Analyse von *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defekten im plastidären Protein-Transport

Dissertation

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

vorgelegt von

Matthias Kugelmann
aus Fischach

Ulm 2010

Analyse von *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defekten im plastidären Protein-Transport

Dissertation

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

vorgelegt von

Matthias Kugelmann
aus Fischach

Ulm 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Axel Brennicke

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Binder

Tag der Promotion: 15.12.2010

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften: Prof. Dr. Axel Groß

meinen Eltern und meiner Verlobten

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst an interessant zu werden, wo sie aufhört“

Justus von Liebig

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **- I -**

Abkürzungen **- IV -**

I. Einleitung **- 1 -**

1. Endosymbiontentheorie - 1 -
2. Proteintransport in den Chloroplasten - 4 -
2.1 Transport via TOC- und TIC-Komplex - 5 -
2.2 Vesikel-gesteuerter Transport in den Chloroplasten - 6 -
3. Proteintransport an der Thylakoidmembran - 6 -
3.1 Transport durch die Thylakoidmembran - 7 -
3.1.1 cpSec-Transportweg - 8 -
3.1.2 ΔpH/cpTat-Transportweg - 8 -
3.2 Transport in die Thylakoidmembran - 10 -
3.2.1 Spontane Insertion - 10 -
3.2.2 cpSRP-Transportweg - 11 -
4. Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie - 13 -
4.1 YidC aus *Escherichia coli* - 15 -
4.2 Oxa1p und Cox18/Oxa2p aus Mitochondrien - 16 -
4.3 Slr1471p aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 - 17 -
4.4 Alb3.1p und Alb3.2p aus *Chlamydomonas reinhardtii* - 17 -
4.5 Alb3p und Alb4p aus *Arabidopsis thaliana* - 19 -

II. Problemstellung **- 21 -**

III. Material und Methoden **- 23 -**

1. Material - 23 -
1.1 Verwendete Organismen - 23 -
1.1.1 Bakterien-Stämme - 23 -
1.1.2 Pflanzenmaterial - 23 -
1.2 Geräte - 23 -
1.3 Oligonukleotide - 25 -
1.4 Plasmide - 26 -
1.4.1 Vektoren - 26 -
1.4.2 Generierte Plasmide - 27 -
1.5 Chemikalien - 27 -
1.6 Radiochemikalien - 29 -
1.7 Enzyme und Kits - 29 -
1.8 Antikörper - 30 -
2. Methoden - 30 -
2.1 Mikrobiologische Methoden - 30 -
2.1.1 Kultur und Anzucht von *Escherichia* (*E.*) *coli* - 30 -
2.1.2 Transformation von *E. coli* - 31 -

2.1.3	Anzucht und Kultur von *Agrobacterium* (*A.*) *tumefaciens*	- 31 -
2.1.4	Transformation von *A. tumefaciens*	- 31 -
2.2	*Arabidopsis* (*A.*) *thaliana*-Methoden	- 31 -
2.2.1	Anzucht auf Erde	- 31 -
2.2.2	Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen und Anzucht auf Agar	- 31 -
2.2.3	Transformation von *A. thaliana* mittels „floral dip“	- 32 -
2.2.4	Chlorophyll- und Carotinoid-Bestimmung	- 32 -
2.3	Nukleinsäure-Methoden	- 33 -
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	- 33 -
2.3.2	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	- 33 -
2.3.3	Ligation von DNA-Fragmenten	- 33 -
2.3.4	DNA-Fällungen	- 34 -
2.3.5	Plasmid-Präparation	- 34 -
2.3.6	Präparation von DNA aus *A. thaliana*	- 34 -
2.3.7	Präparation von RNA aus *A. thaliana*	- 34 -
2.3.8	Reverse Transkription	- 35 -
2.3.9	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	- 35 -
2.3.10	DNA-Sequenzierung und Auswertung von Nukleotidsequenzen	- 35 -
2.3.11	Native Agarose-Gelelktrophorese	- 35 -
2.3.12	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	- 36 -
2.3.13	Radioaktive Markierung von DNA	- 36 -
2.3.14	Southern-Hybridisierung	- 36 -
2.4	Protein-biochemische Methoden	- 37 -
2.4.1	Isolierung von Membranproteinen aus *A. thaliana*	- 37 -
2.4.2	*In vivo*-Proteinmarkierung mit L.-[^{35}S]-Methionin	- 37 -
2.4.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 38 -
2.4.4	Blue native-Polyacrylamid-Gelelktrophorese (BN-PAGE) und 2. Dimension BN/SDS-PAGE	- 38 -
2.4.5	Coomassie-Färbung	- 39 -
2.4.6	Silberfärbung	- 40 -
2.4.7	Western-Blot	- 40 -
2.4.8	Chemilumineszenz-Detektion (ECL)	- 41 -
2.5	TEM Mikroskopie	- 41 -
2.6	Sicherheitsbestimmungen	- 41 -
IV.	**Ergebnisse**	**- 42 -**
1.	Charakterisierung verschiedener Mutanten	- 42 -
1.1	Charakterisierung der Δ*cpftsy*-Mutante	- 43 -
1.2	Charakterisierung der *albino3*-Mutante	- 49 -
1.3	Charakterisierung der *ffc*$^{-}$-Mutante	- 52 -
1.4	Charakterisierung der Δ*hcf106*-Mutante	- 54 -
1.5	Charakterisierung der Δ*psy*-Mutante	- 60 -
2.	Phänotypische Unterschiede in Abhängigkeit zur Lichtintensität	- 65 -
3.	Protein-biochemische Analysen	- 75 -
3.1	Zweidimensionale BN/SDS-PAGE-Untersuchungen	- 75 -

3.2	SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen	- 82 -
3.3	*In vivo*-Proteinmarkierung plastidärer Proteine	- 89 -
V.	**Diskussion**	**- 101 -**
1.	Vergleich der untersuchten Mutanten mit der Literatur	- 102 -
1.1	Vergleich der Δ*cpftsy*-Mutante mit der Literatur	- 102 -
1.2	Vergleich der *albino3*-Mutante mit der Literatur	- 104 -
1.3	Vergleich der *ffc*$^-$-Mutante mit der Literatur	- 106 -
1.4	Vergleich der Δ*hcf106*-Mutante mit der Literatur	- 107 -
1.5	Vergleich der Δ*psy*-Mutante mit der Literatur	- 111 -
2.	Vergleich von Schwachlicht- mit Standardlichtbedingungen und daraus resultierende neue Erkenntnisse	- 113 -
2.1	CpFtsY und Alb3p sind Assistenten der LHCP-Integration	- 114 -
2.2	CpSRP54 ist möglicherweise an der PSII-Superkomplex-Assemblierung beteiligt	- 119 -
2.3	*Hcf106*-Knock-Out führt zu pleiotropen Effekten unabhängig von Alb3p	- 121 -
2.4	Ein Verlust der Carotinoid-Synthese ist auch unter Schwachlicht-bedingungen nicht zu kompensieren	- 125 -
2.5	Möglicher Zusammenhang zwischen Alb3p und Carotinoid-Assemblierung	- 127 -
VI.	**Zusammenfassung**	**- 128 -**
VII.	**Summary**	**- 130 -**
VIII.	**Literatur**	**- 132 -**
IX.	**Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**	**- 156 -**
X.	**Anhang**	**- 158 -**
XI.	**Lebenslauf**	**- 164 -**
XII:	**Danksagung**	**- 165 -**
XIII.	**Eidesstattliche Erklärung**	**- 166 -**

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACA-Puffer	6-amino-caproic-acid-Puffer; Aminocpronsäurepuffer
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
ARTEMIS	„*Arabidopsis thaliana* envelope membrane integrase"
ATP	Adenosintriphosphat
BN	Blue native
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C. reinhartii	*Chlamydomonas reinhardtii*
Car	Carotinoide
cDNA	„complementary DNA"
Chl	Chlorophyll
CHI	Cycloheximid
Ci	Curie, Einheit für die Strahlungsintensität $[1Ci = 3,7 \cdot 10^{10} \frac{Zerfälle}{\sec} = 3,7 \cdot 10^{10} Bq]$
cp-	chloroplast-
CP43	Chlorophyll-bindendes Protein 43 kDa
CP47	Chlorophyll-bindendes Protein 47 kDa
Cyt	Cytochrom
d	Tag (day)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ffc	`fifty four chloroplast´, homolog zum SRP54 von Eukayroten und Bakterien
g	Konstante der relativen Erdbeschleunigung (g = 9,80655 m/s²)
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
HSP	„heat shock protein", Hitzeschockprotein
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LHCP	„light harvesting chlorophyll binding protein", Lichtsammelkomplexprotein
M	Marker
min	Minuten
mRNA	„messenger RNA"

OD_{nm}	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge in nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorerese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert = negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an Protonen einer Lösung
PS	Photosystem
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
sec	Sekunde (second)
Sec	secretory
SPP	„stromal processing peptidase"
SRP	„signal recognition particle" (Signalerkennungspartikel)
SSC	sodium stock citrate (Natriumchlorid-Citrat-Lösung)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAT	„twin arginin translocation"
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TBS	„Tris buffered saline" (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
T-DNA	Transfer-DNA, durch *A. tumefaciens* übertragen
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TIC	„translocase of the inner chloroplast envelope"
TMK	Tris-Magnesiumchlorid-Kaliumchlorid-Puffer
TOC	„translocase of the outer chloroplast envelope"
TPP	„thylakoidal processing peptidase"
u	Unit, Einheit der Enzymaktivität
UE	Untereinheit
UV	ultraviolette Strahlung
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	„untranslated region"; nicht translatierte Region
WT	Wildtyp-Ausprägung
v/v	Volumen pro Volumen (Vol%)
w/v	Gewicht pro Volumen

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen sowie Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

I. Einleitung

1. Endosymbiontentheorie

In der Geschichte der Evolution war die Entstehung der Chloroplasten wohl einer der entscheidenden Schritte, um Leben, wie es heute auf der Erde vorhanden ist, möglich zu machen. Dadurch wurde im Vergleich zu der langsamen Evolution mittels zufälliger Mutagenese eine sprunghafte Entwicklung neuer Organismen und ganzer Organismenklassen möglich (Bhattacharya et al., 2007). Hervorgegangen sind Chloroplasten wie auch Mitochondrien durch Endosymbiose. Dabei entstanden vermutlich aus α-Proteobakterien Mitochondrien und aus frei lebenden Cyanobakterien Chloroplasten (Abb. 1; Müller und Martin, 1999; Martin et al., 2002; Bhattacharya et al., 2007). Durch dieses Ereignis gehen auch alle anderen eukaryotischen Zellen auf endosymbiotische Ereignisse zurück (Martin und Müller, 1998).

Triebfeder der Endosymbiose war wie bei allen Ereignissen in der Evolution ein Selektionsvorteil. So gibt z.B. die „Wasserstoff-Hypothese“ einen Aufschluss darüber, wie Mitochondrien entstanden sein könnten (Martin und Müller, 1998). Dabei lebten ein Kohlendioxid-(CO_2)- und Wasserstoff-(H_2)-produzierendes Eubakterium und ein methaogenes Archaeon im gleichen Lebensraum. Der Lebensraum verarmte an H_2, wodurch das Archaeon vom Eubakterium abhängig wurde. Um nun einerseits die Kontaktoberfläche zu vergrößern und andererseits den Verlust des H_2-Lieferanten zu verhindern, wuchs das Archaeon um das Eubakterium herum. Dabei handelte es sich jedoch nicht, wie lange Zeit angenommen, um eine Endozytose, da Archaeen kein Cytoskelett besitzen. Da das Eubakterium am Ende dieses Vorgangs von der Umgebung abgeschnitten war, musste der Wirt organische Substrate liefern. Dazu war ein Gentransfer für Transportproteine ins Wirtsgenom nötig. Ebenso gingen dem Endosymbionten auch Gene verloren; nämlich solche, die für das Archaeon in seiner symbiotischen Lebensweise nicht mehr essentiell waren. Dabei handelte es sich z.B. um Gene für bestimmte Stoffwechselenzyme, da der Wirt den entsprechenden Stoffwechsel übernahm. Dieser Genverlust ist auch der Grund dafür, dass plastidäre Genome im Vergleich zu ihren frei lebenden Verwandten wesentlich kleiner sind.

So kodieren Mitochondrien-Genome im Minimalfall nur für 5 Gene (Gray und Lang, 1998), während das Genom ihres nächsten frei lebenden Verwandten *Rickettsia prowazekii* 834 Gene enthält (Müller und Martin, 1999).

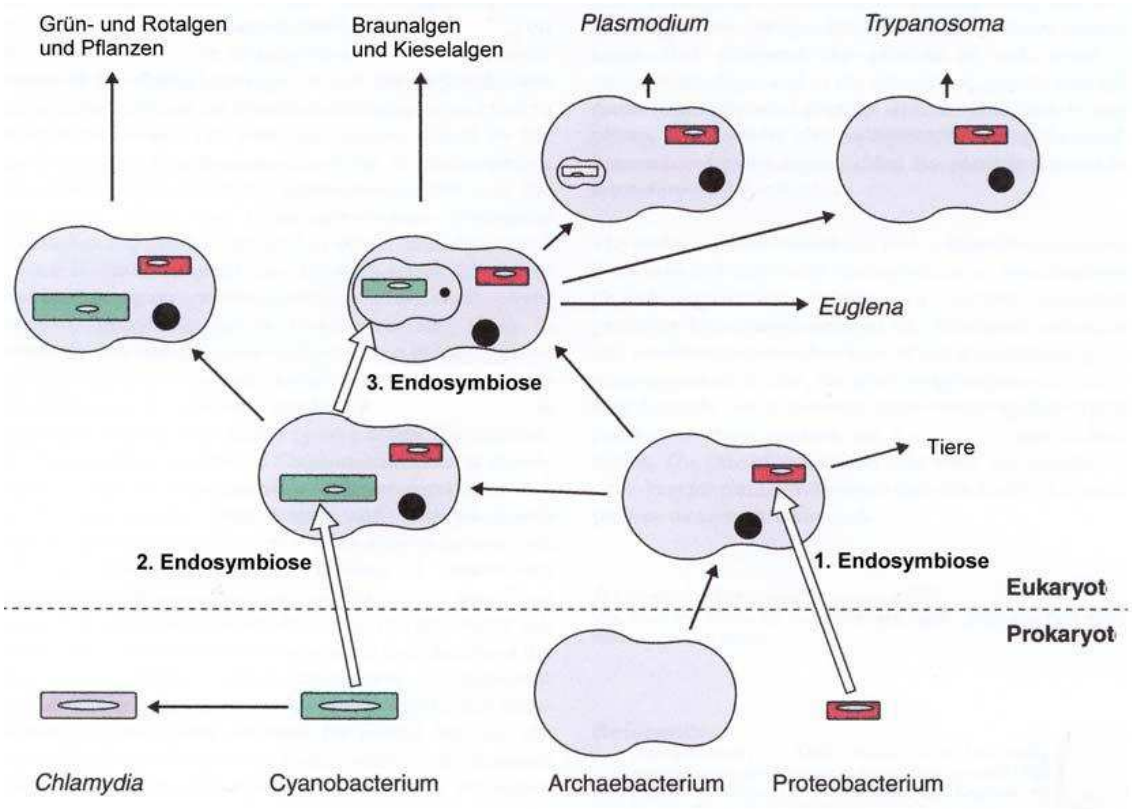


Abb. 1: Endosymbiontentheorie und Evolution der Zelle (verändert nach Raven und Allen, 2003).
Bei der 1. Endosymbiose, die die Geburt der Eukaryoten darstellt, wurde ein Proteobakterium von einem Archaeon aufgenommen, wodurch Mitochondrien entstanden. Durch die Aufnahme eines Cyanobakteriums in einer 2. Endosymbiose bildeten sich photosynthetische Zellen. Daraus gingen Pflanzen und Algen hervor. Aus einem weiteren endosymbiotischen Schritt (3. Endosymbiose), in dem eine eukaryotische Zelle eine photosynthetische Zelle aufnahm, gingen Braun- und Kieselalgen hervor. Durch Verlust von Zellkompartimenten entstanden *Plasmodium* und *Trypanosoma*.

Zusätzlich zum Verlust von Genen, fand auch ein enormer Austausch zwischen Kern und Organellen statt. Das zeigt die Tatsache, dass im Genom von *Arabidopsis* (*A.*) *thaliana* rund 4500 Gene enthalten sind, die ursprünglich aus einem Cyanobakterium, vermutlich *Nostoc*, stammen (López-Juez und Pyke, 2005; Martin und Herrmann, 1998). Die Genprodukte dieser 4500 Gene werden jedoch nur etwa zur Hälfte wieder in den Chloroplasten transportiert. Die übrigen Proteine übernehmen nach ihrer Expression Aufgaben im Cytoplasma oder auch im Mitochondrium. Auch ein

minimaler Gentransfer in den Chloroplasten konnte nachgewiesen werden. So stammen z.B. die Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Fructose-Bisphosphatase ursprünglich aus dem Kern-Genom von *A. thaliana*, sind nun aber im Chloroplasten-Genom kodiert (López-Juez und Pyke, 2005; Martin und Herrmann, 1998).

Wozu aber gibt es den bis heute nicht abgeschlossenen Gentransfer? Der Vorteil begründet sich vermutlich auf der niedrigeren Mutationsrate der sich sexuell vermehrenden Kern-Genome im Vergleich zu den sich asexuell vermehrenden Organellen-Genomen, die „Muller's Ratsche" unterliegen (Bhattacharya et al., 2005; Kurland, 1992; Lynch, 1996; Martin et al., 1998; Muller, 1932). Auch gesehen werden muss, dass das Organell vom Wirt ausgebeutet wird, was Kontrolle und Abhängigkeit voraussetzt. Die Abhängigkeit ist dadurch gegeben, dass der Wirt organische Substrate liefert, während die Kontrolle des Wirtes durch den Gentransfer auf genetischer Ebene gewährleistet wird. Jedoch wirken sowohl DNA-Reparaturmechanismen als auch die Tatsache der hohen Kopienzahl des Organellen-Genoms pro Plastid dem Selektions-druck des Gen-Transfers entgegen, wodurch bestimmte Gene im Plastiden-Genom kodiert blieben (Martin und Hermann, 1998).

Wozu braucht der Plastid aber überhaupt noch ein Genom? Hierzu gibt es zwei Hypothesen. Eine Theorie geht auf die hohe Hydrophobizität vieler Plastiden-kodierter Proteine zurück, die aufgrund ihrer vielen hydrophoben Transmembranhelices nur schwer in den Chloroplasten transportiert werden könnten (López-Juez und Pyke, 2005; Goldschmidt-Clermont, 1998; Popot et al., 1994). Jedoch liefert das stromale Protein RbcL ein Gegenbeispiel, da es als lösliches Protein trotzdem im Chloroplasten kodiert ist. Die andere Theorie besagt, dass Chloroplasten schnell auf Veränderungen reagieren können müssen, da sie ihr Redox-Potential als Signal für die Genexpression verwenden und Redox-Reaktionen durch die potentielle Bildung freier Radikale gefährlich sind. Diese schnellen Regulationen sind nur möglich, wenn zentrale Untereinheiten im Plastiden-Genom kodiert sind (Martin und Hermann, 1998; López-Juez und Pyke, 2005; Allen, 2003). Diese Theorie wird auch dadurch gestützt, dass Hydrogenosomen, die keinerlei Atmung oder Photosynthese betreiben und somit keine Radikal-bildenden Reaktionen betreiben, kein Genom besitzen (Race et al., 1999).

Insgesamt ist die Endosymbiose ein enormer Schritt in der Evolution des einzelnen Organismus, da ein Stoffwechselweg mit den jeweils funktionalsten Enzymen der

beiden Symbionten ausgestattet werden kann, was im Vergleich zur Verbesserung des Stoffwechsels durch natürliche Mutation wesentlich schneller verläuft (Martin und Herrmann, 1998).

2. Proteintransport in den Chloroplasten

Durch die Endosymbiose und den damit verbundenen Gentransfer entstand ein großes Problem für die Zelle (Bhattacharya et al., 2005). Die nun im Kern kodierten Proteine mussten wieder in den Chloroplasten transportiert werden.

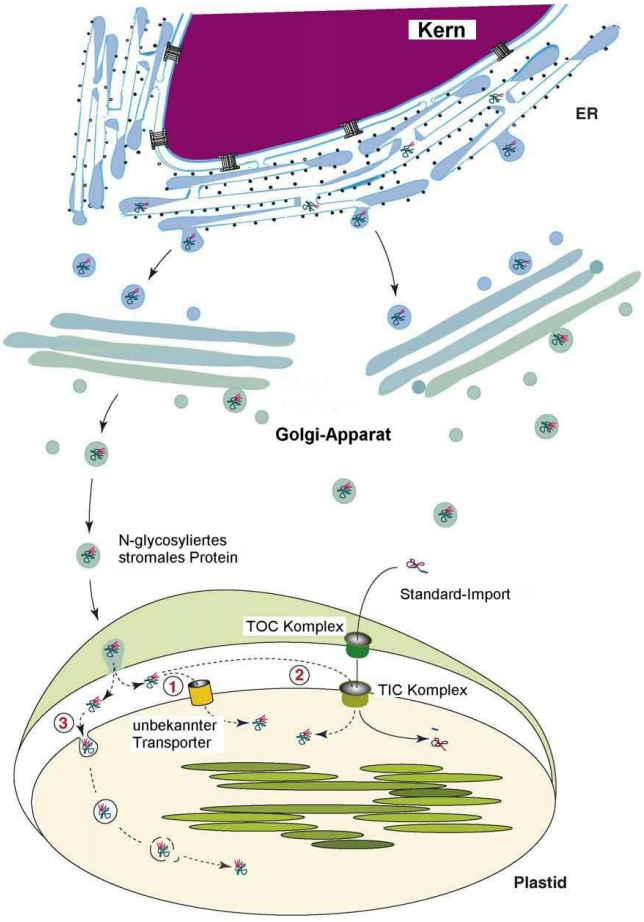


Abb. 2: Proteinimport in den Chloroplasten (verändert nach Radhamony und Theg, 2006).
Zusätzlich zum Standard-Importweg über TOC- und TIC-Komplex wird auch ein Vesikel-vermittelter Import diskutiert, wobei nach Vesikelverschmelzung mit der äußeren Hüllmembran drei Möglichkeiten zur Translokation über die innere Hüllmembran bestehen: (1) über einen unbekannten Transporter, (2) über den TIC-Komplex oder (3) mit Hilfe eines weiteren Vesikel-Schrittes.

Hierfür entwickelten sich im Laufe der Evolution einerseits Transportwege über TOC-(„Translocon of the outer chloroplast envelope“)- und TIC-(„Translocon of the inner chloroplast envelope“)-Komplexe und andererseits auch ein sekretorischer Transport-weg mittels Vesikeln über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat (Abb. 2; Bhattacharya et al., 2005; Cline und Dabney-Smith, 2007; Radhamony und Theg, 2006).

2.1 Transport via TOC- und TIC-Komplex

Proteine, die mittels TOC und TIC in den Chloroplasten importiert werden, werden im Cytosol als Präprotein mit N-terminalen Zielsequenzen expremiert, die 20 bis 70 Aminosäuren lang sind (Kessler und Schnell, 2006; Bédard und Jarvis, 2005; Soll und Schleiff, 2004). Die Proteine werden durch HSP70-Chaperone oder mittels eines sog. Guidance-Komplexes, der zusätzlich noch ein Dimer des 14-3-3-Proteins enthält, zum TOC-Rezeptor, bestehend aus Toc159 und Toc34, geführt und binden dort GTP-abängig. Nach dem unter GTP-Verbrauch stattfindenden Transport des Proteins durch die TOC-Pore Toc75 bindet das Präprotein im Intermembranraum erneut ein HSP70-Chaperon und wird mittels Tic 22 zum TIC-Komplex geleitet.

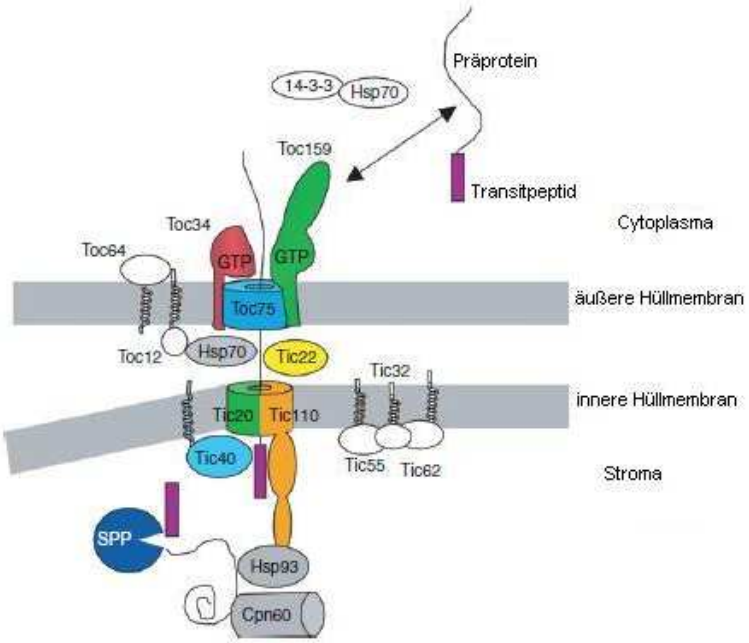


Abb. 3: Proteinimport via TOC- und TIC-Komplex (verändert nach Kessler und Schnell, 2006).

Die Beschreibung des Imports ist im Text näher erläutert. Die in weiß dargestellten Proteine besitzen regulatorische Eigenschaften.

Der ATP-abhängige Transport erfolgt durch die vermutlich aus Tic20 und/oder Tic110 bestehende Pore, wobei die stromale Domäne von Tic110 Chaperone (HSP93 und Cpn60) rekrutiert, die zusammen mit Tic40 die Faltung des importierten Proteins unterstützen. Die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) entfernt nun kurz nach dem Import das Transitpeptid, wodurch das mature stromale Protein gebildet wird.
Der gesamte Proteinimport in den Chloroplasten ist ein stark regulierter Vorgang. So kann der Import z.B. über Tic32, Tic55 und Tic62 Redox-abhängig reguliert werden. Der Import mittels TOC- und TIC-Komplex ist jedoch nicht der einzig mögliche Weg, wie Proteine in den Chloroplasten gelangen können.

2.2 Vesikel-gesteuerter Transport in den Chloroplasten

Betrachtet man das chloroplastidäre Proteom, so fällt auf, dass ca. 30 % der Proteine keine N-terminale Zielsequenz besitzen (Kleffmann et al. 2004). Jedoch besitzen viele von ihnen ein Signalpeptid für das sekretorische System. Villarejo et al. (2005) zeigten, dass das Enzym α-Carboanhydrase in *A. thaliana* aufgrund ihres Signalpeptids nicht nur über das Endoplasmatische Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat transportiert wird, um dort glykosyliert zu werden, sondern, dass auch der Transport ins Stroma des Chloroplasten mit Hilfe des Golgi-Vesikels vonstatten geht (Abb. 2). Ein weiteres Beispiel für den Import von Proteinen in den Chloroplasten über das sekretorische System liefert die plastidäre Nukleotid-Pyrophosphatase/Phosphodiesterase aus Reis (Nanjo et al. 2006). Es wird vermutet, dass dieser Weg des Proteinimports der ursprüngliche ist, da beim frühen Gentransfer vermutlich kein Proteinkomplex zum Import vorhanden war (Vallarejo et al., 2005). Bei einigen Apikomplexa-Parasiten (Sporentierchen) und Algen wie z.B. *Euglena*, die komplexe Plastiden mit mehreren Hüllmembranen besitzen, ist der Proteinimport über das sekretorische System der Standardmechanismus (Vallarejo et al., 2007; Sulli und Schwarzenbach, 1995; Waller et al., 2000).

3. Proteintransport an der Thylakoidmembran

Viele der in den Chloroplasten importierten Proteine sind Bestandteile von Photosynthese-Komplexen und müssen daher in die Thylakoidmembran inseriert oder ins Thylakoidlumen transportiert werden (Schünemann, 2007). Derzeit sind hierfür vier

Wege beschrieben, die in ähnlicher Form auch in Bakterien zu finden sind. Es handelt sich dabei um den cpTat- und cpSec-Weg für die Translokation und den spontanen bzw. den cpSRP-Weg für die Insertion (Abb. 4). Die einzelnen Transportwege werden im weiteren Text näher erläutert.

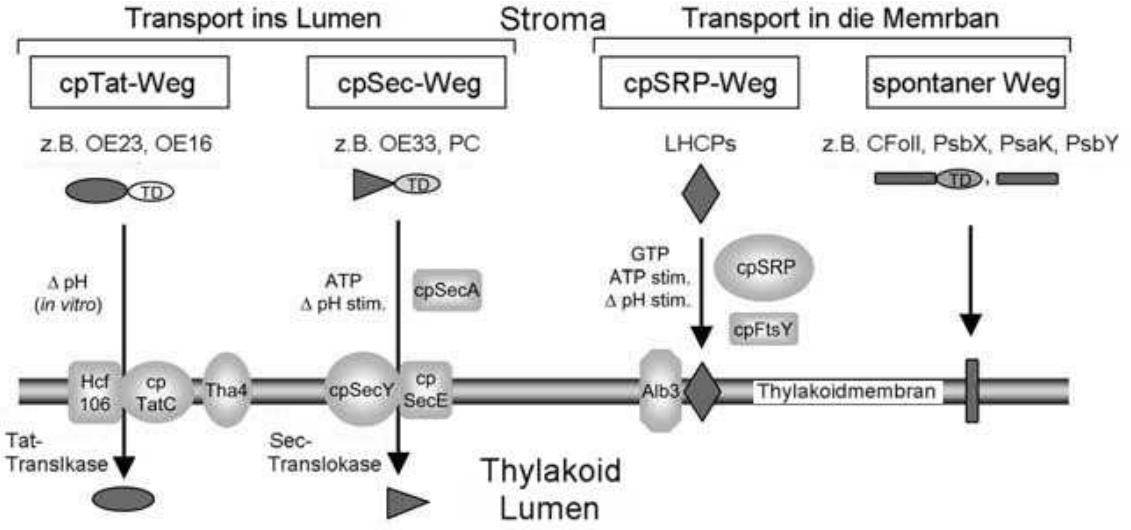


Abb. 4: Übersicht über die Proteintransportwege durch bzw. in die Thylakoidmembran (verändert nach Schünemann, 2007).
Dargestellt sind die Komponenten und benötigten Energiequellen der vier Proteintransportwege: cpTat-Weg, cpSec-Weg, cpSRP-Weg und der Weg der spontanen Integration. Zusätzlich sind noch Beispiele der transportierten Proteine genannt. Die einzelnen Transportmechanismen werden im weiteren Text näher beschrieben.

3.1 Transport durch die Thylakoidmembran

Alle ungefähr 80 Proteine des Thylakoidlumens besitzen zusätzlich zum Transitpeptid, das für den Transport ins Stroma verantwortlich ist, noch ein zweites Signalpeptid, das den Transport durch die Thylakoidmembran veranlasst (Schünemann, 2007; Schubert et al., 2002). Dieses Signalpeptid ist ähnlich zu bakteriellen Signalpeptiden und besteht aus einer positiv geladenen N-terminalen Domäne (N-Domäne), einer hydrophoben Kerndomäne (H-Domäne) und einer polaren C-terminalen Domäne (C-Domäne). Proteine des cpTat-Transportweges besitzen nahe der Bindung der H-Domäne ein sog. „Twin-Arginin“-Motiv, durch das der Transportweg auch seinen Namen erhalten hat (Chaddock et al., 1995).

3.1.1 cpSec-Transportweg

Wie bereits erwähnt ist der chloroplastidäre Sec-Transportweg mit einem in Bakterien vorkommenden Sec-abhängigen Transport von Proteinen ins Periplasma verwandt (Mitra et al., 2006; Robson und Collinson, 2006). Im Chloroplasten sind für den Transport von Proteinen durch die hetero-dimere Translokationspore bestehend aus cpSecY und cpSecE zusätzlich die stromale ATPase cpSecA und ATP nötig (Abb. 4; Aldridge et al. 2009; Schünemann et al., 1999; Roy und Barkan 1998; Hulford et al., 1994; Yuan et al.; 1994). CpSecA fungiert dabei als Motor der ATP-abhängigen Translokation. Die cpSec-Translokase transportiert Proteine wie z.B. OE33 (die 33 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates) oder Plastocyanin (PC) ausschließlich im ungefalteten Zustand (di Cola et al., 2005; Hynds et al., 1998; Marques et al., 2004). Andere Homologe zu bakteriellen Sec-Proteinen wie SecB, SecG oder SecD/F konnten in Pflanzen bislang nicht identifiziert werden, was die Frage aufwirft, welche Faktoren die zu transportierenden Proteine im ungefalteten Zustand halten. In Bakterien übernimmt diese Funktion das cytosolische Chaperon SecB (Aldridge et al., 2009). Abgesehen von den bisher nicht identifizierten Faktoren gibt es auch noch einen weiteren Unterschied zwischen dem cpSec- und dem bakteriellen Sec-Transportweg. So konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von cpSecA nur durch chloroplastidäre, nicht aber durch *Escherichia* (*E.*) *coli*-Signalpeptide stimuliert wird und dass die ATPase-Stimulation auch eine bestimmte Lipidzusammensetzung der Thylakoidmembran benötigt, die sich von der Zusammensetzung der Plasmamembran von *E. coli* unterscheidet (Aldridge et al. 2009; Sun et al. 2007).

3.1.2 ΔpH/cpTat-Transportweg

Im Gegensatz zum cpSec-Transportweg benötigt der ΔpH/cpTat-Weg keine Nukleotidtriphosphate und auch keine stromalen, sondern nur membranständige Komponenten, die ebenfalls verwandt zu bakteriellen Proteinen sind (Abb. 4; Schünemann, 2007). Bei den drei am Transport beteiligten Membranproteinen handelt es sich um Tha4 (TatA in *E. coli*), Hcf106 (TatB) und cpTatC (TatC). Die Energie für den Transport liefert der pH-Gradient über die Thylakoidmembran, wobei der cpTat-Weg sowohl den Protonen-Gradienten als auch das elektrische Potential des pH-Gradienten als Energiequelle nutzen kann (Cline und Dabney-Smith, 2008; Braun

et al., 2008). Ein weiterer Unterschied zum cpSec-Weg besteht darin, dass über die Tat-Translokase vollständig gefaltete Proteine eines breiten Größenspektrums (2 bis mehr als 100 kDa) und sogar mehrere Vorläuferproteine gleichzeitig, z.B. bereits durch Disulfidbrücken gekoppelt, durch die Thylakoidmembran geschleust werden können (Cline und Dabney-Smith, 2008; Ma und Cline, 2010).

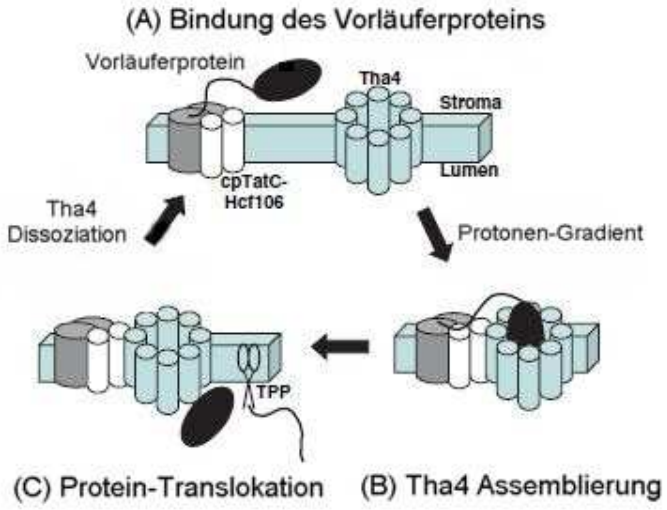


Abb. 5: Translokation von Proteinen mittels cpTat-Transportweg (verändert nach Aldridge et al., 2009).
(A) Der Rezptorkomplex bestehend aus cpTatC und Hcf106 bindet das mit einem Signalpeptid versehene Vorläuferprotein. (B) Es erfolgt eine Assemblierung der Tat-Pore bestehend aus einem Tha4-Oligomer und (C) schließlich kommt es zur Translokation des vollständig gefalteten Proteins ins Thylakoidlumen, wo durch eine thylakoidale Prozessierungspeptidase (TPP) das Signalpeptid abgespalten wird.

Die Komponenten des Transportweges liegen in zwei Subkomplexen vor: Hcf106 und cpTatC bilden einen ca. 700 kDa großen Rezeptorkomplex, während Tha4 als Oligomer in der Thylakoidmembran vorliegt (Abb. 4A; Cline und Mori, 2001; Dabney-Smith et al. 2006). Das Vorläuferprotein bindet mit dem Transitpeptid am Rezeptor-Komplex, wobei das Doppel-Arginin-Motiv in der Nähe von cpTatC liegt (Abb. 4A; Dabney-Smith und Cline, 2008; Gerard und Cline, 2006). Aufgrund dieser Bindung und des ΔpH-Gradienten der Thylakoidmembran erfolgt die Assemblierung der Tha4-Oligomere abhängig von der Größe des zu transportierenden Proteins an den Rezeptorkomplex (Abb. 4B; Cline und McCaffery, 2007; Mori und Cline, 2002). Anschließend wird das Protein durch den Kanal ins Lumen transportiert und dort das

Signalpeptid wie beim cpSec-Transportweg durch eine thylakoidale Prozessierungs-peptidase (TPP) abgespalten (Aldridge et al., 2009).

3.2 Transport in die Thylakoidmembran

Eine Vielzahl von Kern-kodierten Proteinen muss jedoch v.a. wegen der Photosynthesekomplexe in die Thylakoidmembran inseriert werden. Dazu gibt es zwei bisher bekannte Transportwege: zum einen den cpSRP-Weg für Proteine der Lichtsammelkomplexe (LHCP, „light harvesting chlorophyll *a*/*b* binding protein“) und zum anderen einen spontanen Insertionsweg, der vermutlich den Standardweg für Membranproteine mit nur einer Transmembranhelix darstellt (di Cola et al., 2005; Schünemann, 2007).

3.2.1 Spontane Insertion

Zum ersten Mal gezeigt wurde eine spontane Insertion für die CF_oII-Untereinheit der ATP-Synthase, für die nachgewiesen werden konnte, dass weder Nukleotidtriphosphate oder ein ΔpH-Gradient noch Proteinbestandteile der bekannten Transportwege die Integration in die Membran benötigt wurden (Michl et al., 1994). Es wurde auch in *E. coli* ein spontaner Insertionsweg für das sog. „M13 procoat protein“ angenommen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Insertion dieses Proteins von YidC, einem Alb3-Homologen, abhängig ist (Samuelson et al., 2000; Schleiff und Klosgen, 2001). Für die PSII-Proteine PsbW und PsbX, die wie die oben genannte ATP-Synthase-Untereinheit nur eine Transmembrandomäne besitzen, konnte gezeigt werden, dass sie auch in Abwesenheit von Alb3p spontan in die Membran integrieren (Woolhead et al., 2001).

Es gibt auch komplexere Membranproteine die spontan in die Thylakoidmembran integrieren. Dazu gehören die PSI-Untereinheiten PsaK und PsaG, die beide zwei Transmembrandomänen besitzen, die durch einen stromalen positiv geladenen Loop verbunden sind (Zygadlo et al., 2006; Mant et al., 2001). Auch für Proteine mit mehr als zwei Transmembranproteinen wurde eine spontane Integration angenommen, nämlich für die PSII-Untereinheit PsbS und Elip2 („early light inducible protein 2“; Kim et al., 1999; Woolhead et al., 2001). Jedoch konnte für Elip2 gezeigt werden, dass es in einer SRP-Doppelmutante nur in reduzierten Mengen vorliegt (Hutin et al., 2002), während

PsbS zumindest teilweise spontan integrieren kann (Schünemann, 2007). Auch Proteine der thylakoidalen Protein-Transportwege nutzen den spontanen Insertionsweg, nämlich cpSecE, Hcf106 und Tha4 (Steiner et al., 2002; Fincher et al., 2003).
Bei einigen Proteinen ist für die spontane Insertion jedoch eine Art hydrophobes Signalprotein nötig, das nach der Insertion über einen lumalen Loop durch die TPP vom eigentlichen Protein abgespalten wird (Thompson et al., 1998).

3.2.2 cpSRP-Transportweg

Neben der spontanen Integration gibt es noch einen weiteren Weg, wie Kern-kodierte Membranproteine in die Thylakoidmembran gelangen können. Der cpSRP-Weg ist verwandt mit dem cytoplasmatischen SRP-Weg in Pro- und Eukaryoten (Aldridge et al., 2009). Jedoch gibt es deutliche Unterschiede. Im Gegensatz zum cytoplasmatischen SRP-Weg benötigt der cpSRP-Transportweg keine RNA-Komponente (Li et al., 1995) und besitzt eine für diesen Weg einzigartige 43 kDa große Protein-Komponente cpSRP43 (Schünemann et al., 1998). Des Weiteren läuft der Transport im Cytoplasma co-translational, während die Integration von LHCPs post-tranlational abläuft (Schünemann, 2007). Ein Transport anderer Kern-kodierter Proteine über den cpSRP-Weg ist bislang nicht bekannt.
Im Stroma binden sowohl die 54 kDa große GTPase cpSRP54 als auch das für LHCPs spezifische molekulare Chaperon cpSRP43 an diese und bilden so den Transitkomplex (Abb. 6; Franklin und Hoffmann, 1993; Li et al. 1995; Schünemann et al., 1998; Klimyuk et al., 1999; Falk und Sinning, 2010). Dabei bindet zuerst die konservierte L18-Domäne, die zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne der LHCPs liegt, an die Ankyrin-Domäne von cpSRP43 (De Lille et al., 2000; Tu et al., 2000; Jonas-Straube et al., 2001). Dadurch wird die Bindung von cpSRP54 an die hydrophoben Sequenzen der LHCPs veranlasst. Der so gebildete Transitkomplex bindet anschließend an cpFtsY, ein Homologes des eukaryotischen SRP-Rezeptors SRα und des prokaryotischen FtsY (Kogata et al., 1999). Das führt zu einer Bindung des Transitkomplexes an die Membran durch eine Bindung des C-Terminus von cpSRP43 an den C-Terminus von Alb3p (Moore et al., 2003; Falk et al., 2010). Die Bindung des Transitkomplexes an die Membran erfolgt dabei unabhängig von Alb3p. Anschließend erfolgt die GTP-abhängige Integration der LHC-Proteine in die Thylakoidmembran

(Hoffmann und Franklin, 1994), wobei die GTP-Hydrolyse vermutlich für die Dissoziation des cpSRP-Komplexes nötig ist (Jaru-Ampornpan et al., 2007).
Scheinbar gibt es jedoch auch einen alternativen Weg zur Integration von LHCPs, der nur von cpSRP43 und Alb3p abhängt (Tzvetkova-Chevoulleau et al., 2007).

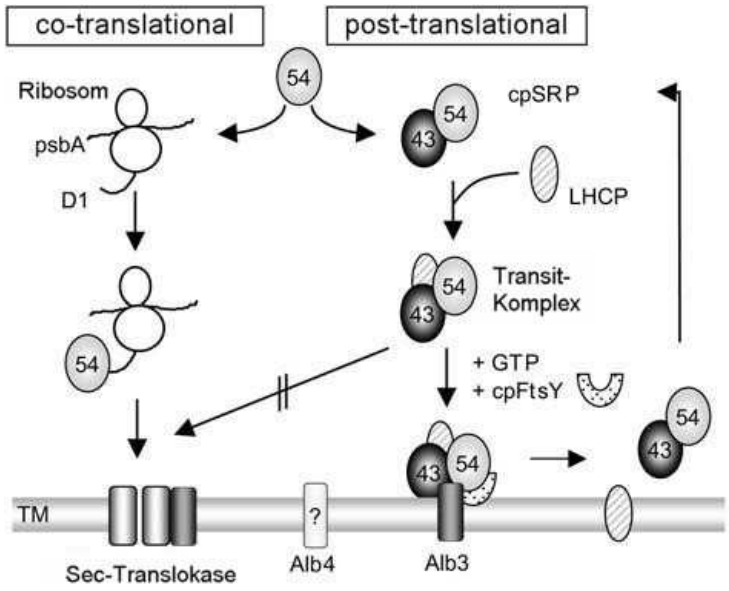


Abb. 6: cpSRP-abhängige Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran in einem co- bzw. post-translationalen Weg (verändert nach Schünemann, 2007).
Das chloroplastidäre „signal recognition particle“ (cpSRP) besteht aus cpSRP54 und cpSRP43 und bindet ins Stroma transportierte LHCPs, wodurch sich der sog. Transitkomplex bildet. Für die Integration von LHCP in die Thylakoidmembran sind zusätzlich GTP, cpFtsY (SRP-Rezeptor) und Alb3p nötig. Die Insertion läuft jedoch unabhängig von der cpSecY/E-Translokase ab. cpSRP54 ist auch in einem co-translationalen Insertionsmechanismus involviert. Dabei vermittelt es die Integration des Chloroplasten-kodierten D1-Proteins über die Sec-Translokase und möglicherweise im Zusammenspiel mit Alb3p. Die Funktion des Alb3-Homologen Alb4 ist weitestgehend unbekannt.

Zusätzlich zur post-translationalen Integration von LHCPs in die Thylakoidmembran wurde auch für cpSRP ein co-translationaler Weg entdeckt, der unabhängig von cpSRP43 ist und bei dem cpSRP54 direkt mit plastidären 70S-Ribosomen interagiert (Abb. 6; Franklin und Hoffman, 1993; Schünemann et al., 1998). Gezeigt werden konnte diese co-translationale Integration für das PSII-Reaktionszentrumsprotein D1 (Abb. 6; Nilsson et al., 1999; Nilson und van Wijk, 2002). Die Integration des Proteins selbst übernimmt dabei in Analogie zum bakteriellen SRP-Weg die cpSec-Translokase (Zhang et al., 2001). Wie in *Chlamydomonas* (*C.*) *reinhardtii* gezeigt werden konnte, ist Alb3 (hier Alb3.1) für die Assemblierung von D1 in das Photosystem, aber nicht direkt

für die Integration in die Thylakoidmembran nötig (Ossenbühl et al., 2004). Zusätzlich zur direkten Interaktion von Alb3p mit cpSecY (Klostermann et al., 2002) konnten auch Interaktionen von Alb3p mit D2, CP43, PSI-A und CF_OIII mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems nachgewiesen werden, was weitere Kandidaten für den post-translationalen cpSRP-Weg aufzeigt (Pasch et al., 2005). Jedoch werden nicht alle plastidär kodierten Membranproteine mittels cpSRP54 in die Membran integriert, da z.B. Cytochrom (Cyt.) *f* nicht mit cpSRP54 interagiert (Röhl und van Wijk, 2001). Cyt. *f* interagiert dafür mit cpSecA, was eine Nutzung der Sec-Translokase für die Integration vermuten lässt (Schünemann, 2007).

4. Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie

Das eben beim cpSRP-Weg beschriebene Alb3-Protein bildet zusammen mit seinen Homologen Oxa1 aus Mitochondrien und YidC aus *E. coli* eine eigene konservierte Proteinfamilie (Abb. 7). Es konnte gezeigt werden, dass genomische Sequenzen für mindestens ein Homologes in jedem bislang vollständig sequenzierten Genom zu finden sind (Luirink et al., 2001; Yen et al., 2001).

Die Mitglieder dieser Proteinfamilie sind dabei nicht nur an der Translokation bzw. Insertion von Proteinen in biologische Membranen von Chloroplasten, Mitochondrien, Eubakterien und Archaeen beteiligt, sondern auch an der Proteinfaltung und Assemblierung (Yi und Dalbey, 2005; Zhang et al., 2009). Gemein haben alle Proteine dieser Familie eine konservierte, ca. 200 Aminosäuren (AS) große, hydrophobe Kernregion, wobei Hydropathie-Diagramme auf fünf konservierte Transmembran-domänen hinweisen, die auch verantwortlich für die Funktion der einzelnen Proteine ist (Abb. 7; Yen et al., 2001). Die Sequenzen der einzelnen Proteine variieren stark. So ist nur ein Tyrosin-Rest in der konservierten hydrophoben Region wirklich identisch unter 76 getesteten Proteinen (Yen et al., 2001). Trotz allem können sie sich gegenseitig bis zu einem gewissen Grad komplementieren. So kann z.B. Alb3p den Phänotyp einer *yidC*-Mangelmutante ebenso aufheben wie Slr1471p, das Homologe aus *Synechocystis* (Gathmann et al., 2008; van Bloois et al., 2005; Jiang et al., 2002). Eine nur teilweise Komplementation der *yidC*-Mutante zeigen dagegen die mitochondrialen Vertreter Oxa1p und Cox18 (van Bloois et al., 2007; van Bloois et al., 2005). Hier konnte nur die Sec-unabhängige Funktion von YidC ersetzt werden.

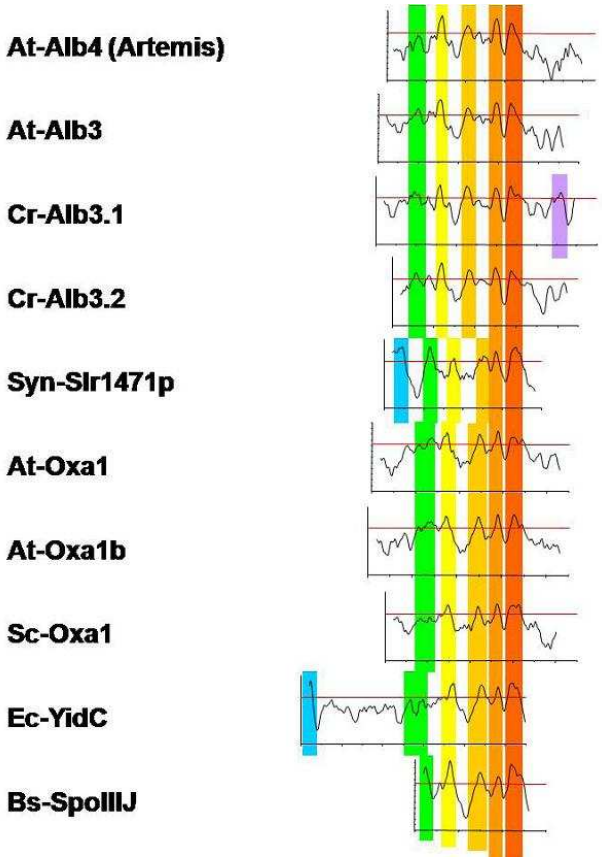


Abb. 7: Hydropathie-Diagramme ausgewählter Beispiele der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung).
Mögliche Transmembranbereiche sind mit farbigen Balken markiert. (At: *Arabidopsis thaliana*; Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*; Syn: *Synechocystis*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Ec: *Escherichia coli*; Bs: *Bacillus subtilis*).

Zusätzlich zu dieser funktional konservierten Kernregion gibt es noch flankierende Regionen am C- und N-Terminus, die sich unterscheiden. So variiert der N-Terminus in einer Größe von 200 bis 620 AS. Dabei besitzt z.B. YidC aus *E. coli* einen periplasmatischen Loop und eine weitere Transmembrandomäne. Auch bei Slr1471p aus *Synechocystis* ist im Hydropathie-Diagramm ein weiterer Transmembranbereich zu erkennen, der aber auch als Signal für die Plasmamembran wirken könnte, da dort die Biogenese der Photosysteme in Cyanobakterien stattzufinden scheint (Abb. 7; Klinkert et al., 2004). Im Gegensatz zu den bakteriellen besitzen die Homologen der Organellen einen relativ großen C-Terminus, der bei Oxa1p als Ribosomenbindedomäne fungiert (van Bloois et al., 2007). Diese C- und N-terminalen Extentionen sind dafür verantwortlich, dass je nach Organismus bzw. zellulärer Lokalisation weitere

Funktionen zusätzlich zur konservierten Translokase-Funktion ausgeführt werden können.

Viele Organismen besitzen zwei oder mehr Homologe der Alb3/Oxa1p/YidC-Proteinfamilie. So konnten in Gram-positiven Bakterien mit YidC1 und YidC2, in *A. thaliana* mit Alb3p und Alb4p, in Mitochondrien mit Oxa1p und Oxa2p/Cox18 und auch in *C. reinhardtii* je zwei Homologe nachgewiesen werden. Phylogenetische Studien deuten darauf hin, dass die Genduplikationen, aus denen diese jeweiligen Homologen hervorgingen, unabhängig voneinander stattgefunden haben und spezielle Funktionen ermöglichten (Funes et al., 2009; Zhang et al., 2009; Yen et al., 2001).

4.1 YidC aus *Escherichia coli*

Das Mitglied der Proteinfamilie aus *E. coli* ist YidC und wurde ursprünglich als Oxa1-Homologes ohne bekannte Funktion gefunden (Bonnefoy et al., 1994). Später wurde gezeigt, dass es für die Lebensfähigkeit des Bakteriums essentiell ist (Samuelson et al., 2000), da es eine Membranuntereinheit der F_OF_1-ATPase in die Membran integriert (van der Laan et al., 2001). Es handelt sich um ein 60 kDa großes Protein mit N_{in}-C_{in}-Topologie (Sääf et al., 1998). YidC konnte sowohl als Monomer, als auch als Dimer isoliert werden, wobei die dimere Form offenbar Insertionsporen für das translatierende Ribosom bildet (van der Laan et al., 2001; Kohler et al., 2009). Dabei interagiert YidC direkt mit den naszierenden Ketten der Membranproteine und katalysiert die Sec-unabhängige Integration in die Membran (Serek et al., 2004), wobei YidC auch direkt mit SecY interagieren kann (Samuelson et al., 2000; Scotti et al., 2000; Nouwen und Driessen, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass das Protein MscL SRP- und YidC-abhängig in die Membran integriert (Kiefer und Kuhn, 2007; Facey et al., 2006). YidC selbst wird über den klassischen SRP-Sec-Transportweg in die Membran gebracht (Koch et al., 2002).

Wie oben schon erwähnt wurde auch YidC im Laufe der Evolution dupliziert (Funes et al., 2009). So konnten in *Streptococcus mutans*, dem Hauptverantwortlichen für Karies beim Menschen, zwei YidC-Proteine identifiziert werden, die unabhängig voneinander die *E. coli yidC*-Mutante teilweise komplementieren konnten und die Insertion von sowohl Sec-abhängigen als auch -unabhängigen Substraten vermittelten

(Hasona et al., 2005; Dong et al., 2008). Dabei konnte auch ein Zusammenhang zwischen YidC2 und dem SRP-Weg festgestellt werden.

4.2 Oxa1p und Cox18/Oxa2p aus Mitochondrien

Oxa1p („oxidase assembly 1“) wurde als erstes Mitglied der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie in Mitochondrien von *Saccharomyces* (*S.*) *cerevisiae* entdeckt, als nach Proteinen gesucht wurde, die an der Assemblierung der Cytochrom-Oxidase beteiligt sind (Bonnefoy et al., 1994; Bauer et al., 1994). Es handelt sich dabei um ein 36 kDa großes Protein in der inneren Mitochondrienmembran, das fünf Transmembrandomänen in einer N_{out}-C_{in}-Topologie besitzt und entweder einen homooligomeren oder dimeren Komplex bildet (Herrmann et al., 1997; Nargang et al., 2002; Kohler et al., 2009). Im dimeren Zustand bildet Oxa1p wie YidC eine Insertionspore für naszierende Proteine translatierender Ribosomen (Kohler et al., 2009).

Die erste Proteintransportaktivität wurde durch die Beteiligung von Oxa1p am Transport von pCoxII (Untereinheit der Cytochrom-Oxidase) und preSu9 (Untereinheit der F_OF_1-ATPase) entdeckt, wobei Oxa1p am Export des jeweiligen N-Terminus in den Intermembranraum beteiligt ist (Hell et al., 1997; Luirink et al., 2001; Stuart, 2002). Im Allgemeinen ist Oxa1p an der Insertion und Assemblierung von sowohl Kern- als auch Mitochondrien-kodierten Proteinen in einem Sec- und SRP-unabhängigen Weg beteiligt (Yi und Dalbey, 2005), da in Mitochondrien weder Homologe der Sec-Translokase noch des SRP-Weges gefunden werden konnten (Pohlschröder et al., 2005). Bei der co-translationalen Insertion von Mitochondrien-kodierten Proteinen interagiert Oxa1p mit den naszierenden Ketten der Substrate und zusätzlich auch mittels seines C-Terminus direkt mit Ribosomen (Hell et al., 1998; Hell et al., 2001; Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003). Die Integration von Oxa1p erfolgt durch Oxa1p selbst (Hell et al., 1998).

Auch in Mitochondrien wurde ein zweites Homologes der Alb3/Oxa1p/YidC-Familie entdeckt. In *S. cerevisiae* konnte Cox18 identifiziert werden und in *Neurospora crassa* Oxa2p (Souza et al., 2000; Funes et al., 2004). Beide Vertreter sind an der Biogenese des Cytochrom *c*-Oxidase-Komplexes beteiligt (Saracco und Fox, 2002; Funes et al., 2004).

4.3 Slr1471p aus *Synechocystis sp.* PCC 6803

Das Alb3/Oxa1/YidC-Homologe im Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC 6803 wird durch das Gen *slr1471* kodiert und ist auch nach diesem Slr1471p benannt (Spence et al., 2004). Da das Protein essentiell für das Cyanobakterium zu sein scheint, konnte keine vollständige Knock-Out-Mutante generiert werden. Spence et al. (2004) untersuchten daher eine partiell segregierte Knock-Out-Mutante und konnten eine Beteiligung von Slr1471p (SynOxa1p) an der Zellteilung und der Membranbiogenese feststellen.

Eine ursprünglich zur Untersuchung der Lokalisation von SynOxa1p erstellte Fusionsmutante, in der GFP (grün fluoreszierendes Protein) an den C-Terminus von Slr1471p fusioniert wurde, ist lichtsensitiv. Dies ist der Fall, da das Redoxpotential der Chinone Q_A und Q_B der Reaktionszentren verändert ist, was zur Photoinhibition des PSII führt (Ossenbühl et al., 2006). Mit Hilfe dieser Mutante konnte die Beteiligung von SynOxa1p an der Integration von D1 in die photosynthetische Membran gezeigt werden, da in der GFP-Fusionsmutante das D1-Vorläufermolekül pD1 akkumulierte. Des Weiteren konnte mittels Co-Immunopräzipitation eine Interaktion von D1 mit SynOxa1p nachgewiesen werden, während Slr1471p-GFP nur mit pD1 interagierte. In späteren Experimenten konnte die Beteiligung von Slr1471p an der co-translationalen Integration von D1 über eine direkte Interaktion nachgewiesen werden (Sikorski, 2008).

Lokalisiert werden konnte SynOxa1p in der Cytoplasmamembran, nicht aber in der Thylakoidmembran (Gathmann et al., 2008). Dies korreliert mit der Initiation der PSII-Biogenese in *Synechocystis* in der Cytoplasmamembran (Zak et al., 2001).

Es handelt sich bei SynOxa1p also um ein Cytoplasmamembran-gebundenes Chaperon, das an der korrekten Integration, Faltung und Assemblierung von D1 beteiligt ist (Ossenbühl et al., 2006).

4.4 Alb3.1p und Alb3.2p aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Als erstes Alb3-Homologes in der Grünalge *C. reinhardtii* wurde Alb3.1p als 60 kDa großes Thylakoidmembran-lokalisiertes Protein identifiziert, das an ca. 600 bis 700 kDa große Komplexe assoziiert (Bellafiore et al., 2002). Bei diesen Komplexen könnte Alb3.1p mit cpFtsY und LHCP bei dessen Integration interagieren oder es könnte assoziert an die Sec-Translokase vorliegen. Die Alb3.1p-Deletionsmutante *ac29* zeigt

eine Reduktion der Chlorophyllmenge auf ca. 30 %, eine Verringerung der LHCPs von PSI und PSII auf 5 bis 10 % und die PSII-Akkumulation ist gestört, während die anderen Photosynthesekomplexe nicht beeinflusst sind (Bellafiore et al., 2002). Die Störung der PSII-Anreicherung ist auf eine Reduktion der PSII-Reaktionszentrumsproteine auf 50 % verglichen zum WT zurückzuführen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Alb3.1p sowohl an der post-translationalen Integration der Kern-kodierten LHC-Proteine über den cpSRP-Weg als auch an der Integration von D1 in das PSII beteiligt ist (Bellafiore et al., 2002; Ossenbühl. et al., 2004).

