Analysen zu Funktionen von zwei Vertretern der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat. der Fakultät für Biologie
der Universität Ulm

vorgelegt von

Susanne Piekenhayn
aus Zittau

2008

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Brennicke

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

Amtierender Dekan der Fakultäten für Naturwissenschaften: Prof. Dr. P. Bäuerle

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Die Photosynthese 1
1.2 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 2
1.2.1 Das Photosystem I (PSI) 3
1.2.2 Das Kernprotein PsaB des PSI 4
1.3 Die Grünalge *Chlamydomonas* (*C.*) *reinhardtii* 5
1.4 Transport von Thylakoidmembran-integrierten Proteinen 6
1.4.1 Proteintransport in den Chloroplasten 6
1.4.2 Transport kernkodierter Proteine in bzw. durch die Thylakoidmembran 7
1.4.3 Integration in die Thylakoidmembran chloroplastenkodierter Proteine 10
1.4.4 Proteintransport in *Synechocystis* 11
1.5 Die Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie 12
1.5.1 Oxa1p und Cox18p 13
1.5.2 YidC 14
1.5.3 Slr1471p in *Synechocystis* 15
1.5.4 Alb3.1p und Alb3.2p in *C. reinhardtii* 16
1.5.5 Alb3p und Alb4p in *A. thaliana* 18

2 Problemstellung 20

3 Materialien und Methoden 22

3.1 Materialien 22
3.1.1 Geräte 22
3.1.2 Chemikalien 23
3.1.3 Enzyme 23
3.1.4 Antikörper 23
3.1.5 Verwendete Organismen 24
3.1.6 Plasmide 25
3.1.7 Kulturmedien 30
3.2 Methoden 32
3.2.1 Mikrobiologische Methoden 32
3.2.2 Nukleinsäuretechniken 34
3.2.3 Quantifizierungen 35
3.2.4 Proteinbiochemische Methoden 35
3.2.5 Gelelektrophoresemethoden 43
3.2.6 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems (Dualsystem Biotech AG, Schweiz) 46
3.2.7 Sequenzierungen 48
3.2.8 Sicherheitsbestimmungen 48

4 Ergebnisse 49

4.1 Interaktionsanalysen im Split-Ubiquitin-System 49
4.1.1 Übersicht der eingesetzten Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine 51
4.1.2 Negativkontrolle der Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine 53
4.1.3 Interaktion zwischen PsaB und Proteinen der verschiedenen Transportwege 55
4.1.4 Interaktionsanalysen zwischen Proteinen der einzelnen Transportwege 60
4.2 Biochemische Untersuchungen zu Alb3.2p aus *C. reinhardtii* 64
4.2.1 Lokalisierung von Alb3.2p 65
4.2.2 Untersuchungen zur Polysomenassoziation von Alb3.2p 68
4.2.3 Co-Immunopräzipitation mit Alb3.2p 73
4.2.4 Quervernetzung von Alb3.2p und seinen Interaktionspartnern 79

5 Diskussion 89

5.1 Interaktionsstudien von Slr1471p aus *Synechocystis* im Split-Ubiquitin-System 89
5.2 Biochemische Untersuchungen zu Alb3.2p in *C. reinhardtii* 95
5.3 Die Funktion der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in Cyanobakterien und höheren Pflanzen 100

6 Zusammenfassung 103

7 Summary 105

8 Literatur 107

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
ARTEMIS	*Arabidopsis thaliana envelope membrane integrase*
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosintriphosphat
BN	blue native
bp	Basenpaare
Chl	Chlorophyll
CoIP	Co-Immunopräzpitation
cp	Chloroplast-
CP43	Chlorophyll-bindendes Protein 43 kDa
CP47	Chlorophyll-bindendes Protein 47 kDa
C. reinhardtii	*Chlamydomonas reinhardtii*
Cub (C)	C-terminaler Teil von Ubiquitin
Cyt	Cytochrom
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DO	Dropout
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fd	Ferredoxin
FeS	Eisen-Schwefel
Flag	Epitop-Markierung: Flag-tag
g	Konstante der relativen Erdbeschleunigung (g = 9,80655 m/s²)
GFP	Green-fluorescent proteins (Grün Fluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Epitop-Markierung: Haemaglutin-tag
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansolfonsäure
His	Histidin
HIS3	Gen für die Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase
HPLC/MS	high performance liquid chromatography/Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
IS	isotonic solution (isotonische Lösung)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	Gen für die ß-Galaktosidase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
LHCP	light harvesting complex proteins (Lichtsammelkomplexproteine)
LiAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
M	Marker
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht

$NAD(P)^+$	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat) (oxidierte Form)
NAD(P)	Nikotinamidadenindinukleotid(phosphat)
Nub (N)	N-terminaler Teil von Ubiquitin
ODnm	optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge (nm)
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert = negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an Protonen einer Lösung
PLV	Transkriptionsfaktor bestehend aus *Staphylococcus aureus*-Protein A, *E. coli* Lex A, H*erpes Simplex* Virus-Transaktivator
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SFAD	Sulfosuccinimidyl-(perfluoroazidobenzamido)ethyl-1,3´-dithiopropionat
sec	*secretion*
sp.	Spezies
Spec	Spectinomycin
SRP	signal recognition particle (Signalerkennungspartikel)
Synechocystis	*Synechocystis* sp. PCC 6803
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAT	twin-arginine-translocation
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung)
TIC	translocon at the inner membrane of chloroplasts
TM	Transmembranbereich
TOC	translocon at the outer membrane of chloroplasts
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethansulfonsäure
Triton X-100	Polyoxyethylen-(9,10)p-t-octylphenol
Trp	Tryptophan
Ub	Ubiquitin
UBP(s)	Ubiquitin-spezifische Protease(n)
UE	Untereinheit
UV	ultraviolette Strahlung
ü.N.	über Nacht
Vis	visable light (sichtbares Licht)
WT	Wildtyp
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid
YNB wo aa	yeast nitrogen base without aminoacids (Hefemedium ohne Aminosäuren)

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Die Photosynthese

Bei der Photosynthese erfolgt die Umsetzung von energiearmen, anorganischen in energiereiche, organische Verbindungen mit Hilfe von Sonnenenergie. Dies stellt die Quelle nahezu der gesamten biologischen Energie dar. Die Photosynthese kommt in Bakterien, einzelligen Eukaryoten (Algen) und höheren Pflanzen vor, dabei sind sich die zugrunde liegenden Mechanismen sehr ähnlich und Unterschiede nur in einigen Details zu finden. Somit sind Erkenntnisse über die Photosynthese von höheren Pflanzen durch Studien an einfacheren Organismen zugänglich.
Photosynthetische Organismen nehmen Sonnenenergie auf, synthetisieren aus CO_2 und H_2O Kohlenhydrate und andere organische Verbindungen, dabei entsteht O_2. Die Bruttogleichung der Photosynthese wird durch die Redox-Reaktion:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Licht}} 6\ O_2 + (CH_2O)$$ beschrieben.

Die Photosynthese umfasst zwei Vorgänge, die Lichtreaktion und die Dunkelreaktion. Während der Lichtreaktion absorbieren Chlorophyll und andere Pigmente der photosynthetischen Zelle Lichtenergie, diese wird in ATP und NADPH gespeichert und gleichzeitig Sauerstoff gebildet. In der Dunkelreaktion, auch CO_2-Fixierungs-Reaktion genannt, dienen die in der Lichtreaktion gebildeten Verbindungen ATP und NADPH dazu, Kohlendioxid zu Kohlenhydraten zu reduzieren.

In höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien wird die Photosynthese durch Kooperation von zwei großen Protein-Cofaktor-Komplexen, dem PSI und PSII angetrieben. Diese sind in der Thylakoidmembran lokalisiert. Die Photosysteme setzen sich aus hydrophoben, transmembranen Proteinuntereinheiten, verschiedenen hydrophilen, peripheren Proteinen und einer Reihe von Cofaktoren zusammen. Die Struktur der Photosysteme ist unter anderem durch Kristallstruktur-Analysen weitestgehend aufgeklärt (Jordan *et al.*, 2001, Zouni *et al.*, 2001). Hingegen sind bezüglich der Biogenese der Photosysteme noch zahlreiche Fragen offen.

In Eukaryoten sind die Untereinheiten der photosynthetischen Komplexe teilweise im Kern-, teilweise im Chloroplastengenom kodiert. Daher liegt für die kernkodierten Proteine eine räumliche Trennung von Kodierungs- und Wirkungsort vor. Diese Proteine werden nach Synthese im Cytoplasma in den Chloroplasten importiert, wobei die anschließende Assemblierung der Untereinheiten der photosynthetischen Komplexe eine aufwendige Regulation erfordert. Diverse Hilfsfaktoren stellen die Funktionalität und Effizienz der Komplexe durch topologisch korrekte Membraninsertion und -faltung der Untereinheiten sowie durch die korrekte Anbindung von Cofaktoren sicher. Die Biogenese der photosynthetischen Komplexe benötigt somit einen koordinierten Transport zur Thylakoidmembran, die Insertion in bzw. Translokation durch die Thylakoidmembran und anschließend die Assemblierung in hochmolekulare Strukturen.

1.2 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Der einzellige Prokaryot *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) gehört zur Gruppe der Cyanobakterien. Diese einzelligen, gram-negativen Bakterien haben mit den heutigen Pflanzen die oxidative Photosynthese gemeinsam (Zak *et al.*, 2001). Nach der allgemein akzeptierten Endosymbiontentheorie haben Chloroplasten ihren Ursprung in einer Cyanobakterien-ähnlichen Zelle. Daher bieten sich für die Analyse des photosynthetischen Apparates der eukaryotischen Zelle Cyanobakterien an (Mereschkowsky, 1905, Abdallah *et al.*, 2000, Raven und Allen, 2003). Im Vergleich zu anderen Eubakterien ist für die Cyanobakterien einzigartig, dass sie ein stark differenziertes Membransystem besitzen. *Synechocystis* ist von zwei Membranen umgeben, der äußeren Membran und der Plasmamembran mit dazwischen liegendem Periplasma. Die Thylakoide sind ein ausgeprägtes intrazelluläres Membransystem, welches nicht kompartimentiert vorliegt (Zak *et al.*, 2001, Spence *et al.*, 2003).

Das Genom von *Synechocystis* hat eine Größe von ca. 3,57 Mbp, kodiert 3168 Proteine und ist das erste vollständig sequenzierte Genom eines photosynthetischen Organismus (Kaneko *et al.*, 1996, Martin und Herrmann, 1998). Aus diesen Gründen bietet sich *Synechocystis* als exzellentes experimentelles Modellsystem für die Untersuchungen der Biogenese der photosynthetischen Apparate an. Weitere Vorteile für eine Verwendung gegenüber eukaryotischen Systemen stellen die natürliche Transformationskompetenz sowie die Integration der aufgenommenen DNA durch homologe Rekombination dar. Dies

erlaubt eine gerichtete Mutagenese und Untersuchungen von Struktur-Funktions-Beziehungen. Die Fähigkeit, photomixotroph auf bzw. in glucosehaltigem Medium zu wachsen, ermöglicht den Eingriff in die photosynthetischen Vorgänge (Williams, 1988, Vermaas, 1994, Zak *et al.*, 2001). *Synechocystis* bietet sich zusätzlich als genetisches Modellsystem an, da es durch die geringe Generationszeit von ca. 18 Stunden eine hohe Wachstumsrate besitzt.

1.2.1 Das Photosystem I (PSI)

Der PSI-Komplex ist ein aus vielen Untereinheiten bestehender Protein-Pigment-Komplex, der in der Thylakoidmembran verankert ist. Dieser Komplex nutzt Lichtenergie um eine stabile Ladungstrennung über die Thylakoidmembran zu erzeugen. Im linearen Elektronentransporter produziert PSI zusammen mit dem PSII, dem Cytochrom b_6f-Komplex und Plastocyanin (oder Cytochrom c_6) NADPH und einen Protonengradienten zwischen Stroma und Thylakoidmembran. Das PSI kann ebenfalls im zyklischen Modus mit dem Cytochrom b_6f-Komplex arbeiten und ausschließlich einen Protonengradienten zur ATP-Herstellung über die ATP-Synthase generieren. Das Elektron wird vom Ferredoxin nicht auf das $NADP^+$ sondern auf den Cytochrom b_6f-Komplex übertragen (Xu und Chitnis, 1995).

Das cyanobakterielle PSI liegt *in vivo* als Trimer vor, wobei die Monomere aus den folgenden zwölf Protein-Untereinheiten aufgebaut sind: PsaA - PsaF, PsaI - PsaM (Jordan *et al.*, 2001). Dabei wurde PsaM nur in Cyanobakterien und in den Chloroplasten einiger niederer Pflanzen und Algen identifiziert. Im Gegensatz zu den Cyanobakterien konnten die Untereinheiten PsaG, PsaH, PsaN, PsaO und PsaP nur in photosynthetischen Eukaryoten gefunden werden (Xu und Chitnis, 1995). Daher besteht der PSI-Komplex in den meisten Pflanzen und Algen aus dreizehn Untereinheiten, davon sind fünf chloroplastenkodiert (PsaA, PsaB, PsaC, PsaI, PsaJ) und acht kernkodiert (PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaK, PsaL, PsaN). Hinzu kommen zahlreichen Redoxfaktoren sowie die Antennenchlorophylle (Abb. 1, Xu und Chitnis, 1995).

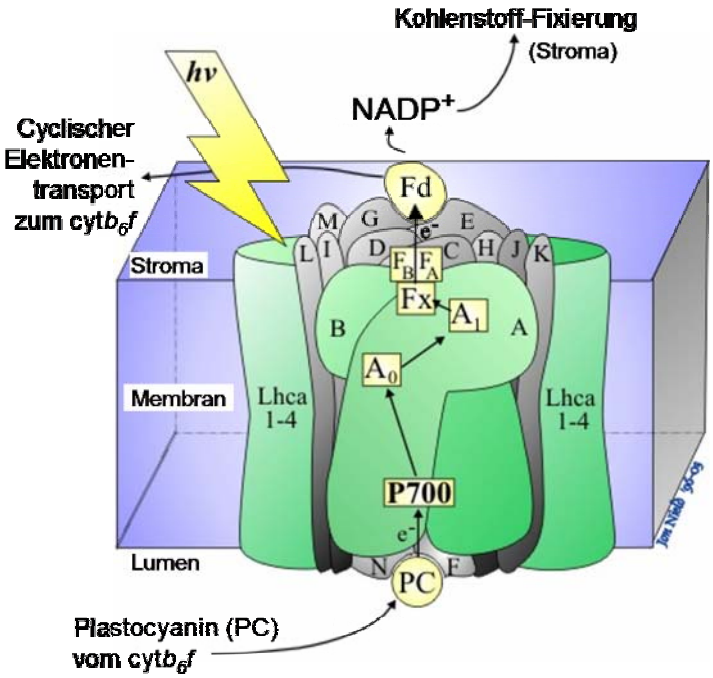

Abb. 1: Die Struktur des PSI-Komplexes.

Der Elektronenfluss durch das PSI ist durch Pfeile gekennzeichnet (veränderte Zeichnung von Jon Nield).

1.2.2 Das Kernprotein PsaB des PSI

Die Kernuntereinheiten PsaA und PsaB des PSI sind homologe integrale Membranproteine mit 45-50 % Sequenzidentität, beide Proteine sind vermutlich durch Genduplikation entstanden. PsaA und PsaB besitzen je elf transmembrane α-Helices, sind je 82 kDa groß und bilden gemeinsam das heterodimere Reaktionszentrum des PSI. Der N-Terminus jeder Untereinheit zeigt in das Chloroplasten-Stroma, der C-Terminus ragt auf die luminale Seite der Thylakoide (Xu und Chitnis, 1995, Wostrikoff *et al.*, 2004). Die Kristallstruktur von PsaA bzw. PsaB ermittelte, dass die sechs N-terminalen Helices die Antennenchlorophylle binden. Die restlichen fünf C-terminalen Helices befinden sich im Zentrum des Komplexes und dienen als Liganden für den primären Donor P700, das Chlorophyll *a*-Dimer A_0, das Chlorophyll *a*-Monomer A_1, das Phylloquinon und den Eisen-Schwefel-Cluster F_x. Die terminalen Elektronenakzeptoren F_A und F_B sind an die Untereinheit PsaC auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran gebunden (Xu und Chitnis, 1995, Rochaix *et al.*, 2000, Dühring *et al.*, 2007). Da das PsaB gemeinsam mit PsaA das heterodimere Reaktionszentrum des PSI bildet, ist die korrekte Integration in die Thylakoidmembran und Assemblierung in das PSI von besonderer Bedeutung.

1.3 Die Grünalge *Chlamydomonas* (*C.*) *reinhardtii*

Die einzellige Grünalge *C. reinhardtii* ist ein Modellsystem für Studien zur Photosynthese und Chloroplasten-Biogenese. *C. reinhardtii* hat einen photosynthetischen Apparat ähnlich dem höherer Pflanzen und besitzt eine hohe Wachstumsrate. Die Grünalge ist fakultativ heterotroph, die Isolierung von Mutanten kann daher unabhängig von Photosynthese und sexuellem Zyklus durchgeführt werden. Damit wird die Varianz von genetischen Studien erhöht. Photosynthetische Mutanten von *C. reinhardtii* können heterotroph auf Medium mit Acetat (exogen) wachsen, dieses wird im Glyoxylatzyklus assimiliert und als reduzierte Kohlenstoffquelle benutzt (de Vitry und Vallon, 1999). Eine bedeutende Eigenschaft von *C. reinhardtii* ist die Chlorophyllsynthese im Dunkeln, dies ermöglicht eine korrekte Assemblierung von photosynthetischen Komplexen auch unter heterotrophen Bedingungen. Dadurch werden während des Wachstums von Mutanten indirekt die Licht-induzierten Stresseffekte minimiert (Nickelsen und Kück, 2000). Diese Merkmale von *C. reinhardtii* erlauben die Isolierung einer breiten Menge an Mutanten mit Defekten in den photosynthetischen Funktionen (Grossmann *et al.*, 2004).

Wie andere photosynthetische Eukaryoten enthält *C. reinhardtii* drei autonome genetische Systeme, diese sind im Nukleus, in den Chloroplasten und in den Mitochondrien lokalisiert. Das Kerngenom besteht aus ungefähr 100000 kbp und repräsentiert die Hauptmenge an DNA in den Zellen. Das Chloroplastengenom zeigt Gemeinsamkeiten zu dem von höheren Pflanzen. Es ist ein zirkuläres, ca. 204 kbp großes Molekül und in 80-100 Kopien vorhanden. Die meisten der ca. 80 Gene kodieren entweder Untereinheiten der photosynthetischen Komplexe oder der Transkriptions- bzw. Translations-Maschinerie. Das Mitochondriengenom ist sehr verschieden zum Chloroplastengenom und beinhaltet mehrere Kopien eines 15,8 kbp großen, linearen Moleküls (Nickelsen und Kück, 2000, Rochaix, 2001).

Transformationsmethoden sind sowohl für das Kerngenom als auch für das Chloroplastengenom etabliert. Spezifische Genunterbrechungen oder ortsspezifische Mutagenese können für jeden Chloroplasten mit Hilfe der homologen Rekombination durchgeführt werden. Im Gegensatz zur Chloroplasten-Transformation wird bei der Kern-Transformation die DNA zufällig in das Kerngenom integriert (Rochaix *et al.*, 2000, Rochaix, 2001).

1.4 Transport von Thylakoidmembran-integrierten Proteinen

1.4.1 Proteintransport in den Chloroplasten

Allgemein akzeptiert ist die Theorie, dass die Chloroplasten der höheren Pflanzen von Cyanobakterien abstammen (Mereschkowsky, 1905, Herrmann, 1997, Raven und Allen, 2003). Während der Endosymbiose sind die meisten Gene der Cyanobakterien in den Kern der Wirtszelle transferiert worden. Daraus resultiert, dass die meisten Chloroplasten-lokalisierten Proteine kernkodiert sind und zunächst importiert werden müssen (Abdallah *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 2002).

Die an cytosolischen Ribosomen synthetisierten Chloroplasten-Proteine werden post-translational in die Organellen transportiert. Der chloroplastidäre Proteinimport durch die Chloroplasten-Hüllmembran wird durch die Toc/Tic-Translokase vermittelt und in drei Schritte unterteilt. Zuerst erkennt der Rezeptor des Toc (translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts)-Komplexes das Transitpeptid des Vorläuferproteins. Im zweiten Schritt wird das Vorläuferprotein in den Toc-Komplex inseriert und nimmt Kontakt zu den Komponenten des Tic (translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts)-Komplexes auf. Im letzten Schritt erfolgt die vollständige Translokation des Vorläuferproteins in das Stroma. Dieser Transport durch die Chloroplasten-Hüllmembran ist ATP- und GTP-abhängig und wird mit Proteinen im ungefalteten Zustand durchgeführt. Des Weiteren sind Chaperone beteiligt, die z. B. die Faltung der Vorläuferproteine verhindern (Di Cola *et al.*, 2005, Jarvis und Robinson, 2004).

Für die Zielsteuerung in das Stroma der Chloroplasten ist das N-terminale Transitpeptid der Vorläuferproteine notwendig. Nach der Translokation durch die äußere und innere Hüllmembran entfernt die „stromal processing peptidase“ (SPP) das Transitpeptid. Für den Transport in das Thylakoidlumen existiert ein separates Signalpeptid am N-Terminus. Daraus resultiert eine zweigeteilte Signalsequenz, wobei Transit- und Signalpeptid hintereinander geschaltet vorliegen. Nach Entfernung des Transitpeptides durch die SPP erfolgt die Freilegung des Thylakoid-Signalpeptides. Dieses Signalpeptid wird nach dem Transport in das Thylakoidlumen durch die „thylakoidal processing peptidase“ (TPP) abgespalten (Di Cola *et al.*, 2005).

1.4.2 Transport kernkodierter Proteine in bzw. durch die Thylakoidmembran

Nach dem Import in den Chloroplasten erfolgt die Zielsteuerung zu den Thylakoiden mit Hilfe von vier Transportwegen. Für die luminalen Proteine, die durch die Thylakoidmembran transloziert werden, sind zwei Translokasen bekannt, die cpTAT („chloroplast twin-arginine-translocase“)- und die cpSec („chloroplast secretion translocase“)-Translokase. Für Proteine, die in die Thylakoidmembran integriert werden, kommen der cpSRP („chloroplast signal recognition particle“)-Transportweg und die spontane Integration in Betracht. Mit Ausnahme der spontanen Integration sind bei allen Transportwegen spezifische Helferproteine an den Integrations- bzw. Translokationsprozessen beteiligt (Abb. 2, Schünemann, 2007).

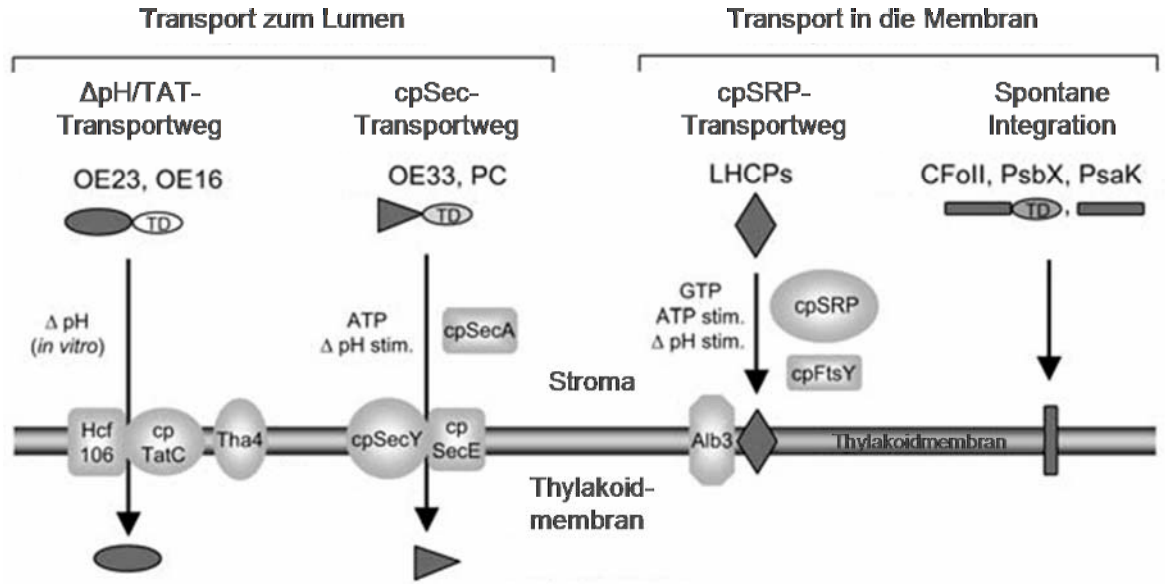

Abb. 2: Transportwege kernkodierter Proteine in bzw. durch die Thylakoidmembran (verändert nach Schünemann, 2007).

Der ΔpH/TAT-Transportweg transportiert ganz oder teilweise gefaltete Proteine mit einem charakteristischen Zwillingsarginin-Motiv (*twin-arginine*) in der N-terminalen Signalsequenz. Die Hauptfunktion ist dabei der Transport von löslichen Proteinen in das Thylakoidlumen. Proteine wie OE23, OE16, PsbT und PsaN werden auf diesem Wege transportiert (Schünemann, 2007). Dieser Transportweg hängt *in vitro* von einem pH-Gradienten über die Thylakoidmembran ab. Als Komponenten werden die integralen Membranproteine Tha4, Hcf106 und cpTatC benötigt. Diese sind den Komponenten des bakteriellen TAT-Transportweges ähnlich und entsprechen den Proteinen TatA, TatB bzw. TatC (Cline und Mori, 2001, Schünemann, 2007). Die Translokase existiert in zwei

Teilkomplexen. CpTatA und Hcf106 bilden ohne Tha4 einen Rezeptorkomplex. Nach Bindung des Substrates über das Signalpeptid an den Rezeptorkomplex und der Bildung eines Protonengradienten erfolgt die Assemblierung von Tha4. Damit ist die aktive Translokase gebildet. Nach dem Transport des Substrates in das Thylakoidlumen zerfällt die Translokase wieder in die Teilkomplexe (Cline und Mori, 2001, Schünemann, 2007). Da mit der TAT-Translokase gefaltete Proteine verschiedener Größe transportiert werden, stellt der Translokationskanal ein flexibles System mit einem variablen Porendurchmesser dar. Der *in vitro* essentielle Protonengradient scheint für die Translokation der TAT-Substrate *in vivo* nicht notwendig zu sein. Die Unterschiede können mit dem Fehlen von bislang unbekannten Faktoren im *in vitro* System erklärt werden (Schünemann, 2007).

Der cpSec-Transportweg ist dem Exportmechanismus von Sec-abhängigen Proteinen in das Periplasma von Bakterien ähnlich (Schünemann, 2007). In den Chloroplasten wird die Translokation von luminalen Proteinen durch die Thylakoidmembran mit Hilfe der heterodimeren cpSecYE-Translokationspore durchgeführt. Die Zielsteuerung benötigt cpSecA, eine ATPase, die als Motor für die ATP-abhängige Translokation von ungefalteten Vorläuferproteinen dient. Proteine wie OE33, PSI-F, Plastocyanin und das chloroplastenkodierte Cytochrom *f* werden mit diesem Transportweg in das Thylakoidlumen transportiert (Schünemann, 2007). Obwohl der chloroplastidäre und der bakterielle Transport Sec-abhängiger Proteine einem sehr ähnlichen Mechanismus folgen, konnten bislang nicht alle Homologe in den Chloroplasten identifiziert werden. Ebenso bleibt ungeklärt, welche stromalen Faktoren in den Chloroplasten existieren, die den ungefalteten Zustand der Proteine erhalten. In Bakterien übernimmt diese Funktion das cytosolische Chaperon SecB, welches das vollständig translatierte Protein bindet und in einem Translokations-kompetenten Status stabilisiert (Schünemann, 2007).

Der post-translationale cpSRP-Weg transportiert spezifisch die kernkodierten Lichtsammelkomplexproteine („Light harvesting complex proteins“, LHCPs) durch das Stroma in die Thylakoidmembran (Schünemann, 2004, Luirink *et al.*, 2005). Das cpSRP besteht aus einer konservierten 54 kDa GTPase (cpSRP54) und einer 43 kDa Untereinheit (cpSRP43). CpSRP54 ist homolog zum bakteriellen cytosolischen SRP, besitzt aber im Gegensatz zum bakteriellen SRP keine RNA-Komponente. Allerdings existiert in den Chloroplasten ein zusätzlicher Proteinfaktor, das cpSRP43, der wiederum in Bakterien nicht vorkommt (Franklin und Hoffmann, 1993, Li *et al.*, 1995, Schünemann *et al.*, 1998,

Klimyuk *et al.*, 1999). Die LHCP-Integration benötigt ein weiteres stromales Protein, das cpFtsY, welches ein Homologes zum bakteriellen SRP-Rezeptor FtsY darstellt (Kogata *et al.*, 1999, Tu *et al.*, 1999). Neben den Komponenten die an der Proteinzielsteuerung beteiligt sind, ist bisher wenig über die Translokase, die die Integration vermittelt, bekannt. Die Mitglieder der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie sind bei der LCHP-Integration an der Translokation beteiligt. Untersuchungen mit anti-Alb3-Antikörper zeigten, dass sich Alb3p an den cpSRP-cpFtsY-Komplex anlagert (Moore *et al.*, 2003). Für YidC in Bakterien ist nachgewiesen, dass YidC sowohl Sec-abhängig als auch Sec-unabhängig arbeiten kann (van der Laan *et al.*, 2005, Yi und Dalbey, 2005). Allerdings findet die post-translationale Insertion der LHCPs unabhängig von der cpSecY-Translokase statt (Klostermann *et al.*, 2002, Schünemann, 2007). Bei der LHCP-Insertion in die Thylakoidmembran bildet sich zunächst der Transitkomplex aus LHCP, cpSRP43 und cpSRP54 (Schünemann *et al.*, 1998, Yuan *et al.*, 2002). Nach der Zielsteuerung zur Thylakoidmembran bindet der Transitkomplex an den cpFtsY-Rezeptor und die GTP-abhängige Integration wird mit Hilfe von Alb3p durchgeführt. Dabei interagiert Alb3p mit cpSRP54, cpSRP43 und cpFtsY im Stroma und bildet einen Membran-gebundenen Komplex (Moore *et al.*, 2003). Bislang ist jedoch wenig über den Mechanismus bekannt, wie die Freisetzung bzw. Insertion der LHCPs in die Thylakoidmembran stattfindet (Schünemann, 2007).

Einige Thylakoidmembranproteine inserieren in die Membran in einem unassistierten, spontanen Transportweg. Dieser benötigt weder stromale Faktoren noch integrale Membranproteine oder Energie. Einige kernkodierte Proteine, wie PsbS, PsbW, PsbX, PsaK und cpSecE benutzen diesen Transportweg für den Import in die Thylakoidmembran (Schünemann, 2007). Details zum Mechanismus sind bislang nicht bekannt. Allerdings scheinen, in Abhängigkeit der Anzahl der zu integrierenden Transmembrandomänen (TM), Unterschiede vorzuliegen (Schünemann, 2007). Für Proteine mit nur einer TM ist diese für die spontane Integration von entscheidender Bedeutung (Thompson *et al.*, 1998). Dagegen spielen für Proteine mit zwei TM der positiv geladene stromale Loop zwischen den TMs eine wichtige Rolle für die Insertion (Zygadlo *et al.*, 2006).

1.4.3 Integration in die Thylakoidmembran chloroplastenkodierter Proteine

Allgemein gültige Mechanismen für die Integration von chloroplastenkodierten Proteinen in die Thylakoidmembran liegen bisher nicht vor. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Transportsysteme, die für kernkodierte Proteine vorhanden sind, an den meist co-translationalen Insertionsprozessen chloroplastenkodierter Proteine beteiligt sind.

In Bakterien ist für die Sec-Translokase neben dem post-translationalen Proteinexport die Beteiligung an der co-translationalen Insertion von SRP-abhängigen Proteinen in die Plasmamembran bekannt. In höheren Pflanzen scheinen in Abhängigkeit des folgenden Integrationsmechanismus zwei verschiedene cpSRP54-Varianten aufzutreten. Ein Teil ist an cpSRP43 gebunden und aktiv an der Transitkomplex-Bildung mit den LHCPs beteiligt (siehe 1.4.2). Der zweite Teil von cpSRP54 liegt in Assoziation mit 70S-Ribosomen unter Abwesenheit von cpSRP43 vor (Franklin und Hoffman, 1993, Schünemann, 2004). Die Funktionsanalyse von cpSRP54 zeigt die Interaktion mit der ersten Transmembrandomäne des PSII-Reaktionszentrumproteins D1. Die direkte Beteiligung von cpSRP54 an der co-translationalen Zielsteuerung plastidenkodierter Proteine wurde durch die Interaktion mit Ribosomen-assoziierten naszierenden D1-Intermediaten (kleiner als 17 kDa) nachgewiesen (Nilsson *et al.*, 1999). In Analogie zur SRP-abhängigen Integration vieler bakterieller Membranproteine ist die Sec-Translokase an der co-translationalen Insertion von D1 beteiligt (Zhang *et al.*, 2001). Mittels BN-PAGE wurde ein 900 kDa cpSecY-Komplex nachgewiesen, der die cpSecY-Translokase in Assoziation mit Ribosomen und naszierenden D1-Fragmenten (17 bis 25 kDa) enthält (Zhang *et al.*, 2001). Diese Interaktion mit D1-Elongationsintermediaten findet nur vorübergehend während der Insertion in die Thylakoidmembran statt. Bei Termination der Translation geht die Interaktion verloren (Zhang *et al.*, 2001, Zhang und Aro, 2002). Somit existiert in höheren Pflanzen ein co-translationaler Insertionsmechanismus, bei dem die Zielsteuerung der Proteine mit Hilfe von cpSRP54 und die Insertion durch die cpSecY-Translokase erfolgen. Die anschließende Assemblierung von D1 in das PSII wird mit Hilfe der Mitglieder der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie vermittelt (Ossenbühl *et al.*, 2004).

Für die Zielsteuerung der chloroplastenkodierten Thylakoidmembranproteine ist nicht ausschließlich das cpSRP54 zuständig. Z. B. zeigen die naszierenden Ketten von Cytochrom *f* keine Interaktion mit cpSRP54. Stattdessen bindet Cytochrom *f* das cpSecA und nutzt die Sec-Translokase für die Integration (Rohl und van Wijk, 2001).

1.4.4 Proteintransport in *Synechocystis*

In *Synechocystis* sind Gene für die Homologen des SRP-, Sec- und Tat-abhängigen Transportweges nachgewiesen (Spence *et al.*, 2003). In einem proteomischen Ansatz wurden Sec- und Tat-abhängige Substrate im Periplasma von *Synechocystis* identifiziert (Fulda *et al.*, 2000). Das deutet darauf hin, dass beide Translokationswege für den Transport von Proteinen durch die Plasmamembran verwendet werden. Aussagen darüber, ob diese Translokationswege für Thylakoidmembranproteine genutzt werden können, liegen nicht vor. Des Weiteren ist wenig darüber bekannt, wie die Zielsteuerung und Translokation der Proteine in die Thylakoidmembran bzw. in das Thylakoidlumen stattfindet (Spence *et al.*, 2003).

Für die Proteine in *Synechocystis* ist denkbar, dass der Transport zunächst in bzw. durch die Plasmamembran erfolgt und die Proteine anschließend von dort weiter an ihren Zielort gelangen (Spence *et al.*, 2003). Einen ersten Hinweis auf dieses Modell lieferten Thylakoidlumenproteine, die im Periplasma detektiert wurden (Smith *et al.*, 1992). Für Untereinheiten des PSI und PSII wurde postuliert, dass die Initiation der Assemblierung in der Plasmamembran und anschließend der Transport zu den Thylakoiden stattfindet (Zak *et al.*, 2001). Für den Transport der Proteine bzw. Komplexe von der Plasmamembran zu den Thylakoiden sind zwei grundlegende Modelle denkbar: laterale Bewegung aufgrund physikalischer Verbindung zwischen den zwei Kompartimenten oder Membranvesikel-Transport (Spence *et al.*, 2003).

Eine Bestätigung, dass die PSII-Biogenese und möglicherweise die Assemblierung weiterer transmembraner Proteinkomplexe im cyanobakteriellen Cytoplasma stattfindet (Zak *et al.*, 2001, Gathmann *et al.*, 2008), erfolgte durch die Bestimmung der zellulären Lokalisation von Slr1471p. Dieses Protein konnte exklusiv in der Cytoplasmamembran von *Synechocystis* nachgewiesen werden (Gathmann *et al.*, 2008). Slr1471p ist ein Mitglied der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie und interagiert mit dem PSII-Kernprotein D1 (Ossenbühl *et al.*, 2006). Slr1471p wurde in Assoziation mit Polysomen und den naszierenden D1-Proteinketten gezeigt und ist demnach an der co-translationalen D1-Integration beteiligt (Sikorski, 2008). Eine direkte Interaktion von Slr1471p mit dem SRP-Homologen Slr1531p wurde nachgewiesen (Sikorski, 2008). Diese Studien zur Integration des PSII-Reaktionszentrumproteins D1 bestätigen das Vorhandensein eines SRP- und Alb3-abhängigen Transportweges in *Synechocystis*. Damit scheint ein co-translationaler Insertionsmechanismus zu existieren, der dem SRP-abhängigen Transportweg chloroplastenkodierter Proteine in höheren Pflanzen entspricht. Für Bakterien ist bekannt,

dass SRP für die Protein-Zielsteuerung zur Sec-Translokase verantwortlich ist. Eine Beteiligung der Sec-Translokase am D1-Integrationsmechanismus ist nicht ausgeschlossen. Allerdings wurden bisher keine weiteren Komponenten oder Chaperone identifiziert, die der D1-Integration in *Synechocystis* assistieren.

1.5 Die Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie

Die Membranproteine der Oxa1/Alb3/YidC-Familie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Insertion und Translokation von Proteinen in bzw. durch biologische Membranen, sondern auch bei der Proteinfaltung und der Assemblierung von Protein-Komplexen. Homologe dieser evolutionär konservierten und ubiquitär vorkommenden Proteinfamilie sind in Eubakterien, Archaebakterien sowie in den Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryoten zu finden (Jiang *et al.*, 2002, Yi und Dalbey, 2005, Kiefer und Kuhn., 2007).
Obwohl die Sequenzidentität zwischen den Mitgliedern der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie relativ gering ist (~ 20 %), können sie sich bis zu einem gewissen Grad gegenseitig ersetzen. Untersuchungen einer *yidC*-Mangelmutante haben ergeben, dass die mitochondrialen Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Oxa1p und Cox18p die essentielle Sec-unabhängige Funktion von YidC komplementieren können (van Bloois *et al.*, 2007, van Bloois *et al.*, 2005). Das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p von *Synechocystis* kann ebenso wie das Alb3p von *A. thaliana* die YidC-Funktion in der *yidC*-Mangelmutante ersetzen (Gathmann *et al.*, 2008, van Bloois *et al.*, 2005, Jiang *et al.*, 2002). Die Mitglieder der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie sind durch diese funktionelle Konservierung charakterisiert.
Für die Funktion der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie ist die konservierte hydrophobe Kerndomäne verantwortlich, die ungefähr 200 Aminosäuren umfasst. Das Hydropathie-Profil weist auf fünf TM hin, die in der C-terminalen Region lokalisiert sind (Abb. 3, Yen *et al.*, 2001). Diese strukturelle Kerndomäne ist flankiert von nicht-konservierten Domänen. In *E. coli* z. B. hat das YidC einen zusätzlichen N-terminalen periplasmatischen Loop und eine weitere TM. Bei dem mitochondrialen Oxa1p hingegen existiert eine C-terminale Verlängerung, die als Ribosomen-Bindedomäne fungiert (van Bloois *et al.*, 2007). Je nach Organismus bzw. zellulärer Lokalisation können neben der konservierten, weitere zusätzliche Funktionen ausgeführt werden.

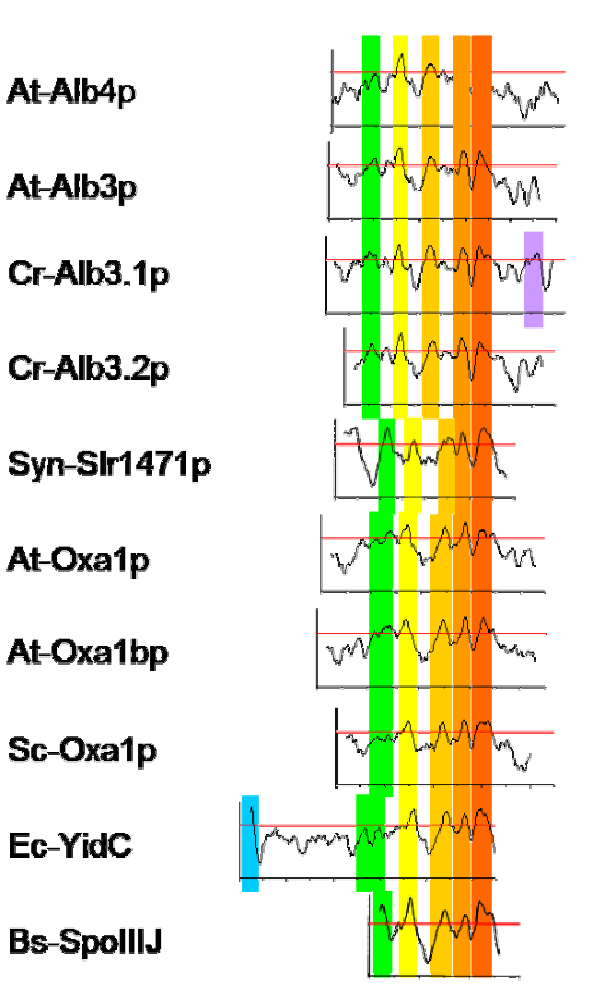

Abb. 3: Hydropathie-Profil einiger Verteter der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie.

Putative Transmembrandomänen sind durch farbige Markierungen gekennzeichet (At: *A. thaliana*, Cr: *C. reinhardtii*, Syn: *Synechocystis*, Sc: *S. cerevisiae*, Ec: *E. coli*, Bs: *Bacillus* (*B.*) *subtilis*).

