

**Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein:
Analyse des Transport- und Assemblierungsprozesses**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Sabine Molik
geb. am: 19. August 1976 in: Halberstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

2. Prof. Dr. Roland Freudl

Halle (Saale), 26. April 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008353

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008353>]

Abkürzungen	IV
1 Einleitung & Problemstellung.....	1
2 Material & Methoden	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Enzyme.....	9
2.1.3 Reaktionskits	9
2.1.4 Längenstandards/Marker	9
2.1.5 Antibiotika.....	10
2.1.6 Kulturmedien.....	10
2.1.7 Nukleinsäuren und Oligonukleotide.....	10
2.1.8 Bakterienstämme und Vektoren	11
2.1.9 cDNA-Klone	11
2.1.10 Antikörper	12
2.1.11 Säulenmaterial und Membranen.....	13
2.1.12 Pflanzenmaterial.....	13
2.2 Methoden	13
<i>Molekularbiologische Methoden</i>	
2.2.1 <i>In vitro</i> -Synthese von Proteinen.....	14
2.2.2 Mutagenese der TPP-Schnittstelle in den Konstrukten 16/Ri-h und 33/Ri-h	15
2.2.3 Klonierung der AtNFU2-cDNA.....	16
2.2.4 Erstellung der Rieske-Konstrukte zur Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
<i>Biochemische Methoden</i>	
2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.2.6 Färbung von Proteinen	20
2.2.7 Native Auftrennung von Membranproteinkomplexen: <i>Blue native</i> -PAGE	21
2.2.8 Auftrennung löslicher Proteinkomplexe des Stromas	23
2.2.9 Auftrennung von Proteinkomplexen in der zweiten Dimension (2D)	23
2.2.10 <i>Western</i> -Analyse	24
2.2.11 Co-Immunpräzipitation	25
2.2.12 Versuche mit rekonstituiertem IscA1 aus <i>Synechocystis</i>	26
<i>Pflanzliche Methoden</i>	
2.2.13 Gewinnung von Proteinfraktionen aus <i>Arabidopsis</i> -Pflanzenmaterial	28
2.2.14 Isolierung von Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
2.2.15 Behandlung von <i>Arabidopsis</i> -Proteinfraktionen	30
2.2.16 Reinigung des Rieske-KK _{HA} -Proteins aus <i>Arabidopsis</i> -Pflanzenextrakten.....	30
2.2.17 Isolierung von Chloroplasten aus <i>Spinacia oleracea</i> (Spinat).....	31
2.2.18 Importreaktion mit Spinatchloroplasten (<i>in organello</i> -Ansatz).....	32
2.2.19 Isolierung von Chloroplasten aus <i>Pisum sativum</i> (Erbse).....	33
2.2.20 Isolierung von Erbsenthylakoiden.....	34
2.2.21 Importreaktion mit Erbsenthylakoiden (<i>in thylakoido</i> -Ansatz)	34
2.2.22 Erstellung und Selektion transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	35

3	Ergebnisse	37
3.1	Transporteigenschaften des Rieske Fe/S-Proteins	37
3.1.1	Das Transportverhalten des Rieske Fe/S-Proteins <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	37
3.1.2	Das Rieske-Thylakoidtransportsignal und die Assemblierung in Membrankomplexe	41
3.1.2.1	Besonderheiten des Rieske-Thylakoidtransportsignals	41
3.1.2.2	Der Austausch des Rieske-Membranankers und die Veränderung der TPP-Schnittstelle	44
3.1.2.3	Import- und Assemblierungsverhalten der chimären Rieske-Proteine	45
3.1.2.4	Versuche zur Identifizierung der BN-Gel-Komplexe	54
3.1.3	Der Einfluß der luminalen Rieske-Domäne auf den Transportprozeß	59
3.1.3.1	Blockierung des Thylakoidtransports	59
3.1.3.2	Das Transportverhaltne der Fe/S-Ligandenmutanten	62
3.1.3.3	Die Analyse des 440 kDa-Kompkexes	66
3.2	Kandidaten der plastidären Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (ISC)	71
3.2.1	Die Basis zur Identifizierung der ISC-Kandidaten	72
3.2.2	Identifizierung der ISC-Kandidaten	75
3.2.3	Importverhalten der ISC-Kandidaten	78
3.2.4	Komplexe der ISC-Kandidaten im Stroma	82
3.2.5	Interaktionen der ISC-Kandidaten mit dem Rieske-Protein	86
3.2.6	Das IscA1-Protein aus <i>Synechocystis</i>	89
3.3	Die Suche nach stromalen Rieske-Interaktionspartnern	93
3.3.1	Die Expression mutierter Rieske-Proteine aus Spinat in <i>Synechocystis</i>	94
3.3.1.1	Das Rieske-KK-Protein	94
3.3.1.2	Der Einfluß des HA-Peptids auf Transport und Assemblierung des Rieske-Proteins	95
3.3.1.3	Expression von Rieske-KK _{HA} und Rieske-KR _{HA} in <i>A. thaliana</i>	98
3.3.2	Die Membranfraktion der Rieske-KK(KR) _{HA} -exprimierenden Pflanzen	105
3.3.3	Die lösliche Fraktion der Rieske-KK _{HA} -exprimierenden Pflanzen	110
3.3.4	Die Reinigung von Rieske-KK _{HA} -haltigen Komplexen	113
4	Diskussion	116
4.1	Das Rieske-Protein als besonderes Δ pH/Tat-Substrat	116
4.2	Das plastidäre Rieske-Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
4.3	Die Rieske-Signalankerdomäne	119
	<i>Komplex 2 – Die plastidäre Sec-Translokase?</i>	120
	<i>Komplex 3 – Die monomere Form des Cytochrom <i>b₆/f</i>-Komplexes?</i>	121
4.4	Die Bedeutung der luminalen Domäne für den Thylakoidtransport	122
	<i>Der Transport von gefalteten Proteinen</i>	122
	<i>Die Interaktion mit Chaperonen</i>	124
	<i>Der Einbau von Cofaktoren</i>	126
4.5	Die Kandidaten der plastidären Fe/S-Assemblierungsmaschinerie	127
	<i>Die IscS/NFS-Komponente</i>	128
	<i>Die NFU-Komponente</i>	129
	<i>Die IscA/ISA-Komponente</i>	131
	<i>Die ISC-Kandidaten bilden Komplexe im Stroma</i>	133

4.6	Die Expression von Rieske-KR _{HA} und Rieske-KK _{HA} in <i>A. thaliana</i>	135
	<i>Das Rieske-KK-Protein</i>	135
	<i>Der Einfluß des HA-Peptids</i>	135
	<i>Rieske-KK_{HA} assoziiert mit der Thylakoidmembran</i>	136
	<i>Die Reinigung des Rieske-KK_{HA}-Proteins zusammen mit der Rubisco-Aktivase</i>	137
4.7	Das zusammenfassende Modell.....	138
5	Zusammenfassung	140
6	Literatur	142
	Erklärung	158
	Danksagung	159
	Publikationsliste	160
	Lebenslauf	161

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien, Nukleinsäuren und Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
αX	Anti-X Antikörper
A	Adenin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. vinelandii</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Ap ^(r)	Ampicillin (-Resistenz)
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A _x	Absorption bei der Wellenlänge x
Bistris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BN	<i>Blue native</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Cytosin
CAP	m ⁷ G(5')ppp(5')G
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy</i> -DNA)
Cef	Cefotaxim
CN	<i>Colorless native</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Chl.	Chlorophyll
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	Tag (e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemilumescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fe/S	Eisen-Schwefel
FM	Frischmasse
g	Gramm
g	Schwerkraft
G	Guanin
Gm ^(r)	Gentamycin (-Resistenz)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde (n)
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-Ethansulfonsäure
Hyg	Hygromycin
IgG	Immunglobulin G
ISC	<i>iron-sulfur cluster formation</i> , Fe/S-Cluster-Assemblierung
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kn ^(r)	Kanamycin (-Resistenz)
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
M	Molar
mA	Milliamper

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> (Boten-) RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde (n)
Syn.	Synonym
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tc ^r	Tetracyclin-Resistenz
TG	Tris-Glycin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen

Abkürzungen für Polypeptide und Proteinkomplexe

16 (23, 33) kDa	16 (23, 33) kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates
ATP-S.	ATP-Synthasekomplex
Cpn60	<i>Chaperonin</i> 60
Cyt. b ₆ /f	Cytochrom b ₆ /f-Komplex
Hsp60 (70)	<i>heat shock protein</i> 60 (70)
LHCII	Antennenkomplex von Photosystem II
PC	Plastocyanin
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RuA	Rubisco-Aktivase
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SPP	Stromaprozessierungspeptidase
TP	Transitpeptid
TPP	Thylakoidprozessierungspeptidase

Einbuchstaben- und (Dreibuchstaben-) Code der Aminosäuren

A	(Ala)	Alanin	I	(Ile)	Isoleucin	R	(Arg)	Arginin
C	(Cys)	Cystein	K	(Lys)	Lysin	S	(Ser)	Serin
D	(Asp)	Asparaginsäure	L	(Leu)	Leucin	T	(Thr)	Threonin
E	(Glu)	Glutaminsäure	M	(Met)	Methionin	W	(Trp)	Tryptophan
F	(Phe)	Phenylalanin	N	(Asn)	Asparagin	Y	(Tyr)	Tyrosin
G	(Gly)	Glycin	P	(Pro)	Prolin	V	(Val)	Valin
H	(His)	Histidin	Q	(Gln)	Glutamin			

1 Einleitung & Problemstellung

Rieske Eisen-Schwefel-Proteine sind ubiquitär verbreitete Redoxproteine und wurden erstmals 1964 als „Eisen-Protein“ des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette beschrieben (Rieske et al., 1964). Sie sind durch den Besitz eines einfachen [2Fe-2S]-Clusters gekennzeichnet. Die spektroskopische Analyse des proteingebundenen Eisens zeigte auffällige Unterschiede zu bereits bekannten Eisen-Schwefel-Proteinen (Rieske et al., 1964). Im Laufe der Jahre fand man auch im Cytochrom b/c₁-Komplex der bakteriellen Atmungskette, im Cytochrom b₆/f-Komplex der photosynthetischen Elektronentransportkette und sogar in der Atmungskette der Archea eine Komponente mit ähnlichen spektroskopischen Eigenschaften, wie von Rieske et al. (1964) für den mitochondrialen Cytochrom b/c₁-Komplex beschrieben (Riedel et al., 1991; Trumpower & Gennis, 1994; Schäfer et al., 1996). Der Sequenzvergleich diverser Rieske-Proteine ließ ein hoch konserviertes Motiv erkennen: Cys-x-His-x₁₅₋₁₇-Cys-x-x-His (Neidle et al., 1991; Mason & Cammack, 1992; Castresana et al., 1995; Carrell et al., 1997). Da alle bis dahin bekannten Fe/S-Proteine eine reine Cystein-Koordinierung der Eisenionen zeigten, war es überraschend, daß in diesem Proteintyp vermutlich eine gemischte Bindung durch Cystein- und Histidinseitenketten vorlag. Durch die Strukturaufklärung mitochondrialer und plastidärer Rieske-Proteine konnte endgültig bestätigt werden, daß der vorhandene [2Fe-2S]-Cluster über zwei Cystein- und zwei Histidinreste gebunden wird (Iwata et al., 1996; Carrell et al., 1997).

Der Zustandswechsel von Fe³⁺ und Fe²⁺ innerhalb des [2Fe-2S]-Clusters ermöglicht einen Elektronentransport, der im Fall des plastidären Rieske-Proteins die Oxidation des Plastochinons und die Reduktion der Cytochrom f-gebundenen Häm-Gruppe bedeutet, die wiederum die Elektronen auf Plastocyanin überträgt (Cramer et al., 1996). Durch diesen Elektronentransport stellt der Cytochrom b₆/f-Komplex die zentrale Verbindung zwischen den zwei lichtenergieabsorbierenden Proteinkomplexen der Thylakoidmembran (Photosystem [PS] II und I) dar. Diese Elektronentransportkette (PSII -> Cyt. -> PSI) bewirkt außerdem den Transport und die Anreicherung von Protonen im Thylakoidlumen. Die Energie, die beim Abbau dieses Protonengradienten frei wird, kann durch einen vierten Proteinkomplex (ATP-Synthase) in Form von ATP, dem universellen Energieäquivalent der Zelle, gespeichert werden. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird als Lichtreaktion der

Photosynthese bezeichnet und bildet die Grundlage zur Synthese sämtlicher organischer Verbindungen.

Die vier Photosynthesekomplexe der Thylakoidmembran stellen genetische Chimäre dar, d.h. sie setzen sich aus Untereinheiten zusammen, die entweder im Kern- oder im Plastidengenom codiert sind (Leister, 2003). So bilden die plastidär codierten Untereinheiten Cytochrom f (Genname: *petA*), Cytochrom b_6 (*petB*), Untereinheit IV (*petD*) sowie die kleinen Untereinheiten V, VI und VIII (*petG*, *petL*, *petN*) zusammen mit dem Kern-codierten Rieske-Protein (*petC*) sowie der kleinen Untereinheiten VII (*petM*) den Cytochrom b_6/f -Komplex (Whitelegge et al., 2002).

Die räumliche Trennung von Codierungs- (Zellkern) und Wirkort (Plastide) bedeutet einen posttranslationalen Transport der cytosolisch synthetisierten Proteine zur Thylakoidmembran. Aus diesem Grund werden die Polypeptide in Form eines höhermolekularen Vorläufers (*Precursor*) inklusive einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Diese Signalsequenz wird im Fall der Plastidensortierung als Transitpeptid bezeichnet, das nach erfolgreichem Transport proteolytisch entfernt wird (Stromaprozessierungspeptidase [SPP; Robinson und Ellis, 1984] und/oder Thylakoidprozessierungspeptidase [TPP; Hageman et al., 1986; Kirwin et al., 1987, 1988]). Während für stromalokalisierte Proteine ein einfaches Transitpeptid, das lediglich das Chloroplastenimportsignal enthält, ausreichend ist, erfordert die innerplastidäre Sortierung zu den Thylakoiden ein weiteres Signal (Bassham et al., 1991). Dieses kann Teil eines zusammengesetzten Transitpeptids sein, dann spricht man auch von einem thylakoiddirigierenden Signalpeptid oder innerhalb des reifen Proteins liegen. Einfache Transitpeptide und der N-terminale Teil zusammengesetzter Transitpeptide ermöglichen den Transport des *Precursors* über die Doppelmembran der Chloroplastenhülle, die von zwei Translokasekomplexen, Toc und Tic (*translocon at the outer/inner membrane of chloroplasts*), durchspannt wird (Jarvis & Soll, 2002).

Im Gegensatz zum einheitlichen Transportkomplex der Chloroplastenhülle, zeigt die Thylakoidmembran eine größere Vielfalt an Integrations- bzw. Translokationsmechanismen auf. So wurden bislang vier Transportwege identifiziert, die als Sec- (*secretory*), SRP- (*signal recognition particle*), Δ pH/Tat- (*twin-arginine translocation*) abhängig bzw. als „spontane Integration“ bezeichnet werden (Abb. 1-1; Klösgen, 1997; Keegstra & Cline, 1999; Robinson et al., 2000; Mori & Cline, 2001).

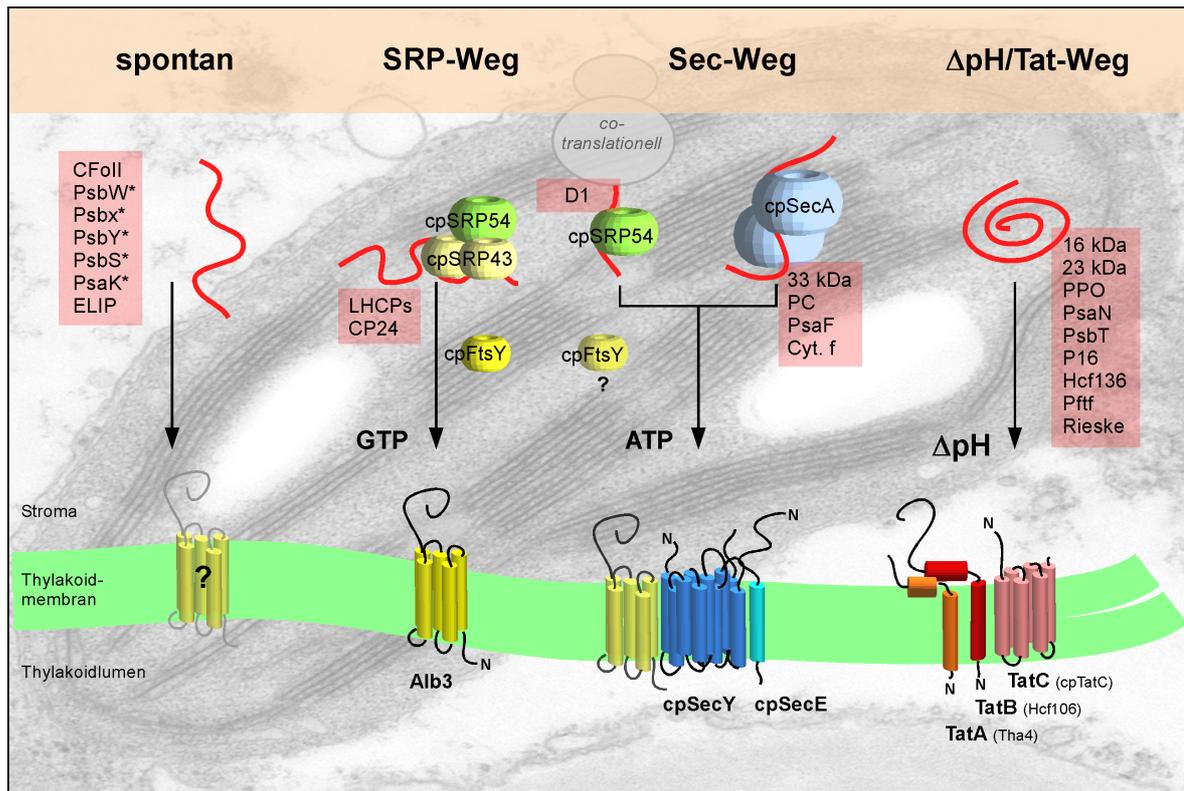


Abb. 1-1 Die Transportwege der Thylakoidmembran und die daran beteiligten Komponenten. Die Integration bzw. der Transport von thylakoidlokalisierten Proteinen erfolgt entweder spontan oder in Abhängigkeit einer membranständigen Insertase/Translokase: Albino3-Insertase [Alb3], Sec-Translokase [cpSecYE] bzw. ΔpH/Tat-Translokase [TatA, B, C]. Der Alb3- bzw. cpSecY-abhängige Transport bedarf zusätzlicher stromaler Komponenten (cpSRP54, cpSRP43, cpFtsY, cpSecA). Als Energiequelle der Transportwege werden Nukleosidtriphosphate (GTP bzw. ATP) bzw. der transthylakoidale Protonengradient (ΔpH) genutzt. Bislang analysierte Substrate der vier Wege sind rot unterlegt. Die Beteiligung der Alb3-Insertase am spontanen Weg ist spekulativ. Für die mit (*) markierten Substrate des spontanen Weges wurde eine Alb3-unabhängige Insertion gezeigt. Auch über die Funktionalität der Verbindung von Alb3 mit der Sec-Translokase besteht noch keine endgültige Klarheit. Die Darstellung der Translokasen erfolgte nach Kuhn et al., 2003 (Alb3) und Mori & Cline, 2001. Weitere Einzelheiten im Text. (elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chloroplasten aus *Vicia faba* - mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Birschwilks)

Die Wahl des Weges wird durch das Thylakoidtransportsignal des *Precursors* bestimmt (Robinson et al., 1994; Henry et al., 1994). So befindet sich die Information zum Transport über den SRP-Weg innerhalb des reifen Proteins (DeLille et al., 2000). Dagegen erfolgt die Nutzung des Sec-, ΔpH/Tat- und spontanen Weges in Abhängigkeit typischer Signalpeptide, die nach erfolgreicher Translokation der Substrate proteolytisch durch die TPP entfernt werden (Kirwin et al., 1987, 1988). Plastidäre Signalpeptide ähneln strukturell den bakteriellen Exportsignalen (auch als „Signalpeptid“ bezeichnet) sowie den cytosolischen ER-Transportsignalen (Schatz & Dobberstein, 1996; Settles & Martienssen, 1998; Dalbey & Robinson, 1999).