Das zweite Homologe Alb3.2p besitzt eine höhere Sequenzähnlichkeit zu Alb3p aus *A. thaliana* als zu Alb3.1p (Göhre et al., 2006). Es konnte in 600 bis 700 kDa großen Komplexen zusammen mit Alb3.1p nachgewiesen werden, was auf evtl. gemeinsame überlappende Funktionen schließen lässt. Zusätzlich konnte es in hochmolekularen Komplexen (> 1 MDa) der Stromathylakoidmembran nachgewiesen werden, wobei es nicht mit Polysomen assoziiert, also vermutlich nicht an co-translationalen Prozessen beteiligt ist (Piekenhayn, 2008). Zusätzlich zur Assoziation an Alb3.1p konnte eine direkte Interaktion von Alb3.2p mit den PSII-Kernproteinen D1 und D2 und auch mit LHCPs und PsaA nachgewiesen werden (Göhre et al., 2006). Alb3.2p hat offenbar essentielle Funktionen, da auch unter heterotrophen Bedingungen keine Knock-Out-Mutante gefunden werden konnte (Göhre et al., 2006). Eine mittels RNAi hergestellte Knock-Down-Mutante, in der die Alb3.2p-Menge auf 25 bis 50 % der WT-Menge reduziert vorliegt, sind PSI- und PSII-Untereinheiten reduziert. Währenddessen sind der Cytochrom b_6f-Komplex und die ATP-Synthase nicht beeinträchtigt. Dies deutet auf eine Funktion von Alb3.2p bei der Assemblierung der Photosysteme hin, für die auch eine Kooperation mit Alb3.1p nicht ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich wird eine Beteiligung von Alb3.2p an der LHCP-PSII-Superkomplexbildung vermutet. Phänotypisch konnten in der RNAi-Mutante strukturelle Veränderungen der Zelle erkannt werden. So führte die Vergrößerung der Vakuole zum Zelltod. Der genaue Grund dafür ist nicht klar, jedoch könnte die Interaktion von Alb3.2p mit VIPP1 („vesicle-inducing protein“), das am Lipidtransfer und damit am Aufbau der Thylakoidmembran beteiligt ist, eine Erklärung liefern (Göhre et al., 2006). Dadurch besteht auch eine mögliche direkte Beteiligung von Alb3.2p am Aufbau der

Thylakoidmembran. Wie auch für Alb3p aus *A. thaliana* kann für Alb3.2p eine essentielle Rolle bei der Strukturerhaltung von Chloroplasten angenommen werden.

4.5 Alb3p und Alb4p aus *Arabidopsis thaliana*

In einer Studie, in der das „Ac/Ds transposon-tagging"-System aus Mais in *A. thaliana* etabliert werden sollte, wurde eine albinotische Mutante etabliert, die später als *albino3*-Mutante charakterisiert wurde (Long et al., 1993; Sundberg et al., 1997). Die rezessive Mutation zeigt im homozygoten Zustand einen stark reduzierten Chlorophyllgehalt (5 % verglichen mit dem WT) und eine stark reduzierte Thylakoidmembran-Struktur, bei der Grana-Strukturen fast vollständig fehlen. Die Mutante ist ohne externe Kohlenstoffquelle nicht lebensfähig und wächst nur selten über das 4-Blatt-Stadium hinaus (Sundberg et al., 1997). Auch die chloroplastidäre Lokalisation von Alb3p konnte nachgewiesen werden. Dies lässt zusammenfassend auf eine Funktion bei der Chloroplasten-Biogenese schließen. Durch Sequenzvergleich und mittels Komplementationsversuchen konnte gezeigt werden, dass Alb3p ein Homologes von YidC ist (Sundberg et al., 1997; Jiang et al., 2002).

In *in vitro*-Experimenten konnte mit Hilfe eines Antikörpers gegen Alb3p die cpSRP-abhängige Integration von LHCPs (Lhcb1) blockiert werden (Moore et al., 2000). Auch für Lhcb4.1 und Lhcb5 konnte eine Alb3p-abhängige Integration direkt nachgewiesen werden (Woolhead et al., 2001). Alb3p ist auch essentiell für den alternativen cpSRP-Weg nötig, da cpSRP43 direkt mit Alb3p interagieren kann und LHCPs auf diese Weise auch ohne cpSRP54 und cpFtsY in die Thylakoidmembran integrieren können (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007; Falk et al., 2010). Es konnte also eine Funktion von Alb3p in der Sec-unabhängigen Integration von LHCPs gezeigt werden (Moore et al., 2003). Alb3p interagiert jedoch direkt mit der cpSec-Translokase, was die Annahme zulässt, dass auch eine Kooperation der beiden Proteine bei Integration und Assemblierung möglich ist (Klostermann et al., 2002; Moore et al., 2003; Pasch et al., 2005; Schünemann, 2007). So sind für die co-translationale Integration des PSII-Reaktionszentrumsproteins D1 cpSRP54, cpSecY und Alb3p nötig, wobei vermutet wird, dass Alb3p bei der Assemblierung von D1 in das Photosystem nötig ist (Nilsson et al., 1999; Zhang et al., 2001; Ossenbühl et al., 2004; Schünemann et al., 2007).

Der starke Phänotyp der *albino3*-Mutante lässt sich vermutlich aber nicht mit fehlender LHCP-Integration und verminderter D1-Assemblierung erklären, weswegen eine Beteiligung von Alb3p an der Chloroplasten-Biogenese vermutet wird (Sundberg et al., 1997).

Auch in *A. thaliana* wurde ein zweites Homologes der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie entdeckt, das zunächst als 110 kDa großes Protein namens ARTEMIS in der inneren Hüllmembran beschrieben wurde, das aus einer N-terminalen Rezeptorkinase-ähnlichen Domäne, einer zentralen ATP/GTP-bindenden Domäne und einer C-terminalen Alb3/Oxa1/YidC-ähnlichen Domäne (Fulgosi et al., 2002; Funes et al., 2004). ARTEMIS sollte an der Zell- und Chloroplastenteilung beteiligt sein. In einer späteren Studie konnte ARTEMIS jedoch nicht mehr nachgewiesen werden, sondern nur noch das durch den C-Terminus von ARTEMIS kodierte Alb3-Homologes, das als 55 kDa großes Alb4-Protein charakterisiert wurde und in der Thylakoidmembran lokalisiert ist (Gerdes et al., 2006). Eine Reduktion des Alb4p-Levels auf ca. 90 % des WT-Niveaus in einer Knock-Down-Mutante zeigte keinen sichtbaren Phänotyp. Allerdings ist eine Veränderung der Chloroplasten- und Thylakoidmembran-Struktur zu beobachten. So erscheinen die Plastiden vergrößert und die Grana-Stapel verkleinert. Mit Hilfe einer Knock-Out-Mutante konnte die Funktion von Alb4p näher beschrieben werden (Benz et al., 2009). Der Verlust von Alb4p führte zu einer Verringerung der Wachstumsrate, einer leicht veränderten Thylakoidmembran-Struktur und zu einer verminderten ATP-Synthese-Kapazität. Es konnte eine direkte Interaktion von Alb4p mit der $CF_1\beta$- und der CF_OII-Untereinheit der ATP-Synthase festgestellt werden. Ebenso konnte in Blue Native-Analysen gezeigt werden, dass Alb4p mit der ATP-Synthase assoziiert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Alb4p im Gegensatz zu Alb3p die Assemblierung und Stabilisierung des ATP-Synthase-Komplexes unterstützt.

Insgesamt konnten in *A. thaliana* sechs Gene identifiziert werden, die für Alb3/Oxa1/YidC-Homologe kodieren (Yen et al., 2001; Luirink et al., 2001; Zhang et al., 2009). Neben den chloroplastidären Alb3p und Alb4p und den mitochondrialen Oxa1p und Oxa2p/Cox18, sind noch Sequenzen für je ein weiteres chloroplastidäres bzw. mitochondriales Homologes bekannt. Die Funktion dieser Proteine ist aber noch gänzlich unbekannt.

II. Problemstellung

Im Laufe der Evolution entstanden aus frei lebenden Cyanobakterien durch Endosymbiose Chloroplasten. In diese werden Proteine, die aufgrund des Gentransfers vom Chloroplasten in den Kern im Cytoplasma expremiert werden, mit Hilfe des TOC- und TIC-Komplexes bzw. über einen Vesikel-vermittelten Transport gebracht. Da manche Proteine weiter ins Thylakoidlumen bzw. in die Thylakoidmembran transportiert werden müssen, haben sich vier Transportwege entwickelt. Dabei werden über den cpTat- und den cpSec-Weg Proteine ins Lumen transloziert, während durch spontane Insertion oder über den cpSRP-Weg Kern-kodierte Proteine in die Membran inseriert werden.

An der Insertion von Proteinen in biologische Membranen sind in Plastiden, Bakterien und Archaeen Mitglieder der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie beteiligt. In der Thylakoidmembran handelt es sich dabei um Alb3p und Alb4p. Anhand der *albino3*-Mutante in *A. thaliana* und anschließender Untersuchungen des kodierten Proteins Alb3p konnte dessen Beteiligung an der cpSRP-vermittelten Integration von LHC-Proteinen gezeigt werden (Sundberg et al., 1997; Moore et al., 2000; Woolhead et al., 2001). In *C. reinhardtii* konnte für das Homologe Alb3.1p eine Beteiligung an der Integration und Assemblierung des PSII-Reaktionszentrumsproteins D1 in das PSII nachgewiesen werden (Ossenbühl et al., 2004). Da mit D2, CP43, PSI-A und CF_OIII auch weitere Plastiden-kodierte Proteine mit Alb3p interagieren, kann auch hier eine Beteiligung von Alb3p an der Integration und Assemblierung angenommen werden (Pasch et al., 2005).

Die beschriebenen Funktionen von Alb3p erklären jedoch nicht, warum die Knock-Out-Mutante *albino3* in *A. thaliana* einen so schwerwiegenden Phänotyp aufweist (Sundberg et al., 1997). So erreichen *albino3*-Pflanzen bei autotrophen Wachstumsbedingungen nur das Keimlingsstadium und wachsen auch bei Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium nur selten über das 4-Blatt-Stadium hinaus. Dabei besitzen sie einen sterilen Phänotyp. Daher wird vermutet, dass Alb3p auch an anderen Prozessen beteiligt ist.

In diesem Zusammenhang sollten in dieser Arbeit T-DNA-Insertionsmutanten von *CpFtsY* aus dem cpSRP-Transportweg und *Hcf106* aus dem cpTat-Transportweg in *A. thaliana* etabliert und charakterisiert werden und anschließend zusammen mit einer bereits beschriebenen cpSRP54-Mutante (*ffc*$^-$; Amin et al., 1999) mit der *albino3*-

Mutante verglichen werden, um möglicherweise klären zu können, ob der schwerwiegende Phänotyp der Alb3p-Knock-Out-Mutante auf spezifische Aufgaben von Alb3p zurückzuführen ist oder ob die Thylakoidmembran als funktionelle Einheit einen Einfluss auf die Pflanzenentwicklung hat. Des Weiteren sollte eine T-DNA-Insertionsmutante der Phytoensynthase, dem zentralen Enzym der Carotinoid-Biosynthese, etabliert werden, da in *Synechocystis* ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Alb3-Homologen Slr1471p und der Assemblierung von Carotinoiden in die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran vermutet wurde (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung).

Tzvetkova-Chevolleau et al. (2007) erwähnen in ihrer Veröffentlichung über eine andere T-DNA-Insertionsmutante von *CpFtsY*, dass vermutlich aufgrund von vermindertem oxidativem Stress die *cpftsy*-Mutante WT-ähnliche Thylakoidmembran-Ultrastrukturen zeigt, wenn sie bei wenig Licht angezogen wurde. Daher sollten sowohl WT als auch die etablierten Knock-Out-Mutanten von *CpFtsY* und *Hcf106* sowie die *albino3*-Mutante auch bei Wachstum unter Schwachlichtbedingungen untersucht werden. Dabei sollten sowohl die makroskopischen als auch die mittels TEM-Aufnahmen sichtbaren Phänotypen festgehalten und mittels Chlorophyll- und Carotinoidgehalt-Bestimmungen näher beschrieben werden. Protein-biochemisch sollten die Zusammensetzung der Thylakoidmembran-Komplexe mittels BN-PAGE und 2D-Gelelkrophorese, sowie SDS-PAGE und Western Blot-Analysen untersucht werden. Des Weiteren sollte die Assemblierung der Komplexe und deren Stabilität sowie sie Stabilität plastidär kodierter Proteine an sich mittels *in vivo*-Markierungsexperimenten mit L-[^{35}S]-Methionin näher untersucht werden.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Verwendete Organismen

1.1.1 Bakterien-Stämme

Escherichia 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).

Agrobakterium tumefaciens:

GV2260	(Deblaere, 1985).

1.1.2 Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana Ökotyp Columbia

T-DNA-Insertionsmutanten:

Salk_020680	(The Salk Institute for Biological studies, San Diego, USA)
Salk_049077	(The Salk Institute for Biological studies, San Diego, USA)
Salk_054288	(The Salk Institute for Biological studies, San Diego, USA)
Sail_816 E11 9	(The Salk Institute for Biological studies, San Diego, USA)

andere Mutanten:

ffc^{-}	(Amin et al., 1999)
albino3	(Sundberg et al., 1997)

1.2 Geräte

Blotter:

Elektroblotter, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Photometer:

Hanna, HI 83141, Hanna Instruments®, USA

Entwicklermaschine:

Cawomat 2000IR, Ernst Christiansen GmbH, Planegg

Filme:

Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig

Phosphorimaging:
- Imaging Plate BAS-IP MS 2040, Fujifilm, Düsseldorf
- FLA-3000, Fujifilm, Düsseldorf
- Verstärkerfolie (Cronex Qanta Detail, Dupont), Sigma-Aldrich, München

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

Gelbearbeitung:
- Agarosegel-Dokumentation: GenFlash, Syngene Bio Imaging, Cambridge (UK)
- Geltrockner: DrygelSr. SLAB Gel Dryer SE1160, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco (USA)
- SDS-Gelanlage: PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M, peqlab, Erlangen
  Ettan DALTtwelve System, Amersham Bioscience, München
- Blue Native Gelanlage: Protean™ II, BioRad, USA
- Schüttler: Rocky, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
- Agarosegel-Elektrophoresekammer, BioRad, USA

Hybridisierungsofen, Biozym, Oldendorf

pH-Meter:
- Lab 850, Schott Instruments, Mainz

Powersupplies:
- EPS 301, amersham pharmacia biotech, München
- Powerpac 300, BioRad, USA
- EPS 3500, Amersham pharmacia biotech, München

Pottermaschine mit Aufsatz, Janke + Kunkel, Staufen

Klimazelle Typ VB8018/S, Vötsch Industrietechnik GmbH, Balingen

Überkopfschüttler:
- Roto-shake Genie, Scientific Industries Inc., USA

Vortex:
- Vortex Genie, Scientific Industries Inc., USA

Thermocycler:
- Doppio, VWR International, Leuven (Belgien)

UV-Stratalinker 1800, Agilent Technologies**,** Waldbronn

Waagen:

SI-2002A, Denver Instruments, Göttingen
R200D, Satorius research, Göttingen

Zellzüchtung:

Brutschränke: 28°C, Heraeus Instruments, Hanau
37°C, Heraeus Instruments, Hanau
Schüttler, CH-4015, INFORS AG, Schweiz
Innova43, New Brunswick Scientific, Edison (USA)
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
Force 7 Tischzentrifuge, Denver Instruments, Göttingen
Biofuge Primo R, Heraeus, Hanau

1.3 Oligonukleotide

Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Name:	**Sequenz und Lokalisation:**	**Verwendung:**
ftsYCompATG	CAAGGATCCATGGCAACTTCTTCTGC +1 bis +17 im Gen At2g45770* **	Klonierung Komplementation
ftsYCompStop	CAAGGATCCTTAAGAGAATATAGCATTCACAAAAGCC +1101 bis +1074 im Gen At2g45770* **	Klonierung Komplementation
ftsY-E8E10-fw	GTCTCCATACTAATTACAGTTTGATGGAGGAG +773 bis +804 im Gen At2g45770*	RT-PCR
ftsY-E8E10-rev	CACACAGCCTCCTCTAGCAG +987 bis +968 im Gen At2g45770*	RT-PCR
GFP Seq	CACCCTCTCCACTGACAGAA +80 bis +60 im GFP-Gen auf pAHDK/pSMGFP4	Sequenzierung
hcf106 CompATG	CAAGGATCCATGGCATGGC +1 bis +11 im Gen At5g52440* **	Klonierung Komplementation
hcf106 CompStop	CAAGGATCCTCAATCTTGCCTGGAG +783 bis +767 im Gen At5g52440* **	Klonierung Komplementation
hcf106- E5E6-fw	ATGATTCACAATCACCAAAAGCTTACACATCC +566 bis +597 im Gen At5g52440*	RT-PCR
hcf106- E5E6-rev	GGTGCTTTCAATCTTGCCTTGGAG +790 bis +767 im Gen At5g52440*	RT-PCR
LB3-Sail	TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATACAC +383 bis +349 auf pDAP101	Genotypisierung Sail-Mutanten
LB-XL	CGATTTCGGAACCACCATCAAACAGG +6330 bis +6305 auf pBIN-pROK2	Genotypisierung Salk-Mutanten
LP PSY	CAAACCACAAGATGTTGTTCTTCCTG +342 bis + 367 im Gen At5g17230*	Genotypisierung und Sequenzierung
LP2	CGTGCGTCTCTGTTTGGTGTTGGAGC +247 bis +272 im Gen At5g52440*	RT-PCR, Sequenzierung und Genotypisierung
LP9E	ATGGCAACTTCTTCTGCTCACTTCTCG +1 bis +27 im Gen At2g45770*	RT-PCR, Sequenzierung und Genotypisierung
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC +205 bis +221 auf pCRII	Sequenzierung
M13 uni	GTAAAACGACGGCCAG +431 bis +446 auf pCRII	Sequenzierung

Oligo-dT(30)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Reverse Transkription
Promotor PSY fw (PstI)	CAACTGCAGGAATACGATTTAGTAAACGACATATATGT TTCG -1413 bis -1381 im Gen At5g1723*** ****	Klonierung Komplementation
Promotor PSY rev	CCACAATTGTTCATTGGGTCTGGATTTAGAG +71 bis +41 im Gen At5g17230*	Klonierung Komplementation
PSY Komp ATG	CAAGGATCCATGTCTTCTTCTGTAGCAG +1 bis +19 im Gen At5g17230* **	Klonierung Komplementation
PSY Komp Stop	CAAGGATCCTCATATCGATAGTCTTGAACTTG +1269 bis +1247 im Gen At5g17230* **	Klonierung Komplementation
RP PSY	GGTTTATTGCAATGGACTGAATGCAACTC +1349 bis +1377 im Gen At5g17230****	Genotypisierung und Sequenzierung
RP PSY E4	GAATATCGACCGGGTATCTAGCAAC +667 bis +643 im Gen At5g17230*	RT-PCR und Genotypisierung
RP PSY E5	CTTCGCCTACGTCTCTGAGTATGTTAG +904 bis +878 im Gen At5g17230*	RT-PCR und Genotypisierung
RP2	CAGTGAACTTGAGGTAATCCTCGGATGTG +755 bis +727 im Gen At5g52440*	RT-PCR, Sequenzierung und Genotypisierung
RP9E	CAAGAGATGTCGTCTTCCCACC +544 bis +523 im Gen At2g45770*	RT-PCR, Sequenzierung und Genotypisierung
Sail-Blot-rev	GTGTAGAGCGTGGAGCCCAG +1150 bis + 1131 auf pDAP101	Sonde für Southern Blot
Sail-LB3inv	GGTGTATCGAGATTGGTTATGAAATTCAGATGC +349 bis +381 auf pDAP101	Sonde für Southern Blot
Salk-Blot-rev	GGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGAACACGG +7104 bis +7075 auf pBIN-pROK2	Sonde für Southern Blot
Salk-LB-XLinv	CCTGTTTGATGGTGGTTCCGAAATCG +6305 bis +6330 auf pBIN-pROK2	Sonde für Southern Blot

* = relativ zum ATG in der jeweiligen cDNA
** = mit *Bam*HI-Schnittstelle
*** = mit *Pst*I-Schnittstelle
**** = relativ zum ATG in der jeweiligen genomischen Sequenz
Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert.

1.4 Plasmide

1.4.1 Vektoren

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren.

Vektoren:	**Verwendung:**	**Eigenschaften:**	**Quelle:**
Tth-730	Marker		Sürig, 1989
pCRII	Klonierung	*lacZ*, T7 Promotor, f1 origin, M13 reverse priming site, M13 forward priming site, KanR, AmpR, pUC origin	Invitrogen
pAHDK	Komplementation	*Hin*dIII-*Eco*RI-Fragment aus psmGFP4 (Davis und Vierstra, 1998) im *Hin*dIII-*Eco*RI- Fragment pMDC123 (Curtis und Grossniklaus, 2003)	D. Köhler, A. Hölzle zur Verfügung gestellt

1.4.2 Generierte Plasmide

Tab. 3: Zusammenfassung der in dieser Arbeit generierten Plasmide.

Plasmide:	Eigenschaften:	Verwendung:	Quelle:
pAHDK-cpFtsY	*Bam*HI-Fragment aus pCRII-cpFtsY ligiert mit dem *Bam*HI-restrigierten pAHDK-Vektor	Komplementation	diese Arbeit
pAHDK-Hcf106	*Bam*HI-Fragment aus pCRII-Hcf106 ligiert mit dem *Bam*HI-restrigierten pAHDK-Vektor	Komplementation	diese Arbeit
pAHDK-PSY	*Bam*HI-Fragment aus pCRII-PSY ligiert mit dem *Bam*HI-restrigierten pAHDK-Vektor	Komplementation	diese Arbeit
pAHDK-PromPSY	*Bam*HI/*Pst*I-Fragment aus pCRII-PromPSY ligiert mit dem *Bam*HI/*Pst*I-restrigierten pAHDK-Vektor	Komplementation	diese Arbeit
pCRII-cpFtsY	cpFtsY-cDNA mit Schnittstellen für *Bam*HI über TA-Überhänge in den pCRII-Vektor kloniert	Klonierung	diese Arbeit
pCRII-Hcf106	Hcf106-cDNA mit Schnittstellen für *Bam*HI über TA-Überhänge in den pCRII-Vektor kloniert	Klonierung	diese Arbeit
pCRII-PSY	PSY-cDNA mit Schnittstellen für *Bam*HI über TA-Überhänge in den pCRII-Vektor kloniert	Klonierung	diese Arbeit
pCRII-PSYProm	PSY-cDNA zusammen mit einem ca. 1,4 kb großen PCR-Produkt der Promotor-Region mit Schnittstellen für *Pst*I u. *Bam*HI über TA-Überhänge in den pCRII-Vektor kloniert	Klonierung	diese Arbeit

1.5 Chemikalien

Aceton	VWR International Normapur, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Bio-budget, Krefeld
ε-Amminocapronsäure	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumacetat (NH_4Ac)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
BASTA®	Bayer, Leverkusen
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, München
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, München
Cycloheximid	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe

Desoxyribonukleosid-5´-triphosphate (dNTPs)	peqlab, Erlangen
β-Dodecylmaltosid (β-DDM)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethanol	VWR International Normapur, Darmstadt
Ficoll	Sigma-Aldrich, München
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid (deionisiert)	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	VWR International, Darmstadt
Hefeextrakt	Duchefa, Belgien
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Duchefa, Belgien
Kaliumacetat (KAc)	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2x6H_2O$)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methionin	Sigma-Aldrich, München
Mikroagar	Duchefa, Belgien
Murashige & Skoog Medium	Duchefa, Belgien
Natriumacetat (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Natriumbicarbonat (Na_2CO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, München
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorit (NaOCl, 12 % Cl)	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	Sigma-Aldrich, München
Plantagar	Duchefa, Belgien
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylen-(9,10)p-t-octylphenol (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, BSA)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	VWR International, Darmstadt
Salzsäure (32% HCl)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Roth, Karlsruhe

Silwet L-77	Lehle Seeds, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypton	Duchefa, Belgien
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma-Aldrich, München
5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galaktopyranosid (X-Gal)	Duchefa, Belgien
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, München

1.6 Radiochemikalien

α-[^{32}P]-CTP: Aktivität: 0,37 MBq/µl (10 µCi/µl)
L-[^{35}S]-Methionin: Aktivität: 0,37 MBq/µl (10 µCi/µl)
Die Radiochemikalien wurden von Hartmann-Analytic (Braunschweig) bezogen.

1.7 Enzyme und Kits

*Bam*HI	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DNaseI	Promega, Mannheim
*Eco*RI	MBI Fermentas, St. Leon Rot
*Eco*RV	MBI Fermentas, St. Leon Rot
FastAP	MBI Fermentas, St. Leon Rot
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, Freiburg
GoTaq Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
*Hin*dIII	MBI Fermentas, St. Leon Rot
*Hin*fI	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, Mannheim
Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit	GE Healthcare, Freiburg
Nukleobond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren
Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Darmstadt
Proteinaseinhibitor	Roche, Mannheim
*Pst*I	MBI Fermentas, St. Leon Rot
PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit	Invitrogen, Darmstadt
Rediprime™ II DNA Labeling Kit	GE Healthcare, Freiburg
RNaseA	Invitrogen, Darmstadt
RNAsin® Plus RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
Spectrum™ Plant Total RNA Kit	Sigma-Aldrich, München
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon Rot
TA Cloning Kit	Invitrogen, Darmstadt

1.8 Antikörper

Primärantikörper:
α-Alb3p; polyklonales Antiserum, aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:1000; von Prof. Dr. D. Schünemann zur Verfügung gestellt)
α-ATPase subunit beta; polyklonales Antiserum aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-CP47 aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:2500; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-cpFtsY aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:2000; von Prof. Dr. R. Henry zur Verfügung gestellt)
α-cpTatC (*Arabidopsis thaliana*) aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Prof. Dr. K. Cline zur Verfügung gestellt)
α-D1 aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-D2 aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-hcf106 (*Zea mays*) aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Prof. Dr. K. Cline zur Verfügung gestellt)
α-LHCII; polyklonal (total IgG), aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:10000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-PSI-A aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)
α-PSI-D aus Kaninchen (verwendete Verdünnung: 1:5000; von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt)

Sekundärantikörper:
α-Kaninchen-IgG aus Esel; konjugiert mit Meerrettichperoxidase (verwendete Verdünnung: 1:2500 bis 1:10000; GE Healthcare, Großbritannien)

2. Methoden

Alle nicht näher erläuterten Standardmethoden wurden nach Sambrook et al., 1989, durchgeführt.

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Kultur und Anzucht von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Festmedium (LB-Medium mit 1,5 % Agar) bei 37°C. Flüssigmedium-Schüttelkulturen wurden in 2YT-Medium bei 220 rpm und 37°C ü.N. angezogen. Durch Zugabe von Antibiotika zum Medium konnte auf entsprechende Resistenzen selektioniert werden.

LB-Medium:	2YT-Medium:
1,0 % NaCl	0,5 % NaCl
1,0 % Trypton	1,6 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt	1,0 % Hefeextrakt

2.1.2 Transformation von *E. coli*

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

2.1.3 Anzucht und Kultur von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte auf LB-Festmedium bei 28°C für 2 d. Flüssigkulturen, die zur Transformation von *A. thaliana* verwendet wurden, wurden in 2YT-Medium zuerst als Vorkultur und anschließend in 200 ml Hauptkulturen bei 28°C und 220 rpm im Schüttler angezogen. Dabei wurde mittels Zugabe von Antibiotika auf das eingebrachte Plasmid (Kanamycin: 30 mg/ml) und das Helferplasmid (Carbenicillin: 100 mg/ml) selektioniert.

2.1.4 Transformation von *A. tumefaciens*

Kompetente Agrobakterien vom Stamm GV2260 (Deblaere et al., 1985) wurden mit 1 µg des Plasmids vermischt. Anschließend wurden die Zellen je 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert und nach Zugabe von 1 ml 2YT-Medium 4 h bei 28 °C und 220 rpm geschüttelt. Zum Schluss wurden die Zellen auf LB-Festmedium mit Antibiotika ausplattiert.

2.2 *Arabidopsis thaliana*-Methoden

2.2.1 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

A. thaliana-Samen wurden auf feuchter Aussaaterde angezogen und im 4-Blattstadium vereinzelt. Die Anzucht erfolgte in einer Klimazelle VB8018 (Vötsch Industrietechnik, Balingen) bei 21 °C bis 23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 80 % unter Langtagbedingungen in einem Rhythmus von 18 h Tag (~120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) und 8 h Nacht.

Aussaaterde:
80 % Anzuchterde „ökohum“
20 % Vermiculite
0,5 g/l Osmocote Extract Mini Dünger

2.2.2 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen und Anzucht auf Agar

Um T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana* auch heterotroph anziehen zu können, wurden die Samen einer Oberflächensterilisation unterzogen. 40 bis 60 Samen wurden

in 10 ml Flüssigkeit im Rotationsschüttler inkubiert und anschließend abzentrifugiert (TS 5.1-500 Rotor, 2800 rpm, 2 min, RT). Zuerst wurden die Samen in H_2O_{dd} 5 min geschüttelt, gefolgt von 5 min in Isopropanol und einem Waschschritt mit H_2O_{dd}. Danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation in Bleichlösung, gefolgt von 3 weiteren H_2O_{dd}-Waschschritten. Anschließend wurden die Samen mit Topagar (0,1 % (w/v) Mikroagar) auf MS+S-Medium ausgebracht. Die Wachstumsbedingungen unterscheiden sich nicht von III.2.2.1, jedoch wurden lichtsensitive Pflanzen statt bei einer Lichtintensität von ~120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bei 50 bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen.

MS+S-Medium:		Bleichlösung:	
0,44 %	Murashige & Skoog	5 %	(v/v) Natriumhypochlorid
3 %	Saccharose	1 %	Triton X-100
1 %	Plantagar		

2.2.3 Transformation von *A. thaliana* mittels „floral dip“

Die Übertragung von T-DNA-Konstrukten auf entsprechende *A. thaliana*-Pflanzen erfolgte mittels der „floral dip“-Methode (Clough and Bent, 1998).
Dazu wurden Töpfe mit je drei bis fünf Pflanzen angezogen, deren Primärinfloreszenzen bei einer Höhe von 2 bis 10 cm abgeschnitten wurden. Die Pflanzen wurden dann bis zu Bildung der Sekundärinfloreszenzen weiter gezogen. Für die Transformation wurden zwei vorher angezogene *Agrobakterium*-Hauptkulturen (III.2.1.3) mittels Zentrifugation geerntet (Rotor JA10.5, 3000 g, 20 min, RT). Die Zellpellets wurden anschließend in Infiltrationsmedium zu einer $OD_{600nm} \geq 0,8$ aufgenommen. Nach dem Entfernen bereits offener Blüten, wurden die Pflanzen kopfüber 3 bis 5 sec in die Zellsuspension gehalten, anschließend liegend ü.N. bei gedämpfter Beleuchtung gehalten und dann unter Langtagbedingungen weiter kultiviert. Nach 3 bis 4 Tagen wurde die Transformation wiederholt und die Pflanzen anschließend bis zur Samenreife kultiviert. Die Selektion positiver Transformanden erfolgte anschließend mit Hilfe des Herbizids BASTA® nach Herstellerangaben.

Infiltrationsmedium:	
5 %	Saccharose
0,05 %	Silwet L-77
pH 6-8	

2.2.4 Chlorophyll- und Carotinoid-Bestimmung (Arnon, 1949; Lichtenthaler und Buschmann, 2001)

Zur Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes verschiedener *A. thaliana*-Mutanten wurde Blattmaterial frisch abgewogen und mittels Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Das gefrorene Pflanzenpulver wurde in 80 % Aceton aufgenommen und gevortext. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert, der Überstand gesammelt und das Pellet erneut in 80 % Aceton resuspendiert. Diese Extraktion wurde vier- bis fünfmal wiederholt und der gesammelte Überstand auf 10 ml aufgefüllt. Anschließend

wurden die optischen Dichten bei 470 nm, 647 nm, 652 nm und 663 nm photometrisch ermittelt und mit folgenden Formeln die Chlorophyll- bzw. Carotinoid-Konzentration ermittelt.

$$c(Chl_a) = 12,25 \cdot OD_{663nm} - 2,79 \cdot OD_{647nm} = [\mu g / ml]$$
$$c(Chl_b) = 21,50 \cdot OD_{647nm} - 5,10 \cdot OD_{663nm} = [\mu g / ml]$$
$$c(Chl_{ges}) = OD_{652nm} / 34,5 = [\mu g / ml]$$
$$c(Carotenoide) = (1000 \cdot OD_{470nm} - 1,82 \cdot c(Chl_a) - 85,02 \cdot c(Chl_b)) / 198 = [\mu g / ml]$$

2.3 Nukleinsäure-Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Genotypisierung wurde mithilfe der GoTaq Flexi DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) eine PCR in einem Thermocycler (Doppio, VWR International, Leuven) durchgeführt. Dabei wurden folgende Bedingungen verwendet:

PCR-Ansatz:

10 ng	Matrizen-DNA
10 µl	5x GoTaq Flexi Puffer
3 µl	$MgCl_2$ (25 mM)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	Primer 1 (50 µM)
0,2 µl	Primer 2 (50 µM)
1 u	GoTaq DNA-Polymerase
ad 25 µl	H_2O_{dd}

PCR-Zyklus:

Denaturierung	2 min	94 °C
Denaturierung*	1 min	94 °C
Annealing*	1 min	60 °C
Elongation*	1:30 min	72 °C
Elongation	3 min	72 °C

* Der Zyklus wurde 35x durchgeführt.

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die Klonierung von Plasmiden wurden die Primestar HS DNA Polymerase (Lonza, Potsdam) bzw. zur Verwendung des TA Cloning Kits (Invitrogen, Darmsatdt) die Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Darmsatdt) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.2 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Bei der Klonierung von Plasmiden und für die Southern Blot-Analyse wurden Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon Rot) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit entsprechend hydrolysierter Vektor-DNA (im Verhältnis von 5:1) bzw. mit Hilfe des TA Cloning® Kits (Invitrogen, Darmstadt) erfolgte durch die T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben.

2.3.4 DNA-Fällungen

Zur Aufreinigung wurde DNA entweder mit 1,6 Volumen 5 M Ammoniumacetat-Lösung und 8 Volumen 100 % Ethanol oder mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100 % Ethanol für 15 min bei -80 °C gefällt. Die mittels Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4 °C) pelletierte DNA wurde anschließend mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut pelletiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C) und in einem entsprechenden Volumen H_2O_{dd} aufgenommen.

2.3.5 Plasmid-Präparation

Zur Plasmid-Vermehrung in *E. coli* wurden 2 ml 2YT-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und ü.N. bei 37 °C im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mittels alkalischer Lyse (verändert nach Birnboim und Doyl, 1979; Sambrook et al. 1989) oder mittels Säulenaufreinigung (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit; Invitrogen, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Um größere Mengen Plasmid zu erhalten, wurde eine 200 ml-Flüssigkultur angeimpft, ü.N. im Schüttler bei 37 °C inkubiert und die Plasmid-DNA anschließend mit Hilfe des Nukleobond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren) laut Herstellerangaben aufgereinigt.

2.3.6 Präparation von DNA aus *A. thaliana*

Zur Genotypisierung wurde Pflanzenmaterial von *A. thaliana*-T-DNA-Insertions-mutanten nach Edwards et al. (1991) aufgearbeitet. Rosetten-Blätter wurden mittels Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen, anschließend in 400 µl Extraktionspuffer aufgenommen und gevortext. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, RT) wurden 300 µl Überstand mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und 2 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, RT) wurde das DNA-Pellet in 350 µl H_2O_{dd} aufgenommen. Nach erneuter Isoproanol-Fällung wurde die DNA getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.
Die für die Southern-Hybridisierung benötigte genomische DNA wurde mittels Nucleon™ PhytoPure™ Genomic DNA Extraction Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Extraktionspuffer:	
200 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
250 mM	NaCl
25 mM	EDTA
0,5 %	SDS

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

2.3.7 Präparation von RNA aus *A. thaliana*

Zur Präparation von RNA aus *A. thaliana* wurde Blattmaterial mittels Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Die anschließende Extraktion erfolgte mittels Spectrum™ Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, München) nach Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.3.8 Reverse Transkription

Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurden zunächst 7 µg isolierte RNA mit 70 u DNaseI 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Natriumacetat gefällt. Die gereinigte RNA wurde in 15 µl H_2O_{dd} aufgenommen, mit 2 µl oligo-dT-Primer (100 µM) versetzt und anschließend je 5 min bei 70 °C und auf Eis inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte dann mit Hilfe der M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde durch Zugabe von 5 µl 1 M NaOH die RNA abgebaut, der Ansatz mit 5 µl 1 M HCl neutralisiert und die cDNA mittels GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben gereinigt. Die gewonnene cDNA wurde in 10 µ-Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.3.9 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentration (Sambrook et al., 1989)

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 44 µg/ml. Die entsprechenden Konzentrationen konnten dann wie folgt berechnet werden:

$$c(DNA) = 50\mu g / ml \cdot OD_{260nm} \cdot Verdünnungsfaktor = [\mu g / ml]$$
$$c(RNA) = 44\mu g / ml \cdot OD_{260nm} \cdot Verdünnungsfaktor = [\mu g / ml]$$

2.3.10 DNA-Sequenzierung und Auswertung von Nukleotidsequenzen

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte im Auftrag durch die Firma 4baselab GmbH (Reutlingen). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte durch geeignete Software (Clonewin, ClustalX) und mit Hilfe der Datenbanken von NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/), des Salk Instituts (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, La Jolla; http://signal.salk.edu/) und der Carnegie Institution for Science, Department of Plant Biology (http://arabidopsis.org/).

2.3.11 Native Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR oder den Restriktionsschnitt kontrollieren zu können, wurden die DNA-Fragmente auf nativen Agarosegelen (1 % Agarose in 1x TAE-Puffer) der Größe nach aufgetrennt. Die angelegte Spannung betrug zwischen 80 und 150 V und die Dauer der Gelelektrophorese 45 min bis 1,5 h. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 5x 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; Süring, 1989). Die im Gel aufgetrennten DNA-Banden wurden durch im Gel enthaltenes Ethidiumbromid (1 µg/ml Agarosegel) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

1x TAE-Puffer:		5x Probenpuffer:	
40 mM	Tris/Acetat, pH 8,0	30 % (v/v)	Glycerin
2 mM	EDTA	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
		0,1 % (w/v)	Xylencyanol

2.3.12 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben.

2.3.13 Radioaktive Markierung von DNA

Mit Hilfe des Rediprime™ II DNA Labeling Kit (GE Healthcare, Freiburg, beruhend auf Feinberg und Vogelstein, 1983) wurden nach Herstellerangaben Sonden für die Southern-Hybridisierung hergestellt. Diese wurden anschließend über eine Sephadex G50-Säule aufgereinigt, um nicht eingebautes α-[^{32}P]-CTP zu entfernen.

2.3.14 Southern-Hybridisierung (verändert nach Southern, 1975)

Ein natives Agarosegel wurde nach der Elektrophorese für 20 min in 0,25 M HCl und anschließend für 20 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Danach erfolgte ein Kapillartransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Optitran BA-S 85 Reinforced NC; Schleicher & Schüll, Dassel) mit 0,4 M NaOH für mind. 3 h. Zur Fixierung der DNA wurde die Membran nach dem Transfer für 1 min mit UV-Licht (254 nm; 120 mJ/cm^2) bestrahlt (UV-Stratalinker 1800; Agilent Technologies**,** Waldbronn).
Nach Vorhybridisierung in Hybridisierungslösung für 1 h bei 37 °C erfolgte nach Zugabe der Hitze-denaturierten Sonde (III.2.3.13) die Hybridisierung für mind. 16 h bei 37 °C. Die nicht gebundenen Sondenmoleküle wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Waschlösung (je 15 min, ≥ 37 °C) entfernt. Die in Folie eingeschweißte Membran wurde mit einer Imaging Plate (BAS-IP MS 2040, Fujifilm, Düsseldorf) und Verstärkerfolie (Cronex Qanta Detail, Dupont, Sigma-Aldrich, München) in einer Expositionskassette 2 bis 14 d exponiert. Die Auswertung der Imaging Plate erfolgte mittels FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf) und „BAS-Reader“-Software.

20x SSC:		Hybridisierungslösung:	
3 M	NaCl	5x	SSC
0,3 M	Natriumcitrat	5x	Denhardts
		50 %	Formamid
Waschlösung:		0,2 %	SDS
0,1x	SSC	0,2 mg/ml	hitzedenaturierte
0,2 %	SDS		Heringssperma-DNA

50x Denhardts:
1 % Ficoll
1 % Polyvinylpyrrolidon
1 % BSA

2.4 Protein-biochemische Methoden

2.4.1 Isolierung von Membranproteinen aus *A. thaliana*

Hierfür wurden 50 bis 100 mg frisches Blattmaterial mit 100 µl TMK-Puffer vermengt und mittels einer Pottermaschine (Janke + Kunkel, Staufen) durch dreimal 10 sec Pottern aufgeschlossen. Diese Mischung wurde anschließend durch 3 Lagen Baumwolle filtriert (6000 rpm, 3 min, 4 °C) und die Membranen anschließend pelletiert (6000 rpm, 5 min, 4 °C). Als Waschschritt wurde das Membranpellet anschließend zweimal in 300 µl TMK-Puffer aufgenommen und wiederum jeweils bei 14000 rpm (2 min, 4 °C) pelletiert. Das gewaschene Pellet wurde nun in 60 bis 80 µl ACA-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 6 bis 8 µl 10 % β-Dodecylmaltosid (β-DDM) für 10 min auf Eis solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Die im Überstand enthaltenen Membranproteine konnten anschließend für Analysen mittels SDS- (III.2.4.3) bzw. BN/SDS-PAGE (III.2.4.4) verwendet werden.

ACA-Puffer:
750 mM ε-Aminocapronsäure
50 mM Bis/Tris, pH 7 (HCl)
0,5 mM EDTA pH 7

TMK-Puffer:
10 mM Tris/HCl, pH 6,8
10 mM $MgCl_2$
20 mM KCl

2.4.2 *In vivo*-Proteinmarkierung mit L-[^{35}S]-Methionin

Um chloroplastidäre Proteine *in vivo* zu markieren, wurden je ca. 50 mg Blattmaterial zunächst 45 min in CHI-Lösung bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} inkubiert, um die nukleäre Translation im Cytoplasma zu unterbinden. Damit die Stabilität von Proteinen und ihren Komplexen untersucht werden konnte, wurden verschiedene Ansätze verfolgt:

1. 30 min Pulse
2. 90 min Pulse
3. 30 min Pulse/60 min Chase

Für eine Pulse-Inkubation wurde das Blattmaterial in Pulse-Lösung bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} inkubiert, bei einer Chase-Inkubation in Chase-Lösung bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}. Nachdem das Blattmaterial anschließend mit H_2O_{dd} gewaschen wurde, wurden Membranproteine (wie in III.2.4.1 beschrieben) aufgearbeitet und anschließend mittels BN/SDS-PAGE analysiert.

CHI-Lösung:
0,4 % (w/v) Cycloheximid

Pulse-Lösung:
50 % (v/v) CHI-Lösung
125 mM L-[^{35}S]-Methionin

Chase-Lösung:
50 % (v/v) CHI-Lösung
125 mM Methionin

2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; nach Laemmli, 1970)

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). Über ein Trenngel (12,5 % Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 und 4 M Harnstoff in 1x Trenngelpuffer) wurde ein Sammelgel bestehend aus 4 % Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 in 1x Sammelgelpuffer gegossen. Die Proben wurden auf 1x SDS-Ladepuffer eingestellt, 15 min bei 37 °C denaturiert und anschließend aufgetragen. Als Größenstandards dienten PageRuler Prestained Protein Marker (Fragmentgrößen (in kDa): 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 11; MBI Fermentas, St. Leon Rot). Die Elektrophorese lief ü.N. (ca. 15 h) bei 6 mA in 1x Laufpuffer.
Radioaktive Gele wurden anschließend 60 min in Fixierlösung I und 30 min in Fixierlösung II bei RT unter Schütteln inkubiert, dann unter Vakuum bei 80 °C getrocknet (SLAB Gel Dryer; Drygel Sr) und mit einer Imaging Plate (BAS-IP MS 2040, Fujifilm, Düsseldorf) und Verstärkerfolie (Cronex Qanta Detail, Dupont, Sigma-Aldrich, München) in einer Expositionskassette 1 bis 14 d exponiert. Die Auswertung der Imaging Plate erfolgte mittels FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf) und „BAS-Reader"-Software. Zur Quantifizierung von radioaktiven Signalen wurde „AIDA"-Software verwendet.

1x Trenngelpuffer:
375mM Tris/HCl
pH 8,9

1x Sammelgelpuffer:
125mM Tris/HCl
0,001% Bromphenolblau
pH 6,8

Fixierlösung I:
40% Ethanol
10% Essigsäure

Fixierlösung II:
10% Essigsäure

4x SDS-Ladepuffer
0,04% Bromphenolblau
600mM Tris/HCl, pH 6,8
20% Glycerin
4% SDS
5% ß-Mercaptoethanol

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

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

Um Proteinkomplexe analysieren zu können, wurde die BN-PAGE eingesetzt, mit der Komplexe unter nativen Bedingungen aufgetrennt werden, die dann mittels SDS-PAGE

in einer 2. Dimension in ihre Bestandteile aufgetrennt werden können (Schaegger und von Jagow, 1991).
Die BN-PAGE wurde in einem Gelsystem aus Sammelgel (4 % Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 in 1x BN-Gelpuffer) und einem linearen Gradientengel (4-16 % Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 in 1x BN-Gelpuffer) durchgeführt. Die solubilisierten Proben (III.2.4.1) wurden mit 3 µl BN-Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C und mit blauem 1x Kathodenpuffer im oberen Tank und 1x Anodenpuffer im unteren Tank für ca. 3 h bei 12 bis 15 mA pro Gel (2400 V, 24 W). Bei Erreichen der halben Trennstrecke durch die Coomassie-Front wurde der blaue 1x Kathodenpuffer durch farblosen ersetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in Folien gelegt und bei -20 °C gelagert und anschließend für die 2. Dimension eingesetzt.
Die BN-PAGE-Spuren wurden ausgeschnitten und in Solubilisierungspuffer 20 min bei RT inkubiert. Die so behandelten Gelstreifen wurden anschließend zusammen mit SDS-Größenstandard (auf Whatman-Papier aufgetragen) auf ein diskontinuierliches SDS-Gelsystem bestehend aus einem 4 %-igen Sammelgel und einem 12,5 %-igen Trenngel (siehe III.2.4.3) aufgetragen und mittels Agaroselösung fixiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 15 °C zunächst für 30 min bei 30 mA pro Gel und ü.N. bei 12 bis 25 mA pro Gel in 1x Laufpuffer (III.2.4.3). Die Gele wurden anschließend, wie in III.2.4.3 beschrieben, weiterverarbeitet.

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

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

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

Agaroselösung:
0,5 % (w/v) Agarose
1x Laufpuffer (III.2.4.3)

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

1x Kathodenpuffer (blau):
1x Kathodenpuffer (farblos)
0,2 % Coomassie G250

Solubilisierungspuffer:
2 % (w/v) SDS
66 mM Na_2CO_3
2 % (v/v) β-Mercaptoethanol

2.4.5 Coomassie-Färbung

Nicht radioaktive Gele aus der SDS-PAGE wurden zunächst einer Coomassie-Färbung unterzogen. Dazu wurden die Gele 60 min in Coomassie-Färbelösung bei RT geschüttelt und anschließend dreimal 15 min mit Fixierlösung I und daraufhin 60 min mit Fixierlösung II entfärbt.
Die Lagerung der gefärbten Gele erfolgte in Fixierlösung II bei 4°C.

Coomassie-Färbelösung:
40 % Ethanol
10 % Essigsäure
0,2 % Coomassie R250

2.4.6 Silberfärbung (Blum et al., 1987)

Für eine sensitivere Proteinfärbung wurde im Anschluss an die Coomassie-Färbung (III.2.4.5) gegebenenfalls die sensitivere 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_{dd} gewaschen. Es folgte eine 20 min dauernde Inkubation in 0,2 %-iger Silbernitrat-Lösung, gefolgt von zwei Waschschritten mit H_2O_{dd} für 20 sec. 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_{dd} und 5 min Inkubation in Stopp-Lösung abgebrochen. Nachdem das Gel noch einmal 30 min in H_2O_{dd} gewaschen wurde, konnte es dokumentiert werden.
Die Lagerung der gefärbten Gele erfolgte in Fixierlösung II bei 4°C.

Waschlösung:
30 % Ethanol

Stopp-Lösung:
0,5 % Glycin

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

2.4.5 Western Blot

Nach einer SDS-PAGE (III.2.4.2) wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Elektroblotters (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 1x Transferpuffer im Semi-Dry-Blot-Verfahren (Bjerrum und Säfer-Nielsen, 1986) für 2 h bei RT elektrophoretisch (400 mA) auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman Optitran BA-S 85 Reinforced NC; Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Proteine wurden anschließend durch 5 min Inkubation in Ponceau S-Lösung auf der Membran fixiert (Ponceau-Färbung, Salinovich und Montelar, 1986). Nach dem Entfärben mit 1x TBS und H_2O_{dd} wurde die Membran 1 h bei RT in Block-Lösung inkubiert, um freie Bindestellen abzusättigen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte in der jeweiligen Verdünnung ü.N. unter Schütteln bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min in 1x TBS) wurde die Membran 1 h mit dem HRP-gekoppelten 2. Antikörper in der jeweiligen Verdünnung bei RT geschüttelt. Nach erneut dreimal Waschen (je 10 min in 1x TBS) erfolgte die Detektion durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL, III.2.4.6).

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
1x TBS

Antikörper-Lösungen:
jeweilige Verdünnungen in
1 % Magermilchpulver in 1x TBS

2.4.6 Chemilumineszenz-Detektion (ECL; Durrant 1990; Schneppenheim et al., 1991)

Die gewaschene Membran wurde für 1 min in einer 1:1 Mischung von Lösung I und Lösung II unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Membran dann in eine lichtdurchlässige Folie und anschließend in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie (Cronex Qanta Detail, Dupont, Sigma-Aldrich, München) gelegt wurde, wurden Hyperfilme ECL (Amersham, Braunschweig) für 1 min bis maximal 1 h exponiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte nach Herstellerangaben. Um weitere Antikörper auf der Membran detektieren zu können, wurde nach der ECL-Detektion die Membran 10 min in 1x TBS gewaschen, 10 min in Strip-Lösung I und 20 min in Strip-Lösung II geschüttelt. Nach einem weiteren Waschschritt in 1x TBS für 10 min konnte die Membran nach einem erneuten Blocking-Schritt anschließend mit einem neuen Primär-Antikörper inkubiert werden.
Die Lagerung der Membran erfolgte in 1x TBS bei 4 °C.

Lösung I:
100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
2,5 mM 3-Aminophalhydrazin
4 mM p-Cumarsäure

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

Strip-Lösung I:
0,2 M Glycin
0,5 M NaCl
pH 2

Strip-Lösung II:
0,5 M Tris
pH 11

2.5 TEM-Mikroskopie

In Kooperation mit der „Zentralen Einrichtung für Elektronenmikroskopie“ der Universität Ulm wurden Dünnschnitte (50 nm) von Blattmaterial hergestellt, chemisch fixiert und anschließend mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert.

2.6 Sicherheitsbestimmungen

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

IV. Ergebnisse

1. Charakterisierung verschiedener Mutanten

Die Thylakoidmembran in Chloroplasten ist nicht nur Ort der Photosynthese, sondern trennt zusätzlich ein weiteres lösliches Kompartiment, das Lumen, vom Stroma ab. Da sowohl Proteine durch die Thylakoidmembran transportiert als auch in diese inseriert werden müssen, haben sich im Laufe der Evolution vier Transportwege für Kern-kodierte Proteine an der Thylakoidmembran entwickelt. Dabei werden über den cpTat- bzw. den cpSec-Transportweg Proteine über die Membran in das Lumen transportiert, während durch spontane Insertion oder den cpSRP-Weg Proteine in die Thylakoid-membran integriert werden.

Mitglieder der ubiquitär in Membranen prokaryotischen Ursprungs vorkommenden Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie sind bei der Insertion und Assemblierung von Proteinen in Membranen beteiligt, so auch vermutlich Alb3p in der Thylakoidmembran von *A. thaliana*. Anhand der *albino3*-Mutation konnte Alb3p identifiziert werden (Sundberg et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Alb3p für die Integration von LHCII-Proteinen über den cpSRP-Weg benötigt wird (Moore et al., 2000). Des Weiteren wurde in *C. reinhardtii* mit Alb3.1p auch ein Homologes von Alb3p identifiziert (Bellafiore et al., 2002), für das eine Beteiligung an der Assemblierung, nicht aber an der Integration des PSII-Kernproteins D1 festgestellt wurde (Ossenbühl et al., 2004).

Aufgrund des schwerwiegenden Phänotyps der *albino3*-Mutante, die unter autotrophen Wachstumsbedingungen einen letalen Phänotyp im Keimlingsstadium aufweist, auch bei Anzucht auf Saccharose-haltigem Medium selten über das 4-Blatt-Stadium hinaus wächst und dabei einen sterilen Phänotyp zeigt, kann angenommen werden, dass Alb3p nicht nur an LHCII-Integration und D1-Assemblierung beteiligt ist, sondern auch weitere, bisher unbekannte Funktionen erfüllt. Daher wurden T-DNA-Insertionsmutanten von *CpFtsY* und *Hcf106* zusammen mit einer bereits beschriebenen cpSRP54-Mutante (*ffc*$^-$; Amin et al., 1999) vergleichend zu *albino3* untersucht, um aus den resultierenden Phänotypen auf evtl. weitere Funktionen von Alb3p schließen zu können. Zusätzlich wurde noch eine T-DNA-Insertion in einem Gen für die Phytoen-synthase (PSY), das zentrale Enzym der Carotinoid-Biosynthese (Übersicht: Qin et al.,

2007), untersucht, da in *Synechocystis sp.* PCC 6803 ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Alb3p-homologen Slr1471p und der Assemblierung von Carotinoiden in Proteinkomplexe der Thylakoidmembran vermutet wurde (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung). Im ersten Teil wird nun die Charakterisierung der genannten *A. thaliana*-Mutanten dargestellt.

1.1 Charakterisierung der Δ*cpftsy*-Mutante

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Δ*cpftsy*-Linie handelte es sich um eine bisher nicht näher charakterisierte T-DNA-Insertionsmutante des Gens für den cpSRP-Rezeptor CpFtsY. Dazu wurden Samen vom Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (San Diego, USA) angefordert und die resultierenden Pflanzen in einer früheren Arbeit mittels PCR auf eine T-DNA-Insertion im *CpFtsY*-Gen untersucht (Honold, 2008). Heterozygote Pflanzen wurden geselbstelt und die entstandenen Samen erneut ausgesät. Ca. ein Viertel der Pflanzen zeigten anschließend einen Phänotyp, der vermutlich auf eine homozygote T-DNA-Insertion zurückzuführen war. Diese in Abb. 1A skizzierte homozygote Insertion musste für diese Arbeit noch einmal mittels PCR-Analyse überprüft werden.

Dazu wurde genomische DNA aus der Mutante isoliert und mittels PCR im Vergleich zur gDNA aus WT Col-0 untersucht. Abb. 8C zeigt, dass die Primer LP9E und RP9E, die jeweils neben der T-DNA-Insertion liegen, nur für WT-gDNA ein PCR-Produkt ergeben, nicht jedoch für Δ*cpftsy*-gDNA. Hingegen ergeben die Kombinationen aus LP9E bzw. RP9E zusammen mit dem T-DNA-spezifischen Primer LB3-Sail für Δ*cpftsy* jeweils ein Produkt, das beim WT nicht erscheint. Dies zeigt, dass bei der Mutante Δ*cpftsy* im *CpFtsY*-Gen im Intron 1 an Position 439 relativ zum Transkriptionsstart eine Insertion von mindestens zwei T-DNAs vorliegt. Die genaue Position wurde mittels Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte festgestellt und verifiziert (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten PCR-Experiment wurde untersucht, ob trotz der T-DNA-Insertion ein *CpFtsY*-Transkript gebildet wird. Dazu wurde RNA aus Δ*cpftsy* isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend eine PCR mit den in Abb. 8A rot gekennzeichneten Primern ftsY-E8E10-fw und ftsY-E8E10-rev durchgeführt. Das PCR-Produkt der cDNA ist klar von einem von gDNA gebildeten PCR-Produkt zu

unterscheiden, da bei der cDNA die Intron-Sequenzen entfallen (Abb. 8B). Ebenfalls ersichtlich ist, dass auch in der Δ*cpftsy*-Mutante ein Transkript gebildet wird. Der Aufbau dieses Transkripts wurde mit einer weiteren PCR untersucht, in der die gleichen Primer-Kombinationen wie bei der Verifizierung der T-DNA-Insertion verwendet wurden. Nur wurde statt genomischer DNA die bereits im vorigen Experiment verwendete cDNA verwendet. Das Ergebnis dieser PCR (Abb. 8C) zeigt für die Primerkombination RP9E mit LB3-Sail ein kleineres Produkt für die cDNA als für die gDNA von Δ*cpftsy*. Das lässt darauf schließen, dass das *CpFtsY*-Transkript in der Mutante die Sequenz der T-DNA-Insertion enthält.

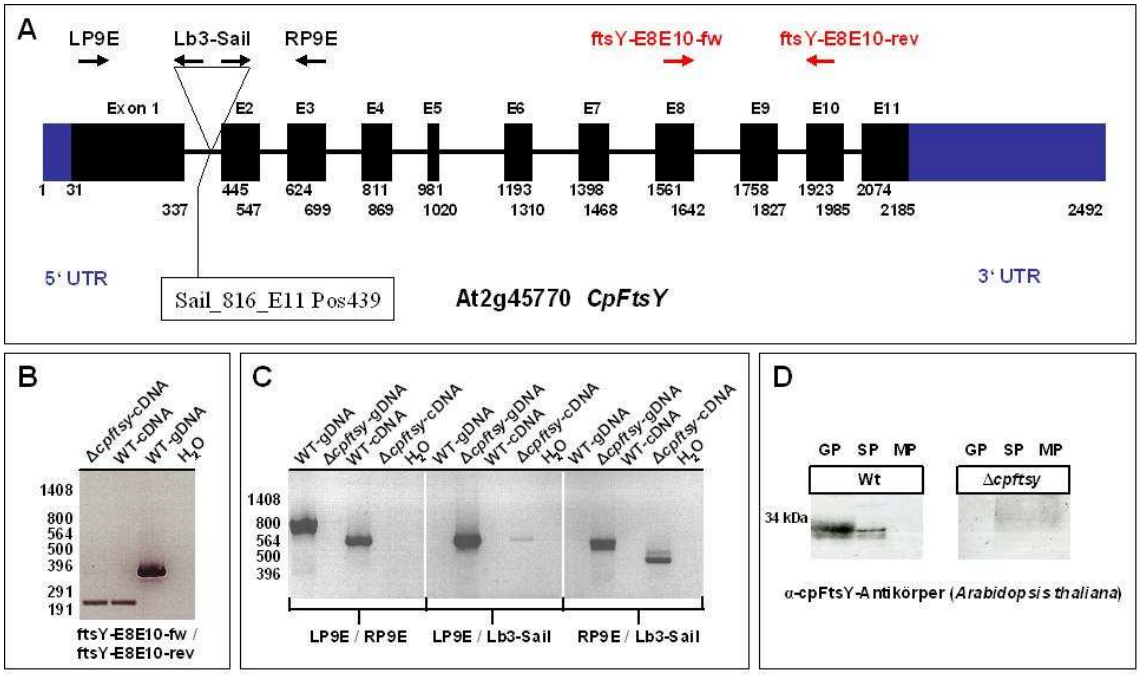


Abb. 8: Charakterisierung der T-DNA-Insertion Sail_816_E11.
A: Die Skizze zeigt die Struktur des *CpFtsY*-Gens (At2g45770), wobei blaue Boxen die 5'- bzw. 3'-nicht-translatierten Regionen der mRNA kennzeichnen, während schwarze Boxen für Exons und die dazwischen liegenden Linien für Introns stehen. Die mindestens zweifache T-DNA-Insertion ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Oligonukleotide für PCR-Analysen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und oberhalb benannt. Primer für eine RT-PCR sind als rote Pfeile gekennzeichnet und ihre Bezeichnung ist ebenfalls darüber angegeben. **B**: Zum Nachweis eines *CpFtsY*-Transkripts wurde eine RT-PCR mit den in der Abb. genannten Primern durchgeführt und die Produkte auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **C**: Zum Nachweis der mind. zweifache T-DNA-Insertion und eines T-DNA enthaltenden Transkripts wurden PCRs mit den jeweils in der Abb. dargestellten Primern durchgeführt und auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **D**: Zum Nachweis des Knock-Outs von *CpFtsY* auf Protein-Ebene mittels Western Blot wurden jeweils aus 50 mg Rosettenblättern Gesamtprotein (GP), lösliche Proteine (SP) und Membranproteine (MP) isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Mit einem α-cpFtsY-Antikörper wurden CpFtsY-Proteine in den Spuren immunologisch detektiert. Größe von Markerprotein in kDa.