1.5.1 Oxa1p und Cox18p

Das erste Mitglied der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie wurde in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* identifiziert. Oxa1p (oxidase assembly) ist an der Biogenese der Atmungskettenkomplexe beteiligt (Bauer *et al.*, 1994, Bonnefoy *et al.*, 1994). Oxa1p vermittelt in den Mitochondrien die Insertion und Assemblierung von inneren Membranproteinen, wobei die Substrate wichtige Komponenten der Atmungskette sind (Yi und Dalbey, 2005, Luirink *et al.*, 2001). Die Substrate des Oxa1p sind sowohl kern- als auch mitochondrienkodierte Proteine (Yi und Dalbey, 2005). Dabei arbeitet Oxa1p in den Mitochondrien ausschließlich in einem Sec- und SRP-unabhängigen Mechanismus, da weder Homologe zur Sec-Translokase noch zum SRP-Transportweg identifiziert werden

konnten (Pohlschröder *et al.*, 2005). Oxa1p scheint mit Hilfe einer Kanal-ähnlichen Struktur als Translokase die Proteinintegration durchzuführen. Dies wird vermutet, da Oxa1p aus *Neurospora crassa* als Homo-Tetramer isoliert wurde (Nargang *et al.*, 2002). Die Integration von Oxa1p in die Membran erfolgt durch sich selbst, die Oxa1p-Translokase (Hell *et al.*, 1998). Des Weiteren besitzt Oxa1p eine C-terminale Verlängerung, darüber ist Oxa1p an Ribosomen assoziiert und an der Zielsteuerung naszierender Proteinketten zur Membran beteiligt (Jia *et al.*, 2003, Szyrach *et al.*, 2003). Somit kann Oxa1p neben der post-translationalen auch co-translationale Proteininsertionen vermitteln (Hell *et al.*, 2001).

In den Mitochondrien wurde ein zweites Homologes der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie, das Cox18p, identifiziert (Souza *et al.*, 2000). Cox18p spielt eine wichtige Rolle in der Biogenese des Cytochrom *c*-Oxidase-Komplexes (Saracco und Fox, 2002). Bisherige Studien deuten darauf hin, dass Cox18p ausschließlich Funktionen in post-translationalen Mechanismen übernimmt (Jia *et al.*, 2003, Szyrach *et al.*, 2003).

1.5.2 YidC

YidC von *Escherichia coli* (*E. coli*) ist eine essentielle Komponente bei der Integration und Assemblierung von inneren Membranproteinen (van Bloois *et al.*, 2005, Kiefer und Kuhn, 2005). YidC interagiert direkt mit den naszierenden Ketten der Membranproteine, erkennt die hydrophoben Regionen und katalysiert deren Integration in die Membran-Doppelschicht (Serek *et al.*, 2004). Dies entspricht dem Sec-unabhängigen Insertionsmechanismus, allerdings kann YidC ebenso in Kooperation mit der Sec-Translokase arbeiten (Serek *et al.*, 2004, Samuelson *et al.*, 2000). Die Zusammenarbeit mit der Sec-Translokase wurde durch Quervernetzung von YidC mit naszierenden Proteinketten und SecY nachgewiesen. Des Weiteren konnten YidC und die Sec-Translokase co-gereinigt werden (Scotti *et al.*, 2000, Nouwen und Driessen, 2002). Eine weitere Möglichkeit für YidC ist die Kooperation mit SRP. Einige YidC-Substrate benötigen dabei das SRP zur Zielsteuerung an die Membran (Kiefer und Kuhn, 2007). Von YidC konnten sowohl monomere Formen als auch Dimere isoliert werden (van der Laan *et al.*, 2001). YidC selbst wird durch den klassischen SRP-Sec-Transportweg in die innere Membran inseriert (Koch *et al.*, 2002).

1.5.3 Slr1471p in *Synechocystis*

Im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 existiert ein Oxa1/Alb3/YidC-homologes Protein, Slr1471p, das durch das Gen *slr1471* kodiert wird (Spence *et al.*, 2004). Eine vollständig segregierte Knockout-Mutante des *slr1471*-Gens konnte bisher nicht generiert werden, somit scheint Slr1471p essentiell für die Zelle zu sein (Spence *et al.*, 2004). Untersuchungen einer partiell segregierten Knockout-Mutante lassen für Slr1471p wichtige Funktionen in der Zellteilung sowie in der Membran-Biogenese vermuten (Spence *et al.*, 2004).

Die Fusion des „Green-fluorescent proteins“ (GFP) an den C-Terminus von Slr1471p erzielte eine lichtsensitive Mutante (Ossenbühl *et al.*, 2006). Die Ursache für die Lichtsensitivität der Mutante ist in einem veränderten Redoxpotential der Reaktionszentrumschinone Q_A und Q_B zu finden. Dies wiederum führt zur Photoinhibition des PSII und zu einer verringerten Wachstumsrate (Ossenbühl *et al.*, 2006).

Die Beteiligung von Slr1471p an der Membranintegration des PSII-Reaktionszentrumproteins D1 konnte bereits nachgewiesen werden (Ossenbühl *et al.*, 2006). Die Analyse der GFP-Fusionsmutante mit Hilfe von radioaktiver *in vivo*-Markierung zeigte eine veränderte D1-Integration, da nicht-prozessiertes Vorläufer-D1 (pD1) akkumulierte. Mittels Co-Immunopräzipitation wurde die Interaktion von Slr1471p mit D1 gezeigt, allerdings interagierte Slr1471p-GFP ausschließlich mit pD1. Somit resultierte aufgrund der GFP-Fusion an das Slr1471p eine Beeinträchtigung in der pD1-Faltung und -Integration (Ossenbühl *et al.*, 2006). Mit Hilfe von Polysomenuntersuchungen in *Synechocystis* konnte erstmals die direkte, co-translationale Interaktion zwischen Slr1471p und D1 dargestellt werden. Weiterführende Experimente bewiesen dabei eine co-translationale Beteiligung von Slr1471p an der D1-Integration (Sikorski, 2008).

Mittels Immunogold-Analysen wurde die zelluläre Lokalisation von Slr1471p untersucht und Slr1471p in der Cytoplasmamembran von *Synechocystis* nachgewiesen (Gathmann *et al.*, 2008). In diesen Experimenten konnte die Assoziation zur Thylakoidmembran nicht detektiert werden (Gathmann *et al.*, 2008). Die Lokalisation von Slr1471p in der Cytoplasmamembran korreliert mit der postulierten Initiation der PSII-Biogenese in der Cytoplasmamembran (Zak *et al.*, 2001). Das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p in *Synechocystis* ist demnach ein Cytoplasmamembran-gebundenes Chaperon, dass für die korrekte Membranintegration, Faltung und Assemblierung des PSII-Reaktionszentrumproteins D1 essentiell ist (Ossenbühl *et al.*, 2006).

In den Oxa1/Alb3/YidC-Homologen der Cyanobakterien konnte eine hochkonservierte periplasmatische Domäne zwischen der zweiten und dritten TM identifiziert werden (Gathmann *et al.*, 2008). Über die Funktion dieser einzigartigen Domäne ist bisher wenig bekannt, möglicherweise ist sie an der Organisation der Transmembranstruktur von Slr1471p beteiligt. Eine zusätzliche spezifische Funktion dieser hochkonservierten Domäne in Cyanobakterien wird vermutet (Gathmann *et al.*, 2008).

1.5.4 Alb3.1p und Alb3.2p in *C. reinhardtii*

In der Grünalge *C. reinhardtii* sind zwei Oxa1/Alb3/YidC-Homologe kodiert, Alb3.1p und Alb3.2p. Alb3.1p ist ein 60 kDa großes, in der Thylakoidmembran lokalisiertes Protein. Mittels Saccharosedichtegradienten wurde eine Alb3.1p-Assoziation an ca. 600-700 kDa große Komplexe nachgewiesen. Die genauen Bestandteile der Alb3.1p-Komplexe sind jedoch nicht bekannt. Zum einen könnte eine Assoziation mit cpFtsY vorliegen, die während der LHCP-Integration stattfindet. Zum anderen ist denkbar, dass der Komplex die Sec-Translokase beinhaltet (Bellafiore *et al.*, 2002).

In der *C. reinhardtii*-Mutante *ac29* liegt eine Deletion des *alb3.1*-Gens vor (Bellafiore *et al.*, 2002). Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die *ac29*-Mutante eine Reduktion der Chlorophyllmenge auf 30 % und der LHCPs von PSI und PSII auf 5-10 %. Des Weiteren ist die PSII-Akkumulation beeinträchtigt, im Gegensatz dazu sind das PSI, der Cytochrom b_6f-Komplex und die ATP-Synthase kaum beeinflusst (Bellafiore *et al.*, 2002). Der Phänotyp der *ac29*-Mutante ist wesentlich schwächer ausgeprägt als in der entsprechenden *alb3*-Mutante in *A. thaliana*, ein eingeschränktes photoautotrophes Wachstum ist möglich (Sundberg *et al.*, 1997, Bellafiore *et al.*, 2002). Durch die Deletion des *alb3.1*-Gens liegt die Menge der plastidenkodierten PSII-Reaktionszentrumproteine um 50 % reduziert vor (Bellafiore *et al.*, 2002).

Alb3.1p übernimmt zwei voneinander unabhängige Funktionen in der Assemblierung der Photosysteme. Zum einen ist Alb3.1p an der post-translationalen Integration der kernkodierten LHCPs in die Thylakoidmembran via SRP-Transportweg beteiligt (Bellafiore *et al.*, 2002). Zum anderen übernimmt Alb3.1p eine Chaperon-ähnliche Funktion bei der Integration von D1 in das PSII (Bellafiore *et al.*, 2002, Ossenbühl *et al.,* 2004).

Für das zweite Oxa1/Alb3/YidC-Homologe zeigt die Proteinsequenz eine höhere Ähnlichkeit zu *A. thaliana* Alb3p als zu Alb3.1p. Alb3.2p ist 40 kDa groß und in der Thylakoidmembran lokalisiert. Die Assoziation an große Komplexe (600-700 kDa) wurde mittels Saccharosedichtegradienten und BN-PAGE nachgewiesen, dabei wurde die Co-Fraktionierung von Alb3.2p und Alb3.1p detektiert. Des Weiteren konnte die direkte Interaktion von Alb3.1p und Alb3.2p mit Hilfe der CoIP nachgewiesen werden. Dies sind Hinweise darauf, dass beide Proteine in einem Komplex gemeinsame Funktionen ausführen können (Göhre *et al.*, 2006). In der BN-PAGE wurde Alb3.2p in Assoziation mit dem PSII-Kernkomplex nachgewiesen. Die direkte Interaktion von Alb3.2p mit D1 und D2 bestätigt diesen Hinweis. Als weitere Interaktionspartner wurden die LHCPs und PsaA identifiziert (Göhre *et al.*, 2006).

Die Reduzierung der Alb3.2p-Menge mittels RNAi in *C. reinhardtii* führt zur Verminderung der PSI- und PSII-Untereinheiten, wobei der Cytochrom b_6f-Komplex und die ATP-Synthase unverändert vorliegen. Dies deutet auf eine Funktion von Alb3.2p in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe hin. Eine Beteiligung von Alb3.2p an der PSII-LHCII-Superkomplexbildung wird vermutet. Komplementäre Aufgaben von Alb3.1p und Alb3.2p in der Assemblierung von photosynthetischen Komplexen sind denkbar (Göhre *et al.*, 2006).

Eine *alb3.*2-Deletionsmutante konnte bisher nicht generiert werden. Dies ist ein Hinweis auf eine oder mehrere essentielle Funktionen von Alb3.2p (Göhre *et al.*, 2006).

Mittels RNAi konnte die Alb3.2p-Menge auf 25-50 % des Wildtyps reduziert werden, dabei wurden elektronenmikroskopisch strukturelle Veränderungen in der Zelle beobachtet. Die Zunahme der Vakuolengröße führte zum Zelltod. Der genaue Grund für die Einleitung des Zelltodes ist bislang ungeklärt, einen Hinweis liefert jedoch die Interaktion von Alb3.2p mit dem „Vesicle-inducing protein“ (VIPP1). Dieses Protein ist am Lipidtransfer und am Aufbau der Thylakoiden via Vesikeltransport beteiligt. Eine Erklärung wäre die Beteiligung von Alb3.2p an der VIPP1-Insertion in die Thylakoidmembran. Eine andere Möglichkeit besteht in der direkten Beteiligung von Alb3.2p am Aufbau der Thylakoidmembranen. In Analogie zu den Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in Cyanobakterien und *A. thaliana* kann eine essentielle Rolle in der Strukturerhaltung der Chlorplasten angenommen werden (Göhre *et al.*, 2006).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Alb3.2p essentiell für das Zellwachstum auch unter heterotrophen Bedingungen ist. Das deutet darauf hin, dass dieses Protein neben

seiner Rolle in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe weitere Funktionen in derzeit unbekannten, essentiellen zellulären Wegen besitzt.

1.5.5 Alb3p und Alb4p in *A. thaliana*

In *A. thaliana* wurde das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Alb3p bei der Charakterisierung der *albino3* (*alb3*)-Mutante identifiziert (Long *et al.*, 1993). Durch Sequenzähnlichkeiten konnte Alb3p der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie zugeordnet werden, mit Hilfe von Komplementationsversuchen wurde dies bestätigt (Sundberg *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 2002). Das kernkodierte Alb3p wird in den Chloroplasten importiert und ist in der Thylakoidmembran lokalisiert (Sundberg *et al.*, 1997).

Homozygote *alb3*-Mutanten sind steril und können ohne externe Kohlenstoffquelle nicht über das Keimlingsstadium hinaus wachsen. Die *alb3*-Mutanten zeigen einen albinotischen Phänotyp, elektronenmikroskopisch konnte die Beeinträchtigung der Chloroplasten-Morphologie nachgewiesen werden. Dabei ist die Menge der Thylakoidmembranen reduziert und die Grana-Thylakoide fehlen fast vollständig (Sundberg *et al.*, 1997). Der Chlorophyllgehalt ist in den Blättern der *alb3*-Mutante auf 5 % des Wildtyps reduziert. Der Phänotyp dieser Mutante deutet darauf hin, dass Alb3p eine wichtige Funktion in der Chloroplasten-Biogenese übernimmt (Sundberg *et al.*, 1997).

Durch *in vitro*-Experimente konnte bewiesen werden, dass Alb3p für die Assemblierung der LHCPs in die Thylakoidmembran benötigt wird. Dabei wurde durch Inkubation der Thylakoidmembranen von *A. thaliana* mit Antikörper gegen Alb3p die Integration der LCHPs blockiert (Moore *et al.*, 2000). Bisherige Daten deuten darauf hin, dass die post-translationale Integration der LHCPs durch einen cpSRP/Alb3p-abhängigen und cpSec-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird (Moore *et al.*, 2003). Allerdings konnte eine Assoziation zwischen Alb3p und der cpSecY-Translokase nachgewiesen werden (Klostermann *et al.*, 2002, Moore *et al.*, 2003, Pasch *et al.*, 2005). Damit besteht die Möglichkeit, dass beide Proteine an der Insertion oder Assemblierung von chloroplastenkodierten Thylakoidmembranproteinen beteiligt sind (Schünemann, 2007). Das PSII-Reaktionszentrumprotein D1 nutzt einen cpSecY-, Alb3p- und cpSRP54-abhängigen Transportweg. Für die Zielsteuerung der naszierenden Proteinketten an die Thylakoidmembran wird das cpSRP54, für die anschließende D1-Insertion die cpSecY-Translokase benötigt (Nilsson *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2001). Die genaue Funktion von

Alb3p bei der D1-Biogenese ist bislang ungeklärt. Vermutet wird eine Funktion in der Assemblierung von D1 in das PSII (Schünemann, 2007).
Der starke Phänotyp der *alb3*-Mutanten in *A. thaliana* kann nicht ausschließlich auf fehlende LHCPs zurückgeführt werden. Eine Beteiligung von Alb3p an der Chloroplasten-Biogenese wird vermutet (Sundberg *et al.*, 1997).

Das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Alb4p ist ein 55 kDa großes Protein, das zunächst als Artemis identifiziert wurde (Gerdes *et al.*, 2006). Alb4p ist in der Thylakoidmembran der *A. thaliana*-Chloroplasten lokalisiert (Gerdes *et al.*, 2006). Obwohl Alb3p und Alb4p eine starke Konservierung in ihrer Sequenz vorweisen, kann Alb4p den starken Phänotyp in der *alb3*-Mutante nicht verhindern bzw. den Verlust von Alb3p kompensieren (Sundberg *et al.*, 1997). Dies deutet auf eine spezialisierte Funktion von Alb4p hin.
A. thaliana-Mutanten mit einem auf ca. 90 % reduzierten Alb4p-Level sind lebensfähig und haben bei normalen Wachstumsbedingungen keinen sichtbaren Phänotyp (Gerdes *et al.*, 2006). Allerdings kann ein Effekt auf die Chloroplasten- und Thylakoidmembran-Struktur beobachtet werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Chloroplasten sind die Plastiden der *alb4*-Mutanten vergrößert und sphärischer, die Grana-Thylakoide hingegen weniger gestapelt. Im Gegensatz zu Alb3p scheint Alb4p nicht essentiell für die Chloroplasten-Entwicklung zu sein, jedoch eine wichtige Rolle in der korrekten Ausbildung der Chloroplasten-Ultrastruktur zu spielen (Gerdes *et al.*, 2006).

In *A. thaliana* konnten insgesamt sechs Gene identifiziert werden, die Oxa1/Alb3/YidC-homologe Proteine kodieren. Neben Alb3p und Alb4p existieren demnach vier weitere Proteine über deren Funktion wenige Informationen vorliegen. Bekannt ist, dass ein Gen eine Signalsequenz für den Transport in den Chloroplasten aufweist und die drei anderen Gene Signalsequenzen für den Transport in die Mitochondrien besitzen (Luirink *et al.*, 2001).

2 Problemstellung

Die Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie spielt eine wichtige Rolle bei der Insertion und Translokation von Proteinen in bzw. durch biologische Membranen, sowie bei der Proteinfaltung und der Assemblierung von Protein-Komplexen (Yi und Dalbey, 2005, Kiefer und Kuhn, 2007). Die Funktion der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie wird durch eine konservierte hydrophobe Kerndomäne ermöglicht, welche fünf Transmembrandomänen entspricht und in der C-terminalen Region lokalisiert ist (Yi *et al.*, 2005). Die strukturelle Kerndomäne ist flankiert von nicht-konservierten Domänen, daher können je nach Organismus bzw. zellulärer Lokalisation neben der konservierten zusätzliche spezialisierte Funktionen ausgeführt werden.

Basierend auf den Informationen, dass *Synechocystis* Gene für die Homologen des SRP-, Sec- und Tat-abhängigen Transportweges besitzt (Spence *et al.*, 2003), sollten Vertreter dieser Transportwege auf wechselseitige Interaktionen hin untersucht werden. Des Weiteren ist bekannt, dass das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p in *Synechocystis* an der co-translationalen Insertion von D1 beteiligt ist (Sikorski, 2008). Die direkte Interaktion von Slr1471p mit D1 konnte sowohl im Split-Ubiquitin-System, als auch in *Synechocystis* mit Hilfe von Co-Immunopräzipitation und Polysomenuntersuchungen nachgewiesen werden (Ossenbühl *et al.*, 2006, Sikorski, 2008). Das deutet darauf hin, dass das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p eine bedeutende Funktion als co-translationale Integrase in *Synechocystis* einnimmt.
Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Split-Ubiquitin-System für detaillierte Interaktionsstudien zu den Transportmechanismen von Proteinen aus *Synechocystis* einzusetzen. Von besonderem Interesse sind dabei der Nachweis einer Beteiligung von Slr1471p an der Integration des PSI-Reaktionszentrumproteins PsaB sowie die Identifizierung von Interaktionspartnern des PsaB. Zur weiteren Charakterisierung von PsaB sollten interaktionsaktive Bereiche analysiert werden, die Rückschlüsse auf einen Integrationsmechanismus ermöglichen. Das Slr1471p interagiert über die N-terminalen Helices 1-3 direkt mit Slr1531p (Sikorski, 2008), dieses Ergebnis wird überprüft und durch weitere Analysen zu den interaktionsaktiven Bereichen in Slr1471p ergänzt. Damit sollten erste Aussagen möglich sein, wie die Proteine in *Synechocystis* miteinander in Verbindung stehen und welche Transportwege demnach vorliegen.

Des Weiteren soll im Rahmen dieser Arbeit das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Alb3.2p der Grünalge *C. reinhardtii* untersucht werden. Alb3.2p ist in der Thylakoidmembran lokalisiert und mit großen Komplexen assoziiert. Einige Interaktionspartner von Alb3.2p konnten mittels CoIP identifiziert werden, dazu gehören Alb3.1p, D1 und D2, sowie die LHCPs und PsaA. Zusätzlich interagiert Alb3.2p mit dem „Vesicle-inducing protein“ (VIPP1), welches am Lipidtransfer und am Vesikeltransport in die Plastiden beteiligt ist. Die Reduzierung der Alb3.2p-Menge mittels RNAi in *C. reinhardtii* verursacht die Zunahme der Vakuolengröße und führt zum Zelltod. Zusätzlich zeigt die Abnahme der Alb3.2p-Menge durch RNAi einen Effekt auf die Akkumulation der PSI- und PSII-Untereinheiten (Göhre *et al.*, 2006). Somit ist Alb3.2p in *C. reinhardtii* essentiell für das Zellwachstum auch unter heterotrophen Bedingungen. Das deutet darauf hin, dass dieses Protein neben seiner Aufgabe in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe weitere Funktionen besitzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion von Alb3.2p hinsichtlich der Beteiligung an essentielle zelluläre Wege zu untersuchen. Dazu sollen biochemische Experimente durchgeführt werden, die Rückschlüsse auf die Alb3.2-Funktion zulassen. Die Assoziation von Alb3.2p zu Polysomen soll durch Co-Fraktionierung im Saccharosedichtegradienten analysiert werden. Durch Co-Immunopräzipitation und HPLC/MS-Analyse sowie durch Quervernetzungsexperimente sollen weitere Interaktionspartner von Alb3.2p identifiziert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Blotter
Elektroblotter, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Photometer
Hanna, HI 83141, Hanna Instruments®, USA

Filme
Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig

Filter und Membranen
Nitrozellulosemembran (Whatman Optitran BA-S 85 Reinforced NC), Schleicher & Schüll, Dassel
Rundfilter, Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman-Filterpapier, Schleicher & Schüll, Dassel

MACS® System, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
µMACS, MiniMACS-MACS® Multi Stand
MACS® Separation Columns (20µ, 10M Columns)
µMACS® ProteinA-MicroBeads

Thermocycler
Robocycler Gradient 40, Stratagene, USA

Zellzüchtung
Brutschränke 30 °C, Memmert, Schwabach
37 °C, Heraeus Instruments, Hanau
Schüttler, CH-4015, INFORS AG, Schweiz
Rührer, IKAMAG Labortechnik, Staufen

Zentrifugen
Allegra 25R Centrifuge (Rotor:TS-5,1-500), Beckman Coulter, Krefeld
J2-21M/E Centrifuge (Rotor: JLA-10.5, JS-13.1), Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge, Beckman Coulter, Krefeld
Force 7 Tischzentrifuge, Denver Instruments, Göttingen
Biofuge Primo R, Heraeus, Hanau

3.1.2 Chemikalien

Agarose	Peqlab, Erlangen
X-Gal	Duchefa, Großbritannien
Desoxyribonukleosid-5´-triphosphat (dNTPs)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Digitonin	Calbiochem, Darmstadt
Hefeextrakt	Duchefa, Großbritannien
Hefemedium ohne Aminosäuren (YNB wo aa)	Difco, USA
Heringssperma-DNA	Clonetech, USA
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Micro-Agar	Duchefa, Großbritannien
Pepton	Duchefa, Großbritannien
Percoll	GE Healthcare, Großbritannien
SFAD	Pierce, USA
Trypton	Duchefa, Großbritannien

Alle sonstigen Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham, Braunschweig; Applichem, Darmstadt; Boehringer, Ingelheim; Calbiotech, USA; Fluka, München; Merck, Darmstadt; Qiagen, Hilden; Riedel de Häen, Seelze; Roche, Schweiz; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, München und VWR International Normapur, Darmstadt bezogen.

3.1.3 Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Merck, Darmstadt
Platinum® Taq-DNA-Polymerase High Fidelity®	Invitrogen, Karlsruhe
Polynukleotidkinase (PNK)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinaseinhibitor	Roche, Schweiz
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega, Mannheim
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Die von den Enzymen katalysierten Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.4 Antikörper

α-Alb3.2; polyklonales Antiserum aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:10000; von Prof. J.-D. Rochaix zur Verfügung gestellt; Göhre *et al.*, 2006)
α-ATPase subunit beta; polyklonales Antiserum aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-Flag; aus Maus (verwendete Verdünnung: 1:5000; Covance, USA)
α-Kaninchen-IgG aus Esel; konjugiert mit Meerrettichperoxidase (verwendete Verdünnung: 1:5000; GE Healthcare, Großbritannien)

α-LHCII; polyklonal (total IgG), aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:10000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-Maus-IgG aus Ziege; konjugiert mit Meerrettichperoxidase (verwendete Verdünnung: 1:5000; Novagen, USA)
α-Mono HA.11; aus Maus (verwendete Verdünnung: 1:1000; Covance, USA)
α-RbcL (α-RuBisCO): polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen das aufgereinigte RuBisCO-Holoenzym aus Spinat (verwendete Verdünnung: 1:2000; von G. Wildner zur Verfügung gestellt).

3.1.5 Verwendete Organismen

3.1.5.1 Escherichia (E.) coli

DH5α: *end*A1, *deo*R, *hsd*R17, *sup*E44, *thi*-1, *rec*A1, *gyr*A96, *rel*A1, (*res* $^{-}$, *mod*$^{+}$), ΔU169,(m80*lac*ZΔM15), F^{-}, Rezipientenstamm für die Vermehrung von Plasmidvektoren und deren Derivaten (Hanahan, 1983).

3.1.5.2 *Saccharomyces (S.) cerevisiae*

DSY-1: MATa *his*3delta200 *trp*1-901 *leu*2-3,112 *ade*2 LYS2:: (lexAop) 4-HIS3 *URA*3:: (*lex*Aop) 8-*lac*Z GAL4 (Dualsystems Biotech AG 2005, Schweiz).

3.1.5.3 *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803: Wildtyp (Rippka *et al.*, 1979).

3.1.5.4 *Chlamydomonas (C.) reinhardtii*

C. reinhardtii CW15: Kernmutante mit reduzierter Zellwand (Harris, 1989).
C. reinhardtii CW15HF: Kernmutante mit reduzierter Zellwand, in der Epitop-Markierungen in den Proteinen Alb3.2p (3facher FLAG-tag; Sequenz: DYKDDDDK-DYKDDDDK-DYKDDDDK) und Alb3.1p (3facher Haemaglutin-tag; Sequenz: YPYDVPDYA-YPYDVPDYA-YPYDVPDYA) C-terminal eingefügt worden sind (Harris, 1989; Göhre *et al.*, 2006).

3.1.6 Plasmide

3.1.6.1 Vektoren

Die in den Klonierungen verwendeten Vektoren sind der Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCRII	*lac*Z-Gene, M13 reverse priming site, M13 forward priming site, T7-Promotor, f1 origin, Kanamycin-Resistenz, Ampicillin-Resistenz, pUC origin	Invitrogen, Karlsruhe
pBluescript II KS^+ ($pBSIIKS^+$)	CAP protein binding site (compl. strand); mRNA (*lac*Z) starts; *lac* repressor binding site; f1 packaging signal [pBluescript II SK/KS(+)]; f1 packaging signal [pBluescript II SK/KS(-)]	Stratagene, USA
pADSL-Nx	*E. coli* Shuttle-Vektor, *ADH*1-Promotor, *CYC*1 *S. cerevisiae*-Terminator, *TRP*1 *S. cerevisiae* auxotropher Selektionsmarker, Hefe 2 micron origin, Ampicillin-Resistenz	Dualsystems Biotech AG, Schweiz
pTFB1	*E. coli* Shuttle-Vektor, *TEF*1-Promotor, VP16 *Herpes simplex*-Transaktivator, *CYC*1 *S. cerevisiae*-Terminator, *Leu*2 *S. cerevisiae* auxotropher Selektionsmarker, *CEN/ARS* origin of replication, Kanamycin-Resistenz	Dualsystems Biotech AG, Schweiz
pAMBV4	*E. coli* Shuttle-Vektor, starker *ADH*1-Promoter, Cub-Aminosäuren aus Hefe-Ubiquitin, LexA-Aminosäuren, VP16 *Herpes simplex*-Transaktivator, *CYC1* *S. cerevisiae*-Terminator, *LEU*2 *S. cerevisiae* auxotropher Selektionsmarker, *CEN/ARS* origin of replication, Kanamycin-Resistenz, medium-copy Expressionsvektor	Dualsystems Biotech AG, Schweiz
pTMBV4	*E. coli* Shuttle-Vektor, starker *TEF*1-Promoter, Cub-Aminosäuren aus Hefe-Ubiquitin, LexA-Aminosäuren, VP16 *Herpes simplex*-Transaktivator, *CYC*1 *S. cerevisiae* Terminator, *LEU*2 *S. cerevisiae* auxotropher Selektionsmarker, *CEN/ARS* origin of replication, Kanamycin-Resistenz, high-copy-Expressionsvektor	Dualsystems Biotech AG, Schweiz
pAlg5-N*ub*G	*ADH*1 Promoter, Alg5 open reading frame, N*ub*G-Aminosäuren aus Hefe-Ubiquitin, Hefe 2 micron origin, *TRP*1 *S. cerevisiae* auxotropher Selektionsmarker, Ampicillin-Resistenz	Dualsystems Biotech AG, Schweiz
pMBV-Alg5	starker *ADH*1-Promoter, Cub-Aminosäuren aus Hefe-Ubiquitin, LexA-Aminosäuren, Alg5 open reading frame, VP16 *Herpes simplex*-Transaktivator, *CYC1 S. cerevisiae*-Terminator, *LEU*2 *S. cerevisiae* auxotropher Selektionsmarker, *CEN/ARS* origin of replication, Kanamycin-Resistenz	Dualsystems Biotech AG, Schweiz

3.1.6.2 Generierte Plasmide

Im Rahmen der Arbeit wurden die folgenden Plasmidkonstrukte hergestellt und verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten bzw. generierten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
Slr1471p-N	Enthält die Positionen +1 bis +1152* des *slr*1471-Gens zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Bam*HI und *Eco*RI in dem Vektor pADSL-Nx	Prof. Dr. J. Nickelsen pers. Mitteilung
Slr1471p-C	Enthält die Positionen +1 bis +1152* des *slr*1471-Gens zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Xba*I und *Stu*I in dem Vektor pTMBV4	Prof. Dr. J. Nickelsen pers. Mitteilung
Slr1471p/ H1-3-C	Enthält die Positionen +1 bis +771* des *slr*1471-Gens, PCR von den Oligonukleotiden TMBVhintenfw und synoxa1-3rewneu über SynOxa-C gefolgt von Selbstligation in dem Vektor pTMBV4	Sikorski, 2008 pers. Mitteilung
Slr1471p/ H4-5-C	Enthält die Positionen +772 bis +1152* des *slr*1471-Gens, PCR von den Oligonukleotiden TMBVvornrew und synoxa4-6fw über SynOxa-C gefolgt von Selbstligation in dem Vektor pTMBV4	Sikorski, 2008 pers. Mitteilung
pADSL-Nx-cpSecE	Enthält die Positionen +1 bis +531* der cpSecE-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Bam*HI und *Sal*I in dem Vektor pADSL-Nx	Pasch *et al.* (2005)
pTMBV4-cpSecY	Enthält die Positionen +364 bis +1688* der cpSecY-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Xba*I und *Sal*I in dem Vektor pAMBV4	Pasch *et al.* (2005)
Slr1046p-N	ca. 0,4 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden synTatAsus_fw und synTatAsus_rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +380* der cpTatA-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
Sll1814p-N	ca. 1,3 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden synSecYsus_fw und synSecYsus_rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1328* der cpSecY-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
Slr1531p-N	ca. 1,4 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden 1531-split-fw und 1531-split-rw, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1454* der cpSRP54-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
Slr2102p-N	ca. 1,5 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden 2102-split-fw und 2102-split-rw, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1520* der cpFtsY-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit

Slr1046p-C	ca. 0,4 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden synTatA_pAMBV_fw und synTatA_pAMBV_rev, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +377* der cpTatA-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Xba*I und *Nco*I in dem Vektor pAMBV4	diese Arbeit
Sll1814p-C	ca. 1,3 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden synSecY_pAMBV_fw und synSecY_pAMBV_rev, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1325 der cpSecY-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Xba*I und *Nco*I in dem Vektor pAMBV4	diese Arbeit
Slr1531p-C	ca. 1,45 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden synSRP54_pAMBV_fw und synSRP54_pAMBV_rev, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1446* der cpSRP54-cDNA zwischen den Restriktionserkennungs-sequenzen *Xba*I und *Nco*I in dem Vektor pAMBV4	diese Arbeit
Slr2102p-C	ca. 1,5 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden synFtsY_pAMBV_fw und synFtsY_pAMBV_rev, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1512* der cpFtsY-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Xba*I und *Eco*147I (*Stu*I) in dem Vektor pAMBV4	diese Arbeit
pCRII-PsaBH1-6	ca. 1,2 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynB-H6 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1235* der cpPsaB-cDNA in dem Vektor pCRII	diese Arbeit
pCRII-PsaBH7-11	ca. 1,0 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H7 fw und SynB-H11 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1212 bis +2196* der cpPsaB-cDNA in dem Vektor pCRII	diese Arbeit
pKS^{+}-PsaBH1-11	ca. 2,2 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynB-H11 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +2196* der cpPsaB-cDNA in dem Vektor pKS	diese Arbeit
PsaB/ H1-11-N	ca. 2,2 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynB-H11 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +2196* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H1-N	ca. 0,3 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynB-H11 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +339* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI und *Hin*cII in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H1-2-N	ca. 0,5 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynBH1-H2_rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +504* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit

PsaB/ H1-3-N	ca. 0,6 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynB-H11 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +607* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI und *Sma*I in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H1-4-N	ca. 0,9 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynBH1-H4_rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +903 der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H1-5-N	ca. 1,1 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynBH1-H5_rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1080* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H1-6-N	ca. 1,2 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynB-H1 fw und SynB-H6 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +1 bis +1235* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H3-4-N	ca. 0,4 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynBH3-4_fw und SynBH1-H4_rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +483 bis +903* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit
PsaB/ H5-6-N	ca. 0,4 kb PCR-Produkt von den Oligonukleotiden SynBH5-6_fw und SynB-H6 rew, dieses Fragment umfasst die Positionen +882 bis +1235* der cpPsaB-cDNA zwischen den Restriktionserkennungssequenzen *Eco*RI (aus pCRII-Vektor) in dem Vektor pADSL-Nx	diese Arbeit

* relativ zum Translationsstart des entsprechenden Gens

3.1.6.3 Oligonukleotide

Für die Amplifizierung der Genprodukte in der PCR eingesetzte Oligonukleotide sind in der Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: In der Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Position*
synSecYsus_fw	TAGGCCTTATGGTCGTAAGTCGAG	+1 bis +16
synSecYsus_rew	TAGGCCTTTTAGGGTTGTTTAATCATTC	+1308 bis +1328
synTatAsus_fw	TAGGCCTTATGGCATTGACCTTGGTTATG	+1 bis +21
synTatAsus_rew	TAGGCCTTTTAGCTGGCCTTTTCTG	+380 bis +363
1531-split-fw	TAGGCCTTATGTTTGATGCCTTAGCCG	+1 bis +19

1531-split-rw	TAGGCCTTAAGCTGGCCAAAACCTTTTTTC	+1454 bis +1424
2102-split-fw	TAGGCCTTATGTTTAATTGGTTCCGTCG	+1 bis +20
2102-split-rw	TAGGCCTTACCGTTTAGTAGGGCTTCAAC	+1520 bis +1491
synSecY_pAMBV_fw	AATTCTAGAAAATGGTCGTAAGTCGAG	+1 bis +16**
synSecY_pAMBV_rev	ATTCCATGGTAGGGTTGTTTAATCATTC	+1308 bis +1325**
synTatA_pAMBV_fw	AATTCTAGAAAATGGCATTGACCTTGG	+1 bis +16**
synTatA_pAMBV_rev	ATTCCATGGTAGCTGGCCTTTTCTG	+377 bis +363**
synSRP54_pAMBV_fw	AATTCTAGAGCATGTTTGATGCCTTAGCC	+1 bis +18**
synSRP54_pAMBV_rev	ATTCCATGGTAAAGCTGGCCAAAACC	+1446 bis +1432**
synFtsY_pAMBV_fw	AATTCTAGAGGATGTTTAATTGGTTCC	+1 bis +16**
synFtsY_pAMBV_rev	ATTAGGCCTTCACCGTTTAGTAGGG	+1512 bis +1499**
SynB-H1 fw	TAGGCCTTATGGCAACTAAATTTCCTAAA	+1 bis +21**
SynB-H6 rew	TAGGCCTTGTTCAAGCATGCGGGCCAGCACG	+1235 bis +1212**
SynB-H11 rew	TAGGCCTTTTAACCGAACTTACCGGCTGTG	+2196 bis +2175**
SynBH1-H2_rew	GAACCAGGCTAAGCTAGGACGG	+504 bis +483**
SynBH1-H4_rew	GATGCTGTGGCCAATGCCCCAG	903 bis +882**
SynBH1-H5_rew	GGCAATAAAGGCGTAGGAGGGC	+1080 bis +1059**
SynBH3-4_fw	GTCCTAGCTTAGCCTGGTTC	+483 bis +504**
SynBH5-6_fw	GCCATACCAACCTGTACGAC	+882 bis +903**

* Die Positionsangaben beziehen sich auf das entsprechende Wildtyp-Gen von *Synechocystis* und sind relativ zum Translationsstart angegeben.

** Diese Oligonukleotide enthalten zusätzliche Nukleotide mit einer Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme für folgende Klonierungen sowie für die Berücksichtigung der Leserahmen.

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen, Karlsruhe oder Biomers, Ulm synthetisiert.

3.1.7 Kulturmedien

Alle nicht näher aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook *et al*. (2001) oder nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.7.1 Medien für *E. coli*

LB-Vollmedium (Sambrook *et al.*, 1989)
5,0 g NaCl
10,0 g Bacto-Trypton
5,0 g Hefeextrakt
ad 1000 ml H_2O_{dest}

LB-Festmedium
16,0 g Agar
ad 1000 ml Medium

Antibiotika

Kanamycin (Kan)	Konzentration im Medium: 50 µg/ml
Ampicillin (Amp)	Konzentration im Medium: 100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	Konzentration im Medium: 100 µg/ml

3.1.7.2 Medien für *S. cerevisiae*

Glucose-Lösungen und Zusätze wurden nach dem Autoklavieren dem Medium steril zugegeben.

YPAD-Vollmedium
10 g Hefeextrakt
20 g Pepton
44 mg Adeninsulfat
100 ml 20 % Glucose
ad 1000 ml H_2O_{dest}

YPAD-Agar-Platten
1 Plättchen NaOH
20 g Agar
ad 1000 ml YPAD

Das Dropout (DO)-Pulver ist ein Gemisch aus Aminosäuren und Basen. Für die Selektivmedien wurden die entsprechenden Aminosäuren im Dropout weggelassen.

DO-Leu-Trp-Pulver
400 mg L-Adeninsulfat
400 mg L-Histidin
600 mg L-Lysin
400 mg L-Uracil
Die Selektion erfolgte auf beide Hefevektoren, d.h. auf Doppel-Transformanden.

DO-Leu-Trp-His-Pulver

400 mg L-Adeninsulfat
600 mg L-Lysin
400 mg L-Uracil

Die Selektion erfolgte auf beide Hefevektoren und spezifisch interagierenden Fusionsproteine.

DO-Leu-Trp-Medium

6,7 g YNB wo aa
90 mg Mix DO-Leu-Trp
100 ml 20 % Glucose
10 ml 2 g/l Adeninsulfat
ad 1000 ml H_2O_{dest}

DO-Leu-Trp-His-Medium

6,7 g YNB wo aa
70 mg Mix DO-Leu-Trp-His
100 ml 20 % Glucose
10 ml 2 g/l Adeninsulfat
ad 1000 ml H_2O_{dest}

DO-Agar-Platten

1 Plättchen NaOH
20 g Agar
ad 1000 ml DO-Medium

3.1.7.3 Medien für *Synechocystis* sp. PCC 6803

BG-11 Medium

1,623 g BG-11
mit 1 M NaOH auf pH 7,1 eingestellt
ad 1000 ml H_2O_{dest}

BG11-Agarplatten enthielten zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar.

3.1.7.4 Medien für *C. reinhardtii*

TAP-Medium

20 mM Tris/HOAc (pH 7,0)
1 % (v/v) 10x Beijernick
0,1 % (v/v) 1 M $(K)PO_4$
0,1 % (v/v) Trace

1 M $(K)PO_4$

0,6 M K_2HPO_4
0,4 M KH_2PO_4
pH 7,0

Trace (Hutner *et al.*, 1950)

5 % (w/v) EDTA
2,2 % (w/v) $ZnSO_4$ x 7 H_2O
1,14 % (w/v) H_3BO_3
0,51 % (w/v) $MnCl_2$ x 4 H_2O
0,5 % (w/v) $FeSO_4$ x 7 H_2O
0,16 % (w/v) $CoCl_2$ x 6 H_2O
0,16 % (w/v) $CuSO_4$ x 5 H_2O
0,01 % (w/v) $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ x 4 H_2O
1,6 % (w/v) KOH

10x Beijernick

4 % (w/v) NH_4Cl
5 % (w/v) $CaCl_2$ x 2 H_2O
5 % (w/v) $MgSO_4$ x 7 H_2O

TAPS-Medium

1 % (w/v) Sorbitol in TAP-Medium

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultur, Anzucht und Transformation von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium bei 37 °C kultiviert. Die Anzucht der LB-Flüssigmedium-Schüttelkulturen erfolgte ü.N. bei 220 rpm und 37 °C. Durch Zugabe von Antibiotika zum Medium konnte auf Stämme mit entsprechenden Resistenzgenen selektioniert werden.

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurde nach der $CaCl_2$-Methode (Dagert und Ehrlich, 1979) oder durch Elektroporation mit dem „Gene Pulser“ (BioRad, USA) nach Vorschrift von Dower *et al*. (1988) durchgeführt.
Durch Zugabe von 200 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid (X-Gal)-Lösung (4 % in Dimethylformamid) und 20 µl Isopropyl-thio-galaktosid (IPTG; 100 mM) zu 1000 ml LB-Festmedium konnte auf die ß-Galaktosidase-Aktivität („Blau-Weiß-Selektion“ nach Old und Primrose, 1992) selektioniert werden.

3.2.1.2 Kultur und Anzucht von *S. cerevisiae DSY-1*

Die Anzucht des *S. cerevisiae*-Stammes *DSY*-1 erfolgte auf YPAD-Festagarplatten über 3 Tage im Brutschrank bei 30 °C. Flüssigmedium-Kulturen wurden von Stammplatten mit Einzelkolonien beimpft und auf einem Schüttler ü.N. bei 250 rpm und 30 °C inkubiert. Die Kultivierung der Hefe-Transformanden erfolgte in den entsprechenden DO-Medien.