Ausgehend von der allgemeinen Struktur eines Signalpeptids, das durch eine Dreiteilung in eine positiv geladene N-terminale Domäne (N-Region), eine hydrophobe Kerndomäne (H-Region) und eine polare C-terminale Domäne (C-Region) mit kurzketigen Aminosäureresten in Position -3 und -1 der terminalen Prozessierungsstelle (Ala-x-Ala-

Motiv) gekennzeichnet ist, entsteht die Spezifität des Signals durch charakteristische Sequenzmotive (von Heijne, 1985; von Heijne et al., 1989; Shackleton & Robinson, 1991). So enthält die N-Region der Δ pH/Tat-spezifischen Signale das namensgebend, hochkonservierte Zwillingsarginin-Motiv (*twin-arginine*, RR) in Verbindung mit einem stark hydrophoben Aminosäurerest in Position +2 oder +3, gefolgt von einer schwach hydrophoben H-Region und einer durch positive Reste gekennzeichnete C-Region (Chaddock et al., 1995; Bogsch et al., 1997; Henry et al., 1997; Brink et al., 1998). Diese positiven Ladungen werden als „Sec-Vermeidungsmotiv“ (*Sec-avoidance motif*; Bogsch et al., 1997) interpretiert und fehlen somit in der C-Region von Sec-spezifischen Signalen. Darüber hinaus wird bei Sec-Signalen die positive Ladung (N-Region) vor der relativ stark hydrophoben H-Region meist durch einen Lysinrest repräsentiert (Chaddock et al., 1995). Signalpeptide, die zur spontanen Insertion eines Proteins führen, ähneln zwar den Sec-Signalen, können jedoch unabhängig vom Sec-Mechanismus fungieren (Michl et al., 1994).

Die Vielfalt der Transportwege reflektiert eine Spezialisierung der Mechanismen. So können bi- und polytope Membranproteine entweder spontan in die Membran inserieren oder mit Hilfe der SRP-Komponenten integriert werden. Lösliche Proteine nutzen ausschließlich den Sec- oder Δ pH/Tat-Mechanismus, wobei auch diese beiden Translokasen in der Lage sind, (bitope) Membranproteine zu transportieren (z.B. Cytochrom f [Nohara et al., 1996] bzw. das Rieske-Protein [Molik et al., 2001]).

Der SRP-Weg wurde ursprünglich als Translokationsmechanismus der polytope LHC (*Light Harvesting Complex*)-Apoproteine entdeckt und beschrieben (Li et al., 1995). Dabei zeigte sich neben der strikten Abhängigkeit von GTP (Hoffman & Franklin, 1994) die Beteiligung von drei stromalen Proteinen (cpSRP54, cpSRP43, cpFtsY), die zum Teil Homologe zu Komponenten des cytosolisch lokalisierten cotranslationellen ER-Transports darstellen (Franklin & Hofman, 1993; Walter & Johnson, 1994; Schünemann et al., 1998; Kogata et al., 1999; Groves et al., 2001).

Neben der großen Familie der LHC-Proteine scheint es mit dem D1-Protein ein weiteres Substrat für die cpSRP54-Komponente zu geben (Nilsson et al., 1999). Allerdings wird im Gegensatz zum posttranslationellen Transport der LHC-Proteine, das D1-Protein aufgrund seiner plastidären Codierung cotranslationell in die Thylakoidmembran integriert (Zhang & Aro, 2002). Neben der Interaktion zur cpSRP54-Komponente wurde auch eine Verbindung des D1-Proteins zur SecY-Untereinheit der plastidären Sec-Translokase gezeigt (Zhang et

al., 2001). Die Membraninsertion der LHC-Proteine erfolgt allerdings unabhängig von der Sec-Translokase (Moore et al., 2000). Statt dessen konnte die Beteiligung einer Chaperon-ähnlichen Insertase, Albino3 (Alb3), gezeigt werden (Moore et al., 2000; Bellafiore et al., 2002).

Zur Albino3-Familie gehören auch die Proteine Oxa1p (innere Membran der Mitochondrien) und YidC (Plasmamembran der Bakterien), die ebenfalls für die Integration von Membranproteinen essentiell sind (Kuhn et al., 2003). Auch die innere Membran der Chloroplastenhülle besitzt mit ARTEMIS ein Protein der Albino3-Familie (Funes et al., 2004). Die Möglichkeit zur Interaktion von Albino3 mit der plastidären Sec-Translokase (Klostermann et al., 2002) und die gemeinsame Nutzung der cpSRP54-Komponente sowohl für die Alb3- als auch für die SecY-abhängige Integration von Proteinen deutet auf eine enge Verbindung von SRP- und Sec-Weg hin (Dalbey & Chen, 2004). Jedoch ist bislang noch unklar, welche genaue Funktion Alb3 ausübt und ob es für die Funktionalität der Sec-Translokase essentiell ist.

Auch eine Beteiligung des Alb3-Proteins bei der „spontanen Integration“ von plastidären Proteinen ist denkbar. So wurde zumindest im bakteriellen System gezeigt, daß das Alb3-Homologe YidC für die Integration von diversen Membranproteinen zuständig ist, die zuvor als „spontan inserierend“ eingestuft wurden (Samuelson et al., 2000). Allerdings wurde bereits für sechs plastidäre Substrate des „spontanen“ Weges die spontane, also Alb3-unabhängige Insertion bestätigt (PsbS, PsbX, PsbY, PsbW, PsaK; Woolhead et al., 2001; Mant et al., 2001). Jedoch ist für andere Substrate der „spontanen Integration“, eine Mithilfe von Alb3 nicht auszuschließen.

Der klassische Sec-Weg wird nicht durch die cpSRP54-abhängige Integration des D1-Proteins dargestellt, sondern vielmehr durch die Kooperation der membranständigen Sec-Translokase mit der stromalen Komponente cpSecA (Nakai et al., 1994; Yuan et al., 1994; Berghöfer et al., 1995; Haward et al., 1997; Voelker et al., 1997; Roy & Barkan, 1998). Dabei hat cpSecA sowohl die Funktion eines *targeting*-Faktors als auch die eines Motorproteins, das aufgrund seiner ATP-abhängigen Konformationsänderung das Transportsubstrat durch die Translokationspore schiebt (Settles & Martienssen, 1998). Zwangsläufig wird bei diesem Vorgang das Substrat entfaltet und passiert als lineare Aminosäurekette die Sec-Translokase, für die bislang zwei Untereinheiten bekannt sind, cpSecY und cpSecE (Laidler et al., 1995, Berghöfer & Klösgen, 1996; Schünemann et al., 1999).

Im Gegensatz zur Sec-Translokase, zeichnet sich die Δ pH/Tat-Translokase durch die Fähigkeit aus, gefaltete Proteine zu transportieren (Creighton et al., 1995; Clark & Theg, 1997; Robinson, 2000; Marques et al., 2003 und 2004; Robinson & Bolhuis, 2004). Die Translokase wird hier von drei Komponenten gebildet: **TatA** (Syn. *Tha4*, *thylakoid assembly*; Mori et al., 1999; Walker et al., 1999), **TatB** (Syn. *Hcf106*, *high chlorophyll fluorescence*; Martienssen et al., 1989; Voelker & Barkan, 1995; Settles et al., 1997) und **TatC** (Syn. *cpTatC*, *chloroplastidäres TatC*, Bogsch et al., 1998; Mori et al., 2001; Motohashi et al., 2001). Ein Subkomplex aus TatB und TatC wird als *Precursor*-Bindungsstelle (Rezeptor) postuliert (Cline & Mori, 2001). Die anschließende Assemblierung der TatA-Moleküle in Abhängigkeit des transthylakoidalen Protonengradienten (Δ pH) führt zum aktiven Translokasekomplex und damit zum Transport des Substrates (Mori & Cline, 2002). Alle bislang durchgeführten *in vitro*-Experimente mit isolierten Organellen bzw. Thylakoiden konnten belegen, daß eine strikte Abhängigkeit vom Protonengradienten (vermutlich als Energiequelle) besteht und dies die bislang einzige Voraussetzung für die Funktion der Δ pH/Tat-Translokase darstellt (Mould & Robinson, 1991; Mould et al., 1991; Klösgen et al., 1992; Cline et al., 1992; Hulford et al., 1994; Brock et al., 1995). Allerdings deuteten erste *in vivo* Studien, durchgeführt in *Chlamydomonas reinhardtii*, eine mögliche Unabhängigkeit des Δ pH/Tat-Weges vom Protonengradienten an (Finazzi et al., 2003). Obwohl dies ein überraschendes Ergebnis ist, zeigt es doch, daß die Mechanismen dieses Transportweges noch weitgehend unbekannt sind und einer genaueren Aufklärung bedürfen.

Bislang zeigten neun plastidäre Proteine einen Δ pH-abhängigen Thylakoidtransport, die somit als Substrate des Δ pH/Tat-Weges eingestuft wurden (Abb. 1-1): die 16 bzw. 23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungsapparates (16 kDa, 23 kDa; Klösgen et al., 1992; Cline et al., 1992), die Polyphenoloxidase B (PPO; Sommer et al., 1994), Untereinheit N des PSI (PsaN; Nielsen et al., 1994), Untereinheit T des PSII (PsbT; Kapazoglou et al., 1995), ein 16 kDa Protein mit unbekannter Funktion (P16; Mant et al., 1999), der PSII Assemblierungsfaktor *Hcf136* (Hynds et al., 2000), das FtsH-Homolog *Pftf* (*plastid fusion/protein translocation factor*; Summer et al., 2000) sowie das Rieske Fe/S-Protein (Molik et al., 2001). Zwei dieser Proteine bilden einen Membrananker aus, und stellen somit eher untypische Δ pH/Tat-Substrate dar: das Rieske-Protein und *Pftf* (Karnauchov et al., 1997; Summer & Cline, 1999). Ein Vergleich der Topologie beider Membranproteine zeigt eine inverse Orientierung in der Thylakoidmembran. Obwohl beide Proteine einen N-terminalen

Membrananker ausbilden, bleibt im Fall des *Pftf*-Proteins die hydrophile C-terminale Domäne (ca. 500 AS) auf der stromalen Seite, während sie im Fall des Rieske-Proteins (ca. 180 AS) auf die luminaire Seite der Thylakoidmembran transportiert wird. Der N-terminale Bereich des Rieske-Proteins hat vor der Membranverankerung die Funktion des Thylakoidtransportsignals. Somit ist die Transportinformation Teil des reifen Proteins, eine weitere Besonderheit für dieses $\Delta pH/Tat$ -Substrat.

Eine Auflistung der bereits analysierten $\Delta pH/Tat$ -Substrate zeigt für acht der neun Proteine die charakteristischen Merkmale $\Delta pH/Tat$ -spezifischer Signale: das Zwillingarginin-Motiv (RR) vor einer hydrophoben Domäne von 12-18 Aminosäuren sowie positive Ladungen in der C-Region, die mit einem Ala-x-Ala-Motiv abschließt (Abb. 1-2).

	N-Region	H-Region	C-Region
16 kDaVPESS	RR SVIGLVAAAGLA	GGSFV <u>KAVFA</u>
23 kDa	...LSKPVQIIICKAQQSHEDDNSAVS	RR LALTLVGA AAV	GSKVSPADA
PPO*VINNNGNQDETNSVD	RRN VLLGLGGLYGVANAI	PLAASA
PsbTASTSDNTPSLEVEQSSSTM	RRD LMFTAAAAAVCSL	AKVAMA
PsaNIKAQRVVGDDVDGSNG	RR SAMVFLAATLFSTAAV	SASANA
Hcf136LSFS	RRE LLYQSAAVSLSLSSIV	GPARA
P16LLWK	RRE LSLGFMSSSLVAIGLVS	NDRRRHDANA
Pftf**ASLQRPDEG	RRGFLK LLLGNVGLGVPALLG	DGKAYA
RieskeASSIPADRVPMDE	KRK TLNLLLLGALSLPTGYMLVPYATFFV	PPGTGG...

Abb. 1-2 Auflistung der Signalpeptide bislang analysierter plastidärer $\Delta pH/Tat$ -Substrate. Dargestellt sind die Sequenzen der entsprechenden *Arabidopsis*-Proteine, mit Ausnahme der PPO-Sequenz aus Tomate (*) und der *Pftf*-Sequenz aus Tabak (**). Charakterische Merkmale $\Delta pH/Tat$ -spezifischer Signale sind hervorgehoben: das Zwillingarginin-Motiv ist rot, die H-Region ist blau, die positiven Ladungen der C-Region sind grün dargestellt. Das Ala-x-Ala Motiv ist unterstrichen.

Nur das Signal des Rieske-Proteins fällt durch Abweichungen in mehreren Merkmalen auf. So zeigt es statt des Zwillingarginins eine KR-Sequenz, die hydrophobe Domäne ist mit 26 Resten entschieden länger als durchschnittliche H-Regionen, die C-Region läßt weder positive Ladungen (*Sec-avoidance motif*) noch ein Ala-x-Ala-Motiv als Prozessierungsstelle erkennen (Abb. 1-2). Obwohl sich das Thylakoidtransportsignal des Rieske-Proteins so stark von typischen $\Delta pH/Tat$ -Signalen abhebt, besitzt es doch für fremde Passagierproteine die volle Funktionalität als thylakoiddirigierendes Transportsignal (Madueno et al, 1994; Molik, 2000). Neben diesen strukturellen Besonderheiten wurde für das plastidäre Rieske-Protein auch ein ungewöhnliches Transportverhalten innerhalb isolierter Organellen beobachtet (Molik et al., 2001). Statt einer vollständigen Lokalisation des importierten Proteins in der Thylakoidmembran, dem

endgültigen Wirkort, zeigt der überwiegende Teil eine zeitweilige Akkumulation im Stroma. Nur *Hcf136* als weiteres plastidäres Δ pH/Tat-Substrat verhält sich ähnlich (Hynds et al., 2000).

Im Gegensatz zu allen bislang analysierten Δ pH/Tat-Substraten des Chloroplasten zeichnet sich das Rieske-Protein durch die Anwesenheit eines Cofaktors, ein [2Fe-2S]-Zentrum, aus. Die Fähigkeit der Δ pH/Tat-Translokase zum Transport gefalteter Proteine würde für solche Substrate von Bedeutung sein, die im Stroma die Insertion eines Cofaktors bzw. ihre Faltung erfahren. Im Gegensatz zum bakteriellen Tat-Weg, wo die Faltung bzw. die Cofaktorinsertion eine Voraussetzung für den Transport über die Plasmamembran zu sein scheint (Palmer & Berks 2003; DeLisa et al., 2003; Jack et al., 2004), ist noch offen, ob das plastidäre Pendant die gleiche Anforderung an die Substrate stellt (Hynds et al., 1998). Durch die Bindung eines Cofaktors bietet das Rieske Fe/S-Protein somit eine gute Möglichkeit, mehr Informationen über die Voraussetzung plastidärer Δ pH/Tat-Substrate zu gewinnen.

So wurde der Rahmen dieser Arbeit durch die Analyse des Transportverhaltens des plastidären Rieske Fe/S-Proteins gespannt. Ausgehend von der *in organello* beobachteten Retardierung des Proteins im Stroma (Molik et al., 2001) sollten die dafür verantwortlichen Faktoren bzw. Prozesse identifiziert werden, um so ein detailliertes Bild vom Geschehen zwischen Chloroplastenhülle und Thylakoidmembran zu bekommen. Als möglicher „transportvorbereitender“ Prozeß lag der Schwerpunkt auf der Analyse der Fe/S-Cluster-Assemblierung. Obwohl zu Beginn der Arbeit Informationen zur Biogenese von Fe/S-Zentren in Bakterien und Mitochondrien reichlich vorhanden waren (Jacobson et al., 1989 a; Zheng et al., 1998; Lill & Kispal, 2000; Mühlhoff & Lill, 2000; Seidler et al., 2001), fehlten sie komplett für das plastidäre System. So sollten zu den bereits bekannten Komponenten aus Bakterien und Mitochondrien homologe Proteine mit Plastidenlokalisierung, codiert im *Arabidopsis*-Genom, identifiziert und auf eine funktionelle Verbindung zum Rieske-Protein hin überprüft werden. Um neben den Kandidaten der plastidären Fe/S-Cluster-Assemblierung die Suche nach Rieske-Interaktionspartnern zu erweitern, wurde Co-Immunpräzipitation mit Hilfe von Antikörpern gegen potentielle Interaktionspartner durchgeführt. Außerdem sollten durch die Expression einer stromaakkumulierenden Rieske-Variante in *Arabidopsis thaliana* und deren Reinigung weitere Bindungspartner identifiziert werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien in p.a. Qualität wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biomol (Hamburg), Difco-Laboratories (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem Niederlande), ICN Biochemicals GmbH (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München). Die verwendeten Radiochemikalien kamen von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg).

2.1.2 Enzyme

Von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt am Main) und Roche Diagnostics (Mannheim) wurden die Restriktionsendonukleasen bezogen. Außerdem wurden folgende Enzyme von der entsprechenden Firma verwendet:

Alkalische Phosphatase (<i>shrimp</i>)	United States Biochemical
AmpliTaq Gold [®] DNA-Polymerase	Applied Biosystems (Roche Diagnostics)
ProteinaseK	Sigma-Aldrich
Reverse Transkriptase (M-MLV)	Promega
T3 RNA-Polymerase	Stratagene
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics, MBI Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Thermolysin	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich

2.1.3 Reaktionskits

DNA Sequencing Kit (ABI Prism <i>dRhodamine</i>)	Applied Biosystems
<i>Flexi[®] Rabbit Retikuloocyte Lysate System</i>	Promega
<i>Nucleobond[®] AX</i>	Macherey & Nagel
<i>NucleoSpin[®] Extract</i>	Macherey & Nagel
<i>NucleoSpin[®] Plasmid</i>	Macherey & Nagel
<i>Quick-Change[®] Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene

2.1.4 Längenstandards/Marker

DNA Längenstandard:	1kb Leiter	Gibco BRL
Protein Größenmarker:	SDS-7L	Sigma-Aldrich
	SDS-6H	Sigma-Aldrich
	<i>Rainbow[®]</i> -Marker	Amersham Biosciences
	HMW (<i>high molecular weight</i>)-Marker	Amersham Biosciences

2.1.8 Bakterienstämme und Vektoren

Bakterienstämme:

Escherichia coli K12 DH5 α : F⁻ ϕ 80d Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺) deoR thi-1 supE44 λ - gyrA96 relA1 (Hanahan, 1983)

GM2163: F⁻ ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lAtY1 tsx-78 galK2 galT22 glnV44 hisG4 1 rpdL136 (Str^r) xyl-5 dam13::Tn9 (Camr) dcm-6 mcrB1 hsdR2(r_k⁻m_k⁺) mcrA (New England Biolabs)

Agrobacterium tumefaciens

GV3101 (pMP90, pSoup) C58C1 Rif^r Gm^r Tc^r Koncz & Schell, 1986
Hellens et al., 2000

Vektoren: pBluescript KS- Ap^r Stratagene
pBAT Ap^r Annweiler et al., 1991
pGEM Teasy Ap^r Promega
pUC57 Ap^r MBI Fermentas

Pflanzenvektoren: pGreenII 0129 Kn^r, Hyg^r Hellens et al., 2000
pPE1000 Ap^r Hancock et al., 1997
pRT100 Ap^r Töpfer et al., 1987

2.1.9 cDNA-Klone

Die in Tab. 2-1 aufgelisteten Klone wurden zwar im Rahmen dieser Arbeit verwendet, sind aber bereits in früheren Arbeiten des Labors beschrieben worden und standen somit zu Verfügung. Falls noch nicht geschehen, wurden sie in den pBAT-Vektor umklontiert. Alle Konstrukte haben somit eine T3->T7 Orientierung und können mit *NotI* für die *in vitro*-Transkription linearisiert werden. Die Abb. 2-1 soll die Anteile des Rieske-Proteins an den verschiedenen Chimären und ihre Nomenklatur verdeutlichen.