Um nun nachweisen zu können, dass die homozygote T-DNA-Insertion den Knock-Out von *CpFtsY* zur Folge hat, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden aus Rosettenblättern der Δ*cpftsy*-Mutante und des WT Col-0 die Fraktionen Gesamtprotein, lösliches Protein und Membranprotein isoliert. Die Proteine wurden anschließend über ein SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit Hilfe eines spezifischen α-cpFtsY-Antikörpers untersucht. Abb. 8D zeigt, dass für den WT sowohl im Gesamtprotein als auch in der Fraktion „lösliches Protein" eine Bande für CpFtsY zu sehen ist. Diese sind in der Mutante nicht zu sehen, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der Δ*cpftsy*-Mutante um eine echte Knock-Out-Mutante handelt.

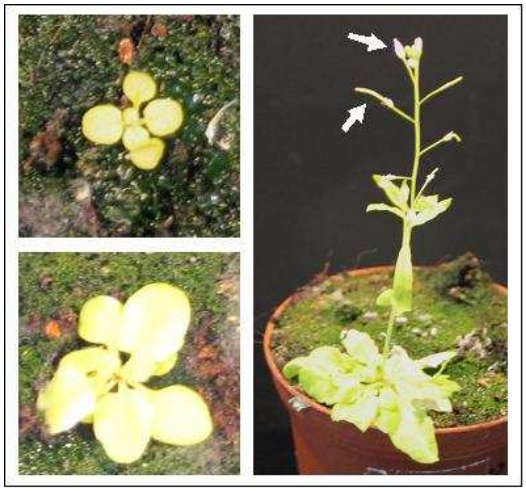


Abb. 9: Makroskopischer Phänotyp der Δ*cpftsy*-Mutante.
Samen homozygoter Δ*cpftsy*-Pflanzen wurden auf Erde unter Langtagbedingungen (16 h bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}, 8 h Dunkelheit bei 21 bis 23 °C und 50 bis 80 % Luftfeuchtigkeit) angezogen. Die Abb. zeigt Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Weiße Pfeile markieren Blüten bzw. entstandene Samenschoten.

Diese Mutation im *CpFtsY*-Gen führte zu einem gelblichen Phänotyp (Abb. 9), der stark verzögertes Wachstum im Vergleich zum WT aufwies. Die Pflanzen wuchsen bis zur Blüte und bildeten fertile Samen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Anzahl und Größe der Chloroplasten bei Δ*cpftsy* im Vergleich zum WT gleich waren. Jedoch lag eine veränderte Thylakoidmembran-Struktur vor (Abb. 10). Δ*cpftsy*-Chloroplasten zeigten vor allem Stroma-Thylakoide und nur kleine Grana-Stapel. Des Weiteren waren auch weniger und kleinere Stärkekörner in den Chloroplasten zu erkennen. Außerdem zeigten sich im Vergleich zum WT mehr Plastoglobuli in den Chloroplasten der Mutante.

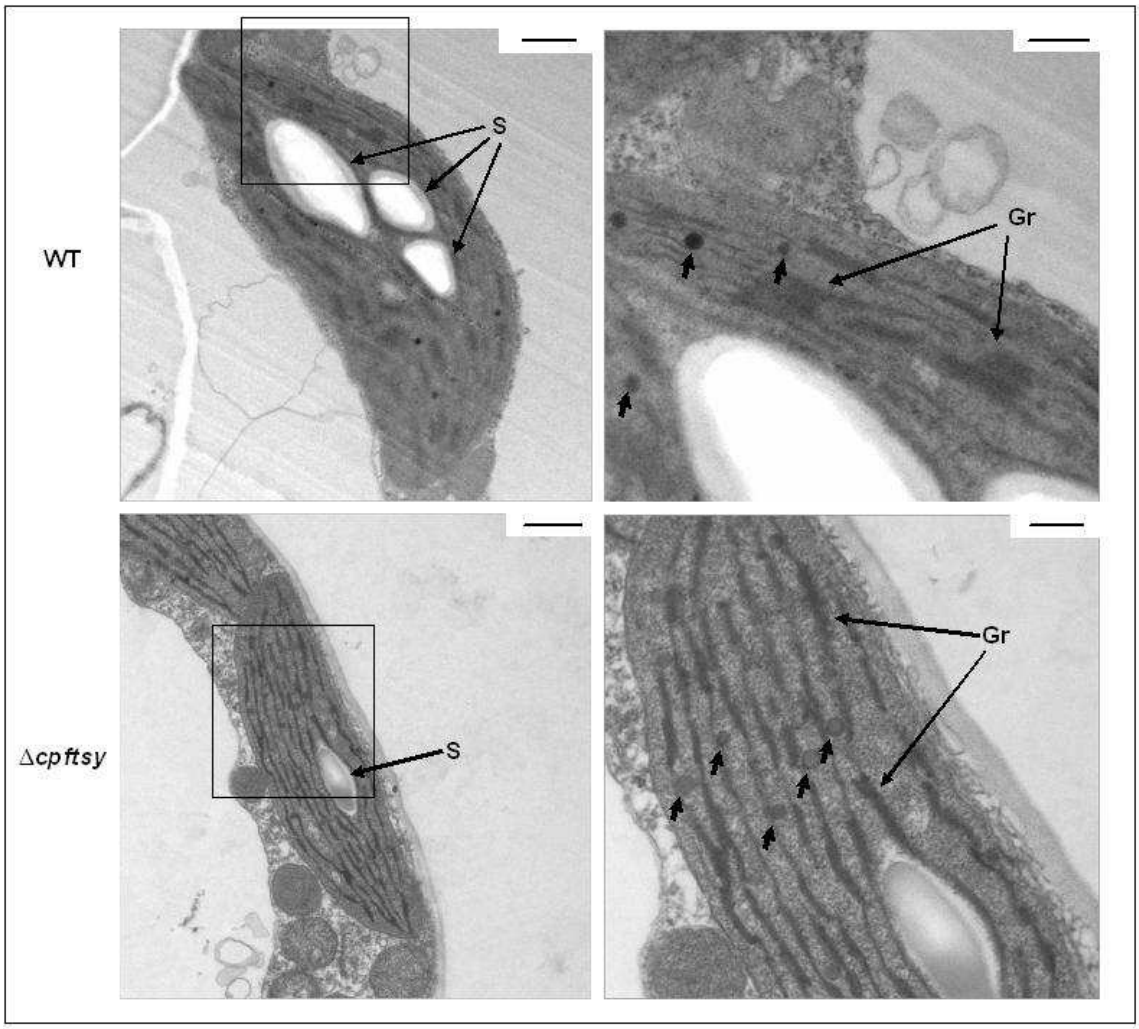


Abb. 10: TEM-Aufnahmen von Δ*cpftsy*-Chloroplasten im Vergleich zum WT.
Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen von ganzen Chloroplasten und vergrößerten Ausschnitten der Δ*cpftsy*-Mutante im Vergleich zum WT. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 400 nm und bei Δ*cpftsy* 900 nm bzw. 300 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. S: Stärke; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran.

Chlorophyll-(Chl)-Messungen zeigten, dass die Gesamtmenge an Chl in der Mutante auf 14,3 % im Vergleich zum WT reduziert ist (Abb. 11A). Dabei ist Chl*a* (13,7 %) geringfügig stärker reduziert als Chl*b* (15,6 %), was sich auch in einem leicht verringerten Verhältnis von Chl*a* zu Chl*b* niederschlägt. Dies beträgt 2,375 beim WT im Vergleich zu 2,080 bei Δ*cpftsy* (Abb. 2D). Der Carotinoid-(Car)-Anteil ist in der Δ*cpftsy*-Mutante ebenfalls reduziert, jedoch nur auf 29 % (Abb. 11B). Daher ergeben sich für das Verhältnis von Chl zu Car im Vergleich zum WT deutlich kleinere Werte: 3,400 bei Δ*cpftsy* im Vergleich zu 6,885 beim WT Col-0 (Abb. 11B). Dies zusammen mit dem beschriebenen Phänotyp lässt auf deutlich erhöhten oxidativen Stress schließen.

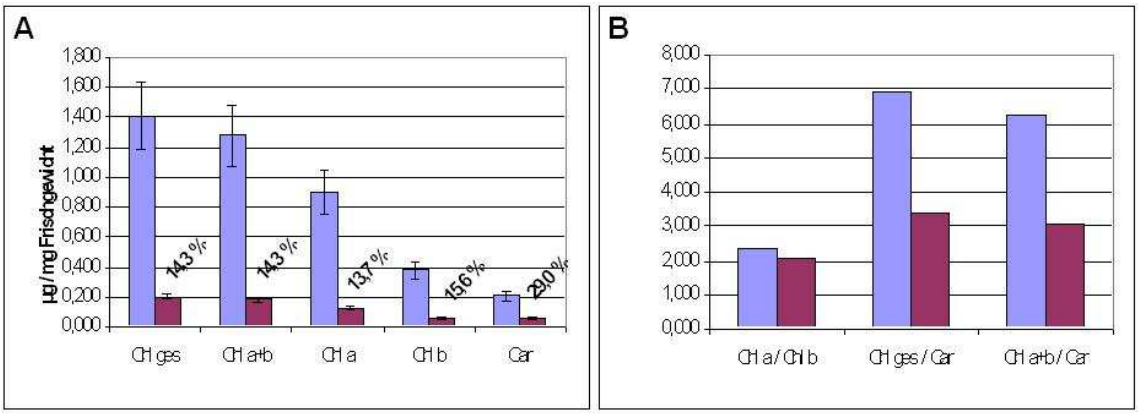


Abb. 11: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von Δ*cpftsy*.
Für die Bestimmung von Chl- und Car-Mengen wurden aus WT- bzw. Δ*cpftsy*-Rosettenblättern mit 80 %-igem Aceton die Farbstoffe isoliert und photometrisch bestimmt. Dabei wurde Chl ges (Chl gesamt) bei 652 nm, Chl*a* bei 663 nm, Chl*b* bei 645 nm und Car bei 470 nm gemessen. In **A** sind die jeweiligen Chl- bzw. Car-Mengen von WT (blau) und Mutante (lila) relativ zum Frischgewicht aufgetragen. Die in % angegebenen Werte zeigen die jeweils dargestellten Werte der Mutante relativ zum WT. **B**: Aus den in A gezeigten Werten wurden für Δ*cpftsy* (lila) und den WT (blau) die Verhältnisse von Chl*a* zu Chl*b* und von Chl ges bzw. Chl*a* + Chl*b* zum Car-Anteil berechnet und aufgetragen.

Um sicher gehen zu können, dass dieser Phänotyp der Δ*cpftsy*-Mutante nicht auf eine zusätzlicher T-DNA-Insertion, sondern ausschließlich auf die Mutation im *CpFtsY*-Gen zurückzuführen ist, wurde eine Southern Blot-Hybridisierung durchgeführt (Abb. 12A). Für diese wurde genomische DNA aus Δ*cpftsy* und WT Col-0 isoliert, mit *Hin*dIII hydrolysiert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Als Sonde diente ein 0,8 kbp großer Bereich der T-DNA. Da die T-DNA-Insertion aus mindestens zwei einzelnen T-DNAs besteht, wurden 2,3 kbp und 3,2 kbp große Fragmente im Southern Blot erwartet. Beide Fragmente waren in der Mutante, nicht aber in der WT-Spur zu sehen (Abb. 12A). Zusätzlich zu den genannten Fragmenten waren noch Signale bei höheren Molekulargewichten bei beiden Spuren zu erkennen, die unspezifische Bindungen darstellen. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nur die im *CpFtsY*-Gen vorhandene T-DNA-Insertion für den Phänotyp verantwortlich ist. Also wurde zusätzlich eine Komplementation der Mutante mit *CpFtsY*-cDNA unter CaMV-35S-Promotor-Kontrolle durchgeführt. Beim CaMV-35S-Promotor handelt es sich um einen konstitutiv stark expremierenden Promotor aus dem Blumenkohl Mosaik Virus („cauliflower mosaic virus“). Für die Komplementation wurde die *CpFtsY*-cDNA mittels „floral dip“-Methode über *Agrobacterium tumefaciens* in die Mutante eingebracht. Abb. 12B zeigt einzelne Komplementanten im Vergleich zu

einer Vielzahl von nicht komplementierten Δ*cpftsy*-Pflanzen. Die Komplementanten zeigten makroskopisch keinen Phänotyp mehr.

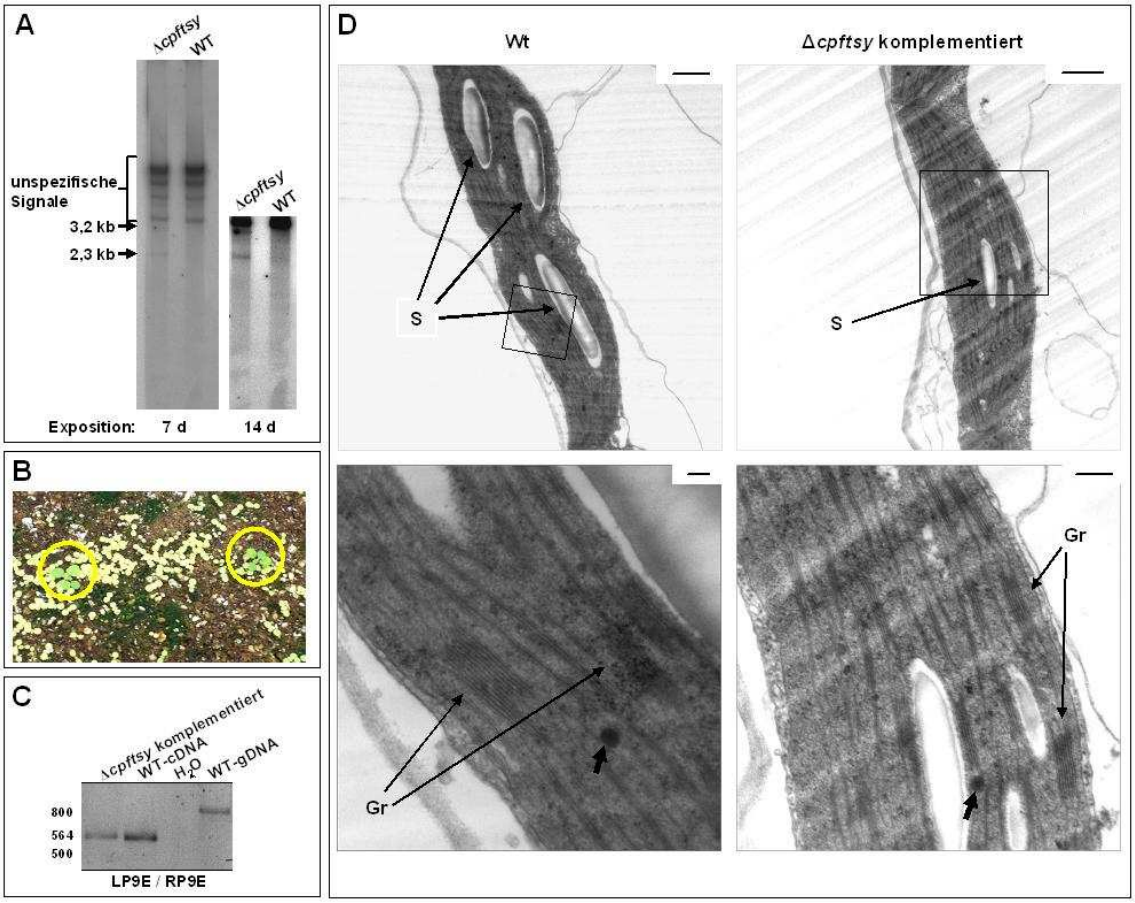


Abb. 12: Southern Blot-Experiment und Komplementation von Δ*cpftsy*.
A: Je 7 µg gDNA von Δ*cpftsy* und Wt Col-0 wurde mit *Hin*dIII hydrolysiert, anschließend über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt und für eine Southern-Hybridisierung auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Als Sonde diente ein 0,8 kbp großer Teil der T-DNA. **B**: Δ*cpftsy*-Pflanzen wurden mit *CpFtsY*-cDNA unter Kontorolle eines 35S-Promotors mittels *Agrobakterium*-Transformation komplementiert. Die Samen wurden auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. Gelb eingekreiste Pflanzen zeigten eine erfolgreiche Komplementation. **C**: Zum Nachweis der erfolgreichen Komplementation wurde gDNA aus der komplementierten Pflanze isoliert und damit und im Vergleich zu WT-gDNA und WT-cDNA eine PCR mit den in der Abb. angegebenen Primern (vgl. Abb. 8) durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **D**: Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen einer komplementierten Δ*cpftsy*-Pflanze im Vergleich zum WT. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 100 nm und bei Δ*cpftsy* (komplementiert) 1000 nm bzw. 300 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. S: Stärke; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran.

Um nachzuweisen, dass die positiven Komplementanten auch wirklich komplementierte homozygote Δ*cpftsy*-Pflanzen waren, wurde eine PCR-Analyse durchgeführt. Für die komplementierten Pflanzen konnte nur ein Signal für die eingebrachte cDNA, nicht

aber für ein intaktes WT-Allel erkannt werden (Abb. 3C), was eine erfolgreiche Komplementation nachweist. Auch durch TEM-Aufnahmen konnte die erfolgreiche Komplementation von Δ*cpftsy* mit dessen eigener cDNA nachgewiesen werden (Abb. 12D). So zeigten die komplementierten Pflanzen im Gegensatz zur Mutante wieder größere Grana-Stapel und auch die Einlagerung von Stärke in den Chloroplasten war wieder normalisiert. Der gezeigte Phänotyp war also auf die Mutation im *CpFtsY*-Gen durch Insertion von T-DNA an einer bestimmten Stelle im Genom zurückzuführen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei der Δ*cpftsy*-Mutante trotz Transkription des mutierten Gens um einen Knock-Out-Phänotyp handelt, dessen Pflanzen verringertes Wachstum und einen gelblich hellgrünen Phänotyp mit reduzierten Chl- und Car-Gehalten aufweisen. Die Pflanzen erblühen und sind fertil. Die Thylakoidmembran-Struktur zeigt verringerte Grana-Stapel und verstärktes Auftreten von Plastoglobuli. Der Phänotyp kann aufgrund erfolgreicher Komplementation der Mutante mit WT-*CpFtsY*-cDNA auf die T-DNA-Insertion im *CpFtsY*-Gen zurückgeführt werden.

1.2 Charakterisierung der *albino3*-Mutante

Die *albino3*-Mutante wurde ursprünglich von Sundberg et al. (1997) bei der Suche nach albinotischen Mutanten beschrieben.

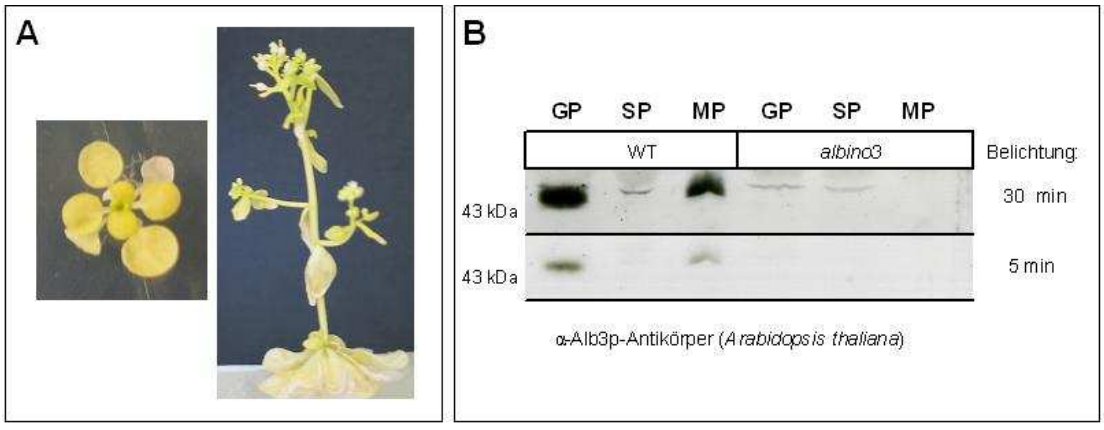


Abb. 13: Makroskopischer Phänotyp von *albino3* und Western Blot-Nachweis von Alb3p.
A: *albino3*-Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen auf Saccharose-haltigem Medium angezogen. Die Abb. zeigt Pflanzen zu verschiedenen Entwicklungsstadien. **B**: Zum Nachweis des *Albino3*-Knock-Outs wurden jeweils aus 50 mg Rosettenblättern Gesamtprotein (GP), lösliche Proteins (SP) und Membranproteine (MP) isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Mit einem polyklonalem α-Alb3p-Antikörper wurden Alb3-Proteine immunlogisch nachgewiesen.

Es handelt sich dabei um eine Transposon-Insertionsmutante für das Alb3-Protein, das am co- und post-translationalen cpSRP-Weg beteiligt.
Sie zeigte einen blassen gelblichen Phänotyp (Abb. 13A) und wuchs auf Erde nicht über das Keimlingsstadium hinaus. Auf Saccharose-haltigem Medium hingegen wuchs sie zu einer im Vergleich zum WT wesentlich verkleinerten Form heran und erblühte selten (Abb. 13A). Die aus den Blüten resultierenden Samen waren steril und zeigten bei erneuter Aussaat kein Wachstum.

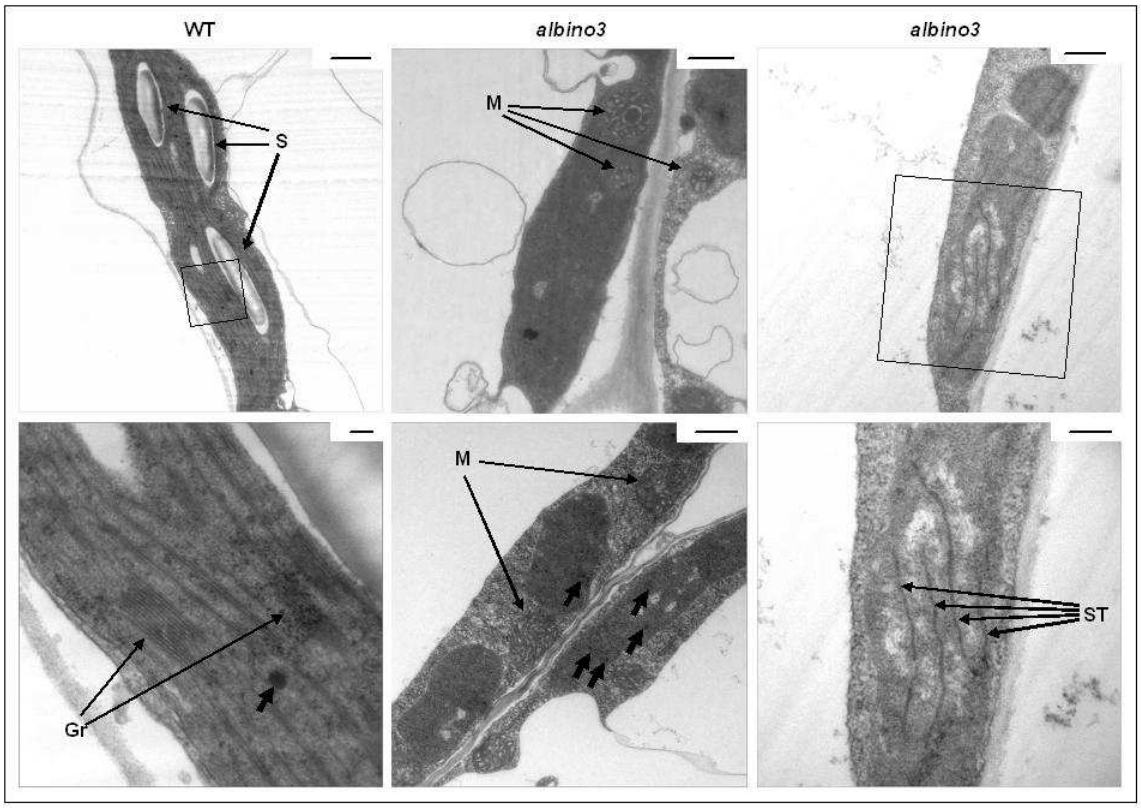


Abb. 14: TEM-Aufnahmen der *albino3*-Mutante im Vergleich zum WT.
Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen von *albino3*- im Vergleich zu WT-Chloroplasten. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 100 nm und bei *albino3* 700 nm, 600 nm, 900 nm bzw. 300 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. M: Mitochondrien; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; S: Stärke; St: Stroma-Thylakoide.

Auch für *albino3* sollte der Knock-Out mittels Western Blot-Analyse gezeigt werden. Dazu wurden wie schon für Δ*cpftsy* Proteine aus Rosettenblättern isoliert und in die Fraktionen Gesamtprotein, lösliches Protein und Membranprotein aufgeteilt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion von Alb3p erfolgte mit Hilfe eines polyklonalen anti-Alb3-Serums. Abb. 13B zeigt, dass in der Gesamt- und Membran-

protein-Fraktion des WT eine spezifische Bande bei ca. 45 kDa auftrat, die in den Fraktionen der *albino3*-Mutante nicht vorhanden war. Bei den zusätzlich bei ca. 47 kDa auftretenden Banden in den Fraktionen Gesamtprotein und löslichem Protein sowohl beim WT als auch bei *albino3* handelte es sich vermutlich um unspezifische Kreuzreaktionen des Serums.

Der makroskopisch sichtbare Phänotyp zeigte bei TEM-Aufnahmen im Vergleich zum WT weniger Chloroplasten, die zwar in ihrer Größe nicht allzu sehr vom WT abwichen, jedoch keine klar definierte Form aufwiesen (Abb. 14). Die *albino3*-Chloroplasten zeigten meist keine sichtbare Thylakoidmembran-Struktur. Einige Plastiden zeichneten sich jedoch durch vereinzelte Stroma-Thylakoide aus (Abb. 14). Es konnten nur wenige bzw. keine Plastoglobuli erkannt werden.

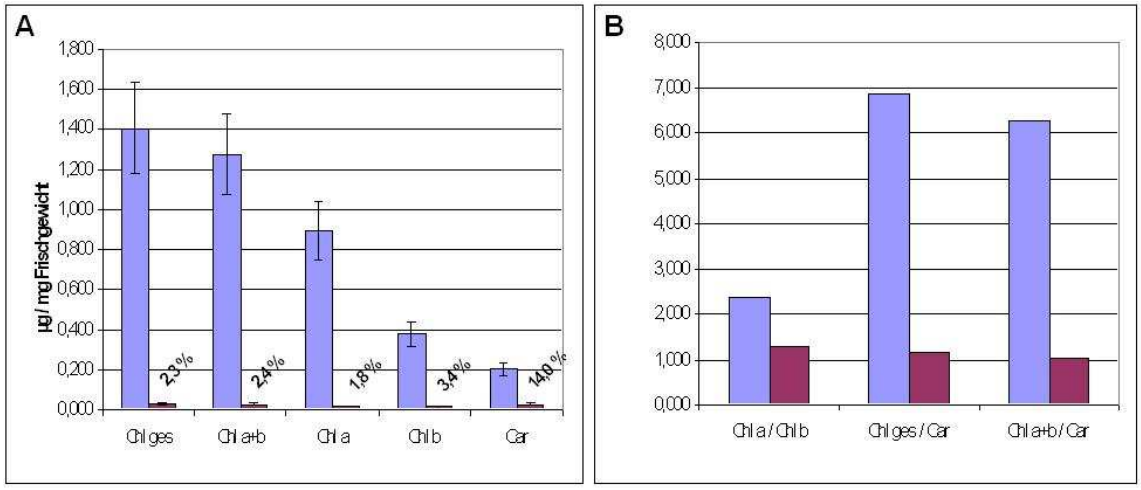


Abb. 15: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von *albino3*.
Für die Bestimmung von Chl- und Car-Mengen wurden aus WT- bzw. *albino3*-Rosettenblättern mit 80 %-igem Aceton die Farbstoffe isoliert und photometrisch bestimmt. Dabei wurde Chl ges bei 652 nm, Chl*a* bei 663 nm, Chl*b* bei 645 nm und Car bei 470 nm gemessen. In **A** sind die jeweiligen Chl- bzw. Car-Mengen von WT (blau) und Mutante (lila) relativ zum Frischgewicht aufgetragen. Die in % angegebenen Werte zeigen die jeweils dargestellten Werte der Mutante relativ zum WT. **B**: Aus den in A gezeigten Werten wurden für *albino3* (lila) und den WT (blau) die Verhältnisse von Chl*a* zu Chl*b* und von Chl ges bzw. Chl*a* + Chl*b* zum Car-Anteil berechnet und aufgetragen.

Chl-Messungen zeigen für *albino3* eine deutliche Reduktion auf 2,3 bis 2,4 % (Abb. 15A), wobei auch hier der Gehalt von Chl*a* stärker reduziert ist (1,8 % relativ zum WT) als der Chl*b*-Gehalt (3,4 %). Daraus resultiert auch ein deutlich verringertes Verhältnis von Chl*a* zu Chl*b* von 1,274 im Vergleich zu 2,375 beim WT (Abb. 15B). Der Car-Gehalt ist verglichen mit dem Chl-Anteil weniger stark reduziert (14 % relativ

zum WT; Abb. 15A). Daraus ergibt sich eine Reduktion des Verhältnisses des gesamten Chls zum Car-Anteil auf ca. ein Sechstel des WT-Wertes (1,172) bei *albino3* verglichen mit 6,885 beim WT (Abb. 15B).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die *albino3*-Mutation wie bei Sundberg et al. (1997) beschrieben auf einen Knock-Out des Alb3-Proteins zurückzuführen ist und einen albinotischen Phänotyp zeigt. Dieser wächst bei Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium nicht über das Keimlingsstadium hinaus und führt auch bei heterotrophen Wachstumsbedingungen zu sterilen Pflanzen, die wesentlich kleiner sind als der WT. Es ist eine starke Reduktion der Chl- und Car-Gehalte zu beobachten und auch die Thylakoidmembran-Struktur ist stark beeinträchtigt, da z.T. keine differenzierte Struktur zu beobachten ist und nur in einzelnen Fällen vereinzelte Stroma-Thylakoide auftreten.

1.3 Charakterisierung der *ffc*$^-$-Mutante

Wie auch die *albino3*-Mutante wurde die *ffc*$^-$-Mutante bereits beschrieben (Amin et al., 1999) und soll im Folgenden kurz charakterisiert werden. Hierbei handelt es sich um eine T-DNA-Insertionsmutante für *CpSRP54*. Dieses ist sowohl am co- als auch am post-translationalen cpSRP-Weg beteiligt.

Sie zeigte im Vergleich zum WT einen nur schwachen Phänotyp (Abb. 16A). Das Wachstum der Rosettenblätter sowie der Stiel erreichte WT-Größe. Jedoch zeigten die Rosettenblätter eine leicht schwächere Grün-Färbung im Vergleich zum WT (Abb. 16A, links).

Auch in TEM-Aufnahmen war kein deutlicher Phänotyp zu erkennen (Abb. 16B). So unterschieden sich weder Zahl noch Größe der Chloroplasten von *ffc*$^-$ vom WT noch war ein Unterschied in der Thylakoidmembran-Struktur zu erkennen. Die Zahl der Plastoglobuli schien leicht erhöht.

Chl-Messungen zeigten im Vergleich zum WT eine Reduktion sowohl des gesamten Chl als auch der Bestandteile Chl*a* und Chl*b* auf ca. 84 % (Abb. 17B). Daraus ergab sich ein Verhältnis Chl*a* zu Chl*b*, das mit 2,397 dem WT-Wert (2,375) ähnelt (Abb. 17B). Da jedoch der Car-Gehalt auf nur 88 % relativ zum WT reduziert ist (Abb. 17A), ist das Verhältnis von Chl zum Car-Gehalt mit 6,540 im Vergleich zum WT (6,885) leicht reduziert (Abb. 6D).

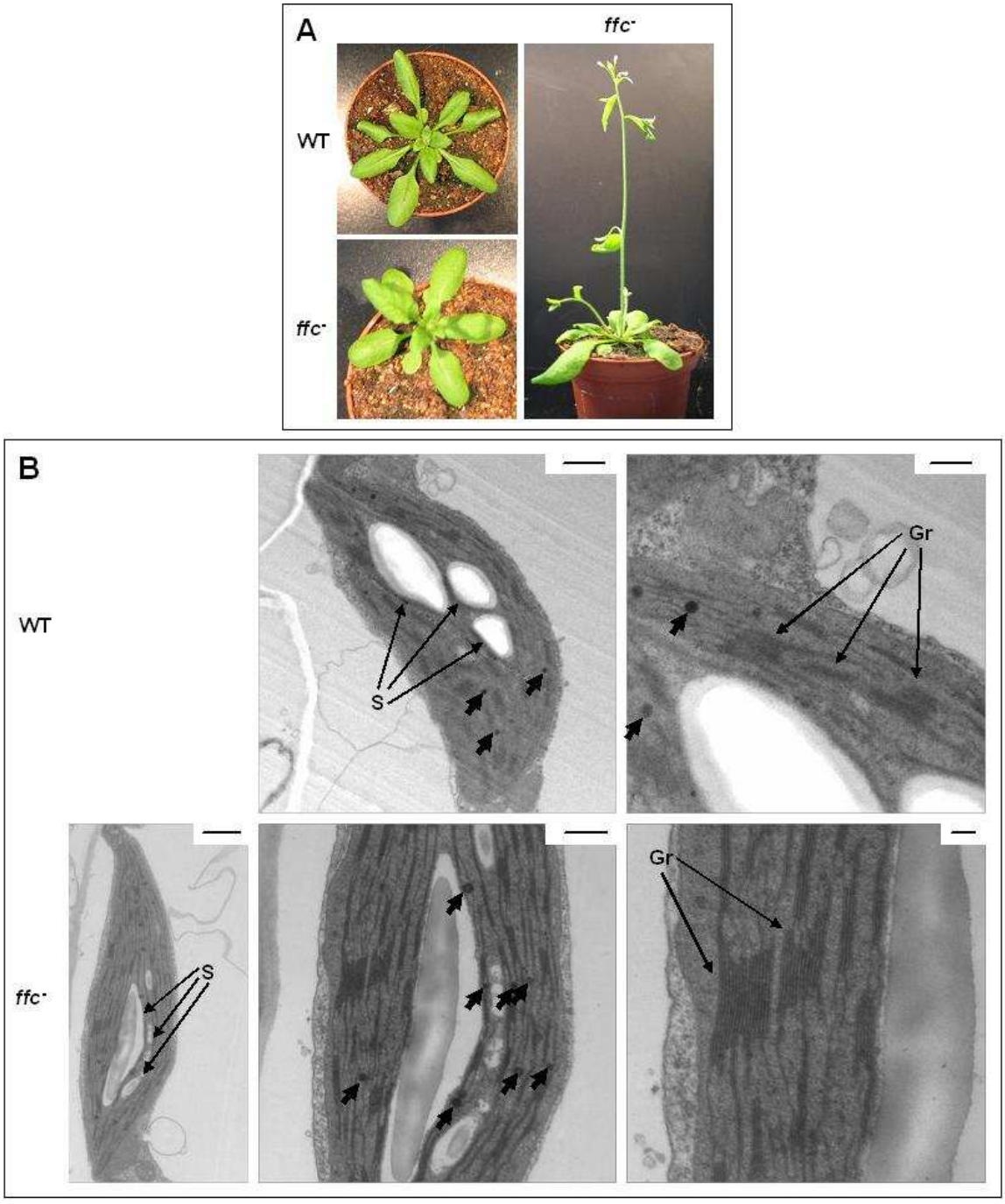


Abb. 16: Makroskopischer Phänotyp und TEM-Aufnahmen der *ffc*-Mutante.
A: *ffc*-Pflanzen wurden auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. Die Abb. zeigt eine WT- und eine *ffc*-Pflanze zu etwa dem gleichen Stadium der Entwicklung sowie eine *ffc*-Pflanze zu einem späteren Wachstumsstadium. **B:** Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen von Chloroplasten aus *ffc*-Pflanzen im Vergleich zum WT. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 400 nm und bei *ffc* 1000 nm, 400 nm bzw. 100 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; S: Stärke.

Zusammenfassend ist für die *ffc*-Mutante zu sagen, dass sie einen nur schwachen Phänotyp zeigt. Im Vergleich zum WT ist kein deutlicher Unterschied bei autotrophen

Wachstumsbedingungen zu erkennen und auch unter dem Elektronenmikroskop ist nur eine leicht erhöhte Anzahl von Plastoglobuli zu erkennen, die zusammen mit den reduzierten Chl- und Car-Gehalten und den daraus resultierenden Verhältnissen auf einen leicht erhöhten oxidativen Stress schließen lassen.

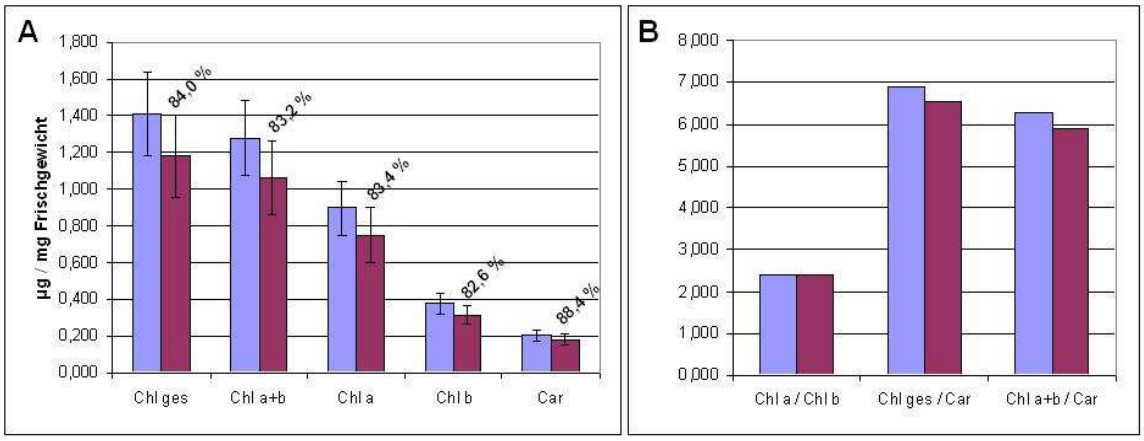


Abb. 17: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von *ffc*$^-$.
Für die Bestimmung von Chl- und Car-Mengen wurden aus WT- bzw. *ffc*$^-$-Rosettenblättern mit 80 %-igem Aceton die Farbstoffe isoliert und photometrisch bestimmt. Dabei wurde Chl ges (Chl gesamt) bei 652 nm, Chl*a* bei 663 nm, Chl*b* bei 645 nm und Car bei 470 nm gemessen. In **A** sind die jeweiligen Chl- bzw. Car-Mengen von WT (blau) und Mutante (lila) relativ zum Frischgewicht aufgetragen. Die in % angegebenen Werte sind die jeweils dargestellten Werte der Mutante relativ zum WT. **B**: Aus den in A gezeigten Werten wurden für *ffc*$^-$ (lila) und den WT (blau) die Verhältnisse von Chl*a* zu Chl*b* und von Chl ges bzw. Chl*a* + Chl*b* zum Car-Anteil berechnet und aufgetragen.

1.4 Charakterisierung der Δ*hcf106*-Mutante

Bei der Δ*hcf106*-Mutante handelte es sich um die erste Knock-Out-Mutante für *Hcf106* in *A. thaliana*, das für ein Protein der cpTat-Rezeptorkomplexes kodiert. Wie bei Δ*cpftsy* wurde auch hier eine T-DNA-Insertionslinie ausgewählt, die zunächst etabliert werden musste (Honold, 2008). Für diese Arbeit wurde in Pflanzen mit einem Phänotyp die homozygote T-DNA-Insertion mittels PCR nachgewiesen (Abb. 18A). Es wurden dazu Kombinationen der Primer LP2 und RP2, sowie von RP2 und dem T-DNA-spezifischen Primer LB-XL verwendet (Abb. 18A und 18C). Für WT-gDNA erhielt man für die Primerkombination RP2 und LP2, die die T-DNA-Insertion umspannen, ein PCR-Produkt der erwarteten Größe, das bei gDNA aus der Δ*hcf106*-Pflanze fehlte (Abb. 18C). Im Falle einer Kombination von LP2 und dem T-DNA-Primer LB-XL wurde kein PCR-Produkt erhalten (Daten nicht gezeigt). Für das Primerpaar RP2 und

LB-XL ist jedoch in der Spur der gDNA aus der Δ*hcf106*-Mutante ein PCR-Produkt zu erkennen, das in der WT-gDNA-Spur nicht vorhanden ist (Abb. 18C). Die genaue Position der T-DNA-Insertion wurde mittels Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte im Exon 4 an Position 1122 im *Hcf106*-Gen relativ zum Transkriptionsstart ermittelt.

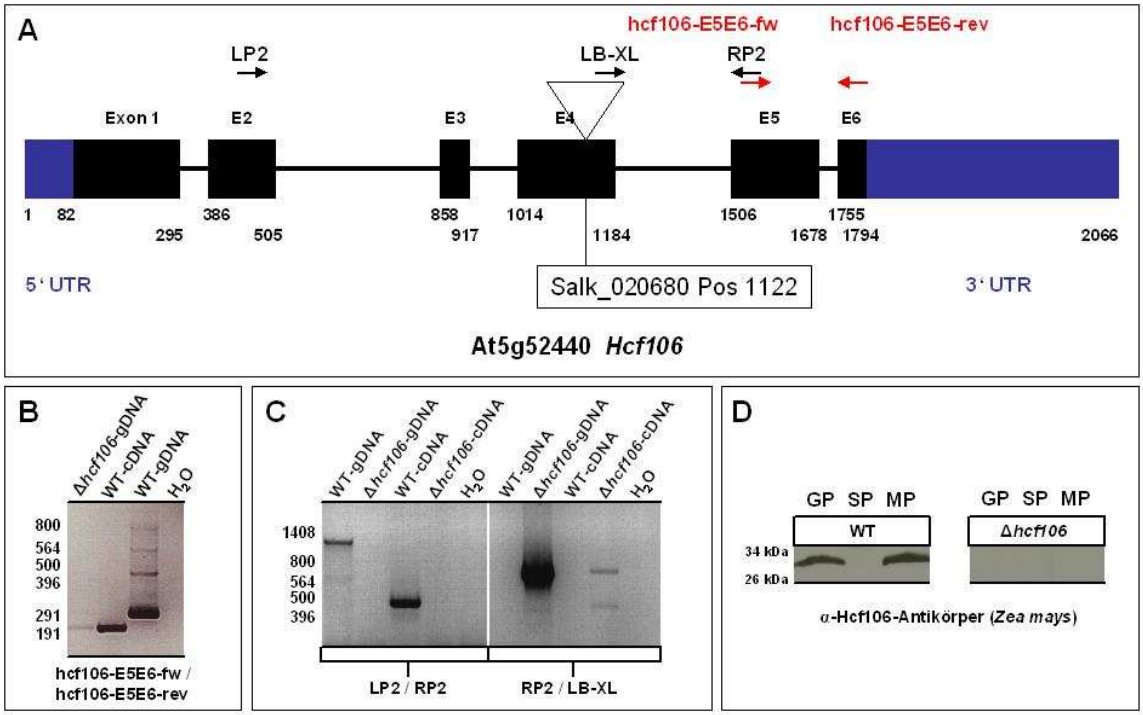


Abb. 18: Charakterisierung der T-DNA-Insertion Salk_020680.
A: Die Skizze zeigt die Struktur des *Hcf106*-Gens (At5g52440), wobei die 5'- bzw. 3'-nicht-translatierte Region als blaue Boxen dargestellt sind, kodierende Exons als schwarze Boxen und nicht kodierende Introns als schwarze Linien dazwischen. Die T-DNA-Insertion ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Oligonukleotide für PCR-Analysen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und oberhalb benannt. Primer für eine RT-PCR sind als rote Pfeile gekennzeichnet und ihre Bezeichnung ist ebenfalls darüber angegeben. **B:** Zum Nachweis eines *Hcf106*-Transkripts wurde eine RT-PCR mit den in der Abb. genannten Primern durchgeführt und die Produkte auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **C:** Zum Nachweis der T-DNA-Insertion und eines T-DNA enthaltenden Transkripts wurden PCRs mit den jeweils in der Abb. dargestellten Primern durchgeführt und auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **D:** Zum Nachweis des Knock-Outs von *Hcf106* auf Protein-Ebene mittels Western Blot wurden jeweils aus 50 mg Rosettenblättern Gesamtprotein (GP), lösliche Proteine (SP) und Membranproteine (MP) isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Mit einem α-Hcf106-Antikörper (gegen Hcf106 aus *Zea mays*; 1:5000) und HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG (1:5000) wurden Hcf106-Proteine in den Spuren immunologisch detektiert. Größe von Markerprotein in kDa.

Anschließend wurde die Transkription des *Hcf106*-Gens überprüft. Dazu wurde eine Intron-überspannende PCR mit den Primern hcf106-E5E6-fw und hcf106-E5E6-rev mit

cDNA aus der Mutante durchgeführt. Im Vergleich zur cDNA aus dem WT Col-0 konnte auch in der Mutante ein PCR-Produkt nachgewiesen werden, das sich vom Produkt genomischer DNA unterscheidet (Abb. 18B). Es wurde also nachgewiesen, dass auch in der Δ*hcf106*-Mutante ein Transkript des Gens gebildet wurde. Um zu überprüfen, ob das Transkript die T-DNA enthält, wurde wiederum eine PCR-Analyse mit den Primerpaaren durchgeführt, die auch zum Nachweis der T-DNA-Insertion verwendet wurden (Abb. 18C). Es ist zu erkennen, dass mit dem T-DNA-spezifischen Primer LB-XL und dem Primer RP2 auf Δ*hcf106*-cDNA zwei PCR-Produkte gebildet wurden; eines, das dem PCR-Produkt der gDNA der Mutante entsprach, und eines, das wesentlich kleiner war. Dieses kleinere Produkt entspricht vermutlich einer mRNA, die zwar die T-DNA, nicht aber Intron 4 enthält. Die Mutante bildet also trotz T-DNA-Insertion im Gen noch Transkripte, die zur Translation verwendet werden können.

Daher musste der Knock-Out noch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Dazu wurden aus je 50 mg Rosettenblättern der Mutante und von WT-Pflanzen Gesamtproteine, lösliche Proteine und Membranproteine isoliert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Membran erfolgte die Detektion von Hcf106 mit einem spezifischen α-Hcf106-Antikörper. Wie in Abb. 18D zu sehen ist, konnte Hcf106 im Gesamtprotein und in der Membranprotein-Fraktion des WT, nicht aber in den Spuren der Mutante nachgewiesen werden.

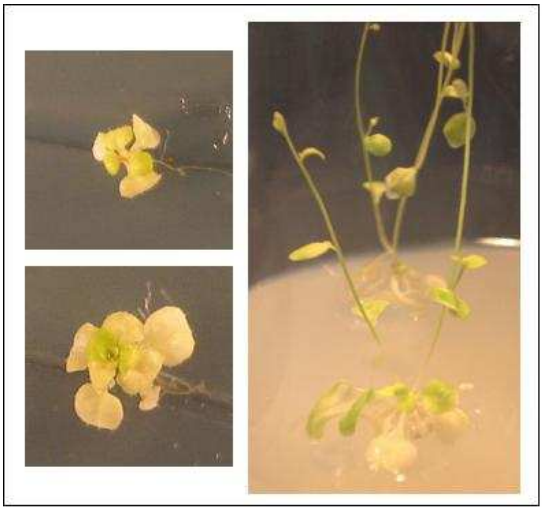


Abb. 19: Makroskopischer Phänotyp der Δ*hcf106*-Mutante.
Δ*hcf106*-Pflanzen wurden auf Saccharose-haltigem Medium unter Langtagbedingungen bei reduziertem Licht (ca. 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) angezogen. Die Abb. zeigt Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Der Knock-Out von Hcf106 zeigte bei autotrophen Wachstumsbedingungen einen im Sätzlingsstadium letalen Phänotyp. Auf Saccharose-haltigem Medium angezogen, brachten homozygote Samen der Mutante einen gelblichen Phänotyp hervor, dessen späte Rosettenblätter sowie Stiel und Stielblätter grünlich erschienen (Abb. 19). Die erblühende Pflanze brachte jedoch keine fertilen Samen hervor.

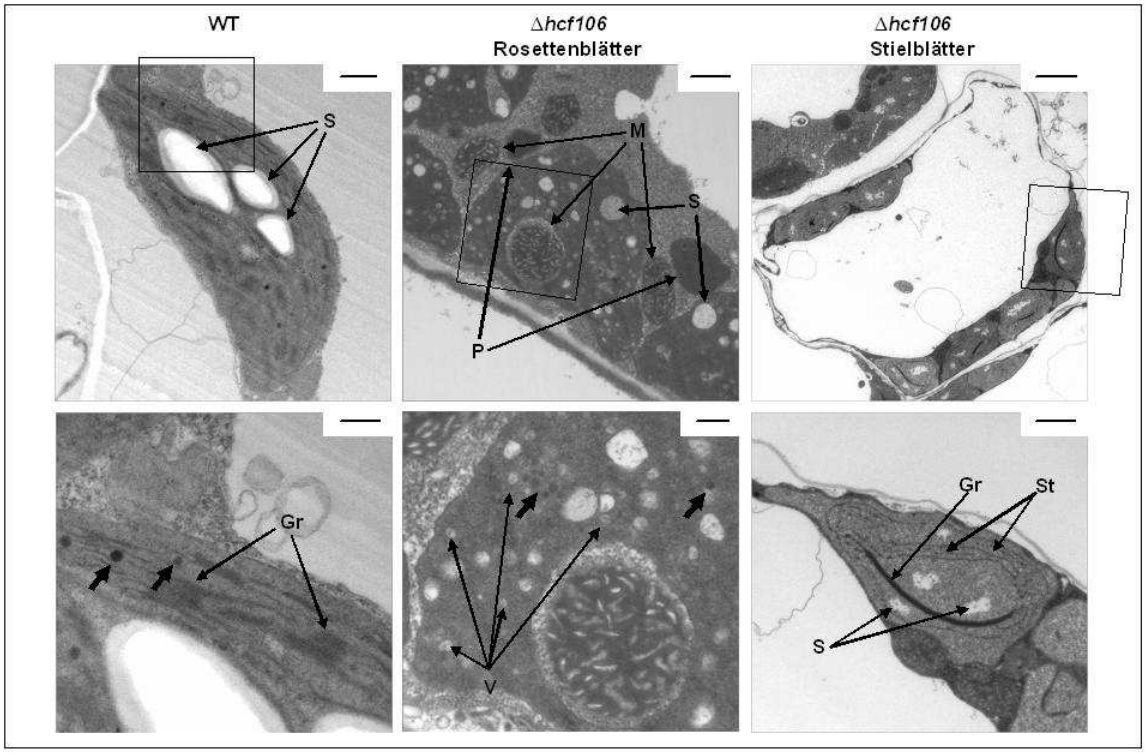


Abb. 20: TEM-Aufnahmen der Δ*hcf106*-Mutante im Vergleich zum WT.
Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen von Δ*hcf106*-Rosetten- und Stielblättern im Vergleich zu WT-Rosettenblättern. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 400 nm bei Δ*hcf106*-Rosettenblättern 700 nm bzw. 200 nm und bei Δ*hcf106*-Stielblättern: 3000 nm bzw. 1000 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. M: Mitochondrien; P: Proplastid; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; St: Stroma-Thylakoide; S: Stärke; V: Vesikel.

Unter dem Elektronenmikroskop konnte in den gelblichen Rosettenblättern keine Thylakoidmembran-Struktur erkannt werden und auch die Struktur der Chloroplasten aus Rosettenblättern war unregelmäßig (Abb. 20). In den Stielblättern hingegen sind einzelne große Grana-Strukturen und einzelne Stroma-Thylakoide zu sehen. Die Chloroplasten-Struktur blieb jedoch unregelmäßig. In den gelblichen bzw. bleichen Rosettenblättern konnten im Vergleich zum WT vermehrt Vesikel und Plastoglobuli erkannt werden, die in Chloroplasten von Stielblättern nicht mehr vorhanden waren. Die Einlagerung von Stärke beschränkte sich in den gelblichen Blättern auf kleine, aber

zahlreiche Körnchen. Im Vergleich zum WT waren pro Zelle weniger Chloroplasten zu sehen, die sowohl in Rosetten- als auch in Stielblättern kleiner erscheinen als in WT-Chloroplasten. Die Δ*hcf106*-Chloroplasten waren verkleinert und zeigten keine klassische Chloroplasten-Form.

Ermittlungen des Chl-Gehaltes für Δ*hcf106*-Rosettenblätter zeigte eine Reduktion der Chl-Menge auf ca. 3 % (Abb. 21A), wobei die Menge an Chl*a* mit 2,4 % stärker verringert war als Chl*b* (4,1 %). Das ergab im Vergleich zum WT ein verringertes Verhältnis von Chl*a* zu Chl*b* von 2,375 auf 1,422 in der Mutante (Abb. 21B). Da der Car-Gehalt in der Mutante auf 11 % relativ zum WT reduziert war (Abb. 21A), ergab das ein stark reduziertes Verhältnis vom Chl- zum Car-Gehalt. Im WT lag ein Verhältnis von 6,885 vor, während für die Δ*hcf106*-Mutante ein Wert von 1,898 vorlag. Dies lässt auf starken oxidativen Stress schließen.

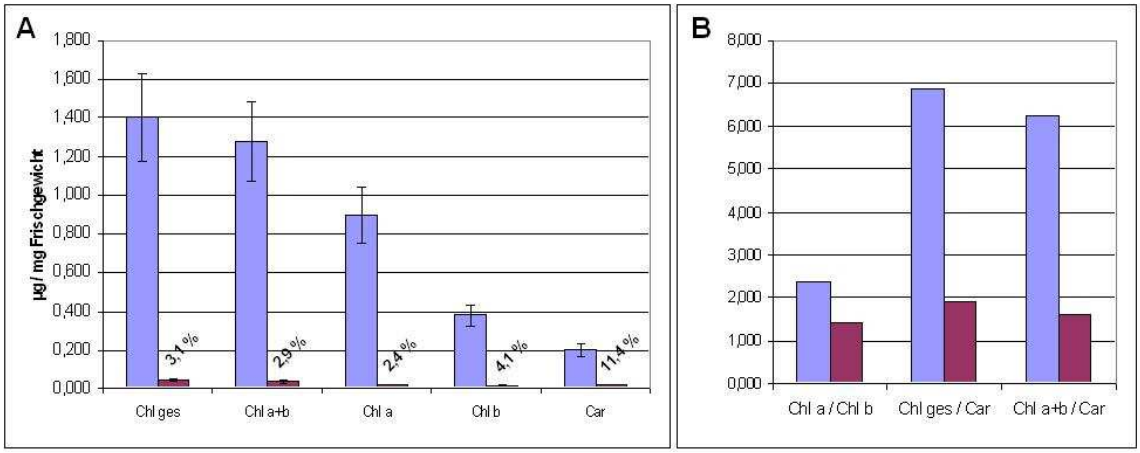


Abb. 21: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von Δ*hcf106*.
Für die Bestimmung von Chl- und Car-Mengen wurden aus WT- bzw. Δ*hcf106*-Rosettenblättern mit 80 %-igem Aceton die Farbstoffe isoliert und photometrisch bestimmt. Dabei wurde Chl ges bei 652 nm, Chl*a* bei 663 nm, Chl*b* bei 645 nm und Car bei 470 nm gemessen. In **A** sind die jeweiligen Chl- bzw. Car-Mengen von WT (blau) und Mutante (lila) relativ zum Frischgewicht aufgetragen. Die in % angegebenen Werte zeigen die jeweils dargestellten Werte der Mutante relativ zum WT. **B**: Aus den in A gezeigten Werten wurden für Δ*hcf106* (lila) und den WT (blau) die Verhältnisse von Chl*a* zu Chl*b* und von Chl ges bzw. Chl*a* + Chl*b* zum Car-Anteil berechnet und aufgetragen.

Um festzustellen, ob wirklich nur die T-DNA-Insertion im *Hcf106*-Gen für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich war, wurde zunächst eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden je 7 µg gDNA von Mutante und WT mit *Hin*dIII hydrolysiert, auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Detektiert wurde mit einer Sonde, die 0,7 kbp der T-DNA

darstellte. Es wurde ein 2,3 kbp großes Fragment für die untersuchte T-DNA-Insertion erwartet. Dieses war nach der Hybridisierung auch in der Δ*hcf106*-Spur sichtbar (Abb. 22A), jedoch wurden für die Mutante im Vergleich zum WT auch fünf weitere Signale detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass sich noch mindestens fünf weitere T-DNA-Insertionen im Genom der Δ*hcf106*-Mutante befinden.

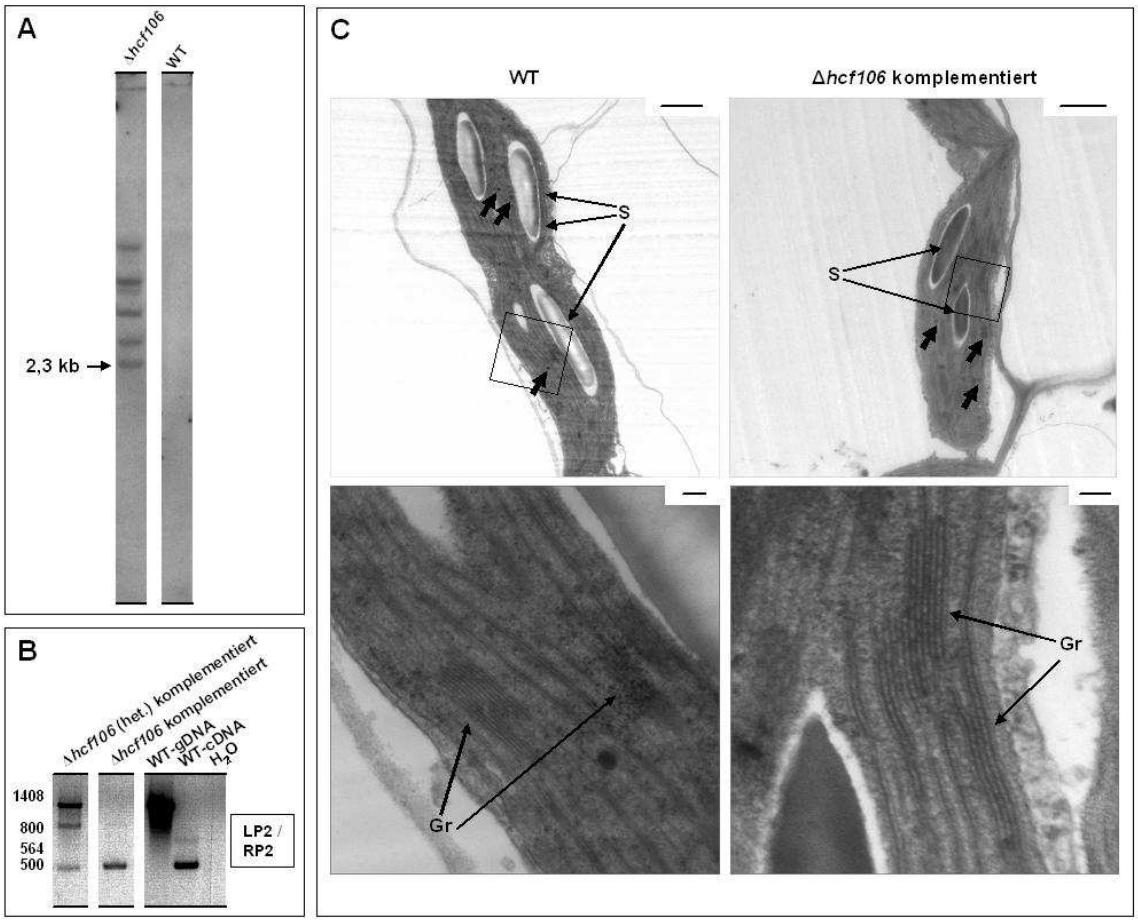


Abb. 22: Southern Blot-Analyse und Komplementation der Δ*hcf106*-Mutante.
A: Je 7 µg genomische DNA von Δ*hcf106* und WT Col-0 wurde mit *Hin*dIII restringiert, anschließend über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt und für eine Southern-Hybridisierung auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Als Sonde diente ein 0,7 kbp großer Teil der T-DNA.
Heterozygote Δ*hcf106*-Pflanzen wurden mit *Hcf106*-cDNA unter Kontrolle eines 35S-Promotors mittels *Agrobakterium*-Transformation komplementiert. Die Samen wurden auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. **B**: Zum Nachweis der erfolgreichen Komplementation wurde gDNA aus BASTA-resistenten komplementierten Pflanzen isoliert und damit und im Vergleich zu WT-gDNA und WT-cDNA eine PCR mit den in der Abb. angegebenen Primern (vgl. Abb. 18) durchgeführt. Die Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **C**: Die Abb. zeigt TEM-Aufnahmen einer komplementierten Δ*hcf106*-Pflanze im Vergleich zum WT. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 100 nm und bei Δ*hcf106* (komplementiert) 1000 nm bzw. 100 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. S: Stärke; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran.