3.2.1.3 Kultur und Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Der *Synechocystis* sp. PCC 6803 Wildtyp (WT) wurde bei 25 °C mit einer Lichtstärke von 10-20 µE bei 120 rpm in BG-11 Medium angezogen.

3.2.1.4 Kultur und Anzucht von *C. reinhardtii*

Der *C. reinhardtii*-Stamm CW15HF (Harris, 1989; Göhre *et al.*, 2006) wurde auf TAP-Festmedium (TAP mit 1,8 % Agar; Gorman und Levine, 1965) angezogen. Ausgehend von 200 ml-Schüttel-Vorkulturen (TAPS-Flüssigmedium; 4 d; 40 µE/cm²; 25 °C), die mit Zellen der Anzucht angeimpft wurden, wurden 1 l-Rührkulturen etwa 3 bis 15 %-ig mit TAPS-Flüssigmedium angeimpft und 2 bis 4 Tage kultiviert.

3.2.1.5 Transformation von *S. cerevisiae* mit Polyethylenglykol/Lithium-Acetat (PEG/LiAc, modifiziert nach Schiestl und Gietz, 1989 und Hill *et al.*, 1991)

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit dem Split-Ubiquitin-System wurden Nub- und Cub-haltige Plasmide in kompetente Hefezellen co-transformiert.

Herstellung kompetenter Hefezellen
Zellen aus einer 200 ml Hauptkultur $OD_{600\,nm}$ von 0,5 ± 0,1 wurden durch Zentrifugation (JLA10.5, 1000 x g, 5 min, RT) pelletiert, der Überstand entfernt und das Sediment in 10 ml 1 x TE resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (JLA10.5, 1000 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 2 ml frisch angesetzter 1 x LiAc-Lösung resuspendiert.
Die kompetenten Zellen wurden für eine optimale Transformationseffizienz innerhalb 1 h nach Herstellung transformiert.

10 x TE (pH 7,5)
0,1 M Tris/HCl
10 mM EDTA

10 x LiAc (pH 7,5)
1 M LiAc
mit Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt

Transformation kompetenter Hefezellen
Für die Hefetransformation wurde in einem Ansatz je 1,5 µl (0,2 µg/µl) Nub-Plasmid, 1,5 µl (0,2 µg/µl) Cub-Plasmid und 10 µl Heringssperma Carrier-DNA gemischt. Diesem wurde ein 0,1 ml-Aliquot der frisch hergestellten kompetenten Hefezellen zugefügt und intensiv durchmischt.
Nach Zugabe von 0,6 ml einer sterilen PEG/LiAc-Lösung wurde der Ansatz erneut intensiv gemischt und anschließend auf dem Schüttler bei 30 °C für 30 min inkubiert. Dem Ansatz wurden 70 µl DMSO zugefügt und vorsichtig invertiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 15 min bei 42 °C. Nach Inkubation auf Eis für 1-2 min wurden die Zellen ca. 5 s bei 13000 rpm pelletiert und in 100 µl 1 x TE resuspendiert. Nach Ausplattieren des gesamten Ansatzes auf dem DO-Leu-Trp-Selektivmedium, erfolgte die Inkubation für 3 Tage bei 30 °C.
Von den gewachsenen Klonen wurden je 3 Doppel-Transformanden auf DO-Leu-Trp- und auf DO-Leu-Trp-His-Platten überimpft. Diese wurden erneut bei 30 °C für 3 Tage inkubiert.

Heringssperma Carrier-DNA
10 mg/ml denaturierte, gescherte Heringssperma-DNA

PEG/LiAc -Lösung
1 ml 10 x LiAc
1 ml 10 x TE
8 ml 50 % (w/v) PEG 4000

3.2.2 Nukleinsäuretechniken

3.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Plasmidvermehrung in *E. coli* wurde eine Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und ü.N. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Reinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers oder mit alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979).

3.2.2.2 DNA-Isolierung aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Zur Extraktion der Gesamt-DNA aus *Synechocystis* wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min, RT) geerntet, mit 1 ml TE-Puffer gewaschen und in 270 µl STET-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 15 µl Chloroform versetzt und 5 min lang intensiv geschüttelt. Nach Zugabe von Lysozym (20 mg/ml) folgte eine Inkubation über 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden 100 µl 10 % SDS hinzugefügt und die Suspension 50 min lang bei 65 °C lysiert. Nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl wurde für weitere 10 min inkubiert. Die Proteine wurden mit Hilfe von Chloroform entfernt, anschließend konnte die DNA mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H_2O_{dest} gelöst werden.

STET-Puffer
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
8 % Saccharose
5 % Triton X-100
50 mM EDTA

3.2.2.3 DNA-Fällungen

Die DNA-Fällung erfolgte mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5fachem Volumen 100 % Ethanol. Nach dem Zentrifugieren (12000 x g, 30 min, 4 °C) wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und das getrocknete DNA-Pellet in 50 µl H_2O_{dest} aufgenommen. Die so gereinigte DNA konnte nun weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.2.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus *C. reinhardtii*-Extrakten erfolgte mittels Phenol-Extraktion. Dafür wurden die Fraktionen (aus 3.2.4.4 und 3.2.4.5) mit 1 % SDS versetzt und mit gleichem Volumina wassergesättigtem Phenol gemischt. Nach Zentrifugation (12000 x g, 5 min, RT) wurde die obere Phase abgenommen und die RNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5fachem Volumen 100 % Ethanol gefällt. Das nach Zentrifugation (12000 x g, 30 min, 4 °C) erhaltene RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min bei RT getrocknet. In Abhängigkeit des weiteren Einsatzes der RNA wurde in entsprechender H_2O_{dest}-Menge aufgenommen.

3.2.3 Quantifizierungen

3.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Proben wurde in UV-Küvetten photometrisch bei 260 nm in einem Spektrometer bestimmt. Für doppelsträngige DNA wird für eine $OD_{260\ nm}$ von 1 eine Referenz-Konzentration von 50 µg/ml zugrunde gelegt (Sambrook *et al*., 1989).

Damit berechnet sich die DNA-Konzentration nach folgender Formel:

$$c(DNA)\ [\mu g/ml] = OD_{260\ nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

3.2.3.2 Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration (Arnon, 1949)

Zur Quantifizierung der eingesetzten Menge an Chloroplasten pro Versuch wurde die Chlorophyll-Menge als Maß verwendet. Zur Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration wurden Chloroplasten in 80 % Aceton resuspendiert, auf eine geeignete Verdünnung eingestellt, zentrifugiert (7000 x g, 30 s) und die optische Dichte des Überstandes bei einer Wellenlänge von 652 nm bestimmt.

Die Chlorophyll-Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c(Chl)\ [\mu g/\mu l] = OD_{652\ nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 34{,}5$$

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Chloroplasten-Isolierung

Zur Isolierung von Chloroplasten wurden Zellen von *C. reinhardtii* CW15HF bei einer Kulturdichte von 2x 10^6 Zellen/ml mittels Zentrifugation (JLA10.5-Rotor, 4400 x g, 10 min, 4 °C) geerntet. Mit 1x IS wurden die Zellen zu einer Dichte von 1x 10^8 Zellen/ml aufgenommen, auf eine Konzentration von 1 % Saponin eingestellt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Pelletieren der behandelten Zellen (TS-5,1-500-Rotor, 5300 x g, 3 sec, 4 °C) wurden diese in 8 ml 1x IS aufgenommen und durch einen Percoll-Gradienten (35 %/ 75 % in 1x IS) zentrifugiert (JS13.1-Rotor; 7800 x g, 30 min, 4 °C). Die Chloroplasten in den Interphasen wurden abgenommen, mit 1x IS verdünnt und abzentrifugiert (TS-5,1-500-Rotor, 5300 x g, 5 min, 4 °C). Die so erhaltenen Chloroplasten wurden entweder in 1x IS oder in dem entsprechenden Puffer für die weitere Anwendung aufgenommen.
Für die Verwendung der isolierten Chloroplasten in der Polysomenanreicherung (3.2.4.4) oder Polysomenfraktionierung (3.2.4.5) erfolgte die gesamte Isolierung in Anwesenheit von 0,5 mg/ml Chloramphenicol. Das Chloramphenicol hemmt die plastidäre Translation und stabilisiert dabei die Polysomen.

1x IS

10 mM Tricine/KOH (pH 7,8)
5 mM $MgCl_2$
0,3 M Sorbitol

3.2.4.2 Chloroplasten-Fraktionierung (verändert nach Zerges und Rochaix, 1998)

Die in den Chloroplasten enthaltenen Membranstrukturen können aufgrund verschiedener Eigenschaften im Saccharosedichtegradienten zunächst vom Stroma und im weiteren Zentrifugationsschritt untereinander aufgetrennt werden. Hierbei werden nach Entfernung der Mg^{2+}-Ionen die „Low density membranes“ und die gereinigten Thylakoidmembranen voneinander getrennt.
Die isolierten Chloroplasten (3.2.4.1) wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren in hypotonischer Lösung/Mg^{2+} zu etwa 0,5 µg/µl Chlorophyll lysiert und durch ein 1 M Saccharose-Kissen von 4,5 ml (in hypotonischer Lösung/Mg^{2+}) zentrifugiert (SW55Ti-Rotor; 144000 x g; 1½ h; 4 °C). Die lösliche Phase, die nicht in das Saccharose-Kissen eingewandert ist (Stroma-Fraktion, S), wurde abgenommen. Die pelletierten Thylakoidmembranen wurden zur weiteren Reinigung in 2,5 ml 1,8 M Saccharose (in hypotonischer Lösung) aufgenommen, mit 2,5 ml 1,3 M Saccharose (in hypotonischer Lösung) überschichtet und erneut zentrifugiert (SW55Ti-Rotor, 144000 x g, 1½ h, 4 °C). Dabei wurden zwei verschiedene Interphasen erhalten, die obere Interphase beinhaltete die orange gefärbte „Low density membranes“-Fraktion (LDM-Fraktion) und die untere Interphase enthielt die grünen gereinigten Thylakoidmembranen. Die Interphasen wurden abgenommen, die gereinigten Thylakoidmembranen mit dem doppelten Volumen hypotonischer Lösung verdünnt und durch Zentrifugation (SW55Ti-Rotor, 144000 x g, ½ h, 4 °C) pelletiert. Die gereinigten Thylakoide wurden in ACA-Puffer aufgenommen (gereinigte Thylakoidmembran-Fraktion, T). Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt, die erhaltenen SDS-Gele auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot ausgewertet.

Hypotonische Lösung/Mg^{2+}
- 10 mM Tricine/KOH (pH 7,8)
- 5 mM $MgCl_2$
- 5 mM 2-Mercaptoethanol

Hypotonische Lösung
- 10 mM Tricine/KOH (pH 7,8)
- 10 mM EDTA
- 5 mM 2-Mercaptoethanol

ACA-Puffer
- 750 mM ε-Aminocapronsäure
- 50 mM Bis-Tris (pH 7.0)
- 0,5 mM EDTA
- 1 Tablette Proteinaseinhibitor in 50 ml ACA-Puffer

3.2.4.3 Fraktionierung von Thylakoidmembranen (Ossenbühl *et al.*, 2002)

Die Thylakoidmembranen lassen sich in Grana- und Stromamembranen fraktionieren (Adir *et al.*, 1990). Dazu müssen diese Bestandteile differenziert vorliegen. Die ursprüngliche Differenzierung der Thylakoide bleibt erhalten, wenn die Thylakoidmembran-Isolierung (3.2.4.2) in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen erfolgt. Die Thylakoidmembran-Fraktionierung wird durch die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Digitonin und die daraus resultierenden, unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von Grana- und Stromamembranen ermöglicht.
Die isolierten Chloroplasten (3.2.4.1) wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren in hypotonischer Lösung/Mg^{2+} (siehe 3.2.4.2) zu etwa 0,5 µg/µl Chlorophyll lysiert und durch ein 1 M Saccharose-Kissen von 9 ml (in hypotonischer Lösung/Mg^{2+}) zentrifugiert (SW40-Rotor; 144000 x g; 3 h; 4 °C). Die pelletierten Thylakoidmembranen wurden zur weiteren Fraktionierung in Puffer A zu 0,4 µg/µl Chlorophyll aufgenommen. Danach wurde Digitonin zu einer Endkonzentration von 0,4 % zugegeben und nach gutem Durchmischen für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 10 Volumina Puffer A wurde diese Inkubationsphase beendet. Die erhaltene Suspension wurde 4 aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten unterzogen. Dabei wurden die Sedimente der jeweiligen Zentrifugationen in Puffer A aufgenommen und bei -80 °C gelagert, während die jeweiligen Überstände für den nächsten Zentrifugationsschritt eingesetzt wurden. Folgende Zentrifugationsbedingungen resultierten in den entsprechenden Fraktionen: JS13-Rotor, 1000 x g, 10 min, 4 °C → $P_{1000\ x\ g}$ (Pellet des ersten Zentrifugationsschrittes bei 1000 x g): unbehandelte Thylakoidmembranen (T); JS13-Rotor, 10000 x g, 30 min; 4 °C → $P_{10000\ x\ g}$: Granamembran-Fraktion (G); JA20-Rotor, 40000 x g, 30 min, 4 °C → $P_{40000\ x\ g}$: Intermediäre Thylakoidmembran-Fraktion (iT); SW40-Rotor; 150000 x g, 1 h, 4 °C → $P_{150000\ x\ g}$: Stromamembran-Fraktion (S). Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt, die erhaltenen SDS-Gele auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot ausgewertet.

Puffer A

15 mM Tricine/KOH (pH 7,8)
0,1 M Sorbitol
10 mM NaCl
5 mM $MgCl_2$
10 mM NaF

Umkristallisation von Digitonin
Unter Wärmezufuhr wurde 1 g Digitonin in 100 ml 100 % Ethanol im Wasserbad vollständig gelöst. Das gelöste Digitonin wurde sofort durch Rundfilter in das Zentrifugentube filtriert. Nach 20 h Ausfallen bei -20 °C erfolgte eine Zentrifugation (4000 x g, 15 min, 4 °C). Das Digitonin-Pellet wurde ü.N. im Eksikator bei RT getrocknet bis der Ethanol vollständig entfernt war. Für die weitere Verwendung wurde das Pellet in H_2O_{dest} gelöst und eine Konzentration von 10 % Digitonin eingestellt.

3.2.4.4 Polysomenanreicherung aus Chloroplasten von *C. reinhardtii* (verändert nach Umlauf, 2002)

Die Polysomen können mit Hilfe eines Saccharosedichtegradienten angereichert werden. Dabei wird aufgrund der hohen Dichte der Polyribosomen im Saccharosegradient das polysomale Pellet durch Zentrifugation erhalten.
Die isolierten Chloroplasten (3.2.4.1) wurden in ACA-Puffer (3.2.4.2) oder zur RNA-Analyse in Polysomenextraktionspuffer zu 1 µg/µl Chlorophyll lysiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 % β-Dodecylmaltosid und 10 min Inkubation auf Eis solubilisiert. Die solubilisierten Chloroplasten wurden nach Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C) über einen Zuckergradienten geschichtet (1,5 M/0,5 M Saccharose in ACA-Puffer bzw. zur RNA-Analyse im Polysomengradientenpuffer). Die Gradienten wurden zentrifugiert (SW55Ti-Rotor, 367600 x g, 6 h, 4 °C), um die Polysomen zu pelletieren. Die verschiedenen Fraktionen wurden entweder mittels SDS-PAGE getrennt, die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot ausgewertet oder die RNA isoliert und mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

Polysomenextraktionspuffer
- 200 mM Tricine/HCl (pH 7,9)
- 150 mM NaCl
- 50 mM $MgCl_2$
- 20 mM EDTA
- 50 mM 2-Mercaptoethanol
- 0,5 mg/ml Heparin
- 0,5 mg/ml Chloramphenicol
- 8,55 % Saccharose
- 1 Tablette Proteinaseinhibitor in 50 ml Polysomenextraktionspuffer

Polysomengradientenpuffer
- 40 mM Tricine/HCl (pH 7,9)
- 30 mM NaCl
- 10 mM $MgCl_2$ (in der Negativkontrolle: 2,5 mM EDTA anstelle $MgCl_2$)
- 5 mM 2-Mercaptoethanol
- 0,5 mg/ml Heparin
- 0,5 mg/ml Chloramphenicol
- 1 Tablette Proteinaseinhibitor in 50 ml Polysomengradientenpuffer

3.2.4.5 Polysomenfraktionierung aus Chloroplasten von *C. reinhardtii* (verändert nach Nickelsen *et al.*, 1999)

Die Polysomen können mit Hilfe eines linearen Saccharosedichtegradienten fraktioniert werden. Dabei wird die Trennung durch Zentrifugation aufgrund der unterschiedlichen Dichteeigenschaften der verschiedenen Polysomen erzielt (Baumgartel und Howell, 1976).
Die isolierten Chloroplasten (3.2.4.1) wurden in Polysomenextraktionspuffer zu 1 µg/µl Chlorophyll lysiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 % β-Dodecylmaltosid und 10 min Inkubation auf Eis solubilisiert. Die solubilisierten Chloroplasten wurden nach Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C) über einen linearen Zuckergradienten geschichtet (15-55 % Saccharose in Polysomengradientenpuffer siehe 3.2.4.4). Die Gradienten wurden zentrifugiert (SW55Ti-Rotor, 367600 x g, 2 h, 4 °C) und anschließend in sechs Fraktionen

unterteilt. Die verschiedenen Fraktionen wurden entweder mittels SDS-PAGE getrennt, die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot untersucht oder die RNA isoliert und mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

3.2.4.6 Co-Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation werden direkt miteinander interagierende Proteine aus dem Chloroplasten-Extrakt isoliert. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, co-präzipitierte Proteine massenspektrometrisch zu analysieren und Interaktionspartner zu identifizieren.
Die isolierten Chloroplasten (3.2.4.1) wurden in ACA-Puffer (3.2.4.2) zu 0,5 µg/µl Chlorophyll lysiert und durch Zugabe von 1 % β-Dodecylmaltosid und 10 min Inkubation auf Eis solubilisiert. Die solubilisierten Chloroplasten wurden nach Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C) für 1 h bei 4 °C mit Antikörpern gegen Alb3.2p, Flag, RbcL bzw. ohne Antikörper auf einem Rundschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl MACS® ProteinA-MicroBeads erfolgte eine erneute Inkubation auf einem Rundschüttler für 45 min bei 4 °C. Die Co-Präzipitate wurden über eine µMACS® Säule gereinigt. Dazu wurden die gebundenen Co-Präzipitate fünfmal mit ACA-Puffer gewaschen. Für die Elution wurden die µMACS® Säule aus dem MACS® Multi Stand entnommen und die Co-Präzipitate mit ACA-Puffer und 4x SDS-Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol (3.2.5.4) eluiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE getrennt und die Proteine mit Coomassie- oder Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.2.4.7 Quervernetzungsexperimente

Das SFAD (Sulfosuccinimidyl-[perfluoroazidobenzamido] ethyl-1,3´-dithiopropionat) ist ein spaltbarer, wasserlöslicher und heterobifunktionaler (Amin- und photoreaktiv) Quervernetzer. SFAD besitzt einen Abstand zwischen den reaktiven Gruppen von 14,6 Å, darin befindet sich die Disulfidbrücke, die mit 2-Mercaptoethanol spaltbar ist (Abb. 4). Die erste reaktive Gruppe von SFAD ist ein Sulfo-NHS-Ester der Aminogruppen angreift, die zweite reaktive Gruppe ist die photoreaktive Perfluoroaryl-azid-Gruppe, die CH-Bindungen angreift (Pierce, USA).

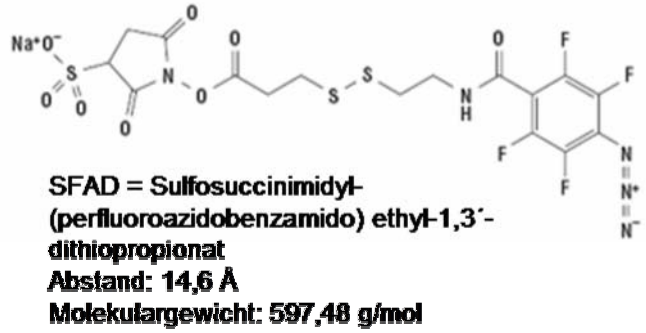

Abb. 4: Die Struktur mit den reaktiven Gruppen von SFAD.

Die Abbildung zeigt die reaktiven Gruppen des SFAD, den Sulfo-NHS-Ester der Aminogruppen angreift und die photoreaktive Perfluoroaryl-azid-Gruppe, die CH-Bindungen angreift. Die Verbindung zwischen beiden reaktiven Gruppen ist ein 14,6 Å großer Arm, der eine Disulfidbrücke beinhaltet (Pierce, USA).

Die isolierten Chloroplasten (3.2.4.1) wurden vorsichtig in einem geringem Volumen an 1x IS (3.2.4.1) aufgenommen. Für die Reaktion wurde die entsprechende Chloroplasten-Menge (2 µg, 5 µg und 20 µg Chlorophyll) entnommen, mit der jeweiligen Menge an SFAD versetzt und der gesamte Reaktionsansatz von 50 µl auf 1x PBS eingestellt. Die erste Reaktion erfolgte für eine Stunde im Dunkeln bei RT und die Zweite durch Aktivierung der Azidgruppe mittels UV-Licht ($UV_{365\,nm}$, 15 min). Die erhaltenen Quervernetzungsprodukte wurden zum einen direkt in der SDS-PAGE getrennt und durch Western-Blot analysiert. Dafür wurden die Chloroplasten mit 1 % SDS vollständig solubilisiert. Zum anderen wurden die nativen Proteinkomplexe über BN-PAGE getrennt und die Protein-Untereinheiten in der 2. Dimension mittels SDS-PAGE analysiert. Die Auswertung erfolgte über Western-Blot oder Coomassie-Färbung.

1x PBS
0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH7,5)
0,15 M NaCl

3.2.4.8 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 60 min in Coomassie-Färbelösung bei RT geschüttelt und anschließend dreimal 20 min mit Fixierlösung I und 30 min mit Fixierlösung II entfärbt.

Coomassie-Färbelösung
40 % Ethanol
10 % Essigsäure
0,2 % Coomassie R-250

Fixierlösung I
40 % Ethanol
10 % Essigsäure

Fixierlösung II
10 % Essigsäure

3.2.4.9 Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987)

Für eine sensitivere Proteinfärbung wurde im Anschluss an die Coomassie-Färbung (3.2.4.8) die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) durchgeführt. Alle Schritte liefen bei RT und unter Schütteln ab. Das Gel wurde dazu nach der Fixierung dreimal 20 min in Waschlösung inkubiert. Anschließend wurde 1 min mit einer 0,02 %-igen Natriumthiosulfat-Lösung geschüttelt und das Gel dreimal 20 sec mit H_2O_{dest} gewaschen. Es folgte eine 20 min dauernde Inkubation in 0,2 %-iger Silbernitrat-Lösung, gefolgt von zwei Waschschritten mit H_2O_{dest} für 20 s. Sichtbar gemacht wurden die Proteine durch eine Inkubation in Entwicklerlösung für 3 bis 15 min. Diese Reaktion wurde durch zweimal 1 min Waschen mit H_2O_{dest} und 5 min Inkubation in Stopp-Lösung abgebrochen. Nach 30 min Waschen in H_2O_{dest} konnte das Gel dokumentiert werden.

Waschlösung
30 % Ethanol

Entwicklerlösung
3 % Natriumbicarbonat
0,0004 % Natriumthiosulfat
0,05 % Formaldehyd

Stopp-Lösung
0,5 % Glycin

3.2.4.10 MS-kompatible Silberfärbung (Shevchenko *et al.*, 1996)

Für die Sequenzierung der CoIP mittels HPLC/MS wurden die Proteinbanden mit der MS-kompatiblen Silberfärbung (Shevchenko *et al.*, 1996) sichtbar gemacht. Alle Schritte liefen unter Schütteln ab. Das Gel wurde dazu nach der Fixierung dreimal 20 min in Waschlösung inkubiert. Anschließend wurde 1 min mit einer 0,02 %-igen Natriumthiosulfat-Lösung geschüttelt und das Gel zweimal 1 min mit H_2O_{dest} gewaschen. Es folgte eine 40 min dauernde Inkubation bei 4 °C in 0,1 %-iger Silbernitrat-Lösung, gefolgt von zwei Waschschritten mit H_2O_{dest} für 1 min. Sichtbar gemacht wurden die Proteine durch eine Inkubation in Entwicklerlösung für mindestens 20 min. Die Entwicklung wurde durch Inkubation mit Stopp-Lösung abgebrochen, anschließend konnte das Gel dokumentiert werden.

Fixierlösung
45 % Methanol
5 % Essigsäure
45 % Wasser

Entwicklerlösung
2 % Natriumbicarbonat
0,04 % Formaldehyd
Stopplösung
1 % Essigsäure

Die mit Hilfe der MS-kompatiblen Silberfärbung sichtbar gemachten Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in vorbereitete 500 µl Eppendorfgefäße überführt. Die 500 µl Eppendorfgefäße wurden dafür mit 5 % Ameisensäure und Methanol gereinigt und nach dem Trocknen mit 5 µl Stopplösung versehen. Die so präparierten Proteinproben wurden zur weiteren HPLC/MS-Analyse an Prof. K. J. van Wijk übergeben.

3.2.4.11 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Trägermembran transferiert und dort fixiert.
Nach der SDS-PAGE (3.2.5.4) wurden die ungefärbten Gele in 1x Transferpuffer mit dem Semi-Dry-Blot-Verfahren (Bjerrum und Schäfer-Nielsen, 1986) für 2 h bei 400 mA und RT auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Proteine auf der Membran wurden anschließend mit Ponceau S-Lösung (Salinovich und Montelaro, 1986) gefärbt und auf der Membran fixiert. Durch Waschen der Nitrozellulosemembran mit Wasser und 1x TBS wurde entfärbt, anschließend für 1 h in Block-Lösung inkubiert, um freie Bindestellen der Membran mit Proteinen abzusättigen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in der jeweiligen Verdünnung ü.N. bei 4 °C. Durch Waschen der Nitrozellulosemembran (3x 10 min mit 1x TBS) wurden ungebundene Reste des Antikörpers entfernt. Anschließend

erfolgt die Inkubation mit dem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper in der jeweiligen Verdünnung für 1 h bei RT. Nach dem Waschen der Membran (3x 10 min mit 1x TBS) erfolgt die Detektion des 2. Antikörpers durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL).

1x Transferpuffer
39 mM Glycin
48 mM Tris
20 % Methanol
0,037 % SDS

Ponceau S-Lösung
0,2 % Ponceau S
1 % Essigsäure

1x TBS
10 mM Tris/HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl

Block-Lösung
5 % Magermilchpulver in 1x TBS

Antikörper
jeweilige Verdünnung in 1 % Magermilch in 1x TBS

3.2.4.12 Chemilumineszenz (ECL, Durrant 1990, Schneppenheim *et al.*, 1991)

Die gewaschene Membran wurde für 1 min mit einer 1:1 Mischung von Lösung I und Lösung II inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine lichtdurchlässige Folie gelegt und in einer Verstärker-Kassette mit einem Film für 1 min bis max. 2 h exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte nach Herstellerangaben. Die Membran konnte nach der Entwicklung in 1x TBS bei 4 °C gelagert werden.

Lösung I
100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
0,017 % H_2O_2

Lösung II
100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
2,5 mM 3-Aminophalhydrazin
4 mM pCumarsäure

3.2.5 Gelelektrophoresemethoden

3.2.5.1 Native Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden auf nativen Agarosegelen (1-1,5 % Agarose in 1x TAE-Puffer) der Größe nach getrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 bis 150 V für ca. 1 h in 1x TAE als Laufpuffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Probenpuffer gemischt (Sambrook *et al.*, 1989).
Als Größenstandards dienten zum einen die mit *Hin*dIII geschnittene λ-DNA (Fragmentgröße (in bp): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125; Kück, 1981) und zum anderen das mit *Eco*RI und *Hin*fI geschnittene Plasmid Tth-730 (BOA-Marker; Fragmentgröße (in bp): 1409, 800, 517, 396, 261, 191, 88, 75, 65; Sürig, 1989). Die im Gel aufgetrennten DNA-Banden wurden durch Ethidiumbromid (0,5 µg/ml im Gel) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

1x TAE-Puffer
40 mM Tris/ HOAc (pH 8,0)
2 mM EDTA

5x Probenpuffer
30 % (v/v) Glycerin
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
0,1 % (w/v) Xylencyanol

3.2.5.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution der DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels dem DNA-Extraktionskit „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ (GE Healthcare, Großbritannien) laut Herstellerangaben.

3.2.5.3 Denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese

Mit der isolierten RNA (3.2.2.4) wurde eine denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde die getrocknete RNA in 8 µl H_2O_{dest} aufgenommen, mit 20 µl RNA-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurde die RNA auf einem 1,3 %-igen Formaldehyd-Agarosegel (2,2 M Formaldehyd und 1,3 % Agarose in 1x MOPS-Puffer) der Größe nach aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer bei 100 V für 2 bis 3 h. Als Größenstandards dienten λ/*Hin*dIII- und BOA-Marker der nativen Agarose-Gelelektrophorese. Die Gele wurden anschließend 15 min in H_2O_{dest} gewaschen und unter UV-Licht dokumentiert.

1x MOPS-Puffer
20 mM MOPS
8 mM NaAc
1 mM EDTA
pH 8,0

1x Laufpuffer
1x MOPS (pH 8,0)
10 % Formaldehyd

RNA-Probenpuffer
1x MOPS (pH 8,0)
7,5 mM Formamid
3 mM Formaldehyd
30 µM Ethidiumbromid
0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xylencyanol

3.2.5.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende, diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese, mit deren Hilfe Proteine der Größe nach aufgetrennt werden können (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Gelsystem aus Sammelgel (4 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in Sammelgel-Puffer) und Trenngel (12,5 % bzw. 16 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in Trenngel-Puffer) durchgeführt. Die Proben wurden auf 1x SDS-Probenpuffer eingestellt, 15 min bei 37 °C denaturiert und anschließend aufgetragen. Als Größenstandard diente der Prestained Broad Range Marker (Fragmentgrößen (in kDa): 175, 83, 62, 47,5, 32,5, 25, 16,5, 6,5; New England Biolabs, Schwalbach) und der PageRuler Prestained Protein Marker (Fragmentgrößen (in kDa): 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11; MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Die Gelelektrophorese läuft ü.N. (ca. 15 h) bei 6 mA in 1x Laufpuffer.

8x Trenngelpuffer
3 M Tris/HCl (pH 8,9)

2x Sammelgelpuffer
250 mM Tris/HCl (pH 6,8)
0,002 % Bromphenolblau

1x Laufpuffer
25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1 % SDS
pH 8,4

4x SDS-Probenpuffer
0,04 % Bromphenolblau
600 mM Tris/HCl (pH 6,8)
20 % Glycerin
4 % SDS
5 % 2-Mercaptoethanol

4x SDS-Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol
0,04 % Bromphenolblau
600 mM Tris/HCl (pH 6,8)
20 % Glycerin
4 % SDS

3.2.5.5 Blue native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und 2. Dimension BN/SDS-PAGE (Schaegger und von Jagow, 1991)

Für die Analyse photosynthetischer Komplexe bietet sich die BN-PAGE als native Methode an. Die Proben werden mit ß-Dodecylmatosid solubilisiert und die Komplexe nach Molekulargröße elektrophoretisch getrennt. Anschließend werden die Komplexe denaturiert und in der 2. Dimension in einem SDS-Gel eingesetzt. An dieser Stelle können die Untereinheiten der einzelnen Proteinkomplexe genauer analysiert werden, da diese vertikal zum entsprechenden Komplex in der SDS-PAGE getrennt vorliegen (Schaegger und von Jagow, 1991).

Die BN-PAGE wurde in einem Gelsystem aus Sammelgel (4 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in BN-Gelpuffer) und linearem Gradientengel (4-16 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in BN-Gelpuffer) durchgeführt. Die Proben der Quervernetzungsexperimente (3.2.4.7) wurden zentrifugiert (12000 x g, 4 min, 4 °C), in ACA-Puffer (3.2.4.2) resuspendiert und durch Zugabe von 1 % β-Dodecylmaltosid und 10 min Inkubation auf Eis solubilisiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 5 µl BN-Ladepuffer versetzt und intensiv gemischt. Nach dem Vorkühlen der Apparatur auf 4 °C und dem Auftragen der Proben erfolgte die Gelelektrophorese mit blauem 1x Kathodenpuffer im oberen Tank und 1x Anodenpuffer im unteren Tank. Die Gelektrophorese läuft bei 4 °C für 3-4 h bei 12 mA pro Gel (1200 V, 24 W), wobei mit dem Erreichen der halben Trennstrecke der Coomassie-Front der blaue in den farblosen 1x Kathodenpuffer gewechselt wurde. Die BN-Gele können für mehrere Wochen bei -20 °C in einer Folie gelagert und anschließend für die 2. Dimension eingesetzt werden.

Die SDS-PAGE trennt in der 2. Dimension die Proteine der Komplexe nach Größe (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Gelsystem aus Sammelgel (4 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in Sammelgel-Puffer, siehe 3.2.5.4) und Trenngel (12,5 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 in Trenngel-Puffer, siehe 3.2.5.4) durchgeführt. Die Gelstreifen der 1. Dimension (BN-PAGE) wurden in 25 ml/pro Gel Solubilisierungspuffer für 20 min bei RT inkubiert. Diese Gelstreifen wurden zusammen mit dem SDS-Größenstandard (auf Whatman-Papier aufgetragen) luftblasenfrei auf das Sammelgel transferiert und mittels Agarose-Lösung fixiert. Die Gelelektrophorese läuft bei 15 °C zunächst für 30 min bei 30 mA pro Gel und ü.N. bei 12-16 mA pro Gel in 1x Laufpuffer (3.2.5.1).

6x BN-Gelpuffer
- 3 M ε-Aminocapronsäure
- 0,3 M Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

1x Kathodenpuffer (farblos)
- 50 mM Tricine
- 15 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

1x Kathodenpuffer (blau)
- 1x Kathodenpuffer (farblos) + 0,02 % Coomassie G250

1x Anodenpuffer
- 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

BN-Ladepuffer
750 mM ε-Aminocapronsäure
5 % (w/v) Coomassie G250

Solubilisierungspuffer
2 % (w/v) SDS
66 mM Dinatriumcarbonat
2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

Agarose-Lösung
0,5 % (w/v) Agarose
1x Laufpuffer (3.2.5.1)

3.2.6 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems (Dualsystem Biotech AG, Schweiz)

Das Split-Ubiquitin-System erlaubt, im Gegensatz zum Yeast-Two-Hybrid-System, die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen an oder in einer Membran. Dies wird ermöglicht, da das Split-Ubiquitin-System nicht auf die Translokation der zu interagierenden Proteine in den Zellkern der Hefe angewiesen ist (Stagljar *et al*., 1998). Diese Methode basiert auf Ubiquitin, einem aus 76 Aminosäuren bestehenden, in allen Eukaryoten hoch konservierten Protein, das als Proteinabbausignal dient (Johnsson und Varshavsky, 1994; Vijay-Kumar *et al*., 1987; Johnson *et al*., 1992; Jentsch und Schlenker, 1995). Das native Ubiquitin kann auf Strukturebene in zwei Hälften (Nub und Cub) unterteilt werden. Die beiden Hälften können sich zum funktionellen Ubiquitin zusammenlagern, auch wenn sie als getrennte Proteine exprimiert werden. Im Split-Ubiquitin-System wird die spontane Reassoziation von Nub und Cub durch eine Punktmutation mit daraus reultierendem Aminosäureaustausch im Nub (Isoleucin 13 gegen Glycin zu NubG) verhindert (Johnsson und Varshavsky, 1994). Die Rekonstitution der beiden Ubiquitinhälften zum vollständigen Ubiquitin kann nur stattfinden, wenn an Nub und Cub Proteine fusioniert sind, die miteinander interagieren. Zusätzlich ist ein Transkriptionsfaktor (ProtA-LexA-VP16-PLV bestehend aus *Staphylococcus aureus* Protein A, *E. coli* LexA und *Herpes simplex*-Virus-Transaktivator VP16) an den C-Terminus des Cub gebunden. Kommt es zu einer Interaktion, setzen Ubiquitin-spezifische Proteasen dieses Reporterprotein vom Cub frei. Der Transkriptionsfaktor kann nun in den Zellkern eintreten und die Expression der Reportergene (*lacZ* und *HIS3*) aktivieren (Abb. 5). Das Ergebnis sind His-auxotrophe Zellen, die sich im ß-Galaktosidase-Test blau färben.

Besonders geeignet ist das Split-Ubiquitin-System zur Untersuchung von Interaktionen von Membranproteinen sowie Proteinen, die nicht in den Kern eindringen können. Das Problem der Kerntranslokation beim Yeast-Two-Hybrid-System wird hier dadurch gelöst, dass der Interaktions-Komplex nicht selbst als Reporter wirkt. Anstelle dessen wird ein Reporter freigesetzt, der unabhängig von den interagierenden Proteinen aktiv werden kann. Ein weiterer Vorteil ist, dass auch vorübergehende Interaktionen erkannt werden, da der einmal freigesetzte Reporter weiter aktiv bleibt.

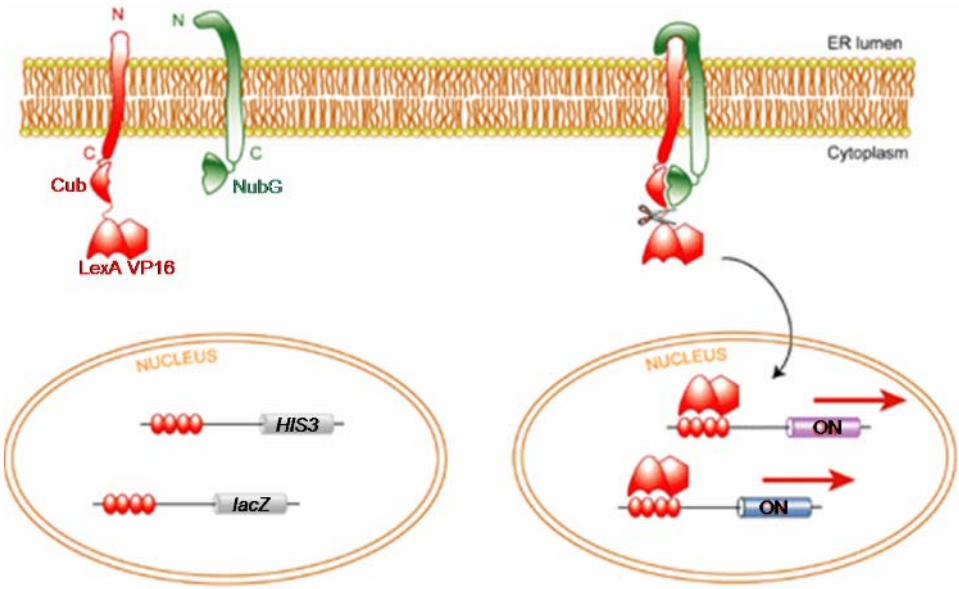

Abb. 5: Das Split-Ubiquitin-System.

Zwei zu untersuchende Membranproteine liegen als Fusionen mit dem N-terminalen Teil (Nub) bzw. mit dem C-terminalen Teil (Cub) des Ubiquitins vor. An das Cub ist der Transkriptionsfaktor ProtA-LexA-VP16-PLV gebunden. Die Interaktion der Fusionsproteine führt zur Ubiquitin-Reassoziation und damit zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors. Dieser aktiviert daraufhin im Kern die Reportergene *HIS3* und *lacZ*.

3.2.6.1 Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mittels Histidin-Auxotrophie und im ß-Galaktosidase-Filtertest

Die Doppel-Transformanden konnten auf Expression der *HIS3*/*lac*Z-Reportergene getestet werden. Dies erfolgte zum einen durch Zellwachstum auf DO-Leu-Trp-His-Platten und zum anderen mit Hilfe der β-Galaktosidase-Aktivität im Filtertest (Breeden und Nasmyth 1985).

Die Expression der *HIS3*-Reportergene erfolgte durch Zellwachstum auf DO-Leu-Trp-His-Platten. Nach Inkubation für drei Tage bei 30 °C konnte das Zellwachstum beurteilt werden. Dabei wurde die Interaktion zweier Proteine im Split-Ubiquitin-System durch Wachstum auf His-Mangelplatten angezeigt.

Die Doppel-Transformanden konnten auf Expression der *lac*Z-Reportergene mit Hilfe des β-Galaktosidase-Filtertestes untersucht werden. Die auf DO-Leu-Trp-Platten gewachsenen Hefekolonien wurden auf einen trockenen, nummerierten Rundfilter übertragen. Nach vollständigem Anfeuchten des Filters erfolgten die Fixierung und der Aufschluss der Kolonien mit flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen des Filters wurde dieser mit den Kolonien nach oben auf die zuvor in Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkten Filterpapiere gelegt. Nach 1-2 h Inkubation bei 30 °C konnte geprüft werden, welche Kolonien blau sind. Die Blaufärbung der Klone zeigte die Interaktion zweier Proteine im Split-Ubiquitin-System.

Z-Puffer (1 l) pH 7,0
10,68 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O
6,21 g NaH_2PO_4 x 2 H_2O
0,75 g KCl
0,138 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
pH 7,0

X-Gal-Lösung (5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galaktopyranosid)
40 mg/ml in Dimethylformamid
Lagerung: - 20 °C

Z-Puffer/X-Gal-Lösung:
50 ml Z-Puffer
135 µl 2-Mercaptoethanol
418 µl X-Gal-Lösung

Die Funktionalität des Wachstums- und ß-Galaktosidase-Filtertests ließ sich durch eine Negativ- und eine Positivkontrolle nachweisen. Als Negativkontrolle wurde der Stamm *DSY-1* verwendet. Als Positivkontrolle diente eine Hefe-Transformande, die mit den Plasmiden pADSL-Nx-cpSecE und pTMBV4-cpSecY co-transformiert wurde. Für cpSecE und cpSecY, zwei Untereinheiten der cpSec-Translokase aus *A. thaliana*, konnte bereits eine starke Interaktion nachgewiesen werden (Pasch *et al*., 2005).

3.2.6.2 Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen

Zur Darstellung der Abbildungen wurden von jedem Doppel-Transformanden drei Einzelkolonien in 3 ml Selektivmedium (DO-Leu-Trp) angeimpft und ü.N. im Schüttler bei 30 °C inkubiert. Von jeder Kultur wurde die $OD_{600\ nm}$ von 0,3 eingestellt, damit die Stärke des Wachstums (DO-Leu-Trp-His) und die Blaufärbung direkt vergleichbar sind. Von diesen Kulturen wurden jeweils 5 µl auf folgende DO-Testplatten pipettiert:
DO-Leu-Trp (für β-Galaktosidase-Filtertest)
DO-Leu-Trp-His

Die Platten wurden für drei Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend direkt oder nach Durchführung des β-Galaktosidase-Filtertests dokumentiert.