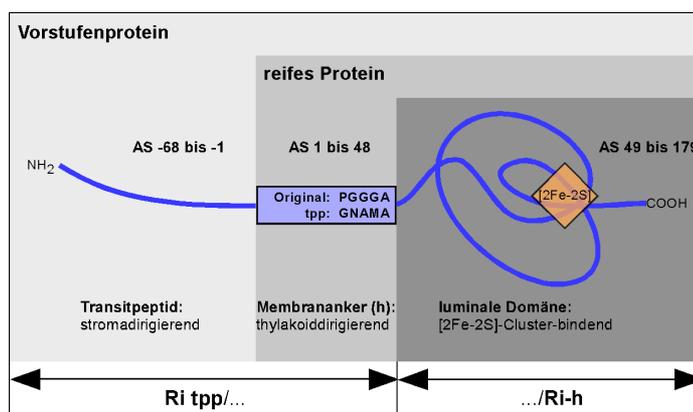


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des Rieske Fe/S-Proteins (*Spinacia oleracea*). Der Umfang des Transitpeptids, des Membranankers und der luminalen Domäne (AS, Aminosäuren) sowie die Zusammensetzung bzw. Bezeichnung der chimären Proteine ist abgebildet. Die Sequenz der generierten TPP-Schnittstelle aus Plastocyanin (tpp) bzw. die entsprechende Originalsequenz des Rieske-Proteins ist angegeben.

Tab. 2-1 Zusammenstellung der zur Verfügung stehenden cDNA-Klone.

Nr.	cDNA-Klon Bezeichnung (en)	Erläuterung	beschrieben in
1	SoRi, Ri/Ri, Ri-KR, Ri	plastidäres Rieske-Vorstufenprotein aus Spinat, bestehend aus: TP - Membrananker - luminaler Domäne; Abb. 2-1	Steppuhn et al., 1987
2	Ri tpp	1 mit generierter TPP-Schnittstelle (GNAMA, aus Plastocyanin) als Abschluß der Membranankerregion, Abb. 2-1	Weidlich, 1998
3	Ri-KK	1 mit KR zu KK Modifikation	Weidlich, 1998
4	Ri tpp/23	luminale Domäne aus 2 durch reifes 23 kDa-Protein ersetzt	Molik, 2000
5	23 kDa, 23/23	23 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates des PSII (Spinat)	Clausmeyer, 1992
6	Ri_I124S	1 mit AS-Austausch Ile124 zu Ser (Negativkontrolle)	Karnauchov, 1998
7	Ri_C125S	1 mit AS-Austausch Cys125 zu Ser (Ligand)	Karnauchov, 1998
8	Ri_C127S	1 mit AS-Austausch Cys127 zu Ser (Disulfidbrücke)	Karnauchov, 1998
9	Ri_H128Q	1 mit AS-Austausch His128 zu Gln (Ligand)	Karnauchov, 1998*
10	16/Ri-h	TP des 16 kDa-Proteins in Verbindung mit der luminlen Domäne aus 1	Molik, 2000
11	23/Ri-h	TP des 23 kDa-Proteins in Verbindung mit der luminlen Domäne aus 1	Molik, 2000
12	33/Ri-h	TP des 33 kDa-Proteins in Verbindung mit der luminlen Domäne aus 1	Molik, 2000
13	PC/Ri-h	TP des Plastocyanins in Verbindung mit der luminlen Domäne aus 1	Molik, 2000

Mit (*) gekennzeichnete Klon wurde im Rahmen dieser Arbeit neu erstellt. Alle cDNA-Klone befinden sich im pBAT-Vektor mit der Orientierung T3 -> T7 und können mit *NotI* für die *in vitro*-Transkription linearisiert werden. TP, Transitpeptid.

2.1.10 Antikörper

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tab. 2-2 zusammengefaßt.

Tab. 2-2 Zusammenstellung der verwendeten Antikörper.

verwendeter Antikörper	zu detektierendes Antigen	gerichtet gegen	Charge	Verdünnung	Beschreibung bzw. Bezug
α Ri	plastidäres Rieske- Protein	plastidäres Rieske-Protein, Spinat	07.10.96	1:2000	Berghöfer, 1998
α 33	33 kDa-Protein	33 kDa-Protein, Spinat	16.11.95	1:1000	Berghöfer, 1998
α CFoII	CFoII	CFoII, Spinat	23.07.97	1:2000	Berghöfer, 1998
α SecA	cpSecA	cpSecA, Spinat	02.11.95	1:1000	Berghöfer, 1998
α SecY	cpSecY	cpSecY	20.02.96	1:2000	C. Robinson
α RuA	Rubisco-Aktivase	RuA	-	1 :10 000	A. R. Portis
α Ffh	cpSRP54	Ffh (P48), <i>E. coli</i>	-	1:2000	?
α Hsp60	Cpn60	mtHsp60, <i>S. cerevisiae</i>	-	1:2000	T. Langer
α Hsp70	cpHsp70	SSC (Hsp70), <i>S. cerevisiae</i>	-	1:2000	T. Langer
α HA*	HA-Peptid	HA-Peptid	-	1:1000	Roche Diagnostics

Mit (*) gekennzeichnete Antikörper wurde in Ratte erzeugt. Alle anderen Antikörper stammen aus Kaninchen und wurden als Serum verwendet.

Als sekundäre Antikörper kamen mit angegebener Verdünnung zum Einsatz:

<i>Anti-Rabbit-IgG</i> Peroxidase-Konjugat	1:30 000	Sigma-Aldrich
<i>Anti-Rat-IgG</i> Peroxidase-Konjugat	1:1000	Sigma-Aldrich

2.1.11 Säulenmaterial und Membranen

Säulenmaterial:	<i>Anti-HA Affinity Matrix</i> ProteinA-Sepharose	Roche Diagnostics Amersham Biosciences
PVDF-Membran:	<i>Immobilon-P Transfer Membrane</i> (Porengröße 0,45 µM)	Millipore

2.1.12 Pflanzenmaterial

Der verwendete Spinat (*Spinacia oleracea* L., Sorte „Lina“) wurde als hydroponische Kultur in Nährlösung angezogen. Die Lösung wurde mittels Aquariumpumpen ständig belüftet. Die Anzucht erfolgte in Klimakammern unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei 20 bis 25 °C. Geerntet wurden 3-4 Monate alte Pflanzen.

Nährlösung:	6 mM KNO ₃ 4 mM Ca(NO ₃) ₂ 2 mM MgSO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ 0,04 mM Fe-EDTA Spuren	Spuren: 46 µM H ₃ BO ₃ 9 µM MnCl ₂ x 4 H ₂ O 0,77 µM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 0,32 µM CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,12 µM Na ₂ MoO ₄
-------------	--	---

Die Erbsen-Keimlinge (*Pisum sativum* L., Var. „*Feltham First*“) wurden 7-10 Tage nach der Aussaat in Erde und Anzucht unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) geerntet. Die Blätter der jungen Pflanzen waren dabei größtenteils noch geschlossen.

Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH. Ökotyp Columbia (col 5-13) wurde in Erde unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) kultiviert. Die Blüten- und Samenbildung erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit).

2.2 Methoden

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt:

Ligation, Plasmidtransformation in *E. coli*, Isolation von Plasmid-DNA nach Birnboim & Doly (1979), DNA-Restriktion, Agarosegelelektrophorese, Plasmidpräparationen, DNA-Extraktionen und DNA-Sequenzierungen wurden nach den Angaben des Herstellers des jeweiligen Kits durchgeführt.

Molekularbiologische Methoden

2.2.1 In vitro-Synthese von Proteinen

in vitro-Transkription

Die zur *in vitro*-Transkription eingesetzte Plasmid-DNA wurde mit dem *Nucleobond*[®] *AX Kit* (Macherey & Nagel) aus *E. coli* isoliert. Um eine effiziente RNA-Synthese zu erreichen, wurden die Plasmide hinter der inserierten cDNA mittels Restriktionsenzym linearisiert. Alle hier verwendeten Konstrukte befanden sich in der T3 -> T7 Orientierung im pBAT-Vektor und wurden mit *NotI* linearisiert (Tab. 2-1).

<i>in vitro</i> -Transkriptionsansatz:	2,0 µl	linearisierte DNA (1mg/ml)	
	3,3 µl	H ₂ O (DEPC-behandelt)	
	5,0 µl	5 x T3-Puffer	
	5,0 µl	Ribonukleotide (2,5 mM ATP, CTP, UTP; 0,25 mM GTP)	
	7,5 µl	100 mM DTT	
	1,2 µl	10 mM CAP-Strukturanalogon	(New England Biolabs)
	0,5 µl	RNase-Inhibitor 50 U/µl	(MBI Fermentas)
	0,5 µl	T3 RNA-Polymerase 50 U/µl	(Stratagene)
Gesamtvol.	<u>25 µl</u>		

Ansatz 30 min bei 37 °C inkubieren

1,0 µl 11,25 mM GTP zugeben

Ansatz weitere 30 min bei 37 °C inkubieren

Das Volumen der Ansätze wurde mit Wasser (DEPC-behandelt) auf 100 µl erhöht; 4 µl davon wurden auf einem nicht-denaurierenden 1,4%igen Agarosegel (5 mM Na-Acetat pH 7,0, 20 mM MOPS, 1 mM EDTA) bei 50 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA des restlichen Transkriptionsansatzes wurde durch Zugabe von 5 µl 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. Ethanol bei -20 °C ausgefällt und gelagert.

in vitro-Translation

5 µl der gefällten RNA wurden 30 min bei 21 000 g (15 300 UpM, Sigma 3K12; Rotor: 12154-H) und 4 °C pelletiert. Das trockene Pellet wurde mit 12,5 µl des Translationsansatzes versetzt und 90 min bei 30 °C inkubiert. Die Ansätze konnten dann bei -80 °C gelagert werden.

<i>in vitro</i> -Translationsansatz:	4,35 µl	H ₂ O (DEPC-behandelt)	
	6,25 µl	Retikulocytenlysat (Promega)	
	0,90 µl	1 M KCl	
	0,25 µl	100 mM DTT	
	0,25 µl	100 mM Aminosäuremix (minus Met bzw. Cys)	
	0,50 µl	[³⁵ S]-Methionin (oder [³⁵ S]-Cystein)	
Gesamtvol.	<u>12,5 µl</u>		

2.2.2 Mutagenese der TPP-Schnittstelle in den Konstrukten 16/Ri-h und 33/Ri-h

Die TPP-Schnittstelle der chimären Konstrukte 16/Ri-h und 33/Ri-h wurde durch gezielten Basenaustausch auf DNA-Ebene in die PGGGA-Sequenz des Rieske-Membranankers überführt:

	Ala - x - Ala												
										↓ TPP			
• 16/Ri-h										Gly	Thr	Gly	Gly
Protein (orig.):	Gly	Ser	Phe	Val	Lys	Ala	Val	Leu	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly
DNA (orig.):	GGT	TCG	TTT	GTT	AAG	GCT	GTT	CTT	GCC	GGC	ACT	GGT	GGA
DNA (mutag.):	GGT	TCG	TTT	GTT	<u>CCG</u>	<u>GGT</u>	<u>GGT</u>	<u>GGT</u>	GCC	GGC	ACT	GGT	GG
Protein (mutag.):	Gly	Ser	Phe	Val	<u>Pro</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly
• 33/Ri-h										Gly	Thr	Gly	Gly
Protein (orig.):	Ala	Leu	Ile	Ala	Ser	Gly	Ala	Asn	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly
DNA (orig.):	GCT	CTT	ATC	GCC	TCG	GGG	GCA	AAT	GCC	GGC	ACT	GGT	GGA
DNA (mutag.):	GCT	CTT	ATC	GCC	<u>CCG</u>	<u>GGG</u>	<u>GGA</u>	<u>GGT</u>	GCC	GGC	ACT	GG	
Protein (mutag.):	Ala	Leu	Ile	Ala	<u>Pro</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	<u>Gly</u>	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly

Mutagenese mit dem *Quick-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit* (STRATAGENE)

Die zu modifizierende Plasmid-DNA wurde mit den veränderten Primern (16-tpp bzw. 33-tpp, Kapitel 2.1.7) in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die PCR-Produkte konnten anschließend mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, das nur methylierte bzw. hemimethylierte DNA schneidet, inkubiert werden. So erfolgte der Abbau der original DNA und übrig blieben Plasmide mit der gewünschten Modifikation. Diese konnten durch Elektroporation in *E. coli*-Zellen eingebracht werden. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit Ampicillin. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung der Plasmid-DNA überprüft.

PCR-Ansatz:	40 µl H ₂ O	PCR-Programm:	
	5 µl 10xPuffer	(1) 95 °C 30 sek	
	1 µl dNTP-Mix	(2) 95 °C 30 sek	<i>Denaturierung</i>
	1 µl 3'16-tpp bzw. 33-tpp (125 ng)	(3) 55 °C 1 min	<i>Annealing</i>
	1 µl 5'16-tpp bzw. 33-tpp (125 ng)	(4) 68 °C 4 min	<i>Elongation</i>
	1 µl Plasmid-DNA (25 ng)		
	1 µl <i>PfuTurbo</i> [®]	(5) zurück zu (2); 18 Zyklen	
	DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	(6) 68 °C 12 min	
	<u>51 µl Gesamtvol.</u>	(7) 4 °C ~	

2.2.3 Klonierung der AtNFU2-cDNA

Präparation von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis*-Pflanzengewebe

Extraktionspuffer: 100 mM Na-Acetat pH 5,0
 1 mM Na-EDTA
 4 % (w/v) SDS

8 M LiCl mit 0,2 % (v/v) DEPC behandelt

Die Isolierung der RNA aus *Arabidopsis*-Pflanzengewebe wurde nach Eggermont et al. (1996) durchgeführt. Das gefrorene Pflanzenmaterial wurde im vorgekühlten Mörser (flüssiger N₂) möglichst fein zerkleinert und mit 2 ml eines 1:1 Gemisches aus Extraktionspuffer und saurem Phenol/Cl versetzt. Wenn möglich, wurde die Probe weiter zerkleinert. Die aufgetaute Probe konnte in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 12 000 UpM und 4 °C zentrifugiert werden (Sigma 3K12; Rotor: 12154-H). Der wässrige Überstand wurde abgenommen, weitere 2 x phenolisiert (je 1 Vol. saures Phenol), jeweils 5 min geschüttelt und zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit 1 Vol. Chloroform versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die RNA durch Zugabe eines ½ Vol. 8 M LiCl und einer Inkubation von mindestens 1 h bei -20 °C ausgefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation 10 min bei 12 000 UpM pelletiert, 2 x mit 70%igem Ethanol (mit DEPC-behandeltem Wasser) gewaschen und in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde durch die Absorption bei 260 nm bestimmt (OD₁ = 40 µg/ml). Die RNA wurde nun zur Erststrangsynthese eingesetzt.

Erststrangsynthese/Reverse Transkription

Reverse Transkription: 1,5 µg RNA
 2 µl oligo dT (100 µg/ml)
 H₂O ad 10 µl

- 5 min bei 70 °C -> Denaturierung
- auf Eis abkühlen und folgendes zugeben

 5 µl 5 x Reverse-Transkriptase-Puffer
 5 µl dNTPs (4 x 2,5 mM)
 1 µl Reverse Transkriptase, 200 U/µl (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV RT*, PROMEGA)
 H₂O ad 25 µl

- Ansatz 1 h bei 37 °C inkubieren -> cDNA-Synthese

Die cDNA konnte nun in eine PCR Reaktion mit spezifischen Primern (3'Nfu2, 5'Nfu2; Kapitel 2.1.7), die zur Amplifikation des gewünschten Stückes führen sollten, eingesetzt werden.

<u>PCR-Ansatz:</u>	<u>PCR-Programm:</u>
1 µl des Ansatzes „Reverse Transkription“	(1) 95 °C 5 min
4 µl dNTPs (4 x 1,25 mM)	(2) 95 °C 45 sek
2,5 µl 10 x Polymeras-Puffer	(3) 56 °C 45 sek
1,5 µl MgCl ₂ (25 mM)	(4) 72 °C 1 min
1 µl Primer I 3`Nfu2 (20 µM)	(5) zurück zu (2); 29 Zyklen
1 µl Primer II 5`Nfu2 (20 µM)	(6) 72 °C 5 min
0,25 µl DNA-Polymerase 5 U/µl (<i>AmpliTaq Gold</i> ®)	(7) 4 °C ~
H ₂ O <i>ad</i> <u>25 µl</u>	

Aufgrund schwacher Amplifikation in der ersten PCR wurde ein zweite PCR mit den Produkten der ersten Runde als *template* (1µl des PCR-Ansatzes) durchgeführt. Das ca. 800 bp-Fragment konnte nun über ein präparatives Agarosegel gereinigt und in den *pGEM Teasy*-Vektor (PROMEGA) ligiert werden. Nach Transformation, Selektion und Kultivierung der *E. coli*-Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert (*NucleoSpin*® *Plasmid*, Macherey & Nagel) und sequenziert (*DNA Sequencing Kit*, Applied Biosystems). Die korrekte AtNfu2-cDNA wurde in den pBAT-Vektor überführt und stand nun für die *in vitro* Transkription/Translation zur Verfügung.

Weitere, hier verwendete cDNA-Klone waren als Voll-Längen Version erhältlich (RIKEN, *DNA stock center*; Tab.3-2).

2.2.4 Erstellung der Rieske-Konstrukte zur Expression in *Arabidopsis thaliana*

Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Abb. 2-2 A zusammenfassend dargestellt. Im ersten Schritt wurde auf Basis der Rieske-cDNA (KR bzw. KK Version) eine PCR mit modifizierten Primern (Kapitel 2.1.7), die die Generation der benötigten Restriktionsschnittstellen ergaben, durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in den *pGEM Teasy*-Vektor integriert. Nach Amplifikation des Vektors wurde die Rieske-cDNA mit den in Schritt 2 (Abb. 2-2 A) angegebenen Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den Pflanzenvektor pPE1000 eingefügt, so daß der dort vorhandene Hämagglutinin (HA)-Peptid-codierende Bereich Leserahmen-korrekt an das 3'-Ende der cDNA angefügt wurde. Ebenfalls konnte die Terminatorsequenz der Nopalinsynthese (Nos 3') für die weitere Klonierung genutzt werden. Um das Konstrukt mit dem lichtregulierten Promotor des *psaD2*-Gens zu kombinieren, wurde es in Schritt 3, wie in Abb. 2-2 A angegeben, ausgeschnitten und mit dem im pUC57-Vektor befindlichen PsaD2-Promotor verbunden. In Schritt 4 wurde das komplette Konstrukt (Promotor - Leserahmen für das Rieske-Protein [KK bzw. KR] - HA-Peptid - Terminator) über die *KpnI*-Schnittstelle aus dem pUC57 in den pGreenII 0129-Vektor integriert (Abb. 2-2 A und B). Eine Schematische Karte dieses Vektors ist in Abb.