Damit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die zusätzlichen T-DNA-Insertionen für den Phänotyp verantwortlich sind. Daher wurde eine Komplementation der Mutante mit *Hcf106*-cDNA unter 35S-Promotor-Kontrolle durchgeführt. Da die Δ*hcf106*-Mutation steril ist, wurde die Transformation mit heterozygoten Pflanzen durchgeführt, die anschließend über die im Transformationsvektor enthaltene BASTA-Resistenz selektioniert werden konnten. BASTA-resistente Pflanzen wurden daraufhin mittels PCR auf ihren Genotyp hin untersucht. Abb. 22B zeigt, dass heterozygote Pflanzen, die mit *Hcf106*-cDNA transformiert wurden, sowohl eine Bande aufweisen, die in Größe dem erwarteten Produkt für WT-gDNA entspricht, als auch eine Bande, die für WT-cDNA erwartet wurde. Für homozygote Pflanzen, die erfolgreich komplementiert wurden, konnte nur ein der cDNA entsprechendes PCR-Produkt erhalten werden. Diese Pflanzen zeigten makroskopisch einen WT-Phänotyp.

Anschließend wurden diese auch mittels TEM-Aufnahmen untersucht (Abb. 22C). Hier zeigte sich, dass die Chloroplasten sowohl in Anzahl und Größe, als auch in Form und Struktur der Thylakoidmembran dem WT entsprechen. Folglich war die Komplementation der Mutante mit *Hcf106*-cDNA erfolgreich und die beschriebene T-DNA-Insertion für den gezeigten Phänotyp verantwortlich.

Zusammenfassend zeigt sich bei der Δ*hcf106*-Mutante ein nur auf die T-DNA-Insertion im *Hcf106*-Gen zurückführbarer stark ausgeprägter Phänotyp. Homozygote Pflanzen wachsen unter autotrophen Wachstumsbedingungen nicht über das Keimlingsstadium hinaus und sind auch bei Anzucht unter heterotrophen Wachstumsbedingungen steril und wesentlich kleiner als WT-Pflanzen. Dabei erscheinen späte Rosettenblätter und Stielblätter im Vergleich zu den meisten Rossettenblättern schwach grünlich und weisen auch eine gewisse Struktur in der Thylakoidmembran auf. Frühere Blätter sind dagegen gelblich weiß und weisen keine interne Membranstruktur auf.

1.5 Charakterisierung der Δ*psy*-Mutante

Da in *Synechocystis sp.* PCC 6308 ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Alb3p-homologen Slr1471p und der Assemblierung von Carotinoiden in Proteinkomplexe der Thylakoidmembran vermutet wird (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung), sollte auch eine T-DNA-Insertion im Gen für die Phytoensynthase (PSY), das zentrale Enzym

der Carotinoid-Biosynthese (Übersicht: Qin et al., 2007) untersucht werden. Diese Mutante wurde wie die vorher beschriebenen Δ*hcf106*- und Δ*cpftsy*-Mutanten etabliert.

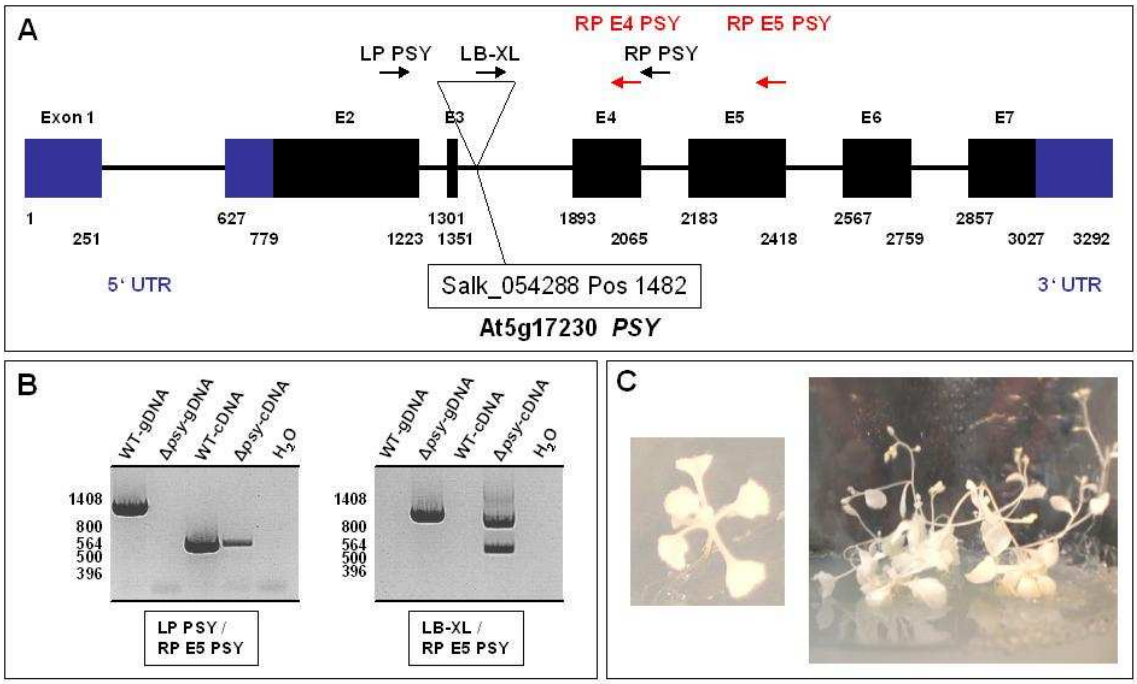


Abb. 23: Charakterisierung der T-DNA-Insertion Salk_054288 und makroskopischer Phänotyp.

A: Die Skizze zeigt die Struktur des *PSY*-Gens (At5g17230), wobei die 5'- bzw. 3'-nicht-translatierten Regionen als blaue Boxen, kodierende Exons als schwarze Boxen und nicht kodierende Introns als schwarze Linien dargestellt sind. Die T-DNA-Insertion ist durch ein Dreieck gekennzeichnet. Oligonukleotide für PCR-Analysen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und oberhalb benannt. Primer für RT-PCR bzw. Genotypisierung sind als rote Pfeile gekennzeichnet und ihre Bezeichnung ist ebenfalls darüber angegeben. **B**: Zum Nachweis der T-DNA-Insertion und eines T-DNA enthaltenden Transkripts wurden PCRs mit den jeweils in der Abb. dargestellten Primern durchgeführt und auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **C**: Δ*psy*-Pflanzen wurden auf Saccharose-haltigem Medium unter Langtagbedingungen bei reduziertem Licht (ca. 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) angezogen. Die Abbildungen zeigt Pflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien.

Bei Pflanzen, die einen Phänotyp zeigten, musste die homozygote T-DNA-Insertion (Abb. 23A) verifiziert werden. Dazu wurde eine PCR-Analyse mit einer Kombinationen aus den Primern LP PSY und RP E5 PSY, die die T-DNA-Insertion umschließen, und einem T-DNA-spezifischen Primer LB-XL durchgeführt. Für die Primer LP PSY und RP E5 PSY wurde ein PCR-Produkt für WT-gDNA, nicht aber für Δ*psy*-gDNA erhalten (Abb. 23B). Bei der T-DNA-spezifischen PCR mit dem LP PSY-Primer konnte kein Produkt erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Mit dem Primer RP E5 PSY in Kombination mit dem in der T-DNA liegenden LB-XL-Primer wurde ein Produkt der

erwarteten Größe bei Δ*psy*, nicht aber bei WT-gDNA erhalten. Dadurch wurde die homozygote T-DNA-Insertion verifiziert. Durch Sequenzanalyse des erhaltenen PCR-Produktes konnte die T-DNA-Insertion im Intron 3 an Position 1482 lokalisiert werden.
Auch für die Δ*psy*-Mutante sollte gezeigt werden, ob ein Transkript gebildet wird oder nicht. Dazu wurde eine PCR mit den Primern LP PSY und RP E5 PSY, die sowohl die T-DNA als auch ein zusätzliches Intron (Intron 4) einschließen, durchgeführt. Ein zweiter Ansatz enthielt die Primer LB-XL und RP E5 PSY und war somit T-DNA-spezifisch. Für Δ*psy*-cDNA konnte ein PCR-Produkt erhalten werden, das gleich dem WT-cDNA-Produkt war und sich deutlich vom Produkt für genomische DNA unterschied (Abb. 23B). Dieses wurde auch mittels Sequenzierung untersucht und weist im Vergleich zum WT-Fragment zusätzliche Nukleotide auf, was evtl. auf Fehler beim Spleißen der RNA zurückzuführen ist. Für die T-DNA-spezifsche PCR konnte für die Δ*psy*-gDNA ein Produkt erhalten werden. In der Spur der cDNA der Mutante konnte eine Doppelbande erkannt werden, wobei die größere Bande dem Produkt für die Δ*psy*-gDNA ähnelt. Diese Doppelbande verstärkt die Vermutung, dass es sich bei allen PCR-Produkten der Δ*psy*-cDNA um unterschiedlich bzw. falsch gespleißte mRNA handelt. Dies zeigte, dass auch in der Δ*psy*-Mutante das Gen mitsamt der T-DNA transkribiert wurde. Es kann also nicht klar gesagt werden, ob es sich bei der Δ*psy*-Mutante um einen echten Knock-Out handelt. Die Δ*psy*-Mutante zeigt einen vollkommen weißen Phänotyp mit extremem Zwergenwuchs (Abb. 23C). Auf Erde konnten keine homozygoten Pflanzen angezogen werden. Auf Saccharose-haltigem Medium konnten die Pflanzen bis zur Blüte angezogen werden. Die Pflanzen entwickelten einzelne Samen, die aber steril waren.
TEM-Aufnahmen zeigten, dass Δ*psy*-Pflanzen nur wenige und sehr kleine Chloroplasten enthielten. Es konnten im Vergleich zum WT einzelne Proplastiden erkannt werden. Die entwickelten Chloroplasten zeigten keinerlei Thylakoidmembran-Struktur, jedoch waren große Mengen Stärke in die Chloroplasten eingelagert, die als große Blasen auf den TEM-Aufnahmen zu erkennen waren (Abb. 24). Zusätzlich waren Anhäufungen von Plastoglobuli zu erkennen (Abb. 24, unten rechts).

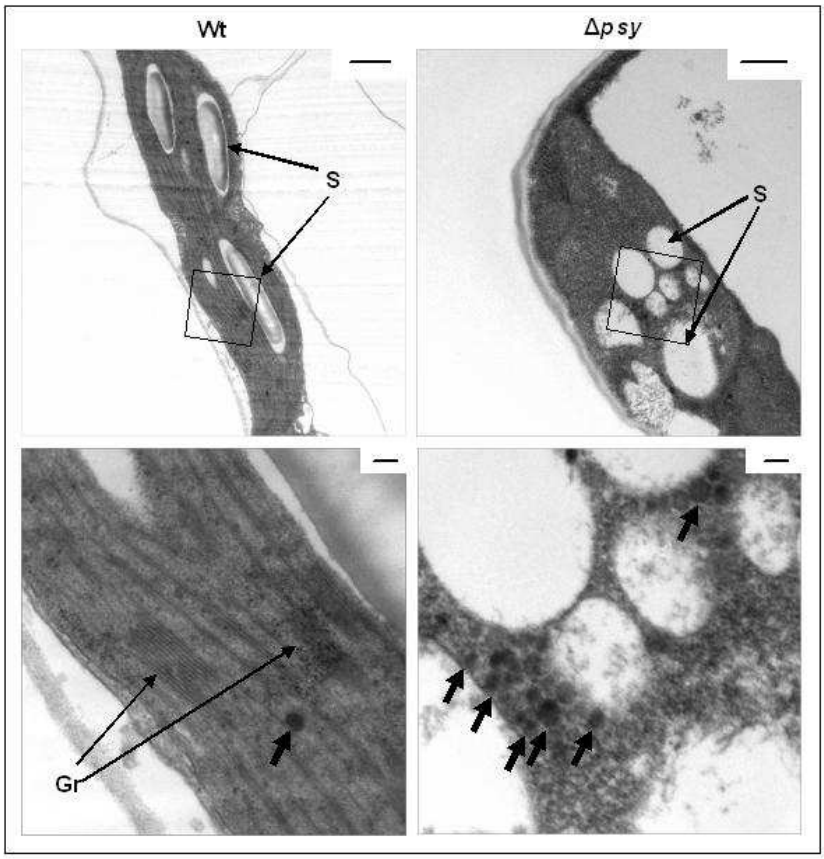


Abb. 24: TEM-Aufnahmen von Δ*psy*-Chloroplasten im Vergleich zum WT.
Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen von Δ*psy*-Chloroplasten im Vergleich zum WT. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 100 nm bei Δ*psy* 900 nm bzw. 100 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; S: Stärke.

Auch die Δ*psy*-Mutante sollte mit der cDNA des *PSY*-Gens komplementiert werden, um zu verifizieren, dass der Phänotyp auf die untersuchte T-DNA-Insertion zurückzuführen ist. Da die Δ*psy*-Pflanzen steril waren, wurden auch hier heterozygote Pflanzen zur Komplementation herangezogen. Zunächst wurden Pflanzen mit *PSY*-cDNA unter Kontrolle des 35S-Promotors transformiert und mittels BASTA-Resistenz selektioniert. BASTA-resistente Pflanzen wurden anschließend mittels PCR auf ihren Genotyp hin untersucht (Abb. 25A). Dabei konnten sowohl komplementierte WT-Pflanzen als auch komplementierte hetero- bzw. homozygote Δ*psy*-Pflanzen gefunden werden. Da jedoch auch WT-Pflanzen, die zusätzlich die *PSY*-cDNA enthielten, einen Phänotyp zwischen dem Δ*psy*-Phänotyp und dem WT-Phänotyp aufwiesen (Abb. 25B), wurde die Komplementation mit einem Konstrukt wiederholt, in dem die *PSY*-cDNA unter Kontrolle des nativen Promotors stand. Wiederum wurde auf die ebenfalls im Konstrukt

enthaltene BASTA-Resistenz selektioniert und die entsprechenden Pflanzen genotypisiert (Abb. 25C).

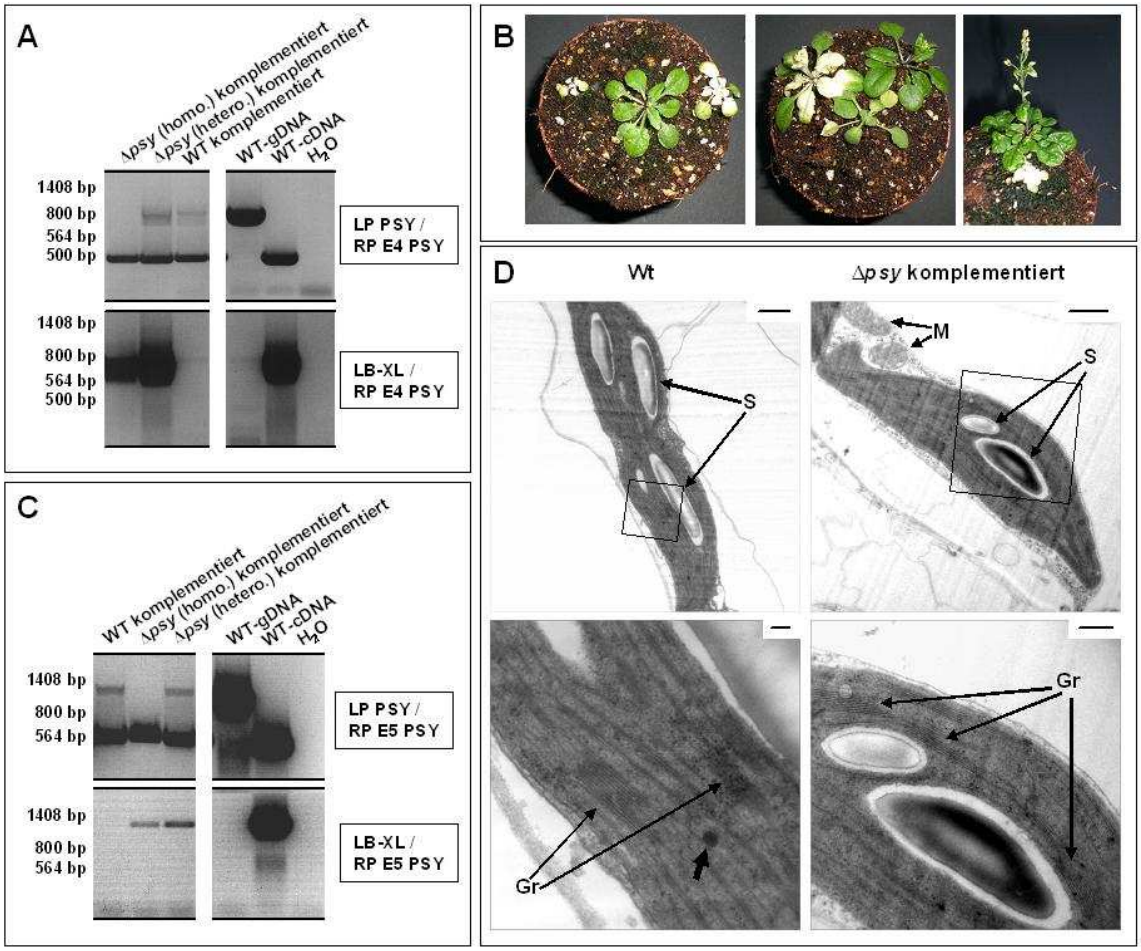


Abb. 25: Komplementationsversuche der Δ*psy*-Mutante.
Δ*psy*-Pflanzen wurden mit *PSY*-cDNA unter Kontrolle eines 35S-Promotors komplementiert. **A**: Zum Nachweis der erfolgreichen Komplementation wurde gDNA aus BASTA-resistenten komplementierten Pflanzen (möglich war: WT Col-0, Δ*psy* homozygot und heterozygot) isoliert und damit im Vergleich zu WT-gDNA und WT-cDNA eine PCR mit den in der Abb. angegebenen Primern durchgeführt (vgl. Abb. 23). Die Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **B**: Komplementierte Δ*psy*-Pflanzen wurden auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. Die Abb. zeigt Pflanzen mit unterschiedlichen Phänotypen.
Δ*psy*-Pflanzen wurden anschließend mit *PSY*-cDNA unter Kontrolle des nativen Promotors komplementiert. **C**: Zum Nachweis der erfolgreichen Komplementation wurde gDNA aus BASTA-resistenten komplementierten Pflanzen isoliert und damit im Vergleich zu WT-gDNA und WT-cDNA eine PCR mit den in der Abb. angegebenen Primern durchgeführt (vgl. Abb. 23). Die Produkte wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Markerangaben in bp. **D**: Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen von Chloroplasten komplementierten Δ*psy*-Pflanzen im Vergleich zum WT. Die Balken entsprechen beim WT 1000 nm bzw. 100 nm bei Δ*psy* (komplementiert) 900 nm bzw. 300 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. M: Mitochondrien; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; S: Stärke.

Auch hierbei konnte die Transformation der cDNA in allen drei möglichen Genotypen (homozygot WT, heterozygot und homozygot Δ*psy*) gefunden werden. Jedoch zeigten alle Pflanzen makroskopisch einen WT-Phänotyp. Daher wurden Chloroplasten komplementierter homozygoter Δ*psy*-Pflanzen unter dem Elektronenmikroskop betrachtet (Abb. 25D). Diese zeigten sowohl in Größe, Anzahl und Form der Chloroplasten, als auch in Struktur der Thylakoidmembran den WT-Phänotyp. Daraus konnte geschlossen werden, dass die T-DNA-Mutation im *PSY*-Gen verantwortlich für den beschriebenen Phänotyp war.

Zur Δ*psy*-Mutante ist zusammenfassend zu sagen, dass aufgrund der RT-PCR-Ergebnisse nicht eindeutig gesagt werden kann, ob es sich um einen echten Knock-Out handelt. Die Pflanzen zeigen einen vollkommen weißen Phänotyp, aus dessen Blättern weder Chl noch Car isoliert werden können. Die Pflanzen wachsen auf Erde nicht über das Keimlingsstadium hinaus und entwickeln bei heterotrophen Wachstums-bedingungen kleine Pflanzen, die vereinzelt erblühen und sterile Samen hervorbringen. Es ist keinerlei Thylakoidmembran-Struktur erkennbar und eine Komplementation mit der WT-cDNA des *PSY*-Gens zeigte einen eindeutigen epigenetischen Effekt. Durch Komplementation mit *PSY*-cDNA unter nativer Promotor-Kontrolle konnte jedoch gezeigt werden, dass der gezeigte Phänotyp allein auf die T-DNA-Insertion im *PSY*-Gen zurückzuführen ist. Dies spricht dafür, dass die Δ*psy*-Mutante einen Knock-Out des *PSY*-Gens darstellt.

2. Phänotypische Unterschiede in Abhängigkeit zur Lichtintensität

Da es sich bei allen untersuchten Mutanten um Pflanzen handelte, die indirekt in ihrer Photosynthese beeinträchtigt waren, wurde untersucht, ob eine Verringerung der Lichtintensität beim Wachstum einen Einfluss auf den gezeigten Phänotyp hat. Dazu wurden die Mutanten einerseits wie ursprünglich bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (*albino3*, *ffc*$^-$ und Δ*cpftsy*) bzw. 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (Δ*hcf106* und Δ*psy*) angezogen und zusätzlich bei Schwachlicht von nur 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}.

Dabei zeigten bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsene *albino3*-Pflanzen schwach grüne Blätter im Vergleich zu gelblichen Blättern bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (Abb. 26). Diese schwach grüne Färbung setzte sich auch in Stiel und Stielblättern fort.

Die Pflanzen wuchsen jeweils zu ähnlicher Größe und blühten bei beiden Lichtbedingungen selten. Auch der sterile Phänotyp blieb erhalten.

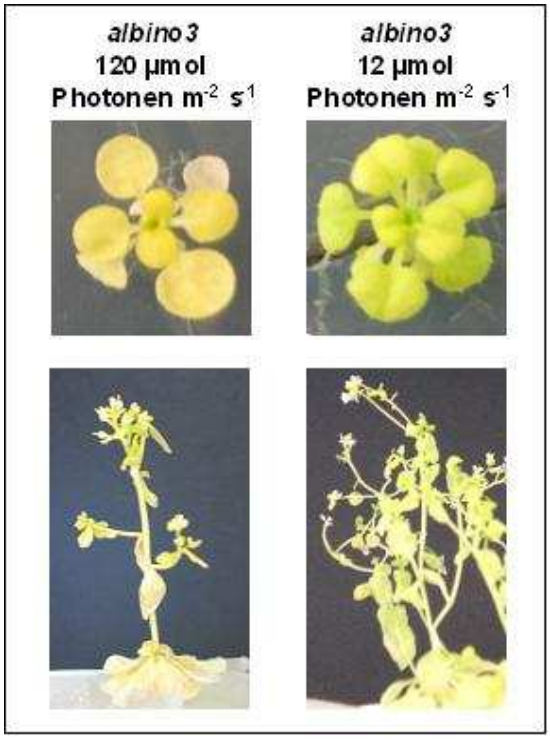


Abb. 26: Phänotyp-Unterschied bei *albino3* abhängig von der Lichtintensität.
albino3-Pflanzen wurden auf Saccharose-haltigem Medium unter Langtagbedingungen bei 120 bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen. Die Abb. zeigt für beide Lichtintensitäten je zwei Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

TEM-Aufnahmen von Chloroplasten aus *albino3*-Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, zeigten einzelne Stroma-Thylakoide (Abb. 27). Größtenteils war jedoch keine Membranstruktur erkennbar. In *albino3*-Chloroplasten aus Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, waren in allen Chloroplasten Membranstrukturen und auch wenige Plastoglobuli zu sehen. Entweder handelte es sich dabei um einzelne Grana-Stapel (Abb. 27, *albino3* 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oben) oder aber die bereits bei *albino3* bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} erkennbaren Stroma-Thylakoide brachten kleine Grana-Stapel hervor (Abb. 27, *albino3* 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} unten).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine Reduktion der Lichtintensität beim Wachstum der *albino3*-Mutante den oxidativen Stress reduziert und

dazu führt, dass sich wieder eine gewisse Struktur der Thylakoidmembran ausbilden kann.

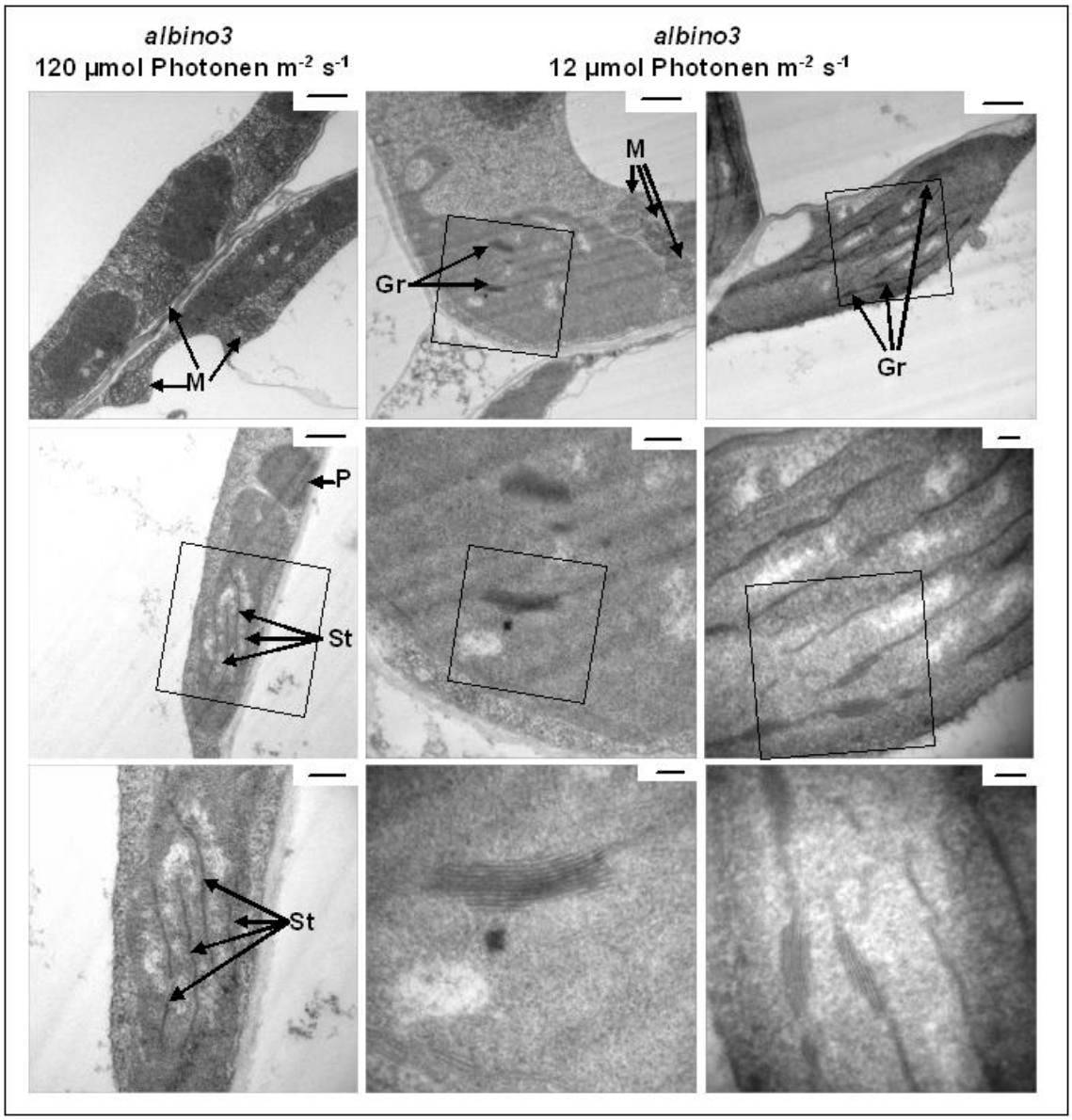


Abb. 27: TEM-Aufnahmen von *albino3*-Chloroplasten abhängig von der Lichtintensität. Die Abb. zeigt TEM-Aufnahmen von *albino3*-Chloroplasten von Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden. Die Balken entsprechen bei *albino3* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) 900 nm, 600 nm bzw. 300 nm, bei *albino3* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; links): 900 nm, 300 nm bzw. 100 nm und bei *albino3* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; rechts) 500 nm, 100 nm bzw. 100 nm. M: Mitochondrien; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; St: Stroma-Thylakoide; S: Stärke.

Auch die Δ*cpftsy*-Mutante zeigte bei weniger Lichteinstrahlung einen deutlich grüneren Phänotyp (Abb. 28). Auch hier konnten ansonsten keine Änderungen des makroskopischen Phänotyps festgestellt werden. TEM-Aufnahmen der entsprechenden

Chloroplasten zeigten, dass bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} WT-ähnliche Thylakoidmembran-Strukturen sichtbar wurden (Abb. 29).

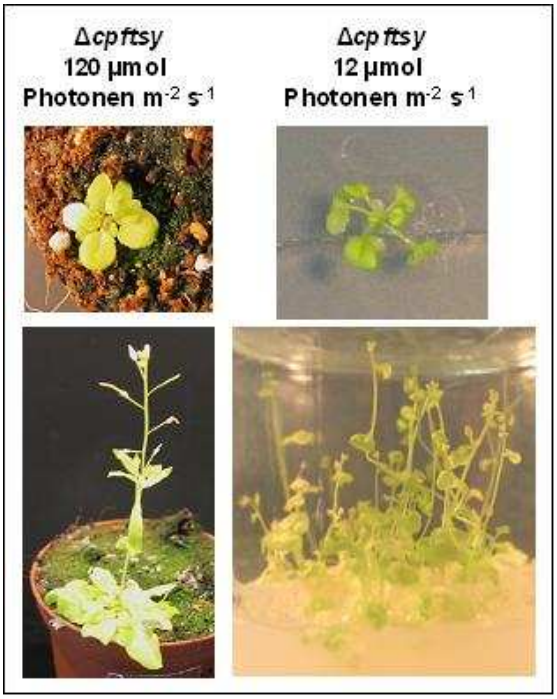


Abb. 28: Phänotyp-Unterschied der Δ*cpftsy*-Mutante abhängig von der Lichtintensität.
Δ*cpftsy*-Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} auf Erde bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} unter heterotrophen Wachstumsbedingungen angezogen. Die Abb. zeigt für beide Lichtintensitäten jeweils Pflanzen zu unterschiedlichen Entwicklungs-stadien.

Bei Δ*cpftsy*-Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, zeigten die Chloroplasten hauptsächlich Stroma-Thylakoide und lediglich sehr flache Grana-Stapel. Bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} konnten im Vergleich dazu normale Grana-Stapel erkannt werden. Auch die Anzahl an Plastoglobuli verringerte sich bei geringer Lichtintensität auf WT-Niveau. In Größe, Form und Anzahl waren die Plastiden der Δ*cpftsy*-Mutante bei beiden Lichtbedingungen gleich. Daraus kann man schließen, dass auch hier eine reduzierte Lichtintensität beim Wachstum den oxidativen Stress verringert und zu einer Normalisierung der Thylakoidmembran-Struktur führt, was eine stärkere grüne Färbung der Blätter zur Folge hat.

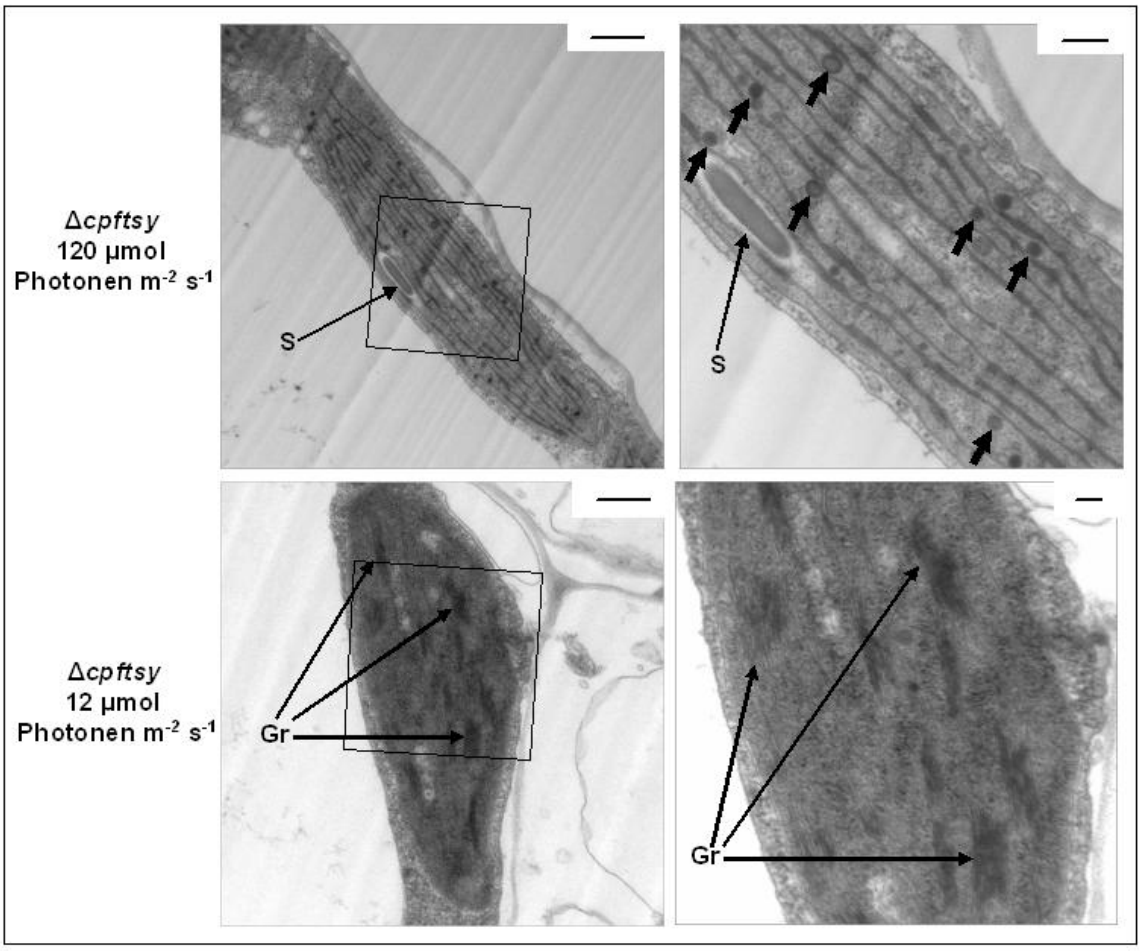


Abb. 29: TEM-Aufnahmen von Δ*cpftsy*-Chloroplasten abhängig von der Lichtintensität. Die Abb. zeigt TEM-Aufnahmen von Δ*cpftsy*-Chloroplasten von Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden. Die Balken entsprechen bei Δ*cpftsy* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) 900 nm, 700 nm bzw. 200 nm und bei Δ*cpftsy* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) 400 nm bzw. 100 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; S: Stärke.

Δ*hcf106*-Pflanzen zeigten bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} nur einzelne gelblich-weiße Blätter (Abb. 30). Die meisten Rosettenblätter zeigten eine deutliche Grünfärbung im Vergleich zu Pflanzen, die bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden. Auch die Stielblätter erschienen grüner als bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}. Andere Änderungen des makroskopischen Phänotyps konnten nicht festgestellt werden. So blieb auch der sterile Phänotyp der Δ*hcf106*-Mutation bei Wachstum bei geringerer Lichtintensität erhalten.

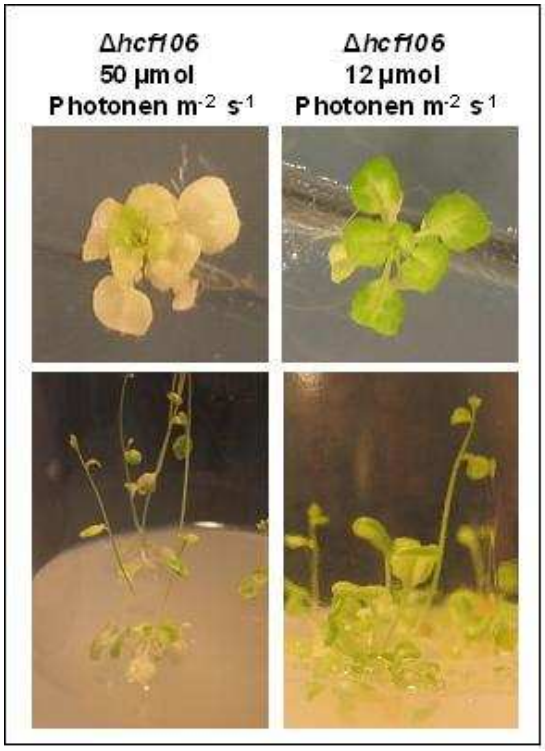


Abb. 30: Phänotyp-Unterschied der Δ*hcf106*-Mutante abhängig von der Lichtintensität.
A: Δ*hcf106*-Pflanzen wurden auf Saccharose-haltigem Medium unter Langtagbedingungen bei 50 bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen. Die Abb. zeigt je zwei Pflanzen bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

TEM-Aufnahmen von Chloroplasten aus Rosettenblättern von Pflanzen, die bei wenig Licht gewachsen waren, zeigten einzelne längliche Grana-Stapel (Abb. 31), ähnlich denen, die in geringerer Anzahl auch in Stielblättern bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} erkannt werden konnten. In diesen Pflanzen waren kaum Plastoglobuli zu sehen. Auch zeigten die Plastiden bei 12 µmol m^{-2} s^{-1} eher die typische Linsenform (Abb. 31, oben rechts). Die Anzahl der Chloroplasten blieb bei beiden Lichtbedingungen unverändert und auch die Größe der Plastiden blieb unverändert und somit kleiner als beim WT.
Auch bei der Δ*hcf106*-Mutante zeigen die Pflanzen bei verringerter Lichtintensität ein stärkeres Ergrünen der Blätter, was mit einer verstärkten Differenzierung der Thylakoidmembran-Struktur einhergeht. Auch hier sind Zeichen für oxidativen Stress wie z.B. Plastoglobuli bei niedriger Lichtintensität deutlich reduziert.

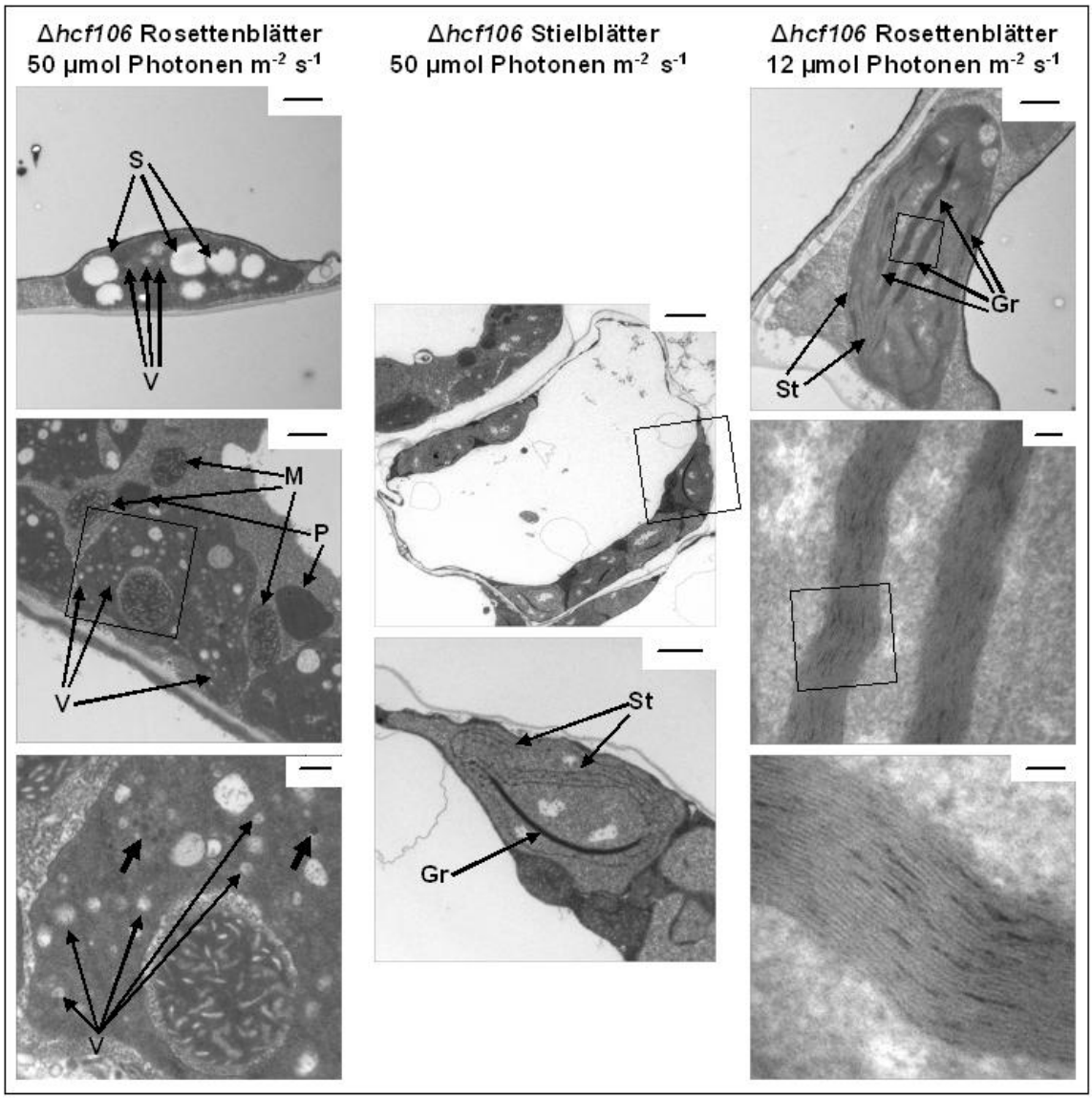


Abb. 31: TEM-Aufnahmen von Δ*hcf106*-Chloroplasten abhängig von der Lichtintensität. Die Abb. zeigt TEM-Aufnahmen von Δ*hcf106*-Chloroplasten von Pflanzen, die bei 50 bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden. Die Balken entsprechen bei Δ*hcf106* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) Rosettenblätter 900 nm, 700 nm bzw. 200 nm, bei Δ*hcf106* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) Stielblättern 3000 nm bzw. 1000 nm und bei Δ*hcf106* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) Rosettenblättern 900 nm, 100 nm bzw. 60 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. M: Mitochondrien; P: Proplastid; Gr: Grana-Stapel der Thylakoidmembran; St: Stroma-Thylakoide; S: Stärke.

Auch Δ*psy*-Pflanzen wurden bei zwei unterschiedlichen Lichtbedingungen untersucht. Dabei konnte kein Unterschied im makroskopischen Phänotyp festgestellt werden. Auch unter dem Elektronenmikroskop konnten keine Veränderungen der Plastiden oder ihrer Membranstruktur erkannt werden (Abb. 15), was zeigt, dass auch eine Verringerung der Lichtintensität keinen Einfluss auf den Phänotyp der Δ*psy*-Mutation zu haben scheint.

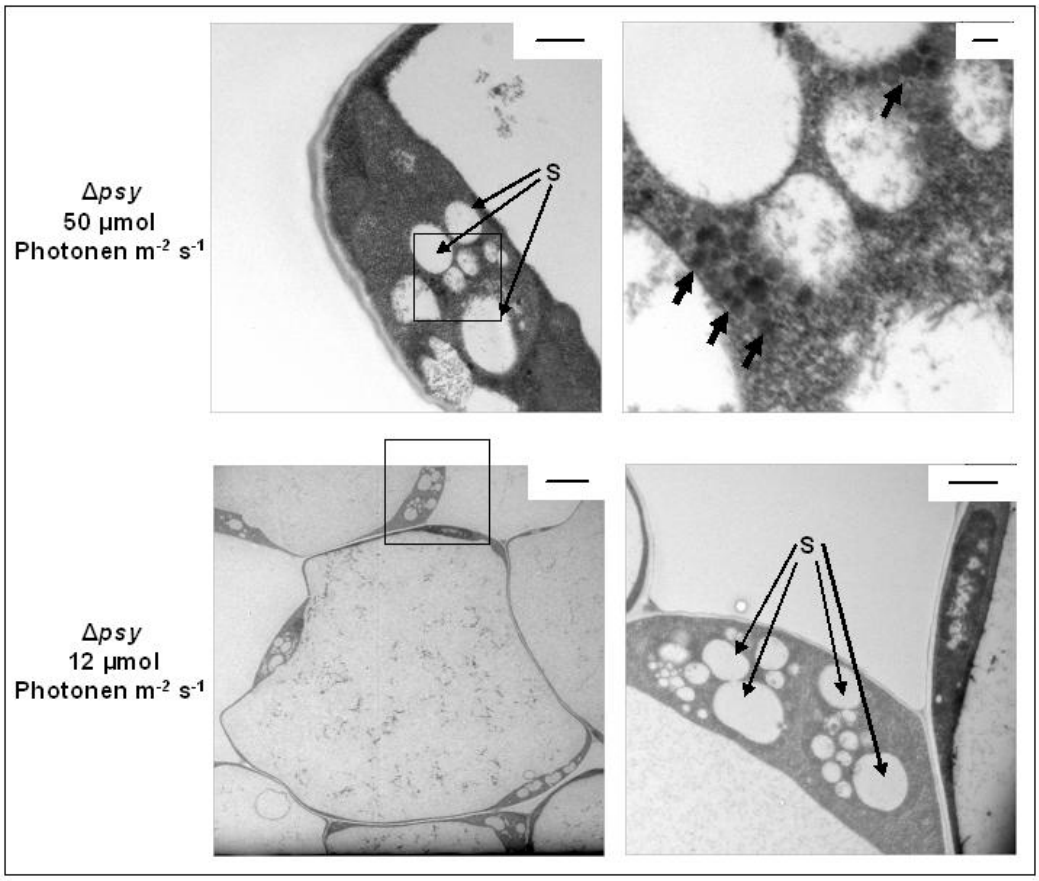


Abb. 32: Membranstruktur bei Δ*psy* in Abhängigkeit zur Lichtintensität.
Die Abb. zeigt TEM-Aufnahmen von Δ*psy*-Chloroplasten von Pflanzen, die bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bzw. 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden. Die Balken entsprechen bei Δ*psy* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) 900 bzw. 100 nm und bei Δ*psy* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) 4000 nm bzw. 1000 nm. Mit kleinen Pfeilen sind Plastoglobuli gekennzeichnet. S: Stärke.

Für alle veränderten Phänotypen wurde eine Bestimmung des Chl- und Car-Gehaltes durchgeführt. Die Werte wurden im Vergleich zum WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) und zu den Werten der jeweiligen Messungen aus der Mutanten-Charakterisierung aufgetragen und in einer Tabelle relativ zu den WT-Werten bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} dargestellt (Abb. 33 und Tab. 4). Bei den Chl-Werten war bei den Mutanten jeweils ein Anstieg auf das Zwei- bzw. Dreifache zu erkennen. Bei *albino3* war bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} sogar ein Anstieg auf das Vierfache des Wertes bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} zu sehen. Beim WT wichen die Chl-Werte bei weniger Licht nur geringfügig von denen bei Standardlicht-Bedingungen ab. Es ergab sich eine schwache Verringerung des Chl*a*-Wertes, während der Chl*b*-Anteil leicht anstieg.

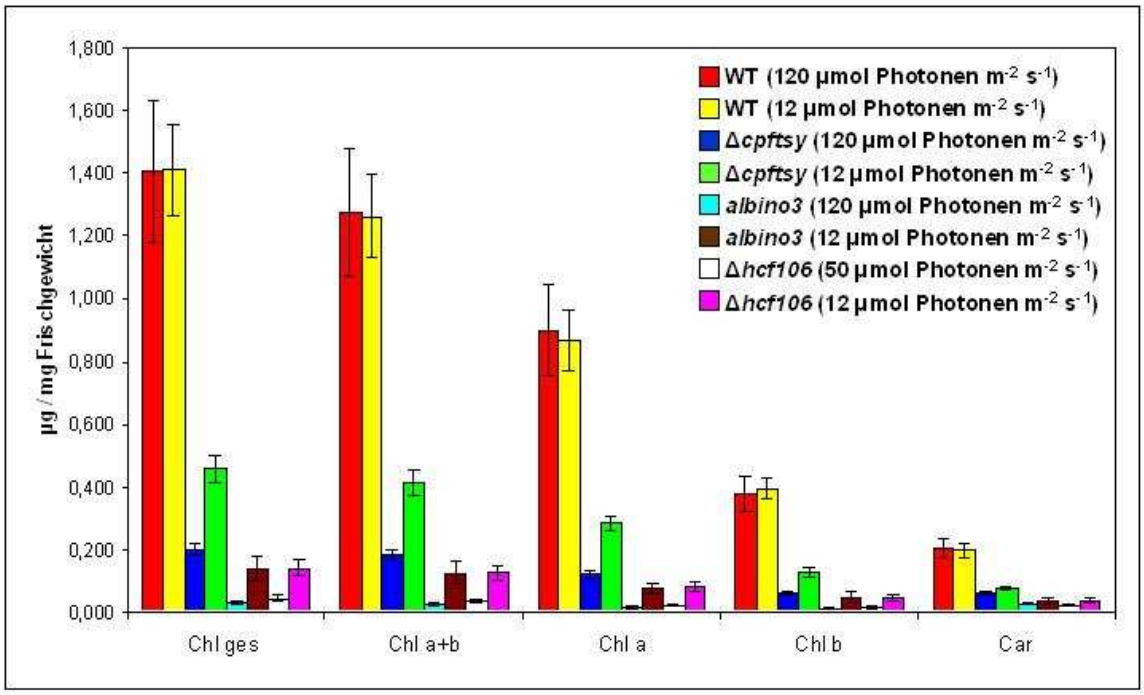


Abb. 33 : Ergebnisse Chl- und Car-Bestimmungen in Abhängigkeit von der Lichtintensität.

Für die Bestimmung von Chl- und Car-Mengen wurden aus WT- bzw. Mutanten-Rosettenblättern mit 80 %-igem Aceton die Farbstoffe isoliert und photometrisch bestimmt. Dabei wurde Chl ges bei 652 nm, Chl*a* bei 663 nm, Chl*b* bei 645 nm und Car bei 470 nm gemessen. Die jeweiligen Chl- bzw. Car-Mengen sind relativ zum Frischgewicht aufgetragen. Die Farbgestaltung ist in der Abb. erklärt.

Der Gehalt an Car hingegen stieg bei den Mutanten nur in geringem Maße an. Beim WT Col-0 konnte ein geringfügiger Rückgang des Car-Gehaltes gemessen werden.

Tab. 4: Relative Chl-Werte aus Abb. 33 bezogen auf WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).

	Chl ges	**Chl*a*+Chl*b***	**Chl*a***	**Chl*b***	**Car**
WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	100±16,2	100±16,0	100±16,3	100±15,5	100±15,8
WT (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	100,5±10,2	98,9±10,3	96,7±10,7	104,1±9,2	97,1±11,5
Δ*cpftsy* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	14,3±1,4	14,3±1,4	13,7±1,4	15,6±1,2	29,1±3,2
Δ*cpftsy* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	32,5±3,2	32,4±3,2	31,5±2,9	34,4±3,8	36,8±2,1
***albino3* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})**	2,3±0,3	2,4±0,4	1,8±0,4	3,4±0,5	14,0±1,0
***albino3* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})**	9,9±2,7	9,8±2,6	8,6±1,9	12,7±4,5	18,6±5,9
Δ*hcf106* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	3,1±0,6	2,9±0,6	2,4±0,4	4,1±1,0	11,4±1,2
Δ*hcf106* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	10,1±1,9	10,0±1,9	9,0±1,9	12,3±1,9	19,7±4,1

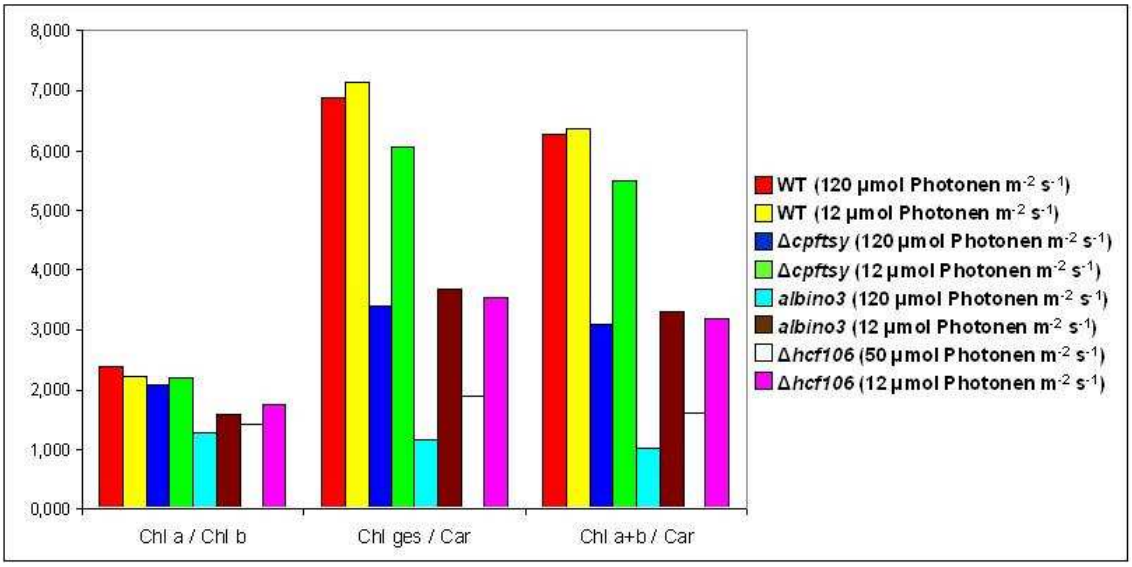


Abb. 34: Bestimmung der Verhältnisse der Chl*a* zu Chl*b* bzw. von Chl zu den Car.
Aus den in Abb. 33 dargestellten Werten wurden für sowohl für den WT als auch für die Mutanten die Verhältnisse von Chl*a* zu Chl*b* und von Chl ges bzw. Chl*a* + Chl*b* zum Car-Anteil berechnet und aufgetragen. Die Farbgestaltung ist in der Abb. erklärt.

Wie bei der Charakterisierung der verschiedenen Mutanten wurden wiederum die Verhältnisse von Chl*a* zu Chl*b* sowie vom gesamten Chl- zum Car-Gehalt berechnet (Abb. 34 und Tab. 5). Beim Chl-Verhältnis ist zu sehen, dass dieses bei Δ*hcf106*, Δ*cpftsy* und *albino3* ansteigt, während beim WT ein leichter Rückgang zu bemerken war. Beim Verhältnis des Chl- zum Car-Gehalt ist beim WT ein leichter Anstieg zu erkennen. Deutlicher sind die Anstiege bei den Mutanten, v.a. bei *albino3*, wo es sich mehr als verdreifacht, während es sich bei Δ*hcf106* und Δ*cpftsy* verdoppelt.

Tab. 5: Absolute Werte für die in Abb. 34 gezeigten Daten.

	Chl*a* / Chl*b*	**Chl ges. / Car**	**Chl*a*+Chl*b* / Car**
WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	2,375	6,885	6,255
WT (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	2,206	7,120	6,367
Δ*cpftsy* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	2,080	3,400	3,074
Δ*cpftsy* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	2,175	6,074	5,500
***albino3* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})**	1,274	1,172	1,009
***albino3* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})**	1,597	3,668	3,306
Δ*hcf106* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	1,422	1,898	1,610
Δ*hcf106* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1})	1,730	3,527	3,170

Diese Ergebnisse zeigen, dass bis auf die Δ*psy*-Mutante alle untersuchten Mutanten einen Phänotyp aufweisen, der sich bei Abschwächung der Lichtintensität und damit des potentiellen photo-oxidativen Stresses einen abgemilderten Phänotyp aufweisen. Nun ist es interessant zu sehen, ob der veränderte Phänotyp auch auf Protein-Ebene bei den jeweiligen Mutanten zu sehen ist.

3. Protein-biochemische Analysen

Um zu überprüfen, ob der im vorigen Teil beschriebene Unterschied im Phänotyp abhängig zur Lichtintensität auch auf Proteinebene auftritt, wurden im Weiteren 2D-BN/SDS-, Western Blot- und *in vivo*-Markierungsanalysen durchgeführt, deren Ergebnisse im folgenden Teil näher behandelt werden.

3.1 Zwei-dimensionale BN/SDS-PAGE-Untersuchungen

Mit der BN-PAGE lassen sich Proteinkomplexe im nativen Zustand ihrer Größe entsprechend auftrennen. Dazu werden die Proteinkomplexe mit einem milden Detergenz aus Membranen isoliert und auf einem Gradienten-Gel aufgetrennt. In einer 2. Dimension werden anschließend mittels SDS-PAGE die Komplexe in ihre einzelnen Protein-Bestandteile aufgeteilt.

Der BN-Gel-Streifen von WT-Gesamtmembranen aus Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, zeigt das klassische Bandenmuster (Abb. 35A). Es sind alle Komplexe des Photosynthese-Apparates und auch Assemblierungsintermediate wie z.B. RC47 oder PSII-Monomer erkennbar. In der 2. Dimension der WT-Probe konnten alle PSII-Assemblierungskomplexe erkannt werden (Abb. 35B II und IV bis IX). Dabei ist auch freies CP47 und CP43 zu erkennen (Abb. 35B VIII und IX). PSII-Superkomplexe konnten nicht in dem Ausmaß isoliert werden, wie es anhand der Referenzabbildung (Anhang) erwartet wurde (Abb. 35B, SC). Dies hat vermutlich methodische Gründe.

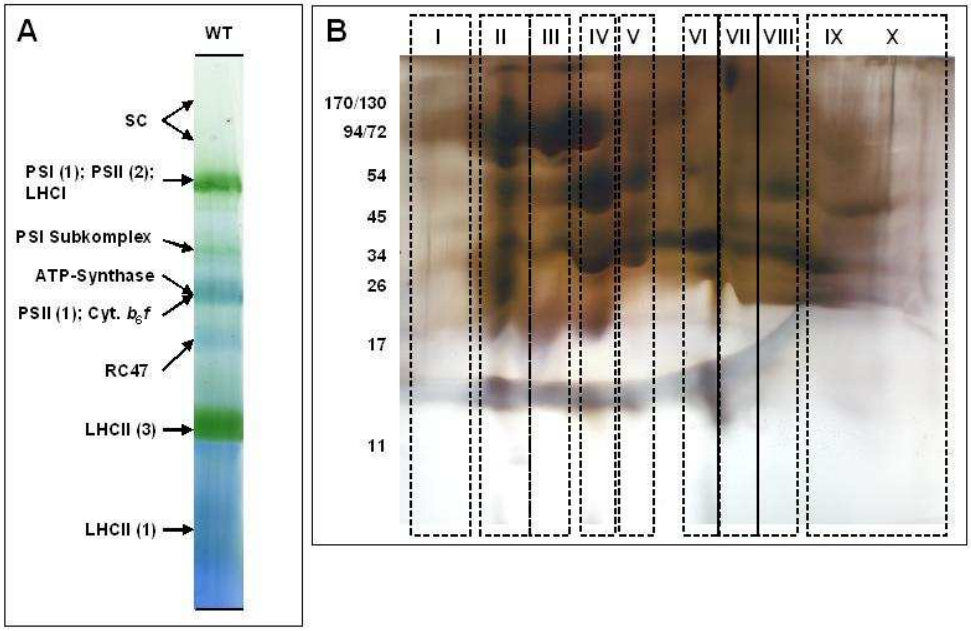


Abb. 35: BN- und BN/SDS-PAGE vom WT zum Vergleich.
A: Aus 70 mg WT-Rosettenblättern, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, wurden Membranen und daraus Proteinkomplexe isoliert und auf einem nativen Gradientengel (4 bis 16 %) aufgetrennt. LHCII (1): LHCII-Monomer; LHCII (3): LHCII-Trimer; RC47: CP43-freies PSII-Monomer; PSII(1): PSII-Monomer; Cyt. *b_6f*: Cytochrom *b_6f*-Komplex; PSI(1): PSI-Monomer; LHCI: PSI-Monomer-gekopelte LHCI-Proteine; PSII(2): PSII-Dimer; SC: PSII-Superkomplexe. **B:** Der Streifen wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12,5 %-igen Gel in eine 2. Dimension gebracht, in der die Protein-Komplexe der BN-PAGE in ihre Bestandteile aufgetrennt wurden. Das SDS-Gel wurde zunächst mit Coomassie und anschließend mit Silber gefärbt. Markerangaben in kDa. I: SC; II: PSI(1) mit LHCI, LHCII(2); III: PSI-Subkomplex; IV: ATP-Synthase; Cyt. *b_6f*; V: RC47: VI: RC (Reaktionszentrum); VII: LHCII(3); VIII: LHCII(3), freies CP47; IX: LHCII(1), freies CP43; X: andere freie Proteine.