3.2.7 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg und 4baselab, Reutlingen vorgenommen.
Genomsequenzen von *Synechocystis* konnten der Homepage http://www.cyanobase.de entnommen werden.
Zur Auswertung von Nukleotidsequenzen wurden Sequenzvergleiche mit dem Computerprogramm „LALIGN“ (http://www.ch.embnet.org) sowie ClustalX durchgeführt.

3.2.8 Sicherheitsbestimmungen

Genetische Experimente der Sicherheitsstufe 1 wurden nach Richtlinien des Gentechnikgesetztes (GenTG) vom 01.07.1990 durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Interaktionsanalysen im Split-Ubiquitin-System

In *Synechocystis* ist die Interaktion zwischen dem Protein der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie Slr1471p (SynOxa1p) und dem PSII-Kernprotein D1 gezeigt (Ossenbühl *et al.*, 2006, Sikorski, 2008). Für die vollständige Integration von D1 in die Thylakoidmembran wird nicht ausschließlich der Faktor Slr1471p benötigt, sondern auch einige in höheren Pflanzen bekannte Integrationsfaktoren. Die Bedeutung von cpSRP54 für die D1-Integration konnte mit Hilfe von Quervernetzungsexperimenten bestätigt werden. Eine Interaktion dieses Faktors wurde mit frühen, Ribosomen-assoziierten D1-Intermediaten gezeigt (Nilsson *et al.*, 1999). In *Synechocystis* ist das cpSRP54-Homologe Slr1531p, sowie weitere Homologe zu denen an den Transportmechanismen beteiligten Proteinen in höheren Pflanzen bekannt (Spence *et al.*, 2003). Allerdings existieren für die Integration von Proteinen, wie das PSI-Reaktionszentrumprotein PsaB in die Thylakoidmembran von *Synechocystis* keine allgemein gültigen Transportmechanismen.

Tab. 4: Übersicht der für die Interaktionsanalysen eingesetzten Faktoren, die an den Transportwegen kernkodierter Proteine in bzw. durch die Thylakoidmembran beteiligt sind.

Für die Interaktionsanalysen im Split-Ubiquitin-System wurden aus den bekannten Transportwegen höherer Pflanzen die hier gezeigten Vertreter ausgewählt. Für eine direkte Interaktion und damit Beteiligung der verschiedenen Faktoren an möglicherweise evolutionär früheren Importwegen wurden diese *Synechocystis*-Proteine im Split-Ubiquitin-System untersucht.

Transportweg kernkodierter Proteine	Proteinbezeichnung in höheren Pflanzen	Proteinbezeichnung in *Synechocystis*
cpSec	cpSecY	Sll1814p
ΔpH/TAT	cpTatA	Slr1046p
cpSRP	cpSRP54 cpFtsY Alb3	Slr1531p Slr2102p Slr1471p

Das Split-Ubiquitin-System sollte daher eingesetzt werden, um detaillierte Interaktionsanalysen zwischen PsaB und den entsprechenden homologen Proteinen zu Transportproteinen höherer Pflanzen durchzuführen. Dafür wurden die Homologen zu

folgenden Proteinen untersucht: Für die beiden Transportwege durch die Thylakoidmembran wurde für den cpSec-Transportweg die cpSecY-Translokase und für den ΔpH/TAT-Transportweg das TatA gewählt. Für die Integration in die Thylakoidmembran ist neben dem spontanen Transportweg, der keine offensichtlichen Faktoren benötigt, der cpSRP-Transportweg bekannt. Aus diesem Grund wurden aus dem cpSRP-Transportweg die Faktoren cpSRP54, cpFtsY sowie der Vertreter der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie, das Alb3, für die Interaktionsanalysen ausgewählt (Tab. 4).

Für eine Interaktionsanalyse im Split-Ubiquitin-System mussten die zwei zu untersuchenden Proteine in der Hefe (*S. cerevisiae DSY-1*) exprimiert werden. Die beiden potenziellen Interaktionspartner lagen als Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine vor (3.2.6). Dafür wurden die kodierenden Bereiche der entsprechenden Gene in die Split-Ubiquitin-Vektoren pADSL-Nx (C-terminal, Nub-Fusion, -N) bzw. pAMBV4/pTMBV4 (N-terminal, Cub-Fusion, -C) kloniert (Dualsystem Biotech AG, Schweiz). Die Wahl der Vektoren gewährleistete die korrekte Ausrichtung der Transmembranbereiche (TMs) der Proteine in der Membran. Für das PsaB wurde der pADSL-Nx-Vektor ausgewählt. Damit ist Nub N-terminal an das PsaB fusioniert. Das Slr1471p lag im pTMBV4-Vektor mit einem C-terminal fusionierten Cub vor. Für die weiteren Proteine der Transportwege sollte jeweils der pADSL-Nx und der pAMBV4 verwendet werden, damit wechselseitige Interaktionskontrollen möglich wurden.
Für die Interaktionsanalyse wurden jeweils die Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine in den Hefestamm *DSY-1* co-transformiert. Zum Nachweis der Plasmidetablierung wurden die Zellen auf Mangelmedium ohne Leucin und Tryptophan (DO-Leu-Trp) ausplattiert. Das Wachstum der Transformanden wurde durch einen *TRP1*-Marker im pADSL-Nx-Vektor und einen *Leu2*-Marker im pTMBV4- bzw. pAMBV4-Vektor ermöglicht. Im Anschluss wurde ein Interaktionstest durchgeführt, welcher anhand einer Aktivierung der Reportergene Aufschluss über Interaktionen zwischen den Fusionsproteinen gibt. Für die Interaktionsanalyse wurde zum einen das Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin (DO-Leu-Trp-His, -His) verwendet, zum anderen erfolgte ein ß-Galaktosidase-Filtertest (X-Gal) von Platten mit Mangelmedium ohne Leucin und Tryptophan. Dabei ließ sich aus dem Wachstum der Transformanden auf -His-Medium sowie aus deren Blaufärbung im X-Gal-Filtertest eine Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ* ableiten. Daraus konnte auf die Interaktion der Fusionsproteine gefolgert werden. Als

Negativkontrolle diente der Stamm *DSY-1*, dieser ist für Leucin, Tryptophan und Histidin auxotroph und wächst nicht auf den Selektivmedien. Als Positivkontrolle diente ein Hefe-Transformand, der mit den Plasmiden pADSL-Nx-cpSecE und pTMBV4-cpSecY co-transformiert wurde und eine relativ starke Aktivierung der Reportergene zeigte (Pasch *et al.*, 2005).

4.1.1 Übersicht der eingesetzten Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine

Das Protein PsaB aus *Synechocystis* besitzt elf TM, die im Folgenden als Helices bezeichnet werden (Abb. 6A). Diese elf Helices müssen korrekt und in der richtigen Orientierung in die Thylakoidmembran eingebettet sein.

Mit Hilfe der in Abb. 6B gezeigten PsaB-Fragmente sollte eine detaillierte Lokalisierung der interaktionsaktiven Bereiche der Helices 1-6 des PsaB-Proteins ermöglicht werden. Damit sollte nachgewiesen werden, welche Interaktionspartner zu Beginn der Integration von Bedeutung sind.

Für die Homologen zu den aus höheren Pflanzen bekannten Proteinen, die an den Transportwegen kernkodierter Proteine in bzw. durch die Thylakoidmembran beteiligt sind, sollten einige auf Interaktion mit PsaB untersucht werden (siehe Tab. 4). Weitere Interaktionsanalysen, die eine detaillierte Aussage über den genauen Mechanismus der Integration in die *Synechocystis*-Thylakoidmembran ermöglichen, sollten anschließend durchgeführt werden.

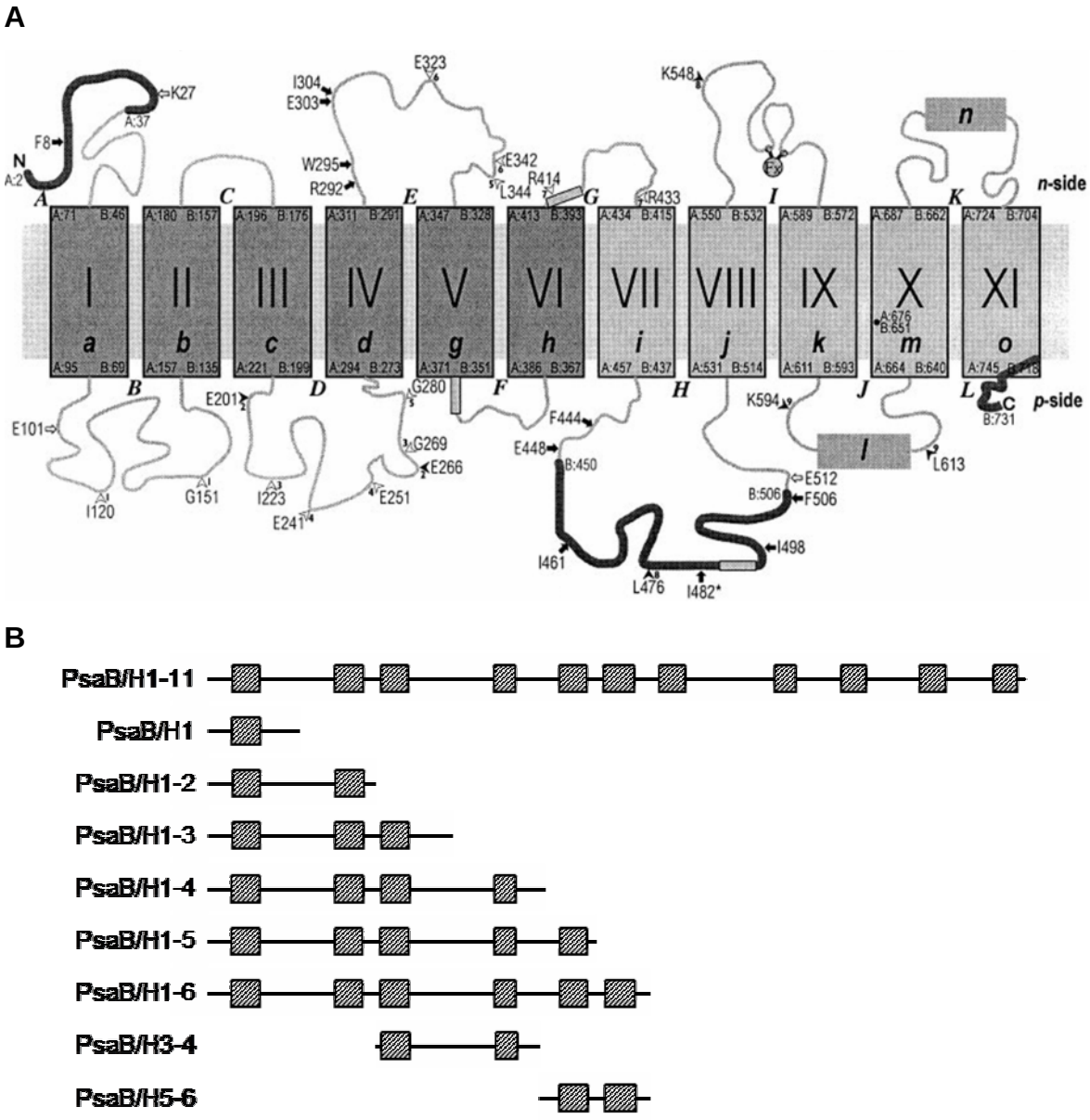

Abb. 6: Struktur des PsaB in *Synechocystis*.

(A) Die Struktur der elf Transmembranbereiche des PsaB-Proteins von *Synechocystis* in der Thylakoidmembran (verändert aus Sun *et al.*, 1997). (B) Schematische Darstellung der Transmembranbereiche (Helices, H) von PsaB und den PsaB-Fragmenten, die für die Lokalisierung der interaktionsaktiven Bereiche in den Nub-Vektor kloniert wurden.

Für die genaue Lokalisierung interaktionsaktiver Bereiche im Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p wurde dieses Protein in zwei Fragmente unterteilt. Ein Hydropathie-Profil zeigte, dass Slr1471p fünf TMs besitzt (Abb. 7, Sikorski, 2008). Zur Unterteilung wurde jeweils eine Cub-Fusion der drei N-terminalen Helices (Slr1471p/H1-3-C) sowie der zwei C-terminalen Helices (Slr1471p/H4-5-C) für die Interaktionsanalysen eingesetzt.

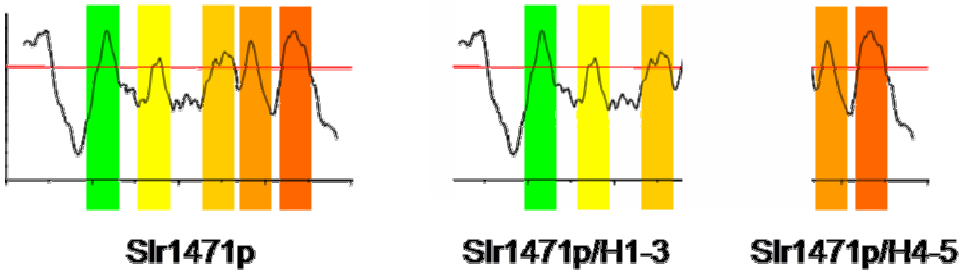

Abb. 7: Das Hydropathie-Profil von Slr1471p sowie die für die genaue Lokalisierung der interaktionsaktiven Bereiche untersuchten Slr1471p-Fragmente.

Die drei N-terminalen Helices (H1-3) sowie die zwei C-terminalen Helices (H4-5) wurden in der Interaktionsanalyse verwendet. Die mittels Hydropathie-Profil gefundenen TMs sind durch farbige Markierung gekennzeichnet (Sikorski, 2008).

4.1.2 Negativkontrolle der Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine

Die im Folgenden eingesetzten Vektoren wurden vor der Interaktionsanalyse daraufhin kontrolliert, ob das Nub- bzw. das Cub-Fusionsprotein unabhängig vom potentiellen Interaktionspartner die Transkription der Reportergene aktiviert (Bartel *et al.*, 1993). Die Selbstaktivierung kann z.B. auftreten, wenn das an Cub fusionierte Protein direkt mit Nub interagiert, oder umgekehrt. Ursache für die Selbstaktivierung können unspezifische Spaltungen im cytosolischen Bereich der Fusionsproteine oder Überexpression sein (Ma und Ptashne, 1987, Dualsystem Biotech AG).

Um eine unspezifische Aktivierung der Reportergene auszuschließen, wurden alle Nub-Plasmide mit dem Plasmid pMBV-Alg5 und alle Cub-Plasmide mit dem Plasmid pAlg5-NubG co-transformiert. Alg5 ist ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums und sollte als Glucosyltransferase der Hefe nicht mit den zu testenden *Synechocystis*-Proteinen interagieren.

Das entsprechende Cub-Fusionsprotein (pTFB1-Vektor) von PsaB zeigte Autoaktivierung (Daten nicht gezeigt) und wurde nicht weiter analysiert. Für die Nub-Fusionsproteine von PsaB wurde keine Autoaktivierung der Reportergenexpression detektiert (Abb. 8A).

Die zu untersuchenden Proteine der verschiedenen Transportwege zeigten weder in der Nub- noch in der Cub-Fusion eine Selbstaktivierung (Abb. 8B). Damit konnten alle in der Abb. 8 dargestellten Vektoren für weitere Interaktionsanalysen eingesetzt werden.

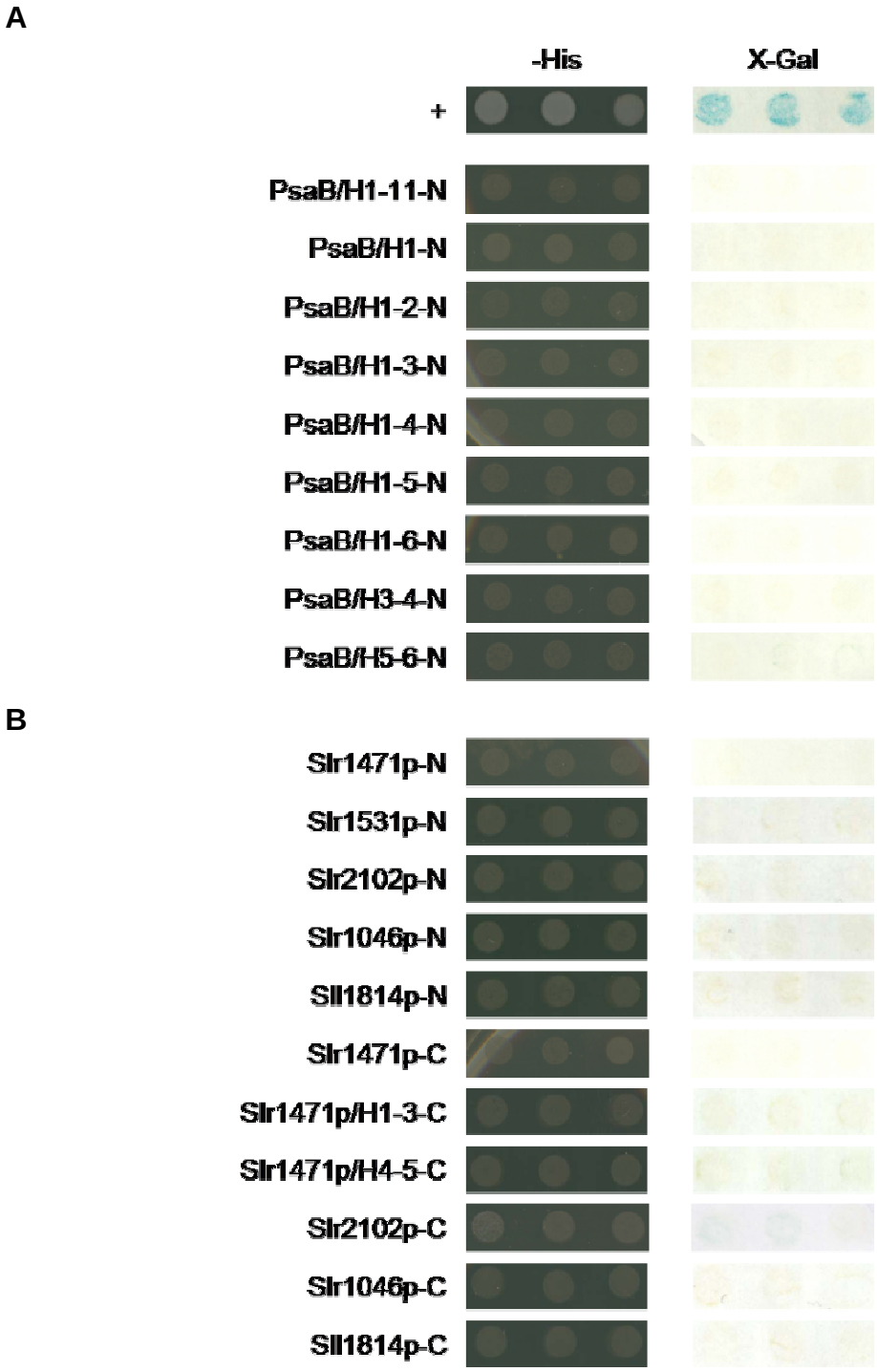

Abb. 8: Negativkontrolle der Nub- bzw. Cub-Fusionsproteine.

Für den Test auf Autoaktivierung wurden die jeweiligen Proteine an den N-terminalen Teil des Ubiquitins, das sog. Nub (N) bzw. an den C-terminalen Teil des Ubiquitins, das sog. Cub (C) fusioniert. Die Co-Expression erfolgte mit dem Protein Alg5. Das Wachstum auf histidinfreiem Medium (-His) sowie eine Blaufärbung im ß-Galaktosidase-Filtertest (X-Gal) deuten auf eine Selbstaktivierung hin. Als Vergleich diente die Positivkontrolle (+). Test auf Autoaktivierung der PsaB-Fragmente (A) sowie der Proteine der verschiedenen Transportwege (B).

4.1.3 Interaktion zwischen PsaB und Proteinen der verschiedenen Transportwege

In der Interaktionsanalyse wurde zunächst das Volllängen-PsaB an Nub (PsaB/H1-11-N) mit dem am Cub fusionierten Slr1471p (Slr1471p-C) auf Interaktion untersucht. Ein Wachstum auf -His-Medium sowie eine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest zeigten eindeutig eine Interaktion zwischen den beiden Fusionsproteinen (Abb. 9). Mit diesem Experiment konnte erstmals eine direkte Interaktion zwischen PsaB und Slr1471p nachgewiesen werden.

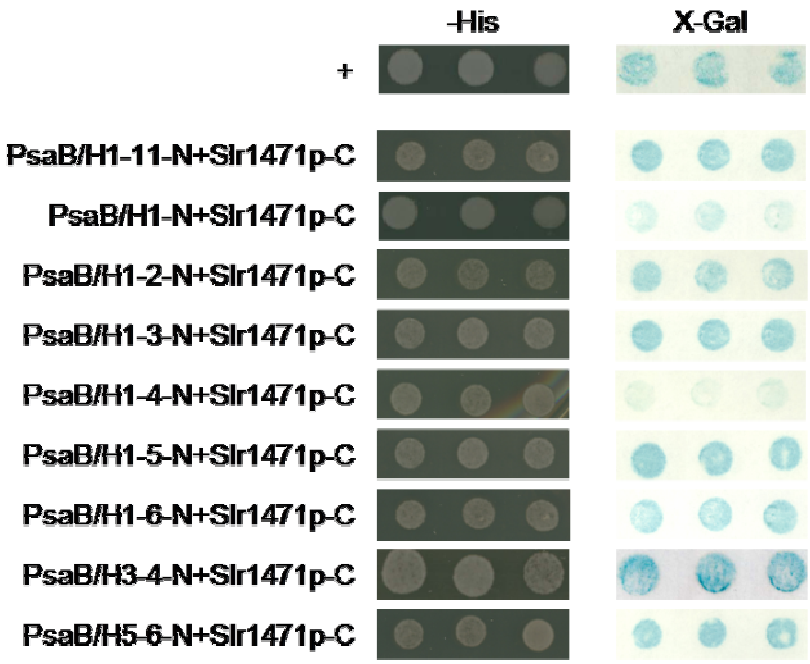

Abb. 9: Interaktionsanalyse der Nub-Fusionen von PsaB und dessen Fragmente mit der Cub-Fusion von Slr1471p.

Das Volllängen-PsaB (PsaB/H1-11) sowie die verschiedenen PsaB-Fragmente wurden an den N-terminalen Teil von Nub (N) fusioniert. Diese wurden mit der Cub-Fusion von Slr1471p (Slr1471p-C) co-transformiert. Ein Wachstum der Transformanden auf histidinfreiem Medium (-His) sowie eine Blaufärbung im ß-Galaktosidase-Filtertest (X-Gal) zeigte eine Interaktion an. Als Vergleich diente die Positivkontrolle (+) sowie die Negativkontrollen der Fusionsproteine (Abb. 8).

Für eine genauere Lokalisation der Interaktionsflächen im PsaB wurden im Folgenden verschiedene an Nub fusionierte PsaB-Fragmente auf ihre Interaktion mit Slr1471p untersucht (Abb. 9). Diese Analysen erfolgten zunächst mit sechs verschiedenen PsaB-Fragmenten die ausgehend von der ersten Helix jeweils eine zusätzliche Helix aufwiesen (H1, H1-2, H1-3, H1-4, H1-5, H1-6). Dabei konnte bereits ein Zellwachstum auf -His-Medium sowie eine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest bei der Interaktionsanalyse von

PsaB/H1-N mit Slr1471p beobachtet werden (Abb. 9). Das weist auf das Vorhandensein einer Interaktionsfläche in der ersten Helix hin. Da bereits in Helix 1 eine Interaktionsfläche zu finden war, konnten bei den weiteren Co-Transformanden mit zunehmender Helix-Anzahl ebenfalls Interaktionen nachgewiesen werden (PsaB/H1-2-N bis PsaB/H1-6-N, Abb. 9). Um festzustellen, ob sich in den untersuchten Bereichen dieser ersten sechs Helices noch weitere unabhängige Interaktionsflächen befanden, wurden zwei zusätzliche PsaB-Fragmente untersucht. Zunächst wurden die Helices 3-4 (PsaB/H3-4-N, Abb. 9) mit Slr1471p-C co-transformiert. Hier konnten Zellproliferation auf -His-Medium sowie Blaufärbung im X-Gal-Filtertest nachgewiesen werden, womit für die Helices 3-4 eine weitere unabhängige Interaktionsfläche gefunden war. Die Analyse der Helices 5-6 (PsaB/H5-6-N, Abb. 9) zeigte das gleiche Ergebnis. Damit konnte für die Helices 5-6 ebenfalls eine unabhängige Interaktionsfläche gefunden werden.
Die bisherigen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass sich im N-terminalen Teil von PsaB mehrere interaktionsaktive Bereiche befinden, die mit Slr1471p interagieren. Dabei interagierten die Helix 1, sowie die Helices 3-4 bzw. 5-6 unabhängig voneinander.

Für eine Lokalisierung interaktionsaktiver Bereiche im Slr1471p wurde dieses Protein in zwei Fragmente unterteilt (siehe Abb. 7, S. 53). Die Cub-Fusionen der beiden Slr1471p-Fragmente wurden mit den Nub-Fusionen der PsaB-Fragmente co-transformiert und auf Interaktion getestet (Abb. 10). Die Interaktionsanalyse der PsaB-Fragmente mit Slr1471p/H1-3 zeigten alle ein negatives Ergebnis (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu konnte bei Co-Transformation der PsaB-Fragmente mit dem Slr1471p/H4-5 ein Zellwachstum auf -His-Medium sowie eine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest nachgewiesen werden (Abb. 10B). Damit ließen sich die Ergebnisse der Interaktion des Volllängen-Slr1471p mit den PsaB-Fragmenten bestätigen. Die drei bereits gezeigten, unabhängigen Interaktionsflächen (Helix 1, Helices 3-4 bzw. Helices 5-6) konnten in den hier durchgeführten Interaktionsanalysen mit Slr1471p/H4-5 bestätigt werden.

Aus diesen Ergebnissen der Interaktionsanalyse lässt sich feststellen, dass Slr1471p eine Affinität zu PsaB aufweist. Der interaktionsaktive Bereich von Slr1471p ist in den Helices 4-5 zu finden. Eine genauere Analyse des C-terminalen Bereiches von Slr1471p wäre notwendig, um eine Aussage über die Größe bzw. die Anzahl der vorhandenen Interaktionsflächen zum PsaB zu treffen.

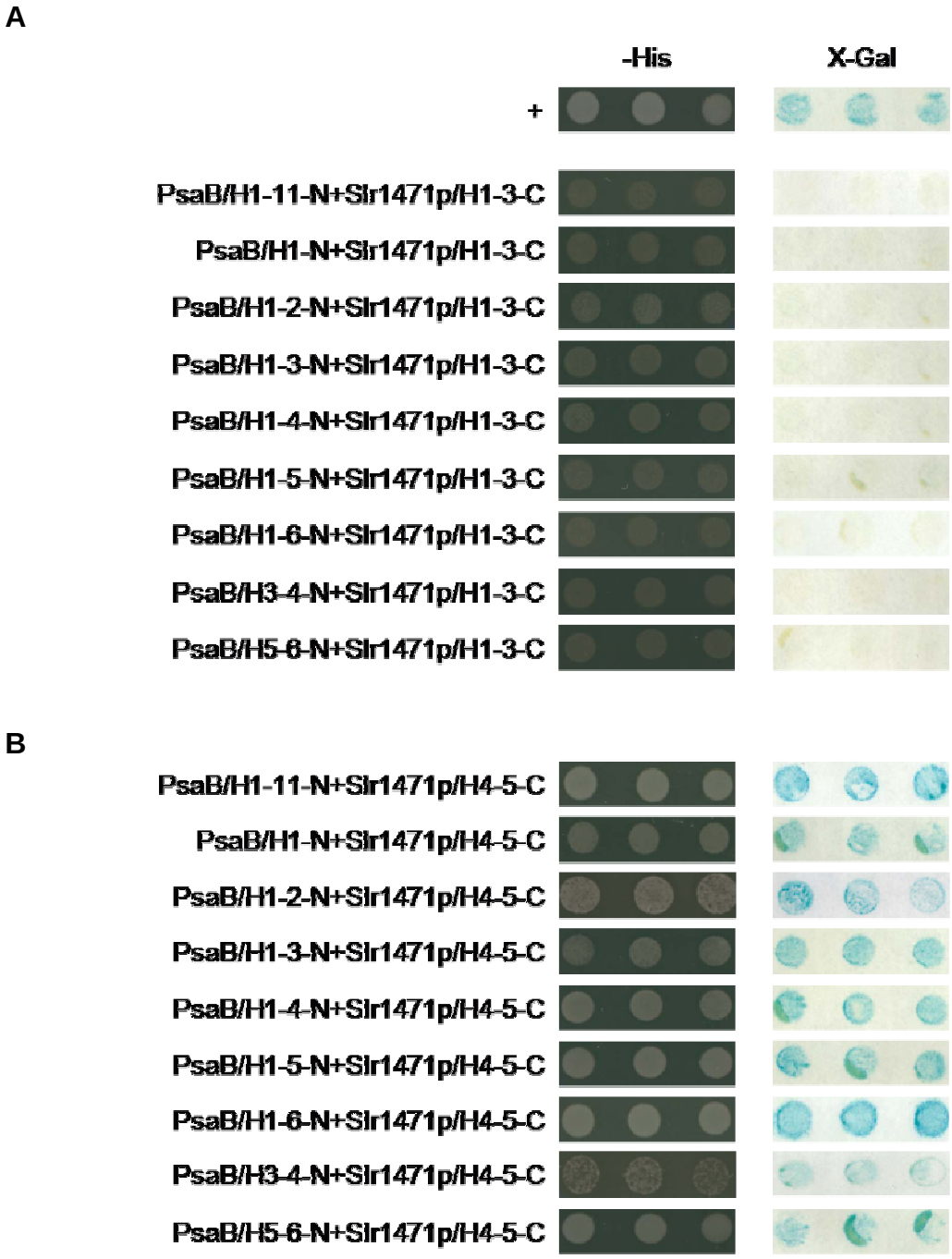

Abb. 10: Interaktionsanalyse der Nub-Fusionen von PsaB und dessen Fragmente mit den Cub-Fusionen der zwei Slr1471p-Fragmente.

Das Volllängen-PsaB (PsaB/H1-11) sowie die verschiedenen PsaB-Fragmente wurden an den N-terminalen Teil von Nub (N) fusioniert. Diese wurden mit den Cub-Fusionen von Slr1471p/H1-3 (Slr1471p/H1-3-C) und Slr1471p/H4-5 (Slr1471p/H4-5-C) co-transformiert. Ein Wachstum der Transformanden auf histidinfreiem Medium (-His) sowie eine Blaufärbung im ß-Galaktosidase-Filtertest (X-Gal) zeigte eine Interaktion an. Als Vergleich diente die Positivkontrolle (+) sowie die Negativkontrollen der Fusionsproteine (Abb. 8). Detaillierte Untersuchungen auf Interaktionsflächen im PsaB-Volllängenprotein sowie in den PsaB-Fragmenten mit Slr1471p/H1-3 (A) und mit Slr1471p/H4-5 (B).

Weitere Faktoren, die bei der Integration von PsaB eine Rolle spielen könnten, sollten mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems analysiert werden. Die in der Tab. 4 (S. 49) gezeigten Proteine der verschiedenen Transportwege wurden auf eine Interaktion mit PsaB untersucht. Wie bereits erwähnt, ist kein Mechanismus für die möglicherweise co- oder auch post-translationale Integration von PsaB bekannt.

Das cpSecY-Homologe Sll1814p wurde auf Interaktion mit PsaB geprüft. Dabei lag das Sll1814p als Cub-Fusion vor und konnte mit der Nub-Fusion des PsaB co-transformiert werden. Mit dem Volllängen-PsaB wurde durch Zellwachstum auf -His-Medium und Blaufärbung im X-Gal-Filtertest eine schwache Interaktion festgestellt (Abb. 11A). Eine genaue Analyse der Interaktionsflächen erfolgte durch Co-Transformation von Sll1814p mit den an Nub fusionierten PsaB-Fragmenten. Diese Interaktionstests erfolgten zunächst mit PsaB-Fragmenten, die jeweils eine zusätzliche Helix aufwiesen (H1, H1-2, H1-3, H1-4, H1-5, H1-6). Dabei konnte bereits für die erste Helix eine Aktivierung der beiden Reportergene *HIS3* und *lacZ* beobachtet und damit eine Interaktion von PsaB mit Sll1814p nachgewiesen werden (Abb. 11A). Da bereits in Helix 1 eine Interaktionsfläche zu finden war, mussten bei allen weiteren Co-Transformanden mit zunehmender Helix-Anzahl Interaktionen nachweisbar sein (PsaB/H1-2-N bis PsaB/H1-6-N, Abb. 11A). Um festzustellen, ob sich in den untersuchten Bereichen dieser ersten sechs Helices noch weitere unabhängige Interaktionsflächen befinden, wurden ebenfalls die PsaB-Fragmente PsaB/H3-4 und PsaB/H5-6 mit Sll1814p co-transformiert. Für die Helices 3-4 wurde ein negatives Ergebnis festgestellt, die Aktivierung der Reportergene konnte nicht beobachtet werden (Abb. 11A). Die Analyse der Helices 5-6 (Abb. 11A) zeigte ein Zellwachstum auf -His-Medium sowie eine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest. Damit konnte für die Helices 5-6 eine unabhängige Interaktionsfläche gefunden werden. Die vorhandenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich im PsaB zwei interaktionsaktive Bereiche zu dem cpSecY-Homologen Sll1814p befinden. Dabei interagieren die Helix 1 und die Helices 5-6 von PsaB unabhängig voneinander. Somit konnte erstmals ein weiterer Faktor, das Sll1814p, identifiziert werden, der an der Integration von PsaB in die Thylakoidmembran beteiligt sein könnte.

Die Analyse des cpFtsY-Homologen Slr2102p ergab, dass das Volllängen-PsaB (PsaB/H1-11-N) in Co-Transformation mit der Cub-Fusion von Slr2102p keine Aktivierung der Reportergene zeigte (Abb. 11B). Somit konnte eine Interaktion dieser beiden Proteine nicht nachgewiesen werden.

Für die Untersuchung des cpTatA-Homologen Slr1046p konnte ebenfalls keine Interaktion mit PsaB gefunden werden. Die Nub-Fusion des Volllängen-PsaB zeigte bei Co-Transformation mit der Cub-Fusion von Slr1046p kein Zellwachstum auf -His-Medium sowie keine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest (Abb. 11C).

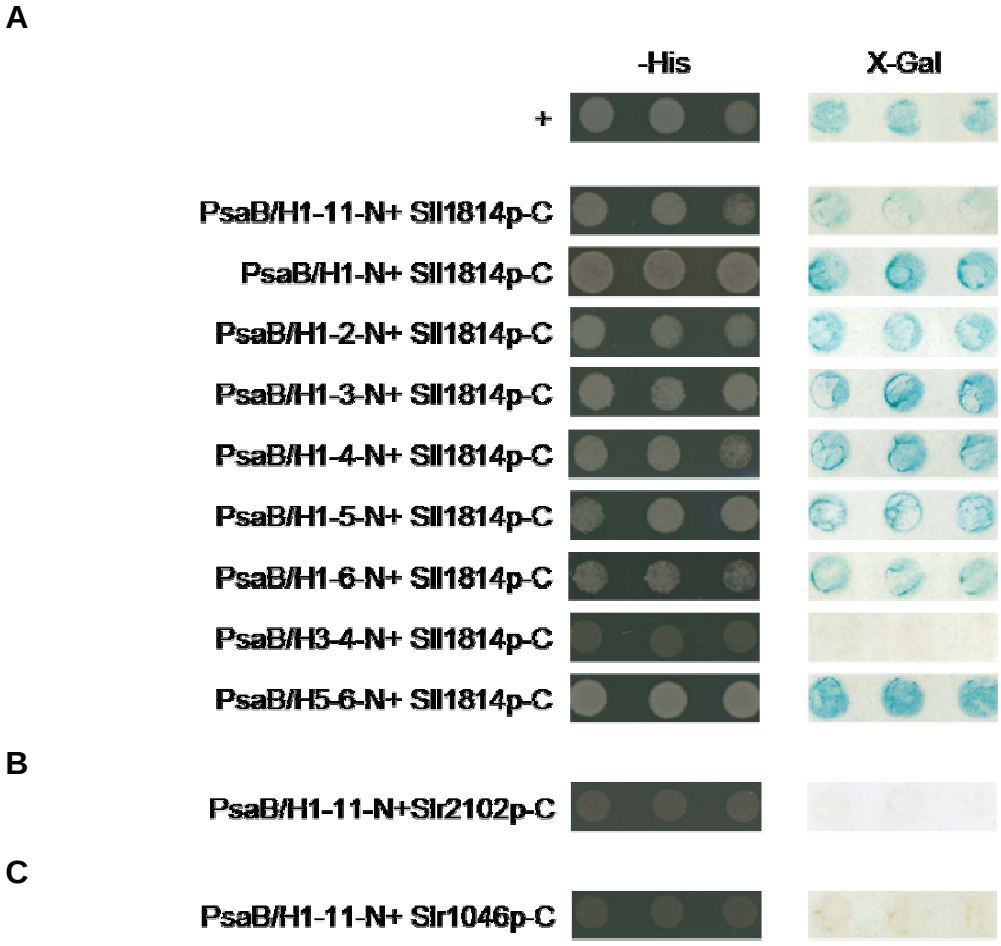

Abb. 11: Interaktionsanalyse der Nub-Fusionen von PsaB und dessen Fragmente mit den Cub-Fusionen von Sll1814p, Slr2102p und Slr1046p.

Das Volllängen-PsaB (PsaB/H1-11) sowie die verschiedenen PsaB-Fragmente wurden an den N-terminalen Teil von Nub (N) fusioniert. Diese wurden mit den Cub-Fusionen von Sll1814p (Sll1814p-C), Slr2102p (Slr2102p-C) und Slr1046p (Slr1046p-C) co-transformiert. Ein Wachstum der Transformanden auf histidinfreiem Medium (-His) sowie eine Blaufärbung im ß-Galaktosidase-Filtertest (X-Gal) zeigte eine Interaktion an. Als Vergleich diente die Positivkontrolle (+) sowie die Negativkontrollen der Fusionsproteine (Abb. 8). Detaillierte Untersuchungen auf Interaktionsflächen im PsaB-Volllängenprotein sowie in den PsaB-Fragmenten (A) mit Sll1814p, (B) mit Slr2102p und (C) mit Slr1046p.

Neben der bereits gezeigten Interaktion von PsaB mit Slr1471p (Abb. 9) konnte nur Sll1814p (Abb. 11A) als möglicher weiterer, direkter Interaktionspartner identifiziert werden. Für die Analyse der interaktionsaktiven Bereiche im N-terminalen Teil von PsaB

konnten für Slr1471p drei unabhängige Interaktionsflächen gefunden werden, Helix 1, Helices 3-4 und Helices 5-6. Für Sll1814p deuteten die Analysen des N-terminalen Teils von PsaB auf nur zwei unabhängige interaktionsaktive Bereich hin, Helix 1 und Helices 5-6. Für die Integration von PsaB in die Thylakoidmembran spielen Slr2102p und Slr1046p keine direkte Rolle, eine Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden. Für Slr1531p kann bislang keine Aussage über eine direkte Interaktion zu PsaB getroffen werden. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die untersuchten Faktoren in einem gemeinsamen Integrationsmechanismus von Bedeutung sind. Dazu folgen im nächsten Abschnitt die wechselseitigen Interaktionsanalysen der Faktoren der verschiedenen Transportwege.

4.1.4 Interaktionsanalysen zwischen Proteinen der einzelnen Transportwege

In den folgenden Analysen sollten die direkten, wechselseitigen Interaktionen der Faktoren der Transportwege (Übersicht in Tab. 4, S. 49) genauer untersucht werden. In *Synechocystis* ist bisher kein Mechanismus bekannt, der für eine co- oder post-translationale Integration von Membranproteinen allgemein gültig ist. Die hier aufgeführten Interaktionsanalysen sollten dazu beitragen, die einzelnen in höheren Pflanzen bekannten Transportwege in *Synechocystis* in Verbindung zu bringen.

Wie in Abb. 12 dargestellt, wurden zunächst alle Proteine der Transportwege auf Interaktion mit dem Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p untersucht, einschließlich der Analyse der interaktionsaktiven Bereiche im Slr1471p (Slr1471p/H1-3, Slr1471p/H4-5, siehe Abb. 7, S. 53).

Das cpSRP54-Homologe Slr1531p als Nub-Fusion wurde mit Slr1471p als Cub-Fusion in den Hefestamm *DSY-1* co-transformiert. Ein Zellwachstum auf -His-Medium sowie eine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest deuteten auf eine Interaktion hin (Abb. 12A). Die genaue Analyse der interaktionsaktiven Bereiche im Slr1471p ergab, dass eine eindeutige und starke Interaktion mit dem N-terminalen Teil von Slr1471p (Slr1471p/H1-3) vorlag (Abb. 12A). Der C-terminale Teil von Slr1471p (Slr1471p/H4-5) zeigte hingegen nur eine sehr schwache Aktivierung der Reportergene. Das deutete darauf hin, dass die Interaktion nicht vorhanden oder nur sehr schwach ausgeprägt war (Abb. 12A).