2-2 B dargestellt. Er trägt als Pflanzenselektionsmarker das Gen für die Hygromycinresistenz. Bei der Amplifikation in *A. tumefaciens* bzw. *E. coli* wird die Kanamycinresistenz als Selektionsmarker genutzt (nptI).

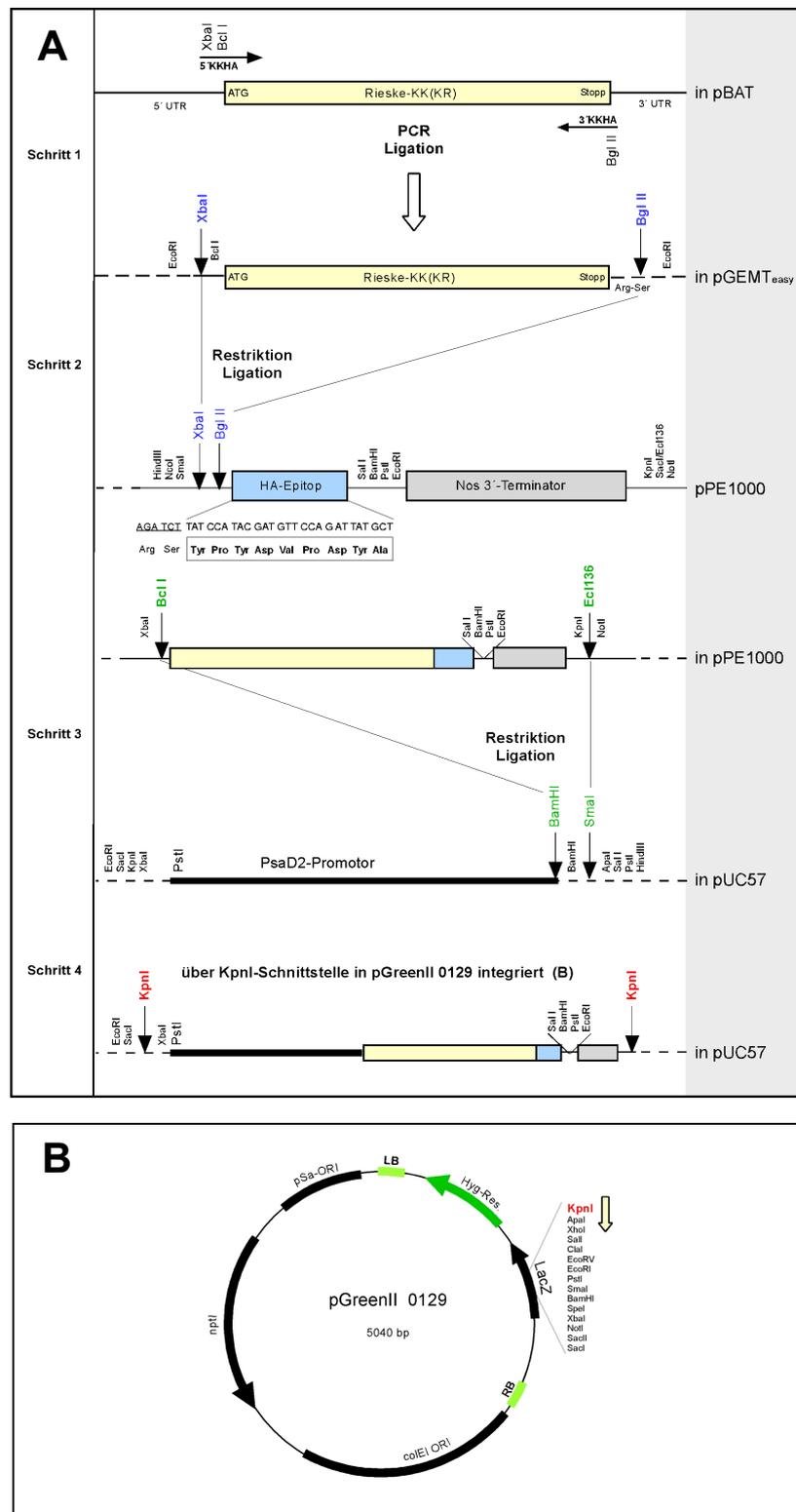


Abb. 2-2 Klonierungsstrategie zur Erstellung des Rieske-KK(KR)_{HA}-Konstruktes zur Expression in *A. thaliana* (A) und die Integration in den T-DNA Vektor pGreenII 0129 (Hellens et al., 2000; B). Der Pfeil in Teil (B) gibt die Orientierung des cDNA-Konstruktes an. Weitere Einzelheiten im Text.

Biochemische Methoden

2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde basierend auf der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei kamen 10-17,5%ige Gradientengele (Tab. 2-3) bzw. Mini-Gele (Tab. 2-4, Hoefer-Gelsystem, AMERSHAM) unterschiedlicher Acrylamidkonzentrationen zum Einsatz.

30 % Acrylamidlösung:	29,2 % (w/v) 0,8 % (w/v)	Acrylamid Methylenbisacrylamid
4x Laemmli-Probenpuffer:	0,25 M 8 % (w/v) 40 % (w/v) 20 % (w/v) 0,02 % (w/v)	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glycerin β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
10 x Laufpuffer:	250 mM 1,95 M 1 %	Tris Glycin SDS

Tab. 2-3 Pipettierschema für ein 10-17,5%iges Gradientengel der Größe 350 x 270 x 1 mm (Maxi-Gel).

	Trenngel 10 %	Trenngel 17,5 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O	15,4 ml	-	7,0 ml
30 % Acrylamid	14,3 ml	23,3 ml	1,7 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,2 ml
80 % Saccharose	2,4 ml	8,8 ml	-
10 % SDS	400 μ l	400 μ l	100 μ l
10 % APS	160 μ l	160 μ l	80 μ l
TEMED	16 μ l	16 μ l	8 μ l
Gesamtvolumen (ca.)	<u>40 ml</u>	<u>40 ml</u>	<u>10 ml</u>

Tab. 2-4 Pipettierschema für je 4 Mini-Gele (Hoefer-System) unterschiedlicher Acrylamidkonzentration.

	12 %	15 %	17 %	Sammelgel 5 %
H ₂ O	12 ml	9 ml	7 ml	7,0 ml
30 % Acrylamid	12 ml	15 ml	17 ml	1,7 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	5,5 ml	5,5 ml	5,5 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	1,2 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,3 ml	100 µl
10 % APS	180 µl	180 µl	180 µl	80 µl
TEMED	18 µl	18 µl	18 µl	8 µl
Gesamtvolumen (ca.)	<u>30 ml</u>	<u>30 ml</u>	<u>30 ml</u>	<u>10 ml</u>

2.2.6 Färbung von Proteinen

Coomassiefärbung

Färbelösung:	45,4 % (v/v) Methanol	Entfärber I:	20 % (v/v) Methanol
	9,2 % (v/v) Essigsäure		7 % (v/v) Essigsäure
	0,25 % (w/v) Coomassie G-250		
		Entfärber II:	50 % (v/v) Methanol
			10 % (v/v) Essigsäure

Die Färbung der Gele erfolgte mind. 30 min bei 50 °C. Anschließend wurden sie mit Entfärber I bei 50 °C so lange entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren (ca. 1 h). Für weitere 30 min erfolgte die Inkubation der Gele im Entfärber II bei RT. Anschließend wurden sie 2 h bei 80 °C im Vakuum getrocknet und schließlich auf Phosphorimagerplatten (FUJIFILM) exponiert. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte mit Hilfe des Phosphorfluoroimagers Fujifilm FLA-3000 und dem Programm AIDA (*advanced image data analyzer*, RAYTEST/FUJIFILM).

Silber-Färbung

Die Lösungen für die Silberfärbung wurden in Glasgefäßen mit bidestilliertem Wasser angesetzt. Um eine Verunreinigung der Gele zu vermeiden, wurden Handschuhe getragen. 100 ml Lösung ist für die Behandlung eines Gels der Fläche 20 x 20 cm ausreichend.

		<i>Einzelsschritte:</i>
1) Fixierlösung:	50 ml Methanol 12 ml Essigsäure 50 µl 37 % Formaldehyd H ₂ O <i>ad</i> <u>100 ml</u>	Gel mind. 1 h in Lösung 1 schütteln 3 x 20 min in Lösung 2 Waschen
2) Ethanol-Waschlösung:	50 % Ethanol	genau 1 min in Lösung 3 inkubieren
3) Thiosulfat-Lösung:	0,2 g/l Na ₂ S ₂ O ₃	3 x 20 sek mit bidest. H ₂ O waschen
4) Silbernitrat-Lösung:	0,2 g AgNO ₃ 75 µl 37 % Formaldehyd H ₂ O <i>ad</i> <u>100 ml</u>	20 min in Lösung 4 inkubieren
5) Entwickler-Lösung:	6 g Na ₂ CO ₃ 50 µl 37 % Formaldehyd 2 ml Thiosulfat-Lösung (0,2 g/l) H ₂ O <i>ad</i> <u>100 ml</u>	3 x 20 sek mit bidest. H ₂ O waschen mit Lösung 5 bis zur gewünschten Signalstärke entwickeln
6) Stopper-Lösung:	50 % Methanol 12 % Essigsäure	Entwicklung mit Lösung 6 abstoppen (10 min)
7) Lagern/Trocknen:	40 % Methanol 10 % Essigsäure 4 % Glycerin	Lagerung bis zur Trocknung erfolgt in Lösung 7 (mind. 20 min)
8) Folien-Lösung:	35 % Ethanol 2 % Glycerol	zum Trocknen benötigte Folien (Cellophan, BÜROPA-GMBH) werden in Lösung 8 eingeweicht

2.2.7 Native Auftrennung von Membranproteinkomplexen: *Blue native*-PAGE

Zur Analyse vom Membranproteinkomplexen wurde die *Blue native*-Technik genutzt (Schägger und Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994; Karnachov, 1998). Dazu wurden die Thylakoidmembranen mit dem milden Detergens Digitonin solubilisiert und die so gewonnenen Proteinkomplexe konnten auf einem *Blue native*-Gel aufgetrennt werden.

Die Solubilisierung der Thylakoide (30 µg Chlorophyll entsprechend) erfolgte nach Zugabe von 15 µl Lysepuffer (Tab. 2-5) und 7,5 µl 5 % Digitonin (frisch angesetzt und bei 98 °C gelöst) 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad (Rotator, SAUR). Nicht-solubilisierte Membranen wurden durch Zentrifugation, 1 h bei 40 000 g und 4 °C, pelletiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und mit 1,5 µl 5 % Coomassie G-250 (gelöst in 500 mM ε-Aminocaprinsäure) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben nochmals bei 40 000 g 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde mittels 5-13%igen *Blue native*-Gradientengel (Tab. 2-6) aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte entweder über Nacht bei 120 V oder für 4 Stunden bei 500 V (max. 15 mA) mit einer Einlaufphase von 45 min bei 80 V. Nach dem Lauf konnten die Gele entweder ca. 30 min

fixiert (50 % Methanol, 12 % Essigsäure), anschließend 2 Stunden bei 80 °C getrocknet und auf Phosphorimagerplatten exponiert werden oder es erfolgte eine Auftrennung in der zweiten Dimension (2D-Analyse; Kapitel 2.2.9).

Tab. 2-5 Zusammensetzung des Lysepuffers zur Solubilisierung von Membranproteinkomplexen als Vorbereitung zur BN-PAGE.

	Volumen	Endkonzentration
2 M ϵ -Aminocaprinsäure	250 μ l	1 M
0,5 M Bis-Tris, pH 7,0	50 μ l	50 mM
0,5 M EDTA, pH 8,0	5 μ l	5 mM
0,1 M DTT	5 μ l	1 mM
0,1 M PMSF (in Isopropanol)	5 μ l	1 mM
0,1 M $MgCl_2$	2,5 μ l	0,5 mM
H ₂ O	182,5 μ l	-
Gesamtvolumen	<u>500 μl</u>	

Tab. 2-6 Pipettierschema für ein 5-13%iges *Blue native*-Gradientengel der Größe 200 x 200 x 1 mm.

	Trenngel 5 %	Trenngel 13 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O	6,6 ml	1,6 ml	5,0 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	6,9 ml	1,3 ml
2 M ϵ -Aminocaprinsäure	4,0 ml	4,0 ml	2,5 ml
0,5 M Bistris pH 7,0	1,6 ml	1,6 ml	1,0 ml
Glycerin	1,0 ml	1,7 ml	-
5 % Digitonin	100 μ l	100 μ l	60 μ l
10 % APS	70 μ l	70 μ l	90 μ l
TEMED	7 μ l	7 μ l	9 μ l
Gesamtvolumen	<u>16 ml</u>	<u>16 ml</u>	<u>10 ml</u>

Laufpuffer: Kathode (-) 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris (ergibt pH 7,0)
0,0075 % Coomassie G-250 (37,5 mg/500 ml)

Anode (+) 50 mM Bis-Tris pH 7,0

2.2.8 Auftrennung löslicher Proteinkomplexe des Stromas

Colorless native (CN)-PAGE

Durch folgende Änderungen läßt sich aus der *Blue native*-PAGE die *Colorless native*-PAGE zur Trennung löslicher Proteinkomplexe ableiten (Schägger et al., 1994): (i) in den CN-Gelen wird auf die Zugabe von Digitonin verzichtet, ansonsten entspricht die Zusammensetzung den Angaben in Tab. 2-6. (ii) Der Kathoden-Laufpuffer der BN-PAGE wird hier ohne Coomassie-G250-Farbstoff verwendet. (iii) Der Probenpuffer setzt sich wie folgt zusammen:

5 x CN-Probenpuffer:	250 mM	Bis-Tris pH 7,0
	50 %	Glycerin
	0,004 %	Ponceau S

Tris-Glycin (TG)-PAGE

Die native Tris-Glycin-PAGE basiert auf dem System der SDS-PAGE von Laemmli (1970; Kapitel 2.2.5). Gele, Proben- und Laufpuffer enthalten jedoch kein SDS. Die Zusammensetzung eines nativen Tris-Glycin-Gradientengels ist in Tab. 2-7 aufgelistet.

Tab. 2-7 Pipettierschema für ein natives 5-13%iges Tris-Glycin-Gradientengel der Größe 200 x 200 x 1 mm.

	Trenngel 5 %	Trenngel 13 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O	9,2 ml	4,3 ml	7,6 ml
30 % Acrylamid	2,7 ml	6,9 ml	1,3 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	3,0 ml	3,0 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,0 ml
Glycerin	1,0 ml	1,7 ml	-
10 % APS	70 µl	70 µl	90 µl
TEMED	7 µl	7 µl	9 µl
Gesamtvolumen	<u>16 ml</u>	<u>16 ml</u>	<u>10 ml</u>

2.2.9 Auftrennung von Proteinkomplexen in der zweiten Dimension (2D-Analyse)

2D-Denaturierungspuffer:	1 %	SDS
	1 %	β-Mercaptoethanol
	62,5 mM	Tris/HCl pH 6,8

Die Gelstreifen bzw. Gelstücke wurden 5 min bei 40 °C im 2D-Denaturierungspuffer inkubiert und weitere 20 min bei RT. Die Gele wurden gut mit bidestilliertem Wasser gespült und auf das vorbereitete SDS-Gel (15%iges Trenngel, 5%iges Sammelgel, Größe 200 x 200 x 1,5 mm; Kapitel 2.2.5) arrangiert. Die Fixierung des Streifens erfolgte mit 1%iger Agarose (in 1 % SDS und 125 mM Tris/HCl pH 6,8) Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte z.T. unter Benutzung der *Protean[®] II xi Cell*-Apparatur (BIORAD).

2.2.10 Western-Analyse

Elektrotransfer von Proteinen (*Western blot*)

Der Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, MILLIPORE) erfolgte mittels *SemiDry-Blot* Apparatur (OWL) und wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll (*Immobilon-P Transfer Membrane User Guide*) durchgeführt. Dabei betrug die Transferzeit 1 h bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² Membran. Native Gele wurden vor dem Elektrotransfer einem Denaturierungsprozeß unterzogen.

Denaturierungspuffer:	1 % SDS	Kathodenpuffer: (pH ca. 8,5 ohne Einstellen)
	0,1 % β-Mercaptoethanol	25 mM Tris
	25 mM Tris	192 mM Glycin
	192 mM Glycin	10 % Methanol

Die Denaturierung erfolgt 5 min bei 40 °C im Denaturierungspuffer; eine weitere Inkubation von 15-30 min bei RT schloß sich an. Am Ende wurde der Denaturierungspuffer durch Kathodenpuffer ersetzt.

Antikörperbindung und ECL-Entwicklung (enhanced chemiluminescence)

10 x PBS:	1,37 M NaCl
	27 mM KCl
	43 mM Na ₂ HPO ₄
	5 mM KH ₂ PO ₄

Lösung I:	1 x PBS
	0,1-1 % (v/v) Tween [®] 20
	5 % (w/v) Magermilchpulver

Lösung II:	1 x PBS
	0,1-1 % (v/v) Tween [®] 20

Tab. 2-8 Entwicklerlösung für ECL-Reaktion.

	Volumen	Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 8,3	500 µl	50 mM
250 mM Luminol (in DMSO)	50 µl	1,25 M
90 mM Cumarsäure (in DMSO)	22 µl	200 mM
8,8 M H ₂ O ₂ (30 %)	3 µl	2,7 mM (0,009 %)
H ₂ O <i>ad</i>	<u>10 ml</u>	

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran 1 h in Lösung I inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde sie mit dem primären Antikörper (in Lösung I verdünnt; 0,125 ml/cm² Membran) weitere 1-2 h inkubiert. Danach wurde 4 x 10 min mit Lösung II gewaschen und nachfolgend mit dem sekundären Antikörper (z.B. *Anti-Rabbit-IgG* Peroxidase-Konjugat, SIGMA-ALDRICH, 1:30 000 in Lösung I verdünnt) 1-2 h inkubiert. Danach wurde wiederum 4 x 10 min mit Lösung II gewaschen. Die ECL-Entwicklerlösung (Tab. 2-8) wurde frisch hergestellt (Stammlösungen von Luminol und Cumarsäure wurden bei -20 °C gelagert), wobei ca. 0,125 ml/cm² Membran gerechnet wurde. Die PVDF-Membran wurde 1 min mit dem ECL-Reaktionsgemisch inkubiert, anschließend in Frischhaltefolie eingeschlagen und in einer Filmkassette zusammen mit einem ECL-Film (Hyperfilm-ECL, AMERSHAM BIOSCIENCES) je nach Signalstärke 1-30 min exponiert. Der Film wurde abschließend entwickelt (Entwickler und Fixierer, SIGMA-ALDRICH).

2.2.11 Co-Immunpräzipitation

Immunpräzipitations (IP)-Puffer:	100 mM NaCl
	20 mM HEPES/KOH pH 8,3
	2,5 mM EDTA pH 8,0
	1,0 mM DTT
	0,5 mM MgCl ₂
	0,1 % Triton X-100

Der Puffer basiert auf den Angaben in der Arbeit von Karnauhov (1998).