Für bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogene *albino3*-Pflanzen waren keine deutlichen Banden erkennbar. Wuchsen die Pflanzen jedoch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} konnten deutlich LHCII-Trimere, die Banden der ATP-Synthase, des Cytochrom *b_6f*-Komplexes und des monomeren Photosystem II-Komplexes, die Banden mit PSII-Dimeren und PSI-Monomeren und auch schwache Banden der Superkomplexe erkannt werden (Abb. 36A, rechts). Trennte man die Komplexe mittels SDS-PAGE in einer 2. Dimension in ihre Bestandteile auf, so war zu sehen, dass auch bei *albino3*-Pflanzen, die bei Standard-Licht angezogen worden waren, alle Komplexe vorhanden waren (Abb. 36B). Jedoch ist v.a. bei den Superkomplexen und bei den Photosystemen, sowie bei den Trimeren von LHCII ein deutlicher Anstieg bei *albino3*-Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, im Vergleich zu *albino3*-Pflanzen bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} zu sehen.

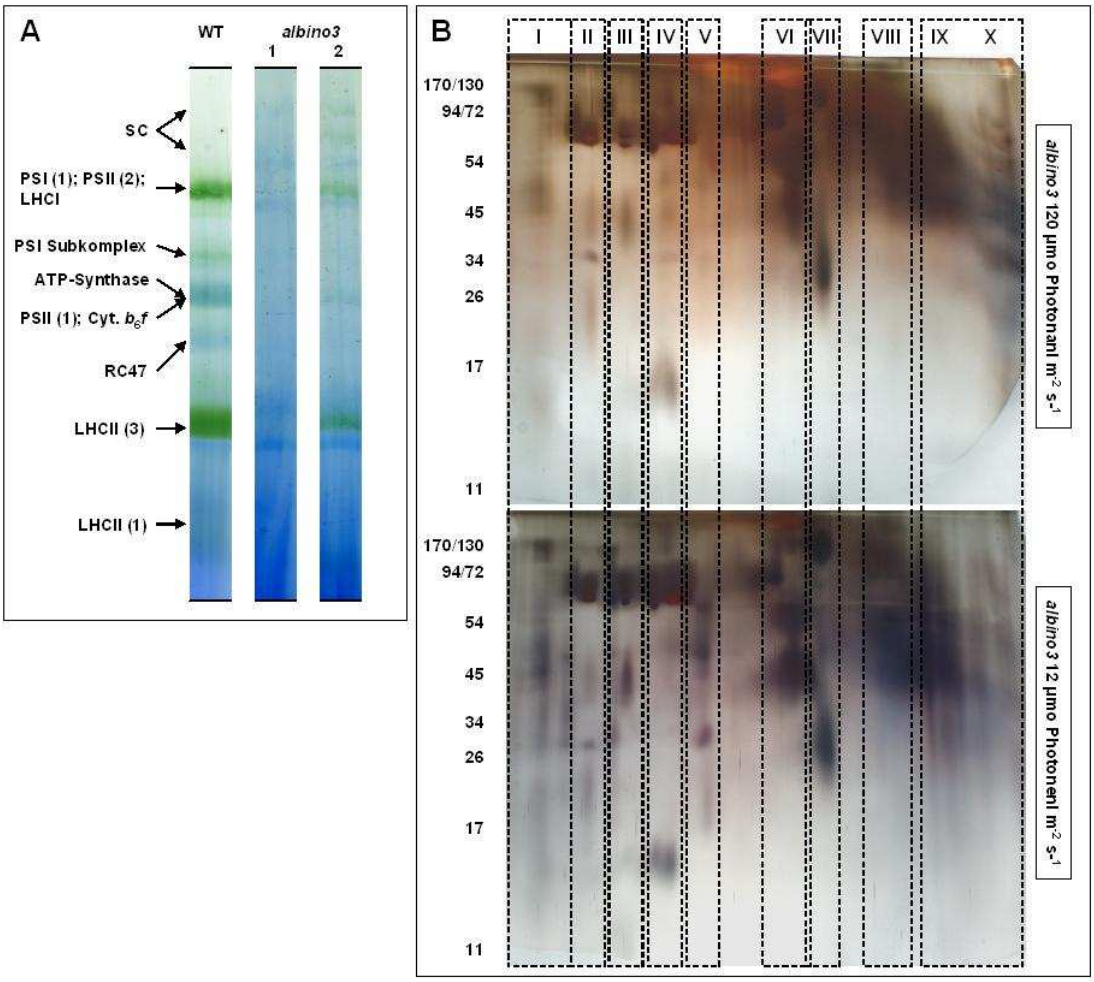


Abb. 36: BN- und BN/SDS-PAGE von *albino3* im Vergleich zum WT.
A: Aus 70 mg Rosettenblättern von WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; WT) und *albino3* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranen und daraus Proteinkomplexe isoliert und auf einem nativen Gradientengel (4 bis 16 %) aufgetrennt. LHCII (1): LHCII-Monomer; LHCII (3): LHCII-Trimer; RC47: CP43-freies PSII-Monomer; PSII(1): PSII-Monomer; Cyt. b_6f: Cytochrom b_6f-Komplex; PSI(1): PSI-Monomer; LHCI: PSI-Monomer-gekopelte LHCI-Proteine; PSII(2): PSII-Dimer; SC: PSII-Superkomplexe. **B:** Die BN-Gel-Streifen von *albino3* wurden mittels SDS-PAGE auf einem 12,5 %-igen Gel in eine 2. Dimension gebracht, in der die Protein-Komplexe der BN-PAGE in ihre Bestandteile aufgetrennt wurden. Die SDS-Gele wurden zunächst mit Coomassie und anschließend mit Silber gefärbt. Markerangaben in kDa. I: SC; II: PSI(1) mit LHCI, LHCII(2); III: PSI-Subkomplex; IV: ATP-Synthase; Cyt. b_6f; V: RC47: VI: RC (Reaktionszentrum); VII: LHCII(3); VIII: LHCII(3), freies CP47; IX: LHCII(1), freies CP43; X: andere freie Proteine. Vgl. auch Abb. 35.

Bei 2D-BN/SDS-Analysen der *ffc*$^-$-Mutante (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) konnten im Vergleich zum WT sowohl im BN-Gel (Abb. 37A) als auch im 2D-Gel (Abb. 37B) fast keine Unterschiede festgestellt werden. Nur der PSI-Subkomplex erscheint im BN-Gel leicht reduziert, während RC47 etwas verstärkt erscheint (Abb. 37A). In der 2. Dimension erscheinen ebenfalls fast alle Komplexe und ihre Bestandteile ähnlich

zum WT (Abb. 37B). Gut zu erkennen sind bei *ffc*$^-$ die PSII-Superkomplexe. Die PSII-Assemblierungsintermediate RC, CP47 und auch PSII-Monomer erscheinen im Vergleich zum WT verstärkt, während die PSII-Dimer-Signale verglichen zum WT abgeschwächt erscheinen.

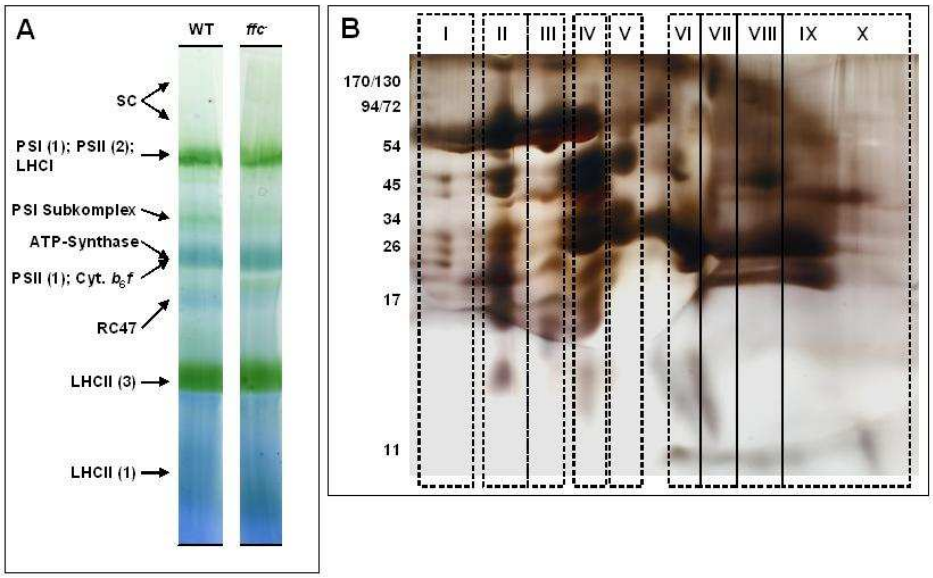


Abb. 37: BN- und BN/SDS-PAGE von *ffc*$^-$ im Vergleich zum WT.
A: Aus 70 mg Rosettenblättern von WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) und *ffc*$^-$ (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) wurden Membranen und daraus Proteinkomplexe isoliert und auf einem nativen Gradientengel (4 bis 16 %) aufgetrennt. LHCII (1): LHCII-Monomer; LHCII (3): LHCII-Trimer; RC47: CP43-freies PSII-Monomer; PSII(1): PSII-Monomer; Cyt. *b*$_6$*f*: Cytochrom *b*$_6$*f*-Komplex; PSI(1): PSI-Monomer; LHCI: PSI-Monomer-gekopelte LHCI-Proteine; PSII(2): PSII-Dimer; SC: PSII-Superkomplexe. **B:** Der BN-Gel-Streifen von *ffc*$^-$ wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12,5 %-igen Gel in eine 2. Dimension gebracht, in der die Protein-Komplexe der BN-PAGE in ihre Bestandteile aufgetrennt wurden. Das SDS-Gel wurde zunächst mit Coomassie und anschließend mit Silber gefärbt. Markerangaben in kDa. I: SC; II: PSI(1) mit LHCI, LHCII(2); III: PSI-Subkomplex; IV: ATP-Synthase; Cyt. *b*$_6$*f*; V: RC47; VI: RC (Reaktionszentrum); VII: LHCII(3); VIII: LHCII(3), freies CP47; IX: LHCII(1), freies CP43; X: andere freie Proteine. Vgl. auch Abb. 35.

Bei der Δ*cpftsy*-Mutante war ein anderes Bild zu sehen. Für Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, konnte im BN-Gel eine starke Reduktion der Bandenintensität der einzelnen Komplexe im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abb. 38A). Diese Verringerung bezog sich nicht spezifisch auf einzelne Komplexe sondern konnte bei allen erkannt werden, wobei ATP-Synthase und PSI-Monomer am wenigsten betroffen zu sein schienen. Jedoch war anhand des BN-Gels festzustellen, dass auch in dieser Mutante alle Komplexe vorhanden waren. Im Vergleich zu Δ*cpftsy* bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} war bei Lichtbedingungen von 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}

wieder ein Anstieg der Bandenintensität zu erkennen, erreichte jedoch nicht das Niveau des WT. Auch hier waren wieder alle Komplexe betroffen. In der 2D-Analyse konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Abb. 38B). Das Fehlen einzelner Komplexbestandteile konnte nicht beobachtet werden.

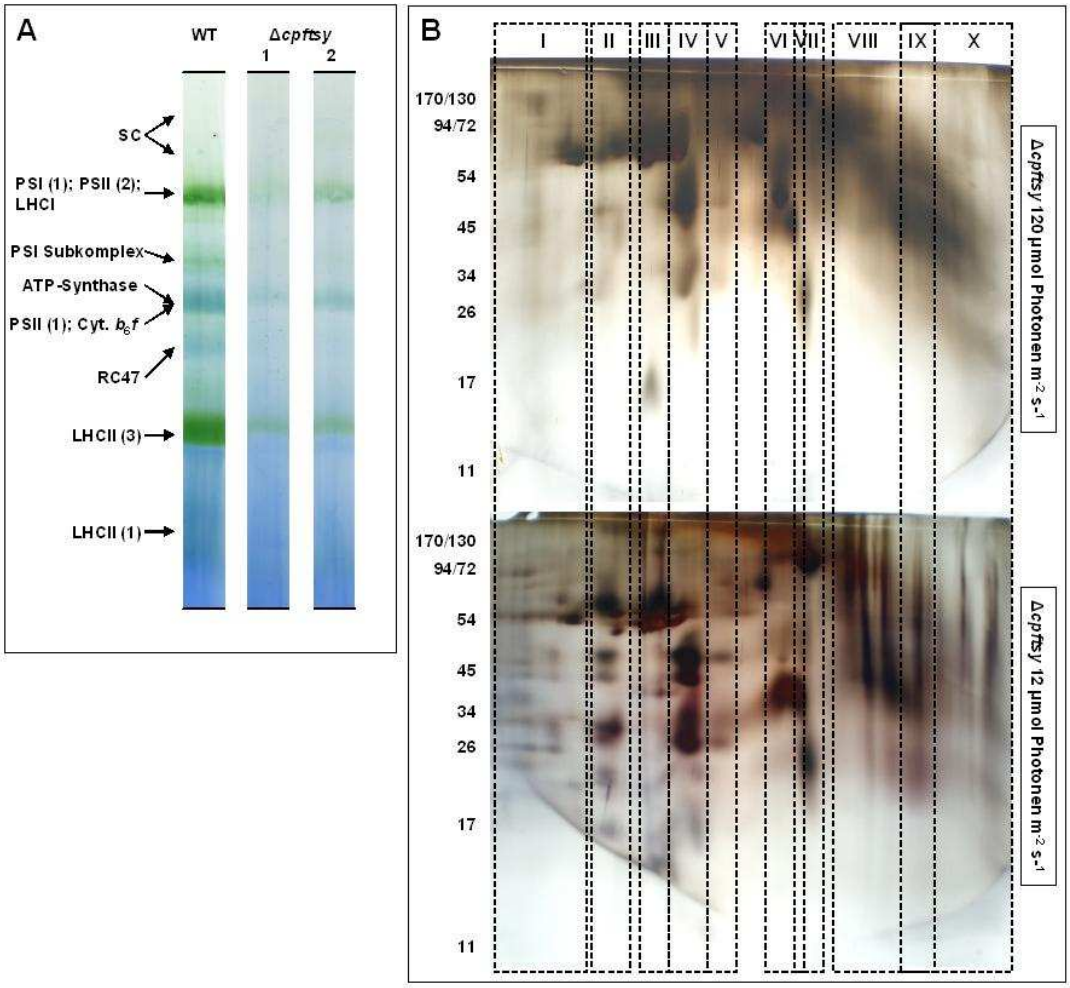


Abb. 38: BN- und BN/SDS-PAGE von Δ*cpftsy* im Vergleich zum WT.
A: Aus 70 mg Rosettenblättern von WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; WT) und Δ*cpftsy* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranen und daraus Proteinkomplexe isoliert und auf einem nativen Gradientengel (4 bis 16 %) aufgetrennt. LHCII (1): LHCII-Monomer; LHCII (3): LHCII-Trimer; RC47: CP43-freies PSII-Monomer; PSII(1): PSII-Monomer; Cyt. b_6f: Cytochrom b_6f-Komplex; PSI(1): PSI-Monomer; LHCI: PSI-Monomer-gekopelte LHCI-Proteine; PSII(2): PSII-Dimer; SC: PSII-Superkomplexe. **B:** Die BN-Gel-Streifen von Δ*cpftsy* wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12,5 %-igen Gel in eine 2. Dimension gebracht, in der die Protein-Komplexe der BN-PAGE in ihre Bestandteile aufgetrennt wurden. Die SDS-Gele wurden zunächst mit Coomassie und anschließend mit Silber gefärbt. Markerangaben in kDa. I: SC; II: PSI(1) mit LHCI, LHCII(2); III: PSI-Subkomplex; IV: ATP-Synthase; Cyt. b_6f; V: RC47; VI: RC (Reaktionszentrum); VII: LHCII(3); VIII: LHCII(3), freies CP47; IX: LHCII(1), freies CP43; X: andere freie Proteine. Vgl. auch Abb. 35.

Nach den Mutanten aus dem cpSRP-Transportweg wurde die Δ*hcf106*-Mutante aus dem ΔpH/Tat-Proteintransportweg betrachtet. Hier war im BN-Gel deutlich zu erkennen, dass bei Δ*hcf106* bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} im Vergleich zum WT bis auf eine schwache Bande des LHCII-Trimers alle Proteinkomplexe fehlten (Abb. 39A). Bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} war diese Bande wieder angereichert, allerdings nicht auf WT-Niveau.

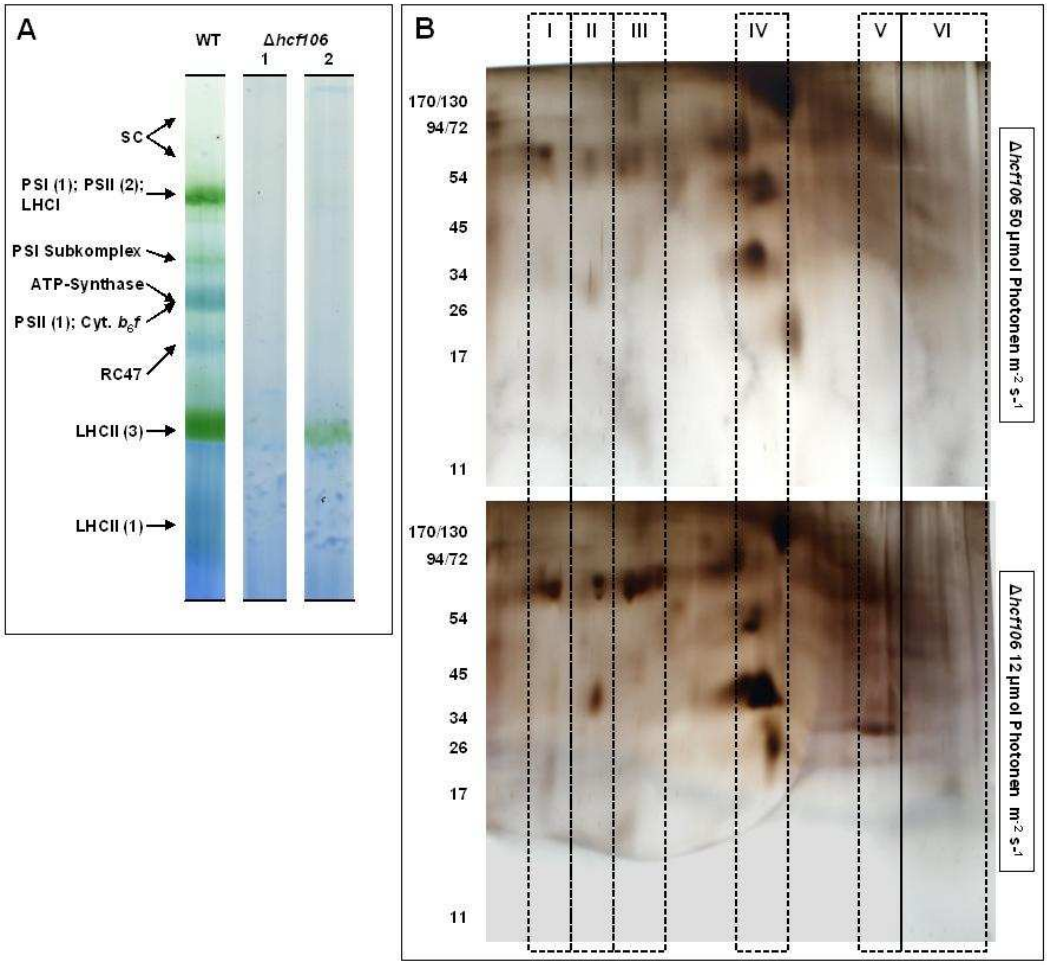


Abb. 39: BN- und BN/SDS-PAGE von Δ*hcf106* im Vergleich zum WT.
A: Aus 70 mg Rosettenblättern von WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; WT) und Δ*hcf106* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranen und daraus Proteinkomplexe isoliert und auf einem nativen Gradientengel (4 bis 16 %) aufgetrennt. LHCII (1): LHCII-Monomer; LHCII (3): LHCII-Trimer; RC47: CP43-freies PSII-Monomer; PSII(1): PSII-Monomer; Cyt. b_6f: Cytochrom b_6f-Komplex; PSI(1): PSI-Monomer; LHCI: PSI-Monomer-gekopelte LHCI-Proteine; PSII(2): PSII-Dimer; SC: PSII-Superkomplexe. **B:** Die BN-Gel-Streifen von Δ*hcf106* wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12,5 %-igen Gel in eine 2. Dimension gebracht, in der die Protein-Komplexe der BN-PAGE in ihre Bestandteile aufgetrennt wurden. Die SDS-Gele wurden zunächst mit Coomassie und anschließend mit Silber gefärbt. Markerangaben in kDa. I: ATP-Synthase; II: ATP-Synthase III: ATP-Synthase; IV: RC, LHCII(3); V: LHCII(1) VI: freie Proteine. Vgl. auch Abb. 35.

Auf den 2D-Gelen war bei Δ*hcf106* bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} zu sehen, dass ein Signal für das LHCII-Trimer und auch für die ATP-Synthase zu erkennen waren (Abb. 39B). Bei Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen worden waren, war sowohl das Signal der ATP-Synthase als auch das LHCII-Trimer- und LHCII-Monomer-Signal verstärkt. Auch die Signale für freie Proteine waren bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angereichert. Andere Komplexe, wie z.B. alle PSI- und PSII-Komplexe waren nicht vorhanden.

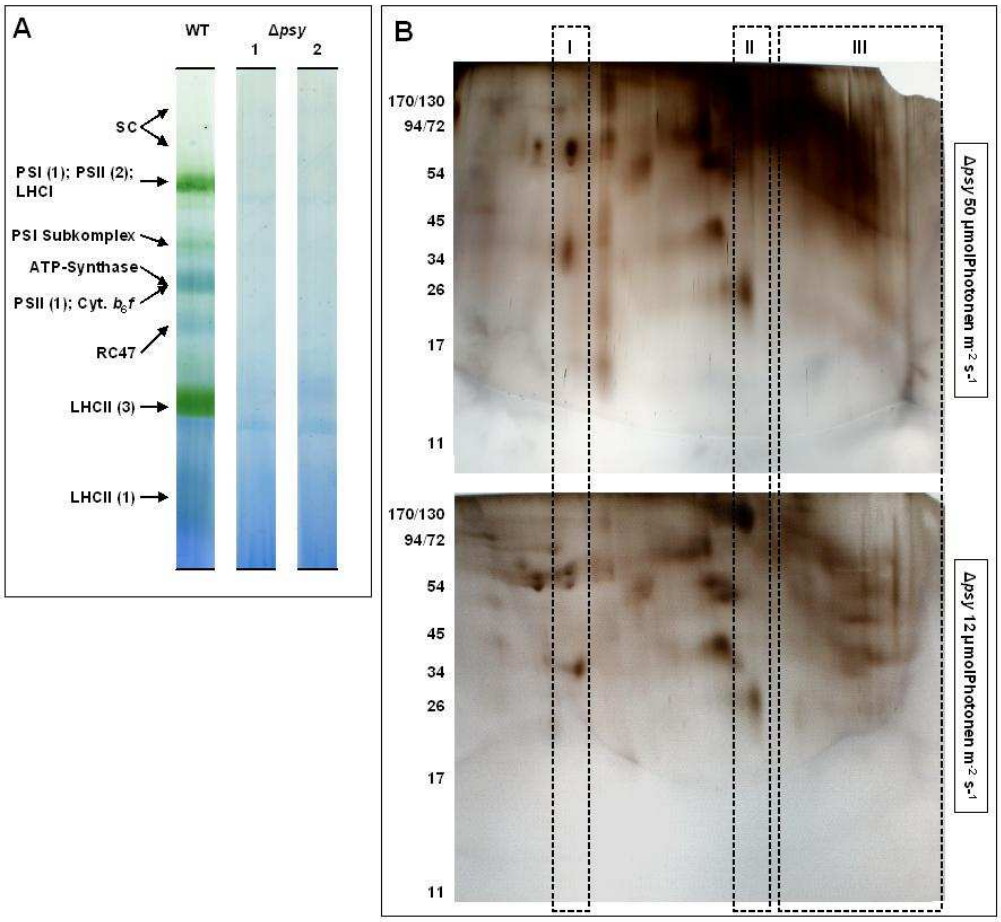


Abb. 40: BN- und BN/SDS-PAGE von Δ*psy* im Vergleich zum WT.
A: Aus 70 mg Rosettenblättern von WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; WT) und Δ*psy* (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranen und daraus Proteinkomplexe isoliert und auf einem nativen Gradientengel (4 bis 16 %) aufgetrennt. LHCII (1): LHCII-Monomer; LHCII (3): LHCII-Trimer; RC47: CP43-freies PSII-Monomer; PSII(1): PSII-Monomer; Cyt. b_6f: Cytochrom b_6f-Komplex; PSI(1): PSI-Monomer; LHCI: PSI-Monomer-gekopelte LHCI-Proteine; PSII(2): PSII-Dimer; SC: PSII-Superkomplexe. **B:** Die BN-Gel-Streifen von Δ*psy* wurde mittels SDS-PAGE auf einem 12,5 %-igen Gel in eine 2. Dimension gebracht, in der die Protein-Komplexe der BN-PAGE in ihre Bestandteile aufgetrennt wurden. Die SDS-Gele wurden zunächst mit Coomassie und anschließend mit Silber gefärbt. Markerangaben in kDa. I: ATP-Synthase; II: LHCII(3); III: freie Proteine. Vgl. auch Abb. 35.

Die Δ*psy*-Mutante zeigte bei BN-Analysen keinerlei Banden, die auf Photosynthese-Komplexe schließen ließen (Abb. 40A). Sowohl bei Lichtbedingungen von 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} als auch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} waren keinerlei Signale zu erkennen. In der 2D-Analyse war zu beobachten, dass Δ*psy*-Pflanzen sowohl bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} als auch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} geringe ATP-Synthase- und LHCII-Trimer-Signale aufwiesen (Abb. 40B). Des Weiteren war zu sehen, dass der Pool an freiem Protein bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} im Vergleich zu 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} verstärkt war. Die Komplexe der Photosysteme I und II, sowohl mature als auch Assemblierungskomplexe, konnten nicht nachgewiesen werden.
Bei den Proteinen, die im 2D-Gel direkt links vom LHCII-Trimer zu sehen sind, handelt es sich nicht um Proteine der Thylakoidmembran (vgl. Granvogl et al., 2006).

3.2 SDS-PAGE- und Western Blot-Analysen

Für weitere Erkenntnisse, ob bestimmte Membranproteine vorhanden sind, die auf den 2D-Gelen evtl. nicht in Proteinkomplexen vorkommen, wurden SDS-Gele mit anschließender Coomassie-Färbung und Western Blot-Analysen durchgeführt. Dabei wurden sowohl Membranproteine aus zwei Thylakoidmembran-Transportwegen als auch Proteine aus den vier an der Photosynthese beteiligten Komplexen PSI, PSII, Cytochrom b_6f-Komplex und ATP-Synthase mit spezifischen Antikörpern untersucht.

WT-Proben zeigten sowohl auf dem SDS-Gel als auch bei den Western Blot-Analysen keinerlei Unterschiede zwischen Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden und solchen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} wuchsen (Abb. 41A).
Bei *albino3* waren auf dem SDS-Gel im Vergleich zum WT deutlich weniger Membranproteine zu erkennen (Abb. 41A). Besonders stark betroffen waren dabei die Proteine der Photosynthese-Komplexe. Betrachtete man aber die Gel-Streifen von *albino3* für sich, so war zu erkennen, dass z.B. bei LHCII-Proteinen eine sichtbare Steigerung der Bandenintensität bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} im Vergleich zu 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} vorlag.

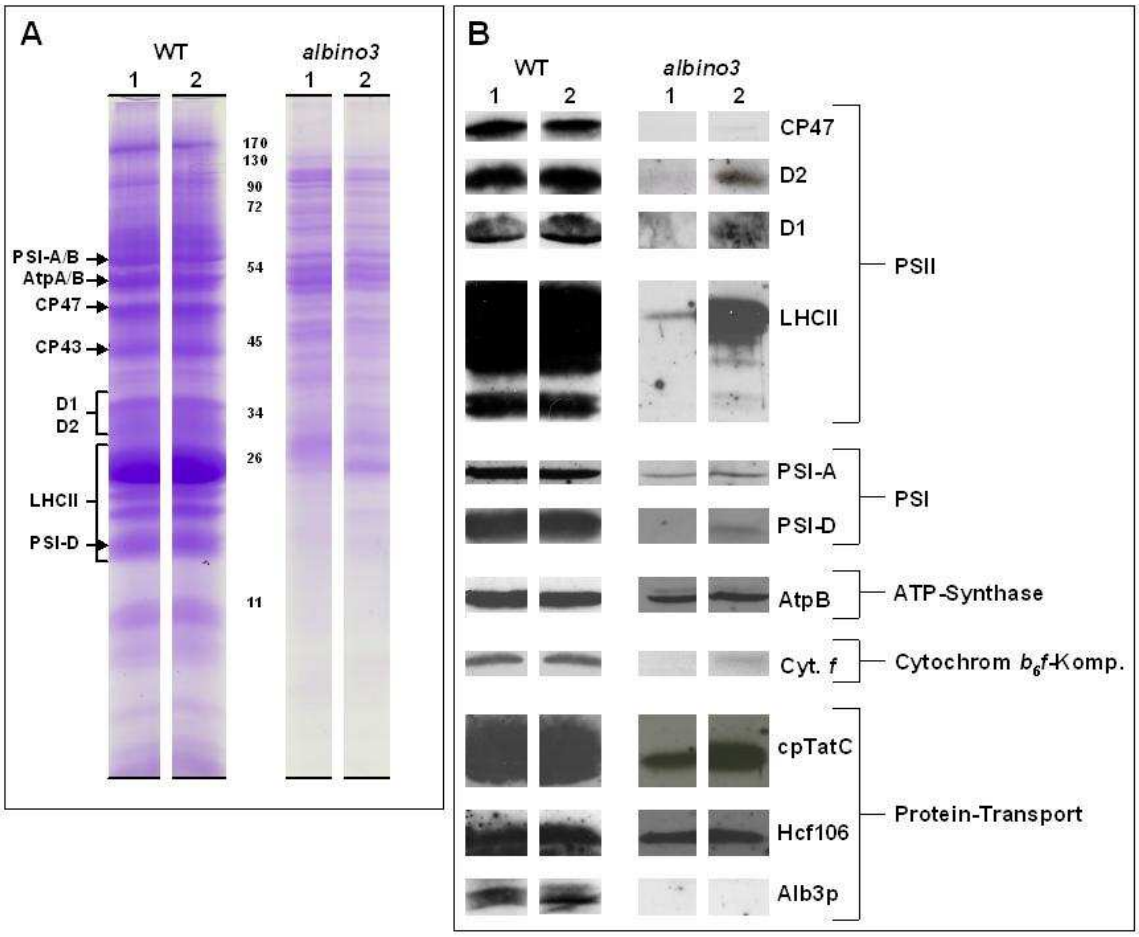


Abb. 41: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von *albino3*.
A: Aus je 50 mg Rosettenblättern von WT (120 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) und *albino3*-Mutante (120 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranproteine isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Einzelne Proteine sind mit Pfeilen markiert: PSI-A/B kodiert durch *psaA/B*; AtpA/B kodiert durch *atpA/B*; CP47 kodiert durch *psbB*; CP43 kodiert durch *psbC*; D1 kodiert durch *psbA*; D2 kodiert durch *psbD*; PSI-D kodiert durch *psaD*; LHCII kodiert durch *Cab2*. Größenstandard in kDa.
B: Die Proteine des SDS-Gels wurden für Western Blot-Analysen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden mittels verschiedener primärer Antikörper (siehe Material und Methoden) und einem HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG (Konz. 1:2500 bis 1:10000) verschiedene Proteine nachgewiesen. Für alle Photosynthese-Komplexe wurden bestimmte Proteine nachgewiesen: für PSII CP47, D1, D2 und LHCII; für PSI PSI-A und PSI-D; für die ATP-Synthase AtpB; für Protein-Transportwege CpTatC, Hcf106 und Alb3p; der Cyt. b_6f-Komplex konnte durch die Autoreaktion von Cyt. *f* nachgewiesen werden.

Western Blot-Analysen zeigten, dass alle untersuchten Proteine im Vergleich zum WT abgeschwächt vorlagen (Abb. 41B). Abgesehen von der β-Untereinheit der ATP-Synthase (AtpB) zeigten fast alle nachgewiesenen Proteine Signal-Zunahme bei Abschwächung der Lichtintensität. Deutlich fielen diese Zunahmen bei cpTatC, PSI-D, D1, D2 und LHCII aus. Nur die β-Untereinheit der ATP-Synthase war sowohl bei Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, als auch bei solchen, die

bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, in gleicher Signal-Stärke detektierbar. Die Anstiege bei Hcf106p, PSI-A, CP47 und Cyt. *f* waren gering. Der Knock-Out von Alb3p konnte noch einmal bestätigt werden.

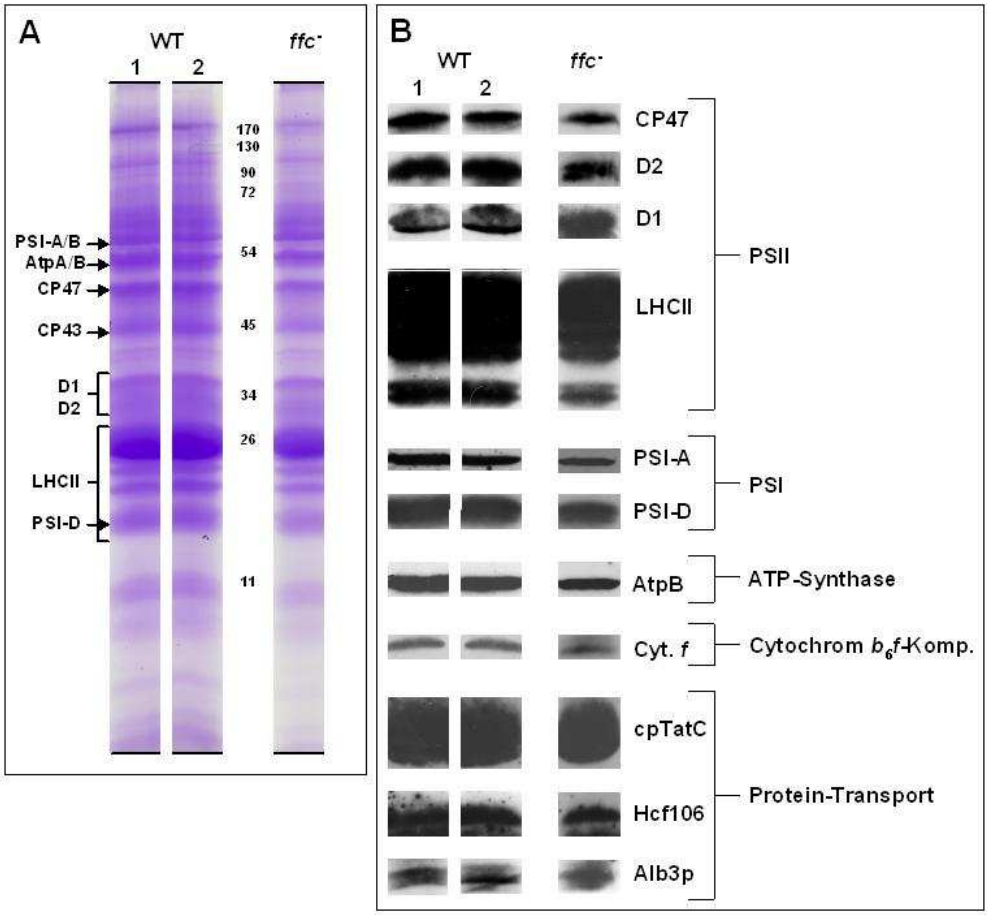


Abb. 42: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von *ffc*$^-$.
A: Aus je 50 mg Rosettenblättern von WT (120 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) und *ffc*$^-$-Mutante (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) wurden Membranproteine isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Einzelne Proteine sind mit Pfeilen markiert: PSI-A/B kodiert durch *psaA/B*; AtpA/B kodiert durch *atpA/B*; CP47 kodiert durch *psbB*; CP43 kodiert durch *psbC*; D1 kodiert durch *psbA*; D2 kodiert durch *psbD*; PSI-D kodiert durch *psaD*; LHCII kodiert durch *Cab2*. Größenstandard in kDa.
B: Die Proteine des SDS-Gels wurden für Western Blot-Analysen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden mittels verschiedener primärer Antikörper (siehe Material und Methoden) und einem HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG (Konz. 1:2500 bis 1:10000) verschiedene Proteine nachgewiesen. Für alle Photosynthese-Komplexe wurden bestimmte Proteine nachgewiesen: für PSII CP47, D1, D2 und LHCII; für PSI PSI-A und PSI-D; für die ATP-Synthase AtpB; für Protein-Transportwege CpTatC, Hcf106 und Alb3p; der Cyt. b_6f-Komplex konnte durch die Autoreaktion von Cyt. *f* nachgewiesen werden.

Bei der *ffc*$^-$-Mutante (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) waren sowohl beim Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abb. 42A) als auch bei den mittels Antikörpern nachgewiesenen

Proteinen (Abb. 42B) keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zum WT zu erkennen. Bei genauer Betrachtung war eine leichte Abschwächung der LHCII-Signale zu erkennen. Auch andere PSII-Signale erschienen schwächer.

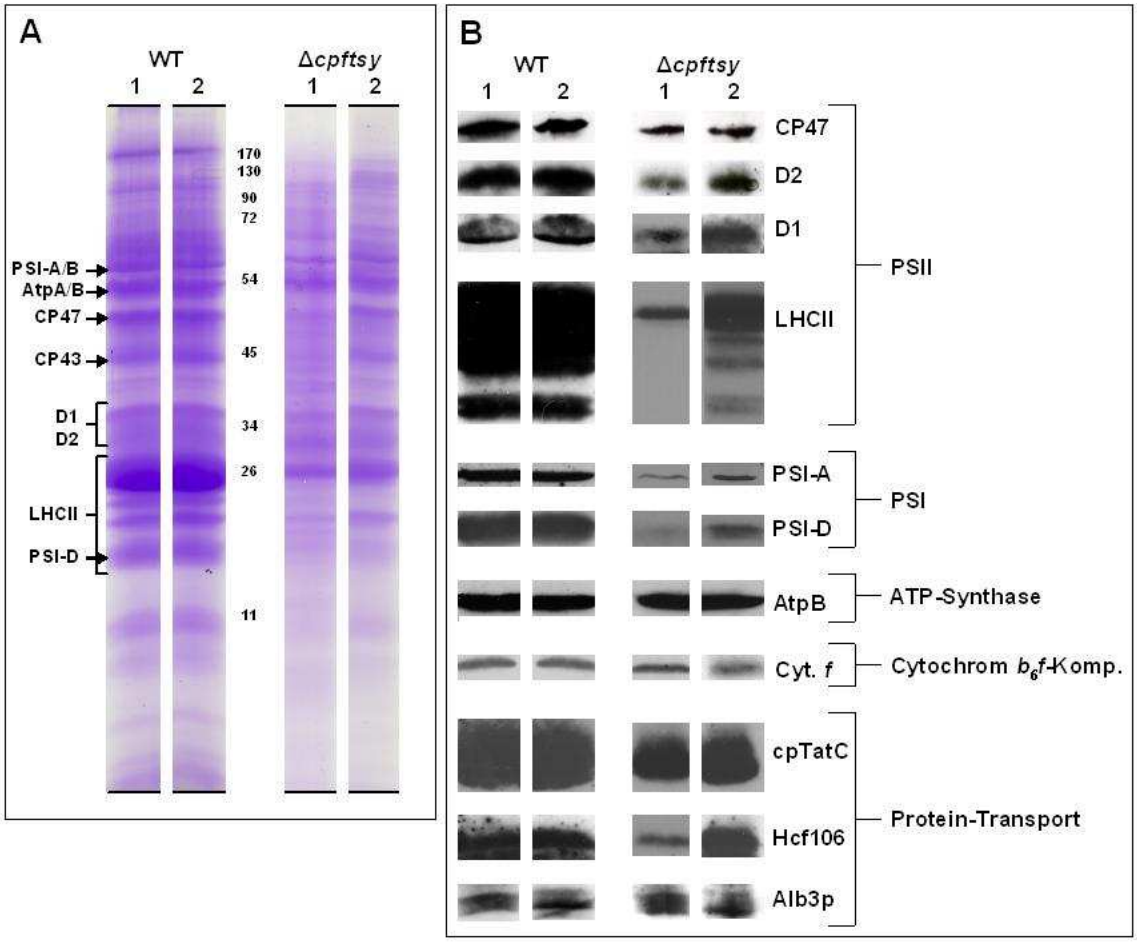


Abb. 43: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von Δ*cpftsy*.
A: Aus je 50 mg Rosettenblättern von WT (120 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) und Δ*cpftsy*-Mutante (120 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranproteine isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Einzelne Proteine sind mit Pfeilen markiert: PSI-A/B kodiert durch *psaA/B*; AtpA/B kodiert durch *atpA/B*; CP47 kodiert durch *psbB*; CP43 kodiert durch *psbC*; D1 kodiert durch *psbA*; D2 kodiert durch *psbD*; PSI-D kodiert durch *psaD*; LHCII kodiert durch *Cab2*. Größenstandard in kDa.
B: Die Proteine des SDS-Gels wurden für Western Blot-Analysen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden mittels verschiedener primärer Antikörper (siehe Material und Methoden) und einem HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG (Konz. 1:2500 bis 1:10000) verschiedene Proteine nachgewiesen. Für alle Photosynthese-Komplexe wurden bestimmte Proteine nachgewiesen: für PSII CP47, D1, D2 und LHCII; für PSI PSI-A und PSI-D; für die ATP-Synthase AtpB; für Protein-Transportwege durch CpTatC, Hcf106 und Alb3p; der Cyt b_6f-Komplex konnte durch die Autoreaktion von Cyt. *f* nachgewiesen werden.

Die Betrachtung der Ergebnisse der SDS- und Western Blot-Analysen für die Δ*cpftsy*-Mutante zeigte wiederum deutliche Unterschiede im Bezug auf Lichtbedingungen beim

Wachstum. So war im SDS-Gel eine Zunahme aller Protein-Signale von Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, zu solchen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen worden waren, zu sehen (Abb. 43A). Deutlich zu erkennen war das vor allem bei CP47, CP43, den PSII-Reaktionszentrumsproteinen D1 und D2 und bei den LHCII-Proteinen. Die Signale erreichten jedoch nicht die Intensitäten des WT.
Dies wurde ebenfalls durch die Ergebnisse des Western Blots bestätigt (Abb. 43B). Auch bei den untersuchten Proteinen des PSI, PSI-A und PSI-D, war ein Anstieg in der Signalintensität zu erkennen. Eine nur schwache Signalzunahme zeigte die Western Blot-Signal von CP47, während Cyt. *f* unverändert erscheint. Hingegen waren die Komponenten des ΔpH/Tat-Transportweges stärker betroffen und wurden bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} deutlich angereichert. Unverändert in ihrer Signalstärke blieben die β-Untereinheit der ATP-Synthase und Alb3p.

Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel der Δ*hcf106*-Mutante zeigte im Allgemeinen deutlich abgeschwächte Protein-Banden im Vergleich zum WT Col-0 (Abb. 44A). Deutlich zu erkennen war die Reduktion anhand der Photosystem-Proteine CP47, CP43, PSI-A/B und den LHCII-Proteinen. Bei den Proben für unterschiedliche Lichtbedingungen war kein Unterschied bei den Bandenintensitäten im Coomassie-Gel zu erkennen, abgesehen von einer deutlichen Zunahme der LHCII-Protein-Banden (Abb. 44A rechts).
Betrachtete man die Western Blot-Signale, so wurde deutlich, dass viele der untersuchten Proteine weder bei Δ*hcf106*-Pflanzen, die bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, noch bei Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, vorhanden waren (Abb. 44B). So fehlten die PSI-Untereinheiten PSI-A und PSI-D ebenso wie die PSII-Untereinheiten CP47, D1 und D2. Signale für die Proteine cpTatC und Hcf106 des ΔpH/cpTat-Transportweges waren ebenfalls nicht vorhanden, wobei letzteres die Verifikation des Knock-Outs darstellte. Ebenso konnte kein Alb3p nachgewiesen werden. Beim Signal für Alb3p in den Δ*hcf106*-Spuren handelt es sich um ein unspezifisches Signal. Unverändert war das Signal von Cyt. *f*. Das Signal der ATP-Synthase-Untereinheit war zwar im Vergleich zum WT schwächer, jedoch deutlich nachweisbar und zeigte eine leichte Steigerung seiner Intensität bei

12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} im Vergleich zu 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}. Der deutlichste Unterschied bei den Western Blot-Signalen konnte für die LHCII-Proteine festgestellt werden. So nahm die Intensität der detektierten Bande bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} im Vergleich zu 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} deutlich zu.

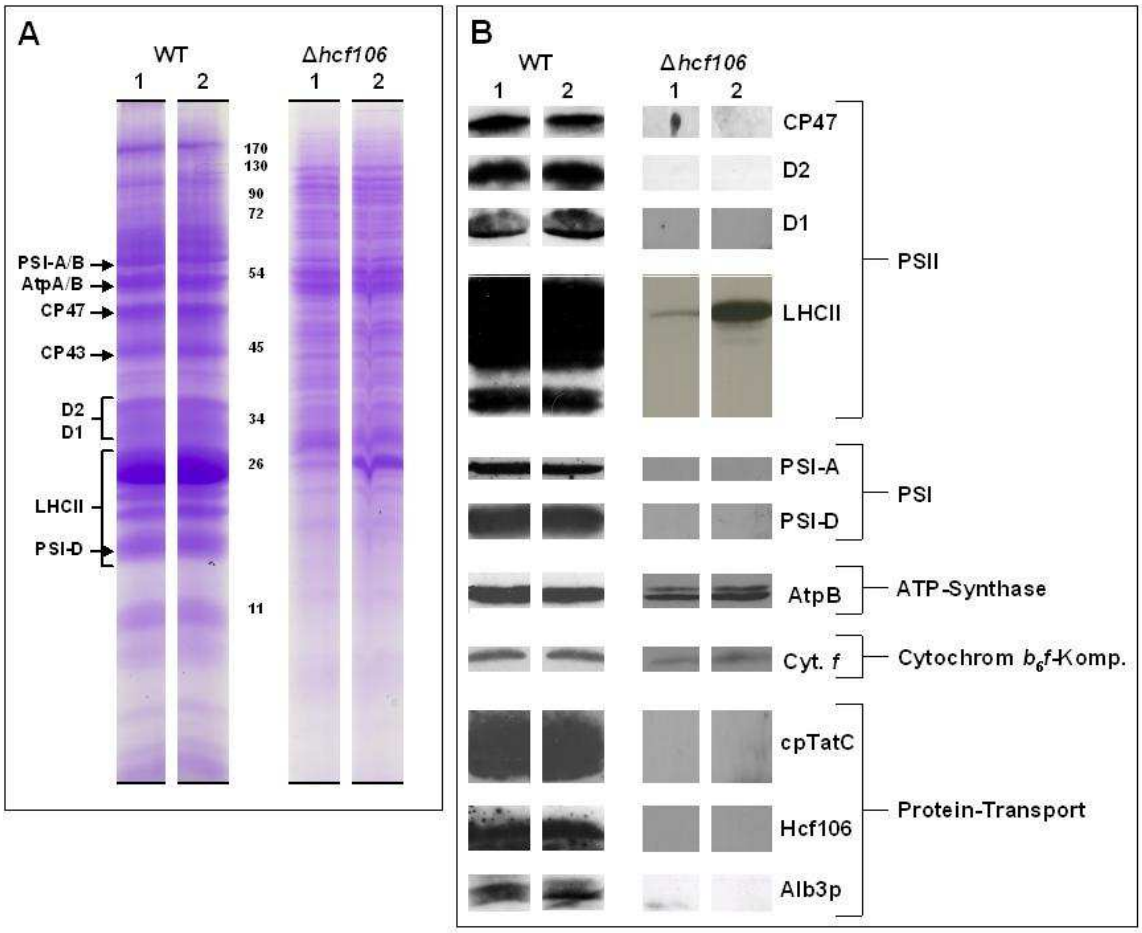


Abb. 44: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von Δ*hcf106*.
A: Aus je 50 mg Rosettenblättern von WT (120 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) und Δ*hcf106*-Mutante (50 (1) und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (2)) wurden Membranproteine isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Einzelne Proteine sind mit Pfeilen markiert: PSI-A/B kodiert durch *psaA/B*; AtpA/B kodiert durch *atpA/B*; CP47 kodiert durch *psbB*; CP43 kodiert durch *psbC*; D1 kodiert durch *psbA*; D2 kodiert durch *psbD*; PSI-D kodiert durch *psaD*; LHCII kodiert durch *Cab2*. Größenstandard in kDa.
B: Die Proteine des SDS-Gels wurden für Western Blot-Analysen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden mittels verschiedener primärer Antikörper (siehe Material und Methoden) und einem HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG (Konz. 1:2500 bis 1:10000) verschiedene Proteine nachgewiesen. Für alle Photosynthese-Komplexe wurden bestimmte Proteine nachgewiesen: für PSII CP47, D1, D2 und LHCII; für PSI PSI-A und PSI-D; für die ATP-Synthase AtpB; für Protein-Transportwege CpTatC, Hcf106 und Alb3p; der Cyt. b_6f-Komplex konnte durch die Autoreaktion von Cyt. *f* nachgewiesen werden.

Die Δ*psy*-Mutante zeigte im SDS-Gel im Vergleich zum WT die wenigsten Membran-gebundenen Proteine (Abb. 45A). Auch hier war die starke Reduktion vor allem bei den Proteinen zu sehen, die an der Photosynthese beteiligt sind und daher im WT in großem Maße vorkommen.

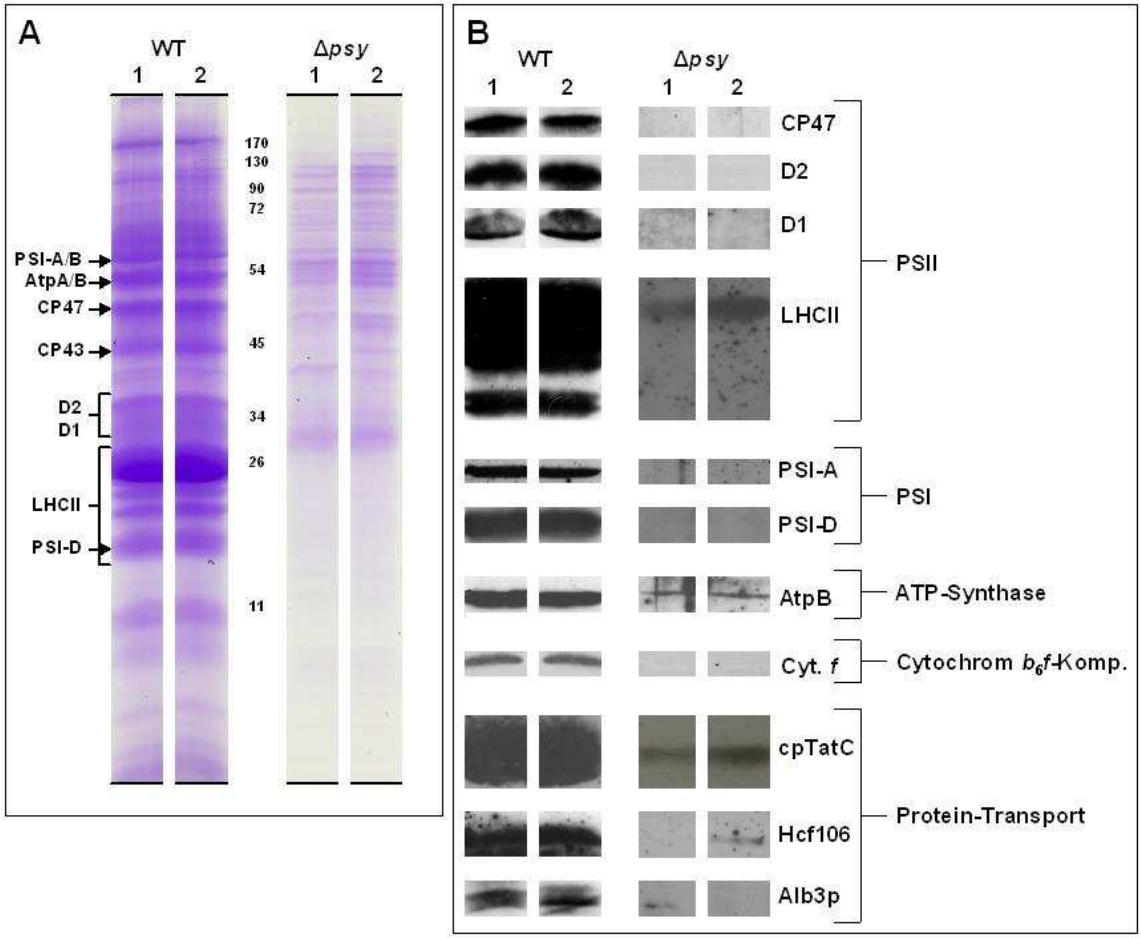


Abb. 45: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von Δ*psy*.
A: Aus je 50 mg Rosettenblättern von WT (120 und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) und Δ*psy*-Mutante (50 und 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) wurden Membranproteine isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Einzelne Proteine sind mit Pfeilen markiert: PSI-A/B kodiert durch *psaA/B*; AtpA/B kodiert durch *atpA/B*; CP47 kodiert durch *psbB*; CP43 kodiert durch *psbC*; D1 kodiert durch *psbA*; D2 kodiert durch *psbD*; PSI-D kodiert durch *psaD*; LHCII kodiert durch *Cab2*. Größenstandard in kDa.
B: Die Proteine des SDS-Gels wurden für Western Blot-Analysen auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Anschließend wurden mittels verschiedener primärer Antikörper (siehe Material und Methoden) und einem HRP-gekoppeltem α-Kaninchen-IgG (Konz. 1:2500 bis 1:10000) verschiedene Proteine nachgewiesen. Für alle Photosynthese-Komplexe wurden bestimmte Proteine nachgewiesen: für PSII CP47, D1, D2 und LHCII; für PSI PSI-A und PSI-D; für die ATP-Synthase AtpB; für Protein-Transportwege cpTatC, Hcf106 und Alb3p; der Cyt. b_6f-Komplex konnte durch die Autoreaktion von Cyt. *f* nachgewiesen werden.

Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, zeigten im Vergleich zu Δ*psy*-Pflanzen bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} eine leichte Zunahme der Bandenintensitäten im SDS-Gel (Abb. 45A rechts). Allerdings waren deutliche Zunahmen der Proteine aus den Photosynthese-Komplexen nicht zu erkennen.

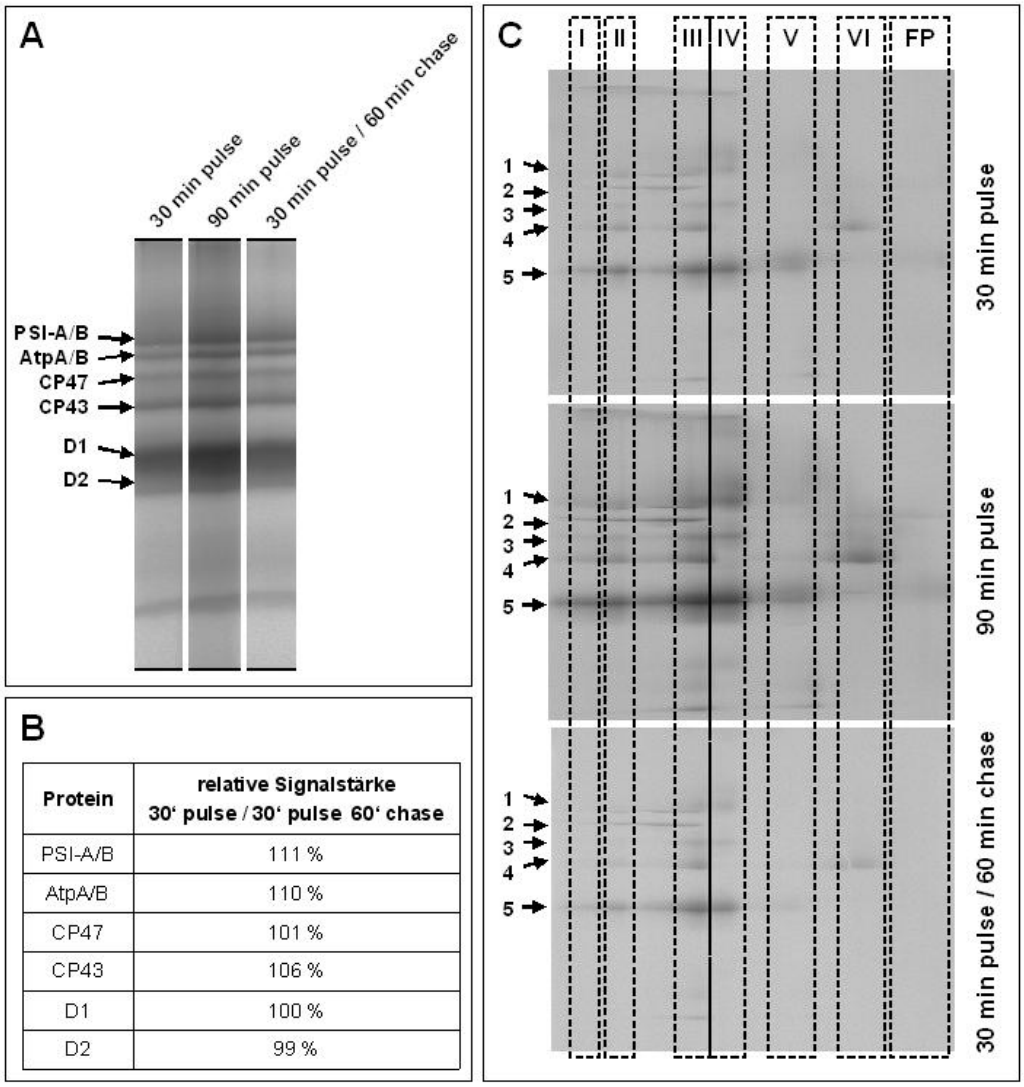
Bei der Betrachtung der Western Blot-Ergebnisse war zu erkennen, dass wie schon bei der Δ*hcf106*-Mutante auch bei der Δ*psy*-Mutante viele der untersuchten Proteine nicht nachgewiesen werden konnten. So fehlten die PSII-Kernproteine CP47, D1 und D2 ebenso wie auch die PSI-Proteine PSI-A und PSI-D. Des Weiteren konnte keine Autoreaktion von Cyt. *f* nachgewiesen werden. Ein schwaches Signal lieferte die Detektion der β-Untereinheit des ATP-Synthase-Komplexes. Ebenso konnten LHCII-Proteine in sehr geringem Umfang nachgewiesen werden, wobei bei weniger Licht ein leichter Anstieg der LHCII-Menge sichtbar wurde. Das am Protein-Transport beteiligte Alb3p konnte nicht nachgewiesen werden. Das sichtbare Signal ist vermutlich wie bei Δ*hcf106* ein unspezifisches. Hingegen waren die Proteine des ΔpH/Tat-Transportweges vorhanden und zeigten eine Licht-abhängige Signal-Zunahme von 50 zu 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}.

Jedoch zeigen alle SDS- und Western Blot-Analysen jedoch nur den Gleichgewichtszustand, was aber nichts über die Synthese der Proteine aussagt.

3.3 *In vivo*-Proteinmarkierung plastidärer Proteine

Nachdem nun das Vorhandensein bestimmter Komplexe der Thylakoidmembran und ihrer einzelnen Bestandteile untersucht wurde, sollte mittels *in vivo*-Proteinmarkierung die Assemblierung und Stabilität der Photosynthese-Komplexe sowie die Stabilität ihrer plastidär kodierten Untereinheiten untersucht werden. Auch kann überprüft werden, ob Proteine, die beispielsweise in den Western Blot-Analysen nicht zu detektieren waren, zwar synthetisiert werden, jedoch dann aufgrund falscher oder nicht vorhandener Assemblierung bzw. Integration einem schnellen Abbau unterliegen. Um die Translation Kern-kodierter Proteine im Cytoplasma auszuschalten, wurde Pflanzenmaterial mit dem Antibiotikum Cycloheximid behandelt und anschließend wurden die Plastiden-kodierten Proteine mit [^{35}S]-Methionin bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (30 bzw. 90 min) radioaktiv markiert, wobei zur Untersuchung der

Stabilität auf eine 30-minütige Markierung mit radiaktivem Methionin eine zusätzliche 60-minütige Inkubation mit nicht radioaktivem Methionin folgte.