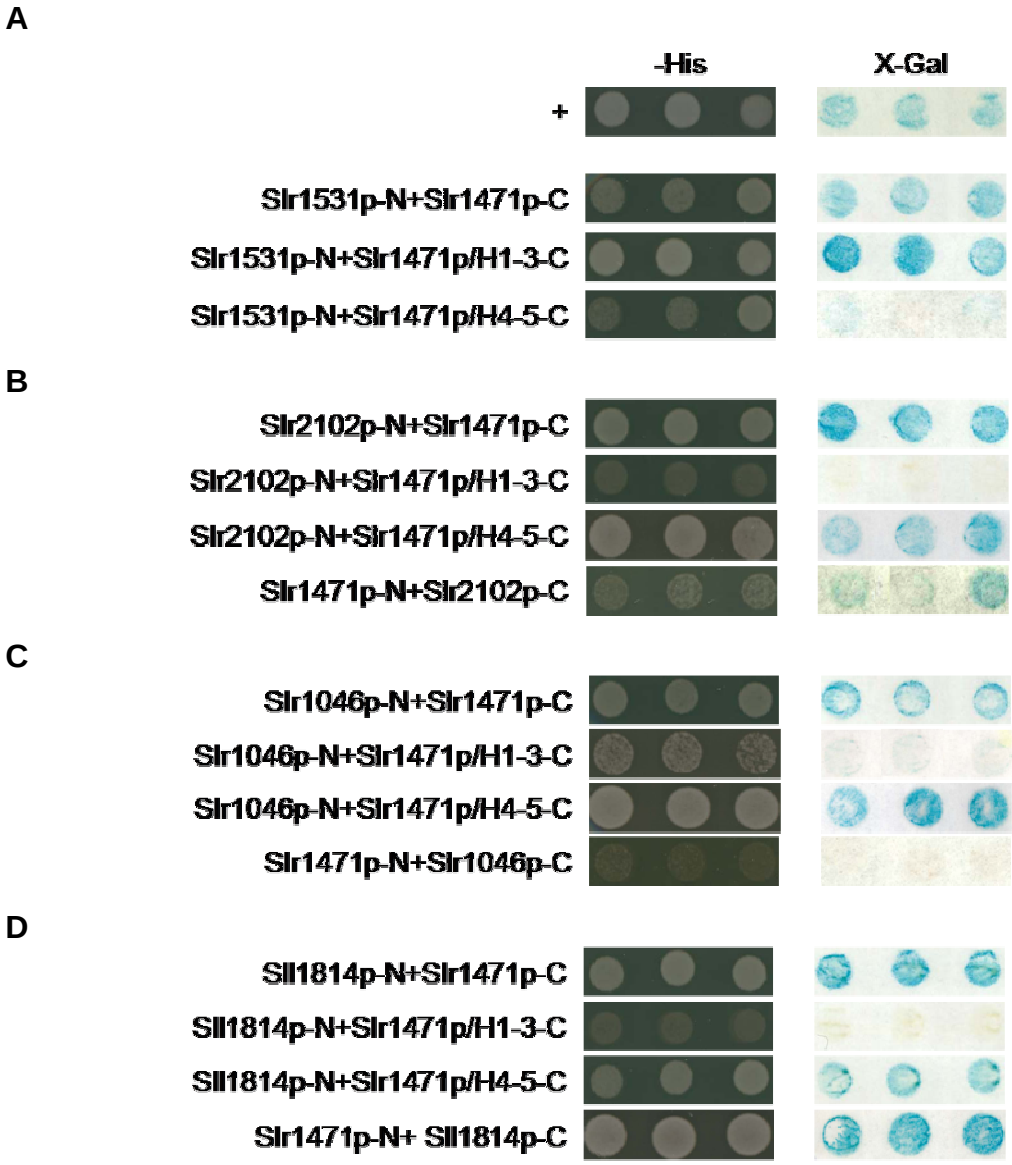

Abb. 12: Interaktionsanalysen der Nub- bzw. Cub-Fusionen von Slr1471p und dessen Fragmente mit den Nub- bzw. Cub-Fusionen von Slr1531p, Slr2102p, Slr1046p und Sll1814p.

Das Volllängen-Slr1471p wurde an den N- sowie den C-terminalen Teil des Ubiquitins fusioniert. Für die Lokalisierung der interaktionsaktiven Bereiche im Slr1471p wurden die zwei Slr1471p-Fragmente mit Cub (C) fusioniert. Diese wurden mit den entsprechenden Nub- bzw. Cub-Fusionen von Slr1531p (Slr1531p-N), Sll1814p (Sll1814p-N/C), Slr2102p (Slr2102p-N/C) und Slr1046p (Slr1046p-N/C) co-transformiert. Ein Wachstum der Transformanden auf histidinfreiem Medium (-His) sowie eine Blaufärbung im ß-Galaktosidase-Filtertest (X-Gal) zeigte eine Interaktion an. Als Vergleich diente die Positivkontrolle (+) sowie die Negativkontrollen der Fusionsproteine (Abb. 8). Untersuchungen auf Interaktionen von Slr1471p (A) mit Slr1531p, (B) mit Slr2102p, (C) mit Slr1046p und (D) mit Sll1814p.

Die Analyse des cpFtsY-Homologen Slr2102p hinsichtlich einer Interaktion mit Slr1471p zeigte ebenfalls ein positives Ergebnis (Abb. 12B). Die Interaktion konnte für beide

Proteine jeweils in Nub- bzw. Cub-Fusion nachgewiesen werden. Als interaktionsaktiver Bereich im Slr1471p wurde ausschließlich der C-Terminus (Slr1471p/H4-5) festgestellt (Abb. 12B).

Bezüglich des cpTatA-Homologen Slr1046p konnte eine Interaktion mit Slr1471p detektiert werden (Abb. 12C). Die Zellproliferation auf -His-Medium sowie die Blaufärbung im X-Gal-Filtertest wurden allerdings nur bei Slr1046p als Nub-Fusion und Slr1471p als Cub-Fusion nachgewiesen. Die umgekehrte Co-Transformation (Slr1046p-C und Slr1471p-N) bestätigte das Ergebnis nicht (Abb. 12C). Für die Co-Transformationen von Slr1046p als Nub-Fusion und den Slr1471p-Fragmenten als Cub-Fusion konnte die Interaktion mit Zellwachstum auf -His-Medium sowie einer Blaufärbung im X-Gal-Filtertest beobachtet werden (Abb. 12C). Dabei wurde ein interaktionsaktiver Bereich von starker Intensität mit den Helices 4-5 und einer mit sehr schwacher Intensität bei den Helices 1-3 im Slr1471p gefunden.

Das cpSecY-Homologe Sll1814p wurde ebenfalls auf Interaktion mit Slr1471p untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige Interaktion, wobei das Slr1471p in Nub- bzw. Cub-Fusion sowie das Sll1814p in Nub- bzw. Cub-Fusion vorliegen konnte (Abb. 12D). Das Zellwachstum auf -His-Medium sowie eine Blaufärbung im X-Gal-Filtertest wurde ebenfalls für die Co-Transformation mit Slr1471p/H4-5 als Cub-Fusion beobachtet (Abb. 12D). Für den N-terminalen Teil von Slr1471p konnte keine Aktivierung der Reportergene nachgewiesen werden. Damit identifizierte die Interaktionsstudie die Helices 4-5 von Slr1471p als interaktionsaktiven Bereich für Sll1814p (Abb. 12D).

Mit den Interaktionsanalysen der Homologen zu den Transportproteinen aus höheren Pflanzen mit dem Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p konnte für alle untersuchten Proteine ein positives Ergebnis gezeigt werden (Abb. 12A-D). Die Proteine der verschiedenen Transportwege besitzen alle eine Affinität zu Slr1471p. Dabei wurde festgestellt, dass für die Proteine Slr2102p, Slr1046p und Sll1814p die Helices 4-5 den interaktionsaktiven Bereich vom Slr1471p darstellten. Im Gegensatz dazu fand sich der interaktionsaktive Bereich für das Protein Slr1531p innerhalb der Helices 1-3 von Slr1471p. Damit scheinen alle Proteine der verschiedenen Transportwege nach Analyse im Split-Ubiquitin-System mit Slr1471p in direkter Verbindung zu stehen.

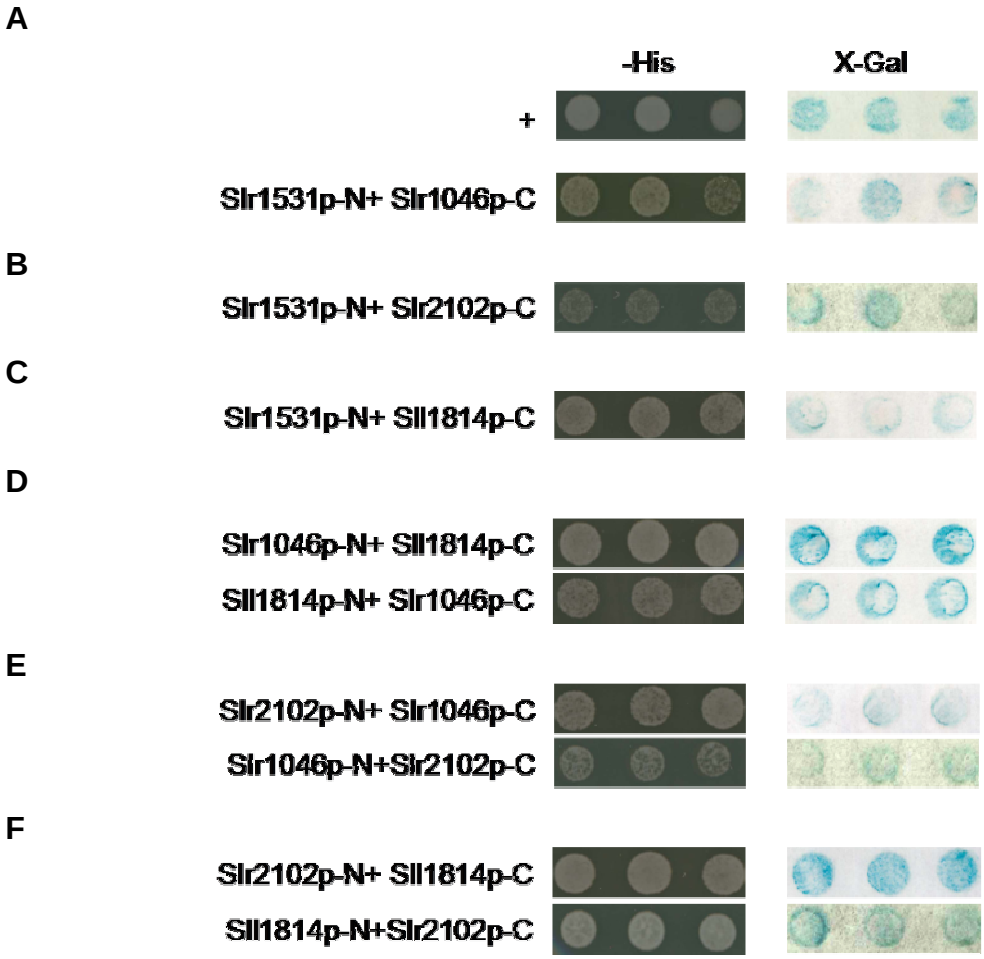

Abb. 13: Test auf wechselseitige Interaktionen der Nub- bzw. Cub-Fusionen von Slr1531p, Sll1814p, Slr2102p und Slr1046p.

Die Proteine der verschiedenen Transportwege in bzw. durch die Thylakoidmembran wurden an den N- sowie den C-terminalen Teil des Ubiquitins fusioniert. Die entsprechenden Nub- bzw. Cub-Fusionen von Slr1531p (Slr1531p-N), Sll1814p (Sll1814p-N/C), Slr2102p (Slr2102p-N/C) und Slr1046p (Slr1046p-N/C) wurden co-transformiert. Ein Wachstum der Transformanden auf histidinfreiem Medium (-His) sowie eine Blaufärbung im ß-Galaktosidase-Test (X-Gal) zeigte eine Interaktion an. Als Vergleich diente die Positivkontrolle (+) sowie die Negativkontrollen der Fusionsproteine (Abb. 8). Folgende Fusionsproteine wurden auf Interaktion untersucht: (A) Slr1531p-N und Slr1046p-C, (B) Slr1531p-N und Slr2102-C, (C) Slr1531p-N und Sll1814p-C, (D) Slr1046p-N/-C und Sll1814p-N/-C, (E) Slr2102p-N/-C und Slr1046p-N/-C, (F) Slr2102p-N/-C und Sll1814p-N/-C.

Die folgenden Interaktionsanalysen sollten klären, ob die verbleibenden Proteine Slr1531p, Slr1046p, Slr2102p und Sll1814p miteinander direkt interagieren (Abb. 13). Für die Interaktionsanalyse von Slr1531p und Slr1046p wurde eine schwache Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ* beobachtet (Abb. 13A). Bei der Co-Transformation von Slr1531p mit Slr2102p deutete ein schwaches Zellwachstum auf -His-Medium sowie eine

leichte Blaufärbung im X-Gal-Filtertest auf eine Interaktion hin (Abb. 13B). Die Analyse von Slr1531p mit Sll1814p zeigte ebenfalls eine schwache Interaktion (Abb. 13C). Die Interaktion von Slr1046p mit Sll1814p wurde sowohl in der Nub- als auch in der Cub-Fusion der jeweiligen Proteine nachgewiesen (Abb. 13D). Bei der Analyse von Slr2102p mit Slr1046p konnte in beiden Co-Transformationen (als Nub- bzw. als Cub-Fusionen) nur eine schwache Interaktion beider Proteine beobachtet werden (Abb. 13E). Die Interaktion von Slr2102p und Sll1814p wurde eindeutig gezeigt (Abb. 13F). Dabei war die Aktivierung der Reportergene unabhängig von der jeweiligen Nub- bzw. Cub-Fusion möglich.

Mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems konnten die hier dargestellten Proteine der verschiedenen Transportwege (Tab. 4, S. 49) auf ihre wechselseitige Interaktion untersucht werden. Nach diesen Analysen stehen alle Proteine miteinander in direkter Verbindung. Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktionen lassen sich nicht ziehen, da die Beurteilung der relativen Interaktionsstärke zwischen den Proteinen allein auf Grundlage der Blaufärbung der Hefezellen und der Wachstumsrate auf Selektivmedium erfolgte. Die im Split-Ubiquitin-System nachgewiesenen Interaktionen können in *Synechocystis* sowohl sehr schwacher oder zeitlich begrenzter Art sein. Eine Aussage über eventuelle in *Synechocystis* vorhandene Integrationsmechanismen machten diese Interaktionsanalysen möglich. Jedoch sind für die einzelnen Transportwege genaue Daten zu Interaktionsstudien des zu integrierenden Proteins und weiterführende biochemische Analysen in *Synechocystis* notwendig.

4.2 Biochemische Untersuchungen zu Alb3.2p aus *C. reinhardtii*

In den Chloroplasten sind die Mitglieder der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie wichtig für die Assemblierung der photosynthetischen Proteinkomplexe in die Thylakoidmembran. In *Synechocystis* ist das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p an der Insertion von D1 in die Thylakoidmembran und in das PSII beteiligt (Ossenbühl *et al.,* 2006).
In der Grünalge *C. reinhardtii* sind zwei Oxa1/Alb3/YidC-Homologe kodiert, Alb3.1p und Alb3.2p. Dabei zeigt die Proteinsequenz von Alb3.2p eine höhere Ähnlichkeit zu *A. thaliana* Alb3p als zu Alb3.1p. Das Alb3.1p spielt eine Rolle in der Insertion der LHCPs sowie in der PSII-Assemblierung (Bellafiore *et al.*, 2002, Ossenbühl *et al.,* 2004).

Das Alb3.2p ist in der Thylakoidmembran lokalisiert und mit großen Komplexen assoziiert. Einige Interaktionspartner von Alb3.2p konnten mittels CoIP identifiziert werden, dazu gehören Alb3.1p, D1 und D2, sowie die LHCPs und PsaA. Zusätzlich interagiert Alb3.2p mit dem „Vesicle-inducing protein“ (VIPP1). Dieses Protein ist am Lipidtransfer und am Vesikeltransport in die Plastiden beteiligt. Die Reduzierung der Alb3.2p-Menge mittels RNAi in *C. reinhardtii* verursacht die Zunahme der Vakuolengröße und führt zum Zelltod. Zusätzlich führt die Abnahme der Alb3.2p-Menge durch RNAi zu einem Effekt in der Akkumulation der PSI- und PSII-Untereinheiten (Göhre *et al.*, 2006).
Zusammenfassend ist festzustellen, dass Alb3.2p essentiell für das Zellwachstum auch unter heterotrophen Bedingungen ist. Daraus kann gefolgert werden, dass dieses Protein neben seiner Rolle in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe weitere Funktionen besitzt. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Alb3.2p an derzeit unbekannten, aber essentiellen zellulären Wegen beteiligt ist. Für die Aufklärung dieser Funktionen sollten weiterführende biochemische Analysen zu Alb3.2p durchgeführt werden.

4.2.1 Lokalisierung von Alb3.2p

Vor Beginn der weiterführenden Untersuchungen wurde die Lokalisation von Alb3.2p in den Chloroplasten von *C. reinhardtii* überprüft. Der in den folgenden Analysen verwendete *C. reinhardtii*-Stamm CW15HF besitzt zwei Proteine mit Epitop-Markierung, das Alb3.1p mit dem HA-tag und das Alb3.2p mit dem Flag-tag (Göhre *et al.*, 2006). Dies ermöglicht den Nachweis der beiden Proteine über die Epitop-Markierung oder im Falle von Alb3.2p zusätzlich über den direkten Antikörper.
Zunächst wurde die Lokalisation von Alb3.2p in der Thylakoidmembran überprüft (Abb. 14). Die isolierten Chloroplasten wurden in Gegenwart von Mg^{2+} hypoton lysiert, und nach Zentrifugation durch ein Saccharose-Kissen die ungereinigte Thylakoidmembranen erhalten. Diese konnten im folgenden Zentrifugationsschritt über einen Saccharosestufengradienten mit EDTA gereinigt werden und lagen nun als intermediäre Phase vor. In diesem zweiten Zentrifugationsschritt wurde auch eine orange gefärbte Interphase, die den „Low-density membranes“ (LDM) entspricht, abgetrennt. Dies war möglich, da nach Entfernung der Mg^{2+}-Ionen durch EDTA die Assoziation der LDM mit den Thylakoidmembranen aufgehoben wurde. Die Western-Blot-Analysen (Abb. 14) zeigten deutlich, dass sich Alb3.2p und Alb3.1p in der Thylakoidmembran-Fraktion

befanden. Als Kontrolle für die Thylakoidmembran (T)-Fraktion diente der immunologische Nachweis der AtpB (ATPase Untereinheit β), die in der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Als Markerprotein für die Stroma (S)-Fraktion wurde das stromale Protein RbcL (große Untereinheit der RuBisCo) genutzt. Für Alb3.2p und Alb3.1p konnte keine Lokalisation in den „Low-density membranes" detektiert werden, für die allerdings kein geeigneter Antikörper gegen ein Markerprotein vorlag.

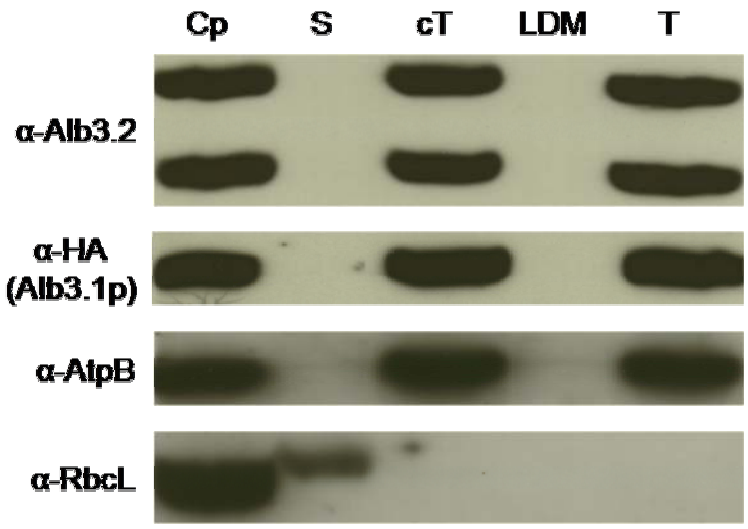

Abb. 14: Die Lokalisierung von Alb3.2p in der Thylakoidmembran.

Aus isolierten Chloroplasten (Cp) wurden in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen mit Hilfe eines Saccharose-Kissens die ungereinigten Thylakoidmembranen (cT) vom Stroma (S) getrennt. Die anschließende Reinigung der Thylakoidmembranen erfolgte über einen Saccharosestufengradienten in Abwesenheit von Mg^{2+}-Ionen, dabei wurden „Low-denisty membranes" (LDM) und gereinigte Thylakoidmembranen (T) voneinander getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p, HA (Alb3.1p), AtpB (ATPase Untereinheit ß) und RbcL (große Untereinheit der RuBisCo) analysiert. Für die Western-Blot-Analysen wurden in der SDS-PAGE je 5 µg Chlorophyll der isolierten Chloroplasten, der ungereinigten Thylakoidmembranen und der gereinigten Thylakoidmembranen eingesetzt. Für die nicht-chlorophyllhaltigen Fraktionen wurden entsprechend der eingesetzten Volumina an Chlorophyll für das Stroma das 1 1/2x Volumen und für die „Low-denisty membranes" das 4x Volumen analysiert.

Zur detaillierten Bestimmung der Lokalisation von Alb3.2p wurden die Thylakoidmembranen in die Grana- und Stromamembranen unterteilt (Adir *et al.*, 1990). Für diese Analyse mussten die Bestandteile differenziert vorliegen. Um die ursprüngliche Differenzierung der Thylakoide zu gewährleisten erfolgte die Thylakoidmembran-Isolierung in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen. In der Fraktionierung der Thylakoidmembranen wurde die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Digitonin und die

daraus resultierenden, unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften von Grana- und Stromamembranen genutzt. Die Unterteilung der Thylakoidmembranen in Grana- und Stromamembranen ist schematisch in Abb. 15 dargestellt.

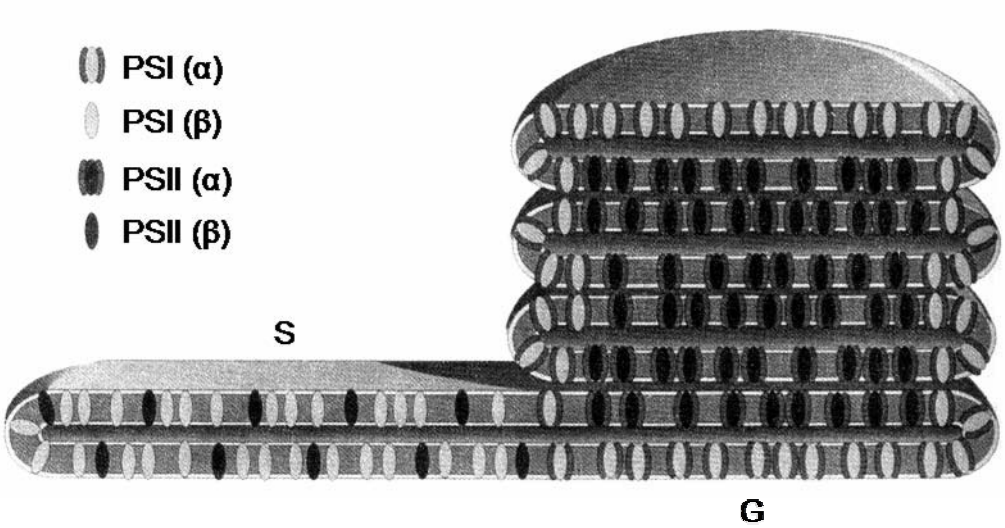

Abb. 15: Struktur der Thylakoidmembranen.

Die Unterteilung der Thylakoidmembranen in Grana- (G) und Stromamembranen (S) ist schematisch mit der Verteilung der PSI und PSII dargestellt. Die Photosysteme in den Granamembranen enthalten die Lichtsammelkomplexe (α), wohingegen in den Stromamembranen keine Lichtsammelkomplexe (β) vorliegen. Die Abbildung ist leicht verändert aus Albertson (1996) entnommen.

Für die Analyse wurden zunächst die Chloroplasten aus *C. reinhardtii* und anschließend die Thylakoidmembranen daraus isoliert. Nach der Behandlung mit Digitonin wurden durch vier aufeinander folgende Zentrifugationsschritte die jeweiligen Sedimente erhalten. Dabei wurden die Thylakoidmembranen (cT) in unbehandelte Thylakoidmembranen (T), Granamembranen (G), intermediäre Thylakoidmembranen (iT) sowie in Stromamembranen (S) fraktioniert. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen der Fraktionen konnte eine Anreicherung von Alb3.2p in den Stromamembranen nachgewiesen werden (Abb. 16). Das gleiche Ergebnis wurde für das zweite Oxa1/Alb3/YidC-homologe Protein, Alb3.1p, gezeigt. AtpB (ATPase Untereinheit β) als Stromamembran-lokalisiertes Protein diente als Kontrolle für die Stromamembran-Fraktion. Im Gegensatz dazu dienten die LHCII als Kontrolle für die Granamembran-Fraktion, da diese Proteine in der Granamembran angereichert sind. Der Unterschied zwischen der An- bzw. Abreicherung der einzelnen Proteine in den Western-Blot-Analysen konnte eindeutig visualisiert werden (Abb. 16).

Sowohl Alb3.2p als auch Alb3.1p sind also in der Stromamembran der Thylakoide lokalisiert.

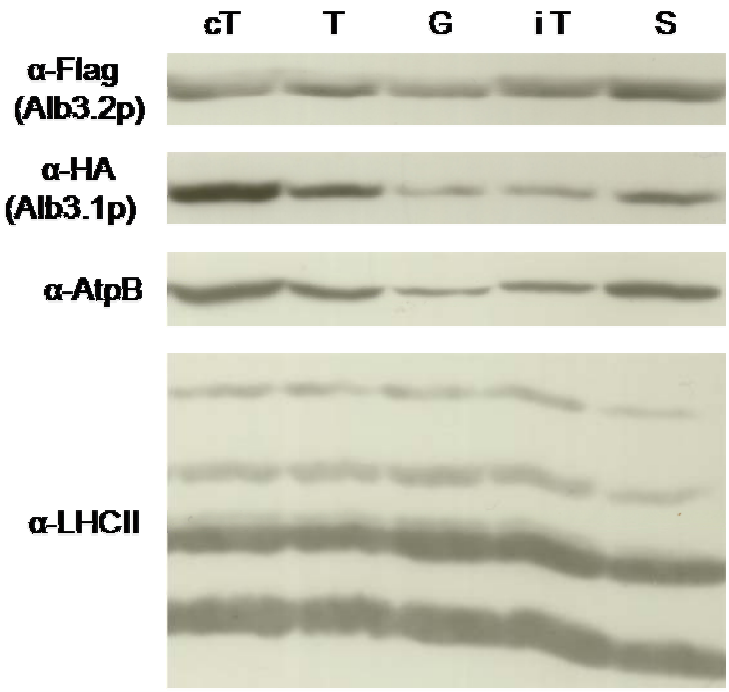

Abb. 16: Die Co-Fraktionierung von Alb3.2p mit der Stromamembran.

Aus isolierten Chloroplasten wurden mit Hilfe eines Saccharose-Kissens die ungereinigten Thylakoidmembranen (cT) vom Stroma getrennt. Die in Anwesenheit von Mg^{2+}-Ionen isolierten Thylakoidmembranen wurden mit Digitonin behandelt und in vier Zentrifugationsschritten fraktioniert. Dabei wurden die Thylakoidmembranen (cT) in unbehandelte Thylakoidmembranen (T), Granamembranen (G), intermediäre Thylakoidmembranen (iT) sowie in Stromamembranen (S) fraktioniert. Von jeder Fraktion wurden 5 µg Chlorophyll für die Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Flag (Alb3.2p), HA (Alb3.1p), AtpB (ATPase Untereinheit ß) und die LHCII (LHCPs des PSII) eingesetzt.

4.2.2 Untersuchungen zur Polysomenassoziation von Alb3.2p

In *Synechocystis* ist die Interaktion zwischen dem Protein Slr1471p der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie und dem PSII-Kernprotein D1 gezeigt (Ossenbühl *et al.*, 2006). Dabei konnte eine co-translationale Interaktion zwischen Slr1471p und D1-Intermediaten in translationsaktiven Ribosomen nachgewiesen werden (Sikorski, 2008).

Für den grundlegenden Nachweis einer co-translationalen Beteiligung von Alb3.2p an der Proteinintegration in die Thylakoidmembran wurden zunächst Polysomen mittels eines Saccharosegradienten aus den Chloroplasten von *C. reinhardtii* isoliert. Der Stufengradient

wurde in fünf Fraktionen unterteilt, wobei sich in der Fraktion 5 das polysomale Pellet befand (Umlauf, 2002).

Die Fraktionen des Saccharosestufengradienten wurden mittels Western-Blot analysiert, dabei konnte weder für Alb3.2p noch für Alb3.1p eine Polysomenassoziation gefunden werden (Abb. 17A). Als Kontrolle diente der Antikörper gegen die große Untereinheit der RuBisCo (RbcL), dieses Protein sollte nicht in Assoziation mit Polysomen vorliegen. Der Nachweis, dass sich in der Fraktion 5 das polysomale Pellet befindet, erfolgte über RNA-Isolierung und anschließender denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese. In den Chloroplasten konnte RNA gezeigt werden, in den solubilisierten Chloroplasten hingegen war die RNA bereits vollständig degradiert (Abb. 17B). Damit konnte nicht eindeutig bestätigt werden, dass sich in der Fraktion 5 RNA befindet und Polysomen angereichert wurden.

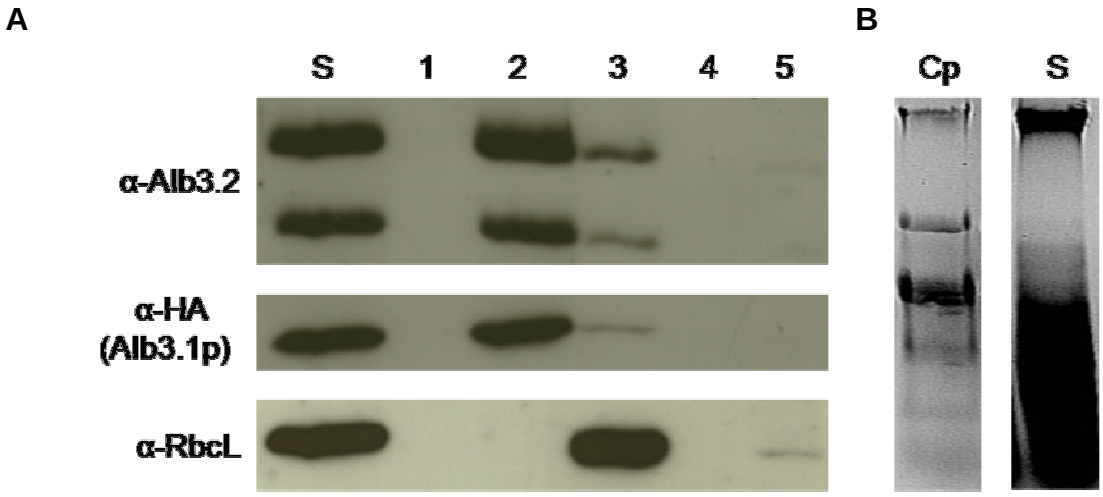

Abb. 17: Analyse der angereicherten Polysomen auf Co-Fraktionierung mit Alb3.2p.

(A) Die aus solubilisierten Chloroplasten über einen Saccharosestufengradienten angereicherten Polysomen wurden mittels Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p, HA (Alb3.1p) und RbcL (große Untereinheit der RuBisCo) analysiert. (B) Von den isolierten sowie solubilisierten Chloroplasten wurde RNA isoliert und in einer denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Abbildung zeigt isolierte Chloroplasten (Cp), solubilisierte Chloroplasten (S), Fraktionen des Gradienten (1-4) und das polysomale Pellet (5).

Im folgenden Experiment wurde erneut eine Polysomenanreicherung durchgeführt, wobei ein anderer Puffer gewählt wurde. Zur Präparation der in Abb. 18 dargestellten RNA wurde im Solubilisierungsschritt und während der Zentrifugation im Saccharosestufengradienten ein Polysomenextraktionspuffer verwendet (Nickelsen *et al.*,

1999). In diesem befinden sich RNA-stabilisierende Faktoren, wie Heparin und Mg^{2+}-Ionen. Mit Hilfe dieses Puffers wurde der Nachweis von RNA im polysomalen Pellet (Fraktion 5, Abb. 18A) möglich. Im Vergleich dazu konnte aus der Negativkontrolle, in der die stabilisierenden Mg^{2+}-Ionen durch destabilisierendes EDTA ersetzt wurden, keine RNA isoliert werden (Fraktion 5, Abb. 18B). Die erfolgreiche Polysomenanreicherung wurde jedoch nicht für weitere Western-Blot-Analysen verwendet, da die stabilisierenden Agenzien die vollständige Solubilisierung der Thylakoidmembranen verhinderte. Dies war am schwach grün gefärbten polysomalen Pellet erkennbar. Diese Kontamination der Polysomen mit Thylakoiden machte weitere Analysen über die Polysomenanreicherung nicht möglich.

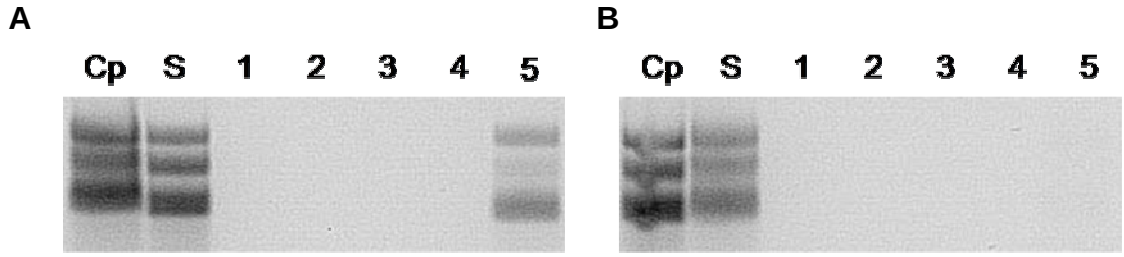

Abb. 18: Nachweis von polysomaler RNA in der Polysomenanreicherung.

Von den aus solubilisierten Chloroplasten über einen Saccharosestufengradienten gereinigten Polysomen sowie den Fraktionen des Gradienten wurde RNA isoliert und analysiert. Zur Kontrolle des eingesetzten Polysomenextraktionspuffers wurden (A) die Polysomen mit stabilisierenden Mg^{2+}-Ionen und (B) die Polysomen mit destabilisierendem EDTA isoliert. Die Abbildung zeigt isolierte Chloroplasten (Cp), solubilisierte Chloroplasten (S), Fraktionen des Gradienten (1-4) und das polysomale Pellet (5).

In weiteren Experimenten sollte eine Methode gefunden werden, um eine eindeutige Aussage zur Polysomenassoziation von Alb3.2p treffen zu können. Dafür wurden aus den solubilisierten Chloroplasten die Polysomen in einem linearen Saccharosegradienten fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden abgenommen (Fraktion 1-6, Abb. 19), RNA isoliert und in einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Abb. 19A). Die Verteilung der RNA erfolgte über den gesamten Saccharosegradienten, wobei das Maximum in der Fraktion 1 vorlag. Dabei besitzt die Fraktion 1 die höchste (55 %) und die Fraktion 6 die niedrigste (15 %) Saccharosekonzentration. Die Western-Blot-Analyse detektierte, dass sowohl Alb3.2p als auch Alb3.1p im linearen Saccharosegradienten bis zur Fraktion 4 verteilt wurden (Abb. 19B). Die Kontrolle, die große Untereinheit der RuBisCo (RbcL), konnte ebenfalls bis zur Fraktion 4 und in geringem Maße in der Fraktion 3 nachgewiesen

werden (Abb. 19B). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sowohl für Alb3.2p als auch für Alb3.1p keine Assoziation an den Polysomen vorliegt.

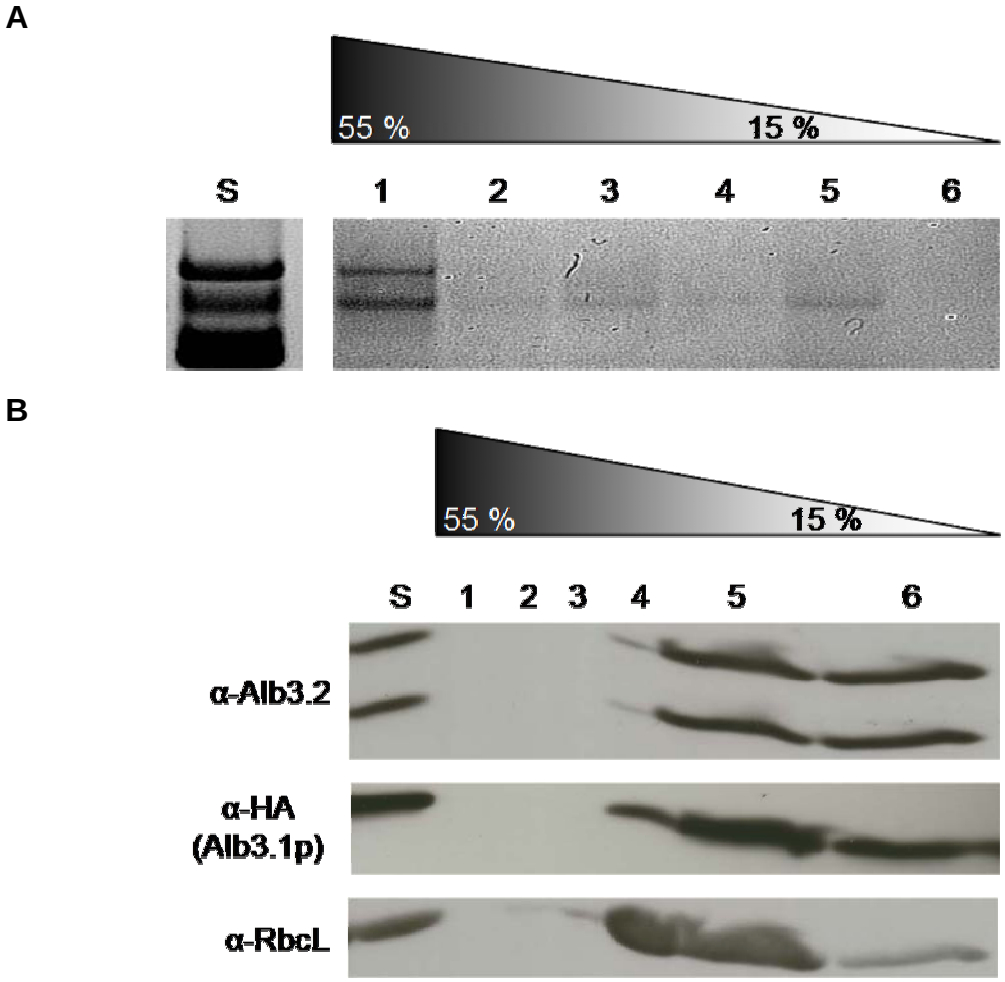

Abb. 19: Analyse der aus Chloroplasten fraktionierten Polysomen auf Assoziation mit Alb3.2p.

Solubilisierte Chloroplasten wurden in einem linearen Saccharosegradienten (15-55 %) fraktioniert. Von den einzelnen Gradientenfraktionen (1-6) sowie den solubilisierten Chloroplasten (S) wurde (A) die RNA isoliert und analysiert und (B) Western-Blot-Analysen durchgeführt. Zur Western-Blot-Detektion wurden Antikörper gegen Alb3.2p, HA (Alb3.1p) und RbcL (große Untereinheit der RuBisCo) eingesetzt.

Zur Verifizierung des in Abb. 19 vorgestellten Experimentes, sollte die Polysomenfraktionierung aus ganzen, solubilisierten *C. reinhardtii*-Zellen wiederholt werden. Dafür wurden erneut die Polysomen im linearen Saccharosegradienten fraktioniert und zunächst die RNA isoliert und analysiert (Abb. 20A). Die Verteilung der RNA erfolgte über den Saccharosegradienten bis in die Fraktion 2. Dabei besitzt die Fraktion 1 die höchste (55 %) und die Fraktion 6 die niedrigste (15 %) Saccharosekonzentration. Im

anschließenden Western-Blot konnte detektiert werden, dass sich sowohl Alb3.2p als auch Alb3.1p im Saccharosegradienten bis zur Fraktion 4 verteilen (Abb. 20B). Im Gegensatz dazu wurde die Kontrolle, RbcL, noch in der Fraktion 3 nachgewiesen (Abb. 20B). Dieses Ergebnis bestätigt, dass sowohl für Alb3.2p als auch für Alb3.1p keine Assoziation an den Polysomen vorliegt.

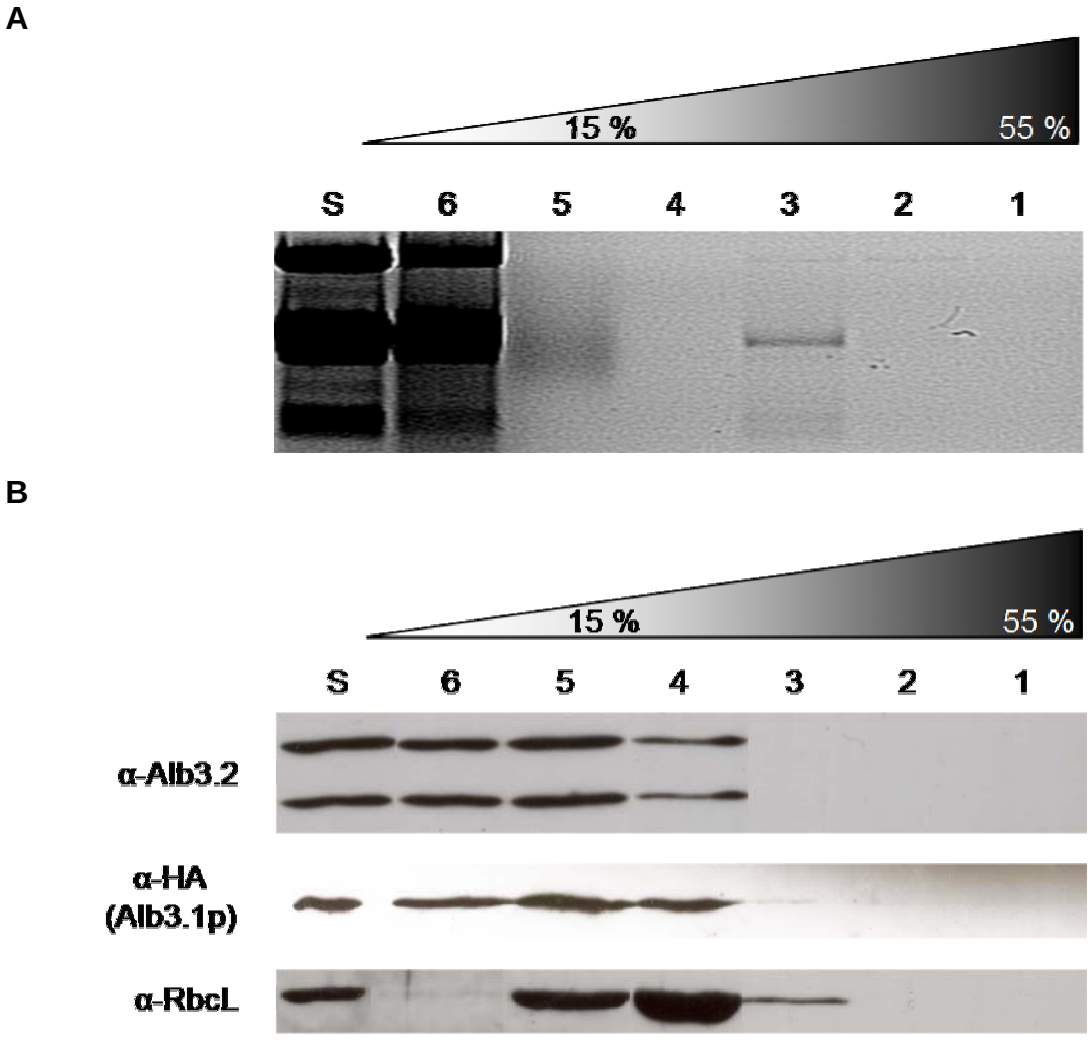

Abb. 20: Analyse der aus *C. reinhardtii*-Zellen fraktionierten Polysomen auf Assoziation mit Alb3.2p.