In einem ersten Schritt erfolgte die Bindung von Antikörpern an die vorgequollene ProteinA-Sepharose. Dazu wurde die benötigte Menge ProteinA-Sepharose abgewogen (etwa 10 mg ProteinA-Sepharose pro IP-Ansatz), mit etwa dem 10fachen Volumen IP-Puffer versetzt und ca. 10-15 min bei RT inkubiert (Quellung). Der Ansatz wurde 2 x mit IP-Puffer gewaschen und jeweils 2 min bei 11 000 g zentrifugiert. Da sich kein festes Pellet bildet, mußte die Entfernung des Überstandes vorsichtig durchgeführt werden. Im letzten Waschschrift wurde der IP-Puffer ohne Triton X-100 verwendet. Die ProteinA-Sepharose lag nun als ca. 10%ige Suspension vor. Die Antikörper wurden in einer 10fach höheren Konzentration, wie sie normalerweise für die *Western*-Analyse eingesetzt wurden, zugegeben. Die Ansätze wurden für 2 h bei RT auf dem Drehrad

(Rotator, SAUR) inkubiert. Die ProteinA-Sepharose wurde anschließend 2 x mit IP-Puffer gewaschen und lag am Ende als 5%ige Suspension vor.

Im zweiten Schritt wurde das Antigengemisch (Stromaextrakt, Standardvol. etwa 100 µl pro Ansatz) mit 2 Vol. der ProteinA-Sepharose-Suspension versetzt und 1 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Nach der Antikörperbindung wurden die Ansätze zentrifugiert (5 min, 11 000 g, 4 °C), der Überstand wurde nach Bedarf in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 4 x Laemmli Probenpuffer versetzt und 2 min bei 100 °C denaturiert (Überstand-Fraktion). Das Pellet wurde 3 x mit IP-Puffer gewaschen. Ein weiterer Waschschriff mit dem IP-Puffer ohne Triton X-100 schloß sich an, dabei erfolgte die Überführung der ProteinA-Sepharose-Suspension in ein neues Reaktionsgefäß. Der letzte Zentrifugationschritt wurde bei ca. 14 000 g durchgeführt, um den Überstand weitestgehend entfernen zu können. Das Pellet wurde mit 4 x Laemmli Probenpuffer (mit 20 % Glycerin) versetzt und 5 min bei 100 °C denaturiert (Pellet-Fraktion). Die beiden Fraktionen, Pellet und Überstand, konnten mittels SDS-PAGE analysiert werden.

2.2.12 Versuche mit rekonstituiertem IscA1 aus *Synechocystis*

Rekonstitution von IscA und Ferredoxin aus *Synechocystis*

Die Arbeiten dazu wurden hauptsächlich in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Seidler (Biochemie der Pflanzen, Fakultät für Biologie, Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt und sind in Wollenberg et al. (2003) beschrieben.

In einem ersten Schritt wurde das in *E. coli* überexprimierte IscA1-Protein aus *Synechocystis* (*slr1417*) chemisch bzw. enzymatisch mit einem [2Fe-2S]-Zentrum ausgestattet (rekonstituiert).

<u>IscA-Rekonstitutionsansatz:</u>	enzymatisch (e)	chemisch (c)	Endkonz.
IscA-Protein		jeweils 10 nmol bzw. 260 µg	(50 µM)
β-Mercaptoethanol (14 M)		jeweils 85 mM	
20 mM HEPES/KOH pH 8,0		ad <u>200 µl</u>	
	10 min mit Argon begasen, unter Argon folgendes zugeben:		
50 mM Na-Sulfid	-	2 µl	(0,5 mM)
50 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0,8 µl	0,8 µl	(0,2 mM)
50 mM Cystein	2 µl	-	
IscS (3,5 mg/ml)	4,0 µl	-	
	Beide Ansätze wurden 2 h bei RT inkubiert.		

Im zweiten Schritt konnte dann die Übertragung des IscA-gebundenen [2Fe-2S]-Zentrum auf Apo-Ferredoxin erfolgen. Dazu wurden 5 nMol des enzymatisch bzw. chemisch rekonstituierten Holo-IscA mit 2,5 nMol Apo-Ferredoxin, 20 mM HEPES/KOH pH 8,0 und 5 mM DTT in einem Volumen von 100 µl 1 h bei RT inkubiert. Die Übertragung erfolgte vergleichsweise unter

anaeroben (Standard) sowie aeroben Bedingungen. Zur Überprüfung der Reaktion wurden die Ansätze auf einem nativen 20%igen Tris-Glycin-Gel mit 20 mM DTT aufgetrennt. Apo- und Holo-Ferredoxin sind so durch ein charakteristisches Laufverhalten zu unterscheiden.

Das Prinzip dieser Übertragung sollte im nächsten Schritt auch für das Rieske-Protein als Cluster-Akzeptor angewendet werden.

Das Rieske-Protein als Akzeptor des IscA-gebundenen [2Fe-2S]-Clusters

In diesem Versuch wurde das zuvor rekonstituierte IscA (IscA_{rek} in 5 mM DTT bei -80 °C gelagert) mit dem *in vitro*-Translationsansatz des Rieske-Vorstufenproteins bzw. des reifen Teils inkubiert:

Ansätze:

	1	2	3	
IscA _{rek} (2,2 µg/µl)	4,5 µl	-	4,5 µl	(10 µg)
50 mM DTT (frisch)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	(5 mM)
<i>in vitro</i> -Translation	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	
20 mM HEPES/NaOH pH 8,0 <i>ad</i>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>	
Ansatz 1 h inkubiert bei	0 °C	20 °C	20 °C	
5 x Probenpuffer: 8 % (w/v)	β-Mercaptoethanol			
1,56 M	Tris/HCl pH 6,8			
20 %	Glycerin			
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau			

Die Ansätze wurden nativ auf einem 10-17,5%igen Tris-Glycin-Gel mit 20 mM DTT aufgetrennt. Eine Clusterübertragung sollte, analog dem Ferredoxin, durch ein verändertes Laufverhalten der nativ aufgetrennten Proteine sichtbar werden.

In einem weiteren Versuch erfolgte die Inkubation mit IscA_{rek}, nachdem das Rieske-Vorstufenprotein in isolierte Erbsenchloroplasten importiert und das Stroma anschließend reisoliert wurde. Die Clusterübertragung sollte nun durch einen gesteigerten Transport in isolierte Erbsenthylakoide detektiert werden. Der Organellimport (Erbsen) erfolgte wie in Kapitel 2.2.18 beschrieben. Die Chloroplasten wurden mit einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml in HM-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 8,0 und 5 mM MgCl₂) lysiert. Der reisolierte Stromaextrakt wurde wie folgt inkubiert:

<u>Ansätze:</u>	1	2	3	Endkonz.
Stromaextrakt	25 µl	25 µl	25 µl	
IscA _{rek} (2,2 µg/µl)	-	9 µl	9 µl	(20 µg)
H ₂ O	9 µl	-	-	
50 mM DTT (frisch)	3,8 µl	2,8 µl	2,8 µl	(5 mM)
Gesamtvol.	<u>37,8 µl</u>	<u>36,8 µl</u>	<u>36,8 µl</u>	
Ansatz 1 h inkubiert bei	20 °C	0 °C	20 °C	

Isolierte Erbsenthylakoide (jeweils 30 µg Chl. entsprechendes Pellet) wurden mit den Ansätzen 1 bis 3 resuspendiert, 25 min bei 25 °C im Licht inkubiert und anschließend entsprechend den Angaben in Kapitel 2.2.21 behandelt (*in thylakoido*-Ansatz).

Pflanzliche Methoden

2.2.13 Gewinnung von Proteinfractionen aus *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial

Isolationspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,6
 2 mM EDTA pH 8.0
 1 mM MgCl₂
 frisch zugeben: 1,0 mg/ml Na-Ascorbat
 0,5 mg/ml Glutathion, reduziert

Mit nachfolgender Methode läßt sich aus geringen Mengen Pflanzenmaterial (ca. ein Blatt) die Membranprotein-Fraktion getrennt von der Fraktion löslicher Proteine gewinnen. Dazu wurde das geerntete Pflanzenmaterial in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff eingefroren. Mit einem Zerstörungsstäbchen (*Dstroy*[®]-Sticks, BIOZYM) wurde das gefrorene Material im Reaktionsgefäß möglichst fein zerkleinert. Je nach Menge wurde die noch gefrorene Probe mit 0,5 - 1 ml Isolationspuffer versetzt. Nachdem das Material vollständig aufgetaut war, konnten die Proben 10 min bei 10 000 UpM (Sigma 3K12, Rotor: 12154-H) und 4 °C zentrifugiert werden. Der Überstand, der die lösliche Proteinfraktion darstellt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals zentrifugiert (5 min 15 000 UpM, 4 °C). Der Überstand wurde erneut abgenommen und ein Aliquot konnte zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976) eingesetzt werden (Roti[®] Quant, ROTH). Das Pellet der ersten Zentrifugation, das die Membranprotein-Fraktion darstellt, wurde 2 x mit Isolationspuffer gewaschen. Beide Fraktionen eines gemeinsamen Ausgangsmaterials wurden so in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, daß gleiche Volumina stöchiometrische Mengen enthalten. Alle Proben wurden 2 min bei 100 °C denaturiert.

2.2.14 Isolierung von Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Homogenisationspuffer (HP):	330 mM Sorbitol	24,1 g	
	20 mM Tricin/KOH pH 8,4	8,0 ml	1M Tricin/KOH pH 8,4
	5 mM EGTA	760 mg	
	5 mM EDTA	744 mg	
	10 mM Na ₂ CO ₃	420 mg	
	0,1 % BSA	400 mg	
		H ₂ O <i>ad</i> 400 ml (pH ca. 9 ohne Einstellen)	
frisch zugeben:	Na-Ascorbat 330 mg/l	132 mg	

5 x Resuspensionspuffer (RP):	1,65 M Sorbitol	4,5 g
	0,1 M Tricin/KOH pH 7,6	1,5 ml 1 M Tricin/KOH pH 7,6
	25 mM MgCl ₂	375 µl 1 M MgCl ₂
	12,5 mM EDTA	375 µl 1 M EDTA pH 8,0
	H ₂ O ad	<u>15 ml</u>

Percoll-Stufengradient:	<u>60%ig (10 ml)</u>	<u>80%ig (6 ml)</u>
Percoll	6 ml	4,8 ml
5 x RP	2 ml	1,2 ml
H ₂ O	2 ml	-

Die Isolierung wurde basierend auf den Angaben in Rensink et al. (1998) durchgeführt.

Die *Arabidopsis*-Pflanzen wurden auf Erde unter Kurztagbedingungen ca. 2-3 Monate kultiviert. Die Rosettenblätter wurden am Vortag der Chloroplastenisolierung geerntet (40-60 g Frischmasse), gewaschen, kühl und dunkel über Nacht gelagert. Sämtliche Lösungen und Zentrifugen/Rotoren waren bei Benutzung ebenfalls gekühlt. Das Pflanzenmaterial wurde mit 400 ml HP im *Waring Blendor* zerkleinert (4-5 kurze Impulse von 2-3 sek). Das Homogenat wurde durch 2 Lagen *Mira cloth* (100 µM-Poren; CALBIOCHEM) filtriert und anschließend 2 min bei 5000 UpM zentrifugiert (SLC-250T, SORVALL). Der Überstand wurde verworfen; das Pellet, je nach Größe, in 5-8 ml 1 x RP vorsichtig mit einem Pinsel resuspendiert. Zwei Stufengradienten, bestehend aus je 3 ml 80%igem Percoll und 5 ml 60%igem Percoll wurden in 15 ml-Corex-Röhrchen vorbereitet und auf Eis kühl gehalten. Das resuspendierte Pellet wurde auf beide Stufengradienten gleichmäßig verteilt. Die Zentrifugation zur Abtrennung der intakten Chloroplasten (untere Bande) wurde bei 5000 UpM 15 min im *swing out*-Rotor durchgeführt (ST-H50, SORVALL). Bis zur grünen Bande auf der unteren Percollstufe wurde der Gradient verworfen; die untere Bande, die die intakten Chloroplasten enthält, wurde mit abgeschnittener 1 ml-Spitze in ein frisches Corex-Röhrchen überführt. Die Plastiden wurden mit 1 x RP gewaschen, 1 min bei 4300 UpM (3000 g) im *swing out*-Rotor zentrifugiert und am Ende in einem geringen Volumen (0,5-1 ml) 1 x RP aufgenommen. Die Chlorophyllkonzentration wurde bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Plastidensuspension und 990 µl 80%iges Aceton mittels Vortex gut gemischt und 3 min bei 13 000 UpM und RT zentrifugiert (Biofuge fresco, HERAERUS). Der Überstand wurde photometrisch bei Wellenlängen von 645 und 663 nm vermessen (Shimadzu UV-1602). Die Berechnung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach der angegebenen Formel (Arnon, 1949):

$$c_{\text{Chlorophyll}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663})/10$$

2.2.15 Behandlung der *Arabidopsis*-Proteinfraktionen

Die Behandlung der Thylakoide erfolgte mit:

2 M	NaBr
2 M	NaSCN
0,1 M	NaOH pH 13
0,1 M	Na ₂ CO ₃ pH 11,4

Alle Lösungen wurden mit HM-Puffer (10 mM HEPES/KOH pH 8,0 und 5 mM MgCl₂) angesetzt. Die Thylakoide wurden mit einer Chlorophyllkonzentration von 0,5 µg/µl in der jeweiligen Lösung 45 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurden 2 Vol. HM-Puffer zugegeben und die Ansätze 10 min bei 21 000 g (15 3000 UpM; Sigma 3K12, Rotor: 12154-H) zentrifugiert. Die Thylakoide wurden 2 x mit HM-Puffer gewaschen und am Ende in 4 x Laemmli-Puffer aufgenommen (0,5 µg/µl Chl.-Endkonz.). Die Denaturierung erfolgte 2 min bei 100 °C.

Proteasebehandlungen:

<u>Protease</u>	<u>Stammlsg.</u>	<u>Arbeitskonz.</u>	<u>Inhibierung durch</u>
Trypsin	2 g/l	50 µg/ml	50 µg/ml Trypsininhibitor
Thermolysin	2 g/l	100 µg/ml	10 mM EDTA
Proteinase K	0,75 g/l	15 µg/ml	10 mM PMSF

Die Thylakoide (Chlorophyllkonz. 0,5 µg/µl, 100 µl Vol.) wurden 45 min auf Eis mit den angegebenen Proteasekonzentrationen behandelt. Die Reaktion wurden durch Zugabe des spezifischen Inhibitors beendet (siehe oben). Die Behandlung der löslichen Proteine (Konz. 1 µg/µl) erfolgte mit steigenden Trypsinkonzentrationen (1-2,5-5-10-20-40 µg/ml) 1 h auf Eis.

2.2.16 Reinigung des Rieske KK_{HA}-Proteins aus *Arabidopsis*-Pflanzenextrakten

Ca. 5 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen (Wildtyp und Rieske-KK_{HA}-exprimierende Mutante) wurden geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und wie unter 2.2.13 beschrieben aufgearbeitet. Die so erhaltene Fraktion löslicher Proteine wurde durch Zugabe des Equilibrierungspuffers (20 mM Tris pH 7,5, 0,1 M NaCl, 0,1 M EDTA) auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Dieses Ausgangsmaterial (insgesamt 2 mg Protein) wurde auf die vorbereitete Affinitätssäule gegeben (2 ml der *Anti-HA High Affinity Matrix, rat monoclonal antibody, clone 3F10*, ROCHE DIAGNOSTICS). Alle weiteren Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 1mg/ml des HA-Peptids (ROCHE DIAGNOSTICS) gelöst in Equilibrierungspuffer bzw. mit 0,1 M Glycin pH 2,0. Neben den Eluaten wurden auch die Fraktionen der ungebundenen Proteine (Durchlauf), der Waschschritte und der Regenerierung aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Aufkonzentrierung der Proben erfolgte mittels Ultrafiltration (*Microcon-3*, Ausschlußgröße 3 kDa; MILLIPORE).

2.2.17 Isolierung von Chloroplasten aus *Spinacia oleracea* (Spinat)

Homogenisationsmedium:
(pH auf 7,6 einstellen) 0,33 M Sorbitol
50 mM HEPES/KOH pH 7,6
2 mM EDTA
1 mM MgCl₂
1 mM MnCl₂
frisch zugeben: 5 mM Na-Ascorbat

PBF-Percoll-Stammlösung:
(gelöst in Percoll) 3 % (w/v) PEG 6000
1 % (w/v) BSA
1 % (w/v) Ficoll 400

Percoll-Stufengradient:	<u>45%ig (50 ml)</u>	<u>85%ig (30 ml)</u>	<u>Endkonz.</u>
Sorbitol	3,0 g	1,8 g	0,33 M
PBF-Stamm.	22,5 ml	25,5 ml	
1 M HEPES/KOH 7,6	2,5 ml	1,5 ml	50 mM
0,5 M EDTA pH 8,0	200 µl	120 µl	2 mM
1 M MgCl ₂	50 µl	30 µl	1 mM
H ₂ O	24,8 ml	2,8 ml	

Percollkissen (35%ig): 3,5 ml Percoll
2,0 ml 5 x SRM
4,5 ml H₂O

5 x SRM:
(Sorbitolresuspensionsmedium) 1,65 M Sorbitol
250 mM HEPES/KOH pH 8,0

HM-Puffer: 10 mM HEPES/KOH pH 8,0
5 mM MgCl₂

SRME (HME) 10 bzw. 50: SRM (HM) Puffer mit 10 bzw. 50 mM EDTA

Thermolysin-Lösung: 1 mg/ml Thermolysin
25 mM CaCl₂

Für eine Präparation wurden etwa 60 g Spinatblätter ohne Mittelrippe und Stiel verwendet. Die Blätter wurden bereits am Vortag geerntet, gereinigt und über Nacht dunkel im Kühlraum gelagert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bzw. auf Eis durchgeführt, die Zentrifugen/Rotoren wurden auf 4 °C vorgekühlt. Ebenfalls vorgekühlt wurde das Homogenisationsmedium (250 ml pro Aufarbeitung), die Lösungen für den Percollgradienten und der *Waring Blender*, der zum Zerkleinern des Blattmaterials benutzt wurde.

So wurden das vorbereitete Blattmaterial mit der dreifachen Menge Homogenisationsmedium (180 ml) in den Mixbecher gegeben und durch 4-6 Pulse von wenigen Sekunden (2-3) zerkleinert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen *Mira cloth* (100 µm Porengröße; CALBIOCHEM, La Jolla, USA) oder alternativ durch ein Nylongewebe (100 µm Porengröße) filtriert. Das erhaltene Filtrat wurde 2 min bei 5000 UpM zentrifugiert (SLC-250T, SORVALL). Der Überstand wurde verworfen

und das Pellet zunächst mit einem feinen Pinsel, dann durch pipettieren mit einer abgeschnittenen 1 ml-Spitze in 5-10 ml Homogenisationsmedium vorsichtig resuspendiert. Diese Chloroplastensuspension wurde dann auf zwei 15 ml-Corex-Röhrchen verteilt, indem der darin befindliche Percollstufengradient, bestehend aus 3 ml 85%igem Percoll und 5 ml 45%igem Percoll, vorsichtig überschichtet wurde. Anschließend erfolgte die Zentrifugation 10 min bei 10 500 UpM im *swing out*-Rotor (ST-H50, SORVALL). Es waren jetzt zwei Banden zu erkennen: in der oberen befinden sich die Organelltrümmer in der unteren die intakten Plastiden. Der Gradient wurde bis zur unteren Bande mittels Pasteurpipette verworfen, um dann die intakten Chloroplasten mit einer abgeschnittenen 1 ml-Spitze in zwei neue Corex-Röhrchen zu überführen.