Protein	relative Signalstärke 30‘ pulse / 30‘ pulse 60‘ chase
PSI-A/B	111 %
AtpA/B	110 %
CP47	101 %
CP43	106 %
D1	100 %
D2	99 %

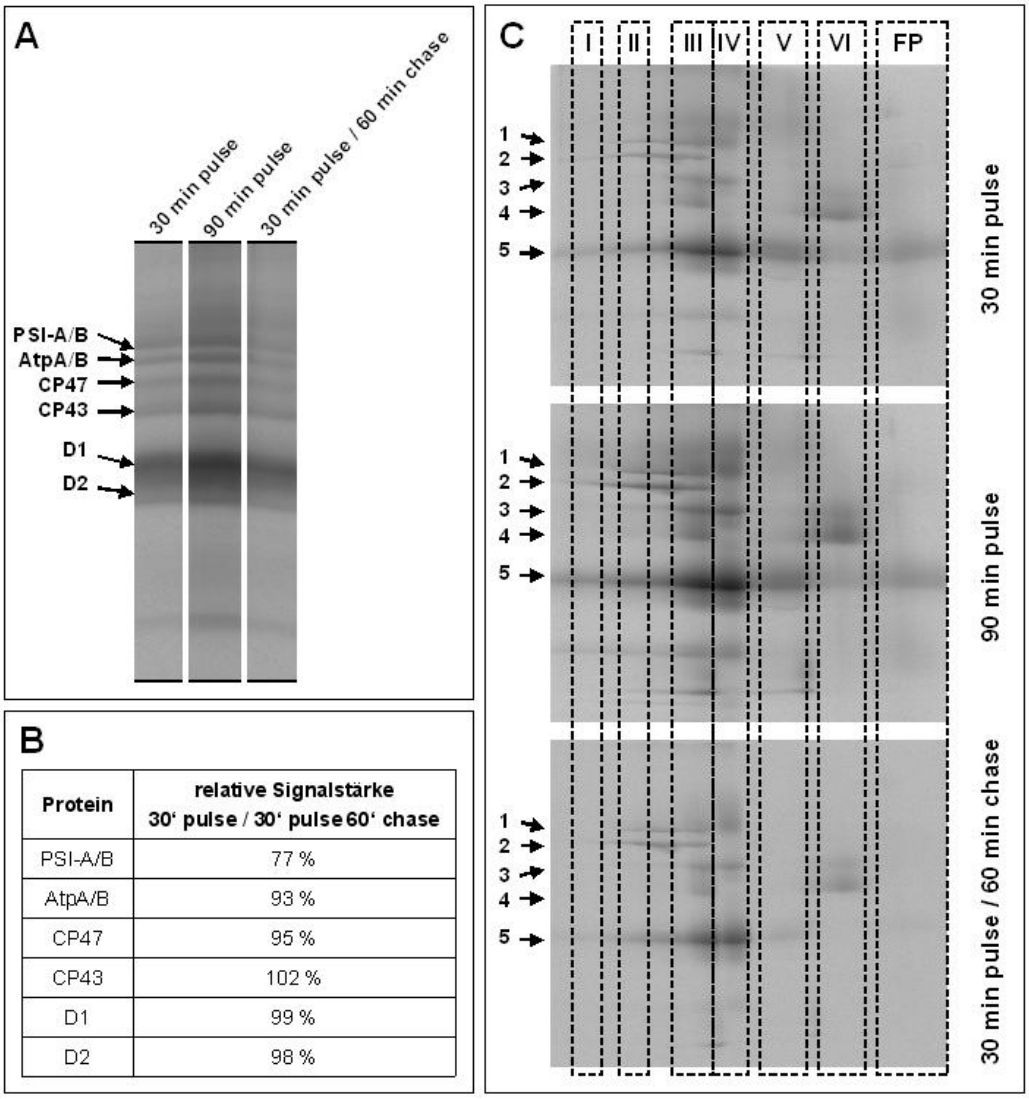
Abb. 46: *In vivo*-Markierungsanalysen von WT Col-0 (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht (**A**). Proteinsignale sind mit Pfeilen markiert und benannt. Die Signale der pulse/chase-Probe wurden in Relation zu den Signalen der 30 min pulse-Probe quantifiziert und tabellarisch dargestellt (**B**). Die gleichen Proben des SDS-Gels wurden auch nativ auf einem BN-Gradientengel (4 bis 16 %) in einer 1. Dimension und über 12,5 %-ige SDS-Gele in einer 2. Dimension aufgetrennt (**C**). Die SDS-Gele wurden jeweils getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht. Beschriftung der Proteine und Komplexe: I: PSI/PSII-Superkomplexe; II: PSI-Monomer, PSII-Dimer; III: PSII-Monomer; IV: RC47 (CP43-freies PSII-Monomer); V: PSII-Reaktionszentrum; VI: freies CP43, FP: freies Protein; 1: PSI-A/B; 2: AtpA/B; 3: CP47; 4: CP43; 5: D1/D2.

Markierte Proteine, die auf SDS- und BN/SDS-2D-Gelen aufgetrennt wurden, konnten anschließen mittels Autoradiografie einfach detektiert werden.

Zunächst wurde als Kontrolle Pflanzenmaterial des WT Col-0 markiert und auf einem SDS-Gel (Abb. 46A und 46B) sowie auf 2D-Gelen (Abb. 46C) untersucht.

Die einzelnen Proben wurden zunächst auf einem SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 46A). So konnten bei 30 min pulse alle in der Abbildung gekennzeichneten Proteine nachgewiesen werden. Bei 90 min pulse steigerten sich die Signalintensitäten. Bei der pulse/chase-Probe wurde im Vergleich zur 30 min pulse eine leichte Steigerung der Signale erkannt (Abb. 46B), was zeigt, dass die in den ersten 30 min translatierten Proteine nach weiteren 60 min immer noch stabil waren. Zusätzlich wurde [^{35}S]-Methionin, das beim Entfernen der externen Quelle zwar schon aufgenommen, aber noch nicht eingebaut worden war, in neu synthetisierte Proteine eingebaut, was die Zunahme der Signal-Intensitäten erklärt.

Beim 2D-Gel der 30 min pulse-Probe waren deutlich die einzelnen PSII-Assemblierungskomplexe zu erkennen (Abb. 45C, oben). So war freies CP43 nachweisbar (VI), gefolgt vom PSII-Reaktionszentrum bestehend aus D1 und D2 (V) und dem RC47-Komplex, der aus D1, D2 und CP47 besteht, aber kein CP43 beinhaltet (IV). Des Weiteren waren PSII-Monomere (III), -Dimere (II) und die entsprechenden Superkomplexe (I) nachweisbar. Auch PSI-Komplexe und der ATP-Synthase-Komplex waren zu erkennen (I bis III). Wie zu erwarten war, wurden bei 90 min pulse auch deutlich stärkere Signale im Autoradiogramm erfasst (Abb. 45C, Mitte). So konnte hier auch freies CP43 nachgewiesen. Bei der pulse/chase-Inkubation, bei der das Pflanzenmaterial zunächst 30 min mit radioaktivem Methionin und anschließend 60 min mit unmarkiertem Methionin inkubiert wurde, war ein ähnliches Muster zu sehen wie bei der 30 min pulse-Inkubation (Abb. 45C, unten). Es war jedoch ein leichter Rückgang der Signalintensitäten zu verzeichnen. Die Signale der freien Proteine sowie des PSII-Reaktionszentrum-Komplexes waren stärker reduziert, was darauf schließen lässt, dass sich die inkorporierte Radioaktivität aus den kleineren Assemblierungs-komplexen in größere Komplexe verlagert. Das weist auf eine funktionale Assemblierung hin.



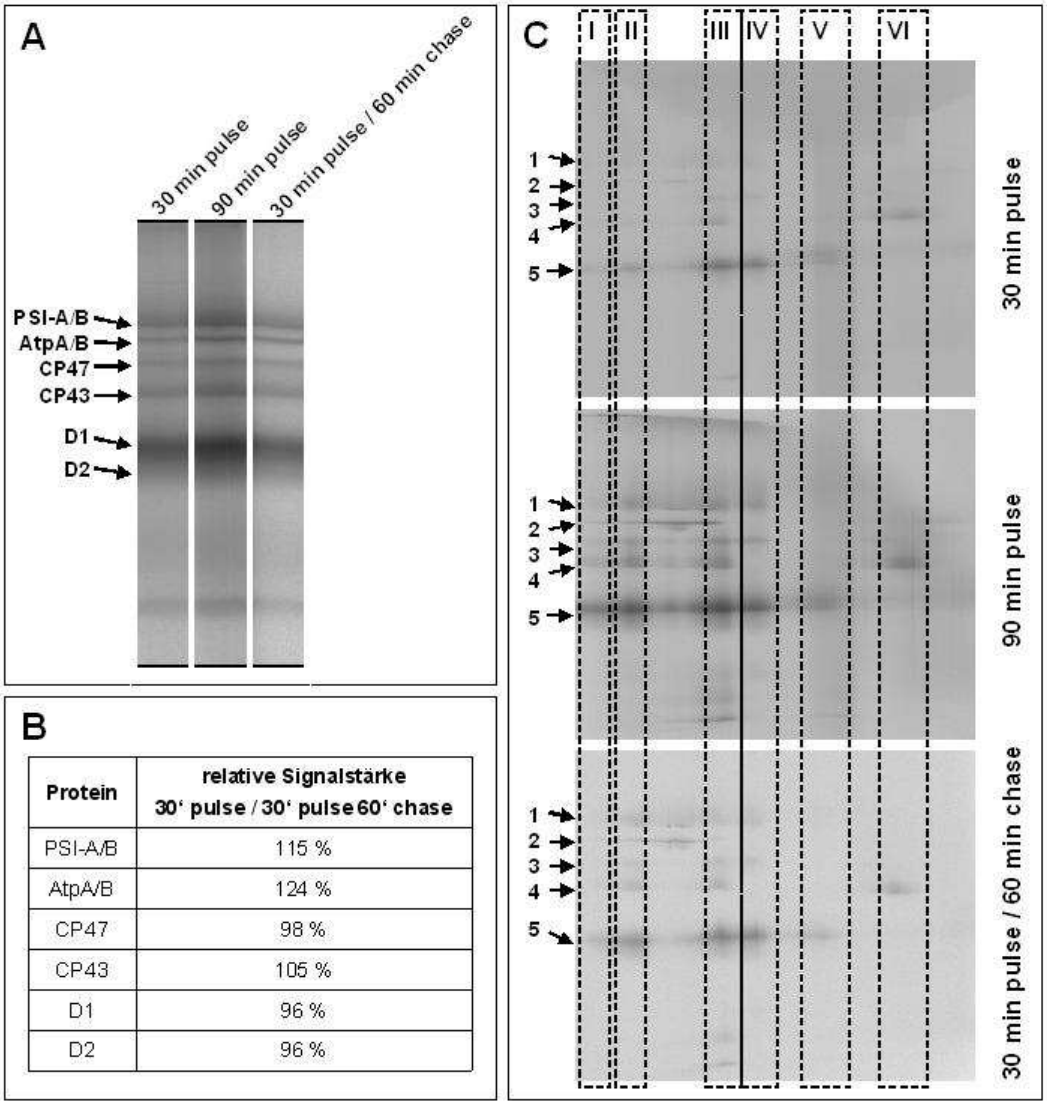
Protein	relative Signalstärke 30' pulse / 30' pulse 60' chase
PSI-A/B	77 %
AtpA/B	93 %
CP47	95 %
CP43	102 %
D1	99 %
D2	98 %

Abb. 47: *In vivo*-Markierungsanalysen von *ffc*$^-$ (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht (**A**). Proteinsignale sind mit Pfeilen markiert und benannt. Die Signale der pulse/chase-Probe wurden in Relation zu den Signalen der 30 min pulse-Probe quantifiziert und tabellarisch dargestellt (**B**). Die gleichen Proben des SDS-Gels wurden auch nativ auf einem BN-Gradientengel (4 bis 16 %) in einer 1. Dimension und über 12,5 %-ige SDS-Gele in einer 2. Dimension aufgetrennt (**C**). Die SDS-Gele wurden jeweils getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht. I: PSI/PSII-Superkomplexe; II: PSI-Monomer, PSII-Dimer; III: PSII-Monomer; IV: RC47 (CP43-freies PSII-Monomer); V: PSII-Reaktionszentrum; VI: freies CP43; FP: freies Protein; 1: PSI-A/B; 2: AtpA/B; 3: CP47; 4: CP43; 5: D1/D2.

Die *ffc*$^-$-Mutante zeigte sowohl bei den 2D-Gelen als auch im SDS-Gel ein WT-ähnliches Muster (Abb. 47). Jedoch zeigten die Signale des SDS-Gels in der pulse/chase-Spur im Gegensatz zum WT eine Reduktion (Abb. 47A und 47B), was auf eine verringerte Stabilität schließen lässt. Davon waren am stärksten die großen PS-I-Untereinheiten PSI-A und PSI-B betroffen.

Auf den 2D-Gelen waren die Signale der PSII-Dimere ebenso wie die der Superkomplexe im Vergleich zum WT deutlich reduziert, was auf ein Problem bei der Assemblierung der entsprechenden Komplexe schließen lässt (Abb. 47C). Auch Signale für freies D1 und D2 sind im Vergleich zum WT in beiden pulse-Gelen erkennbar. Zusätzlich scheinen die PSII-Assemblierungskomplexe RC (V) und RC47 (IV) verstärkt, was auf eine langsamere Assemblierung oder eine verringerte Stabilität der Komplexe schließen lässt.

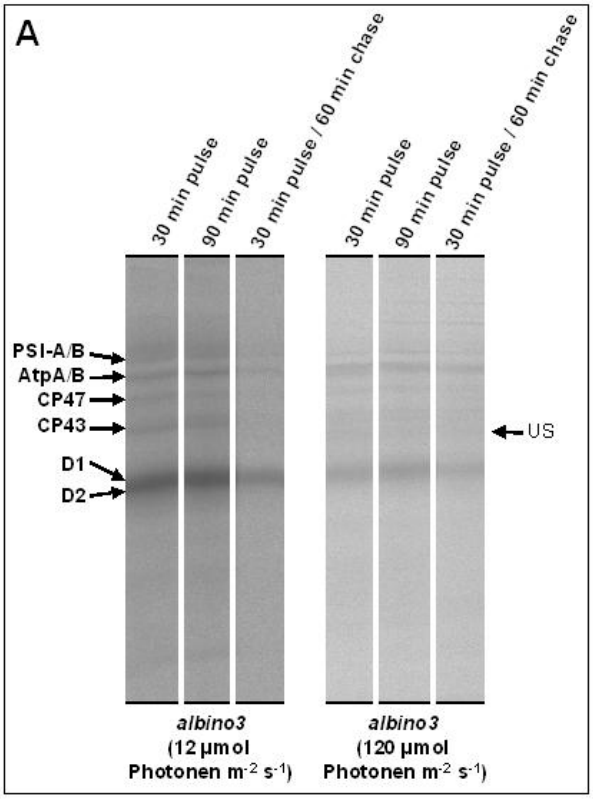
Die Betrachtung der Markierungsergebnisse für die Δ*cpftsy*-Mutante bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} lieferte zum WT vergleichbare Ergebnisse (Abb. 48). Die Signale, die auf dem Autoradiogramm des SDS-Gels zu sehen waren, zeigten das gleiche Muster wie beim WT (Abb. 48A). Dabei zeigte sich bei der pulse/chase-Probe zeigten ähnlich zum WT eine teilweise Signalverstärkung relativ zur 30 min pulse-Probe (Abb. 48B). Das zeigt, dass die Stabilität der Proteine in der Δ*cpftsy*-Mutante nur in sehr geringem Maße betroffen ist.
Auch die 2D-Gele zeigten WT-ähnliche Muster (Abb. 48C). Auf dem Gel der 90 min pulse-Probe konnten alle beim WT nachweisbaren Komplexe erkannt werden (Abb. 48C, Mitte). So fehlten weder PSII-Dimere noch Superkomplexe. Im Autoradiogramm des 2D-Gels der pulse/chase-Probe waren die frühen Assemblierungskomplexe von PSII, namentlich PSII-Reaktionszentrum und auch freies CP43 zu erkennen. Beim WT waren diese kaum detektierbar, was für Δ*cpftsy* wie bei *ffc*$^-$ auf eine verlangsamte Assemblierung der PSII-Komplexe oder auf eine verringerte Stabilität der Komplexe schließen lässt.



Protein	relative Signalstärke 30' pulse / 30' pulse 60' chase
PSI-A/B	115 %
AtpA/B	124 %
CP47	98 %
CP43	105 %
D1	96 %
D2	96 %

Abb. 48: *In vivo* Markierungsanalysen von Δ*cpftsy* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht (**A**). Proteinsignale sind mit Pfeilen markiert und benannt. Die Signale der pulse/chase-Probe wurden in Relation zu den Signalen der 30 min pulse-Probe quantifiziert und tabellarisch dargestellt (**B**). Die gleichen Proben des SDS-Gels wurden auch nativ auf einem BN-Gradientengel (4 bis 16 %) in einer 1. Dimension und über 12,5 %-ige SDS-Gele in einer 2. Dimension aufgetrennt (**C**). Die SDS-Gele wurden jeweils getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht. I: PSI/PSII-Superkomplexe; II: PSI-Monomer, PSII-Dimer; III: PSII-Monomer; IV: RC47 (CP43-freies PSII-Monomer); V: PSII-Reaktionszentrum; VI: freies Protein; 1: PSI-A/B; 2: AtpA/B; 3: CP47; 4: CP43; 5: D1/D2.

Bei der Betrachtung der *albino3*-Mutante mit Markierungen von Pflanzenmaterial, das bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurde, konnten auf dem Autoradiogramm des SDS-Gels nur schwache Signale erkannt werden (Abb. 49A). Dabei konnte auch ein nicht bekanntes Protein detektiert werden, dass unterhalb des CP43-Signals läuft (Abb. 49A, US). Hierbei handelt es sich vermutlich um ein relativ stabiles Degradationsprodukt.



B

Protein	relative Signalstärke 30‘ pulse / 30‘ pulse 60‘ chase	
	12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}	120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}
PSI-A/B	50 %	87 %
AtpA/B	62 %	73 %
CP47	42 %	77 %
CP43	52 %	82 %
US		67 %
D1	50 %	77 %
D2	51 %	77 %

Abb. 49: *In vivo*-Markierung und SDS-Gel von *albno3*.
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht (**A**). Proteinsignale sind mit Pfeilen markiert und benannt. Die Signale der pulse/chase-Probe wurden in Relation zu den Signalen der 30 min pulse-Probe quantifiziert und tabellarisch dargestellt (**B**). US: unbekanntes Signal.

Bei Proben von Pflanzenmaterial, das bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurde, sind die Signale deutlich stärker und auch das mögliche Degradationsprodukt ist hier

nicht vertreten (Abb. 49A). Auffällig ist, dass die Signale in der Spur der 90 min pulse-Probe ähnlich stark erscheinen wie die der 30 min pulse-Probe. Dies lässt zusammen mit den quantifizierten Signalen der pulse/chase-Spuren, die deutliche Reduktionen aufweisen, auf eine verringerte Stabilität der Proteine schließen (Abb. 49B).

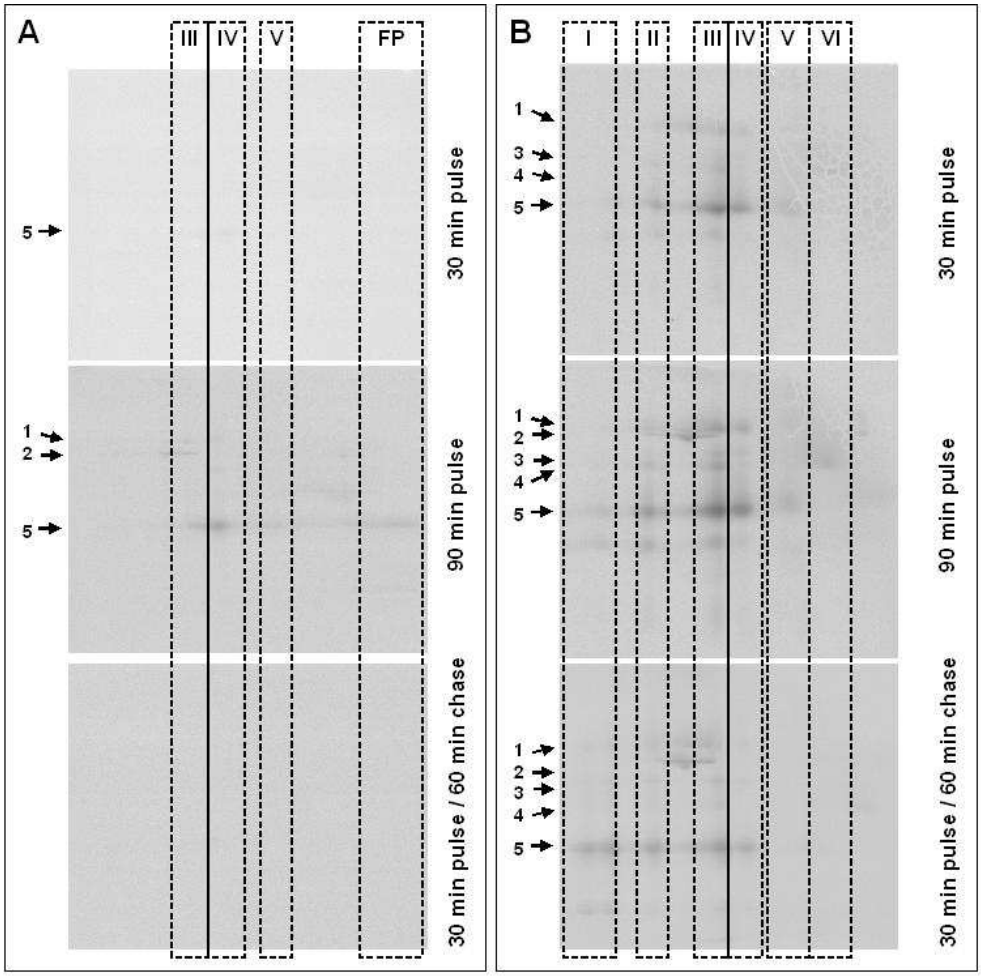


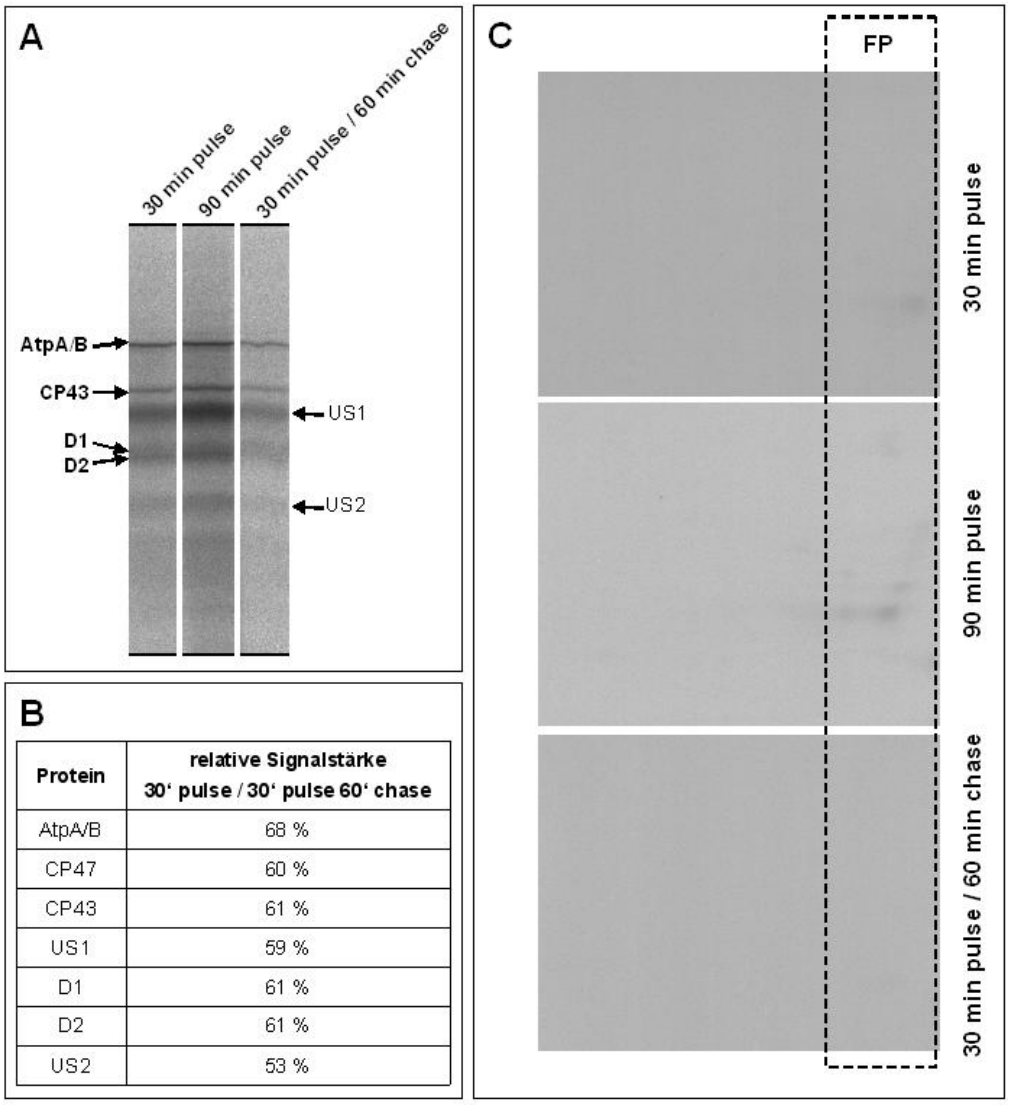
Abb. 50: *In vivo*-Markierung und 2D-BN/SDS-Gele von *albino3*.
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert und anschließend nativ auf einem BN-Gradientengel (4 bis 16 %) in einer 1. Dimension und über 12,5 %-ige SDS-Gele in einer 2. Dimension aufgetrennt (**A**: 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}; **B**: 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}). Die SDS-Gele wurden jeweils getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht. I: PSI/PSII-Superkomplexe; II: PSI-Monomer, PSII-Dimer; III: PSII-Monomer; IV: RC47 (CP43-freies PSII-Monomer); V: PSII-Reaktionszentrum; VI: freies Protein; 1: PSI-A/B; 2: AtpA/B; 3: CP47; 4: CP43; 5: D1/D2.

In den 2D-Gelen der Proben von *albino3*-Pflanzen, die bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, konnten nur im Gel der 90 min-pulse-Probe Signale erkannt werden. Bei dem detektierten Protein handelt es sich zum einen um das starke Signal von D1 im PSII-Monomer und zum anderen um ein schwaches Signal der ATP-Synthase (Abb. 50A, Mitte). In den 2D-Gelen der 30 min pulse-Probe und der pulse/chase-Probe konnten keinerlei radioaktive Markierungen erkannt werden.

Bei den 2D-Gelen der *in vivo*-Markierung von *albino3*-Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen wurden, waren jedoch überall Signale zu erkennen (Abb. 50B). Es konnten auch in dieser Mutante alle Komplexe nachgewiesen werden, die im WT vorhanden waren (vgl. Abb. 46). Das 2D-Gel des pulse/chase-Experimentes zeigte, dass die Signale im Vergleich zur 30 min pulse-Probe zurückgingen (Abb. 50B, oben und unten). Dabei waren die kleinen PSII-Assemblierungskomplexe nicht zu erkennen. Auffällig waren jedoch die deutlichen Signale der Superkomplexe, was darauf schließen ließ, dass diese eine gewisse Stabilität aufwiesen. Des Weiteren konnte mit diesem Ergebnis der Einbau der Radioaktivität aus den kleineren Assemblierungs-komplexen in die größeren Komplexe nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Markierung zeigten, dass in der *albino3*-Mutante trotz der Beeinträchtigungen durch den Knock-Out des Alb3-Proteins, die Assemblierung der Komplexe immer noch möglich, wenn auch durch die Mutation beeinträchtigt ist.

Die *in vivo*-Markierung von Δ*hcf106*-Pflanzenmaterial, das bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen worden war, lieferte keinerlei Signale in der 2D-Analyse (Daten nicht gezeigt). Daher wurde anschließend Pflanzenmaterial von 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}-Pflanzen markiert. Das Autoradiogramm des SDS-Gels lieferte klare Erkenntnisse (Abb. 51A). So konnten PSI-A und PSI-B sowie CP47 nicht nachgewiesen werden. Auch die nachgewiesenen Proteine, v.a. die PSII-Reaktionszentrumsproteine D1 und D2, waren im Vergleich zum WT stark reduziert. Erstaunlicherweise konnten zusätzliche Proteine detektiert werden, die aufgrund ihrer Größe nicht zugeordnet werden konnten (Abb. 51A, US1 und US2). Es könnte sich dabei erneut um stabile Degradationsprodukte handeln. Diese lassen zusammen mit den relativen Signal-Stärken in der pulse/chase-Spur (Abb. 51B) auf instabile Proteine schließen.



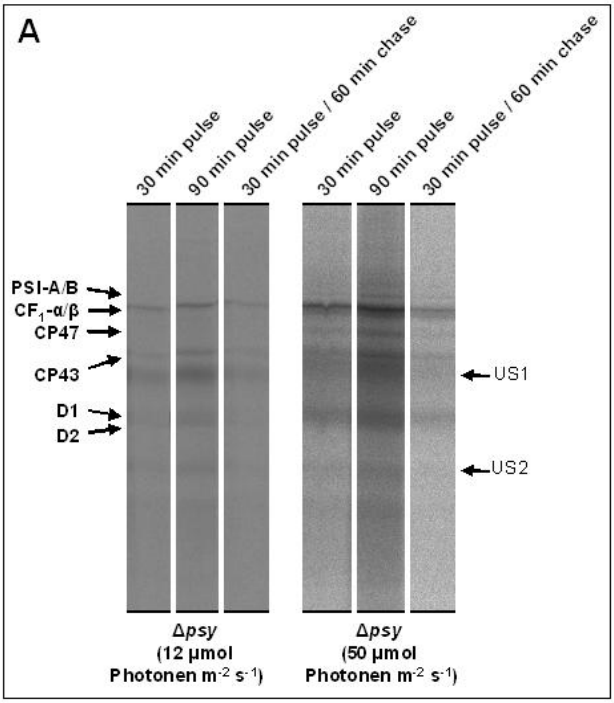
B

Protein	relative Signalstärke 30‘ pulse / 30‘ pulse 60‘ chase
AtpA/B	68 %
CP47	60 %
CP43	61 %
US1	59 %
D1	61 %
D2	61 %
US2	53 %

Abb. 51: *In vivo*-Markierungsanalysen von Δ*hcf106* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 Photonen µmol m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden mittel Phosphor-Imaging sichtbar gemacht (**A**). Proteinsignale sind mit Pfeilen markiert und benannt. Die Signale der pulse/chase-Probe wurden in Relation zu den Signalen 30 min pulse-Probe quantifiziert und tabellarisch dargestellt (**B**). Die gleichen Proben des SDS-Gels wurden auch nativ auf einem BN-Gradientengel (4 bis 16 %) in einer 1. Dimension und über 12,5 %-ige SDS-Gele in einer 2. Dimension aufgetrennt (**C**). Die SDS-Gele wurden jeweils getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht. FP: freies Protein; US1 und US2: unbekannte Signale.

Die markierten Proben von 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}-Pflanzen wurden auch auf 2D-Gelen untersucht (Abb. 51C). Bei den schwachen Signalen in der 90 min pulse-Probe

handelte es sich vermutlich um freie Proteine (Abb. 51C, Mitte, FP). Weitere Signale für Photosynthese-Komplexe bzw. deren Assemblierungsintermediate waren nicht zu detektieren.



B

Protein	relative Signalstärke 30' pulse / 30' pulse 60' chase	
	12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}	50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}
CF_1-α/β	68 %	67 %
CP43	84 %	60 %
US1	72 %	60 %
D1/D2	60 %	65 %
US2	62 %	39 %

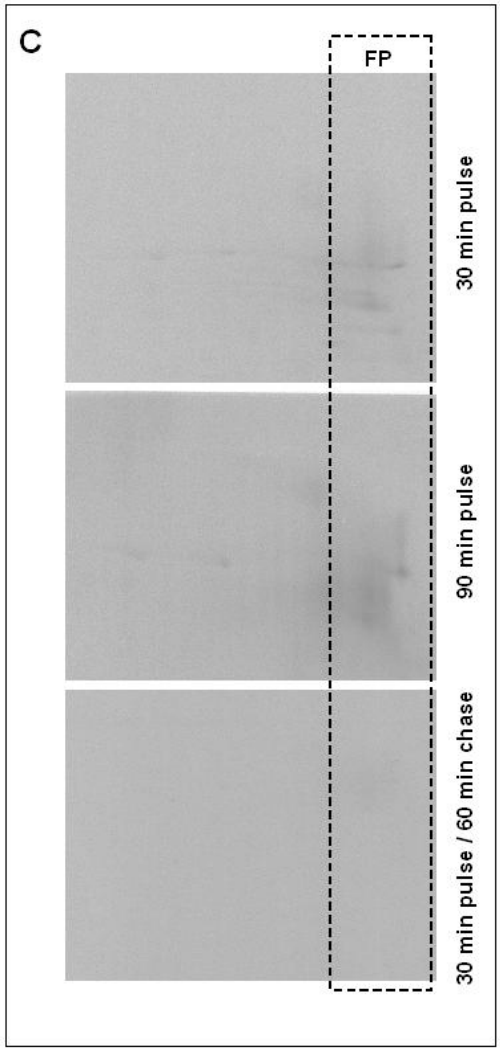


Abb. 52: *In vivo*-Markierungsanalysen von Δ*psy*.
Für die *in vivo*-Markierung wurden ca. 50 mg Rosettenblätter 45 min bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in Cycloheximid-Lösung vorinkubiert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial 30 min (30 min pulse) bzw. 90 min (90 min pulse) mit [^{35}S]-Methionin bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} oder 30 min mit [^{35}S]-Methionin und anschließend 60 min mit nicht radioaktivem Methionin (30 min pulse, 60 min chase) inkubiert. Danach wurden aus den Blättern Membranprotein-Komplexe isoliert, auf einem 12,5 %-igen SDS-Gel aufgetrennt, das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht (**A**). Proteinsignale sind mit Pfeilen markiert und benannt. Die Signale der pulse/chase-Probe wurden in Relation zu den Signalen der 30 min pulse-Probe quantifiziert und tabellarisch dargestellt (**B**). Die Proben von 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} wurden auch nativ auf einem BN-Gradientengel (4 bis 16 %) in einer 1. Dimension und über ein 12,5 %-igen SDS-Gel in einer 2. Dimension aufgetrennt (**C**). Die SDS-Gele wurden jeweils getrocknet und anschließend die radioaktiven Signale mittels Phosphor-Imaging sichtbar gemacht. FP: freies Protein; US1 und US2: unbekannte Signale.

Auch für die Δ*psy*-Mutante wurde zunächst Pflanzenmaterial, das bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen war, für die Markierung verwendet. Dabei konnten bei langen Expositionen der Proben im Vergleich zu Δ*hcf106* auch schwache Signale für CP47 und auch für PSI-A und PSI-B erkannt werden konnten (Abb. 52A, rechts).

Wie schon bei Δ*hcf106* konnten Proteine detektiert werden, die nicht zugeordnet werden konnten. Bei diesen handelt es sich aber vermutlich um stabile Degradationsprodukte, die wiederum zusammen mit den relativen Signalintensitäten der pulse/chase-Spur (Abb. 52B, rechts) auf eine Instabilität der Proteine in der Membran schließen lässt. Da jedoch auch auf den 2D-Gelen keine Signale detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden wiederum Pflanzen, die bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen worden waren, für die Markierung verwendet. Auf dem dargestellte Autoradiogramm des SDS-Gels von 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}-Pflanzen kann aufgrund von kürzerer Expositionszeit im Vergleich zum Autoradiogramm des SDS-Gels von und 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}-Pflanzen kein deutlicher Unterschied erkannt werden (Abb. 52A, links). Die relative Intensität der pulse/chase-Signale ist ähnlich denen der Proben bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} (Abb. 52B, links). Wie schon bei der Δ*hcf106*-Mutante zeigten auch die 2D-Gele der 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}-Pflanzen keine Signale, bzw. konnten bei 30 und 90 min pulse nur Signale für freie Proteine detektiert werden (Abb. 52C, oben und Mitte). Da im pulse/chase-2D-Gel keine Signale erkannt werden können, kann daraus geschlossen werden, dass die freien Proteine sehr instabil sind.

V. Diskussion

Der Endosymbiontentheorie zufolge haben sich Chloroplasten der im Laufe der Evolution aus dem Vorläufer eines Cyanobakteriums entwickelt (Bhattachaya et al., 2007; Martin et al., 2002; Müller und Martin, 1999). Im Zuge dieses Vorgangs gingen die meisten plastidären Gene verloren oder wurden in den Zellkern transferiert (Martin und Müller, 1998). Da unter diesen transferierten Genen auch solche sind, die für die Photosynthese und somit für eine der Hauptaufgaben der Chloroplasten benötigt werden, entwickelte sich wohl zunächst ein Vesikel-vermittelter Transport, der anschließend größtenteils durch den Transport von Proteinen durch TOC- und TIC-Komplexe ersetzt wurde (Bédard und Jarvis, 2005; Radhamony und Theg, 2006). Allerdings handelt es sich bei einer Vielzahl von Proteinen nicht um stromale Proteine, sondern um Proteine, die ihren Wirkort im Thylakoidlumen oder der Thylakoidmembran haben. Um dorthin zu gelangen, entwickelten sich an der Thylakoidmembran vier bisher bekannte Transportwege (Schünemann, 2007). Lumenale Proteine werden mit Hilfe des cpSec- oder des ΔpH/cpTat-Transportweges durch die Membran geschleust, während Membranproteine zum Teil spontan inserieren oder über den cpSRP-Weg in die Membran transportiert werden.

Mitglieder der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie sind an der Insertion und Assemblierung von Proteinen und deren Komplexen in biologischen Membranen von Organellen, Bakterien und von Archaea beteiligt (Yi und Dalbey, 2005; Zhang et al., 2009). So ist in der Thylakoidmembran Alb3p an der post-translationalen Insertion von LHCPs und der co-translationalen Assemblierung von D1 in die Membran beteiligt, während Alb4p für die Assemblierung der ATP-Synthase benötigt (Moore et al., 2003; Ossenbühl et al., 2004; Benz et al., 2009).

Der Knock-Out von Alb4p zeigt nur einen schwachen Phänotyp (Benz et al., 2009). Daher ist anzunehmen, dass Alb4p entweder nur eine untergeordnete Rolle im Proteintransport und der Assemblierung von Komplexen besitzt, es also nur die oben genannte Funktion ausführt, oder dass Alb3p einen Alb4p-Verlust zumindest teilweise ausgleichen kann. Im Vergleich dazu ist der Phänotyp der *albino3*-Mutante, die bei autotrophen Wachstumsbedingungen nicht keimt und auch unter heterotrophen Bedingungen nur selten über das 4-Blatt-Stadium hinaus wächst und steril bleibt (Sundberg et al., 1997), wesentlich gravierender. Das schließt eine Übernahme der

Alb3p-Funktionen durch Alb4p quasi aus. Jedoch ist der schwerwiegende Phänotyp des Alb3p-Knock-Outs mit seinen pleiotropen Effekten auf den Chloroplasten und die gesamte Pflanze nicht schlüssig allein durch die fehlende Integration von LHCPs in die Thylakoidmembran zu erklären, was auf weitere Aufgaben für Alb3p in der Biogenese der Thylakoidmembran und des Chloroplasten schließen lässt (Sundberg et al., 1997).
Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits etablierte T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana* näher charakterisiert und untersucht (Honold, 2008). T-DNA-Insertionen der Gene *CpFtsY* aus dem cpSRP-Transportweg und *Hcf106* aus dem ΔpH/cpTat-Weg wurden charakterisiert und mit der *albino3*-Mutante und der *ffc*$^{-}$-Mutante, in der mit cpSRP54 eine weitere Komponente des cpSRP-Wegs mutiert ist, vergleichend untersucht werden. Zusätzlich wurde eine T-DNA-Insertionsmutante für das *PSY*-Gen etabliert und charakterisiert, da in *Synechocystis* eine mögliche Beteiligung des Alb3p-Homologen Slr1471p an der Assemblierung von Carotinoiden in Proteinkomplexe der Thylakoidmembran vermutet wird (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung).

1. Vergleich der Phänotypen der untersuchten Mutanten mit der Literatur

1.1 Vergleich der Δ*cpftsy*-Mutante mit der Literatur

CpFtsY ist das chloroplastidäre Homologe zum bakteriellen SRP-Rezeptor SRα (Kogata et al., 1999) und liegt größtenteils im Stroma vor. Dort dirigiert CpFtsY den Transitkomplex bestehend aus cpSRP43, cpSRP54 und dem zu importierenden LHCP an die Membran, wo anschließend Alb3p die Integration des LHC-Proteins in die Thylakoidmembran vermittelt (Moore et al., 2003; Schünemann, 2007; Falk et al., 2010).

Bei der in dieser Arbeit charakterisierten T-DNA-Insertion in Intron 1 des *CpFtsY*-Gens handelt es sich um eine neue Mutante, jedoch keinesfalls um die erste untersuchte Mutation von *CpFtsY*. So haben Askura et al. (2004 und 2008) sowohl eine durch Transposon-Insertion hervorgerufene Mutation in Mais (*crs1*) als auch zwei T-DNA-Insertionsmutanten in *Arabidopsis* (*cpFtsY-1* und *cpFtsY-2*) kreiert. Sie zeigten in beiden Organismen, dass der Knock-Out von *CpFtsY* pleiotrope Effekte hervorruft und schlossen daraus, dass CpFtsY nicht nur eine Funktion im cpSRP-Transportweg

einnimmt, sondern auch an der Biogenese der Thylakoide beteiligt ist. Des Weiteren untersuchten sowohl Durrett et al. (2006; *frd4-1*) als auch Tzvetkova-Chevolleau et al. (2007) eine EMS-Mutante, in der durch eine Punkmutation im Exon 6 und einen daraus resultierenden Basenaustausch von Cytosin zu Thymin ein Stoppkodon generiert wurde. Dabei zeigten Tzvetkova-Chevolleau et al. (2007), dass CpFtsY sowohl an einem von zwei möglichen cpSRP-Wegen für die LHCP-Integration als auch möglicherweise an der Assemblierung der Photosysteme beteiligt ist. Durrett et al. (2006) isolierten die gleiche EMS-Mutante ein Jahr zuvor bei der Suche nach Mutanten, die Defekte in der Fe(III)-Chelat-Reduktase-(FRO2)-Aktivität aufwiesen. FRO2 reduziert die in pflanzlichen Wurzeln Fe^{3+} zu Fe^{2+}, bevor es in die Pflanze aufgenommen werden kann. Da Eisen-Schwefel-Komplexe zentrale Bestandteile der Elektronentransportkette im PSI und Cytochrom b_6f-Komplex sind, könnte sich CpFtsY bei einer Beteiligung am Eisenstoffwechsel auch durch eine Störung der Photochemie auf die Thylakoidmembran auswirken (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007).

In der Δ*cpftsy*-Mutante dieser Arbeit konnte trotz Transkription des mutierten Gens kein CpFtsY-Protein in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 8C und 8D). In Southern Blot-Analysen wurden keine zusätzlichen T-DNA-Insertionen gefunden (Abb. 12A). Durch Komplementation mit der entsprechenden WT-cDNA unter Kontrolle des 35S-Promotors konnte aus dem Δ*cpftsy*-Phänotyp erfolgreich wieder der WT-Phänotyp regeneriert werden (Abb. 12B bis 12D). All diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der hier untersuchten T-DNA-Insertion um eine Null-Mutante für CpFtsY handelt und der untersuchte Phänotyp allein auf diesen Knock-Out zurückzuführen ist.

Die Δ*cpftsy*-Mutante zeigt einen gelblichen bis schwach grünen Phänotyp (Abb. 9). Sie wächst wesentlich langsamer als der WT, gelangt jedoch zur Blüte und produziert fertile Samen. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit den oben genannten Mutanten, wobei jedoch die von Askura et al. (2008) etablierte T-DNA-Insertionsmutante einen sterilen Phänotyp aufweist und im Sätzlingsstadium letal ist. Auch die Mais-Mutante von Askura et al. (2004) weist einen letalen Phänotyp im Sätzlingsstadium auf.

Der Chl-Gehalt ist im Vergleich zum WT auf ca. 14 % reduziert, wobei Chl*a* mit 13,7 % eine etwas stärkere Reduktion aufweist als Chl*b* mit 15,4 % (Abb. 11C). Dies hat eine leichte Verringerung des Chl*a*/Chl*b*-Verhältnisses zur Folge (Abb. 11D). Der

Car-Gehalt liegt dagegen bei ca. 29 % des WT-Niveaus, was zu einer starken Reduktion des Verhältnisses von Chl zu Car führt. Dies ist ein Zeichen für photosynthetischen Stress und einen Schaden am Photosynthese-Apparat (Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Ein weiteres Zeichen für „Lichtstress“ ist die Ultrastruktur der Thylakoidmembran, die fast ausschließlich Stroma-Thylakoide aufweist und nur minimale Grana-Stapel erkennen lässt (Abb. 10).

Auch die Zunahme der Plastoglobuli im Vergleich zum WT ist ein Zeichen für oxidativen Stress, da zum Schutz der Thylakoidmembran gegen oxidativen Stress in den Plastoglobuli Tocopherole und Carotinoide produziert werden (Austin II. et al., 2006; Vidi et al., 2006; Youssef et al., 2010; Zhang et al., 2010). Auch die Ausprägung des Phänotyps in der Ultrastruktur ist mit der EMS-Mutante vergleichbar, wobei bei Tzvetkova-Chevolleau et al. (2007) größere Grana-Stapel gefunden wurden (Durrett et al., 2006). Dies könnte auf Unterschiede in den Wachstumsbedingungen zurückzuführen sein, da hier die Pflanzen unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, während die Pflanzen in dieser Arbeit unter Langtagbedingungen bei jedoch geringerer Lichtintensität gewachsen sind. Diese Unterschiede erklären auch den leicht erhöhten Chl-Gehalt der EMS-Mutante (ca. 20 %) im Vergleich zur hier untersuchten T-DNA-Insertion, bei der nur ca. 14 % des WT-Niveaus an Chl gemessen wurden. Die T-DNA-Insertionsmutanten von Askura et al. (2008) weist jedoch trotz Wachstum bei geringeren Lichtintensitäten einen nochmals deutlich verringerten Chl-Wert von 6 bis 7 % auf. Dies lässt zusammen mit den oben genannten Unterschieden vermuten, dass die T-DNA-Mutanten von Askura et al. (2008) eine zusätzliche sekundäre aber nicht nachgewiesene Mutation aufweist, die sowohl in der hier untersuchten Δ*cpftsy*-Mutante als auch in der EMS-Mutante nicht vorhanden ist und für den extremeren Phänotyp der „Askura-*cpftsy*-Mutante“ verantwortlich sein könnte.

1.2 Vergleich der *albino3*-Mutante mit der Literatur

Alb3p ist einer der beiden chloroplastidären Vertreter der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie in *Arabidopsis thaliana* (Sundberg et al., 1997; Jiang et al., 2002). Alb3p ist sowohl am post-translationalen cpSRP-Weg bei der Integration von LHCPs in die Thylakoidmembran als auch beim co-translationalen cpSRP-Weg bei der Integration und Assemblierung des Reaktionszentrumsproteins D1 in das PSII beteiligt

(Schünemann, 2007). Ursprünglich entdeckt wurde Alb3p von Sundberg et al. (1997) bei der Analyse von albinotischen Transposon-Insertionsmutanten (Long et al., 1993). Die *albino3*-Mutante wurde später sowohl von Askura et al. (2008) als auch in dieser Arbeit weiter untersucht.

Makroskopisch und mikroskopisch ist der in dieser Arbeit dargelegte Phänotyp mit dem in den beiden anderen Veröffentlichungen beschriebenen Phänotyp vergleichbar (Sundberg et al., 1997; Askura et al., 2008). So zeigte die *albino3*-Mutante bei Wachstum auf Erde einen im Keimlingsstadium letalen Phänotyp (Daten nicht gezeigt), was diverse andere *albino*- oder *xantha*-Mutanten auch zeigen (Runge et al., 1995; Bisanz et al., 2003; Albrecht et al., 2006). Bei Wachstum auf mit Saccharose angereichertem MS-Medium ist ein gelblicher Phänotyp erkennbar (Abb. 13A). Dabei wuchsen Pflanzen teilweise auch bis zur Blüte, produzierten jedoch keine fertilen Samen. In der Ultrastruktur waren, wie bei Sundberg et al. (1997) beschrieben, Chloroplasten ohne bzw. mit einzelnen Stroma-Thylakoiden zu erkennen. Grana-Thylakoide konnten nicht gefunden werden. Der ermittelte Chl-Gehalt von ca. 2 % verglichen zum WT deckt sich mit dem von Askura et al. (2008) beschriebenen Wert (Abb. 15A), weicht jedoch leicht von dem von Sundberg et al. (1997) angegebenen Wert (5 %) ab. Die Abweichung kann jedoch wiederum mit Unterschieden in den Wachstumsbedingungen erklärt werden. Da der Car-Gehalt auf nur ca. 14 % reduziert ist, ergibt sich ein stark verringertes Chl/Car-Verhältnis, was auf eine versuchte Adaptation an sehr starken oxidativen Stress zurückzuführen ist (Abb. 15B; Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Aufgrund des Lichtstresses sollte auch eine erhöhte Plastoglobuli-Zahl erwartet werden. Diese stehen aufgrund ihrer Entstehung aus der Thylakoidmembranen immer mit dieser in Kontakt (Austin II et al., 2006). Da kaum Membranen in der *albino3*-Mutante vorhanden sind, konnten vermutlich auch keine bzw. nur wenige Plastoglobuli beobachtet werden (Abb. 14). Anzumerken ist jedoch, dass z.B. in der Δ*psy*-Mutante auch ohne Thylakoidmembran Plastoglobuli unter dem Elektronenmikroskop beobachtet werden konnten, was die Frage aufwirft, ob Plastoglobuli zwangsweise mit der Thylakoidmembran zusammenhängen müssen. Das ebenfalls stark nach unten verschobene Verhältnis von Chl*a* zu Chl*b* deutet darauf hin, dass mehr LHCII-Proteine in die Thylakoidmembran integriert wurden, da diese ein Chl*a*/Chl*b*-Verhältnis zwischen 1,1 und 1,3 aufweisen, während LHCI-Proteine ein

Verhältnis von etwa 3 aufweisen (Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Jedoch ist aufgrund der allgemein niedrigen Werte eine Interpretation schwierig.

1.3 Vergleich der *ffc*$^-$-Mutante mit der Literatur

Bei CpSRP54 handelt es sich um das chloroplastidäre Homologe zum cytoplasmatischen SRP54 und wurde von Franklin und Hoffmann (1993) erstmals beschrieben. CpSRP54 ist wie Alb3p sowohl am co- als auch am post-translationalen cpSRP-Weg beteiligt (Schünemann, 2007). Das Protein liegt dabei in zwei Fraktionen vor, nämlich gebunden an CpSRP43 beim LHC-Transport und in Kontakt mit 70S-Ribosomen ohne CpSRP43 beim co-translationalen SRP-Weg (Franklin und Hoffmann, 1993; Schünemann et al., 1998). Zuerst wurde eine Mutation von Pilgrim et al. (1998) erzeugt, indem mutierte cpSRP54-cDNAs im WT-Hintergrund überexprimiert wurden. Ein Jahr später wurden von Amin et al. (1999) sowohl eine EMS- (*ffc1*-1) als auch eine T-DNA-Mutante (*ffc1*-2) charakterisiert. Bei der in dieser Arbeit vergleichend untersuchten *ffc*$^-$-Mutante handelt es sich um die *ffc1*-2-Mutante von Amin et al. (1999). Wie bei Amin et al. (1999) beschrieben, zeigt die in dieser Arbeit betrachtete *ffc*$^-$-Mutante bei den ersten Blättern eine schwache Ausbleichung, wächst aber ansonsten ähnlich zum WT und zeigt im späteren Verlauf keinen merklichen Phänotyp (Abb. 16A). Auch in der Ultrastruktur ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen, wobei eine geringfügige Reduktion der Anzahl an Grana-Stapeln zu erahnen ist (Abb. 16B). Dies zusammen mit der Tatsache, dass der Chl-Gehalt im Vergleich zum WT auf ca. 83 % reduziert ist (Abb. 17A), begründet sich mit der vermutlich leicht verringerten LHCP-Integration, die durch das Fehlen von CpSRP54 vermutlich erschwert und ausschließlich über den alternativen cpSRP-Weg abläuft (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007). Pilgrim et al. (1998) geben für die leicht gebleichten ersten Blätter einen Chl-Gehalt von 75 % an. Die leichte Verringerung des Chl/Car-Verhältnisses spricht zusammen mit dem vermehrten Auftreten von Plastoglobuli für einen leicht erhöhten oxidativen Stress (Abb. 17B und 16B; Austin II. et al., 2006). Das Chl*a*/Chl*b*-Verhältnis ist dagegen, wie früher beschrieben, nicht betroffen (Amin et al., 1998), was darauf schließen lässt, dass der Verlust von CpSRP54 keinen maßgeblichen Effekt auf das Verhältnis der Photosysteme und ihrer Lichtsammelkomplexe zueinander hat (Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Interessant sind die Ergebnisse einer

Proteom-Untersuchung von Rutschow et al. (2008). Sie bestätigen eine Beobachtung von Pilgrim et al. (1998), dass Chaperone wie HSP70, das grundsätzlich wichtig für die Chloroplasten-Biogenese ist, in der *ffc*$^-$-Mutante verstärkt expremiert werden, während alle Bestandteile des cpSRP-Weges nach unten reguliert werden (Latijnhouwers et al., 2010). Dies lässt vermuten, dass *Arabidopsis* bei Verlust von cpSRP54 Chaperone zur Stabilisierung von LHCPs bzw. der co-translational transportierten Proteine verwendet (Rutschow et al., 2008). Ebenso wird die Protease CLPC1 in *ffc*$^-$ nach oben reguliert, was einerseits dadurch erklärt werden kann, dass nicht integrierten Proteine degradiert werden müssen und andererseits plastidäre Proteasen wie z.B. Deg1 oder CLPC1 auch Chaperon-Aktivität besitzen (Bukau et al., 2006; Wu et al., 2010, Sun et al., 2010). Der Einfluss von CpSRP54 auf die Chloroplasten-Biogenese kann vielleicht ähnlich erklärt werden wie der Phänotyp von *sco*-Mutanten („snowy cotyledon“), die gebleichte bis weiße Kotyledonen aufweisen, jedoch im späteren Verlauf normales Wachstum zeigen (Albrecht et al., 2006 und 2008). Chloroplasten entstehen in frühen Wachstumsphasen direkt aus Etioplasten in den Kotyledonen und aus Proplastiden in den ersten Blättern, während spätere Chloroplasten durch Teilung entstehen (Albrecht et al., 2006). Die verlangsamte Integration von LHC-Proteinen und die Verzögerung im co-translationalen cpSRP-Weg in der *ffc*$^-$-Mutante könnte also für die verzögerte Chloroplasten-Biogenese in Kotyledonen und ersten Blättern verantwortlich sein, die von Pilgrim et al. (1998) beschrieben wurde. Ein weiterer Hinweis darauf ist, dass alle Komponenten des cpSRP-Wegs im Laufe der Blattentwicklung herunterreguliert werden, da sie offensichtlich bei einem vollständig entwickelten Thylakoidmembran-System nicht mehr von so großer Relevanz sind (Rutschow et al., 2008).

1.4 Vergleich der Δ*hcf106*-Mutante mit der Literatur

Im ΔpH/cpTat-Transportweg, der aufgrund eines zweiten Signalpeptids vollständig gefaltete Proteine durch die Thylakoidmembran in das Lumen des Chloroplasten transportiert, bilden CpTatC und Hcf106 zusammen einen Rezeptorkomplex. Dieser geht die initiale Bindung mit dem Signalpeptid des zu transportierenden Proteins ein und ermöglicht so erst dessen Transport (Cline und Dabney-Smith, 2008). Das Protein wird anschließend durch eine aus Tha4-Oligomeren geformte Pore durch die Membran transportiert (Cline und McCaffery, 2007).

In Mais (*Zea mays*) wurde erstmals eine *hcf106*-Mutante beschrieben, die einen gebleichten Phänotyp bei gleichzeitiger Keimlingssterblichkeit aufweist (Barkan et al., 1986; Martienssen et al., 1989; Das und Martienssen, 1995; Voekler und Barkan, 1995). Dabei wurde entdeckt, dass Hcf106 am Transport der Wasserspaltungsapparat-Untereinheiten OE17 und OE23 und den Photosystem-Untereinheiten PSII-T und PSI-N beteiligt ist (Kapazoglou et al., 1995; Voekler und Barkan, 1996). In der *hcf106*-Mutante sind aber nicht nur die Photosysteme betroffen, die um das drei- bis zehnfache reduziert vorliegen (Voekler und Barkan, 1995). Auch der Cytochrom b_6f-Komplex und der CF_O-Komplex der ATP-Synthase sind betroffen, während LHCPs und der ATP-Synthase-CF_1-Komplex in normalen Mengen akkumulieren. Dies kann beim ATP-Synthase-Komplex auf die reduzierten Mengen an AtpF und beim Cytochrom-Komplex auf die Untereinheit IV (Riske-Fe-S-Protein; PetC) zurückgeführt werden, die ebenfalls cpTat-spezifische Signalsequenz tragen (Breyton et al., 1994).

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Δ*hcf106*-Mutante handelt es sich trotz Transkription des mutierten *Hcf106*-Gens um eine Nullmutante in *A. thaliana*, was durch Western Blot-Analysen nachgewiesen wurde (Abb. 18C und 18D). Bisher wurde in *Arabidopsis* keine *Hcf106*-Knock-Out-Mutante beschrieben. Southern Blot-Analysen weisen auf zusätzliche T-DNA-Insertionen im Genom der Mutante hin (Abb. 22A). Durch Komplementation der Mutante mit *Hcf106*-cDNA unter 35S-Promotor-Kontrolle konnte jedoch gezeigt werden, dass der aufgetretene Phänotyp einzig auf den Knock-Out von *Hcf106* zurückzuführen ist (Abb. 22B und 22C).

Ebenso wie die Mais-*Hcf106*-Knock-Out-Mutante besitzt die Δ*hcf106*-Mutante einen gelblich weißen Phänotyp und kann ohne externe Kohlenstoffquelle nicht über das Keimlingsstadium hinaus wachsen (Abb. 19; Voekler und Barkan, 1995). Die Keimlingssterblichkeit zeigen auch andere *hcf*-Mutanten wie *hcf136*. Diese wurden in einem allgemeinen Ansatz entdeckt, bei dem gezielt nach Mutanten mit erhöhter Chlorophyll-Fluoreszens gesucht wurde (*hcf = high chlorophyll fluorescence*; Meurer et al., 1996; Meurer et al., 1998). Bei fast allen diesen *hcf*-Mutanten liegen Defekte bei den translationalen oder post-translationalen Regulationsprozessen der Thylakoidmembran-Biogenese vor, wobei die verschiedenen photosynthetischen Komplexe und deren Assemblierung betroffen sind. Durch die Störungen der Photosynthese kann die Pflanze das aufgenommene Licht nicht verarbeiten und gibt die Energie in Form von

Licht wieder ab. Bei Hcf136p handelt es sich beispielsweise um einen Assmblierungsfaktor von PSII, der in *A. thaliana* und in *Synechocystis* beschrieben ist (Plücken et al., 2002; Komenda et al., 2008). In *Arabidopsis* besitzt Hcf136p ein Transitpeptid für den Transport ins Thylakoid-Lumen, kann aber auch in stromalen Thylakoidmembranen gefunden werden, was auf eine amphiphile Struktur schließen lässt (Meurer et al., 1998). Bei der Zielsequenz handelt es sich laut Datenbank um ein ΔpH/cpTat-Signalpeptid. Daher sollte die Störung dieses Transportweges in Δ*hcf106* auch die Funktion von Hcf136p beeinträchtigen. Während die Δ*hcf106*-Mutante bei Wachstum auf Saccharose-haltigem Medium bei späteren Blättern ebenfalls gelblich bis schwach grünlich bleibt, unterscheidet sich der *hcf136*-Phänotyp hier merklich. Diese Mutante erreicht bei Wachstum auf Zucker einen WT-ähnlichen Zustand, wobei sie aber wie die Δ*hcf106*-Mutante steril bleibt (Meurer et al., 1998). Auch mikroskopisch ähneln sich die *hcf106*-Mutanten in Mais und *Arabidopsis* und die *hcf136*-Mutante. Jedoch ist der Phänotyp bei Δ*hcf106* in *Arabidopsis* am stärksten ausgeprägt, da dort in Rosettenblättern keinerlei Membranstruktur gefunden werden kann (Abb. 20). Erst in späteren Stielblättern sind einzelne komprimierte und stark vergrößerte Grana-Stapel zu erkennen, während diese bei *hcf136* in allen Blättern und in Mesophyllzellen der Mais-Mutante zu finden sind (Martienssen et al., 1989; Meurer et al., 1998). Die starke Komprimierung der Thylakoidmembranen in den vergrößerten Grana-Stapeln der *hcf136*-Mutante könnte durch das Fehlen von PSII und des Cytochrom b_6f-Komplexes erklärt werden, da das Vorhandensein dieser in Grana-Thylakoiden eine gewisse sterische Hinderung bei der Stapelung der Membran ergeben (Allen und Forsberg, 2001). Interessant ist, dass in Rosettenblättern der Δ*hcf106*-Mutante dieser Arbeit Plastoglobuli ohne Thylakoidmembran zu erkennen waren, obwohl diese eigentlich stets zusammenhängen müssten (Austin II. et al., 2006; Youssef et al., 2010). Dies ist ein Hinweis auf oxidativen Stress in der Mutante.