Solubilisierte *C. reinhardtii*-Zellen wurden in einem linearen Saccharosegradienten (15-55 %) fraktioniert. Von den einzelnen Gradientenfraktionen (1-6) sowie den solubilisierten *C. reinhardtii*-Zellen (S) wurde (A) die RNA isoliert und analysiert und (B) Western-Blot-Analysen durchgeführt. Für den Western-Blot wurden Antikörper gegen Alb3.2p, HA (Alb3.1p) und RbcL (große Untereinheit der RuBisCo) eingesetzt.

Diese zwei unabhängigen Experimente zur Polysomenassoziation, das Erste mit isolierten Chloroplasten (Abb. 19) und das Zweite mit ganzen *C. reinhardtii*-Zellen (Abb. 20),

zeigten beide das gleiche Ergebnis. Weder für Alb3.2p noch für Alb3.1p konnte eine Assoziation zu Polysomen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine in *C. reinhardtii* erst an post-translationalen Integrationsprozessen oder an später folgenden Assemblierungsschritten beteiligt sind.

4.2.3 Co-Immunopräzipitation mit Alb3.2p

Für die Identifizierung neuer Interaktionspartner von Alb3.2p sollte eine Co-Immunopräzipitation (CoIP) durchgeführt werden. Dabei stand die Optimierung der CoIP im Vordergrund, so dass HPLC/MS-Analysen möglich wurden. Die CoIP wurde mit dem MACS® System von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) durchgeführt.

Die µMACS-MicroBeads besitzen einen sehr kleinen Durchmesser von 50 nm, dadurch werden schnelle Reaktionskinetiken und damit eine starke Reduzierung unspezifischer Wechselwirkungen möglich. Die Isolierung der Proteine erfolgt nach Inkubation des Protein-Extraktes mit Antikörper und den µMACS® ProteinA-MicroBeads. Die daraus entstandenen magnetisierbaren Immunokomplexe passieren eine Trennsäule, die sich im magnetischen Feld des MACS-Separators befindet. Der markierte Proteinkomplex verbleibt in der Trennsäule, während ungebundene Proteine effizient abgewaschen werden (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach).

Für die CoIP wurden zunächst Chloroplasten aus *C. reinhardtii* isoliert und solubilisiert. Anschließend wurden diese nacheinander mit Antikörper und den magnetischen Beads inkubiert. Die Reinigung erfolgte über Trennsäulen im magnetischen Separator, nach Elution der Co-Präzipitate konnten die Proteine in einer SDS-PAGE getrennt und weiter analysiert werden. In den Co-Präzipitaten der Negativkontrolle (CoIP-Ak) waren sowohl in der Silberfärbung (Abb. 21A) als auch in den Western-Blot-Analysen (Abb. 21B) keine Verunreinigungen erkennbar. Die Reduktion des Hintergrundes durch unspezifisch gebundene Proteine konnte mit diesen CoIPs gezeigt werden (Abb. 21). Damit stellte dieses System eine gute Möglichkeit dar, die Co-Präzipitate von Alb3.2p von den restlichen Zellbestandteilen sowie von ungebundenen Proteinen zu trennen.

Für die CoIP konnte ein Antikörper gegen den Flag-tag sowie ein Antikörper direkt gegen Alb3.2p getestet werden, da in dem *C. reinhardtii*-Stamm CW15HF das Alb3.2p mit der Epitop-Markierung (Flag) vorlag. Die Co-Präzipitate wurden zunächst in der SDS-PAGE getrennt und die Proteine anschließend mit Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 21A). Dabei war erkennbar, dass beide CoIPs das gleiche Proteinmuster erzielten und dass in der

CoIP mit α-Alb3.2 eine größere Proteinmenge resultierte als in der CoIP mit α-Flag. In den folgenden Western-Blot-Analysen wurde zunächst mit dem Antikörper gegen Alb3.2p überprüft, ob in beiden CoIPs die Co-Präzipitationen von Alb3.2p und Alb3.2p-Flag vorlagen (Abb. 21B). Beide Proteine konnten nachgewiesen werden, wobei Alb3.2p nur in der CoIP mit α-Alb3.2 zu finden war.

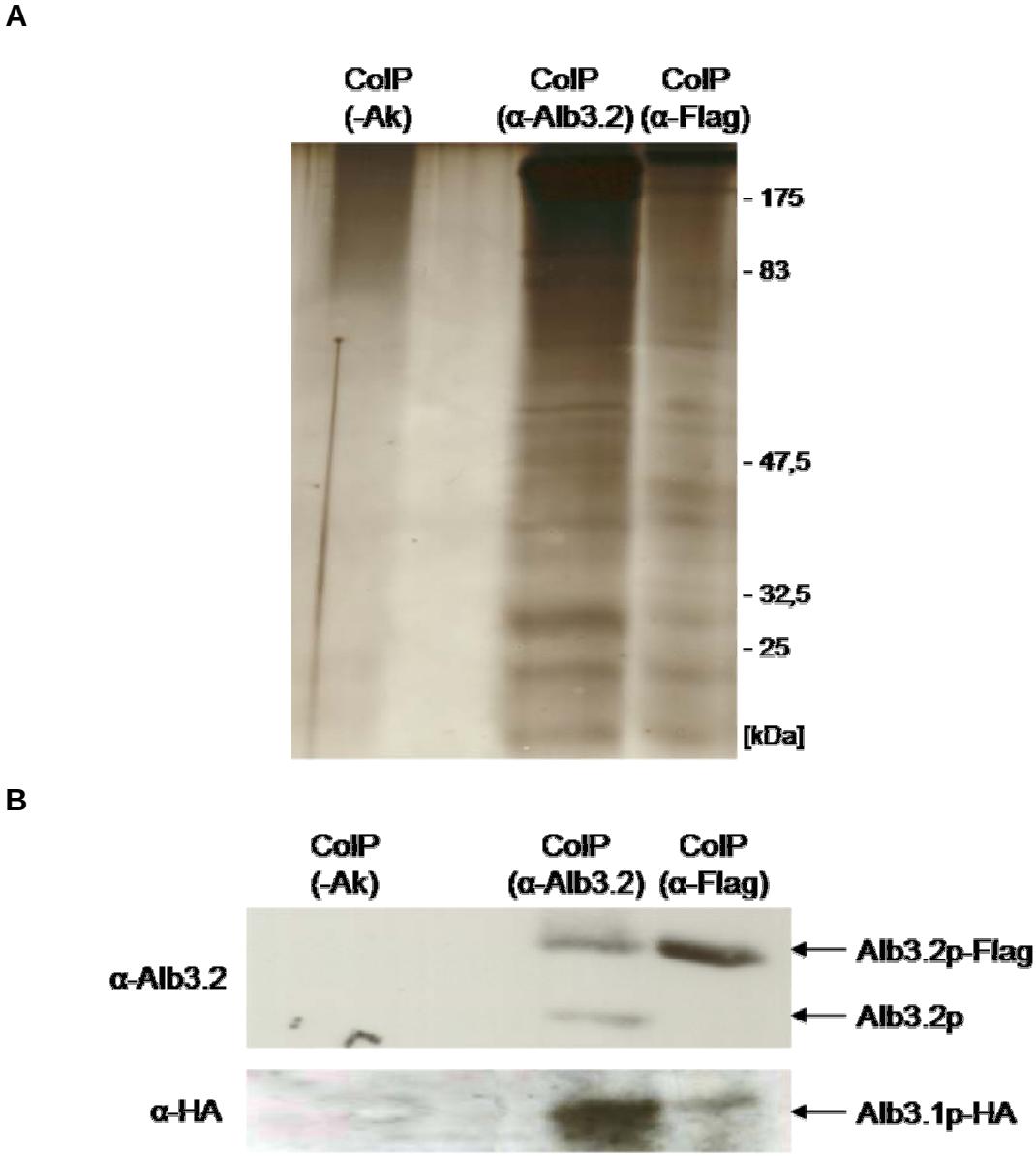

Abb. 21: CoIP mit Antikörpern gegen Alb3.2p und Flag.

Solubilisierte Chloroplasten wurden in CoIPs mit Antikörpern gegen Alb3.2p bzw. Flag eingesetzt. Als Vergleich diente ein Co-Präzipitat ohne Antikörper (-Ak). Die erhaltenen Co-Präzipitate wurden im SDS-Gel getrennt und mittels Silberfärbung (A) oder Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p und HA (B) analysiert.

Der Western-Blot mit dem Antikörper gegen den HA-tag stellte eine weitere Kontrolle dar (Abb. 21B). Mit beiden CoIPs (α-Alb3.2 und α-Flag) konnte das Alb3.1p co-präzipitiert werden. Dies sollte möglich sein, da Alb3.2p und Alb3.1p miteinander direkt interagieren (Göhre *et al.*, 2006). Der Western-Blot mit dem Antikörper gegen den HA-tag bestätigte das Ergebnis der Silberfärbung, in der bereits eine größere Proteinmenge in der CoIP mit α-Alb3.2 zu erkennen war (Abb. 21A).

In Vorbereitung auf die HPLC/MS-Analysen wurde die Menge an Co-Präzipitat erhöht. Dazu wurden vier unabhängige CoIPs mit α-Alb3.2 gesammelt und zusammen in der SDS-PAGE getrennt. Die Proteinbanden wurde mittels Coomassie-Färbung (Abb. 22A) und Silberfärbung (Abb. 22B) sichtbar gemacht. Dabei waren in der Coomassie-Färbung nur sehr schwache Proteinbanden zu erkennen. Im Gegensatz dazu konnte mit der sensitiveren Silberfärbung ein klar sichtbares Proteinmuster erhalten werden.

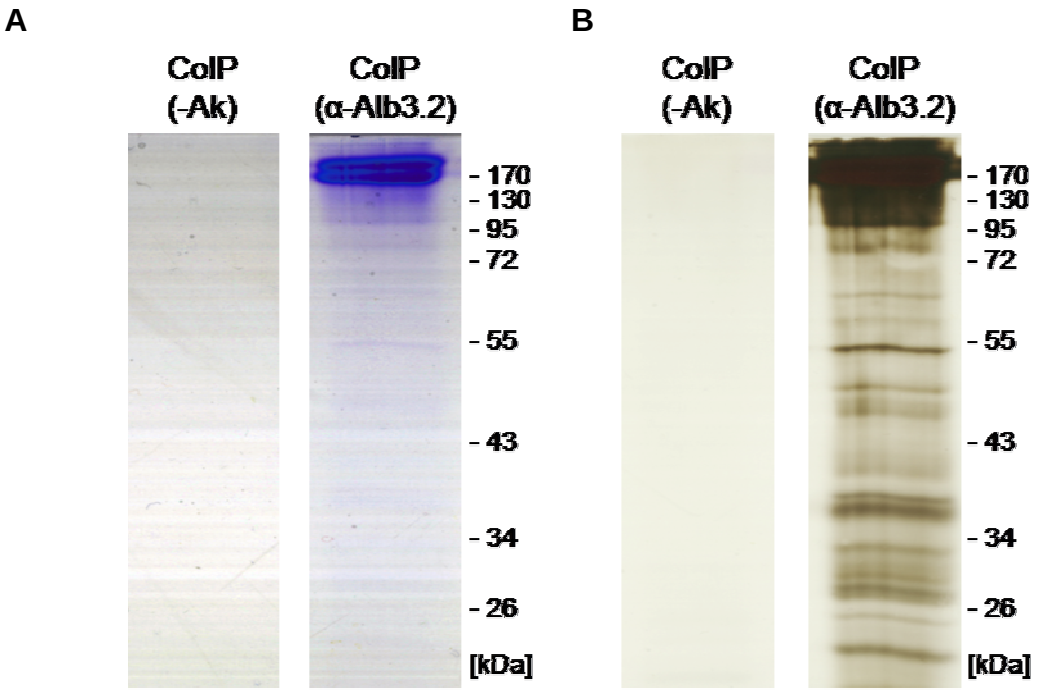

Abb. 22: Die Erhöhung der Proteinmenge bei CoIP mit Antikörper gegen Alb3.2p.

Solubilisierte Chloroplasten wurden in CoIPs mit Antikörper gegen Alb3.2p eingesetzt. Als Vergleich diente ein Co-Präzipitat ohne Antikörper (-Ak). Je vier unabhängige CoIPs wurden in einem SDS-Gel getrennt und mittels Coomassie-Färbung (A) und Silberfärbung (B) sichtbar gemacht.

Für die HPLC/MS-Analyse war eine weitere Kontrolle notwendig, um herauszufinden, welche Proteine unspezifisch an den Antikörper binden und damit jede CoIP

kontaminieren. Als Kontrolle diente ein Antikörper gegen RbcL, die große Untereinheit der RuBisCo, da dieses Protein nicht mit Alb3.2p interagiert. In der Silberfärbung (Abb. 23A) konnte visualisiert werden, dass bei CoIP mit α-RbcL ein anderes Proteinmuster entstand als bei CoIP mit α-Alb3.2. Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Verwendung von RbcL für die Aufstellung einer Negativliste an Proteinen möglich war. Die in Abb. 23B gezeigten Proteinbanden wurden mit der MS-kompatiblen Silberfärbung sichtbar gemacht.

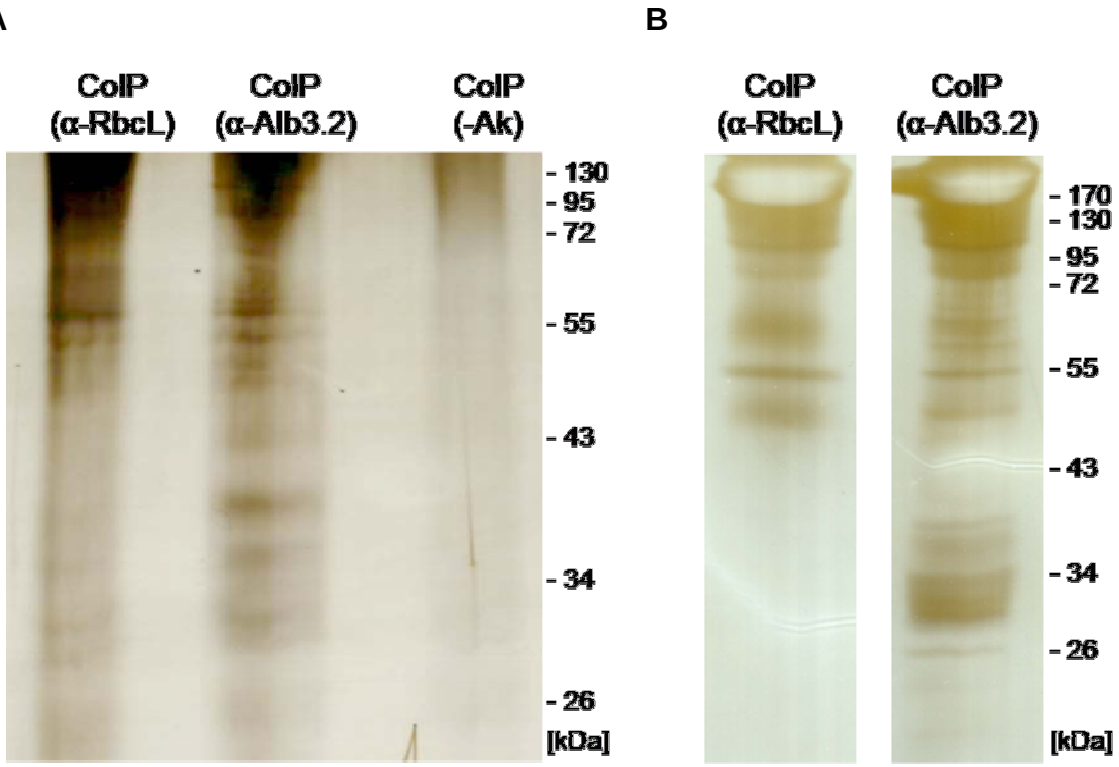

Abb. 23: CoIPs mit Antikörpern gegen Alb3.2p und RbcL in Vorbereitung auf HPLC/MS-Analysen.

Solubilisierte Chloroplasten wurden in CoIPs mit Antikörpern gegen Alb3.2p bzw. RbcL eingesetzt. Dabei diente die CoIP ohne Antikörper (-Ak) als Kontrolle und die CoIP mit RbcL zur Aufstellung einer Negativliste an Proteinen für die HPLC/MS-Analysen. Die erhaltenen Co-Präzipitate wurden in einem SDS-Gel getrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. (A) Vergleich der CoIPs (α-RbcL, α-Alb3.2p und ohne Antikörper) und Anfärben der Proteinbanden mit Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987). (B) Vergleich der CoIPs (α-RbcL und α-Alb3.2p) und Anfärben der Proteinbanden unter Verwendung der MS-kompatiblen Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (1996).

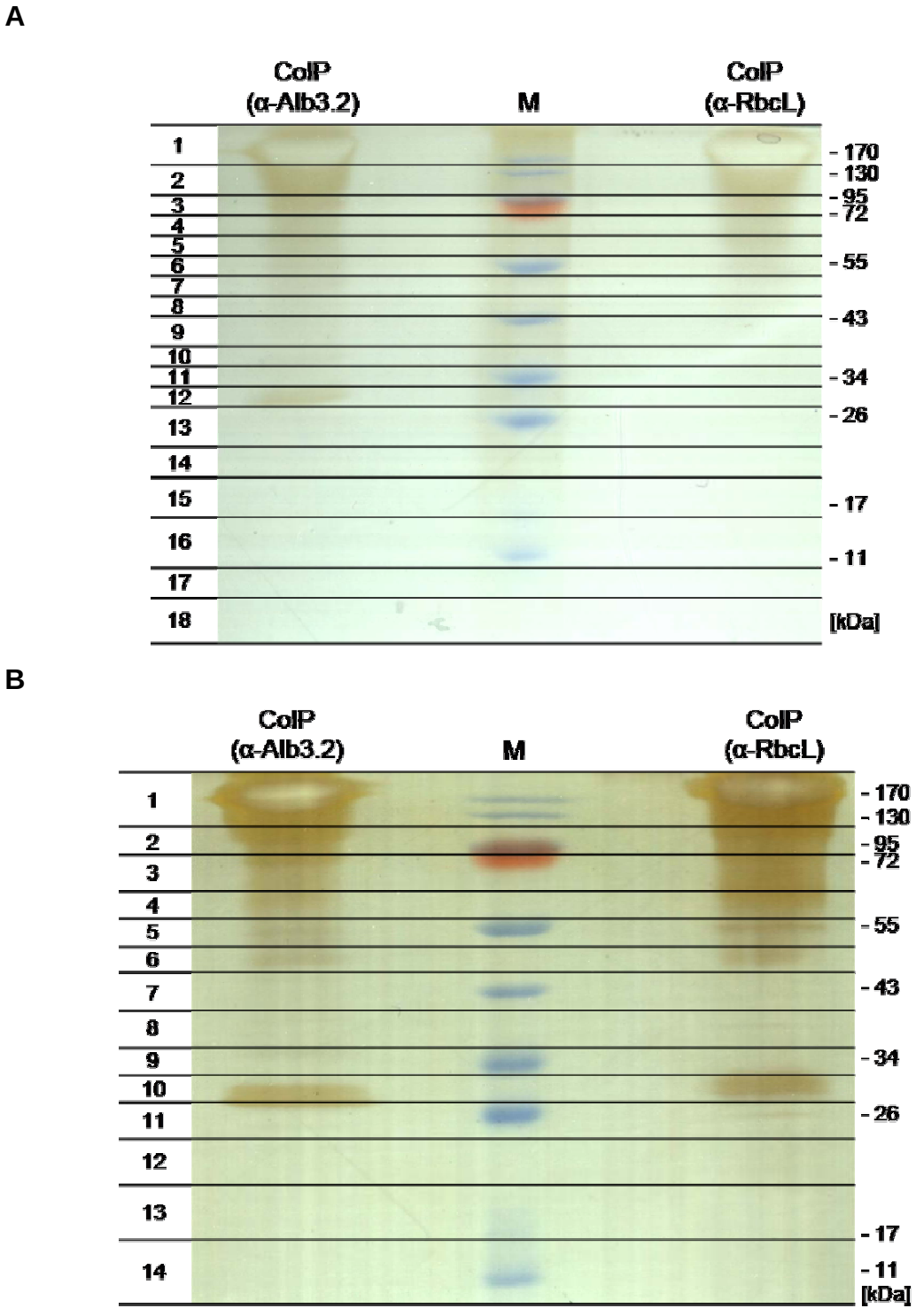

Abb. 24: CoIPs für die HPLC/MS-Analysen.

Solubilisierte Chloroplasten wurden in CoIPs mit Antikörpern gegen Alb3.2p und RbcL eingesetzt. Die CoIP mit RbcL diente der Aufstellung einer Negativliste an Proteinen in der HPLC/MS-Analyse. Die erhaltenen Co-Präzipitate von je sechs unabhängigen CoIPs wurden im SDS-Gel getrennt und mittels MS-kompatibler Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (1996) sichtbar gemacht. Gezeigt sind zwei verschiedene Auftrennungen (A, B). Die SDS-Gele wurden (A) in 18 Gelstücke bzw. (B) in 14 Gelstücke unterteilt und mit diesen zwei voneinander unabhängigen CoIPs HPLC/MS-Analysen durchgeführt.

Für die HPLC/MS-Analysen der Interaktionspartner von Alb3.2p wurden je sechs unabhängige CoIPs gesammelt und in eine Geltasche der SDS-PAGE aufgetragen. Auf die gleiche Weise wurde mit der Kontroll-CoIP mit α-RbcL vorgegangen. Diese diente der Aufstellung einer Negativliste an unspezifisch gebundenen Proteinen. Für die zwei unabhängig durchgeführten CoIPs mit darauf folgender Analyse per HPLC/MS wurden die mit der MS-kompatiblen Silberfärbung sichtbar gemachten Proteinbanden in kleine Gelstücke geteilt (Abb. 24). Für die erste CoIP wurden die Gele in je 18 Stücke unterteilt (Abb. 24A), für die zweite unabhängige CoIP wurden 14 Gelstücke erhalten (Abb. 24B).
Zur Vorbereitung der Proben für die HPLC/MS-Analyse wurden die Proteine aus den Gelstücken mit Trypsin verdaut und die Peptidfragmente daraus extrahiert. Die Peptide wurden in eine „C18 capillary nano column on line with QTof mass spectrometer" geladen. Die Daten der MS/MS-Spektren wurden mit der Suche in der Datenbank „NCBI viridiplants and Chlamydomonas (3.0) plus organellar genomes" ausgewertet.

Tab. 5: Auswertung der mittels HPLC/MS-Analysen identifizierten Proteine, im Vergleich die CoIP mit α-Alb3.2 und α-RbcL.

Proteingröße	Sequenzierung Alb3.2-CoIP	Sequenzierung RbcL-CoIP
60-120 kDa	/	Dehydrogenase/Acetaldehyd Dehydrogenase
45-60 kDa	ß-Tubulin	ß-Tubulin
	α-Tubulin	α-Tubulin
	RbcL	RbcL
	CHLRE Predicted Protein	CHLR Predicted Protein
	Chaperonin	Chaperonin
35-45 kDa	Arogenat/Prephenat Dehydrogenase	Arogenat/Prephenat Dehydrogenase
	Prephenat Dehydratase	Prephenat Dehydratase
		CP43
		CP26
	Alb3.2	
25-35 kDa	LHCII	LHCII
	Chlamyopsin	Chlamyopsin
	D2	D2
	PsbO	PsbO
		VIPP1
10-25 kDa	LHCI	LHCI
	PsbP	PsbP
	PsbQ	PsbQ
	Caltractin	Caltractin

Der direkte Vergleich der Ergebnisse aus den Datenbank-Recherchen lieferte aus der CoIP mit α-RbcL und der CoIP mit α-Alb3.2 keine zusätzlich vorhandenen, spezifisch gebundenen Proteine. Die HPLC/MS-Analyse hat ausschließlich das Alb3.2p als Interaktionspartner von sich selbst ermittelt (Tab. 5). Das bedeutet, dass Alb3.2p in den Chloroplasten weitestgehend als Monomer bzw. als Homooligomer vorliegt. Somit konnte die CoIP auf diesem Wege nicht weiter verfolgt werden, da das Alb3.2p anscheinend nur sehr schwache oder kurzlebige Interaktionen eingeht. Diese sind nach der CoIP nicht mehr nachweisbar.
Ein weiteres Problem scheint die Eigenschaften von Membran-gebundenen Proteinen darzustellen, diese zeigen starke unspezifische Bindungen an Oberflächen. Das wurde damit gezeigt, dass selbst die CoIP mit dem Antikörper gegen RbcL, einem stromalen Protein, ein ähnliches Sequenzierungsmuster ergab.

Damit die Identifizierung von Alb3.2p-Interaktionspartnern spezifisch erfolgen kann, sollte im weiteren Verlauf die Quervernetzung getestet werden. Diese ermöglicht eine kovalente Bindung der Interaktionspartner aneinander. Eine anschließende CoIP könnte neue Interaktionspartner ermitteln.

4.2.4 Quervernetzung von Alb3.2p und seinen Interaktionspartnern

Mit Hilfe der Quervernetzung können Interaktionspartner von Alb3.2p kovalent an dieses gebunden werden. Dabei kann der direkte Nachweis dieser Interaktionspartner im Western-Blot erfolgen, da ein Quervernetzungsprodukt sichtbar werden sollte. Mit diesen Untersuchungen können Interaktionspartner gefunden werden, die mittels einfacher CoIP nicht zugänglich sind. Dies wird möglich, da mit Hilfe eines Quervernetzers sehr schwache oder zeitlich begrenzte Interaktionen fixiert und somit nachweisbar gemacht werden. Damit stellt diese Methode eine weitere Variante dar, Interaktionspartner von Alb3.2p zu identifizieren.
Zunächst wurde ein geeigneter Quervernetzer ausgewählt und getestet. Das SFAD (Abb. 4, S. 39) besitzt zwei verschiedene reaktive Gruppen, einen Sulfo-NHS-Ester sowie eine Perfluoroaryl-azid-Gruppe. Damit greift SFAD Aminogruppen bzw. CH-Bindungen an. Bei Verwendung der ganzen *C. reinhardtii*-Zellen waren keine Quervernetzungsprodukte erkennbar (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf wurden isolierte, intakte

Chloroplasten und aus Chloroplasten isolierte Thylakoidmembranen auf Quervernetzungsprodukte untersucht.

Zunächst wurden die isolierten Chloroplasten in Quervernetzungsreaktionen eingesetzt (Abb. 25). Dabei konnte bei Zunahme des Quervernetzers eine Abnahme der Alb3.2p-Menge im Western-Blot mit dem Antikörper gegen Alb3.2p beobachtet werden (Abb. 25). Ab einer Konzentration von 0,5 mM SFAD war kein Alb3.2p mehr sichtbar. Dies ließ vermuten, dass Quervernetzungsprodukte entstanden sind, allerdings konnten immunologisch keine Produkte nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen für ein nicht sichtbares Alb3.2p-Quervernetzungsprodukt könnten sein: die Nachweisgrenze der Alb3.2p-Menge wurde erreicht, der Quervernetzer verhinderte die Antikörpererkennung oder die Quervernetzungsprodukte waren zu groß und im SDS-Gel nicht detektierbar.

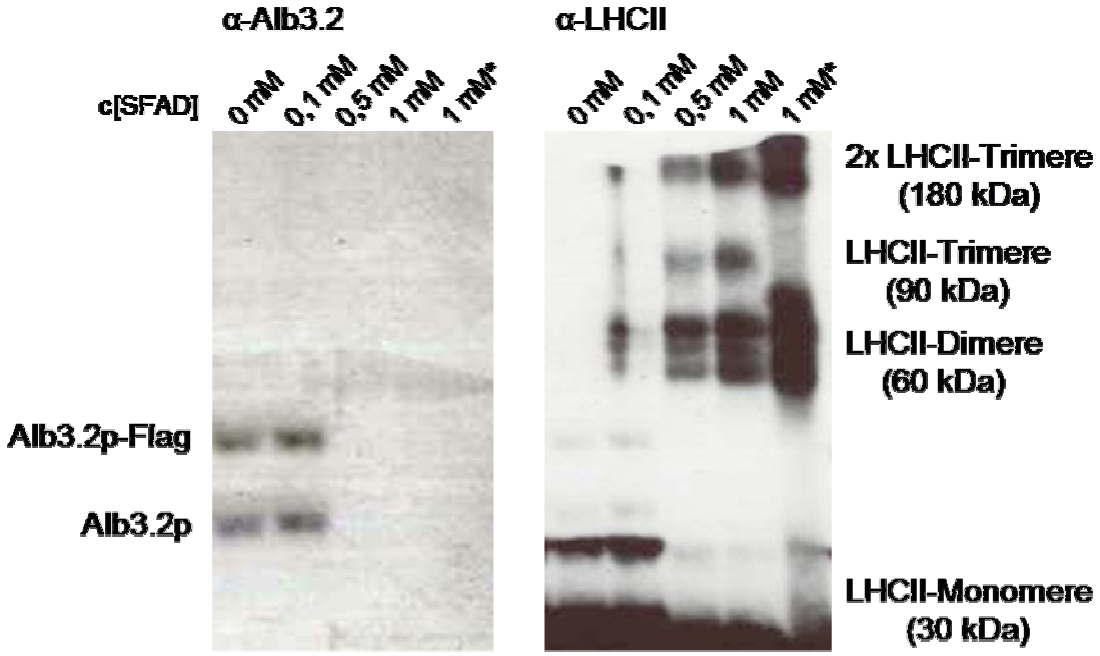

Abb. 25: Quervernetzung mit SFAD und isolierten Chloroplasten.

Die isolierten Chloroplasten (2 µg Chlorophyll) wurden in Quervernetzungsexperimenten mit ansteigender SFAD-Konzentration eingesetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die UV-Aktivierung bei 365 nm für 15 min. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mittels SDS-PAGE getrennt und durch Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p und LHCII analysiert. Die Proben, die mit (*) gekennzeichnet sind, wurden nach der Quervernetzung für 1 h bei 37 °C mit 100 mM 2-Mercaptoethanol inkubiert.

Als Möglichkeit zur Kontrolle der Alb3.2p-Quervernetzung diente die Inkubation mit 2-Mercaptoethanol. Dabei sollte die Disulfidbindung im SFAD (3.2.4.7, Abb. 4) gespalten

und das Ausgangsprodukt wieder nachweisbar werden. Wie in der Abb. 25 gezeigt, konnten die Alb3.2p-Signale nicht durch Inkubation mit 2-Mercaptoethanol restauriert werden. Verschiedene Ursachen können dafür vorliegen. Zum einen ist eine sterische Hinderung denkbar, die den Angriff des 2-Mercaptoethanols an der Disulfidbindung von SFAD verhindert. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Konzentration an 2-Mercaptoethanol zu gering war. Somit fand keine Reaktion mit den Quervernetzungsprodukten statt, da das freie, überschüssige SFAD mit 2-Mercaptoethanol reagierte.

Eine Kontrolle für die erfolgreiche Quervernetzung stellte der Western-Blot mit dem Antikörper gegen die LHCPs des PSII (LHCII) dar (Abb. 25). Hier konnten die Quervernetzungsprodukte eindeutig nachgewiesen werden (LHCII-Dimere, LHCII-Trimere und zweifache LHCII-Trimere). Die Kontrolle mit 2-Mercaptoethanol bestätigte die Ergebnisse mit Alb3.2p. Die LHCII-Trimere konnten vollständig entfernt und eine Zunahme bei den LHCII-Monomeren sowie -Dimeren beobachtet werden. Hingegen konnte die Quervernetzung der zweifachen LHCII-Trimere mit 2-Mercaptoethanol nicht aufgehoben werden. Dies würde darauf hindeuten, dass keine sterische Hinderung vorliegt, sondern dass 2-Mercaptoethanol mit dem überschüssigen SFAD abreagiert anstatt die Quervernetzungsprodukte zu spalten. Ein zusätzliches Problem wird deutlich, da nach Inkubation mit 2-Mercaptoethanol die Banden der LHCII-Dimere und der zweifachen LHCII-Trimere stärker hervortreten als in den Proben ohne Reaktion. Die stärkere Bande der LHCII-Dimere entsteht aufgrund der Spaltung der LHCII-Trimere, die Zunahme der zweifachen LHCII-Trimere ist damit nicht erklärbar. Denkbar ist, dass durch die Dauer der Inkubation von 1 h bei 37 °C Veränderungen in den quervernetzten Komplexen auftreten, die zu einem Schmier in der 2-Mercaptoethanol-Spur führen. Jedoch wurden zu diesem Aspekt keine weiteren Analysen durchgeführt.
Da LHCII-Quervernetzungsprodukte erkennbar waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die Methode prinzipiell funktionierte. Mögliche Ursachen für ein nicht sichtbares Alb3.2p-Quervernetzungsprodukt sollten im Folgenden genauer untersucht werden.

Da das Experiment mit isolierten Chloroplasten nicht die gesuchten Quervernetzungsprodukte zeigte, wurde eine Quervernetzung mit isolierten Thylakoidmembranen durchgeführt. Das Alb3.2p verschwand bei Verwendung der Chloroplasten vollständig, daher sollte vor allem der Bereich von 0,01 bis 0,5 mM SFAD

genauer analysiert werden. Die hier erzielten Ergebnisse waren vergleichbar mit denen aus den isolierten Chloroplasten. Die erneute Abnahme von Alb3.2p konnte nun im Bereich von 0,01 bis 0,1 mM SFAD detektiert werden (Abb. 26). Im Western-Blot mit dem Antikörper gegen Alb3.2p wurde deutlich sichtbar, dass ab einer Quervernetzermenge von 0,2 mM SFAD kein Edukt mehr nachweisbar war. Allerdings war bei Verwendung der isolierten Thylakoidmembranen die Detektion von Quervernetzungsprodukten ebenfalls nicht möglich. Als Kontrolle des Experiments diente der Western-Blot mit dem Antikörper gegen die LHCII-Proteine, hier konnten Quervernetzungsprodukte gezeigt werden (Abb. 26). Ab einer Menge von 0,05 mM SFAD waren Quervernetzungsprodukte nachweisbar und bei einer Erhöhung der Konzentration an SFAD war die Zunahme an Produkt erkennbar. Dies zeigte, dass das Quervernetzungsexperiment funktionierte, allerdings erneut kein Alb3.2p-Produkt detektiert wurde.

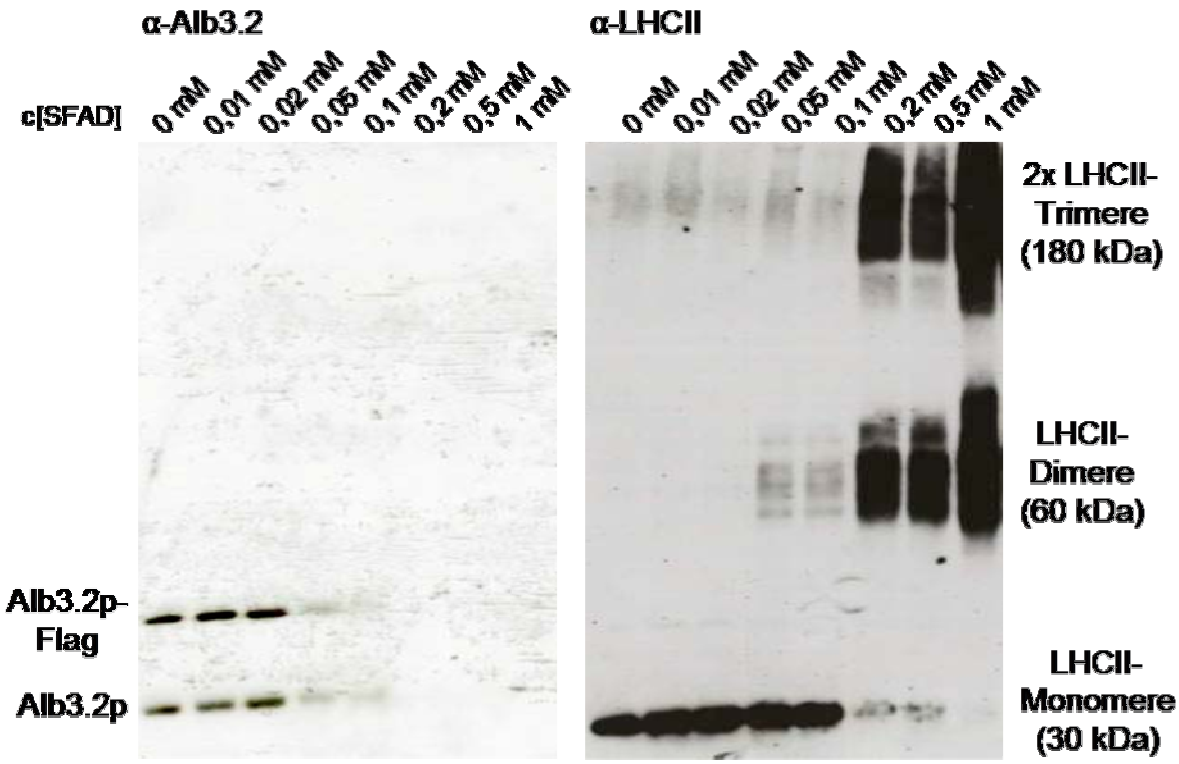

Abb. 26: Quervernetzung mit SFAD und isolierten Thylakoidmembranen.

Aus Chloroplasten isolierte Thylakoidmembranen (2 µg Chlorophyll) wurden in Quervernetzungsexperimenten mit ansteigender SFAD-Konzentration eingesetzt. Nach einer Stunde Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die UV-Aktivierung bei 365 nm für 15 min. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mittels SDS-PAGE getrennt und durch Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p und LHCII analysiert.

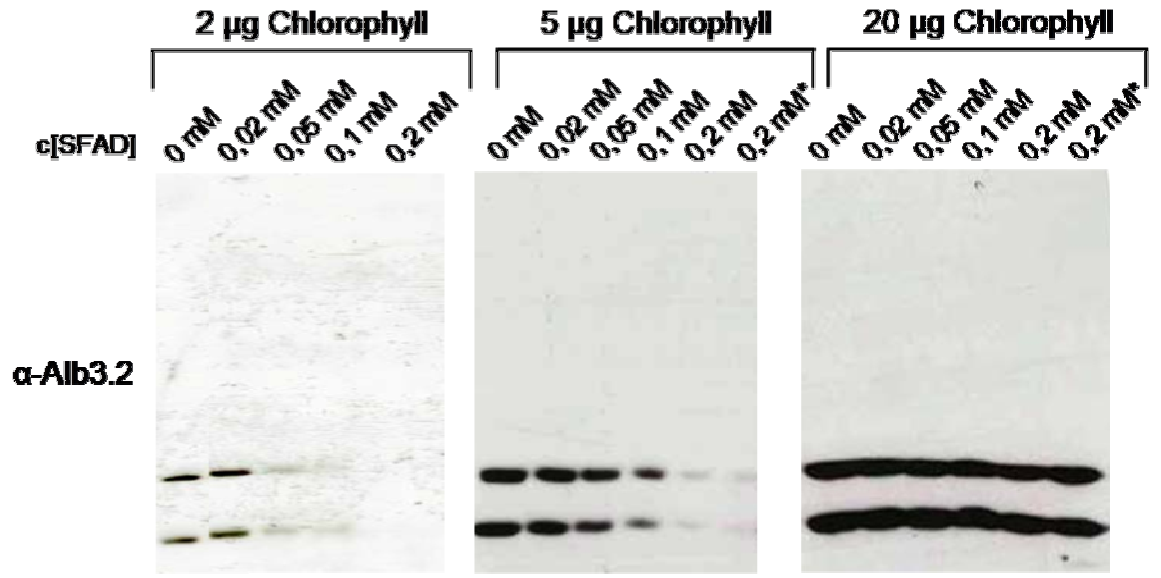

Abb. 27: Test verschiedener Chlorophyllmengen bei Quervernetzung mit SFAD und isolierten Thylakoidmembranen.

Aus Chloroplasten isolierte Thylakoidmembranen (2, 5, 20 µg Chlorophyll) wurden in Quervernetzungsexperimenten mit verschiedenen SFAD-Konzentrationen untersucht. Nach einer Stunde Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die UV-Aktivierung bei 365 nm für 15 min. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mittels SDS-PAGE getrennt und durch Western-Blot mit Antikörper gegen Alb3.2p analysiert. Die Proben, die mit (*) gekennzeichnet sind, wurden nach der Quervernetzung für 1 h bei 37 °C mit 100 mM 2-Mercaptoethanol inkubiert.

Für weitere Analysen wurde die in der Quervernetzung eingesetzte Chlorophyll-Menge erhöht. Damit sollte versucht werden, die Nachweisgrenze von Alb3.2p zu verschieben und die Produkte der Quervernetzung sichtbar zu machen (Abb. 27). Die bisher verwendete Menge von 2 µg Chlorophyll diente dabei als Vergleich. Weiterhin wurden 5 µg und 20 µg Chlorophyll getestet. Bei 5 µg Chlorophyll war die gleiche Abnahme der Alb3.2p-Menge zu beobachten. Eine weitere Erhöhung der Chlorophyll-Menge ließ diesen Effekt vollständig verschwinden (Abb. 27). Die Ursache dafür könnte in der nicht ausreichend vorhandenen Menge an Quervernetzer liegen, so dass Alb3.2p nicht mehr vollständig umgesetzt wurde. Allerdings konnte bei allen drei verwendeten Chlorophyll-Mengen kein Quervernetzungsprodukt im Western-Blot sichtbar gemacht werden. Dies lässt vermuten, dass nicht die Alb3.2p-Menge entscheidend ist, sondern entweder der Quervernetzer die Antikörperbindung verhindert oder die Quervernetzungsprodukte zu groß waren und daher nicht im SDS-Gel getrennt werden können. Die zweite Möglichkeit ist dabei nahe liegend, da bisherige Daten zeigten, dass Alb3.2p an hochmolekulare Komplexe assoziiert ist und

die entstehenden Quervernetzungsprodukte entsprechend groß sein können (Göhre *et al.*, 2006).

Für Alb3.2p ist die Assoziation an große Komplexe bekannt. Die Beteiligung an der Assemblierung photosynthetischer Komplexe bzw. Superkomplexe wird diskutiert (Göhre *et al.*, 2006). Bisher waren keine Quervernetzungsprodukte in der SDS-PAGE nachweisbar, daher sollte nun die Analyse der photosynthetischen Komplexe mit Hilfe der Blue native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) erfolgen. Da große Komplexe (> 1 MDa) sichtbar gemacht werden können, bietet sich diese native Methode an. Bei der anschließenden 2. Dimension werden die Untereinheiten der einzelnen Proteinkomplexe genauer analysiert (Schaegger und von Jagow, 1991).