Die beiden Röhrchen wurden mit Homogenisationspuffer aufgefüllt, um die intakten Chloroplasten vom restlichen Percoll zu reinigen. Pelletiert wurden sie durch Beschleunigung des Festwinkelrotors (SL-50T, SORVALL) auf 5000 UpM und Abstoppen nach wenigen Sekunden. Der Überstand wurde abgegossen und ein zweiter Waschschrift folgte. Danach konnte das Chloroplastenpellet in 1-2 ml Homogenisationsmedium behutsam resuspendiert werden.

Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration erfolgte wie in Kapitel 2.2.13 beschrieben.

2.2.18 Importreaktion mit Spinachchloroplasten (*in organello*-Ansatz)

Standardansatz:	x µl	Chloroplasten-Suspension (50 µg Chlorophyll entsprechend)
	y µl	SRM
	1,5 µl	100 mM ATP
	3,0 µl	250 mM Methionin
	12,5 µl	<i>in vitro</i> -Translationsansatz
Gesamtvolumen:	<u>150 µl</u>	

Nigericin-Ansatz:	x µl	Chloroplasten-Suspension (50 µg Chlorophyll entsprechend)
	y µl	SRM
	1,5 µl	100 mM ATP
	3,0 µl	250 mM Methionin
	6,0 µl	250 mM KCl
	3,0 µl	0,3 mM Nigericin (in SRM; SIGMA-ALDRICH) -> 6µM Endkonz.
	Ansatz 10 min dunkel auf Eis inkubiert	
	12,5 µl	<i>in vitro</i> -Translationsansatz
Gesamtvolumen:	<u>150 µl</u>	

Azid-Ansatz: Der Standardansatz wurde vor Zugabe der *in vitro*-Translation mit 10 mM Na-Azid (Stammlösung frisch hergestellt) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert.

Die Importansätze wurden 20 min bei 25 °C im belichteten Wasserbad inkubiert. Die Importreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskalten SRM-Puffer gestoppt. Die Chloroplasten wurden sedimentiert (3 min, 6000 UpM, 4 °C, Biofuge fresco, HERAEUS), der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl SRM resuspendiert. Dazu und bei allen weiteren Schritten bis zur Lyse der Chloroplasten in HME10 wurden abgeschnittene Pipettenspitzen verwendet. Der Chloroplastensuspension wurden 25 µl Thermolysin-Lösung (1 mg/ml, 25 mM CaCl₂) pro Ansatz

zugesetzt, um durch die 30-40 minütige Proteasebehandlung auf Eis alle nicht-importierten Proteine abzubauen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl SRME50 gestoppt. Anschließend wurde die Chloroplastensuspension auf ein 35%iges Percollkissen (500 µl) geschichtet, um durch Zentrifugation (8 min, 8000 UpM) eine Abtrennung der intakten Chloroplasten zu erreichen (lockeres Pellet am Boden). Das Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes ein Mal mit etwa 900 µl SRME10 gewaschen und 3 min bei 6000 UpM zentrifugiert. Die Chloroplasten dieses Pellets wurden durch Resuspendieren in 75 µl HME10 und 10 minütiger Inkubation auf Eis osmotisch lysiert. Anschließend wurden die Thylakoide durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 13 000 UpM). Der freigesetzte Stromaextrakt wurde als Überstand vollständig abgenommen und mit 25 µl 4 x Laemmli-Puffer versetzt (**Stroma-Fraktion**). Durch Waschen der Thylakoide mit etwa 200 µl HM-Puffer sollte das restliche Stroma entfernt werden (Zentrifugation 5 min bei 13 000 UpM). Das Pellet wurde erneut in 200 µl HM-Puffer resuspendiert und gleichmäßig auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Der einen Hälfte (100 µl) wurden 10 µl Thermolysin-Lösung zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 µl HME50 gestoppt (**T+ Fraktion**). Die andere Hälfte inkubierte ohne Zugabe von Thermolysin während dieser Zeit auf Eis (**T- Fraktion**).

Anschließend wurden beide Fraktionen zentrifugiert (5 min, 13 000 UpM) und die Sedimente in jeweils 50 µl 2 x Laemmli-Puffer (mit 20 mM EDTA) aufgenommen. Zum Schluß wurden alle Fraktionen 2 min bei 100 °C denaturiert und ein letztes Mal zentrifugiert (5 min, 13 000 UpM). Von jeder Fraktion wurden dann 25 µl (jeweils etwa 12,5 µg Chlorophyll entsprechend) auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen.

2.2.19 Isolierung von Chloroplasten aus *Pisum sativum* (Erbsen)

SIM (<u>S</u> accharose- <u>I</u> solations <u>m</u> edium)-Puffer:	0,35 M Saccharose
	25 mM HEPES/KOH pH 7,6
	2 mM EDTA

Alle weiteren Lösungen sind unter 2.2.17 aufgeführt.

Die Gewinnung intakter Erbsenchloroplasten ist ähnlich der Methode, die bereits für Spinat beschrieben wurde (Kapitel 2.2.17). Auch hier wurden alle Arbeitsschritte auf Eis bzw. im Kühlraum durchgeführt, die verwendeten Lösungen waren vorgekühlt und alle Zentrifugationen erfolgten bei 4 °C.

Für eine Aufarbeitung wurden ca. 50 g von 7-10 Tage alten Erbsenkeimlingen geerntet. Die Zerkleinerung des Pflanzenmaterials in 400 ml SIM-Puffer erfolgte im *Waring Blendor* (4-6 Pulse von wenigen Sekunden). Das Homogenat wurde durch zwei Lagen *Mira cloth* (100 µm Porengröße) gefiltert und 2 min bei 4000 UpM zentrifugiert (SLC-250T, SORVALL). Das Pellet wurde vorsichtig resuspendiert, auf ein 35%iges Percollkissen geschichtet und 8 min bei 4000 UpM im *swing out*-

Rotor zentrifugiert (ST-H50, SORVALL). Die intakten Chloroplasten sammelten sich als kleines Pellet auf dem Boden des Corex-Röhrchens. Dieses lockere Sediment wurde zwei Mal mit SRM gewaschen und jeweils 2 min bei 3000 UpM im Festwinkelrotor (SL-50T, SORVALL) zentrifugiert. Zum Schluß konnten die Chloroplasten in einem kleinen Volumen (1-2 ml) SRM aufgenommen und die Chlorophyllkonzentration konnte bestimmt werden (Kapitel 2.2.14).

Die Chloroplasten konnten nun für Importreaktionen (Kapitel 2.2.18) oder zur Gewinnung von Thylakoiden verwendet werden.

2.2.20 Isolierung von Erbsenthylakoiden

Dazu wurde ein definiertes Volumen der Chloroplastensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 10 000 UpM zentrifugiert (Sigma 3K12; Rotor: 12154-H). Nachdem der Überstand möglichst vollständig entfernt worden war, wurde das Pellet so in HM-Puffer aufgenommen, daß eine Chlorophyllkonzentration von 0,75 µg/µl vorlag. Die Plastiden wurden 10 min auf Eis osmotisch lysiert. Die so freigesetzten Thylakoide konnten anschließend durch Zentrifugation sedimentiert werden (5 min, 10 000 UpM). Der Stromaextrakt wurde als Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß aufbewahrt. Die Thylakoide wurden jetzt entweder zwei Mal gewaschen (etwa 800 µl HM-Puffer; Zentrifugation 5 min, 10 000 UpM) und dann in HM-Puffer resuspendiert oder nur einmal gewaschen und wieder in Stroma aufgenommen. Die Chlorophyllkonzentration betrug am Ende in beiden Fällen (mit oder ohne Stroma) 0,75 µg/µl.

2.2.21 Importreaktion mit Erbsenthylakoiden (*in thylakoido*-Ansatz)

Standardansatz:	40 µl	Thylakoide	(Chlorophyllkonzentration: 0,75 µg/µl)
	5 µl	HM-Puffer	
	5 µl	<i>in vitro</i> -Translationsansatz	
Gesamtvolumen:	<u>50 µl</u>		

Die Importreaktion erfolgte 20 min bei 25 °C im belichteten Wasserbad. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl HM-Puffer gestoppt. Die Thylakoide wurden pelletiert (5 min, 13 000 UpM, Biofuge fresco, HERAEUS) und anschließend in 200 µl HM-Puffer aufgenommen. Die Hälfte des Ansatzes wurde mit 10 µl Thermolysin-Lösung versetzt (1mg/ml, 25 mM CaCl₂) und 30 min auf Eis inkubiert; die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl HME10 gestoppt (**T+ Fraktion**). Die zweite Hälfte der Thylakoide blieb unbehandelt (**T- Fraktion**). Die Thylakoide beider Fraktionen wurden sedimentiert (5 min, 13 000 Upm) und in 50 µl 2 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden 2 min bei 100 °C denaturiert, kurz zentrifugiert und zur Analyse auf ein SDS-Gel aufgetragen (jeweils 25 µl, 7,5 µg Chlorophyll entsprechend).

2.2.22 Erstellung und Selektion transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen durch Vakuum-Infiltration

YEB-Medium (1 l):	5 g	Rindextrakt	(Platten enthielten zusätzlich 1,5 % Bacto-Agar im Medium)
	1 g	Hefeextrakt	
	5 g	Baktopepton	
	5 g	Saccharose	
MS-Medium (1 l):	50 g	Saccharose	
	4,33 g	<i>Murashige & Skoog</i> (MS) Salz-Vitamin-Mischung	
		pH-Wert mit KOH auf 5,8 einstellen, Medium nur 15 min sterilisieren.	

Die Methode basiert auf der Vakuum-abhängigen Infiltration einer *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension in *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Bechthold et al., 1993). Die *A. tumefaciens*-Zellen enthalten ein binäres T-DNA-Vektorsystem: ein Vektor (pMP90) trägt die *vir*-Gene (virulenz), die für den Transfer der zu integrierenden DNA erforderlich sind; ein zweiter Vektor (pGreen) ist mit zwei je 25 bp-Wiederholungsmotiven (*left/right border*, LB und RB; Abb. 2-2 B) ausgestattet, die für die Integration der dazwischen liegenden T-DNA (Transfer-DNA) in das Pflanzengenom erforderlich sind (Koncz & Schell, 1986; Hellens et al., 2000). Die Deletion der normalerweise dort befindlichen Gene zur Tumorinduktion und Opinin-Biosynthese ermöglichen die Aufnahme der zu transferierenden DNA. Die Replikation des pGreen-Vektors in *A. tumefaciens* ist von der Anwesenheit eines weiteren Plasmids abhängig. Dieses Helferplasmid (pSoup) codiert die zur Replikation erforderliche ReplikaseA (Hellens et al., 2000).

Verwendet wurden:

<i>A. tumefaciens</i> -Stamm:			
	GV3101 (pMP90)	C58C1, Rif ^r , Gm ^r	Koncz & Schell, 1986
	mit Helferplasmid pSoup	Tc ^r	Hellens et al., 2000
T-DNA-Vektor:			
	pGreenII 0129	Kn ^r , Hyg ^r	Hellens et al., 2000

Die zu transferierende DNA wurde in die entsprechende Klonierungsstelle des Vektors pGreenII 0129 integriert (Kapitel 2.2.4). Das Plasmid konnte nun mit Hilfe der Elektroporation (1,8 kV) in *A. tumefaciens*-Zellen eingebracht werden. Die Selektion der Zellen erfolgte auf YEB-Platten mit Rifampicin (100 µg/ml, Rif100) und Kanamycin (50 µg/ml, Kn50) 2 Tage bei 28 °C. Die Kolonien wurden dann zur Inokulation von 15 ml YEB-Medium genutzt (Rif100, Kn50, Gentamycin 10 µg/ml [Gm10]), das wiederum 2 Tage bei 28 °C kultiviert wurde. Von 2 ml dieser Kultur wurde eine Plasmidpräparation angefertigt (*NucleoSpin[®] Plasmid Kit*), die zur Transformation von *E. coli*-Zellen (DH5α) genutzt wurde. Durch eine Plasmidpräparation aus der daraus resultierenden *E. coli*-Kultur mit anschließender Restriktionsanalyse konnte die Anwesenheit der zu transferierenden DNA im pGreen-Vektor überprüft werden. Bei positivem Ergebnis wurden 50 ml YEB-Medium (Rif100, Kn50, Gm10) mit 5 ml der *A. tumefaciens*-Kultur

inokuliert und 2 Tage bei 28 °C kultiviert. Diese Vorkultur wurde zur Inokulation von 450 ml YEB-Medium (Rif100, Kn50, Gm10) genutzt, das nur 1 Tag bei 28 °C geschüttelt wurde.

Die Zellen dieser 500 ml-Kultur wurden 10 min bei 6000 UpM und 4 °C pelletiert (SLC-250T, SORVALL) und anschließend in 1 l MS-Medium (2 Vol. der Kultur) resuspendiert.

Transformation suspension: *A. tumefaciens*-Zellen in 1 l MS-Medium
 10 µl Benzylaminopurin (BAP), 1 µg/µl oder 10 U/µl
 50 µl Silwet77 (Detergens)

Die Transformation suspension wurde in ein geeignetes Glasgefäß (Marmeladenglas [WECK] oder Becherglas) gegeben und die zu transformierenden *Arabidopsis*-Pflanzen wurden kopfüber mit den Infloreszenzachsen in die *Agrobacterium*-Suspension eingetaucht. Die Pflanzen wurden 20 min einem Vakuum ausgesetzt (Membran-Vakuumpumpe [VAKUUBRAND] mit Exikatorgefäßen), das möglichst abrupt aufgehoben wurde. Die transformierten Pflanzen wurden 1-2 h horizontal gelagert, bevor sie die nächsten 24 h unter einer vor Verdunstung schützenden Abdeckhaube stehend unter Langtagbedingungen gehalten wurden. Ca. 4-6 Wochen später wurden die Samen geerntet, sterilisiert und auf Selektionsplatten ausgebracht.

Selektion der *Arabidopsis*-Transformanden

Sterilisationslösung: 5 % Calciumhypochlorid
 0,1 % Triton X-100

½ Ara-Medium (1l): 15 g Saccharose
 2,15 g *Murashige & Skoog* Salz-Vitamin-Mischung

pH mit KOH auf 7,5 einstellen, 0,8 % Micro-Agar zugeben,
 Medium nur 15 min sterilisieren

Bevor die Samen der transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen auf Selektionsplatten ausgebracht werden konnten, mußten sie sterilisiert werden. Dazu wurden die im 1,5 ml-Reaktionsgefäß befindlichen Samen (max. 500 µl) mit 1 ml Sterilisationslösung genau 15 min inkubiert. Es folgten drei Waschungen mit sterilem Wasser. Die Samen trockneten über Nacht. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

Nachdem die Samen gut getrocknet waren, wurde ein etwa 100 µl Aliquot auf eine Kulturplatte (Ø 13 cm) mit ½ Ara-Medium und den benötigten Antibiotika (Cefotaxim 500 µg/ml [verhindert das Wachstum von *A. tumefaciens*], Hygromycin 15 µg/ml [Pflanzenselektionsmarker]) ausgebracht. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen kultiviert. Nach etwa 2 Wochen konnte man die Transformanden als grüne Pflänzchen mit entwickelten Sekundärblättern und ins Medium wachsenden Wurzeln von nicht-transformierten Pflanzen unterscheiden (gelb, ohne Sekundärblätter und Wurzel). Die Transformanden wurden auf frische Platten transferiert und nach weiteren 2 Wochen Kultivierung auf Erde umgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Transporteigenschaften des Rieske Fe/S-Proteins

Die Eisen/Schwefel-haltige Untereinheit des thylakoidlokalisierten Cytochrom b_6/f -Komplexes, das Rieske Fe/S-Protein, ist kerncodiert und wird nach der Synthese im Cytosol posttranslationell in den Chloroplasten transportiert. Plastidäre Rieske-Vorstufenproteine verfügen über ein einfaches, stromadirigierendes Transitpeptid (Salter et al., 1992). Der anschließende Transport zur bzw. über die Thylakoidmembran wird durch eine hydrophobe N-terminale Sequenz des reifen Proteins ermöglicht (Madueno et al., 1994). Ein Teil dieses etwa 50 Aminosäurereste umfassenden Bereiches bildet eine α -helikale Sekundärstruktur aus und verankert damit das Rieske-Protein in der Thylakoidmembran, wobei die C-terminale hydrophile Domäne in das Thylakoidlumen gerichtet ist (Karnauchov et al., 1997). Die Translokation dieser luminalen Domäne über die Membran erfolgt auf dem Δ pH-abhängigen Tat-Weg (Molik et al., 2001).

3.1.1 Das Transportverhalten des Rieske Fe/S-Proteins *in vivo* und *in vitro*

Die Analyse des Rieske-Transportverhaltens mittels isolierter Chloroplasten hatte gezeigt, daß das *in vitro* synthetisierte Protein während des Transportvorgangs in erheblichem Maße im Stroma akkumuliert und nicht, wie erwartet, nach der Inkubation quantitativ in den Thylakoiden, dem endgültigen Wirkort, vorliegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit dem plastidären Rieske-Protein aus *Spinacia oleracea* (SoRi) gearbeitet, dessen cDNA im Labor bereits zur Verfügung stand (Tab. 2-1). Darüber hinaus wurde auch das plastidäre Rieske-Protein aus *Arabidopsis thaliana* (AtRi) analysiert. Die entsprechende cDNA wurde als RAFL (RIKEN-Arabidopsis-Full-Length)-cDNA-Klon bezogen. Der cDNA-Bereich wurde in einen für *in vitro* Transkription/Translation optimierten Vektor (pBAT, Annweiler et al., 1991) inseriert. Die Synthese der Vorstufenproteine erfolgte *in vitro* im zellfreien System des Retikulocytenlysats in Gegenwart der radioaktiv markierten Aminosäure Methionin. Beide Rieske-Vorstufenproteine wurden nun für *in organello*-Experimente sowohl mit Erbsen- als auch mit Spinatchloroplasten eingesetzt (Kapitel 2.2.18). Dabei zeigte sich, daß das 27 kDa Rieske-Vorstufenprotein aus Spinat erwartungsgemäß in die Chloroplasten transportiert und im Stroma zum reifen Protein von etwa 20 kDa prozessiert wurde (Abb. 3-1).