Ebenfalls von Interesse ist, dass z.T. eine deutliche Anhäufung von Vesikeln in den Chloroplasten von Rosettenblättern zu erkennen war. Dies deutet auf eine Störung des Chloroplasten-internen Vesikeltransport-Systems hin, an dem Vipp1 („vesicle inducing protein in plastids“) beteiligt ist (Abb. 20; Kroll et al., 2001; Westphal et al., 2001; Asseva et al., 2007). Dieses Vesikeltransportsystem ist essentiell an der Bildung der Thylakoidmembran beteiligt. Dabei ist Vipp1 an der Bildung der Vesikel an der inneren

Chloroplastenhüllmembran beteiligt, während die kleine GTPase FZL an der Fusion der Vesikel beteiligt zu sein scheint, die auch eine Rolle bei der Stapelung der Grana-Thylakoide zu spielen scheint (Gao et al., 2006; Waters und Langdale, 2009). Dadurch kann sich aus den Vesikeln die Thylakoidmembran bilden. In der Δ*hcf106*-Mutante waren in Rosettenblättern unter dem Elektronenmikroskop deutlich Vesikel zu sehen, die in späteren Rosettenblättern und Stielblättern nicht mehr beobachtet werden konnten (Abb. 20). Diese Abschwächung des Phänotyps ist bei der *vipp1*-Mutante in *A. thaliana* zu sehen, deren Phänotyp sich im Laufe der pflanzlichen Entwicklung abschwächt (Kroll et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass die Störung des Vesikeltransports in der Δ*hcf106*-Mutante in der späteren Entwicklung der Pflanze abgeschwächt ist. Vermutlich liegt in Δ*hcf106* eine Störung der Vesikelfusion vor. Möglicherweise wird durch den cpTat-Transportweg ein Protein transportiert, das katalytisch bei der Vesikelfusion wirkt. FZL scheidet als Kandidat praktisch aus, da dieses kein Signalpeptid für den ΔpH/cpTat-Transportweg besitzt und außerdem auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist (Gao et al., 2006). Die Abschwächung des Phänotyps ist ähnlich zu erklären wie zuvor bei der *ffc*$^{-}$-Mutante. Chloroplasten müssen zunächst neu aus Etioplasten bzw. Proplastiden gebildet werden, während sie später durch Teilung entstehen (Albrecht et al., 2006). Dabei müssen interne Membranen nicht neu gebildet werden, was die Störung bei der Vesikelfusion abschwächen würde.

Möglicherweise hängt die Störung im Vesikeltransport auch mit dem erhöhten oxidativen Stress zusammen, der durch das deutlich verringerte Chl/Car-Verhältnis verdeutlicht ist (Abb. 21B). Dieses Verhältnis ergibt sich, da der Chl-Gehalt auf ca. 3 % des WT-Niveaus sinkt, während der Car-Anteil bei ca. 11 % liegt (Abb. 8C). Aus den einzelnen Chl*a*- und Chl*b*-Werten ergibt sich ein Verhältnis von ca. 1,4, während der WT ein Verhältnis von 2,4 aufweist. Daraus ergibt sich ein vermehrtes LHCII-Vorkommen im Vergleich zu LHCI, da wie oben beschrieben LHCI ein Chl*a*/Chl*b*-Verhältnis von etwa 3 aufweist, während LHCII ein Chl*a*/Chl*b*-Verhältnis von 1,1 zu 1,3 besitzt (Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Jedoch ist auch hier das Chl*a*/Chl*b*-Verhältnis aufgrund der geringen Werte nur schwer zu interpretieren.

1.5 Vergleich der Δ*psy*-Mutante mit der Literatur

Bei der Phytoensynthase handelt es sich um ein Enzym, das den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Carotinoid-Biosynthese katalysiert (Scolnik und Bartley, 1994). Dabei wird Phytoen aus zwei Geranyl-gernayl-pyrophosphaten synthetisiert. Aus Phytoen entsteht durch zwei Desaturase-Schritte Lycopin, aus dem über zwei weitere Reaktionen α- und β-Carotin gebildet wird (Übersicht: Qin et al, 2007). Aus β-Carotin wird auch Abscisinsäure synthetisiert, während auf der Stufe des Geranyl-geranyl-pyrophosphat auch die Chlorophyll-Biosynthese abzweigt (Qin et al., 2007).

Bekannt ist ein Knock-Out der Phytoensynthase nur in *C. reinhardtii* (McCarthy et al., 2004; Inwood et al., 2008) und *Synechocystis* (Sozer et al., 2010). In *A. thaliana* wurden bisher Mutanten untersucht, die direkt (Qin et al., 2007) oder indirekt (Norris et al., 1995 und 1998; Carol und Kuntz, 2001) die Phytoendesaturase betreffen. Dabei wurde festgestellt, dass zwei Enzyme der Plastochinon-Biosynthese wichtig für die Phytoen-desaturase-Funktion sind (Norris et al., 1995 und 1998). Ebenso ist eine plastidäre terminale Oxidase, die im Lokus *IMMUTANS* kodiert und an der Plastochinon-Oxidation beteiligt ist, essentiell für die Desaturase-Funktion (Carol und Kuntz, 2001). Der Knock-Out der Phytoendesaturase (*pds*-Mutante) selbst führte erstaunlicherweise nicht nur zu einem Abschalten der Car-Synthese, sondern auch dazu, dass die Chl- und die Gibberillin-Biosynthese abgeschaltet wurde, obwohl diese auf Höhe des Geranyl-geranyl-Pyrophosphats von der Car-Synthese abzweigen (Qin et al., 2007). In *Chlamydomonas* und *Synechocystis* konnte durch den Knock-Out der Phytoensynthase zwar auch die Car-Synthese abgeschaltet werden, jedoch werden in beiden Fällen im Gegensatz zu den *pds*-Mutanten in *Arabidopsis* Chl synthetisiert (McCarthy et al., 2004; Sozer et al., 2010). Dabei konnte in *Synechocystis* ein Zusammenhang zwischen Car und der Assemblierung von PSII festgestellt werden, v.a. weil die Synthese von CP43 und CP47 herunterreguliert ist. Die anderen Photosynthesekomplexe scheinen nicht betroffen zu sein.

Bei der in dieser Arbeit etablierten T-DNA-Insertionslinie handelt es sich um die erste Knock-Out-Linie für das Phytoensynthase-Gen in *A. thaliana*. Zwar konnte mittels RT-PCR ein T-DNA enthaltendes Transkript nachgewiesen werden, aber da weder Car noch Chl vergleichbar zur *pds*-Mutante detektierbar sind (Daten nicht gezeigt), kann

davon ausgegangen werden, dass deren Synthese abgeschaltet wurde und es sich daher bei der Δ*psy*-Mutante um einen Knock-Out des *PSY*-Gens handelt. Bei der Komplementation mit WT-cDNA unter 35S-Promotor-Kontrolle traten trotz erfolgreicher Komplementation unterschiedliche Phänotypen auf (Abb. 25A und 25B). Ein ähnliches Phänomen wurde beim RNAi-vermittelten Abschalten der Phytoen-desaturase in *Arabidopsis* festgestellt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den auftretenden Phänotypen um einen epigenetischen Effekt handelt, der durch die Überexpression der Phytoensynthase hervorgerufen wird (Wang et al., 2005). Jedoch muss erwähnt werden, dass in zwei anderen Studien die Überexpression zu keinerlei RNA-Inteferenz führte, sondern durch die erhöhte Menge an Phytoensynthase eine Überproduktion von Carotinoiden stattfand (Lindgren et al., 2003; Maass et al., 2009). Jedoch konnte durch Komplementation der Δ*psy*-Mutante mit WT-cDNA unter Kontrolle des nativen Promotors eine erfolgreiche Komplementation mit Wieder-herstellung des WT-Phänotyps erreicht werden (Abb. 25C und 25D). Dies bestätigt, dass der gezeigte Phänotyp allein durch den Knock-Out der Phytoensynthase begründet ist.

Der Phänotyp äußert sich aufgrund des Fehlens von Car und Chl in absolut weißen Pflanzen (Abb. 23C), die zu Beginn der Entwicklung durch Anthocyan-Bildung lila Schattierungen aufweisen können (Daten nicht gezeigt). Die Δ*psy*-Pflanzen zeigen Zwergen-Wachstum, blühen nur gelegentlich und bringen keine fertilen Samen hervor. TEM-Aufnahmen zeigen im Vergleich zum WT verkleinerte Plastiden mit großen Stärke-Ansammlungen ohne Thylakoidmembran-System (Abb. 24). Jedoch konnten Plastoglobuli gefunden werden, die eigentlich Thylakoidmembran-assoziiert sind und auf oxidativen Stress hinweisen (Austin II. et al., 2006; Youssef et al., 2010). Der gleiche weiße und sterile Phänotyp, der mit der Abwesenheit von Car und Chl zusammenhängt, kann auch bei den *pds*-Mutanten von *Arabidopsis* gesehen werden (Norris et al., 1995; Qin et al., 2007). Dabei weist *pds3* einen Knock-Out der Phytoen-desaturase auf, während bei *pds1* und *pds2* mit der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxigenase und der Phytyl/Prenyltransferase jeweils Enzyme der Plastochinon-Biosynthese betroffen sind. Plastochinon fungiert als Akzeptor von Elektronen, die beim Desaturase-Schritt der Carotenoid-Biosynthese anfallen (siehe Abb. 53; Norris et al., 1995; Qin et al., 2007). Auch die *C. reinhardtii*-Stämme, in denen die Phytoen-

synthase defekt ist und dadurch keinerlei Car gebildet werden, zeigen trotz des Vorhandenseins von Chl einen weißen Phänotyp (McCarthy et al., 2004; Inwood et al., 2008). Der Plastid der Alge zeigt dabei kein internes Membransystem und die Alge akkumuliert große Mengen an Stärke (Inwood et al., 2008).

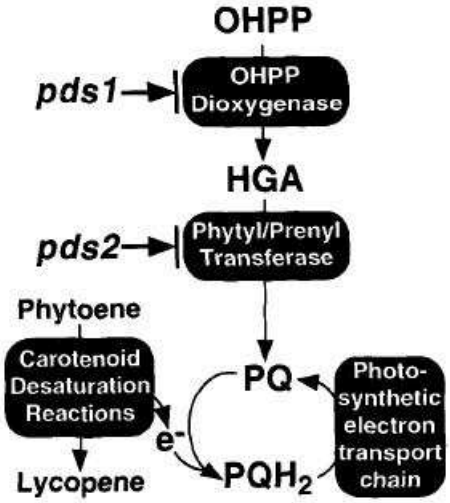


Abb. 53: Modell zur Beteiligung von Plastochinon an der Phytoendesaturase-Reaktion (Norris et al., 1995).
Aus 4-Hydroxyphenylpyruvat (OHPP) entsteht über die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase zu Homogentisinsäure (HGA), aus der über eine Phytyl/Prenyl-Transferase und weitere Reaktionen Plastochinon (PQ) gebildet wird. Dieses bildet mit Plastochinol (PQH_2) den Plastochinon-Pool, der Elektronen aus der Phytoendesaturase-Reaktion aufnimmt und auch an der Photosynthese beteiligt ist. Die Mutanten *pds1* und *pds2* sind in der Abb. gekennzeichnet.

Auch in der Δ*psy*-Mutante dieser Arbeit konnte vergleichbar zur *pds3*-Mutante kein internes Membransystem gefunden werden (Qin et al., 2007). Da in beiden Mutanten die Chloroplasten große Vakuolen aufweisen, kann vermutet werden, dass auch hier wie bei *C. reinhardtii* Stärke akkumuliert. Da die Stärke nicht durch autotrophes Wachstum entstanden sein kann, ist anzunehmen, dass es sich dabei um Nährstoffe handelt, die die *Arabidopsis*-Mutante aus dem Medium aufnimmt.

2. Vergleich von Schwachlicht- mit Standardlichtbedingungen und daraus resultierende Erkenntnisse

In einer früheren Studie, die sich auch mit einer *cpftsy*-Mutante beschäftigte, wird erwähnt, dass diese Mutante bei Wachstum unter Schwachlicht vermutlich aufgrund

von vermindertem oxidativem Stress wieder WT-ähnliche Thylakoidmembran-Strukturen aufweist und auch makroskopisch dem WT ähnelt (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007). Aus diesem Grund wurden die beschriebenen Mutanten sowohl unter ihren jeweiligen Anzuchtlichtbedingungen (50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bei Δ*psy* und Δ*hcf106*; 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bei Δ*cpftsy* und *albino3*) und zusätzlich unter Schwachlicht (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) angezogen und der Phänotyp verglichen. Die Unterschiede wurden auch proteinbiochemisch mittels Western Blot- und 2D-BN/SDS-Analysen sowie mit *in vivo*-Markierungsexperimenten untersucht, um den biochemischen Ursprung der Phänotypen näher betrachten zu können. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich neue Erkenntnisse, die im Folgenden diskutiert werden.

2.1 CpFtsY und Alb3p sind Assistenten der LHCP-Integration

Sowohl das Membranprotein Alb3p als auch das stromale Protein CpFtsY, das z.T. auch mit der Thylakoidmembran assoziiert, sind an der Integration von LHC-Proteinen im cpSRP-Transportweg beteiligt (Moore et al., 2000; Woolhead et al., 2001; Moore et al., 2003). Dabei ist Alb3p auch an einem alternativen cpSRP-Weg beteiligt, an dem nur cpSRP43 und Alb3p für die Integration von LHCPs beteiligt sein sollen (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007).

Auf die Phänotypen der *albino3*- und der Δ*cpftsy*-Mutante bei Wachstum bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} Licht wurde bereits zuvor eingegangen (V.1.1 und V.1.2). Bringt man die Pflanzen nun unter Schwachlicht (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}) aus, so ändert sich der Phänotyp. Makroskopisch war bei beiden Pflanzen eine sichtbar stärkere Grünfärbung der Blätter zu beobachten (Abb. 26 und 28). Diese subjektive Ergrünung konnte auch durch Chl-Quantifizierung bestätigt werden. So stieg der Chl-Gehalt bei der Δ*cpftsy*-Mutante von ca. 14 µg/g Frischgewicht auf ca. 33 µg/g Frischgewicht und bei der *albino3*-Mutante von ca. 2 µg/g auf ca. 10 µg/g (Abb. 33 und Tab. 4). Dieses Ergrünen ging auch mit einer Änderung der Struktur der Thylakoidmembran einher. Bei der *albino3*-Mutante konnten bei Chloroplasten unter 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} keine Thylakoidmembran-Strukturen bzw. in einzelnen Chloroplasten vereinzelte Stroma-Thylakoide beobachtet werden (Abb. 14 und 17). Bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsene Chloroplasten traten dagegen in allen Chloroplasten interne Membranstrukturen auf, wobei nur z.T. Stroma-Thylakoide auftraten, aber in allen

Chloroplasten einzelne Grana-Stapel zu sehen waren. Die Δ*cpftsy*-Mutante zeigte bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} kaum Grana- und fast ausschließlich Stroma-Thylakoide. Bei Wachstum bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} konnte in Chloroplasten dagegen eine WT-ähnliche Membranstruktur mit ausgeprägten Grana-Stapeln beobachtet werden. Die Änderungen in der Thylakoidmembran-Struktur hängen vermutlich mit dem vermehrten Einbau von LHCII-Proteinen in die Membran zusammen. So konnte mittels Western Blot und auch in 2D-Gelen sowohl bei der Δ*cpftsy*-Mutante als auch bei *albino3* ein stark erhöhtes Vorkommen von LHCII in Membranen nachgewiesen werden (Abb. 36, 38, 41 und 43).

Aus diesen LHCII-Proteinen können sich ohne das Zutun zusätzlicher Faktoren nur durch das Vorhandensein der Lipide der Membran Trimere ausbilden, die wiederum für die Stapelung der Thylakoidmembran in den Grana-Stapeln verantwortlich sind, da sich allein durch LHCII-Trimere ungeordnete Lipide in Stapeln anordnen können (Hobe et al., 1994; Simidjiev et al., 2000; Allen und Forsberg, 2001). Jedoch wirft das die Frage auf, wie die LHCII-Proteine trotz der jeweiligen Beeinträchtigung im cpSRP-Weg in die Thylakoidmembran integrieren. Hoober et al. stellten die Vermutung auf, dass LHC-Proteine bereits beim Transport durch die Hüllmembranen in die innere Hüllmembran integrieren können und dabei mit Chl und Car assemblieren, die für die korrekte Faltung nötig sind und diese auch induzieren (Paulsen et al. 1993; Hoober und Eggink, 2001; Hoober et al., 2007). Daraufhin wurde vermutet, dass über das Vesikel-transport-System des Chloroplasten, an dem VIPP1 beteiligt ist, LHCPs von der inneren Hüllmembran zu den Thylakoiden transportiert werden können (Westphal et al., 2001; von Wettstein, 2001; Waters und Langdale, 2009).

Die verbesserte Membranstruktur aufgrund des vermehrten Einbaus von LHCPs könnte auch mit vermindertem oxidativen Stress zusammenhängen. So konnten in der Δ*cpftsy*-Mutante in den Chloroplasten wesentlich weniger Plastoglobuli entdeckt werden als bei Wachstum bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}, die als Hinweis auf erhöhten oxidativen Stress gelten (Austin II. et al., 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl bei *albino3* als auch bei Δ*cpftsy* bei Wachstum bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} der Car-Gehalt weniger stark steigt als der Chl-Gehalt, was dazu führt, dass sich das Chl/Car-Verhältnis bei Δ*cpftsy* fast auf WT-Niveau verdoppelt und bei *albino3* verdreifacht (Abb. 33 und 34, Tab. 4 und 5). Dies ist ein weiteres Zeichen für reduzierten oxidativen Stress

(Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Oxidativer Stress ist in Form von ROS (*reactive oxygen species* = reaktive Sauerstoff-Spezies) auch direkt an der Regulation der LHCP-Expression beteiligt. So aktivieren ROS über GUN1 („*genome uncoupled* 1“) den negativen Regulator ABI4, der die Transkription der *Lhcb*-Gene hemmt (Kakizaki et al., 2009; Inaba, 2010; erläuternde Abb. siehe Anhang). Dabei wird der eigentliche Aktivator HY5, der sonst durch ein durch Licht über cry1 gebildetes Signal die *Lhcb*-Transkription aktiviert, in einen Repressor umgewandelt (Larkin und Ruckle, 2008). Wird aber die Lichtintensität reduziert, sollten weniger ROS entstehen und somit sollte das Signal der *Lhcb*-Repression abgeschwächt werden. Jedoch wird nicht nur die LHCP-Expression durch retrograde Signale beeinflusst. Evtl. spielen retrograde Signale auch bei der Licht-abhängigen Expression des PSII-Proteins D2 und des PSI-Proteins PsaB eine Rolle (Barneche et al., 2006). Dabei wird bei verstärkter Lichtintensität die Expression der beiden genannten Proteine aktiviert, während sie bei weniger Licht inhibiert wird. Durch das Fehlen der beiden Komplex-Initiatorproteine wird auch die Expression der anderen am Komplex beteiligten Proteine über den sog. CES-(“*control by epistasy of synthesis*”)-Prozess inhibiert (Wostrikoff et al., 2004; Minai et al., 2006). Außerdem ist bekannt, dass bei funktionell gestörten Chloroplasten solche negativen Signale bei Lichtreduktion abgeschwächt werden können (Larkin und Ruckle, 2006). Das könnte erklären, dass sowohl bei *albino3* als auch bei Δ*cpftsy* in den Membranfraktionen von bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsenen Pflanzen mehr Proteine der Photosysteme nachgewiesen werden konnten als bei Standardlicht-bedingungen (Abb. 41 und 43).

Die Reduktion von Photosynthesekomplex-Proteinen in den Mutanten war auch früher schon beobachtet worden (Askura et al., 2004 und 2008). Die Verstärkung der Proteinsignale war jedoch auch in den 2D-BN/SDS-Gelen zu erkennen, in denen bei beiden Mutanten eine Vermehrung v.a. von größeren PSII-Komplexen wie PSII-Monomer oder PSII-Dimeren sowie der Superkomplexe gezeigt werden konnte. Eine Erklärung, warum *albino3* trotz geringer Lichtintensität einen schwerwiegenderen Phänotyp aufweist, könnte sein, dass Alb3p im Gegensatz zu CpFtsY nicht nur an der LHCII-Integration, sondern auch an der Photosystem-Assemblierung beteiligt ist. Alb3p interagiert mit den PSII-Assemblierungsfaktoren LPA2 und LPA3, nicht aber mit LPA1 („*low PSII accumulation*“) und ist dadurch an der Assemblierung von CP43 ins PSII

beteiligt (Peng et al., 2006; Ma et al., 2007; Cai et al., 2010). Dadurch führt das Fehlen von Alb3p zu einer verzögerten bzw. deutlich erschwerten Assemblierung des PSII, was wiederum zu freien PSII-Proteinen führt. Diese blockieren, wie zuvor erwähnt, über den CES-Prozess ihre eigene Expression. Daher sind in der *albino3*-Mutante PSII-Proteine im Vergleich zur Δ*cpftsy*-Mutante deutlich in Synthese und Stabilität reduziert (Abb. 41 und 43).

Die Beteiligung von Alb3p an der PSII-Assemblierung kann auch anhand der *in vivo*-Markierungsanalysen gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass bei der Δ*cpftsy*-Mutante die Stabilität plastidär kodierter Proteine im Vergleich zum WT kaum beeinflusst ist, während evtl. ein leichter Effekt auf die Geschwindigkeit der PSII-Assemblierung beobachtet werden konnte (Abb. 46 und 48). So erscheinen die Signale der Assemblierungskomplexe, verglichen mit dem WT, stärker, was darauf schließen lässt, dass die PSII-Assemblierung leicht verzögert abläuft. Jedoch kann die Beteiligung von CpFtsY an der PSII-Assemblierung nicht eindeutig belegt werden. Bei der *albino3*-Mutante sind hingegen einige Aspekte ersichtlich. So sind die Synthese und die Integration von plastidären Proteinen bei Wachstum bei 120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} stark beeinträchtigt, es werden jedoch alle Proteine translatiert und integriert (Abb. 49A). Der Prozess läuft bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} offenbar besser ab, da hier mehr Protein in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnte. An der Integration von D1 ist neben Alb3p auch CpSecY beteiligt und es wird vermutet, dass auch andere im Plastiden kodierte Proteine co-translational über einen Alb3p/CpSecY-abhängigen Weg in die Thylakoidmembran integriert werden (Zhang et al., 2001; Moore et al., 2003; Klostermann et al., 2005). Dieser Import könnte auch ohne Alb3p noch ablaufen, jedoch vermutlich deutlich verlangsamt. Dies würde wiederum die Verzögerung der PS-Assemblierung und z.T. auch die Instabilität plastidär kodierter Proteine erklären, da diese durch den verlangsamten Transport evtl. falsch integrieren und anschließend abgebaut werden.

Dies, zusammen mit der Tatsache, dass auch LHCII-Proteine in Abwesenheit von Alb3p *in vivo* in die Thylakoidmembran integrieren können, spricht dafür, dass es sich bei Alb3p nicht direkt um eine Translokase handelt, sondern dass Alb3p eher die Funktion eines membranständigen Chaperons einnimmt. Das würde auch die Funktion von Alb3p bei der PSII-Assemblierung erklären. Bei 2D-BN/SDS-Analysen der *in vivo*-

Markierungen konnte bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} aufgrund der vermehrt vorhandenen Proteine festgestellt werden, dass die *albino3*-Mutante durchaus zur Assemblierung der Photosysteme und damit auch PSII fähig ist (Abb. 50). Das wiederum bedeutet, dass trotz des Fehlens von Alb3p die Assemblierung mit Hilfe von z.B. LPA2 und LPA3 vonstatten geht, was wiederum einen Hinweis darauf liefert, dass Alb3p als Membran-Chaperon eine katalytische, aber keine essentielle Wirkung auf die Assemblierung hat.

Für CpFtsY wurde 2006 eine Beteiligung am Eisen-Stoffwechsel in den Wurzeln angenommen, da in einer *cpftsy*-Mutante die Fe(III)-Chelat-Reduktase-(FRO2)-Aktivität gestört war, die in pflanzlichen Wurzeln Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert, bevor es in die Pflanze aufgenommen werden kann (Durrett et al., 2006). Da Eisen auch in Eisen-Schwefel-Komplexen wie dem Cytochrom b_6f-Komplex eine wichtige Rolle spielt, könnte angenommen werden, dass in der Δ*cpftsy*-Mutante Komplexe, die Eisen-Schwefel-Bestandteile enthalten, in ihrer Funktion gestört sind. So wurde bereits angenommen, dass das der Grund für die gestörte Photochemie in der *cpftsy*-Mutante ist (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007). Die Assemblierung der Komplexe sollte nicht beeinträchtigt sein, da zum einen mit dem Rieske-Protein (Untereinheit IV) nur ein Protein im Cytochrom b_6f-Komplex ein Eisen-Schwefel-Protein ist und da dieses Protein zum anderen trotz fehlenden Eisens in den Komplex assembliert werden könnte. In dieser Arbeit konnte mittels Western Blot-Analysen im Gegensatz zu früheren Arbeiten kein Unterschied im Auftreten des Cytochrom b_6f-Bestandteils Cyt. *f* beobachtet werden (Askura et al., 2007; Abb. 43). Auch bei den 2D-BN/SDS-Analysen konnte kein spezifischer Effekt der Mutation im *CpFtsY*-Gen auf den Cytochrom b_6f-Komplex festgestellt werden (Abb. 38). Diese Ergebnisse, zusammen mit der Tatsache, dass Cyt. *f* ebenfalls über den CES-Prozess reguliert wird, lässt die Vermutung zu, dass es sich bei der Assemblierung wie oben beschrieben verhält, dass also evtl. ein nicht funktionales Protein in den Komplex eingebaut wird (Choquet et al., 1998; Choquet et al., 2003). Allerdings wäre in diesem Fall ein Abbau des nicht funktionalen Komplexes anzunehmen, was wiederum in 2D- und auch in Western Blot-Analysen erkannt werden müsste.

Daher scheint CpFtsY in Chloroplasten nur als Rezeptor des cpSRP-Transportweges für LHC-Proteine zu fungieren, jedoch ist eine Beteiligung am Eisen-Stoffwechsel von Chloroplasten nicht gänzlich auszuschließen. Bei der Störung der FRO2-Aktivität in

Wurzeln könnte es sich allerdings auch um einen sekundären Effekt der Δ*cpfsy*-Mutation handeln.

2.2 CpSRP54 möglicherweise beteiligt an PSII-Superkomplex-Assemblierung

Der Verlust von CpSRP54 als Bestandteil des co- und post-translationalen cpSRP-Transportweges zeigt nur im frühen Wachstumsstadium einen sichtbaren Phänotyp in der *ffc*$^-$-Mutante (Pigrim et al., 1998; Amin et al., 1999).

Wie bereits erwähnt, scheinen die Komponenten des cpSRP-Weges in späteren Entwicklungsphasen von Blättern nicht mehr von allzu großer Relevanz zu sein. Aber bei der frühen Entwicklung z.B. in den Kotyledonen nehmen die Transportwege eine wichtige Rolle ein (Pilgrim et al., 1998; Rutschow et al., 2007). Interessant ist auch, dass offenbar über die plastidäre Methionin-Sulfoxid-Reduktase B reguliert wird, ob CpSRP54 oxidiert oder reduziert vorliegt (Laugier et al., 2010). Dadurch ergibt sich eine post-translationale Regulation der LHCP-Integration.

Es wurde bereits oben darauf eingegangen, dass die *ffc*$^-$-Mutante in späteren Entwicklungsphasen einen eher milden Phänotyp mit einer leichten Reduktion der Chl-Gehaltes und Anzeichen für leicht erhöhten oxidativen Stress aufweist (V.1.3). Dieser milde Phänotyp ist auch zu erkennen, wenn man sich den Gehalt verschiedener Proteine der Photosynthesekomplexe in der Thylakoidmembran sowie das Auftreten der Komplexe betrachtet (Abb. 37 und 42). So können im BN-Gel nur geringe Unterschiede zum WT ausgemacht werden. Der PSI-Subkomplex, ein Assemblierungskomplex von PSI scheint leicht reduziert zu sein, während RC47 als Assemblierungsintermediat von PSII leicht verstärkt ist (Abb. 37A). In der 2. Dimension erscheinen die PSII-Assemblierungskomplexe RC, RC47 und auch das PSII-Monomer im Vergleich zum WT leicht verstärkt, während PSII-Dimer eher reduziert zu sein scheint (Abb. 37B). Bei Western Blot-Analysen konnten keine deutlichen Unterschiede im Vorkommen von photosynthetischen Proteinen in der Thylakoidmembran erkannt werden (Abb. 42). Einzig die Signale von Photosystem-Proteinen, sowohl von PSII als auch von PSI, schienen leicht reduziert zu sein. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigen die *in vivo*-Markierungen, dass in der *ffc*$^-$-Mutante PSII-Dimere und PSII-Superkomplexe bei den hier verwendeten pulse-Zeiten in stark reduziertem Maße gebildet werden (Abb. 47C). Dies hängt jedoch nicht mit einer verminderten Synthese der plastidär

kodierten Proteine zusammen, da diese im Vergleich zum WT unverändert ist (Abb. 47A). Allerdings scheint die Stabilität der Proteine im Vergleich zum WT verringert, was v.a. für die größeren plastidär kodierten Proteine gilt. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf erhöhten oxidativen Stress sein, da dadurch Proteine stärker bzw. schneller geschädigt und anschließend abgebaut werden. Diese Beobachtung passt auch mit der Tatsache zusammen, dass in der *cpsrp54*-Mutante plastidäre Chaperone wie HSP70 und Proteasen wie z.B. CLPC1 verstärkt expremiert werden (Rutschow et al., 2008). Da aber in 2D-Analysen sowohl PSII-Dimere als auch Superkomplexe nur leicht reduziert erscheinen (Abb. 37B), kann angenommen werden, dass deren Assemblierung in der *ffc*$^{-}$-Mutante per se funktioniert und die gebildeten Komplexe auch stabil vorliegen, jedoch die Geschwindigkeit der Assemblierung deutlich reduziert ist. Dies könnte mit der Beteiligung von CpSRP54 am co-translationalen cpSRP-Weg zusammenhängen. Bisher konnte gezeigt werden, dass D1 co-translational mit Hilfe von CpSRP54 und Alb3p in die Thylakoidmembran integriert (Nilsson et al., 1999; Nilson und van Wijk, 2002; Zhang et al., 2001). Dabei bringt CpSRP54 das translatierende Ribosom mit der naszierenden Kette an die Thylakoid-membran und vermittelt so zwischen Ribosom und Membran. Dieser co-translationale Integrationsmechanismus wird auch für andere plastidär kodierte Proteine angenommen (Pasch et al., 2005). Durch das Fehlen des katalytisch wirkenden CpSRP54 könnte also die Integration von plastidär kodierten Proteinen in die Thylakoidmembran erschwert sein und langsamer ablaufen, wodurch die Proteine falsch bzw. gar nicht in die Membran integrieren könnten. Es könnte sein, dass nur naszierende Ketten bestimmter Länge in die Membran integriert werden können. Da CpSRP54 zwischen Ribosom und Membran vermittelt, könnte die Synthese der Proteine abgelaufen sein, bevor die meisten Proteine die Thylakoidmembran erreicht haben. Dies würde wiederum keinen bzw. einen falschen Einbau der Proteine in die Membran und anschließend deren Abbau durch die überexprimierten Proteasen (z.B. CLPC1) zur Folge haben. Dies würde die verminderte Stabilität der plastidär kodierten Proteine in *in vivo*-Markierungen erklären, die v.a. bei den großen Proteinen wie PsaA und PsaB auftritt. Interessant ist auch, dass bei *albino3* die Assemblierungsgeschwindigkeit von größeren PSII-Komplexen nicht so sehr beeinträchtigt zu sein scheint wie bei der *ffc*$^{-}$-Mutante (Abb. 47C und 50). Dies könnte darauf hindeuten, dass CpSRP54 als Bindeglied zwischen den translatierenden

Ribosomen und der Thylakoidmembran eine wichtigere Funktion beim co-translationalen cpSRP-Weg einnimmt als Alb3p.

CpSRP54 ist also nicht direkt an der Assemblierung von PS-Komplexen beteiligt. Jedoch könnte der Einfluss auf den co-translationalen cpSRP-Mechanismus auf die Geschwindigkeit der Komplex-Assemblierung haben, da nicht bzw. falsch integrierte plastidär kodierte Proteine langsamer bzw. überhaupt nicht in Komplexe assembliert werden.

2.3 *Hcf106*-Knock-Out führt zu pleiotropen Effekten

Das Membranprotein Hcf106p bildet zusammen mit CpTatC einen Rezeptorkomplex und ist damit am initialen Schritt des ΔpH/cpTat-Transportweges beteiligt, über den Proteine wie z.B. die Wasserspaltungsapparat-Bestandteile OE23 und OE16 oder der PSII-Assemblierungsfaktor Hcf136p ins Thylakoid-Lumen transportiert werden (Plücken et al., 2002; Schünemann, 2007).

Auf den schwerwiegenden Phänotyp der Δ*hcf106*-Mutante wurde bereits hingewiesen (siehe V.1.4). Auch für diese Mutante wurden Untersuchungen durchgeführt, wie sich der Phänotyp bei Verminderung der Lichtintensität beim Wachstum ändert. Dazu wurden Δ*hcf106*-Pflanzen sowohl bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} als auch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} Lichteinstrahlung angezogen. Dies führte wie bei *albino3* und Δ*cpftsy* zu einer sichtbar stärkeren Grünfärbung der Mutante, die auch durch Chl-Messungen belegt werden konnte. So steigerte sich der Chl-Gehalt von ca. 3 % auf 10 % verglichen mit dem WT (Abb. 33 und Tab. 4). Da jedoch auch hier Kotyledonen und die ersten Blätter bleich erschienen und auch bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} Licht z.T. grünliche Blätter der Rosette gefunden wurden, ist anzunehmen, dass sich der Einfluss der Lichtreduktion auf ein früheres Ergrünen der Blätter in der pflanzlichen Entwicklung beschränkt. Interessant ist an den Chl-Werten, dass Chl*b* im Vergleich zu Chl*a* stärker zunimmt, was dazu führt, dass das Chl*a*/Chl*b*-Verhältnis im Vergleich zu 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsenen Δ*hcf106*-Pflanzen ansteigt (Abb. 34 und Tab. 5). Das ist auch bei *albino3* und Δ*cpftsy* der Fall. Erstaunlicherweise werden also mehr LHCI-Moleküle in die Membran eingebaut, obwohl Pflanzen bei weniger Lichteinstrahlung eigentlich zur Adaptation mehr LHCII-Moleküle integrieren (Anderson et al., 1995; Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Das

stark reduzierte Chl-Verhältnis kann jedoch auch mit oxidativem Stress erklärt werden, was erklären würde, warum es bei weniger Lichtintensität steigt, anstatt wie beim WT zu sinken (Abb. 34 und Tab. 5).

Mehr als bei *albino3* oder Δ*cpftsy* hängt die stärkere Grünfärbung der Blätter mit der LHC-Integration zusammen. Denn im Gegensatz zu anderen Photosystem-Proteinen, die mittels Western Blot weder bei 50 noch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} detektiert werden konnten, nimmt das Vorkommen von LHCII und vermutlich auch anderer LHC-Proteine bei abgeschwächter Lichteinstrahlung zu (Abb. 44). Dies ist wie oben erwähnt auf ein retrogrades Signal zurückzuführen, da normale Lichteinstrahlung die Repression der *Lhcb*-Expression im Vergleich zu Schwachlicht verzehnfachen kann (Larkin und Ruckle, 2008). Dieser vermehrte LHCP-Einbau hat auch einen Einfluss auf die Ultrastruktur der Thylakoidmembran (Abb. 31). So sind in Δ*hcf106*-Chloroplasten bei weniger Lichteinstrahlung keine Hinweise auf eine Störung des Vesikeltransport-Systems im Chloroplasten zu erkennen, die bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} zu erkennen waren und bereits weiter oben diskutiert wurden. Dagegen sind wie bei späteren Blättern von 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} Chloroplasten einzelne normale, aber auch lang gestreckte Grana-Stapel und einzelne Stroma-Thylakoide zu erkennen. Dabei handelt es sich bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsenen Pflanzen um deutlich mehr interne Membranstrukturen als bei Pflanzen, die bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}angezogen wurden. Die Grana-Stapel erscheinen stark komprimiert, was darauf schließen lässt, dass sich darin nur LHC-Komplexe befinden, wohingegen PSII und andere Komplexe, die eine enge Zusammenlagerung der Membranen sterisch behindern würden, fehlen (Allen und Forsberg, 2001). Klar ist jedoch, dass die vermehrten Grana-Stapel und auch der erhöhte Chl-Gehalt direkt mit dem verstärkten LHCP-Einbau zusammenhängen (Hobe et al., 1994; Simidjiev et al., 2000; Allen und Forsberg, 2001).

Wie erwähnt, kann bereits aus der Membranstruktur geschlossen werden, dass verschiedene Komplexe fehlen könnten. Dies ist durch 2D-BN/SDS-Analysen bestätigt worden (Abb. 39). Bereits im BN-Gel war zu sehen, dass auch bei Wachstum bei 50 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} Licht nur LHCII-Trimere verstärkt auftreten, während andere Komplexe nicht detektierbar waren (Abb. 39A). Auch in der 2. Dimension konnte nur die ATP-Synthase zusätzlich zu LHCII-Komplexen beobachtet werden (Abb. 39B). Die Protein-Signale, die oberhalb von LHCII in Fraktion IV der 2D-Gele erscheinen, sind

nicht eindeutig zuzuordnen (Abb. 39B). Klar ist nur, dass es sich dabei nicht um CP43 oder CP47 handelt, da beide als freie Proteine beim WT an anderen Positionen im 2D-Gel auftreten (Abb. 35) und CP47 mittels Western Blot weder bei 50 noch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} nachgewiesen werden konnte (Abb. 44). Die Western Blot-Ergebnisse zeigen auch, warum keinerlei Photosynthesekomplexe in den 2D-Gelen zu erkennen waren und auch keinerlei Assemblierung plastidär kodierter Proteine bei den *in vivo*-Markierungen erkannt werden konnten (Abb. 51C). So konnten mittels Western Blot im Vergleich zum WT nur abgeschwächte Signale für die β-Untereinheit der ATP-Synthase und für Cytochrom *f* aus dem Cytochrom b_6f-Komplex detektiert werden, wobei die Reduktion im Vergleich zum WT bei abgeschwächter Lichtintensität geringer ist (Abb. 44B). Jedoch waren bis auf LHCII keinerlei Photosystem-Proteine detektierbar. Dies liegt zum Einen daran, dass z.B. CP47 und auch die PSI-Untereinheiten PSI-A und PSI-B scheinbar gar nicht erst synthetisiert werden (Abb. 51A), dass zum Anderen aber auch die synthetisierten Proteine eine geringe Stabilität aufweisen (Abb. 51B). Diese Beobachtung wird noch verstärkt durch zwei nicht bekannte Signale im SDS-Gel der *in vivo*-Markierung, bei denen es sich vermutlich um relativ stabile, noch Membran-gebundene, Degradationsprodukte handelt (Abb. 51A). Zusammenfassend kann man annehmen, dass die zwar synthetisierten Proteine nicht assemblieren und dadurch frei vorliegen. Somit würden diese über den CES-Prozess ihre eigene Synthese hemmen und anschließend aufgrund fehlender Assemblierung relativ schnell wieder abgebaut werden, wodurch sie im Western Blot nicht zu detektieren sind (Wostrikoff et al, 2004; Minai et al., 2006). Interessant ist auch das Fehlen von Alb3p im Western Blot (Abb. 44B), was erneut zeigt, dass LHCII-Proteine auch ohne Alb3p korrekt in die Thylakoidmembran integrieren können. Bleibt zu klären, warum keinerlei Photosynthese-Komplexe bei den 2D-Gelen der *in vivo*-Markierung und nur geringe Mengen der ATP-Synthase in den gefärbten BN/SDS-Gelen erkannt werden konnten. Dies ist mit dem Fehlen von Proteinen zu erklären, die über den cpTat-Transportweg transportiert werden, nämlich die Photosystem-Untereinheiten PSI-N und PSII-T, Teile des Wasserspaltungsapparates (OE17 und OE23) sowie die Untereinheit IV des Cytochrom b_6f-Komplexes und die Untereinheit AtpF der ATP-Synthase (Kapazoglou et al., 1994; Voekler und Barkan, 1996; Breyton et al., 1994, Mori et al., 1999). Zusätzlich scheint auch der PSII-Assemblierungsfaktor

Hcf136p über den cpTat-Weg transportiert zu werden, da dessen Aminosäuresequenz das typische „Twin-Arginin“-Motiv aufweist. Das Fehlen einzelner Komplex-bestandteile, weil sie z.B. nicht mehr transportiert werden, kann zu einer fehlerhaften Assemblierung und schnellen Zerfall der Komplexe führen oder aber dazu, dass der Komplex gar nicht erst assembliert wird. Dadurch könnte das Fehlen der Photosysteme in der Δ*hcf106*-Mutante erklärt werden. Ebenso fehlt für die PSII-Assemblierung sowohl Alb3p als auch Hcf136p, das sowohl in *Synechocystis* als auch in *A. thaliana* an der Assemblierung des PSII-Reaktionszentrums beteiligt ist (Meurer et al., 1998; Plücken et al., 2002; Komenda et al., 2008). Jedoch kann beim Vergleich von Western Blot-Analysen der *hcf136*- mit der Δ*hcf106*-Mutante festgestellt werden, dass bei *hcf136* im Schwachlicht alle PSII-Untereinheiten nachweisbar sind, während dies bei Δ*hcf106* nicht der Fall ist (Plücken et al., 2002). Der Verlust von PSII in der Δ*hcf106*-Mutante kann also nicht allein auf den fehlenden Assemblierungsfaktor Hcf136p zurückgeführt werden. Vielmehr handelt es sich um ein Zusammenspiel aller hier aufgeführten möglichen Erklärungen.

Interessant ist, dass die Untereinheit AtpF offenbar nicht entscheidend für die Assemblierung der ATP-Synthase zu sein scheint, da diese trotz der vermutlich nicht vorhandenen Untereinheit bei BN/SDS-Analysen erkannt werden konnte (Abb. 44B). Ebenso ist auffällig, dass Cytochrom *f* detektiert werden kann, also stabil in der Membran vorliegt, obwohl kein Cytochrom b_6f-Komplex nachgewiesen werden konnte (Abb. 44B). Dies könnte evtl. daran liegen, dass die Proteinsignale dieses Komplexes allgemein eher schwach sind und in der gezeigten 2D-Analyse unterhalb der Detektionsgrenze liegen.

Bei der Betrachtung der untersuchten Proteine, die am thylakoidalen Proteintransport beteiligt sind, ist zunächst auffällig, dass neben Hcf106p auch cpTatC nicht detektiert werden konnte (Abb. 44B). Dies lässt den Schluss zu, dass das Fehlen des Bestandteils Hcf106p des cpTat-Transportweges dazu führt, dass die Expression von *CpTatC* abgeschaltet wird. Es wäre zu überprüfen ob auch der dritte Bestandteil Tha4, der unabhängig vom Rezeptorkomplex aus cpTatC und Hcf106 in der Thylakoidmembran vorliegt, von einer solchen negativen Rückkopplung betroffen ist. Weiterhin wäre zu klären, warum Alb3p in der Δ*hcf106*-Mutante nicht vorhanden ist, da es nicht über den cpTat-Weg transportiert wird.

Ein weiterer Aspekt, der noch untersucht werden könnte, ist der in V.1.4 aufgekommene mögliche Zusammenhang zwischen der Δ*hcf106*-Mutation und einer Störung des Vesikeltransports im Chloroplasten, da bekannt ist, dass eine Störung des Vesikeltransports zu Störungen in der Thylakoidmembran-Biogenese führt (Westphal et al., 2001; Kroll et al., 2001; Asseva et al., 2007). Da über dieses Transportsystem auch Lipide von der inneren Hüllmembran zur Thylakoidmembran gelangen können und da die Lipid-Zusammensetzung der Thylakoidmembran einen Einfluss auf die Stabilität von Membran-Komplexen hat, könnte auch ein verminderter Lipid-Transfer ein Effekt der Δ*hcf106*-Mutation sein (Vothknecht und Westhoff, 2001; Guo et al., 2005; Benning, 2009; Hölzl et al., 2009). Dazu müsste jedoch in weiteren Experimenten der Lipidgehalt und die Zusammensetzung der Thylakoidmembran in der Mutante untersucht werden.

2.4 Ein Verlust der Carotinoid-Synthese ist auch unter Schwachlichtbedingungen nicht zu kompensieren

Die Δ*psy*-Mutante sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Alb3p und der Assemblierung von Carotinoiden in Photosynthesekomplexe zu überprüfen (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung). Bei der Phytoensynthase (PSY) handelt es sich, wie bereits erwähnt, um ein Enzym des Carotinoid-Stoffwechsels (Übersicht: Qin et al., 2007). Dabei katalysiert PSY die erste eigenständige Reaktion, bei dem aus zwei Geranyl-gernayl-pyrophosphaten ein Phytoen-Molekül gebildet wird. Der Knock-Out des *PSY*-Gens führte zu einem Verlust der Synthese von Carotinoiden und auch von Chlorophyllen, was bereits bei *pds*-Mutanten in *A. thaliana* beobachtet werden konnte (Qin et al., 2007). Hier war die Phytoendesaturase ausgeschaltet worden, die den Folgeschritt vom Phytoen zum Phytofluen (ζ-Carotin) katalysiert. Qin et al. (2007) spekulieren über eine negative Rückkopplung im Syntheseweg bzw. über ein plastidäres Signal, das dazu führt, dass sowohl Enzyme des Chlorophyll-Syntheseweges als auch des Gibberellin-Syntheseweges in der *pds3*-Mutante herunterreguliert wurden.

Ein ähnliches Szenario ist auch für die Δ*psy*-Mutante anzunehmen. Bei Δ*psy* war eine starke Reduktion des gesamten Membranproteingehaltes zu erkennen (Abb. 45A). Bei Western Blot-Analysen war zu erkennen, dass bis auf schwache Signale der β-Untereinheit der ATP-Synthase und sehr schwacher Signale der LHCII-Proteine keine

photosynthetischen Proteine zu detektieren waren (Abb. 45B). Auch Beobachtungen der weißen Sektoren der *IMMUTANS*-Mutante und von WT-Pflanzen, die mit Norflurazon, einem Inhibitor der Phytoendesaturase, behandelt wurden, zeigen starke Veränderungen in ihren Transkriptomen (Carol und Kuntz, 2001; Aluru et al., 2005 und 2009). Dabei sind vor allem Photosynthese-relevante Gene nach unten reguliert, was auch bei der Δ*psy*-Mutante durch Western Blot-Analysen gezeigt werden konnte. Die sehr schwachen Signale von LHCII-Proteinen, die auch bei 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} stärker erscheinen, sind wohl auf sehr wenige integrierte aber aufgrund fehlender Chl vermutlich nicht korrekt gefaltete LHCPs zurückzuführen, da Chl nicht nur für die Funktion sondern auch für die Struktur der LHC-Proteine entscheidend sind (Paulsen et al., 1993; Hoober und Eggink, 2001; Hoober et al., 2007). Die leichte Steigerung der LHCII-Signale bei weniger Licht ist wie bereits zuvor in Punkt V.2.3 beschrieben auf ein retrogrades Signal zurückzuführen.

Die bei den Western Blot-Analysen fehlenden Proteine sind einerseits dadurch zu erklären, dass sie nur sehr schwach synthetisiert werden, was z.B. für die PSI-Kernproteine PSI-A und PSI-B oder auch CP47 gilt (Abb. 52A). Zum anderen ist auch die Stabilität der Proteine stark beeinträchtigt (Abb. 52B) Bei Δ*hcf106* traten zwei zusätzliche Proteine bei den *in vivo*-Markierungen auf, bei denen es sich möglicherweise um relativ stabile Degradationsprodukte handelt (Abb. 52B, US1 und US2). Die Instabilität der Proteine ist vermutlich dadurch zu erklären, dass sie nicht in Komplexen assembliert werden (Abb. 52C). Abgesehen von schwachen Signalen der ATP-Synthase sind keine anderen Komplexe in den BN/SDS-Gelen zu erkennen (Abb. 40B).

Gut zu erkennen ist, dass bei den *in vivo*-Markierungen, den 2D-BN/SDS-Gelen und den Western Blot-Analysen, kaum Unterschiede zwischen Pflanzen, die bei 50 oder 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} gewachsen waren, nachweisbar waren. Diese Ergebnisse korrelieren damit, dass bei der Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop bei beiden Lichtintensitäten keine Veränderungen zu sehen sind (Abb. 32). Eine Reduktion des oxidativen Stresses führte also nicht zu einer Änderung des Phänotyps.

2.5 Möglicher Zusammenhang zwischen Alb3p und Carotinoid-Assemblierung

Ein Ziel der Arbeit war es, Ideen über weitere Funktionen von Alb3p zu bekommen. In *Synechocystis sp.* PCC 6803 wird eine mögliche Beteiligung des Alb3p-Homologen Slr1471p an der Assemblierung von Carotinoiden in Proteinkomplexe der Thylakoidmembran vermutet (Friedrich Ossenbühl, persönliche Mitteilung). Ebenfalls in *Synechocystis sp.* PCC 6803 wurde erst kürzlich eine Beteiligung von Carotinoiden an der Assemblierung des PSII-Reaktionszentrums festgestellt (Sozer et al., 2010). Die Assemblierung von PSI und Cytochrom b_6f-Komplex sind dabei nicht beeinflusst. Die Translation von Carotinoid-bindenden Proteinen wie CP43 und CP47 ist nach unten reguliert (Sozer et al., 2010). Carotinoide sind in PSI, PSII und im Cytochrom b_6f-Komplex integriert und dienen dabei dem photochemischen Schutz und stabilisieren die Struktur (Cogdell et al., 2000; Jordan et al., 2001; Stroebel et al., 2003; Guskov et al., 2009). Fehlende Carotinoide könnten eine Verringerung der Stabilität von Komplexen oder der Proteinen der Komplexe hervorrufen. Eben eine solche fehlende Stabilität von photosynthetischen Proteinen und deren Komplexen ist in der *albino3*-Mutante erkennbar (Abb. 49 und 50). Die Stabilität der Komplexe ist jedoch bei nur 12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} Licht gesteigert. Dies lässt darauf schließen, dass einzelne oder mehrere Carotinoide in den Komplexen fehlen, was dazu führt, dass bei mehr Lichteinstrahlung eine erhöhte Photooxidation stattfindet, weil die fehlenden Carotinoide die entstehenden ROS nicht mehr entfernen können. Das führt zu Schäden in den Komplexen und zu deren Abbau. Es kann also darüber spekuliert werden, ob Alb3p an der Assemblierung von Carotinoiden in Komplexe der Thylakoidmembran bzw. beteiligt ist. Die Stabilität der einzelnen Proteine hingegen ist unabhängig von der Lichtintensität (Abb. 49B). Dies kann damit zusammenhängen, dass den Proteinen Carotinoide als strukturelle Bestandteile fehlen. Da Alb3p an der co-translationalen Integration der PSII-Kernproteins D1 v.a. aber an dessen Assemblierung in das PSII beteiligt ist und da eine Interaktion mit weiteren plastidär kodierten Membranproteinen gezeigt werden konnte, kann angenommen werden, dass Alb3p evtl. bei Integration und Assemblierung der Membranproteine für die Assemblierung von Carotinoiden vonnöten ist (Ossenbühl et al., 2004; Pasch et al., 2005).

VI. Zusammenfassung

Der Phänotyp der *albino3*-Mutante von *A. thaliana* zeigt pleiortope Defekte, die nicht ausschließlich auf die Beteiligung von Alb3p an LHCII-Integration in die Thylakoidmembran bzw. an der D1-Assemblierung in das PSII erklärt werden können (Sundberg et al., 1997; Moore et al., 2000; Ossenbühl et al., 2004 und 2006).

Ziel dieser Dissertation war es verschiedene T-DNA-Insertionsmutanten von *A. thaliana*, die zum einen im thylakoidalen Proteintransport und zum anderen im Carotinoid-Stoffwechsel defekt sind, vergleichend mit der *albino3*-Mutante zu untersuchen und dadurch evtl. Hinweise auf zusätzliche Funktionen von Alb3p zu erhalten.

Folgende Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt:

- Die neu etablierte Δ*cpftsy*-Mutante zeigte einen gelblichen bis schwach grünen fertilen Phänotyp mit verlangsamtem Wachstum und einer Reduktion der Grana-Thylakoide. Dieser Phänotyp schwächte sich bei reduzierter Lichtintensität ab. Es konnte kein deutlicher Einfluss auf die Assemblierung von Membranproteinkomplexen bzw. die Stabilität der enthaltenen Proteine festgestellt werden.
- Die ebenfalls noch nicht charakterisierte Δ*hcf106*-Mutante zeigte einen bleichen Phänotyp, der in späteren Wachstumsphasen schwach grün erscheint, war steril und nur bei Wachstum mit externer Kohlenstoffquelle lebensfähig. Es konnten keine bzw. nur schwach ausgeprägte Membranstrukturen beobachtet werden. Bei weniger Belichtung ergrünten die Mutanten früher und auch die interne Membranstruktur veränderte sich. Bis auf ATP-Synthase und LHCII-Trimere waren keine Photosynthese-Komplexe zu erkennen und auch die Assemblierung von Komplexen, die plastidär kodierte Proteine enthalten, konnte nicht gezeigt werden. Auffällig ist das Fehlen von Alb3p in der Mutante.
- *albino3* zeigte unter Standardlichtbedingungen den bereits früher beschriebenen Phänotyp (Sundberg et al., 1997). Bei Wachstum unter Schwachlicht wurden auch diese Pflanzen deutlich grüner und auch hier war eine Veränderung der Thylakoidmembranstruktur im Vergleich zu Standardlicht zu erkennen. Es konnte gezeigt werden, dass in der Mutante alle Photosynthese-Komplexe assembliert werden, wobei dies bei Schwachlicht stärker ausgeprägt ist.

Hingegen ist die Stabilität plastidär kodierter Proteine, die in Thylakoidmembrankomplexen assembliert werden, deutlich abgeschwächt. Dieser Effekt ist Licht-unabhängig.

- Die bis jetzt nicht beschriebene Δ*psy*-Mutante zeigte Licht-unabhängig einen vollkommen weißen Phänotyp und keine vorhandene interne Membranstruktur in Chloroplasten. Es konnten weder Chlorophylle noch Carotinoide isoliert werden. Auch konnten bis auf die ATP-Synthase keinerlei Photosynthesekomplexe nachgewiesen werden, was daran liegt, dass die Assemblierung dieser Komplexe gestört ist.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Alb3p bei der Assemblierung von Proteinen in die Photosysteme auch an der Assemblierung von Carotinoiden beteiligt ist. Inwiefern Hcf106 mit Alb3p zusammenhängt ist jedoch nicht abschließend zu klären. Der Vergleich der Phänotypen lässt eine Funktion von Alb3p bei der Assemblierung von Carotinoiden vermuten, da nur die Δ*psy*-Mutante einen ähnlich schwer beeinträchtigten Phänotyp zeigt.

VII. Summary

The pleiotropic defects of the *albino3* mutant can neither be explained by the participation of Alb3p during integration of LHCII proteins into the thylakoid membrane nor by taking part in D1 assembly into PSII (Sundberg et al., 1997; Moore et al., 2000; Ossenbühl et al., 2004 und 2006).

Aim of this thesis was to compare different T-DNA insertion mutants with defects in thylakoid membrane protein transport and carotenoid synthesis to get hints about additional Alb3p functions.

The following results were obtained:

- Δ*cpftsy* showed a yellowish to pale green fertile slow growing phenotype and a reduction of grana stacks. This phenotype was less severe in plants grown under low light. No clear influence of the mutation on assembling of membrane complexes or the stability of the contraining proteins could be observed.
- The Δ*hcf106* mutant showed a bleached phenotype which changed to a more green phenotype in later growth stadiums. The mutant was sterile and not viable without external carbon source. No or only little thylakoid membrane structure was observed. Under lower light, plants turned green earlier and internal membrane structure changed. Except ATP synthase and LHCII trimer no other photosynthetic complexes could be found and also the assembly of plastid encoded proteins could not be observed. Noticably, Alb3p was also absent in the mutant.
- *Albino3* under standard light conditions showed the already known phenotype (Sundberg et al., 1997). Grown under low light plants appered greener and a change in thylakoid membrane struture compared to standard light conditions was observable. An assembly of all photosynthetic complexes could be shown, which was more pronunced under low light. In contrast stability of plastid encoded proteins was clearly reduced. This effect was not dependent on light conditions.
- A light-independent white phenotype without any internal membrane structure in chloroplasts was developed by the Δ*psy* mutant. Neither chlorophylls nor

carotenoides could be detected. Exept ATP synthase no photosynthetic complexes could be found, due to disturbed assembly of these complexes.

In total the results point to a function for Alb3p in carotenoid assembly into photosynthetic complexes while proteins are assmbled into complexes. How Hcf106p and Alb3p are linked is not clear. Comparison of phenotypes allows the speculation that Alb3p takes part in carotenoid assembly because only Δ*psy* shows a phenotpye which is equally heavy affected in comparison to *albino3*.

VII. Literatur

Albrecht, V., Igenfeld, A., Apel, K. (2006).
Characterization of the *snowy cotyledon 1* mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality.
Plant Mol. Biol. **60**: 507-518.

Albrecht, V., Igenfeld, A., Apel, K. (2008).
Snowy cotyledon 2: the identification of a zinc finger domain protein essential for chloroplast development in cotyledons but not in true leaves.
Plant Mol. Biol. **66**: 599-608.

Aldridge, C., Cain, P., Robinson, C. (2009).
Protein transport in organelles: protein transport into and across the thylakoid membrane.
FEBS J. **276**: 1177-1186.

Allen, J.F. (2003).
The function of genomics in bioenergetics organelles.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **358:** 19-38.

Allen, J.F., Forsberg, J. (2001).
Molecular recognition in thylakoid structure and function.
Trends Plant Sci. **6**: 317-326.

Aluru, M.R., Yu, F., Fu, A., Rodermel, S. (2005).
Arabidpsis variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis.
J. Exp. Bot. **57**: 1871-1881.

Aluru, M.R., Zola, J., Foudree, A., Rodermel, S.R. (2009).
Chloroplast photooxidation-induced transcriptome reprogramming in *Arabidopsis immutans* white leaf sectors.
Plant Physiol. **150**: 904-923.

Amin, P., Sy, D.A.C., Pilgrim, M.L., Parry, D.H., Nussaume, L., Hoffman, N.E. (1999).
Arabidopsis mutants lacking the 43- and 54-kilodalton subunits of the chloroplast signal recognition particle have distinct phenotypes.
Plant Physiol. **121**: 61-70.

Anderson, J.M., Chow, W.S., Park, Y.I. (1995).
The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apperatus to environmental cues.
Photosynth. Res. **46**: 129-139.

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

Asakura, Y., Hirohashi, T., Kikuchi, S., Blecher, S., Osborne, E., Yano, S., Terashima, I., Barkan, A., Nakai, M. (2004).
Maize mutants lacking chloroplast FtsY exhibit pleiotropic defects in the biogenesis of thylakoid membranes.
Plant Cell. **16**: 201-214.