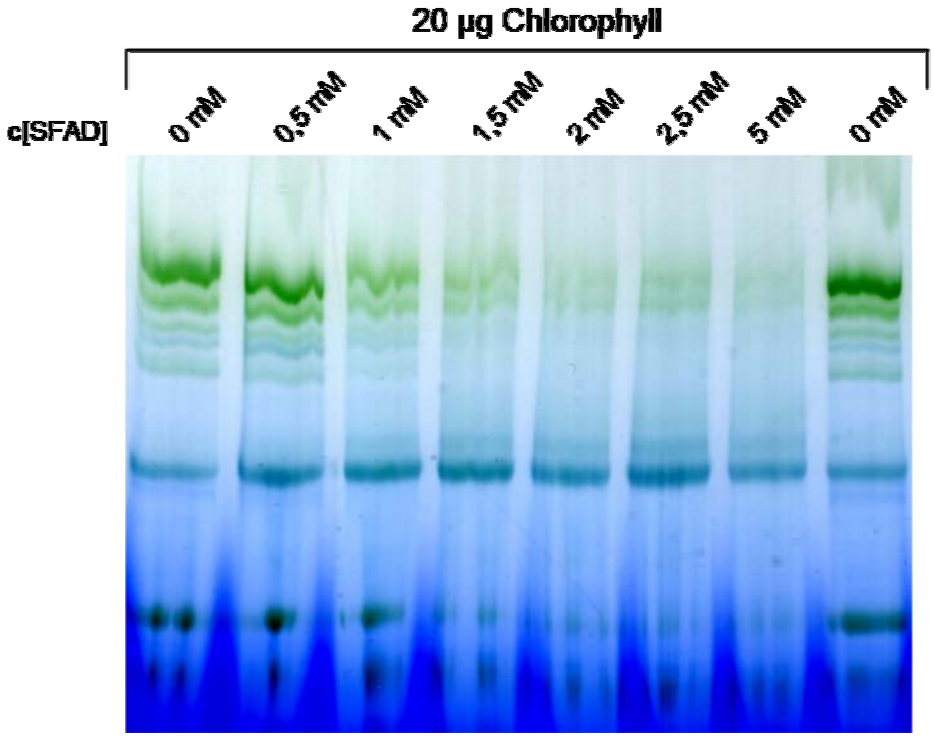

Abb. 28: BN-PAGE nach Quervernetzungsreaktion von Chloroplasten mit SFAD.

Isolierte Chloroplasten (20 µg Chlorophyll) wurden in Quervernetzungsexperimenten mit verschiedenen SFAD-Konzentrationen untersucht. Nach einer Stunde Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die UV-Aktivierung bei 365 nm für 15 min. Der gesamte Reaktionsansatz wurde nach dem Solubilisieren mittels BN-PAGE getrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht.

Die BN-PAGE wurde mit den Chloroplasten nach der Quervernetzungsreaktion durchgeführt. Für die Quervernetzung wurden 20 µg Chlorophyll und zunächst eine

Konzentration an SFAD zwischen 0,5 mM und 5 mM getestet (Abb. 28). In der BN-PAGE war zu erkennen, dass vor allem die chlorophyllhaltigen Komplexe bei Zunahme der Quervernetzerkonzentration vollständig verschwinden.
Mittels UV-Messung im Bereich der Wellenlänge von Chlorophyll (430 nm und 660 nm) konnte bestätigt werden, dass das Chlorophyll vollständig entfernt wurde und nicht im BN-Gel verteilt vorlag (Daten nicht gezeigt). Dies ließ vermuten, dass das Chlorophyll aufgrund der Quervernetzungsreaktion seine Eigenschaft, Licht bestimmter Wellenlänge zu absorbieren, verloren hat. Der Absorptionsdefekt des Chorophylls könnte durch den verwendeten Quervernetzer SFAD entstanden sein, der während der UV-Aktivierung CH-Bindungen angreift. Das Verschwinden des Chlorophylls stellte somit einen Nebeneffekt bei der SFAD-Quervernetzung dar. Dies erfolgte aber erst ab einer bestimmten Konzentration an Quervernetzer. Bis 0,5 mM SFAD war dieser Effekt kaum relevant.

Zur Bestätigung der Ergebnisse von Abb. 28 wurde die BN-PAGE wiederholt. Ziel dabei war es, eine SFAD-Konzentration zu finden, in der die Komplexe nicht vollständig verschwinden. Dabei wurden 20 µg Chlorophyll der isolierten Chloroplasten für die Quervernetzungsreaktion eingesetzt und ein Bereich von 0,1 mM bis 1 mM SFAD untersucht. Hier konnten die bisher gezeigten Ergebnisse bestätigt werden: die Abnahme der photosynthetischen Komplexe mit fast vollständigem Verschwinden des Chlorophylls bei Zunahme der Quervernetzermenge (Abb. 29). Im Anschluss an die BN-PAGE folgte die 2. Dimension, ein SDS-Gel. Die in Abb. 29 dargestellte Zuordnung der photosynthetischen Komplexe erfolgte durch Anfärben der 2. Dimension mittels Silberfärbung (Daten nicht gezeigt).
Für die SFAD-Konzentration von 0,1 mM (Abb. 29) wurde nach der 2. Dimension (SDS-PAGE) ein Western-Blot durchgeführt und mit Antikörpern gegen Alb3.2p und LHCII analysiert (Abb. 30). Als Vergleich diente der Western-Blot mit 0 mM SFAD (Abb. 30A). Darin war zu erkennen, dass Alb3.2p hauptsächlich ungebunden vorlag, also nicht mit großen photosynthetischen Komplexen assoziiert war. Für die LHCII konnten die frei vorliegenden LHCII-Monomere und -Trimere, sowie die Assoziation an das PSII bzw. an die PSII-Superkomplexe detektiert werden (Abb. 30A, siehe zum Vergleich Abb. 29).

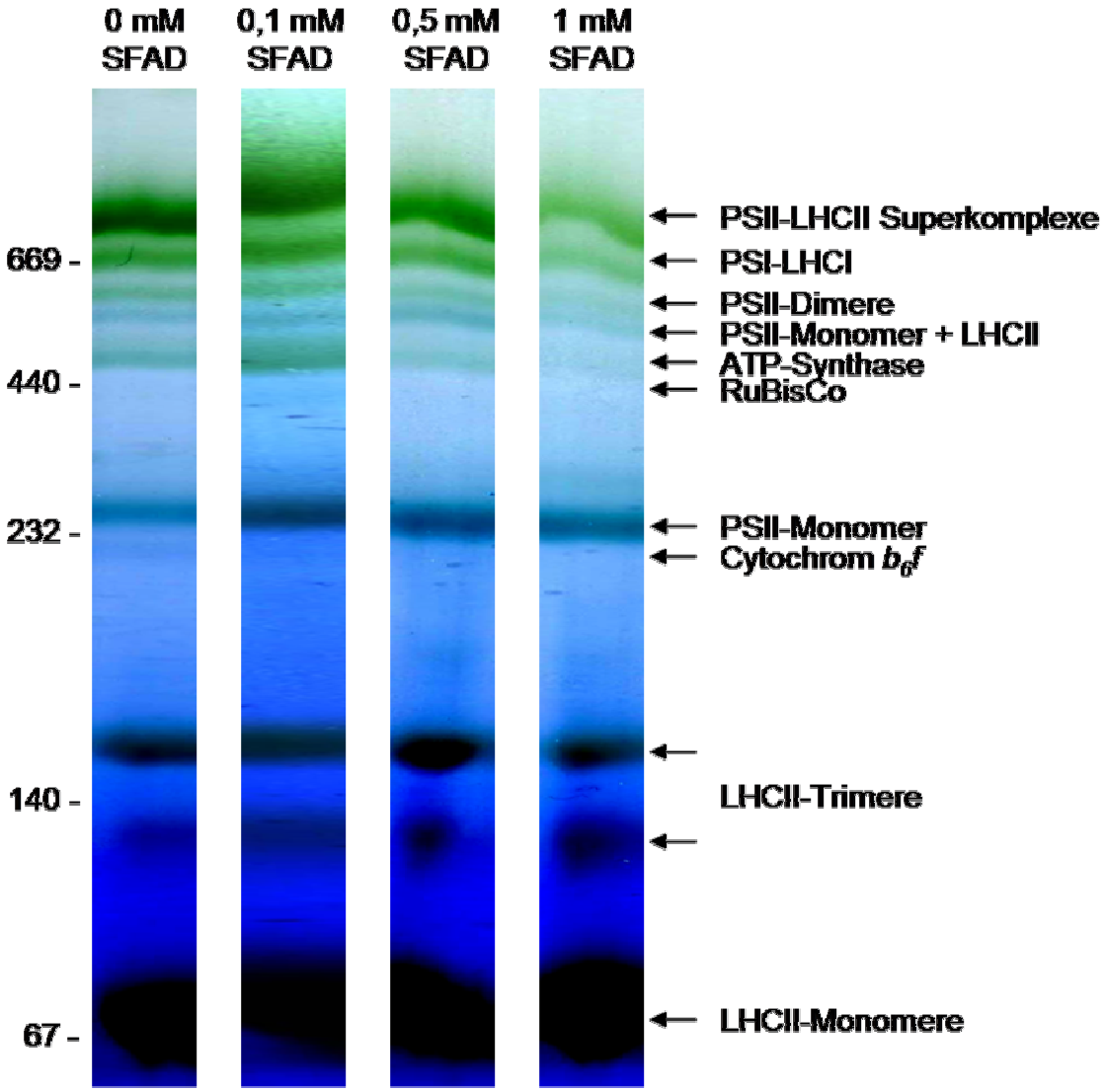

Abb. 29: BN-PAGE nach Quervernetzungsreaktion von Chloroplasten mit SFAD und Zuordnung der photosynthetischen Komplexe.

Isolierte Chloroplasten (20 µg Chlorophyll) wurden in Quervernetzungsexperimenten mit verschiedenen SFAD-Konzentrationen untersucht. Nach einer Stunde Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die UV-Aktivierung bei 365 nm für 15 min. Der gesamte Reaktionsansatz wurde nach dem Solubilisieren mittels BN-PAGE getrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht. Nach der 2. Dimension (SDS-PAGE) konnten die Komplex-Untereinheiten mit Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Die Zuordnung der in der Abbildung gezeigten Komplexe bzw. Komplex-Untereinheiten wurde damit möglich.

Die Western-Blot-Analyse der Quervernetzung mit 0,1 mM SFAD detektierte zum ersten Mal ein Quervernetzungsprodukt für Alb3.2p (Abb. 30B). Dieses lag im Bereich von > 1 MDa. Die Monomere von Alb3.2p konnten nicht mehr nachgewiesen werden, d.h. ab einer Konzentration von 0,1 mM SFAD erfolgte die Quervernetzung nahezu quantitativ. Da die Detektion der Quervernetzungsprodukte im Bereich > 1 MDa lag, war auch die

Frage geklärt, warum die Produkte in der SDS-PAGE mit einem Trennbereich von 20-200 kDa nicht sichtbar wurden. Mit diesem Experiment konnte erstmals gezeigt werden, dass die Antikörperbindestelle von Alb3.2p auch im Quervernetzungsprodukt erhalten blieb. Somit war die Antikörpererkennung in den vorangegangenen Experimenten kein Problem. Im Western-Blot mit Antikörper gegen LHCII konnte die Abnahme der LHCII-Monomere bzw. -Trimere beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Verteilung in den PSII-LHCII-Superkomplexen nur noch schwach gezeigt, wobei eine Ansammlung des LHCII-Signals im Bereich > 1 MDa zu erkennen war.

Bei einer weiteren Erhöhung der SFAD-Konzentration wurde im Western-Blot beobachtet, dass das Quervernetzungsprodukt wieder vollständig verschwand (Daten nicht gezeigt). Das deutete darauf hin, dass ein bestimmtes Verhältnis Quervernetzer zu Chloroplasten streng eingehalten werden musste, um ein Produkt zu detektieren. Da die in Abb. 30A gezeigten Monomere von Alb3.2p bereits bei 0,1 mM SFAD (Abb. 30B) vollständig entfernt wurden, war eine weitere Erhöhung der Quervernetzerkonzentration nicht sinnvoll. Für die 2. Dimension wurden im Anschluss an die BN-PAGE die nativen Proteinkomplexe solubilisiert. Mit Hilfe einer 2-Mercaptoethanol-haltigen Lösung konnten die Untereinheiten der Komplexe bzw. Superkomplexe restauriert und immunologisch detektiert werden. Damit wurde gezeigt, dass keine sterische Hinderung der Disulfidbrücke im SFAD vorlag. Durch die BN-PAGE konnte freies, überschüssiges SFAD lokal angereicht werden und somit war die Einwirkung von 2-Mercaptoethanol auf die Komplexe möglich. Für eine erfolgreiche Spaltung der Disulfidbrücke ist das Konzentrationsverhältnis von 2-Mercaptoethanol zu freiem SFAD im Reaktionsansatz demnach entscheidend.

Die LHCII-Quervernetzungsprodukte scheinen in ähnlich großen Komplexen (> 1 MDa) vorzuliegen, wie die von Alb3.2p (Abb. 30B). Von besonderem Interesse wäre dabei, ob die LHCII- und die Alb3.2p-Quervernetzungsprodukte in einem Superkomplex assoziieren. Für eine detaillierte Identifizierung der Komplex-Untereinheiten sollte der Trennbereich in der BN-PAGE verändert werden. Die bisher vorgestellten BN-PAGEs verwendeten einen linearen Acrylamidgradienten (4-16 %) mit einem Trennbereich von 0,1 bis 1 MDa. Dabei laufen die größeren Proteinkomplexe, bis zu 4 MDa, ohne weitere Trennung in das BN-Gel ein. Nach Optimierung der BN-PAGE könnten die Komplex-Untereinheiten immunologisch nachgewiesen werden. Eine an die Quervernetzung anschließende CoIP mit darauf folgender HPLC/MS-Analyse stellt einen interessanten Ansatz dar, die kovalent an Alb3.2p gebundenen Interaktionspartner spezifisch nachzuweisen.

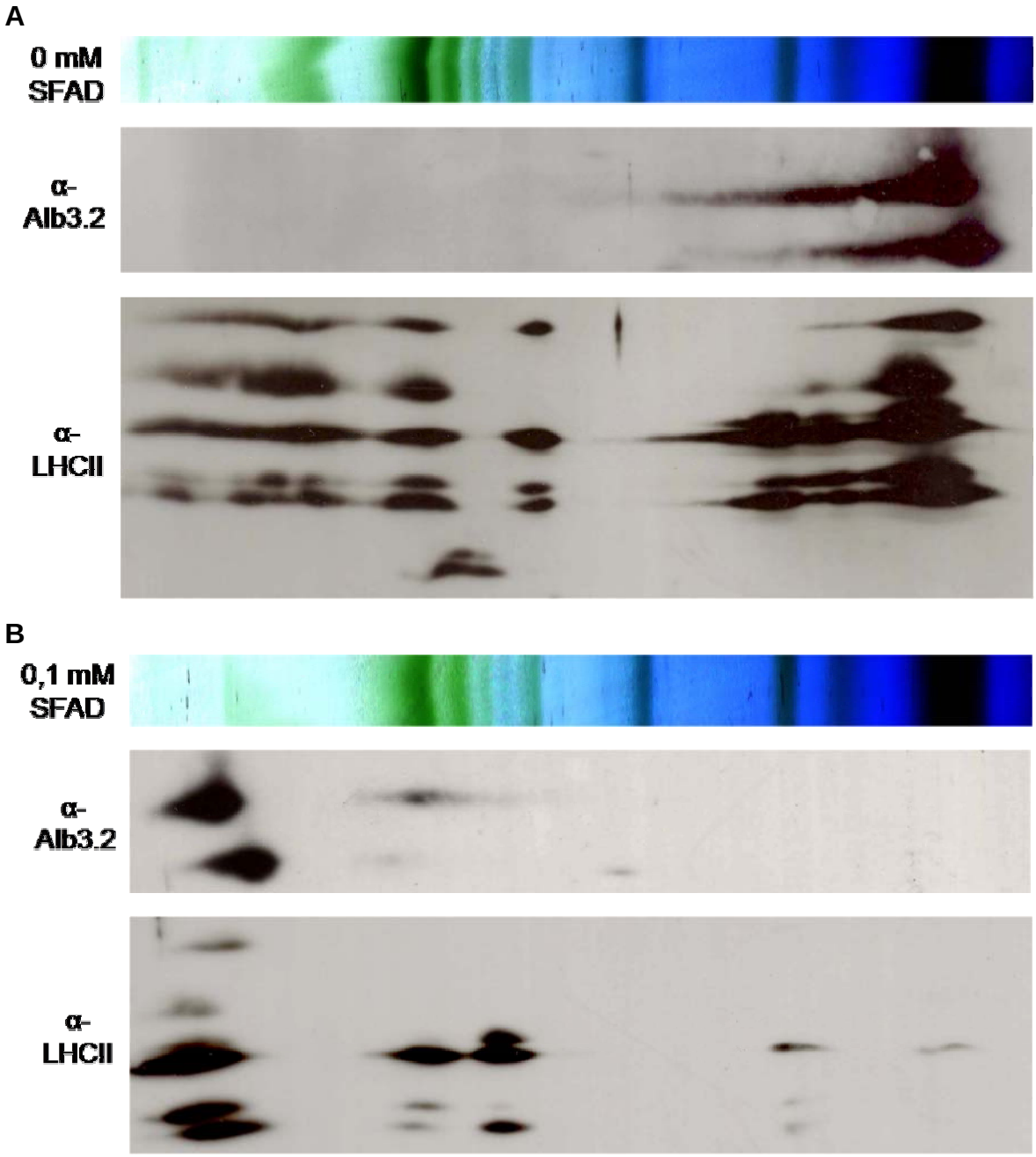

Abb. 30: 2. Dimension des BN-Gels und Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p und LHCII.

Isolierte Chloroplasten (20 µg Chlorophyll) wurden in Quervernetzungsexperimenten (A) mit 0 mM und (B) mit 0,1 mM SFAD-Konzentration untersucht. Nach einer Stunde Inkubation bei RT in Dunkelheit erfolgte die UV-Aktivierung bei 365 nm für 15 min. Der gesamte Reaktionsansatz wurde nach dem Solubilisieren mittels BN-PAGE getrennt und durch Coomassie sichtbar gemacht (oberer Querstreifen). Anschließend erfolgte die 2. Dimension, dabei wurden mittels SDS-PAGE die Untereinheiten der Komplexe getrennt und durch Western-Blot mit Antikörpern gegen Alb3.2p und LHCII analysiert.

5 Diskussion

Die Mitglieder des evolutionär konservierten Oxa1/Alb3/YidC-Transportweges spielen nicht nur eine Rolle bei der Insertion und Translokation von Membranproteinen, sondern auch in der Proteinfaltung und der Assemblierung von Komplexen. Die Substrate dieser Transportwege sind bedeutende Proteine der Komplexe der Atmungskette bzw. der Photosynthese (Yi *et al.*, 2005).

Bei den meisten Prokaryoten wurde jeweils nur ein Oxa1/Alb3/YidC-Homologes nachgewiesen, während es bei Eukaryoten bis zu sechs Homologe sein können (Yen *et al.*, 2001). Im Cyanobakterium *Synechocystis* wurde ein Oxa1/Alb3/YidC-Homologes, das Slr1471p, identifiziert. Slr1471p ist in *Synechocystis* essentiell und scheint, neben seiner Funktion in der photosynthetischen Aktivität, an bedeutenden zellulären Vorgängen bzw. Signalketten beteiligt zu sein (Ossenbühl *et al.*, 2006). In der Grünalge *C. reinhardtii* sind zwei plastidäre Oxa1/Alb3/YidC-Homologe kodiert, Alb3.1p und Alb3.2p. Alb3.1p spielt eine Rolle in der Insertion der LHCPs sowie bei der PSII-Assemblierung (Ossenbühl *et al.,* 2004). Im Gegensatz zu Alb3.1p ist Alb3.2p essentiell für das Zellwachstum auch unter heterotrophen Bedingungen (Göhre *et al.*, 2006). Das deutet darauf hin, dass Alb3.2p neben seiner Rolle in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe weitere Funktionen in derzeit unbekannten, aber essentiellen zellulären Wegen besitzt.

Die Proteine Slr1471p aus *Synechocystis* und Alb3.2p aus *C. reinhardtii* wurden in der vorliegenden Arbeit detailliert untersucht. Dabei stand im Vordergrund, die Proteine hinsichtlich ihrer Funktion bei Integrations- bzw. Assemblierungsprozessen an der Thylakoidmembran zu analysieren.

5.1 Interaktionsstudien von Slr1471p aus *Synechocystis* im Split-Ubiquitin-System

Das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p in *Synechocystis* ist an der Integration des PSII-Kernproteins D1 in die Thylakoidmembran beteiligt (Sikorski, 2008). In Analogie dazu wurde untersucht, ob Slr1471p die Integration weiterer Kernproteine der Photosysteme assistiert. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Volllängen-PsaB von *Synechocystis*

erstmals eine Interaktion mit Slr1471p nachgewiesen. Detaillierte Analysen zeigten dabei, dass im PsaB mindestens drei voneinander unabhängige, interaktionsaktive Bereiche (Helix 1, Helices 3-4 und Helices 5-6) für die Assoziation an Slr1471p vorliegen. Für die genaue Lokalisierung interaktionsaktiver Bereiche im Slr1471p wurde dieses Protein in zwei Fragmente unterteilt (Sikorski, 2008). Hier interagierten sowohl das Volllängen-PsaB als auch die drei unabhängigen Interaktionsflächen von PsaB ausschließlich mit dem C-terminalen Teil von Slr1471p (Slr1471p/H4-5). Des Weiteren konnte für PsaB ein bislang unbekannter Interaktionspartner identifiziert werden, das cpSecY-Homologe Sll1814p. Dabei offenbarten die Split-Ubiquitin-Analysen zwei unabhängige interaktionsaktive Bereiche im PsaB (Helix 1 und Helices 5-6). Sowohl für das cpFtsY-Homologe Slr2102p als auch für das cpTatA-Homologe Slr1046p aus *Synechocystis* wurde keine direkte Interaktion mit PsaB nachgewiesen.
Für die *Synechocystis*-Homologen zu den aus höheren Pflanzen bekannten Proteinen, die an den Transportwegen kernkodierter Proteine beteiligt sind, konnten wechselseitige Interaktionen nachgewiesen werden. Das cpSRP54-Homologe Slr1531p, cpFtsY-Homologe Slr2102p, cpTatA-Homologe Slr1046p sowie cpSecY-Homologe Sll1814p interagierten mit dem Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p und jeweils miteinander. Durch Studien zur Lokalisation des interaktionsaktiven Bereiches von Slr1471p wurde festgestellt, dass alle untersuchten Proteine, außer Slr1531p, mit den C-terminalen Helices 4-5 von Slr1471p interagierten. Slr1531p assoziierte als einziges Protein an die Helices 1-3, also den N-terminalen Bereich von Slr1471p.

Die Spezifität der nachgewiesenen Interaktionen bestätigten die Negativkontrollen. Alle Interaktionstests der untersuchten Fusionsproteine mit dem Protein Alg5 fielen negativ aus. Alg5 ist eine Glucosyltransferase des Endoplasmatischen Retikulums und sollte als ein Hefe-Protein nicht mit den zu testenden *Synechocystis*-Proteinen interagieren. Als weitere Kontrolle dient der Nachweis der stabilen Expression der Fusionsproteine in der Hefe. Für die hier vorgestellten Fusionsproteine erübrigte sich der Expressionsnachweis, da alle verwendeten Plasmide zu einer Aktivierung der Reportergene führten, ohne dass dies auf selbstaktivierende Eigenschaften zurückzuführen war. Nur die korrekte Synthese der Fusionsproteine ermöglicht die Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ*. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Fusionsproteine in der Hefe korrekt exprimiert vorlagen.

Eine Aussage über vorhandene Interaktionen konnte anhand der Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *lacZ* getroffen werden. Allerdings ist eine Beurteilung der relativen Interaktionsstärke zwischen den Proteinen allein auf Grundlage der Blaufärbung der Hefezellen und der Wachstumsrate auf Selektivmedium nicht möglich. Für quantitative Aussagen über Protein-Interaktionsstärken besteht die Möglichkeit, die ß-Galaktosidase-Aktivität zu quantifizieren. Für die untersuchten Interaktionen stellt sich jedoch die Frage, ob Quantifizierungen und damit Aussagen zur Stärke der gefundenen Interaktionen im Split-Ubiquitin-System notwendig sind. Da viele Interaktionen schwach ausgeprägt oder zeitlich begrenzt sind, ist der entscheidende Vorteil des Split-Ubiquitin-Systems diese Interaktionen überhaupt zu detektieren. Allein für Interaktionen stabiler Art stellt die Quantifizierung eine sinnvolle Methode dar, um Vergleiche über Protein-Interaktionsstärke durchführen zu können.
Die Grenzen des Split-Ubiquitin-Systems bestehen darin, dass es sich um ein heterologes System handelt. Damit besteht die Möglichkeit, dass notwendige Vorraussetzungen für eine Interaktion, wie das Vorhandensein von Cofaktoren, Ribosomen oder Thylakoidmembranen nicht erfüllt sind. Ebenso kann es in der Hefe zu einer inkorrekten Faltung der Proteine kommen. Dies würde zu falschen Ergebnissen in den Interaktionsstudien führen. Des Weiteren ist kritisch zu betrachten, dass nur binäre Interaktionen untersucht werden können. Demnach muss bei Analyse der Protein-Wechselwirkungen in artifizieller Umgebung berücksichtigt werden, dass die gezeigten Interaktionen zweier Proteine in der Hefe nicht notwendigerweise auch in *Synechocystis* stattfinden. Daher ist es essentiell, die Daten des Hefe-Systems durch biochemische Analysen in *Synechocystis* zu bestätigen.

Mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems konnten die *Synechocystis*-Reaktionszentrumproteine des PSII, D1 und D2 sowie des PSI, PsaA und PsaB als Interaktionspartner des Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p ermittelt werden (diese Arbeit, Canino, Ossenbühl, unveröffentlicht, Wagner, 2006, Thiel, 2008, Sikorski, 2008). Die Interaktion von D1 mit Slr1471p wurde mittels CoIP in *Synechocystis* nachgewiesen (Ossenbühl *et al.*, 2006, Sikorski, 2008). Mit Hilfe von Polysomenuntersuchungen wurde die direkte, co-translationale Interaktion zwischen Slr1471p und D1 gezeigt. Damit war die co-translationale Beteiligung von Slr1471p an der D1-Integration bewiesen (Sikorski, 2008). Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kernproteine der

Photosysteme in *Synechocystis* über einen gemeinsamen, Slr1471p-abhängigen Mechanismus in die Membran inseriert werden.

Slr1471p scheint, in Analogie zum Oxa1/Alb3/YidC-Homologen YidC aus *E. coli*, eine entscheidende Rolle in der co-translationalen Integration von Membranproteinen zu spielen. In *E. coli* sind verschiedene Transportmechanismen bekannt, an denen YidC beteiligt ist. YidC kann in Zusammenarbeit mit der Sec-Translokase oder ohne zusätzliche Faktoren Proteine integrieren, sowie in Kooperation mit dem SRP-abhängigen Transportweg arbeiten. YidC vermittelt demnach über verschiedene Wege die Integration von bakteriellen inneren Membranproteinen (Kiefer und Kuhn, 2007). Der Sec-abhängige Transportweg in Bakterien kann sowohl post- als auch co-translational Proteine integrieren. Der post-translationale Export in das Periplasma erfolgt YidC-unabhängig. Dabei bindet das cytosolische Chaperon SecB an vollständig translatierte Vorläuferproteine und stabilisiert die Proteine in einem Translokations-kompetenten Status. Nach Zielsteuerung zur Sec-Translokase erfolgt die Translokation durch die Membran (Schünemann, 2007, Kiefer und Kuhn, 2007). Im Gegensatz dazu wird die co-translationale, Sec-abhängige Proteininsertion in die Plasmamembran mit Hilfe von YidC durchgeführt. Mittels Quervernetzung wurde die Assoziation von naszierenden Proteinketten mit SecY und YidC gezeigt. Des Weiteren sind Substrate von YidC bekannt, die SRP für die Zielsteuerung benötigen. Demnach kann in *E. coli* die SRP-abhängige Zielsteuerung die Substrate sowohl zur Sec-Translokase als auch zu anderen Translokasen, wie die YidC-Insertase, leiten (Luirink *et al.*, 2001, Kiefer und Kuhn, 2007). Die Funktion von YidC als unabhängiges Enzym erfolgt katalytisch als co-translationale Membran-Insertase (Kiefer und Kuhn, 2007).

Für den PsaB-Integrationsmechanismus stellt sich damit die Frage, welche der drei in Bakterien vorhandenen, YidC-abhängigen Transportwege für die Integration in Betracht kommen. Hinweise liefern die vorliegenden Split-Ubiquitin-Ergebnisse. Da Slr1471p direkt mit dem SRP-Homologen Slr1531p interagiert, ist für die Zielsteuerung zur Membran in *Synechocystis* ein SRP-abhängiger Weg denkbar. Für die Translokation bleibt zu klären, ob sie ausschließlich durch Slr1471p oder mit Hilfe der Sec-Translokase vermittelt wird. Die Interaktion von PsaB mit dem SecY-Homologen Sll1814p deutet auf eine Sec-abhängige Translokation hin. Dies entspricht für PsaB einem Alb3-, SRP- und SecY-abhängigen Transportweg. Dabei kann mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Integration von PsaB einem co- oder post-translationalen Mechanismus folgt. Allerdings deuten frühe Interaktionsflächen im PsaB

auf einen co-translationalen Mechanismus hin. In Bakterien ist der YidC-, SRP- und SecY-abhängige Transportweg für die co-translationale Proteininsertion verantwortlich, daher ist auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur D1-Insertion in *Synechocystis* eine co-translationale Integration für PsaB wahrscheinlich. Weitere Analysen mit an Ribosomen assoziierten naszierenden Proteinketten, Co-Immunopräzipitationen oder Quervernetzungsexperimenten, sowie gezielte Mutagenese in *Synechocystis* würden eine eindeutige Aussage ermöglichen.

Das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p in *Synechocystis* interagiert direkt mit allen untersuchten Komponenten der Transportwege. Dabei liefert die Analyse des interaktionsaktiven Bereiches von Slr1471p einen interessanten Aspekt: Slr1471p besitzt zwei voneinander unabhängige, interaktionsaktive Bereiche. Die drei N-terminalen Helices dienen für die Assoziation mit Slr1531p, welches für die Protein-Zielsteuerung zur Membran verantwortlich ist. Der C-terminale Bereich von Slr1471p zeigt eine Affinität für die zu integrierenden Proteine. Über die Helices 4-5 scheint also die Substratbindung zu erfolgen. Die Membran-integrierten Proteine Sll1814p, Slr2102p und Slr1046p interagieren mit den Helices 4-5 von Slr1471p. In Analogie zu D1 und PsaB könnte das bedeuten, dass diese drei Proteine Substrate von Slr1471p darstellen. Wenn die Proteine Sll1814p, Slr2102p und Slr1046p Substrate von Slr1471p sind, kann auf einen Alb3-abhängigen Transportweg in die Membran gefolgert werden.
Aussagen zu Integrationsmechanismen der Membran-gebundenen Komponenten der Transportwege liegen derzeit wenig vor. Für das bakterielle YidC ist bekannt, dass es über den klassischen SRP-Sec-Transportweg in die innere Membran inseriert wird (Koch *et al.*, 2002, Kiefer und Kuhn, 2007). Damit kann jedoch nicht die Frage abschließend geklärt werden, warum alle untersuchten Proteine in direkter Interaktion miteinander stehen. Da Sll1814p, Slr2102p und Slr1531p durch den gemeinsamen, in Bakterien bekannten Transportweg in Verbindung stehen, sind direkte Interaktionsflächen denkbar. Allerdings wurde bisher kein Zusammenhang von YidC oder Komponenten der Sec-Translokase mit dem TAT-abhängigen Mechanismus in Bakterien gefunden (Kiefer und Kuhn, 2007, Schünemann, 2007). Ausschließlich in den Chloroplasten höherer Pflanzen existiert eine bekannte Verbindung beider Transportwege. Das Rieske Fe/S-Protein integriert in einem vom klassischen TAT-Mechanismus abweichenden Prozess und benötigt zusätzliche stromale Faktoren und Komponenten der Sec-Translokase (Molik *et al.*, 2001, Schünemann, 2007). Wenn das Rieske Fe/S-Protein einen intermediären oder frühzeitigen

Stand in der Evolution der Transportwege repräsentiert (Molik *et al.*, 2001), ist denkbar, dass eine Verbindung dieser beiden Transportwege in Cyanobakterien vorliegt. Dieser, scheinbar spezifisch für das Rieske Fe/S-Protein in Chloroplasten vorhandene Transportweg, konnte bisher in *Synechocystis* noch nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren sind bisher keine Proteine in *Synechocystis* bekannt, die sowohl den TAT- als auch den Sec-Weg bzw. einzelne Komponenten beider Wege für die Integration in die Thylakoidmembran nutzen. Für Aussagen zu einer Beteiligung des cpTatA-Homologen Slr1046p an anderen Transportwegen in *Synechocystis* sind demnach detaillierte Analysen zu den einzelnen Integrationsmechanismen essentiell.

Die hier vorgestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass in *Synechocystis* Transportmechanismen existieren, die denen in Bakterien ähnlich sind. Ursache dafür kann sein, dass für die Cyanobakterien keine Notwendigkeit bestand, die grundlegenden Mechanismen der Proteinlokalisation zu verändern. Da die Initiation der Assemblierung der Photosysteme nicht an der Thylakoidmembran stattfindet, sondern an der Plasmamembran (Zak *et al.*, 2001), können die bakteriellen Transportwege für den Export durch bzw. die Insertion in die Plasmamembran direkt übernommen werden.
Erst die evolutionäre Weiterentwicklung der Cyanobakterien aufgrund der Endosymbiose zu den Chloroplasten höherer Pflanzen machte Unterschiede in den Transportwegen essentiell. Nicht mehr alle chloroplastidären Proteine werden selbst synthetisiert, sondern sind kernkodiert und werden post-translational in die Organellen importiert (Luirink *et al.*, 2001). Während des evolutionären Prozesses veränderten sich somit die Substrate selbst, vom Ribosomen-gebundenen naszierenden Protein hin zum Ribosomen-entlassenen Volllängen-Protein (Jiang *et al.*, 2002). Erst diese Weiterentwicklung machte eine Veränderung in den Transportwegen notwendig. Eine wichtige Veränderung bezieht sich auch auf die YidC-ähnlichen Proteine, da in Bakterien und in *Synechocystis* nur jeweils ein Homologes der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie existiert, welches diverse Funktionen ohne eine Spezialisierung ausführen kann. Sowohl YidC als auch Slr1471p können die Insertion, Faltung und Assemblierung von Proteinen vermitteln. Im Gegensatz dazu liegen in den Chloroplasten höherer Pflanzen mindestens zwei Homologe der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie vor, die jeweils spezialisierte Funktionen ausüben.

5.2 Biochemische Untersuchungen zu Alb3.2p in *C. reinhardtii*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation von Alb3.1p und Alb3.2p in der Thylakoidmembran der Chloroplasten von *C. reinhardtii* überprüft. Die detaillierte Analyse der Thylakoidmembranen hat für beide Proteine eine Lokalisation in den Stroma-Thylakoiden ergeben. Eine quantitative Trennung der Grana- und Stroma-Thylakoiden ist jedoch nicht möglich, somit sollte von einer Anreicherung der Proteine in den Stroma-Thylakoiden ausgegangen werden.

Des Weiteren wurden für Alb3.1p und Alb3.2p Analysen zur Polysomenassoziation durchgeführt. Mit Hilfe der Polysomenanreicherung konnte keine Assoziation von Alb3.1p und Alb3.2p mit Polysomen detektiert werden. Die Reinheit des polysomalen Pellets wurde immunologisch nachgewiesen und das Vorhandensein des polysomalen Pellets durch RNA-Isolierung kontrolliert. Die Arbeit mit RNA-stabilisierenden Agenzien verhinderte jedoch die vollständige Solubilisierung der Thylakoidmembranen. Um Kontaminationen durch Membranproteine auszuschließen, wurde eine Fraktionierung von solubilisierten Chloroplasten und ganzen *C. reinhardtii*-Zellen im linearen Saccharosegradienten durchgeführt. Durch diese Experimente konnte mit einer unabhängigen Methode das gleiche Ergebnis erzielt werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Proteine nicht in Assoziation mit Polysomen vorliegen. Prinzipiell besteht jedoch die Möglichkeit, dass bei Verwendung der Polysomenanreicherung bzw. -fraktionierung die Assoziation instabil und somit nicht nachweisbar ist. Dieser Aspekt sollte jedoch nahezu ausgeschlossen sein, da zum einen die verwendeten Puffer sowohl Polysomen als auch daran assoziierte Proteine stabilisieren und zum anderen mit diesen Methoden der Nachweis der Polysomenassoziation von Slr1471p in *Synechocystis* erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von Alb3.2p wurden isolierte Chloroplasten aus *C. reinhardtii* mit α-Alb3.2 co-immunopräzipitiert und mittels HPLC/MS analysiert. Die massenspektrometrische Analyse hat ausschließlich das Alb3.2p als Interaktionspartner von sich selbst identifiziert. Alb3.2p kommt also in den Chloroplasten weitestgehend als Monomer bzw. Homooligomer vor. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurden zwei voneinander unabhängige Alb3.2p-CoIPs mittels HPLC/MS analysiert. Parallel wurde die RbcL-CoIP durchgeführt, das stromale Protein RbcL diente dabei der Aufstellung einer Negativliste an unspezifisch gebundenen Proteinen. Nach der

HPLC/MS-Analyse enthielten beide CoIPs die gleichen Proteine, mit Ausnahme von Alb3.2p.

Die CoIP hatte somit den entscheidenden Nachteil, dass der Hintergrund an unspezifisch gebundenen Proteinen relativ groß war. Dazu trägt bei, dass die Membranproteine aufgrund ihrer Lokalisation und den vorhandenen hydrophoben Transmembrandomänen besonders klebrig sind. Durch diese Eigenschaft scheinen solubilisierte Membranproteine mit anderen Proteinen besonders leicht Co-Aggregate zu bilden. Für die CoIP erweist sich somit als Nachteil, dass die Membranproteine für die Interaktionsstudien aus ihrer natürlichen Umgebung herausgenommen werden müssen. Die Auswertung der CoIP hat für Alb3.2p demnach ergeben, dass zum einen das Protein als Monomer bzw. Homooligomer vorliegt und zum anderen die Interaktionen von Alb3.2p sehr schwach oder zeitlich begrenzt sind.

Da es bei den experimentellen Bedingungen der CoIP nicht möglich war, die Bindung von Alb3.2p zu seinen Interaktionspartnern zu erhalten, wurde versucht diese kovalent mit Hilfe von Quervernetzern aneinander zu binden. Eine Quervernetzung hätte die Vorteile, dass die kovalente Bindung in der natürlichen Umgebung der Membranproteine erfolgt und somit unspezifische Interaktionen verhindert und transiente Interaktionen nachweisbar werden.

Zur Detektion von Alb3.2p-Quervernetzungsprodukten erwies sich die 2D-BN/SDS-PAGE als geeignete Methode. Die Reaktion von isolierten Chloroplasten aus *C. reinhardtii* mit 0,1 mM SFAD zeigte zum ersten Mal ein Alb3.2p-Quervernetzungsprodukt. Diese Assoziation an hochmolekulare Komplexe im Bereich > 1 MDa konnte immunologisch nachgewiesen werden. Die Grenzen bei Verwendung des Quervernetzers SFAD wurden jedoch schnell deutlich, da bei einer Konzentration von 0,1 mM SFAD bereits keine Monomere von Alb3.2p mehr detektierbar waren. Das bedeutet, dass ab dieser Konzentration die Quervernetzung nahezu quantitativ erfolgt. Die weitere Erhöhung der SFAD-Konzentration hatte das erneute Verschwinden des Quervernetzungsproduktes zur Folge. Somit setzte die Detektion von Alb3.2p-Quervernetzungsprodukten ein bestimmtes Verhältnis Quervernetzer zu Chloroplasten voraus, welches streng eingehalten werden musste. Ursache dafür kann die photoreaktive Perfluoroaryl-azid-Gruppe des SFAD sein, die relativ unspezifisch CH-Bindungen angreift. Die Wahl eines Quervernetzers mit anderen Eigenschaften stellt eine interessante Möglichkeit dar, die Quervernetzung von Superkomplex-Strukturen größer als 1 MDa zu verhindern. Die mittels Quervernetzung erhaltenen Ergebnisse liefern somit nur einen Hinweis auf die Beteiligung von Alb3.2p an

der Bildung von Superkomplex-Strukturen. Eine Aussage welcher Art diese Superkomplexe sind oder welche Komplex-Untereinheiten diese beinhalten, kann nicht gemacht werden. Zur Identifizierung der Superkomplex-Untereinheiten bieten sich immunologische Nachweise oder die CoIP von Alb3.2p-Quervernetzungsprodukten mit darauf folgender HPLC/MS-Analyse an.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Alb3.1p und Alb3.2p in *C. reinhardtii* weisen im Vergleich zu Cyanobakterien auf einen Wechsel im Aufgabenbereich dieser Proteinfamilie in höheren Pflanzen hin. Dazu trägt die nicht vorhandene Assoziation an Polysomen bei. Damit scheinen beide Proteine nicht an der co-translationalen Integration von Ribosomen-gebundenen naszierenden Proteinketten beteiligt zu sein. Für die Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in Bakterien und Cyanobakterien ist die Assoziation an Polysomen und somit eine Beteiligung an co-translationalen Insertionsprozesse bekannt. YidC aus *E. coli* interagiert direkt mit den inneren Membranproteinen während der Insertion und assistiert die Faltung der hydrophoben Regionen in die Membran-Doppelschicht (Chen *et al.*, 2002). Für das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Slr1471p in *Synechocystis* konnte die Beteiligung an der co-translationalen D1-Insertion nachgewiesen werden (Ossenbühl *et al.,* 2006, Sikorski, 2008). In der Pflanze *A. thaliana* sind zu den Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Alb3p und Alb4p bisher keine Aussagen zur Polysomenassoziation bekannt (Gerdes *et al.*, 2006). Die Funktion der Mitglieder der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie in höheren Pflanzen scheint weg von co-translationalen hin zu post-translationalen Insertionsprozessen, sowie zur Komplex-Assemblierung zu führen.
Dies bestätigt die Funktion des Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Alb3.1p aus *C. reinhardtii*. Alb3.1p ist an der post-translationalen SRP-abhängigen Insertion der LHCPs involviert (Ossenbühl *et al.*, 2004). Des Weiteren ist dieses Protein nicht mehr an der D1-Insertion, sondern ausschließlich an der Assemblierung von D1 in das PSII beteiligt (Ossenbühl *et al.*, 2004). Damit wird verdeutlicht, dass Alb3.1p die Funktion als Integrase nicht mehr selbst ausführen kann. Dies übernimmt z.B. bei der D1-Insertion die cpSecY-Translokase, die die naszierenden D1-Proteinketten in die Thylakoidmembran inseriert (Zhang *et al.*, 2001).
Für Alb3.2p ist eine Funktion in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe nachgewiesen (Göhre *et al.*, 2006). Allerdings ist bislang unbekannt, welche Aufgabe dieses Protein für *C. reinhardtii* essentiell macht. Einen ersten Ansatz für die Funktionsanalyse stellte die CoIP dar. Folgende Interaktionspartner von Alb3.2p konnten

identifiziert werden: Alb3.1p, D1, D2, PsaA, LHCPs, AtpA, AtpB und PsbC (Göhre *et al.*, 2006). Diese Proteine sind alle potentielle Interaktionspartner in Assemblierungsprozessen. Damit kann jedoch nicht erklärt werden, warum Alb3.2p lebensnotwendig ist. Einen interessanten Hinweis liefert der Interaktionspartner VIPP1 (Göhre *et al.*, 2006). Dieses Protein ist am Lipidtransfer und am Aufbau der Thylakoiden via Vesikeltransport beteiligt. Somit besteht die Möglichkeit, dass Alb3.2p entweder an der VIPP1-Insertion in die Thylakoidmembran oder direkt am Aufbau der Thylakoidmembranen beteiligt ist. Alb3.2p scheint eine wichtige Funktion in der Strukturerhaltung der Thylakoidmembranen zu übernehmen (Göhre *et al.*, 2006). Allerdings detektierte die im Rahmen dieser Arbeit angefertigte CoIP, dass die oben aufgeführten Interaktionspartner nach Analyse mittels HPLC/MS sowohl in der Alb3.2p-CoIP als auch in der Kontroll-CoIP mit RbcL vorliegen. Da die Membranproteine leicht Co-Aggregate bilden, könnten die bereits mittels CoIP identifizierten Interaktionspartner (Göhre *et al.*, 2006) Artefakte sein. Weitere Analysen sind notwendig, um die Widersprüche dieser Daten aufzuklären.