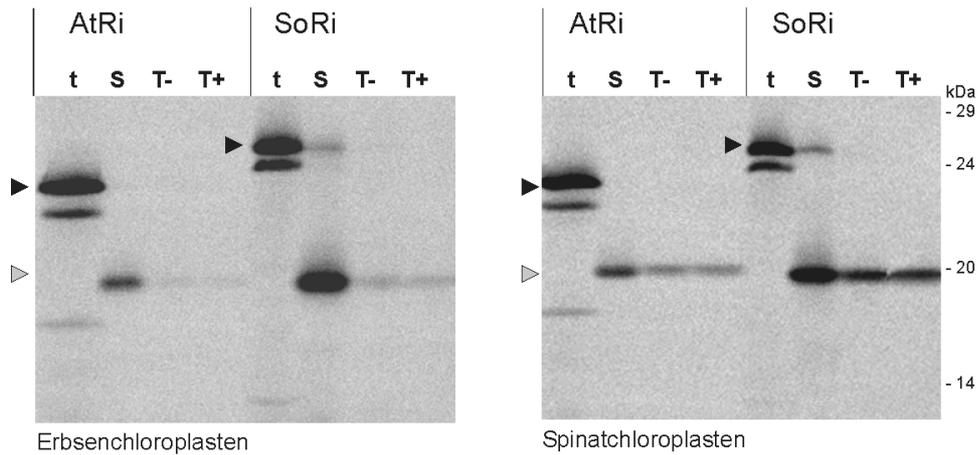


Abb. 3-1 *In organello*-Import der chloroplastidären Rieske Fe/S-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (AtRi) und *Spinacia oleracea* (SoRi) in isolierte Erbsen- bzw. Spinatchloroplasten. Dargestellt sind Expositionen von 10-17,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). *In vitro* synthetisierte, radioaktiv markierte Vorstufenproteine (t, Translation) wurden mit isolierten Chloroplasten aus Erbse bzw. Spinat inkubiert, die anschließend in Stroma (S) und Thylakoide fraktioniert wurden. Ein Teil der Thylakoide wurde mit Thermolysin behandelt (T+) die andere Hälfte blieb unbehandelt (T-). Stroma und Thylakoidfraktionen wurden in stöchiometrischen Mengen (jeweils ca. 10 µg Chlorophyll entsprechend) aufgetragen und zusammen mit 1/50 Vol. (0,25 µl) des zum Import eingesetzten Translationsansatzes mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Größen des mitgeführten 7L-Markers sind in kDa angegeben. Die Doppelbande in der Translationsspur (t) ist auf die Nutzung eines zweiten Start-Methionins zurückzuführen. Die schwarze Pfeilspitze kennzeichnet das Vorstufenprotein, die graue Spitze das Produkt der stromalen Prozessierung, in diesem Fall das reife Protein.

Auch das Rieske-Protein aus *Arabidopsis*, hier erstmals für einen Importversuch eingesetzt, wird als 23 kDa Vorstufe von den Plastiden aufgenommen und zum reifen Protein gleicher Größe wie das Spinatprotein (20 kDa) prozessiert. Die erwartete Größe des *Arabidopsis*-Vorstufenproteins liegt für die 229 Aminosäurereste bei ca. 25 kDa. Die hier beobachtete Größe von etwa 23 kDa weicht anscheinend nur unwesentlich von der erwarteten Größe ab. Bei näherer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, daß es für dieses verkürzte *Arabidopsis*-Vorstufenprotein eine Ursache gab.

So zeigten die umfangreichen Informationen über das *Arabidopsis*-Genom, daß die Transkription des Rieske-Genlokus (*petC*; At4g03280) zwei unterschiedlich gespleißte mRNA-Moleküle hervorbringen kann (Abb. 3-2). Durch ein 90 bp Fragment im 5'-codierenden Bereich, wird der Leserahmen vom ersten ATG nach drei Aminosäuren durch ein Stoppcodon beendet. Die Translation der mRNA kann erst vom zweiten Start-Codon (entspricht dem ersten ATG-Codon nach dem 90 bp Fragment) erfolgreich durchgeführt werden. Wird das 90 bp Fragment jedoch zuvor als Intron entfernt, bleibt der Leserahmen vom ersten Start-Codon beginnend erhalten. Die Folge dieses alternativen Spleißens sind zwei Proteine, die sich lediglich in der Länge des Transitpeptids unterscheiden (Abb. 3-2). Die nicht gespleißte Version der mRNA ergibt einen *Precursor* mit einem um 19 Aminosäuren verkürzten Transitpeptid. Die Aminosäuresequenz dieses N-terminal

verkürzten Proteins stimmt jedoch exakt mit dem entsprechenden Teil des Translationsproduktes der gespleißten mRNA-Version überein. Die Sequenzierung der im Labor vorhandenen *Arabidopsis* Rieske-cDNA zeigte, daß es sich bei dem verwendeten Klon um die ungespleißte, 90 bp Fragment tragende Version handelt. Das Translationsprodukt ist somit ein 210 Aminosäuren umfassende Protein von ca. 23 kDa, dessen verkürztes Transitpeptid eine Länge von 31 Aminosäuren aufweist. Somit läßt sich die Größe des beobachteten Translationsproduktes durch die Verwendung des cDNA-Klons, der das kürzere Rieske-Vorstufenprotein liefert, erklären.

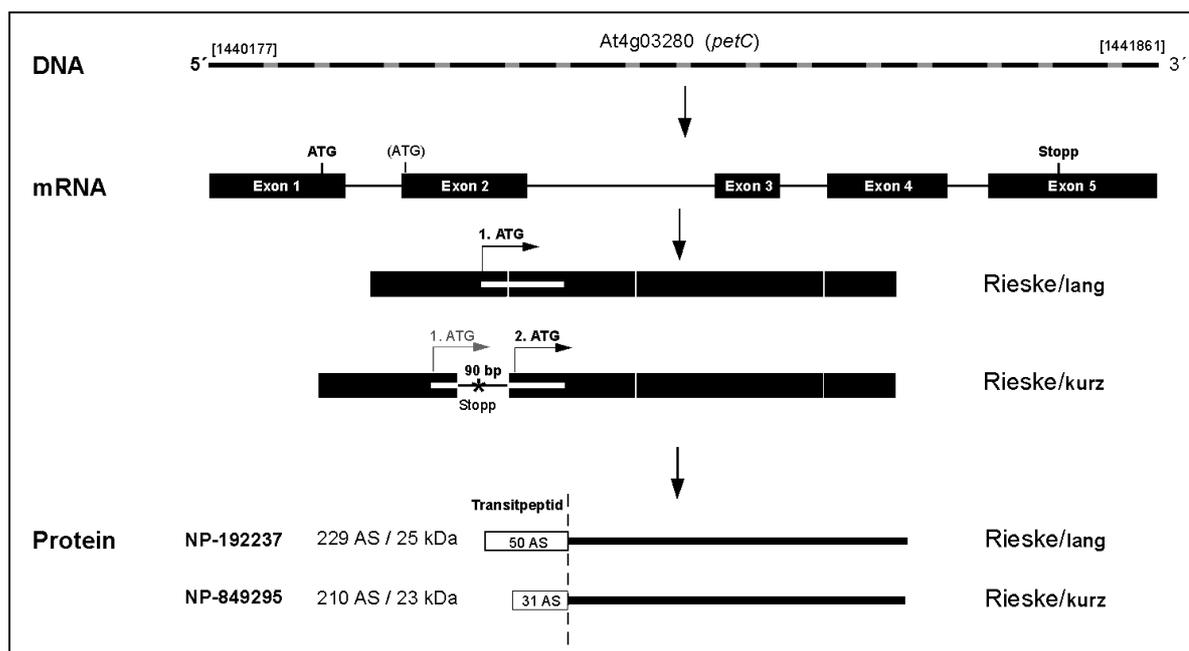


Abb. 3-2 Spleißformen der Rieske mRNA in *Arabidopsis thaliana*. Vom Rieske-codierenden Gen At4g03280 (*petC*) läßt sich eine mRNA mit 5 Exonbereichen ableiten. Kommt es zur Entfernung aller 4 Introns, wird ausgehend vom „1. ATG“ ein Vorstufenprotein von 229 Aminosäuren (AS) synthetisiert, das ein 50 AS Transitpeptid beinhaltet -> „Rieske/lang“. Wird dagegen das erste Intron von 90 bp nicht entfernt, kommt es vom ersten Start-Codon (1. ATG) aus zum vorzeitigen Abbruch der Translation (Stopp-Codon in der Intronsequenz). Der Translationsstart am zweiten Start-Codon (2. ATG) ergibt dann das kürzere Vorstufenprotein mit dem 31 AS Transitpeptid -> „Rieske/kurz“

Es wurde aber deutlich, daß trotz der Verkürzung des Transitpeptids auf 31 Aminosäuren, die Information zum Chloroplastenimport des hier verwendeten Rieske-Vorstufenproteins immer noch vorhanden ist. Das plastidäre Rieske-Protein aus Spinat besitzt zusätzlich eine N-terminale Verlängerung von 18 Aminosäuren, die die Gesamtlänge des Transitpeptides auf 68 Aminosäuren erhöht. Somit läßt sich das unterschiedliche Laufverhalten der hier betrachteten Rieske-Vorstufenproteine durch den Größenunterschied der Transitpeptide erklären (37 AS entsprechen etwa 4 kDa).

Die innerplastidäre Verteilung zeigte, daß in allen vier Ansätzen der überwiegende Teil des importierten Proteins in der Stromafraktion zu finden war (Abb. 3-1). Dabei ließen die verwendeten Chloroplasten eine artspezifische Thylakoidtransportrate beider Rieske-Proteine erkennen. So gelangte bei den Erbsenplastiden nur ein geringer Teil des importierten Proteins bis in die Thylakoide (ca. 10 %). Dagegen erfolgte im Fall der Spinatchloroplasten der innerplastidäre Weitertransport beider Rieske-Proteine zu den Thylakoiden weitaus effizienter (ca. 30 %). Dabei zeigte das Rieske-Protein aus Spinat in beiden Systemen eine höhere Thylakoidtransportrate als das Protein aus *Arabidopsis*.

Nun stellte sich die Frage, ob die beobachtete *in vitro*-Verteilung des frisch importierten Rieske-Protein in isolierten Chloroplasten mit der *in vivo*-Situation übereinstimmt. Dazu wurden Pflanzenextrakte aus *Arabidopsis*, Erbse und Spinat gewonnen (Kapitel 2.2.13). Die Proteine der Gesamtextrakte wurden in Membranfraktion und lösliche Fraktion unterteilt. Es ist davon auszugehen, daß die Membranfraktion zum überwiegenden Teil aus Thylakoidvesikeln besteht, die lösliche Fraktion sollte sämtliche Stromaproteine beinhalten. Die Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine spezifische Detektion des Rieske-Proteins durch die entsprechenden Antikörper (Abb. 3-3).

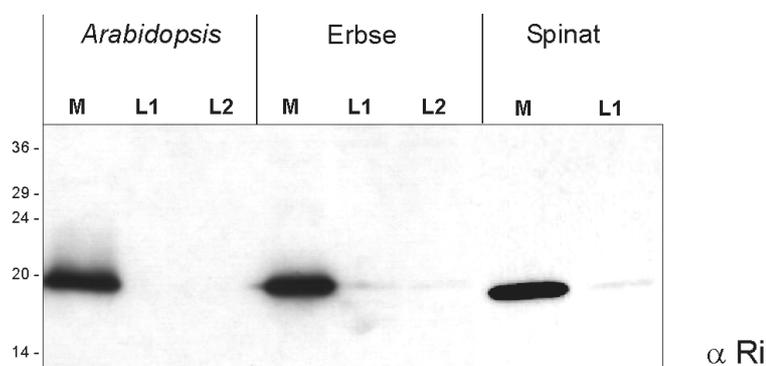


Abb. 3-3 Antikörpernachweis des Rieske-Proteins in verschiedenen Pflanzenfraktionen. Dazu wurde die Gesamtheit der Membranproteine (M) bzw. löslichen Proteine (L) aus unterschiedlichen Pflanzenarten (*Arabidopsis thaliana*, Erbse, Spinat) extrahiert und mittels SDS-PAGE (15%iges Minigel) aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Nachweis des Rieske-Proteins durch *Western*-Analyse verbunden mit einer ECL-Reaktion. Die Fraktionen L1 entsprechen einem 21 000 g Überstand, L2 einem 40 000 g Überstand.

Das Ergebnis der *Western*-Analyse ließ erkennen, daß in allen drei Fällen das Signal des Rieske-Antikörpers fast ausschließlich durch die Membranfraktion hervorgerufen wurde. Ein sehr schwaches Signal ist auch in den Fraktionen der löslichen Proteine aus Erbse und Spinat zu erkennen, im entsprechenden *Arabidopsis*-Extrakt ist kein Signal zu detektieren. Hier beschränkte sich die Verteilung des Rieske-Proteins auf die Membranfraktion, also

auf die Thylakoide. Die schwachen Signale in der löslichen Fraktion sind vermutlich auf eine Kontamination mit Membranvesikeln zurückzuführen, die durch Zentrifugation bei maximal 40 000 g nicht aus dem Überstand entfernt wurden.

Die *in vivo*-Verteilung des Rieske-Proteins, hier gezeigt für drei verschiedene Pflanzenspezies, weicht grundsätzlich von dem *in vitro* beobachteten Verteilungsmuster ab. In der Pflanze scheint das Vorkommen des Rieske-Proteins auf die Thylakoidmembran beschränkt zu sein, im Gegensatz dazu befindet sich beim *in vitro*-Transportexperiment mit isolierten Chloroplasten nur der geringere Anteil des importierten Proteins in der Membranfraktion, die Hauptmenge akkumuliert dagegen im Stroma. Diese Diskrepanz zwischen der *in vivo*- und *in vitro*-Verteilung mag ihre Ursache im Überangebot des *in vitro* translatierten Proteins gegenüber isolierter Chloroplasten haben. *In vivo* dagegen wird die Synthese des Rieske-Proteins dem Bedarf in der Thylakoidmembran angepaßt (Knight et al., 2002). So scheint es erst durch den Einsatz isolierter Plastiden überhaupt möglich zu sein, einen Transportprozeß so zu verlangsamen, daß er in Einzelschritte aufgelöst darstellbar wird. Die Ursache für den Transportstau könnte entweder in einer verzögerten Stromapassage oder in einer suboptimalen Thylakoidtranslokation des Proteins begründet liegen. Um diese Möglichkeiten näher zu analysieren, soll als erstes die Frage nach der Translokation und dem dafür verantwortlichen Thylakoidtransportsignal im Mittelpunkt stehen.

3.1.2 Das Rieske-Thylakoidtransportsignal und die Assemblierung in Membrankomplexe

3.1.2.1 Besonderheiten des Rieske-Thylakoidtransportsignals

Das plastidäre Rieske-Vorstufenprotein aus Spinat besteht aus einem einfachen stromadirigierenden Transitpeptid von 68 Aminosäuren und einem reifen Teil von 179 Aminosäuren. Dieses reife Protein wiederum läßt sich in eine hydrophobe N-terminale Domäne (48 AS) und eine hydrophile C-terminale Domäne (131 AS), die ins Thylakoidlumen exponiert ist und das Fe/S-Zentrum trägt, unterteilen (Abb. 2-1). Die hydrophobe Domäne des reifen Proteins bildet nicht nur einen Membrananker aus und fixiert somit das Rieske-Protein in der Thylakoidmembran, es enthält darüber hinaus die Information zum Erreichen dieser Membran. Dies wurde bereits experimentell für das Rieske-Protein aus Erbse und Spinat gezeigt (Madueno et al., 1994; Molik, 2000). Obwohl

funktionell die Fähigkeit des Rieske-Membranankers als Thylakoidtransportsignal gezeigt wurde, lassen sich auf struktureller Ebene kaum typische Merkmale für ein Signalpeptid erkennen. So zeigen Signalpeptide normalerweise eine Dreiteilung in: positiv geladenen N-Terminus (N-Region), hydrophobe Kernregion (H-Region) und polaren C-Terminus (C-Region) inklusive dem Ala-x-Ala-Motiv als Erkennungsstelle für die Thylakoidprozessierungspeptidase (TPP, von Heijne, 1985; von Heijne et al., 1989; Shackleton & Robinson, 1991). Bei Δ pH/Tat-spezifischen Signalen trägt die N-Region das namensgebende Zwillingsarginin-Motiv (*twin-arginine translocation*, Tat); die H-Region ist nur leicht hydrophob im Gegensatz zu Sec-Signalen und die C-Region kann ebenfalls eine oder mehrere positive Ladungen enthalten („Sec-Vermeidungsmotiv“; Bogsh et al., 1997; Mori & Cline, 2001). Diese Charakteristika eines Δ pH/Tat-spezifischen Transportsignals sind gut im Vorhersageergebnis für das Signalpeptid des 23 kDa-Proteins zu erkennen (Abb. 3-4 A). Zur Vorhersage wurde das Programm SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, Bendtsen et al., 2004) genutzt. Da für den Rieske-Membrananker durch dieses Vorhersageprogramm kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden konnte, sollte zumindest der Bereich der Transmembranregion durch das Programm TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) bestimmt werden (Abb. 3-4 B). Die Transmembranregion konnte so auf die Aminosäurereste 20 bis 42 des reifen Proteins eingegrenzt werden. Dieser Bereich würde der H-Region der Signalpeptidstruktur entsprechen. Allerdings weicht er mit einer Länge von 23 Aminosäureresten und dem großen Anteil sehr hydrophober Aminosäuren stark von den durchschnittlich 12-18 Aminosäurereste umfassenden, leicht hydrophoben Signalpeptiden des Δ pH/Tat-Weges ab. Auch die N-terminale Region weicht von typischen Δ pH/Tat-Signalen ab, da sie statt dem Zwillingsarginin-Motiv eine Lysin-Arginini (KR)-Sequenz trägt. In der C-Region treten weder polare Aminosäurereste noch positive Ladungen auf. Da es zu keiner Prozessierung des Proteins im Thylakoidlumen kommt, ist erwartungsgemäß keine TPP-Schnittstelle vorhanden.

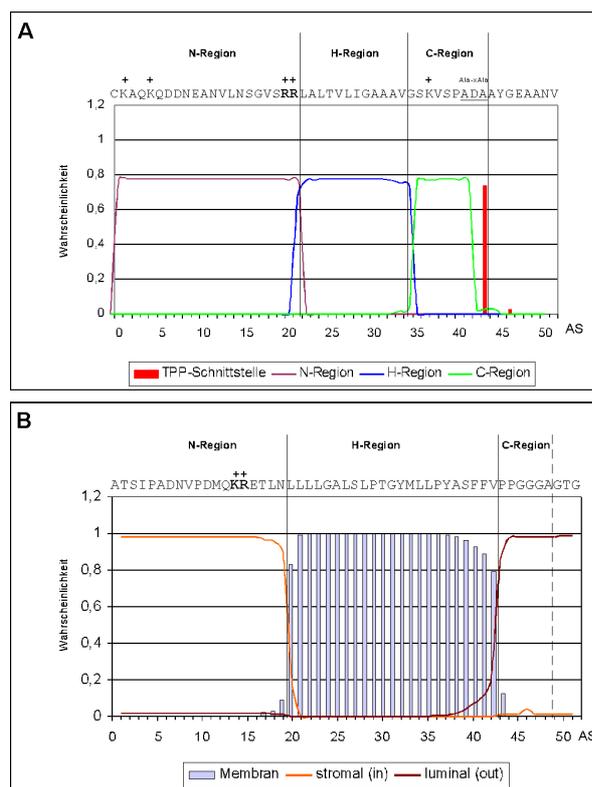


Abb. 3-4 Vergleich der $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -spezifischen Thylakoidtransportsignale des 23 kDa-Proteins (Signalpeptid) und des Rieske-Proteins (Membrananker). Dargestellt sind die Ergebnisse zur Vorhersage des 23 kDa-Signalpeptids mittels SignalP 3.0 (A) und die Bestimmung der Transmembranregion des Rieske-Thylakoidtransportsignals mittels TMHMM (B). Davon ausgehend wurde die typische Dreiteilung der Signalpeptide in N-H-C Region auf den Rieske-Membrananker übertragen. Charakteristische Merkmale $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -spezifischer Signale sind gekennzeichnet: die N-Region mit positiven Ladungen (+) inklusive des Zwillingsarginin-Motivs (RR), die C-Region mit einer positiven Ladung und dem Ala-x-Ala-Motiv der Prozessierungsstelle.