Asakura, Y., Kikuchi, S., Nakai, M. (2008).
Non-identical contributions of two membrane-bound cpSRP components, cpFtsY and Alb3, to thylakoid biogenesis.
Plant J. **56**: 1007-1017.

Aseeva, E., Ossenbühl, F., Sippel, C., Cho., W.K., Stein, B., Eichacker, L.A., Meurer, J., Wanner, G., Westhoff, P., Soll, J., Vothknecht, U.C. (2007).
Vipp1 is required for basic thylakoid membrane formation but not for the assembly of thylakoid protein complexes.
Plant Physiol. Biochem. **45**: 119-128.

Austin II., J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F., Staehelin, L.A. (2006).
Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes.
Plant Cell. **18**: 1693-1703.

Barkan, A., Miles, D., Taylor, W.C. (1986).
Choroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize.
EMBO J. **5**: 1421-1427.

Barneche, F., Winter, V., Crèvecœur, M., Rochaix, J.D. (2006).
ATAB2 is a novel factor in the signalling pathway of light-controlled synthesis of photosystem proteins.
EMBO J. **25**: 5907-5918.

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.

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.

Benning, C. (2009).
Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **25**: 71-91.

Benz, M., Bals, T., Gügel, I.L., Piotrowski, M., Kuhn, A., Schünemann, D., Soll, J., Ankele, E. (2009).
Alb4 of *Arabidopsis* promotes assembly and stabilization of non chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF_1CF_O-ATP synthase.
Mol. Plant. **2**: 1410-1424.

Bédard, J., Jarvis, P. (2005).
Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins.
J. Exp. Bot. **56**: 2287-2320.

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.

Bhattacharya, D., Archibald, J.M., Weber, A.P.M., Reyes-Prieto, A. (2007).
How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution.
Bioessays. **29**: 1239-1246.

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

Bisanz, C., Bégot, L., Carol, P., Perez, P., Bligny, M., Pesey, H., Gallois, J.L., Lerbs-Mache, S., Mache, R. (2003)
The *Arabidopsis* nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation.
Plant Mol. Biol. **51**: 651-663.

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

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**: 11978-11982.

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

Braun, N.A., Davis, A.W., Theg, S.M. (2007).
The chloroplast Tat pathway utilizes the transmembrane electric potential as an energy source.
Biophys. J. **93**: 1993-1998.

Breyton, C., de Vitry, C., Popot, J.L. (1994).
Membrane association of cytochrome b_6f subunits: the Rieske iron-sulfur protein from *C. reinhardtii* is an extrinsic protein.
J. Biol. Chem. **269**: 7597-7602.

Bukau, B., Weissman, J., Horwich, A. (2006).
Molecular chaperones and protein quality control.
Cell. **125**: 443-451.

Cai, W., Ma, J., Chi, W., Zou M., Guo, J., Lu, C., Zhang, L. (2010).
Cooperation of LPA3 and LPA2 is essential for photosystem II assembly in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. **154**: 109-120.

Carol, P., Kuntz, M. (2001).
A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration.
Trends Plant Sci. **6**: 31-36

Chaddock, A.M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., Robinson, C. (1995).
A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase.
EMBO J. **14**: 2715-2722.

Choquet, Y., **Stern, D.B.**, **Wostrikoff, K.**, **Kuras, R.**, **Girard-Bascou, J.**, **Wollman, F.A. (1998).**
Translation of cytochrome *f* is autoregulated through the 5' untranslated region of *petA* mRNA in *Chlamydomonas* chloroplasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95:** 4380-4385.

Choquet, Y., Zito, F., Wostrikoff, K., Wollman, F.A. (2003).
Cytochrome *f* translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain.
Plant Cell. **15**: 1443-1454.

Cline, K., Dabney-Smith, C. (2008).
Plastid protein import and sorting: different paths to the same compartments.
Curr. Opin. Plant Biol. **11**: 585-592.

Cline, K., McCaffery, M. (2007).
Evidence for a dynamic and transient pathway through the TAT protein transport machinery.
EMBO J. **26**: 3039-3049.

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

Clough, S.J., Bent, A.F. (1998)
Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana.
Plant J. **16**: 735-743.

Cogdell, R.J., Howard, T.D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., Lubitz, W. (2000)
How carotenoids protect bacterial photosynthesis.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **355**: 1345-1349.

Curtis, M.D., Grossniklaus, U. (2003).
A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta.
Plant Physiol. **133**: 462-469.

Dabney-Smith, C., Mori, H., Cline, K. (2006).
Oligomers of Tha4 organize at the thylakoid Tat translocase during protein transport.
J. Biol. Chem. **281**: 5476-5483.

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

Das, L., Martienssen, R. (1995).
Site-selected transposon mutagenesis at the *hcf106* locus in maize.
Plant Cell. **7**: 287-294.

Davis, S.J., Vierstra, R.D. (1998).
Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants.
Plant Mol. Biol. **36**: 521-528.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, F., Van Montagu, M., Leemans, J. (1985).
Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated transfer to plants.
Nucleic Acids Res. **13**: 4777-4788.

DeLille, J., Peterson, E.C., Johnson, T., Moore, M., Kight, A., Henry, R. (2000).
A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 1926-1931.

Dong, Y., Palmer, S.R., Hasona, A., Nagamori, S., Kaback, H.R., Dalbey, R.E., Brady, L.J. (2008).
Functional overlap but lack of complete cross-complementation of *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli* YidC orthologs.
J. Bacteriol. **190**: 2458-2469.

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.

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

Durrett, T.P., Connolly, E.L., Rogers, E.E. (2006).
Arabidopsis cpFtsY mutants exhibit pleiotropic defects including an inability to increase iron deficiency-inducible root Fe(III) chelate reductase activity.
Plant J. **47**: 467-479.

Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991).
A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis.
Nucleic Acids Res. **19**: 1349.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983).
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. **132:** 6-13.

Fincher, V., Dabney-Smith, C., Cline, K. (2003).
Functional assembly of thylakoid deltapH-dependent/Tat protein transport pathway components *in vitro*.
Eur. J. Biochem. **270**: 4930-4941.

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**: 22175-22180.

Fulgosi, H., Gerdes, L., Westphal, S., Glockmann, C., Soll, J. (2002).
Cell and chloroplast division requires ARTEMIS.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**: 11501-11506

Funes, S., Gerdes, L., Inaba, M., Soll, J., Herrmann, J.M. (2004).
The *Arabidopsis thaliana* chloroplast inner envelope protein ARTEMIS is a functional member of the Alb3/Oxa1/YidC family of proteins.
FEBS Lett. **569**: 89-93.

Funes, S., Hasona, A., Bauerschmitt, H., Grubbauer, C., Kauff, F., Collins, R., Crowley, P.J., Palmer, S.R., Brady, L.J., Herrmann, J.M. (2009).
Independent gene duplications of YidC/Oxa/Alb3 family enabled a specialized cotranslational function.
Proc. Natl. Acad. Sci. **106**: 6656-6661.

Funes, S., Nargang, F.E., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2004).
The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family.
Mol. Biol. Cell. **15**: 1853-1861.

Gao, H., Sage, T.L., Osteryoung, K.W. (2006).
FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **103**: 6759-6764.

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**: 1090-1094.

Gérard, F., Cline, K. (2006).
Efficient twin arginin translocation (Tat) pathway transport of a precursor protein covalently anchored to its initial cpTatC binding site.
J. Biol. Chem. **281**: 6130-6135.

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.

Goldschmidt-Clermont, M. (1998).
Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells.
Int. Rev. Cytol. **177:** 115-180.

Granvogl, B., Reisinger, V., Eichacker, L.A. (2006).
Mapping the proteome of thylakoid membranes by *de novo* sequencing of intermembrane peptide domains.
Proteomics **6**: 3681-3695.

Gray, M.W., Lang, B.F. (1998).
Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases.
Trends Microbiol. **6:** 1-3.

Guo, J., Zhang, Z., Bi, Y., Yang, W., Xu, Y., Zhang, L. (2005).
Decreased stability pf photosystem I in *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*.
FEBS Lett. **579**: 3619-3624.

Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. Saenger, W. (2009).
Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride.
Nat. Struct.Mol. Biol. **16**: 334-342.

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

Hasona, A., Crowley, P.J., Levesque, C.M., Mair, R.W., Cvitkovitch, D.G., Bleiweis, A.S., Brady, L.J. (2005).
Streptococcal viability and diminished stress tolerance in mutants lacking the signal recognition particle pathway or YidC2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **102**: 17466-17471.

Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R.A. (1997).
Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space.
FEBS Lett. **418**: 367-370.

Hell, K., Herrmann, J.M., 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, J.M., Neupert, W., Stuart, R.A. (1997).
Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p.
EMBO J. **16**: 2217-2226.

Hobe, S., Pryrulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. (1994).
Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a*/*b* complex.
EMBO J. **13**: 3423-3429.

Hölzl, G., Witt, S., Gaude, N., Melzer, M., Schöttler, M.A., Dörmann, P. (2009).
The role of diglycosyl lipids in photosynthesis and membrane lipid homeostasis in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. **150**: 1147-1159.

Honold, A. (2008).
Analyse von Mutanten der plastidären Transportwege in *Arabidopsis thaliana*.
Diplomarbeit, Universität Ulm.

Hoober, J.K., Eggink, L.L. (2001).
A potential role of chlorophylls *b* and *c* in assembly of light-harvesting complexes.
FEBS Lett. **489**: 1-3.

Hoober, J.K., Eggink, L.L., Chen, M. (2007).
Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts.
Photosynth. Res. **94**: 387-400.

Hulford, A., Hazell, L., Mould, R.M., Robinson, C. (1994).
Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates.
J. Biol. Chem. **269**: 3251-3256.

Hutin, C., Hayaux, M., Carde, J.P., Kloppstech, K., Meiherhoff, K., Hoffman, N., Nussaume, L. (2002).
Double mutation cpSRP43$^-$/cpSRP54$^-$ is necessary to abolish the cpSRP pathway required or thylakoid targeting of the light-harvesting chlorophyll proteins.
Plant J. **29**: 531-543.

Hynds, P.J., Robinson, D., Robinson, C. (1998).
The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malfolded proteins across the thylakoid membrane.
J. Biol. Chem. **273**: 34868-34874.

Inaba, T. (2010).
Bilateral communication between plastid and the nucleus: plastid protein imoprt and plastid-to-nucleus retrograde signaling.
Bioci. Biotechnol. Biochem. **74**: 471-476.

Inwood, W., Yoshihara, C., Zalpuri, R., Kim, K.S., Kustu, S. (2008).
The ultrastructure of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking phytoene synthase resembles that of colorless alga.
Mol. Plant. **1**: 925-937.

Jaru-Ampornpan, P., Chandrasekar, S., Shan, S.O. (2007).
Efficient interaction between two GTPases allows the chloroplast SRP pathway to bypass the requirement for an SRP RNA.
Mol. Biol. Cell. **18**: 2636-2645.

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**: 6438-6447.

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**: 19281-19288.

Jonas-Straube, E., Hutin, C., Hoffman, N.E., Schünemann, D. (2001).
Functional analysis of the protein-interacting domains of chloroplast SRP43.
J. Biol. Chem. **276**: 24654-24660.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. (2001).
Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution.
Nature. **411**: 909-917.

Kakizaki, T., Matsumura, H., Nakayama, K., Che, F.S., Terauchi, R., Inaba, T. (2009).
Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling.
Plant Physiol. **151**: 1339-1353.

Kapazoglou, A., Sagliocco, F., Dure, L. 3rd (1995).
PSII-T, a new nuclear encoded lumenal protein from photosystem II. Targeting and processing in isolated chloroplasts.
J. Biol. Chem. **270**: 12197-12202.

Kessler, F., Schnell, D.J. (2006).
The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids.
Traffic. **7**: 248-257.

Kiefer, D., Kuhn, A. (2007).
YidC as an essential and multifunctional component in membrane protein assembly.
Int. Rev. Cytol. **259**: 113-138.

Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., Baginsky, S. (2004).
The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions.
Curr. Biol. **14**: 354-362.

Klimyuk, V.I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schünemann, D., Meiherhoff, K., Gouet, P., Jonas, J.D.G., Hoffman, N.E., Nussaume, L. (1999).
A chromodomain protein encoded by *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**: 44639-44644.

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**: 5715-5718.

Kohler, R., Boehringer, D., Greber, B., Bingel-Erlenmeyer, R., Collinson, I., Schaffitzel, C., Ban, N. (2009).
YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome.
Mol. Cell. **34**: 344-353.

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.

Komenda, J., Nickelsen, J., Tichý, M., Prášil, O., Eichacker, L.A., Nixon, P.J. (2008).
The cyanobacterial homologue of HCF136/YCF48 is a component of an early photosystem II assembly complex and is important for both the efficient assembly and repair of photosystem II in *Synechocystis sp.* PCC 6803.
J. Biol. Chem. **283**: 22390-22399.

Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., Soll, J., Westhoff, P. (2001).
VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**: 4238-4242.

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

Kurland, C.G. (1992).
Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code.
Bioessays. **14:** 709-714.

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

Larkin, R.M., Ruckle, M.E. (2008).
Integration of light and plastid signals.
Curr. Opin. Plant Biol. **11**: 593-599.

Latijnhouwers, M., Xu, X.M., Møller, S.G. (2010).
Arabidopsis stromal 70-kDa heat shock proteins are essential for chloroplast development.
Planta. **232**: 567-578.

Laugier, E., Tarrago, L.,Viera Dos Santos, C., Eymery, F., Havaux, M., Rey, P. (2010).
Arabidopsis thaliana plastidial methionine sulfoxide reductases B, MSRBs, account for most leaf peptide MSR activity and are essential for growth under environmental constraints through a role in the preservation of photosystem antennae.
Plant J. **61**: 271-282.

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 poasttranslational integration of a protein into thylakoid membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 3789-3793.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. (2001).
Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy.
Current Protocols in Food Analytical Chemistry. F4.3.1 – F4.3.8.

Lindgren, L.O., Stålberg, K.G., Höglund, A.S. (2003).
Seed-specific overexpression of an endogenous *Arabidopsis* phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll and abscisic acid.
Plant Physiol. **132**: 779-785.

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.

López-Juez, E., Pyke, K.A. (2005).
Plastids unleashed: their development and their integration in plant development.
Int. J. Dev. Biol. **49:** 557-577.

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

Lynch, M. (1996).
Mutation accumulation in transfer RNAs: molecular evidence for Muller's ratchet in mitochondrial genomes.
Mol. Biol. Evol. **13:** 209-220.

Ma, J., Pengm 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.

Ma, X., Cline, K. (2010).
Multiple precursor proteins bind individual Tat receptor complexes and are collectively transported.
EMBO J. **29**: 1477-1488.

Maass, D., Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., Welsch, R. (2009).
Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels.
PloS One **4**: e6373.

Mant, A., Woolhead, C.A., Moore, M., Henry, R., Robinson, C. (2001).
Insertion of PsaK into the thylakoid membrane in a `Horseshoe´conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nuleoside triphosphates, or functional albino3.
J. Biol. Chem. **276**: 36200-36206.

Marques, J.P., Schattat, M.H., Hause, G., Dudeck, I., Klösgen, R.B. (2004).
In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*.
J. Exp. Bot. **55**: 1697-1706.

Martin, W., Hermann, 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., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D. (2002).
Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacerial genes in the nucleus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**: 12246-12251.

Martienssen, R.A., Barkan, A., Freeling, M., Taylor, W.C. (1989).
Molecular cloning of a maize gene involved in photosynthetic membrane organization that is regulated by Robertson's *Mutator*.
EMBO J. **8**: 1633-1639.

McCarthy, S.S., Kobayashi, M.C., Niyogi, K.K. (2004).
White mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* are defective in phytoene synthase.
Genetics **168**: 1249-1257.

Meurer, J., Meierhoff, K., Westhoff, P. (1996).
Isolation of high-chlorophyll-fluorescence mutants of Arabidopsis thaliana and their characterisation by spectroscopy, immunoblotting and northern hybridisation.
Planta. **198**: 385-396.

Meurer, J., Plücken, H., Kowallik, K.V, Westhoff, P. (1998).
A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*.
EMBO J. **17**: 5286-5297.

Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J.B., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. (1994).
Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CF_oII is imported by a novel, third pathway.
EMBO J. **13**: 1310-1317.

Minai, L., **Wostrikoff, K.**, **Wollman, F.A.**, **Choquet, Y. (2006).**
Chloroplast biogenesis of photosystem II cores involves a series of assembly-controlled steps that regulate translation.
Plant Cell. **18:** 159-175.

Mitra, K., Frank, J., Driessen, A. (2006).
Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work?
Nat. Struct. Mol. Biol. **13**: 957–964.

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 wih the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required.
J. Cell. Biol. **162**: 1245-1254.

Mori, H., Cline, K. (2002).
A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase.
J. Cell Biol. **157**: 205-210.

Mori, H., Summer, E.J., Ma, X., Cline, K. (1999).
Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH–dependent protein transport pathways.
J. Cell Biol. **12**: 45-56.

Müller, M., Martin, W. (1999).
The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on the origin of mitochondria and hydrogenosomes.
Bioessays. **21**: 377-381.

Muller, H.J. (1932).
Some genetic aspects of sex.
Am. Nat. **66**: 118-138.

Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987).
Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction.
Methods Enzymol. **155:** 335-350.

Nanjo, Y., Oka, H., Ikarashi, N., Kaneko, K., Kitajima, A., Mitsui, T., Munoz, F.J.,Rodríguez-López, M., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J. (2006).
Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-Golgi to the chloroplast through the secretory pathway.
Plant Cell. **18**: 2582-2592.

Nargang, F.E., Preuss, M., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2002).
The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*.
J. Biol. Chem. **277**: 12846-12853.

Nilsson, R., van Wijk, K.J. (2002).
Transient interaction of cpSRP54 with elongating nascent chains of the chloroplast-encoded D1 protein: `cpSRP54 caught in the act´.
FEBS Lett. **524**: 127-133.

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

Norris, S.R., Barrette, T.R., DellaPenna, D. (1995).
Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation.
Plant Cell. **7**: 2139-2149.

Norris, S.R., Shen, X., DellaPenna, D. (1998).
Complementation of the *Arabidopsis pds1* mutation with the gene encoding *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase.
Plant Physiol. **117**: 1317-1323.

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., Göhre, V., Meurer, J., Krieger-Liszkay, A., Rochaix, J.D., Eichacker, L.A. (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.

Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N. (1993).
Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a*/*b*-binding protein.
Eur. J. Biochem. **215**: 809-816.

Peng, L., Ma, J., Chi, W., Guo, J., Zhu, S., Lu, Q., Lu, C., Zhang, L. (2006).
LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Cell. **18**: 955-969.

Piekenhayn, S. (2008).
Analysen zu Funktionen von zwei Vertretern der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie.
Dissertation, Universität Ulm.

Pilgrim, M.L., van Wijk, K.J., Parry, D.H., Sy, D.A.C., Hoffman, N.E. (1998).
Expression of a dominant negative form of cpSRP54 inhbits chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*.
Plant J. **13**: 177-186.

Plücken, H., Müller, B., Grohmann, D., Westhoff, P., Eichacker, L.A. (2002).
The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*.
FEBS Lett. **532**: 85-90.

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

Popot, J.L., de Vitry, C., Atteia, A. (1994).
Folding and assembly of integral membrane proteins: An introduction.
In "Membrane protein structure: Experimental apporaches" (S.H. White, ed.), pp 41-96, Oxford Univ. Press, Oxford.

Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X.W., Chen, Z., Qu, L.J. (2007)
Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid and gibberellin biosynthesis.
Cell Res. **17**: 471-482.

Race, H.L., Herrmann, R.G., Martin, W. (1999).
Why have organelles retained genomes?.
Trends Genet. **15:** 364-370.

Radhamony, R.N., Theg, S.M. (2006).
Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway.
Trends Cell Biol. **16**: 385-387.

Robson, A., Collinson, I. (2006).
The structure of the Sec complex and the problem of protein translocation.
EMBO Rep. **7**: 1099–1103.

Röhl, 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.

Roy. L.M., Barkan, A. (1998).
A SecY homolog is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression.
J. Cell Biol. **141**: 385-395.

Runge, S., van Cleve, B., Lebedev, N., Armstrong, G., Apel, K. (1995).
Isolation and classification of chlorophyll-deficient *xantha* mutants of *Arabidopsis thaliana*.
Planta. **197**: 490-500.

Rutschow, H., Ytterberg, A.J., Friso, G., Nilsson, R., van Wijk, K.J. (2008).
Quantitative proteomics of chloroplast *SRP54* sorting mutant and its genetic interactions with *CLPC1* in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. **148**: 156-175.

Sääf, A., Monné, M., de Gier, J.W., von Heijne, G. (1998).
Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from Escherichia coli.
J. Biol. Chem. **273**: 30415-30418.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988).
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science. **239**: 487-494.

Salinovich, O., Montelaro, R.C. (1986).
Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-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.

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**: 637-641.

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. Cell. **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.

Schleiff, E., Klösgen, R.B. (2001).
Without a little help from `my´ friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes?
Biochim. Biophys. Acta. **1541**: 22-33.

Schubert, M., Petersson, U.A., Haas, B.J., Funk, C., Schröder, W.P., Kieselbach, T. (2002).
Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*.
J. Biol. Chem. **277**: 8354-8365.

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

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

Schünemann, D., Amin, P., Hartmann, E., Hoffman, N.E. (1999).
Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex.
J. Biol. Chem. **274**: 12177-12182.

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.

Scolnik, P.A., Bartley, G.E. (1994).
Nucleotide sequence of *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase.
Plant Physiol. **104**: 1471-1472.

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.

Simidjiev, I., Stoylova, S., Amentisch, H., Jávorfi, T., Mustárdy, L., Laggner, P., Holzenburg, A., Garab, G. (2000).
Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins *in vitro*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **97**: 1473-1476.

Soll, J., Schleiff, E. (2004).
Protein import into chloroplasts.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **5**: 198-208.

Southern, E.M. (1975).
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. **98:** 503-517.

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.

Sozer, O., Komenda, J., Ughy, B., Domonkos, I., Laczkó-Dobos, H., Malec, P., Gombos, Z., Kis, M. (2010).
Involvement of carotenoids in the synthesis and assembly of protein subunits of photosynthetic reaction centers of *Synechocystis sp.* PCC 6803.
Plant Cell Physiol. **51**: 823-835.

Spence, E., Bailey, S., Nenninger, A., Møller, 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.

Steiner, J.M., Köcher, T., Nagy, C., Löffelhardt, W. (2002).
Chloroplast SecE: evidence for spontaneous insertion into the thylakoid membrane.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **293**: 747-752.

Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L., Picot, D. (2003)
An atypical haem in the cytochrome b_6f complex .
Nature. **426**: 413-418.

Stuart, R. (2002).
Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex.
Biochim. Biophys. Acta. **1592**: 79-87.

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

Sulli, C., Schwartzbach, S.D. (1995).
The polyprotein precursor of the *Euglena* light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polyprotein processing.
J. Biol. Chem. **270**: 13084-13090.

Sun, C., Rusch, S.L., Kim, J., Kendall, D.A. (2007).
Chloroplast SecA and *Escherichia coli* SecA have distinct lipid and signal peptide preferences.
J. Bacteriol. **189**: 1171-1175.

Sun, X., Ouyang, M., Guo, J., Ma, J., Lu, C., Adam, Z., Zhang, L. (2010).
The thylakoid protease Deg1 is involved in photosystem-II assembly in *Arabidopsis thaliana*.
Plant J. **62**: 240-249.

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**: 6448-6457.

Thompson, S.J., Robinson, C., Mant, A. (1999).
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., Peterson, E.C., Henry, R., Hoffman, N.E. (2000).
The L18 domain of light-harvesting chlorophyll proteins binds to chloroplast signal recognition particle 43.
J. Biol. Chem. **275**: 13187-13190.

Tzvetkova-Chevolleau, T., Hutin, C., Noël, L.D., Goforth, R., Carde, J.P., Caffarri, S., Sinning, I., Groves, M., Teulon, T.M., Hoffman, N.E., Henry, R., Havaux, M., Nussaume, L. (2007).
Canonical signal recognition particle components can be bypassed for posttranslational protein targeting in chloroplasts.
Plant Cell. **19**: 1635-1648.

van Bloois, E., Nagamori, S., Koningstein, G., Ullers, R.S., Preuss, M., Oudega, B., Harms, N., Kaback, H.R., Herrmann, J.M., Luirink, J. (2005).
The Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC is evolutionary-conserved and essential.
J. Biol. Chem. **280**: 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 Rep. **2**: 519-523.

Vidi, P.A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin II., J.R., Csucs, G., Dörmann, P., Kessler, F., Bréhélin, C. (2006).
Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles.
J. Biol. Chem. **281**: 11225-11234.

Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L., Samuelsson, G. (2005).
Evidence for a protein transported through the secretory pathway *en route* to the higher plant chloroplast.
Nat. Cell Biol. **7**: 1224-1231.

Voelker, R., Barkan, A. (1995).
Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for trageting proteins to the chloroplast thylakoid.
EMBO J. **14**: 3905-3914.

von Wettstein, D. (2001).
Discovery of a protein required for photosynthetic membrane assembly.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**: 3633-3635.

Vothknecht, U.C., Westhoff, P. (2001).
Biogenesis and origin of thylakoid membranes.
Biochim. Biophys. Acta. **1541**: 91-101.

Waller, R.F., Reed, M.B., Cowman, A.F., McFadden, G.I. (2000).
Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway.
EMBO J. **19**: 1794-1802.

Wang, T., Iyer, L.M., Pancholy, R., Shi, X., Hall, T.C. (2005).
Assessment of penetrance and expressivity of RNAi-mediated silencing of the *Arabidopsis* phytoene desaturase gene.
New Phytol. **167**: 751-760.

Waters, M.T, Langdale, J.A. (2009).
The making of a chloroplast.
EMBO J. **28**: 2861-2873.

Westphal, S., Soll, J., Vothknecht. U.C. (2001).
A vesicle transport system inside chloroplasts.
FEBS Lett. **506**: 257-261.

Woolhead, C.A., Thompson, S.J., Moore, M., Tisser, C., Mant, A., Rodger, A., Henry, R., Robinson, C. (2001).
Distinct Albino3-dependent and independent pathways for thylakoid membrane protein insertion.
J. Biol. Chem. **276**: 40841-40846.

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

Wu, H., Ji, Y., Du, J., Kong, D., Liang, H., Ling, H.Q. (2010).
ClpC1, an ATP-dependent Clp protease in plastids, is involved in iron homeostasis in *Arabidopsis* leaves.
Ann. Bot. **105**: 823-833.

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.
Mol. Membr. Biol. **22**: 101-111.

Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M., Cline, K. (1994).
SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbion derived sorting.
Science. **266**: 796-798.

Youssef, A., Laizet, Y., Block, M.A., Maréchal, E., Alcaraz, J.P., Larson, T.R., Pontier, D., Gaffé, J., Kuntz, M. (2010).
Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress.
Plant J. **61**: 436-445.

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.

Zhang, R., Wise, R.R., Struck, K.R, Sharkey, T.D. (2010).
Moderate heat stress of *Arabidopsis thaliana* leaves causes chloroplast swelling and plastoglobule formation.
Photosynth. Res. **105**: 123-134.

Zhang, Y.J., Tian, H.F., Wen, J.F. (2009).
The evolution of YidC/Oxa/Alb3 familiy in the three domains of life: a phylogenomic analysis.
BMC Evol. Biol. **9:** 137-148.

Zhang, L.X., 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.

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

IX. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Endosymbiontentheorie und Evolution der Zelle
Abb. 2: Proteinimport in den Chloroplasten
Abb. 3: Proteinimport via TOC- und TIC-Komplex
Abb. 4: Übersicht über die Proteintransportwege durch bzw. in die Thylakoidmembran
Abb. 5: Translokation von Proteinen mittels cpTat-Transportweg
Abb. 6: cpSRP-abhängige Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran in einem co- bzw. post-translationalen Weg
Abb. 7: Hydropathie-Diagramme ausgewählter Beispiele der Alb3/Oxa1/YidC-Proteinfamilie
Abb. 8: Charakterisierung der T-DNA-Insertion Sail_816_E11.
Abb. 9: Makroskopischer Phänotyp der Δ*cpftsy*-Mutante.
Abb. 10: TEM-Aufnahmen von Δ*cpftsy*-Chloroplasten im Vergleich zum WT.
Abb. 11: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von Δ*cpftsy*.
Abb. 12: Southern Blot-Experiment und Komplementation von Δ*cpftsy*.
Abb. 13: Makroskopischer Phänotyp von *albino3* und Western Blot-Nachweis von Alb3p.
Abb. 14: TEM-Aufnahmen der *albino3*-Mutante im Vergleich zum WT.
Abb. 15: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von *albino3*.
Abb. 16: Makroskopischer Phänotyp und TEM-Aufnahmen der *ffc*$^-$-Mutante.
Abb. 17: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von *ffc*$^-$.
Abb. 18: Charakterisierung der T-DNA-Insertion Salk_020680.
Abb. 19: Makroskopischer Phänotyp der Δ*hcf106*-Mutante.
Abb. 20: TEM-Aufnahmen der Δ*hcf106*-Mutante im Vergleich zum WT.
Abb. 21: Ergebnisse der Chl- und Car-Bestimmung von Δ*hcf106*.
Abb. 22: Southern Blot-Analyse und Komplementation der Δ*hcf106*-Mutante.
Abb. 23: Charakterisierung der T-DNA-Insertion Salk_054288 und makroskopischer Phänotyp.
Abb. 24: TEM-Aufnahmen von Δ*psy*-Chloroplasten im Vergleich zum WT.
Abb. 25: Komplementationsversuche der Δ*psy*-Mutante.
Abb. 26: Phänotyp-Unterschied bei *albino3* abhängig von der Lichtintensität.
Abb. 27: TEM-Aufnahmen von *albino3*-Chloroplasten abhängig von der Lichtintensität.
Abb. 28: Phänotyp-Unterschied der Δ*cpftsy*-Mutante abhängig von der Lichtintensität.
Abb. 29: TEM-Aufnahmen von Δ*cpftsy*-Chloroplasten abhängig von der Lichtintensität.
Abb. 30: Phänotyp-Unterschied der Δ*hcf106*-Mutante abhängig von der Lichtintensität.
Abb. 31: TEM-Aufnahmen von Δ*hcf106*-Chloroplasten abhängig von der Lichtintensität.

Abb. 32: Membranstruktur bei Δ*psy* in Abhängigkeit zur Lichtintensität.
Abb. 33 : Ergebnisse Chl- und Car-Bestimmungen in Abhängigkeit von der Lichtintensität.
Abb. 34: Bestimmung der Verhältnisse der Chl*a* zu Chl*b* bzw. von Chl zu den Car.
Abb. 35: BN- und BN/SDS-PAGE vom WT zum Vergleich.
Abb. 36: BN- und BN/SDS-PAGE von *albino3* im Vergleich zum WT.
Abb. 37: BN- und BN/SDS-PAGE von *ffc*$^-$ im Vergleich zum WT.
Abb. 38: BN- und BN/SDS-PAGE von Δ*cpftsy* im Vergleich zum WT.
Abb. 39: BN- und BN/SDS-PAGE von Δ*hcf106* im Vergleich zum WT.
Abb. 40: BN- und BN/SDS-PAGE von Δ*psy* im Vergleich zum WT.
Abb. 41: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von *albino3*.
Abb. 42: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von *ffc*$^-$.
Abb. 43: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von Δ*cpftsy*.
Abb. 44: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von Δ*hcf106*.
Abb. 45: SDS-Gel- und Western Blot-Analysen von Δ*psy*.
Abb. 46: *In vivo*-Markierungsanalysen von WT Col-0 (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Abb. 47: *In vivo*-Markierungsanalysen von *ffc*$^-$ (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Abb. 48: *In vivo* Markierungsanalysen von *Δcpftsy* (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Abb. 49: *In vivo*-Markierung und SDS-Gel von *albno3*.
Abb. 50: *In vivo*-Markierung und 2D-BN/SDS-Gele von *albino3*.
Abb. 51: *In vivo*-Markierungsanalysen von Δ*hcf106* (12 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Abb. 52: *In vivo*-Markierungsanalysen von Δ*psy*.
Abb. 53: Modell zur Beteiligung von Plastochinon an der Phytoendesaturae-Reaktion
Abb. 54: Vektorkarte des pAHDK-Vektors.
Abb. 55: Vektorkarte des pCRII-Vektors.
Abb. 56: Modell der Regulation der *LHCB* Expression durch plastidäre Signale.
Abb. 57: GUN1-abhängiger plastidärer Signalweg.
Abb. 58: Einfluss von plastidären Signalen auf den cry1-Signalweg.
Abb. 59: Interaktion zwischen Plastiden- und Licht-Signalen beeinflsst die *Lhcb*- und *RbcS*-Expression.
Abb. 60: Refferenzabbildung für 2D-BN/SDS-Analysen.
Tab. 1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide
Tab. 2: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren.
Tab. 3: Zusammenfassung der in dieser Arbeit generierten Plasmide.
Tab. 4: Relative Chl-Werte aus Abb. 33 bezogen auf WT (120 µmol Photonen m^{-2} s^{-1}).
Tab. 5: Absolute Werte für die in Abb. 34 gezeigten Daten.

IX. Anhang

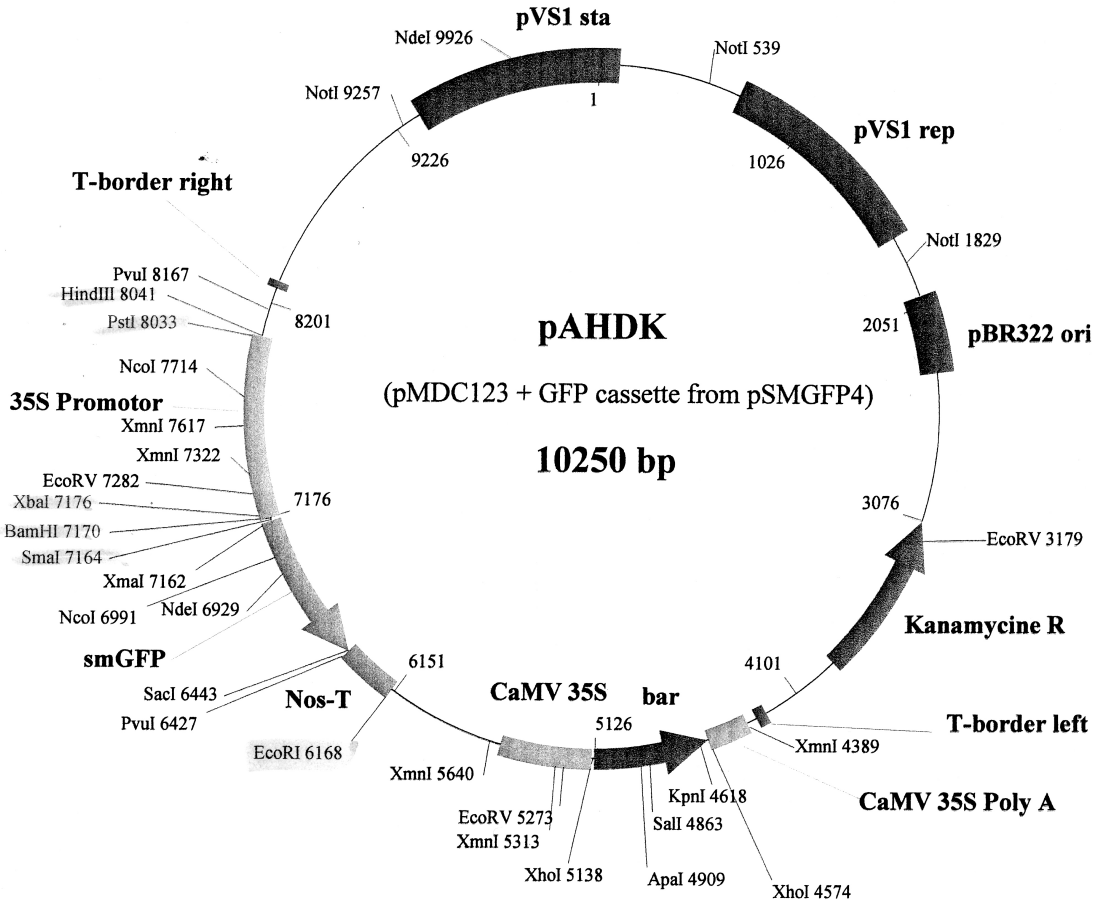


Abb. 54: Vektorkarte des pAHDK-Vektors (Angela Hölzle und Daniela Köhler, zur Verfügung gestellt).

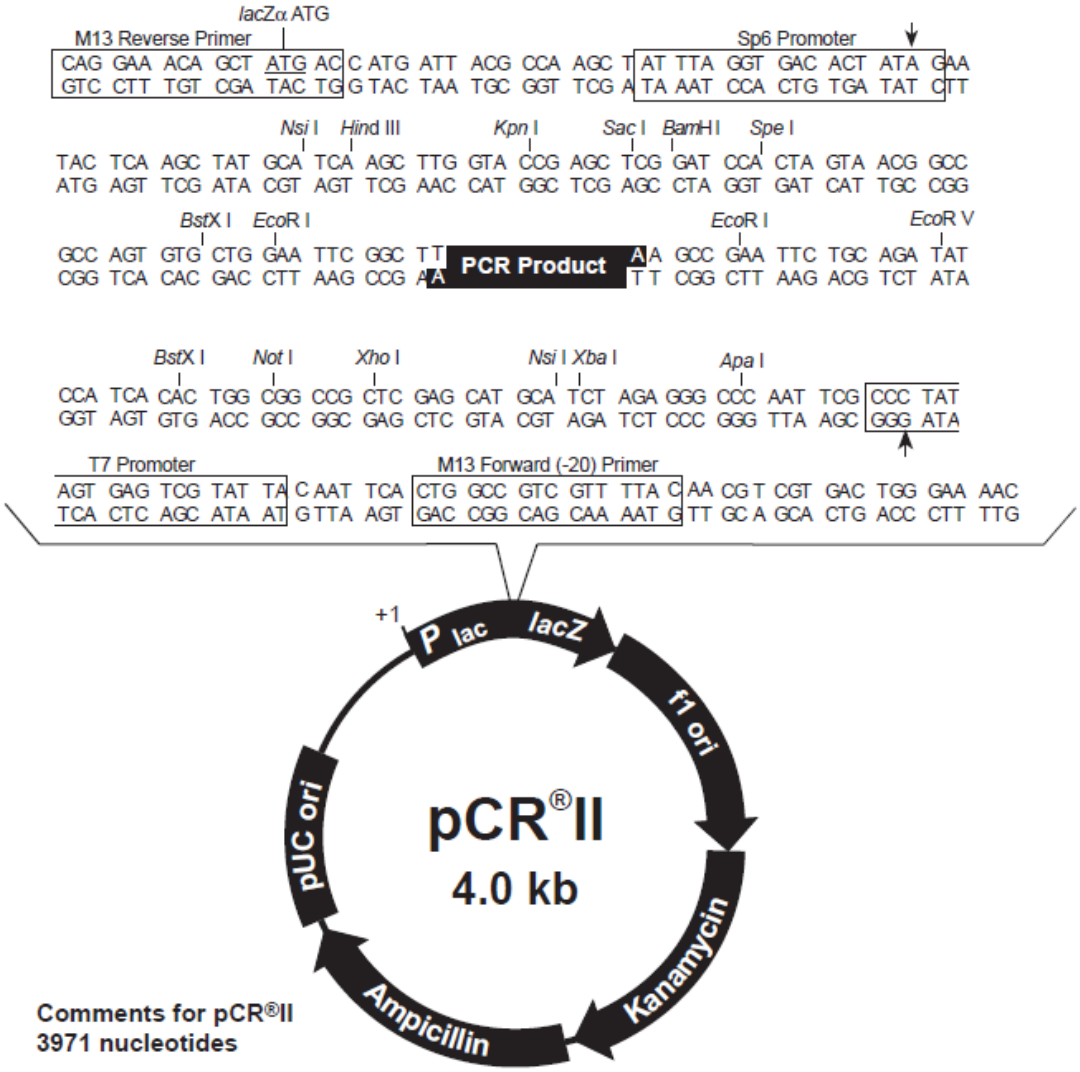


Abb. 55: Vektorkarte des pCRII-Vektors (Invitrogen).

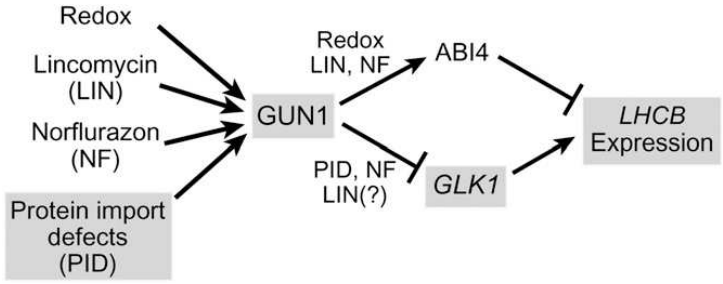


Abb. 56: Modell der Regulation der *LHCB* Expression durch plastidäre Signale (Kakazaki et al., 2009)

Originalbeschriftung: **Figure 9.** Model for the regulation of *LHCB* expression by plastid signals. Multiple plastid signals, including that generated by defects in plastid protein import, converge at GUN1. Subsequently, the plastid signal generated by import defects acts through the suppression of GLK1 expression but not the activation of ABI4. Although plastid signals generated by norflurazon and lincomycin have been shown to act through the GUN1-ABI4 pathway, they may also act through the GUN1-GLK1 pathway.

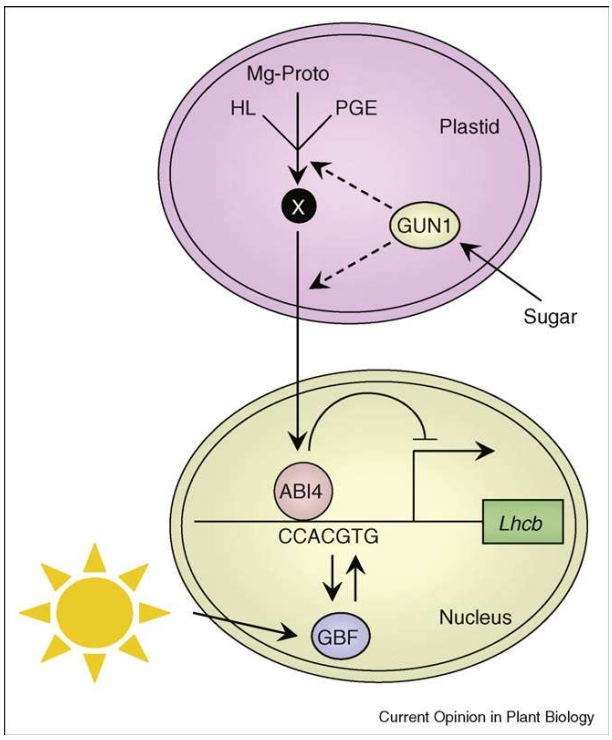


Abb. 57: GUN1-abhängiger plastidärer Signalweg (Larkin und Ruckle, 2008).

Originalbeschriftung: **Figure 3.** The GUN1-dependent plastid signaling. When Arabidopsis seedlings are treated with inhibitors of chloroplast biogenesis, the buildup of Mgprotoporphyrin IX (Mg-Proto) or inhibition of plastid gene expression (PGE) triggers the production of a second messenger (X) that requires GUN1 for its biosynthesis or transduction (dashed arrows). Highintensity light and glucose treatments can also induce the biosynthesis or transduction of X. Light induces PhANG expression by inducing the activity of G-box binding factors (GBFs) that induce PhANG transcription, as described in the text. X induces the ABI4-dependent repression of PhANGs. ABI4 has been proposed to repress PhANGs by binding to CCAC and displacing GBFs, which bind the light-responsive G-box (CACGTG). This model was adapted from Koussevitzky et al. [18].

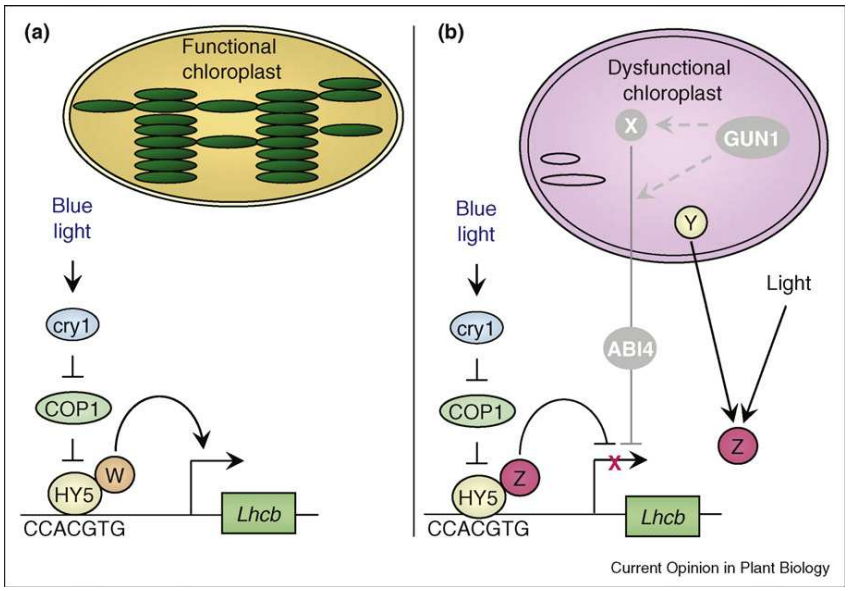


Abb. 58: Einfluss von plastidären Signalen auf den cry1-Signalweg (Larkin und Ruckle, 2008).

Originalbeschriftung: **Figure 4**. Working model for the rewiring of cry1 signaling by plastid signals. (a) Regulation of *Lhcb* transcription by HY5 in cells that contain well-functioning chloroplasts. Because HY5 binding is necessary but not sufficient to regulate gene expression [28], we propose that Lhcb transcription is activated by a factor (W) that associates with the Lhcb promoter using a HY5 dependent mechanism when cells contain well-functioning chloroplasts. As described in the text, HY5 appears to bind the G-box (CACGTG). (b) Regulation of Lhcb transcription by HY5 in cells that contain dysfunctional chloroplasts. When seedlings are treated with an inhibitor of chloroplast biogenesis, the GUN1-dependent signals (shown in gray) are activated as described in Figure 3. Simultaneously, a distinct plastid signal (Y) converts cry1 into a repressor of Lhcb by converting HY5 into a repressor of Lhcb [13]. We propose that Y activates a factor (Z) that replaces factor W described in (a), thereby converting HY5 into a repressor of Lhcb. Increasing the fluence rate of light also increases the repression of Lhcb when chloroplast biogenesis is blocked, regardless of whether the GUN1-dependent signals are present [13]. Therefore, we propose that the activity of factor Z may also be induced by light, as has been reported for HY5 [2].

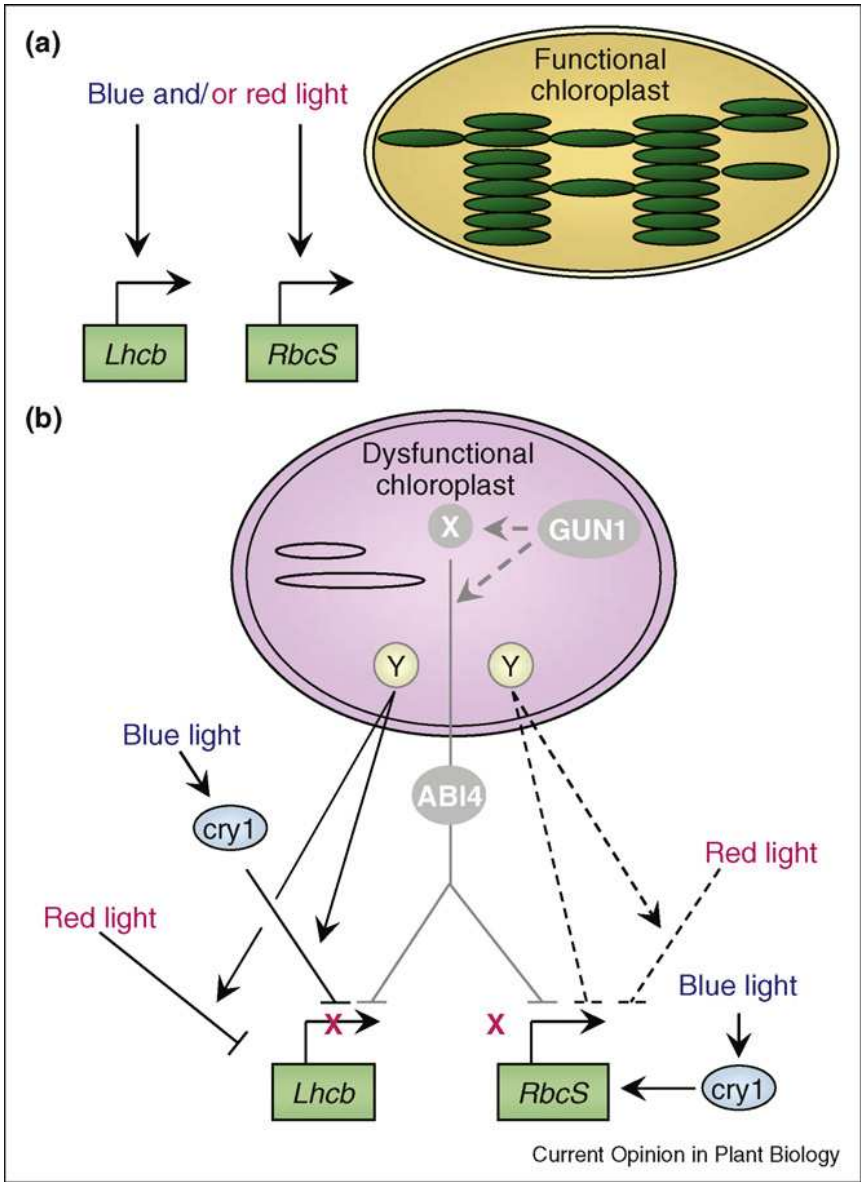


Abb. 59: Interaktion zwischen Plastiden- und Licht-Signalen beeinflsst die *Lhcb*- und *RbcS*-Expression (Larkin und Ruckle, 2008).

Originalbeschriftung: **Figure 5.** Interaction between plastid signaling and light signaling that affects *Lhc* and *RbcS* expression. (a) Regulation of *Lhcb* and *RbcS* expression in seedlings containing chloroplasts that are not stressed. During deetiolation or in green seedlings photoreceptors that perceive red and blue light induce the expression of *Lhcb* and *RbcS*, as described in the text. Chloroplasts that are not stressed have not been shown to influence the regulation of these PhANGs by affecting light-regulated transcriptional networks. (b) The rewiring of light signaling networks by plastid signals. When chloroplast biogenesis is blocked, a plastid signal (X) triggers the GUN1-dependent signaling, as described in Figure 3 (shown in gray). Under these same conditions, a distinct plastid signal(s) (Y) converts the blue and/or red light signaling network, which have otherwise been reported to induce both Lhcb and RbcS, into repressors of Lhcb and RbcS. Plastid–phytochrome interactions are not as well understood as plastid–cry1 interactions. The repression of RbcS by Y may result from a light-dependent or a light-independent signal (dotted arrow and dotted T-bar, respectively). Y may be more than one signal. Subpart (b) was adapted from Ruckle et al. [13].

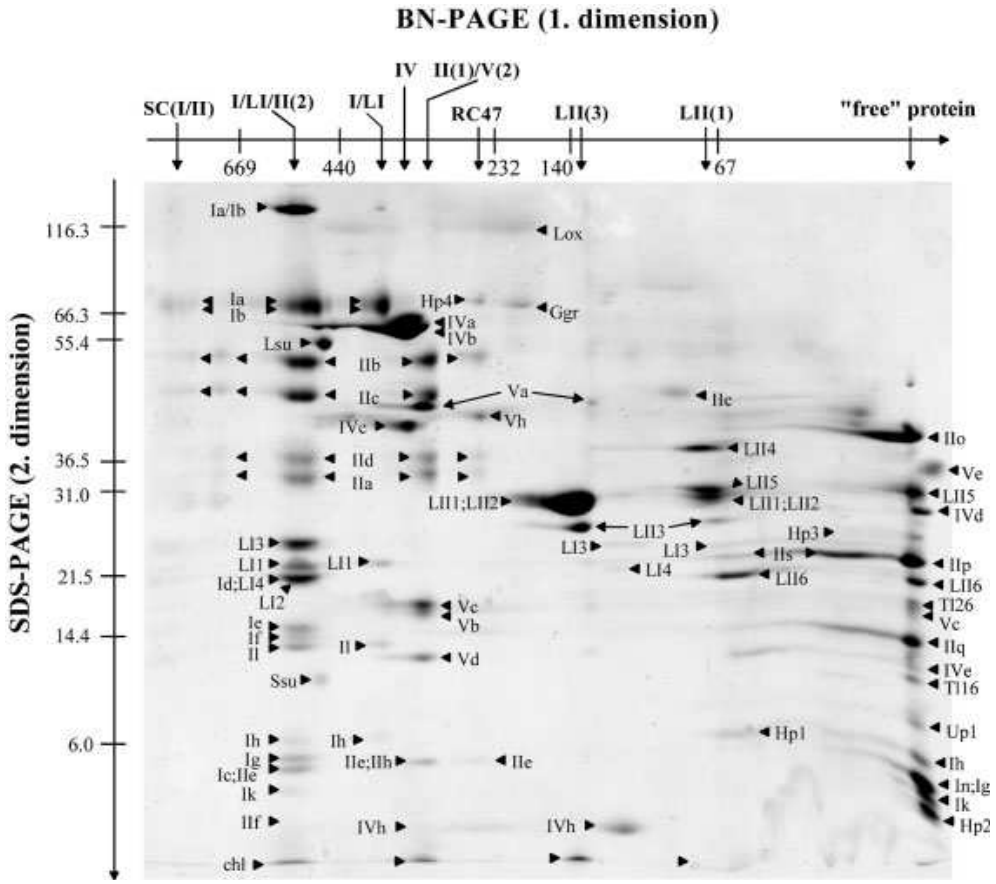


Abb. 60: Refferenzabbildung für 2D-BN/SDS-Analysen (Granvogel et al., 2006).
Originalbeschriftung: **Figure 1.** 2-D Native-/SDS-PAGE of thylakoid membrane proteins. Membrane protein-complexes from 1.56108 chloroplasts were isolated and separated by BN-PAGE in a first dimension. Isolated complexes and subcomplexes were indexed with latin numbers as PSI-LHCI (I), RCII-Core (II), ATP-synthase (IV), Cyt.*b6/f*-complex (V), LHCII (III). Above the gel figure, arabic numbers were added in brackets to indicate the oligomeric status of the protein complex as, trimeric (3), dimeric (2) and monomeric (1). Protein subunits were released from protein complexes and were resolved by SDS-PAGE in a second dimension (SDS-PAGE). Arrows indicate the direction of protein migration in both dimensions. The 2-D gel was stained with CBB. Proteins were identified by MS. Protein spots of interest were cut from the gel, digested with trypsin and analyzed by peptide sequencing with a Q-TOF ESI-MS . Within the gel, protein subunits are characterized by the latin number of the corresponding protein complex and a letter characterizing the protein subunit. In general, the letter corresponds to the gene name of the protein. In case of light harvesting proteins, the letter contains an extra numbering suffix. The following complexes and associated protein subunits are presented within the gel (**protein complex**, *gene name of protein subunit*, name of protein subunit): **PSI (I, arrow):** *psaA* (Ia), *psaB* (Ib), *psaC* (Ic), *PsaD* (Id), *PsaE* (Ie), *PsaF* (If), *PsaG* (Ig), *PsaH* (Ih), *PsaK* (Ik), *PsaL* (Il), *PsaN* (In), **LHCI (LI, arrow):** *Lhca1* (LI1), *Lhca2* (LI2), *Lhca3* (LI3), *Lhca4* (LI4); **PSII (II, arrow):** *psbA* (IIa), *psbB* (IIb), *psbC* (IIc), *psbD* (IId), *psbE* (IIe), *psbF* (IIf), *psbH* (IIh); *PsbO* (IIo); *PsbP* (IIp); **LHCII (LII, arrow):** *LhcIIa-1* (LII4), *Lhcb1* (LII1), *Lhcb2* (LII2), *Lhcb3* (LII3), *Lhcb5* (LII5), *Lhcb6* (LII6), *PsbS* (IIs); **ATP-synthase (IV, arrow):** *atpA* (IVa), *atpB* (IVb), *AtpC* (IVc), *AtpD* (IVd), *atpE* (IVe), *atpF* (IVf), *atpG* (IVg), *atpH* (IVh); **Cyt.b6/f-complex (V, arrow):** *petA* (Va), *petB* (Vb), *PetC* (Vc), *petD* (Vd), *PetE* (Ve); *petH* (Vh); **Other proteins:** *None* (Fbp), *CHLP* (Ggr), *At4g01150* (Hp1), *None* (Hp2), *LOX1* (Lox), *None* (Pie), *At4g02530* (Tl16), *At3g55330* (Tl26), *At1g54780* (Uc1), *At1g03600* (Up1), *Rbcl* (Lsu), *None* (Ssu), chl. (Chlorophyll).

XI. Lebenslauf

Name:	Matthias Georg Kugelmann
Geburtsdatum:	28.05.1982
Geburtsort:	Augsburg
Familienstand:	ledig, verlobt, keine Kinder

Schulbildung:

Sep. 1988 – Aug. 1992:	Volksschule Fischach
Sep. 1992 – Juli 2001:	Justus-von-Liebig-Gymnasium Neusäß
Schulabschluss:	Abitur am 29. Juni 2001
Sep. 2001 – Jun. 2002:	Zivildienst

Studium:

Okt. 2002 – Sep. 2005:	Bachelor-Studium Biochemie, Universität Ulm
21.2.2005 – 4.4.2005:	Anfertigung der Bachelor-Arbeit „Darstellung der Expression ausgewählter Gene während der Embryonalentwicklung im Krallenfrosch“ in der Abteilung Biochemie der Universität Ulm unter der Anleitung von Prof. Dr. Dr. Walter Knöchel
Studienabschluss:	Bachelor of Science am 28. Juli 2005
Okt. 2005 – Aug. 2007:	Master-Studium Biochemie, Universität Ulm
Dez. 2006 – Aug. 2007:	Anfertigung der Master-Arbeit „Das Proteom der chloroplastidären RNA-bindenden Proteine in *Chlamydomonas reinhardtii*“ am Institut für Molekulare Botanik der Universität Ulm unter Anleitung von Prof. Dr. Axel Brennicke
Studienabschluss:	Master of Science am 13. August 2007
seit Sep. 2007:	Anfertigung der Dissertation „Analyse von *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defekten im plastidären Protein-Transport“ am Institut für Molekulare Botanik der Universität Ulm unter Anleitung von Prof. Dr. Axel Brennicke
seit Sep. 2007:	Beschäftigung als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Molekulare Botanik der Universität Ulm

XII. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Brennicke für die Begutachtung meiner Arbeit, für angenehme und aufschlussreiche Diskussionen sowie für die Übernahme meiner Betreuung gegen Ende der Arbeit.

Ebenso danke ich Dr. Friedrich Ossenbühl für die interessante Themenstellung, für angenehme Diskussionsrunden und für eine stets verständnisvolle, aufgeschlossene und hilfreiche Betreuung.

Mein weiterer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Stefan Binder für die Erstellung des Zweitgutachtens sowie für aufschlussreiche Diskussionen.
- Herrn Prof. Dr. Kenneth Cline, Herrn Prof. Dr. Ralph Henry, Frau Prof. Dr. Danja Schünemann sowie Herrn Dr. A. Sokolenko für die Bereitstellung verschiedener Antikörper.
- Frau Bianca Wolf für die praktische Unterstützung im Labor sowie für viele schöne Mittagspausen.
- Herrn Prof. Dr. Paul Walther, Herrn Eberhard Schmid, Renate Kunz und Chris Horrmann für die technische Unterstützung bei der Erstellung der TEM-Aufnahmen.
- den ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ossenbühl Frau. Dr. Susanne Gawenda, Frau Dr. Martha Sikorski und Frau Lena Schmohl sowie allen weiteren ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine stets freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielfältige Unterstützung bei der praktischen Arbeit sowie die jährlichen Weihnachtsmarktbesuche.
- den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Brennicke und Takenaka für die freundliche Aufnahme im letzten Drittel meiner Arbeit und für viele schöne Stunden.
- Herrn Christian Jonietz für die sportlichen Herausforderungen.
- allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Botanik für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit in einem angenehmen Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, sowie meiner Verlobten Katrin Liebscher, die stets für mich da war und all meine Launen mit Gleichmut ertragen hat.

XIII. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation unter der Betreuung von Dr. Friedrich Ossenbühl selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den _____ _____

Matthias Kugelmann