Die mit dem MACS® System von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) durchgeführte CoIP lieferte das Resultat, dass Alb3.2p ausschließlich mit sich selbst interagiert. Die Interaktion mit sich selbst konnte auch für die Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p in *Synechocystis* und Alb3p in *A. thaliana* mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems nachgewiesen werden (Ossenbühl, unveröffentlicht, Pasch *et al.*, 2005). Daraus lässt sich ableiten, dass die Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren denkbar ist. Dies wurde für das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Oxa1p aus den Mitochondrien von *Neurospora crassa* gezeigt, welches als stabiler Homooligomer-Komplex isoliert werden konnte (Nargang *et al.*, 2002). YidC aus *E. coli* liefert bei Trennung mittels BN-PAGE zwei Banden, die dem monomeren bzw. dimeren YidC entsprechen (van der Laan *et al.*, 2001). Allerdings ist weder für YidC, noch für Slr1471p oder die Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in höheren Pflanzen eine Isolierung von stabilen Homooligomer-Komplexen bekannt.

Die CoIP verdeutlichte, dass keine stabil an Alb3.2p gebundenen Interaktionspartner identifiziert werden konnten. Die Quervernetzung stellt eine geeignete Methode dar, die schwachen oder kurzlebigen Alb3.2p-Interaktionen durch kovalente Bindung der Interaktionspartner nachweisbar zu machen. Dies ermöglichte nach 2D-BN/SDS-PAGE den immunologischen Nachweis der Assoziation von Alb3.2p an hochmolekulare Superkomplexe größer als 1 MDa. Die Komplex-Untereinheiten sind bislang unbekannt, allerdings ergab die Verteilung im Saccharosedichtegradienten für Alb3.2p eine Co-Fraktionierung mit dem PSII-Kernkomplex sowie den LHCII-Komplexen und dem PSI

(Göhre *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte mit Hilfe der BN-PAGE eine Assoziation von Alb3.2p mit dem PSII-Kernkomplex nachgewiesen werden. Durch die direkte Interaktion von Alb3.2p mit D1 und D2 wurde dieser Hinweis bestätigt (Göhre *et al.*, 2006). Die Beteiligung an der PSII-LHCII-Superkomplexbildung wird vermutet. Die PSII-LHCII-Superkomplexe bestehen aus einem PSII-Dimer mit einer unterschiedlichen Anzahl daran gebundener LHCII-Trimere und haben eine Größe von ca. 1,1 MDa. Der Superkomplex bindet ungefähr 190 Chlorophyll *a*-, 80 Chlorophyll *b*- und 75 Carotinoid-Moleküle (Dekker und Boekema, 2005). Durch Dimerisierung der PSII-LHCII-Superkomplexe miteinander entstehen Megakomplexe unterschiedlicher Strukturen. Über den Mechanismus dieser Dimer-Bildung zu Megakomplexen liegen keine Aussagen vor (Dekker und Boekema, 2005).

Die Assoziation an hochmolekularen Komplexe (600-700 kDa) konnte bereits mittels Saccharosedichtegradienten und BN-PAGE nachgewiesen werden, wobei die Co-Fraktionierung von Alb3.2p und Alb3.1p detektiert wurde (Göhre *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte die direkte Interaktion von Alb3.1p und Alb3.2p mit Hilfe der CoIP nachgewiesen werden. Dies sind Hinweise darauf, dass beide Proteine in einem Komplex gemeinsame Funktionen ausführen können (Göhre *et al.*, 2006). Daher werden komplementäre Aufgaben von Alb3.1p und Alb3.2p in der Assemblierung von photosynthetischen Komplexen vermutet (Göhre *et al.*, 2006).

Da ein Teil von Alb3.2p am Boden des Saccharosedichtegradienten detektiert wurde, deuteten bisherige Arbeiten die Assoziation von Alb3.2p an weitaus größere Komplexe bereits an (Göhre *et al.*, 2006). Dieser erste experimentelle Hinweis für eine Alb3.2p-Assoziation an hochmolekulare Superkomplexe kann mit der vorliegenden Arbeit bekräftigt werden. Die detektierte Alb3.2p-Assoziation an Komplexe > 1 MDa entsprechen der Größe von PSII-LHCII-Superkomplexe bzw. -Megakomplexe. Allerdings muss die genaue Funktion von Alb3.2p bei der PSII-LHCII-Superkomplex-, evtl. auch Megakomplexbildung in weiteren Experimenten geklärt werden. Eine mögliche Beteiligung von Alb3.2p am Aufbau von PSI-Superkomplexen sollten detaillierte Analysen der Alb3.2p-Quervernetzungsprodukte liefern.

Eine Identifizierung der Superkomplex-Untereinheiten, die mit Hilfe von SFAD quervernetzt wurden, könnte eine eindeutige Aussage über die Funktion von Alb3.2p zulassen.

Die Alb3.2p-Analysen in der vorliegenden Arbeit liefern weitere Hinweise dafür, dass dieses Protein ausschließlich an Assemblierungsprozessen beteiligt ist. Diese Spezialisierung wurde möglich, da in den Chlorplasten eine Duplikation der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen erfolgte. Die beiden Homologen in *C. reinhardtii* können dadurch verschiedene Aufgaben übernehmen. Das Alb3.1p ist spezifisch an der post-translationalen LHCP-Insertion und an der D1-Assemblierung in den photosynthetischen Komplex beteiligt, wohingegen für Alb3.2p eine Spezialisierung als Assemblierungsfaktor in der Bildung von photosynthetischen Superkomplexen erfolgte. Dabei scheint die Bindung von Alb3.2p zu den Interaktionspartnern sehr schwach bzw. zeitlich begrenzt zu sein. Oder die Spezialisierung wurde erst durch das Mitwirken von regulatorischen Hilfsfaktoren realisiert. In *A. thaliana* ist möglicherweise ein regulatorischer Hilfsfaktor von Alb3p bekannt. Alb3p interagiert mit LPA2 („low PSII accumulation 2“) und bildet einen Komplex, der spezifisch an der effizienten Assemblierung von CP43 in das PSII beteiligt ist (Ma *et al.*, 2007). Allerdings konnte LPA2 ausschließlich in höheren Pflanzen nachgewiesen werden. Weder Cyanobakterien noch *C. reinhardtii* besitzen ein Homologes zu *LPA2* im Genom (Ma *et al.*, 2007). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *C. reinhardtii* einen intermediären oder, aufgrund einer kleineren Generationszeit, einen weiteren Stand in der Evolution und damit in der Spezialisierung der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen darstellt. Für *C. reinhardtii* ist bisher kein Faktor bekannt, der in Assoziation mit Alb3.1p oder Alb3.2p die Assemblierung der einzelnen Proteine in die photosynthetischen Komplexe assistiert. Da aber die Funktion von Alb3.2p nicht abschließend geklärt werden kann, ist denkbar, dass die bislang unbekannten, spezifischen Funktionen durch regulatorische Helferproteine assistiert werden.

5.3 Die Funktion der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in Cyanobakterien und höheren Pflanzen

Die evolutionäre Konservierung der Funktion bei den Mitgliedern der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie konnte durch Untersuchungen einer *yidC*-Mangelmutante in *E. coli* verdeutlicht werden. Die mitochondrialen Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Oxa1p und Cox18p können die essentielle Sec-unabhängige Funktion von YidC komplementieren (van Bloois *et al.*, 2007, van Bloois *et al.*, 2005). Ebenso können sowohl Slr1471p von

Synechocystis als auch Alb3p von *A. thaliana* die YidC-Funktion ersetzen (Gathmann *et al.*, 2008, Jiang *et al.*, 2002). Somit ist während der Endosymbiose die funktionelle Konservierung erhalten geblieben und je nach Organismus bzw. zellulärer Lokalisation haben sich zusätzliche bzw. spezielle Funktionen entwickelt. Der Aufgabenbereich der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen hat sich im Laufe der Evolution stark verändert. YidC in Bakterien kann eine Vielzahl an Funktionen, wie co-translationale Integration, Proteinfaltung und Assemblierung (Chen *et al.*, 2002) selbst ausführen. Dieselben Funktionen zeigt das Slr1471p in *Synechocystis*. Erst nach Endosymbiose und Entstehung der Chloroplasten in den Grünalgen bzw. höheren Pflanzen erfolgte eine Funktionsänderung. Die Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in den Organellen wurden verdoppelt und daraus konnte sich die heute vorliegende Aufgabenteilung sowie -spezialisierung entwickeln.

Beispiele dafür, wie sich im Laufe der Evolution die Funktion der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen gewandelt hat, sind bekannt. Das Protein cpSecE, eine Komponente der Sec-Translokase, wurde im bakteriellen Vorfahr der Chloroplasten Alb3-abhängig in die Membran inseriert. Bei der Endosymbiose erfolgte der Transfer des *cpSecE*-Gens zum Nukleus pflanzlicher Zellen und der Import von cpSecE wurde ein entscheidender Schritt. Die co-translationale Alb3-abhängige Insertion veränderte sich zu einem post-translationalen Insertionsmechanismus, der ohne Hilfsfaktoren über die spontane Integration stattfindet (Schünemann, 2007). Unterschiede in der Zielsteuerung sowie im Translokationsweg wurden essentiell, da sich während des evolutionären Prozesses die Substrate des Oxa1/Alb3/YidC-Transportweges grundlegend, vom Ribosomen-gebundenen naszierenden Protein hin zum Ribosomen-entlassenen Volllängen-Protein, veränderten (Jiang *et al.*, 2002).

Für chloroplastenkodierte Proteine, bei denen ein co-translationaler Oxa1/Alb3/YidC-Transportweg denkbar ist, wurde ebenfalls eine Funktionsänderung beobachtet. Als Beispiel dient die D1-Biogenese. Der D1-Insertionsmechanismus des PSII-Reaktionszentrumproteins D1 erfolgt im Cyanobakterium *Synechocystis* mit co-translationaler Beteiligung des Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p (Sikorski, 2008). In der Grünalge *C. reinhardtii* hingegen ist das Oxa1/Alb3/YidC-Homologe Alb3.1p nicht an der D1-Insertion beteiligt (Ossenbühl *et al.*, 2004). Denkbar ist, dass cpSecY die Funktion der co-translationalen D1-Integrase übernimmt (Zhang *et al.*, 2001). Alb3.1p hingegen ist essentiell für die effiziente Assemblierung von D1 in das PSII (Ossenbühl *et al.*, 2004). Für die D1-Biogenese in höheren Pflanzen belegen bisherige Ergebnisse eine Beteiligung der

Proteine des cpSRP- und cpSecY-Transportweges (cpSRP54, Alb3p und cpSecY) an dem Transport zur bzw. in die Thylakoidmembran sowie an der Assemblierung in das PSII. Dabei interagiert cpSRP54 mit frühen, Ribosomen-assoziierten D1-Intermediaten (kleiner als 17 kDa) und ist demnach für die Zielsteuerung von chloroplastenkodierten Proteinen zum cpSecY bei der co-translationalen Translokation verantwortlich (Nilsson *et al.*, 1999, Zhang und Aro, 2002). Hingegen wurde für die naszierenden D1-Fragmente zwischen 17 und 25 kDa eine Interaktion mit der cpSecY-Translokase detektiert. Diese Interaktion ist zeitlich begrenzt und nur während der D1-Translation an den Ribosomen nachweisbar (Zhang *et al.*, 2001). Somit scheint in den Chloroplasten cpSecY die Funktion der D1-Integrase zu übernehmen und die Oxa1/Alb3/YidC-Homologen erst in der D1-Assemblierung zum Einsatz zu kommen.

Dies macht deutlich, dass die Funktion der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen als co-translationale Integrase im Laufe der Evolution vollständig verloren ging. Von zunehmender Bedeutung war die Funktion als Membran-gebundenes Chaperon mit der Aufgabe, die Assemblierung der einzelnen Protein-Untereinheiten in die photosynthetischen Komplexe zu verwirklichen. In höheren Pflanzen scheint dabei die Zusammenarbeit der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen mit regulatorischen Helferproteinen einen entscheidenden Entwicklungsschritt darzustellen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, die Funktionen der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen in *Synechocystis* und *C. reinhardtii* hinsichtlich ihrer Aufgaben in Insertions- und Assemblierungsschritten detailliert zu analysieren.

Die Ergebnisse für Slr1471p aus *Synechocystis*, die mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems erzielt wurden, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Eine direkte Interaktion des PSI-Reaktionszentrumproteins PsaB mit dem Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p und dem cpSecY-Homologen Sll1814p wurde nachgewiesen. Analysen des PsaB-Proteins identifizierten bei Interaktion mit Slr1471p drei unabhängige, interaktionsaktive Bereiche (Transmembranhelix 1, Transmembranhelices 3-4, Transmembranhelices 5-6) und bei Interaktion mit Sll1814p zwei unabhängige, interaktionsaktive Bereiche (Transmembranhelix 1, Transmembranhelices 5-6). Die Interaktion von Slr1471p mit PsaB erfolgt ausschließlich über die C-terminalen Transmembranhelices 4-5 von Slr1471p.
- Das cpSRP54-Homologe Slr1531p, cpFtsY-Homologe Slr2102p, cpTatA-Homologe Slr1046p sowie cpSecY-Homologe Sll1814p interagieren mit dem Oxa1/Alb3/YidC-Homologen Slr1471p und jeweils miteinander.
- In Studien zur Lokalisation des interaktionsaktiven Bereiches von Slr1471p wurde festgestellt, dass die untersuchten Proteine, außer Slr1531p, mit den Transmembranhelices 4-5 von Slr1471p interagierten. Slr1531p assoziiert als einziges Protein mit den N-terminalen Transmembranhelices 1-3 von Slr1471p. Daraus lässt sich folgern, dass der N-terminale Bereich von Slr1471p über die Bindung zu Slr1531p für die Protein-Zielsteuerung zur Membran verantwortlich ist, während der C-terminale Bereich eine Affinität für die Substrate besitzt.

Mit Hilfe der biochemischen Analysen des Alb3.2p aus *C. reinhardtii* wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Alb3.2p ist in der Thylakoidmembran lokalisiert und liegt in den Stroma-Thylakoiden vor.

- Durch Polysomenuntersuchungen wurde nachgewiesen, dass Alb3.2p nicht an Polysomen assoziiert. Eine Beteiligung von Alb3.2p an co-translationalen Integrationsprozessen kann mit diesem Ergebnis nahezu ausgeschlossen werden.
- Die Identifizierung von Interaktionspartnern mittels Co-Immunopräzipitation und HPLC/MS-Analyse verdeutlichte, dass Alb3.2p ausschließlich mit sich selbst interagiert. Somit konnte für Alb3.2p in den Chloroplasten von *C. reinhardtii* nachgewiesen werden, dass es als Monomer oder Homooligomer vorliegt. Die Assoziation von Alb3.2p an seine Interaktionspartner scheint demnach sehr schwach ausgeprägt oder kurzlebig zu sein.
- Mit Hilfe von Quervernetzungsexperimenten war es möglich, Alb3.2p erstmals in Assoziation mit hochmolekularen Komplexen > 1 MDa nachzuweisen.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Funktionen der Oxa1/Alb3/YidC-Homologen im Laufe der Evolution verändert haben. Aufgrund einer Genverdopplung wurde es in den Chloroplasten höherer Pflanzen möglich spezialisierte Funktionen durchzuführen. Dabei scheint die Eigenschaft, Proteine als co-translationale Integrase in die Thylakoidmembran zu inserieren, vollständig verloren gegangen zu sein.

7 Summary

The aim of this PhD thesis was the functional analysis of Oxa1/Alb3/YidC homologues in *Synechocystis* and *C. reinhardtii* with focus on protein insertion and assembly.

The results of the analysis of *Synechocystis* Slr1471p using the Split-Ubiquitin system can be summarized as follows:

- A direct interaction of the PSI reaction centrum protein PsaB with the Oxa1/Alb3/YidC homologue Slr1471p and the cpSecY homologue Sll1814p could be demonstrated. Interaction analysis of the PsaB protein with Slr1471p identified three independent interacting regions (transmembrane helix 1, transmembrane helices 3-4, transmembrane helices 5-6), whereas Sll1814p revealed two independent interacting regions (transmembrane helix 1, transmembrane helices 5-6). The interaction of Slr1471p with PsaB occurs via the C-terminale transmembrane helices 4-5 of Slr1471p.
- The cpSRP54 homologue Slr1531p, cpFtsY homologue Slr2102p, cpTatA homologue Slr1046p as well as the cpSecY homologue Sll1814p interact with the Oxa1/Alb3/YidC homologue Slr1471p and with each other.
- Localisation studies of the interaction sites of Slr1471p showed, that all analyzed proteins interact with the transmembrane helices 4-5 of Slr1471p, apart from Slr1531p. Slr1531p associates with the N-terminal transmembrane helices 1-3 of Slr1471p. This suggests that the N-terminal site of Slr1471p binds to Slr1531p and is responsible for protein targeting to the membran, while the C-terminal site shows an affinity for the substrates.

For the biochemical analyses of Alb3.2p of *C. reinhardtii* the following results were obtained:

- Alb3.2p is localized in the thylakoid membrane and shows an enrichment in the stroma lamella.
- An association of Alb3.2p with polysomes could not be demonstrated using polysome analysis. Therefore an Alb3.2p participitation in co-translational integration is very unlikely.

- Alb3.2p is interacting only with itself, as showed by co-immunoprecipitation and HPLC/MS analysis. In the chloroplasts of *C. reinhardtii* Alb3.2p exist as monomer or homooligomer. An association of Alb3.2p with interacting partners seems to be weak or short-lived.
- An assoziation of Alb3.2p with high molecularweight complexes of > 1 MDa could be demonstrated for the first time by cross linking experiments.

The results give evidence that the function of Oxa1/Alb3/YidC homologues changed during evolution. Because of gene duplication it was possible that Oxa1/Alb3/YidC homologues in the chloroplasts of higher plants gained spezialized functions loosing the property to insert proteins co-translationally.

8 Literatur

Abdallah, F., Salamini., F., Lesiter, D. (2000).
A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. Trends Plant Sci. **5**, 141-142.

Adir, N., Shochat, S., Ohad, I. (1990).
Light-dependent D1 protein synthesis and translocation is regulated by reaction center II: reaction center II serves as an acceptor for the D1 precursor. J. Biol. Chem. **265**, 12563-12568.

Albertson, P.A. (1996).
Domains in biological membranes: a study on the organization of the chloroplast thylakoid membrane. *In:* Möller, I.M., Brodelius, P. (eds), Plant Membrane Biology. pp. 171-184. Oxford Science Publications, Oxford University Press, New York, USA.

Arnon, D.J. (1949).
Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in beta vulgaris. Plant. Physiol. **24**, 1-15.

Bartel, P., Chien, C.T., Sternglnz, R., Fields, S. (1993).
Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. Bio T Techniques. **14**, 920-924.

Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G., Pratje, E. (1994).
PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. Mol Gen Genet. **245**, 272-278.

Baumgartel, D.M., Howell, S.H. (1976).
The isolation and characterization of intact polyribosomes from cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim Biophys Acta. **454**(2), 338-348.

Bellafiore, S., Ferris, P., Naver, H., Göhre, V., Rochaix, J.-D. (2002).
Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. Plant Cell. **14**, 2303-2314.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**, 1513-1523.

Bjerrum, O.J., Schäfer-Nielsen, C. (1986).
Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. *In:* Dunn (ed), Elecrophoresis 1986, pp. 315-327. VCH publishers, Deerfield Beach, USA.

Blum, M., Beier, H., Gross, H.J. (1987).
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Elecrophoresis. **8**, 93-99.

Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Minet, M., Slonimski, P.P., Dujardin, G. (1994).
Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an oxa1- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA. **91**, 11978-82.

Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K., Sanford, J.C. (1988).
Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity micro projectiles. Science. **240**, 1534-1538.

Breeden, L., Nasmyth, K. (1985).
Regulation of the yeast HO gene. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **50**, 643-650.

Chen, M., Xie, K., Jiang, F., Yi, L., Dalbey, R.E. (2002).
YidC, a newly defined evolutionarily conserved protein, mediates membrane protein assembly in bacteria. Biol. Chem. **383**,1565-72.

Cline , K., Mori, H. (2001).
Thylakoid delta pH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. J. Cel. Biol. **154**, 719-729.

Dagert, M., Ehrlich, S.D. (1979).
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene. **6**, 23-28.

Dalbey, R.E., Kuhn, A. (2000).
Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial and thylakoid membrane proteins. Annu Rev Cell Dev Biol. **16**, 51-87.

Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005).
Supramolecular arganization of thylakoid membrane proteins in green plants. Biochim Biophys Acta. **1706**, 12-39.

De Vitry, C., Vallon, O. (1999)
Mutants of *Chlamydomonas*: Tools to study thylakoid membrane structure, function and biogenesis. Biochimie **81**, 631-643

Di Cola, A., Klostermann, E., Robinson, C. (2005).
The complexity of pathways for protein import into thylakoids: it's not easy being green. Biochemical Society Transactions. **33**(5), 1024-1027.

Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale C.W. (1988).
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. **16**, 6127-6145.

Dühring, U., Ossenbühl, F., Wilde, A. (2007).
Late assembly Stepps and dynamics of the cyanobacterial photosysterm I. J Biol Chem. **282**(15), 10915-10921.

Durrant, I. (1990).
Light-based detection of biomolecules. Nature. **346**, 297-298.

Franklin, A.E., Hoffman, N.E. (1993).
Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. J Biol Chem. **268**, 22175-80.

Fulda, S., Huang, F., Nilsson, F., Hagemann, M., Norling, B. (2000).
Proteomics of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. Identification of periplasmatic proteins in cells grown at low and high salt concentration. Eur J Biochem. **267**, 5900-5907.

Gathmann, S., Rupprecht, E., Kahmann, U., Schneider, D. (2008).
A conserved structure and function of the YidC homologous protein Slr1471p from Synechocystis sp. PCC 6803. J Microbiol Biotechnol. **18**(6), 1090-1094.

Gerdes, L., Bals, T., Klostermann, E., Karl, M., Philippar, K., Hünken, M., Soll, J., Schünemann, D. (2006).
A second thylakoid membrane-localized Alb3/OxaI/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem. **281**, 16632-42.

Göhre, V., Ossenbühl, F., Crèvecoeur, M., Eichacker, L.A., Rochaix, J.D. (2006).
One of two Alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in *Chlamydomonas*. Plant Cell. **18**, 1454-1466.

Gorman, D.S., Levine, R.P. (1965).
Cytochrome *f* and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **54**, 1665-1669.

Grossmann, A.R., Lohr, M., Soon Im, C. (2004).
Chlamydomonas reinhardtii in the landscape of pigments. Annu. Rev. Genet. **38**, 119-173.

Hanahan, D. (1983).
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. **166**, 557-580.

Harris, E.H. (1989).
The *Chlamydomonas* source book. Academic Press Inc., New York.

Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R.A. (1998).
Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**, 2250-2255.

Hell, K., Neupert, W., Stuart, R.A. (2001).
Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. EMBO J. **20**, 1281-1288.

Herrmann, R.G. (1997).
In Eukaryotism and Symbiosis, cds. Schenk H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Schwemmler, W., Springer Heidelberg, 73-118.

Hill, J., Donald, K.A., Griffiths, D.E. (1991).
DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acid Res. **19**, 5791.

Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., Haskins, C.P. (1950).
Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. Proc. Am. Philos. Soc. **94**, 152-170.

Jarvis, P., Robinson, C. (2004).
Mechanism of protein import and routing in chloroplasts. Current Biology. **14**, 1064-1077.

Jentsch, S., Schlenker, S. (1995).
Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. Cell. **82**, 881-884.

Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., Stuart, R.A. (2003).
Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. EMBO J **22**, 6438-47.

Jiang, F., Yi., L., Moore, M., Chen, M., Rohl, T., van Wijk, K.-J., de Gier, J.-W.L., Henry, R., Dalbey, R.E. (2002).
Chloroplast YidC homolog Albino3 can functionally complement the bacterial YidC depletion strain and promote membrane insertion of both bacterial and chloroplast thylakoid proteins. J Biol Chem. **277**(22), 19281-19288.

Johnson, E.S., Bartel, B., Seufert, W., Varshavsky, A. (1992).
Ubiquitin as a degradation signal. EMBO J. **11**, 497-505.

Johnsson, N., Varshavsky, A. (1994).
Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. **91**, 10340-10344.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauß, N. (2001).
Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2,5Å resolution. Nature. **411**, 909-917.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996).
Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. **3**, 109-136.

Keegstra, K., Cline, K. (1999).
Protein import and routing systems of chloroplasts. Plant Cell. **11**, 557-570.

Kiefer, D., Kuhn, A. (2007).
YidC as an essential and multifunctional component in membrane protein assembly. International Review of Cytology. **259**, 113-138.

Kindle, K.L. (1998).
Nuclear transformation: technology and applications. *In:* Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. (eds), The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*. pp. 41-61. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.

Klimyuk, V.I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schuenemann, D., Meiherhoff, K., Gouet, P., Jones, J.D., Hoffman, N.E., Nussaume, L. (1999).
A chromodomain protein encoded by the arabidopsis CAO gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. Plant Cell. **11**, 87-99.

Klinkert, B., Ossenbühl, F., Sikorski, M., Berry, S., Eichacker, L., Nickelsen, J. (2004).
PratA, a periplasmic tetratricopeptide repeat protein involved in biogenesis of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol Chem. **279**, 44639-44.

Klostermann, E., Droste Gen Helling, I., Carde, J.P., Schünemann, D. (2002).
The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY translocase in *Arabidopsis thaliana*. Biochem J. **368**, 777-781.

Koch, H.-G., Moser, M., Schimz, K.-L., Müller, M. (2002).
The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. J Biol Chem. **277**(8), 5715-5718.

Kogata, N., Nishio, K., Hirohashi, T., Kikuchi, S., Nakai, M. (1999).
Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids. FEBS Lett. **447**, 329-333.

Kück, U. (1981).
Struktur und Funktion mitochondrialer DNA bei Pilzen. Bibliotheca Mycologica 84, Cramer J. (Editior), Vaduz.

Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., Dalbey, R.E. (2003).
The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? TRENS in Cell Biology. **13**(10), 510-517.

Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**, 680-685.

Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., Hoffman, N.E. (1995).
A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. Proc Natl Acad Sci USA. **92**, 3789-3793.

Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee, P., Coupland, G. (1993).
The maize transposable element system Ac/Ds as a mutagen in *Arabidopsis*: identification of an albino mutation induced by Ds insertion. Proc Natl Acad Sci USA. **90**, 10370-10374.

Luirink, J., Samuelsson, T., de Gier, J.W. (2001).
YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. FEBS Lett **501**, 1-5.

Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., de Gier, J.W. (2005).
Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. **59,** 329-355.

Ma, J., Ptashne, M. (1987).
A new class of transcriptional activators. Cell. **51**, 113-119.

Ma, J., Peng, L., Guo, J., Lu, Q., Lu, C., Zhang, L. (2007).
LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell. **19**, 1980-1993.

Martin, W., Herrmann, R.G. (1998).
Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens and why? Plant Physiol. **118**, 9-17.

Martin, W., Müller, M. (1998).
The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature **392**, 37-41.

Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D. (2002).
Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacteria, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. PNAS. **99**(19), 12246-12251.

Mereschkowsky, C. (1905).
Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. Biologisches Zentralblatt. **25**, 593-604.

Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., Klösgen R.B. (2001).
The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b_6/f complex in chloroplasts. J Biol Chem. **276**(46), 42761-42766.

Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C., Henry, R. (2000).
Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. J Biol Chem. **275**, 1529-1532.

Moore, M., Goforth, R.L., Mori, H., Henry, R. (2003).
Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: Substrate not required. J Cell Biol. **162**, 1245-1254.

Nargang, F.E., Preuss, M., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2002).
The oxa1 protein forms a heterooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. J Biol. Chem. **277**(15), 12846-12853.

Nickelsen, J., Fleischmann, M., Bourdreau, E., Rahire, M., Rochaix, J.-D. (1999).
Identification of *cis*-acting RNA leader elements required for chloroplast *psbD* gene expression in *Chlamydomonas*. Plant Cell. **11**, 957-970.

Nickelsen, J., Kück, U. (2000).
The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. Naturissenschaften. **87**, 97-107.

Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N.E., van Wijk, K.J. (1999).
Interaction of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membran protein with cpSRP54. The EMBO Journal. **18**(3), 733-742.

Nouwen, N., Driessen, A.J. (2002).
SecDFyaJC forms a heterotetrameric complex wih YidC. Mol. Microbiol. **44**, 1397-1405.

Old, R.W., Primrose, S.B. (1992).
Gentechnologie. Eine Einführung. Thieme Stuttgart

Ossenbühl, F., Hartmann, K., Nickelsen, J. (2002).
A chloroplast RNA binding protein from stromal thylakoid membranes specifically binds to the 5' untranslated region of the *psbA* mRNA. Eu. J. Biochem. **269**, 3912-3919.

Ossenbühl, F., Göhre, V., Meurer, J., Krieger-Liszkay, A., Rochaix, J.-D., Eichacker, L., (2004).
Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of Arabidopsis ALBINO3. Plant Cell. **16**, 1790-1800.

Ossenbühl, F., Inaba-Sulpice, M., Meurer, J., Soll, J., Eichacker, L.A. (2006).
The *Synechocystis* sp PCC 6803 Oxa1 homolog is essential for membrane integration of reaction center precursor protein pD1. Plant Cell. **18**, 2236-2246.

Pasch, J.C., Nickelsen, J., Schünemann, D. (2005).
The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. Appl Microbiol Biotechnol. **69**, 440-447.

Pohlschröder, M., Hartmann, E., Hand, N.J., Dilks, K., Haddad, A. (2005).
Diversity and evolution of protein translocation. Annu. Rev. Microbiol. **59**, 91-111.

Raven, J.A., Allen, J.F. (2003).
Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? Genome Biology. **4**(3), 209.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R. (1979).
Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J Gen Mikrobiol. **111**, 1-61.

Rochaix, J.-D., Fischer, N., Hippler, M. (2000).
Chloroplast site-directed mutagenesis of photosystem I in *Chlamydomonas*: Electron transfer reactions and light sensitivity. Biochimie. **82**, 635-645.

Rochaix, J.-D. (2001).
Assembly, function, and dynamics of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. **127**, 1394-1398.

Rohl, T., van Wijk, K.J. (2001).
In vitro reconstitution of insertion and processing of cytochrome *f* in a homologous chloroplast translation system. J. Biol. Chem. **276**, 35465-35472.

Salinovich, O., Montelaro, R.C. (1986).
Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after seperation by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. **156**, 341-347.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).
Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbur Laboraory Press, New York.

Sambrook, J., Russel, D.W. (2001).
Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbur Laboraory Press, New York.

Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., Dalbey, R.E. (2000).
YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. Nature. **406**, 637-41.

Saracco, S.A., Fox, T.D. (2002).
Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded Saccharomyces cerevisiae Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p und Mss2p in the inner membrane. Mol Biol Cel. **13**, 1122-1131.

Schaegger, H., von Jagow, G. (1991).
Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Anal. Biochem. **199**, 223-231

Schiestl, R.H., Gietz, R.D. (1989).
High efficiency transformation of intact cells using single stranded nucleic acid as a carrier. Curr Genet **16**, 339-346

Schneppenheim, R., Budde, U., Dahlmann, N., Rautenberg, P. (1991).
Luminography-a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. Electrophoresis. **12**, 367-372.

Schünemann, D., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V.I. Jones, J.D.G., Nussaume, L., Hoffman, N.E. (1998).
A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. Proc Natl Acad Sci USA. **95**, 10312-10316.

Schünemann, D. (2004).
Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. Curr Genet. **44**, 295-304.

Schünemann, D. (2007).
Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. Biol. Chem. **388**, 907-915.

Shevchenko, A., Wilm, M., vorm, O., Mann, M. (1996).
Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. **68**, 850-858.

Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J.W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A.J., Oudega, B., Luirink, J. (2000).
YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. EMBO J. **19**, 542-549.

Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., Kuhn, A. (2004).
Escherichia coli YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. EMBO J. **23**, 294-301.

Sikorski, M. (2008).
Untersuchungen zur Integration des D1-Proteins in die Thylakoidmembran von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Universität Ulm.

Smith, D., Bendall, D.S., Howe, C.J. (1992).
Occurrence of a Photosystem II polypeptide in non-photosynthetic membranes of cyanobacteria. Mol Microbiol 6, 1821-1827.

Souza, R.L., Green-Williams, N.S., Fox, T.D., Tzagoloff, A., Nobrega, F.G. (2000).
Cloning and characterization of Cox18, a *Saccharomyces cerevisiae PET* gene required for the assembly of cytochrome oxidase. J. Biol. Chem. **275**, 14898-14902.

Spence, E., Sarcina, M., Ray, N., Moller, S.G., Mullineaux, C.W., Robinson, C. (2003).
Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Mol Microbiol. **48**, 1481-1489.

Spence, E., Bailey, S., Nenninger, A., Moller, S.G., Robinson, C. (2004).
A homolog of Albino3/OxaI is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. J Biol Chem. **279**, 55792-55800.

Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., te Heesen, S. (1998).
A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. **95**, 5187-5192.

Stampacchio, O., Girard-Bascou, J., Zanasco, J.-L., Zerges, W., Bennoun, P., Rochaix, J.-D. (1997).
A nuclear-encoded function essential for translation of the chloroplast *psaB* mRNA in *Chlamydomonas*. Plant Cell. **9**, 773-782.

Sürig, D. (1989).
Untersuchungen zur *in vivo*-Transkription eines menschlichen 7SL RNA-Gens. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

Sun, J., Xu, Q., Chitnis, V.P., Jin, P., is, P.R. (1997).
Topography of the photosystem I core proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol Chem. **272**, 21793-21802.

Sundberg, E., Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C., Coupland, G. (1997).
ALBINO3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. Plant Cell. **9**, 717-730.

Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2003).
Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. EMBO J. **22**, 6448-57.

Thiel, V. (2008).
Untersuchungen zur Interaktion der Thylakoidmembranproteine D2 und Slr1471p aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Thompson, S.J., Kim, S.J., Robinson, C. (1998).
Sec-independent insertion of thylakoid membrane proteins. Analysis of insertion forces and identification of a loop intermediate involving the signal peptide. J Biol Chem. **273**, 18979-18983.

Tu, C.J., Schünemann, D., Hoffman, N.E. (1999).
Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes. J Biol Chem. **274**, 27219-27224.

Umlauf, T. (2002).
2-D-Elektrophorese von Polysomen aus Etioplasten und Chloroplasten von Gerste. Schriftliche Hausarbeit, LMU München.

van Bloois, E., Nagamori, S., Koningstein, G., Ullers, R., Preuss, M., Oudega, B., Harms, N., Kaback, R., Herrmann, J.M., Luirink, J. (2005).
The Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC is evolutionary conserved and essential. J Biol Chem. **280**(13), 12996-13003.

van Bloois, E., Koningstein, G., Bauerschmitt, H., Herrmann, J.M., Luirink, J. (2007).
Saccharomyces cerevisiae Cox18 complements the essential Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC. FEBS Journal **274**, 5704-5713.

van der Laan, M., Houben, E.N.G., Nouwen, N., Luirink, J., Driessen, A.J.M. (2001).
Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner. EMBO Reports. **2**(61), 519-523.

van der Laan, M., Nouwen, N.P., Driessen, A.J. (2005).
YidC an evolutionary conserved device for the assembly of energy-transducing membrane protein complexes. Curr Opin Microbiol. **8**(2), 182-187.

Vermaas, W.F.J. (1994).
Molecular-genetic approach to study photosynthetic and respiratory electron transport in thylakoids from cyanobacteria. Biochim Biophys Acta. **1187**, 181-186.

Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Cook, W.J. (1987).
Structure of ubiquitin refined at 1.8 A resolution. J Mol Biol. **194**, 531-44.

Wagner, L. (2006).
Untersuchungen zur Interaktion der *Synechocystis* sp. PCC 6803 Proteine PsaA und dem Oxa1p-homologen Slr1471p im Split-Ubiquitin-System. Diplomarbeit, Universität Ulm.

Williams, J.G.K. (1988).
Construction of specific mutations in Photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engeneering methods in *Synechocystis* 6803. Methods Enzymol. **167**, 766-778.

Wollman, F.A., Minai, L., Nechushtai, R. (1999).
The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. Biochim Biophys Acta. **1411**, 21-85.

Wostrikoff, K., Girard-Bascou, J., Wollman, F.-A., Choquet, Y. (2004).
Biogenesis in PSI involves a cascade of translational autoregulation in the chloroplast of *Chlamydomonas*. EMBO J. **23**, 2696-2705.

Xu, Q., Chitnis, P.R. (1995).
Organization of Photosystem I polypeptides – Identification of PsaB domains that may interact with PsaD. Plant Physiol. **108**, 1067-1075.

Yaffe, M.P., Schatz, G. (1984).
Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. Proc Natl Acad Sci USA. **81**, 4819-4822.

Yen, M.R., Harley, K.T., Tseng, Y.H., Saier, M.H. Jr. (2001).
Phylogenetic and structural analyses of the oxa1 family of protein translocases. FEMS Microbiol Lett. **204**, 223-231.

Yi, L., Dalbey, R.E. (2005).
Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria. Molecular Membrane Biology. **22**(1-2), 101-111.

Yuan, J., Kight, A., Goforth, R.L., Moore, M., Peterson, E.C., Sakon, J., Henry, R. (2002).
ATP stimulates signal recognition particle (SRP)/FtsY-supported protein integration in chloroplasts. J Biol Chem. **277**, 32400-32404.

Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B., Pakrasi, H.B. (2001).
The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. Proc Natl Acad Sci USA. **98**, 13443-13448.

Zerges, W., Rochaix, J.D. (1998).
Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Biol. **140**, 101-110.

Zhang, L., Paakkarinen, V., Suorsa, M., Aro, E.-M. (2001).
A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. J Biol Chem. **276**, 37809-37814.

Zhang, L., Aro, E.-M. (2002).
Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. FEBS Letters. **512**, 13-18.

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001).
Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 A resolution. Nature. **409**, 739-43.

Zygadlo, A., Robinson, C., Scheller, H.V., Mant A., Jensen, P.E. (2006).
The properties of the positively charged loop region in PSI-G are essential for ist ‘spontaneous’ inserion into thylakoids and rapid assembly into the photosystem I complex. J Biol Chem. **281**, 10548-10554.

Lebenslauf

Name:	Susanne Piekenhayn
Geburtsdatum:	21.08.1981
Geburtsort:	Zittau
Familienstand:	ledig, 1 Tochter

Schulbildung

08/1988-06/1992	Grundschule, 1. Oberschule Zittau, Oberschule Leutersdorf
08/1992-07/2000	Gymnasium, Gymnasium Seifhennersdorf
Schulabschluss	Abitur am 07.07.2000

Studium

10/2000-06/2005	Chemie-Studium, Technische Universität Dresden
08/2002	Vordiplom
09/2004	Diplomprüfung
10/2004-06/2005	Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Technische Universität Dresden Thema: „Isolierung einer alkalischen extrazellulären Protease aus *Yarrowia lipolytica* H222 und Untersuchungen zu ihrer Eignung für die enzymatische Peptidsynthese“
Studienabschluss	Diplom am 30.06.2005

Dissertation

seit 07/2005	Dissertation, Abteilung Molekulare Botanik, Universität Ulm

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Axel Brennicke danke ich für die Begutachtung der Arbeit sowie für die stets freundliche Unterstützung bei Problemen formeller Art.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Friedrich Ossenbühl für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für die hilfreichen Diskussionen und die stetige Unterstützung meiner Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Stefan Binder für das Erstellen des Zweitgutachtens,
- Frau Jun. Prof. PD Dr. Danja Schünemann für die Bereitstellung des Split-Ubiquitin-Systems sowie Herrn Prof. Dr. Jörg Nickelsen für das Plasmid pT-SynOxa-C,
- Frau Bianca Wolf für die praktische Unterstützung im Labor, die umfangreiche Hilfe beim Schreiben und die vielen Besuche in Albeck,
- Frau Dr. Martha Sikorski und Herrn Matthias Kugelmann für die konstruktiven Diskussionen und die vielfältige Unterstützung,
- allen ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ossenbühl sowie Sachiko Okada für ihre Hilfsbereitschaft und die stets gute Arbeitsatmosphäre,
- Frau Susan Fischer für die Korrektur der Arbeit,
- Frau Elisabeth Bruckbauer für die kompetenten Ratschläge sowie viele unterhaltsame Stunden,
- allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Botanik für ihre Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie - insbesondere Jens Gawenda und meinen Eltern - für die stetige Unterstützung und die umfangreiche Hilfe während des Schreibens.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende, unter Betreuung von Dr. F. Ossenbühl angefertigte Arbeit selbstständig verfasst habe. Andere als die angegebenen Hilfsmittel wurden von mir nicht benutzt. Alle angeführten Zitate wurden kenntlich gemacht.

Ulm, Dezember 2008 Susanne Piekenhayn