Das 23 kD Signalpeptid dagegen besitzt eine C-Region mit sowohl polaren als auch einem positiv geladenen Aminosäurerest. Die C-Region wird hier vom Ala-x-Ala Motiv, der TPP-Schnittstelle, beendet. Somit wird deutlich, daß der Rieske-Membrananker strukturell recht stark von einem Tat-Signal abweicht. Trotzdem handelt es sich bei dieser Sequenz um ein funktionelles $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -spezifisches Thylakoidtransportsignal (Madueno et al., 1994; Molik, 2000).

Jedoch könnten diese starken Abweichungen von typischen $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Signalpeptiden dazu führen, daß der Membrananker unter *in vitro*-Bedingungen ein effektives „Targeting“ des Transportsubstrats nicht erreichen kann. Ein Ansatz, diese Möglichkeit zu testen, ist, den Membrananker gegen ein typisches Signalpeptid auszutauschen. Käme es durch diese Veränderung zu einem beschleunigten Thylakoidtransport der luminalen Domäne, würde dies für einen Transportsignal-verursachten Transportstau, statt für eine verzögerte Stromapassage, ausgelöst durch die luminalen Domäne, sprechen.

3.1.2.2 Der Austausch des Rieske-Membranankers und die Veränderung der TPP-Schnittstelle

Um den Einfluß des Rieske-Membranankers als Thylakoidtransportsignal auf die Akkumulation des Proteins im Stroma zu analysieren, wurden bereits im Rahmen der Diplomarbeit Fusionsproteine hergestellt, in denen das vermutlich suboptimale Transportsignal durch verschiedene Signalpeptide ersetzt wurde. Dabei kamen sowohl $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ - (16 und 23 kDa) als auch Sec- (33 kDa und PC) spezifische Signale zum Einsatz. Die Konstrukte wurden als 16 (23, 33, PC)/Ri-h („Rieske minus h“, d.h. das reife Rieske-Protein ohne den hydrophoben Membrananker) bezeichnet (Abb. 2-1 und Tab. 2-1). Das Transportverhalten dieser Fusionsproteine wurde bereits in der Diplomarbeit analysiert (Molik, 2000). Da diese Konstrukte jedoch die Basis für weitere Experimente bildeten, soll an dieser Stelle ihr Transportverhalten kurz zusammengefaßt werden (Abb. 3-5).

So konnte gezeigt werden, daß lediglich die $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -spezifischen Signalpeptide der 16 und 23 kDa-Proteine eine erfolgreiche Translokation der luminalen Domäne des Rieske-Proteins über die Thylakoidmembran erreichten. Dagegen war es für Sec-spezifische Signalpeptide nicht möglich, einen Transport der luminalen Domäne über den entsprechenden Weg in die Thylakoide zu ermöglichen. Da der Sec-Weg auf den Transport von entfalteten Substraten beschränkt ist, deutet das Unvermögen zum Transport der luminalen Domäne mittels Sec-Signal bereits auf einen gewissen Faltungszustand des Proteins hin. Somit scheint die luminalen Domäne durchaus einen Einfluß auf das Transportverhalten zu haben. Auch ergab der Austausch des Thylakoidtransportsignals keine Steigerung der Thylakoidtransportrate bezüglich der luminalen Domäne. Es wurde sogar deutlich, daß in Kombination mit einem $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Signal weniger Protein in den Thylakoiden zu finden war, als im Ansatz mit dem authentischen Transportsignal. So scheint der Membrananker als Thylakoidtransportsignal einwandfrei zu funktionieren und ist wahrscheinlich für die Akkumulation des Proteins im Stroma nicht verantwortlich. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß die luminalen Domäne nach ihrer Freisetzung ins Thylakoidlumen proteolytischen Abbauprozessen unterworfen ist, und aus diesem Grund dort nicht stärker akkumulierte.

Als ein Aspekt im Zuge dieser Arbeit sollte der Rieske-Membrananker in Bezug auf die Assemblierungsfähigkeit in den Cytochrom b_6/f -Komplex noch etwas genauer analysiert werden.

Die Integration des Rieske-Proteins in den Cytochrom b_6/f -Komplex erfolgt hauptsächlich über die Interaktion des Membranankers mit der Transmembranhelix der Cytochrom f Untereinheit (El-Demerdash et al., 1988; Kurisu et al., 2003). Handelt es sich hierbei um eine spezifische Interaktion oder um eine hydrophobe Wechselwirkung, die auch von anderen hydrophoben Sequenzen (wie der H-Region von Signalpeptiden) ausgeübt werden kann und die somit nicht unbedingt auf den Rieske-Membrananker beschränkt ist? Diese Frage läßt sich mit Hilfe der bereits erwähnten Fusionsproteine, in denen der Rieske-Membrananker durch typische Signalpeptide ersetzt wurde, untersuchen. Da diese Signalpeptide, im Gegensatz zum Membrananker, eine TPP-Schnittstelle besitzen, die zur Freisetzung der luminalen Domäne führt, ist es erforderlich, diese im voraus zu „inaktivieren“. Nur so ist es möglich, ein membranständiges stabiles Fusionsprotein, bestehend aus Transmembranhelix und luminaler Domäne zu erhalten. Da das Rieske-Protein offensichtlich über keine TPP-Schnittstelle verfügt, sollten die letzten fünf Aminosäuren der Signalpeptide, die das Ala-x-Ala-Motiv und damit die TPP-Schnittstelle einschließen, durch die letzten fünf Aminosäuren des Rieske-Membranankers (Pro-Gly-Gly-Gly-Ala) ersetzt werden. Die dafür notwendige Mutagenese wurde auf DNA-Ebene mit Hilfe eines *Site-Directed Mutagenesis Kit* und entsprechend modifizierten Primern durchgeführt (Kapitel 2.2.2). Sowohl das Konstrukt mit dem $\Delta pH/Tat$ -spezifischen Signalpeptid des 16 kDa-Proteins als auch das Konstrukt mit dem Sec-spezifischen Signalpeptid des 33 kDa-Proteins wurde dieser Mutagenese unterzogen. Die resultierenden Variationen wurden als 16*/Ri-h bzw. 33*/Ri-h bezeichnet, wobei der Stern für die manipulierte TPP-Schnittstelle steht.

3.1.2.3 Import- und Assemblierungsverhalten der chimären Rieske-Proteine

Beide manipulierten Fusionsproteine (16*/Ri-h ,33*/Ri-h) wurden zusammen mit den Ausgangskonstrukten (16/Ri-h, 33/Ri-h) *in vitro*-synthetisiert und anschließend in isolierte Spinat- bzw. Erbsenchloroplasten transportiert (Abb. 3-5 A und B). Hierbei erfolgte die *in vitro*-Translation in Gegenwart von [^{35}S]-Cystein, da nur so eine Markierung der luminalen Domäne erfolgen konnte. Im Fall der 33 kDa-Fusionsproteine führte die Manipulation der TPP-Schnittstelle zu einer deutliche Anreicherung des Intermediats in der Stromafraktion. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Denkbar ist eine erhöhte Stabilität des manipulierten Proteins gegenüber stromalen Proteasen. Ein Teil der Intermediatform lag auch gebunden an die Thylakoidmembran vor, wurde aber durch die extern zugeführte Protease nahezu vollständig abgebaut.

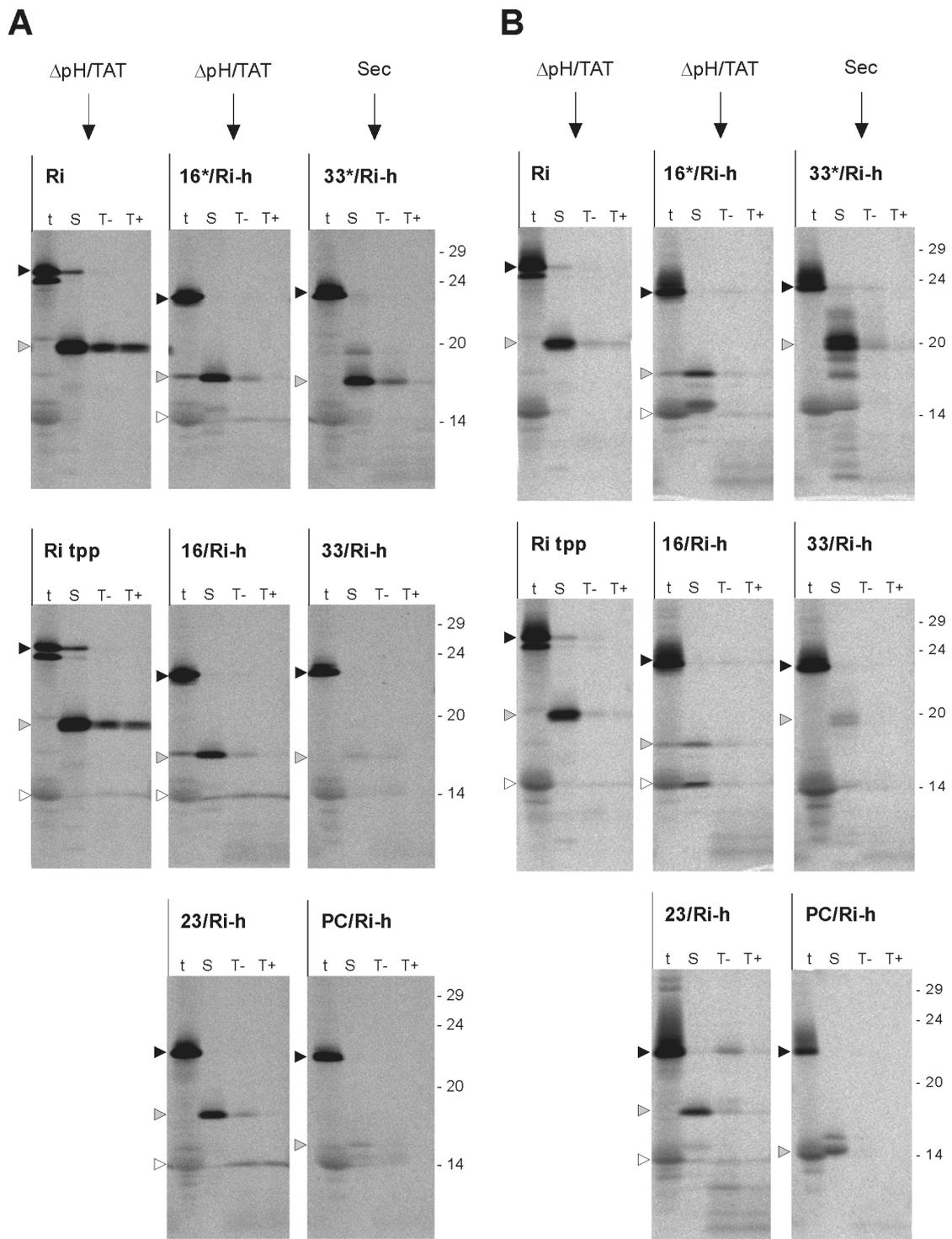


Abb. 3-5 *In organello*-Import des authentischen und verschiedener chimärer Rieske-Proteine (Spinat) in isolierte Spinat- bzw. Erbsenplastiden. Dargestellt sind Expositionen von 10-17,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die jeweils angegebenen Vorstufenproteine wurden in Spinatchloroplasten (A) und Erbsenchloroplasten (B) importiert. Die Spezifität der Thylakoidtransportsignale ist über den einzelnen Spalten angegeben. Die mit (*) gekennzeichneten Konstrukte enthalten die manipulierte TPP-Schnittstelle. Die schwarze Pfeilspitze kennzeichnet das Vorstufenprotein, die graue bzw. weiße das Produkt der Stroma- bzw. Thylakoidprozessierung. Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 3-1.

Somit erfolgte auch in diesem Fall keine Sec-abhängige Translokation der luminalen Domäne (Abb. 3-5, T+ Spur). Dagegen zeigte der Vergleich im Transportverhalten der 16 kDa-Protein-Fusionen mit authentischer (16/Ri-h) und manipulierter TPP-Schnittstelle (16*/Ri-h) auf den ersten Blick keinen signifikanten Unterschied. Wie bereits für das Fusionsprotein 16/Ri-h beschrieben, ist auch die Thylakoidtransportrate des frisch importierten Proteins 16*/Ri-h nur gering, so daß der überwiegende Teil des Proteins im Stroma zu finden war. Überraschenderweise erfolgte die TPP-abhängige Prozessierung des Konstrukts 16*/Ri-h aber weiterhin, trotz der Manipulation der entsprechenden Schnittstelle. Dabei wurde die luminal Domäne, die ein apparentes Molekulargewicht von 14 kDa aufweist, freigesetzt. Die Prozessierungseffizienz war allerdings geringer als für die original TPP-Schnittstelle (KAVLA), wie sie im Konstrukt 16/Ri-h vorliegt. Es ist jedoch aus diesem Experiment klar zu erkennen, das die PGGGA-Sequenz des Rieske-Membranankers durchaus das Potential einer TPP-Schnittstelle besitzt, die zwar im authentischen Protein nicht genutzt wird, aber in Kombination mit einem anderen Signalpeptid aktiviert werden kann.

Auch das Vorhersageergebnis des Programms SignalP zeigte, daß aus der potentiellen TPP-Schnittstelle im Konstrukt 16/Ri-h, die eine Wahrscheinlichkeit von 0,8 besitzt, durch Manipulation im Konstrukt 16*/Ri-h eine Sequenz mit einer Prozessierungswahrscheinlichkeit von 0,5 entsteht (Abb. 3-6).

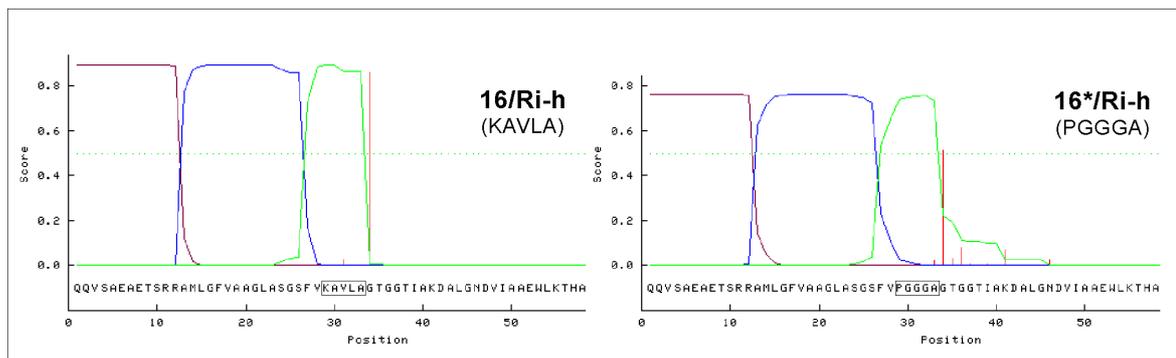


Abb. 3-6 Veränderung der Prozessierungswahrscheinlichkeit durch Manipulation der TPP-Schnittstelle im Konstrukt 16/Ri-h. Dargestellt ist das Ergebnis des Programms SignalP für das authentische Signalpeptid des 16 kDa Proteins im Konstrukt 16/Ri-h und für das manipulierte Signalpeptid im Konstrukt 16*/Ri-h. Die veränderte Sequenz ist eingerahmt. Die rote Vertikale gibt die Prozessierungswahrscheinlichkeit (*score*) an. Die Farbgebung der Linien erfolgt nach Abb. 3-4 A.

Experimentell wurde so bestätigt, daß durch die Veränderung an der TPP-Schnittstelle von der ursprünglichen KAVLA-Sequenz zur PGGGA-Sequenz die Möglichkeit zur Prozessierung durch die TPP zwar herabgesetzt, aber prinzipiell erhalten bleibt. Obwohl die Menge an Protein, die während der Inkubationszeit zur Thylakoidmembran transportiert

wurde, nur gering war, erfolgte die dortige Prozessierung durch die TPP nahezu quantitativ. So ist nur ein geringer Anteil des unprozessierten, reifen Fusionsproteins in der unbehandelten Thylakoidfraktion zu finden (Abb. 3-5; T-, grauer Pfeil), der allerdings durch die anschließende Proteasebehandlung vollständig degradiert wurde. Dies zeigt, daß die Prozessierung der Fusionsproteine durch die TPP unmittelbar an die Translokation gekoppelt ist.

Eine gegensätzliche Beobachtung konnte durch den Einsatz des Rieske tpp-Proteins gemacht werden. In diesem Protein wurde am Ende des Membranankers eine TPP-Schnittstelle erzeugt, indem die vorhandene PGGGA-Sequenz gegen die letzten fünf Aminosäurereste des Plastocyanin-Signalpeptids (GNAMA) ausgetauscht wurde. Das Importergebnis mit dem Rieske tpp-Protein zeigte, daß ein Großteil des thylakoid-lokalisierten Proteins in Form des reifen Polypeptids vorlag und somit nicht durch die luminalen TPP prozessiert wurde (Abb. 3-5). In diesem Fall erfolgte nicht zwangsläufig nach der Translokation die TPP-abhängige Freisetzung der luminalen Domäne, wie es bei den Fusionsproteinen, bestehend aus Tat-spezifischem Signalpeptid und luminaler Domäne, beobachtet wurde.

Nachdem nun das Importverhalten der Fusionsproteine (die luminalen Rieske-Domäne kombiniert mit verschiedenen Transitpeptiden) dargestellt wurde, sollte nun deren Assemblierung in hochmolekulare Proteinkomplexe der Thylakoidmembran analysiert werden.

Die Assemblierung von frisch importierten Proteinen in Komplexe der Thylakoidmembran läßt sich mit Hilfe der *Blue native* (BN)-Gelelektrophorese verfolgen. Dazu wurden nach dem Importversuch die Proteinkomplexe mit dem Detergens Digitonin aus der Lipidschicht herausgelöst, mit Coomassie G250 versetzt und auf einem nicht-denaturierenden Gel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt (Kapitel 2.2.7). Unmittelbar nach der Elektrophorese lassen sich die fünf Hauptkomplexe der Photosynthesekette erkennen, die durch den Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne Untereinheiten der jeweiligen Komplexe als Photosystem I (PSI), ATP-Synthase (ATP-S.), Photosystem II (PSII), Cytochrom b_6/f -Komplex (Cyt. b_6/f) und dem Lichtsammelkomplex des Photosystems II (LHCII) identifiziert wurden (Berghöfer, 1998; Molik et al., 2001). Die ungefähren Größen der Proteinkomplexe wurde durch Einsatz eines HMW (*high molecular weight*)-Markers bestimmt. So konnten für die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran aus Spinat folgende Größen ermittelt werden: PSI - 640 kDa, ATP-Synthase - 570 kDa, PSII - 390 kDa, Cyt. b_6/f - 330 kDa und LHCII - 220 kDa (Abb. 3-7).

Die Methode der BN-Gelelektrophorese wurde nun angewandt, um die Assemblierungsfähigkeit der verschiedenen Rieske-Fusionsproteine zu analysieren. Zu diesem Zweck kamen neben den Chimären auch das authentische Rieske-Protein und die Rieske tpp-Variante zum Einsatz. Sämtliche Proteine wurden *in vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-Cystein synthetisiert und anschließend mit intakten Spinatchloroplasten inkubiert. Nach dem Import wurden die Thylakoidmembranen vom Stroma getrennt und durch das Detergens Digitonin solubilisiert. Nichtgelöste Membranen wurden durch Zentrifugation entfernt und der lösliche Überstand, versetzt mit Coomassie G250, konnte mittels BN-PAGE aufgetrennt werden. Dieses Experiment zeigte, daß alle frisch importierten Proteine in Komplexe der Thylakoidmembran integriert wurden. So sind neben einer leichten Hintergrundmarkierung drei spezifische Banden zu erkennen (Abb. 3-7).

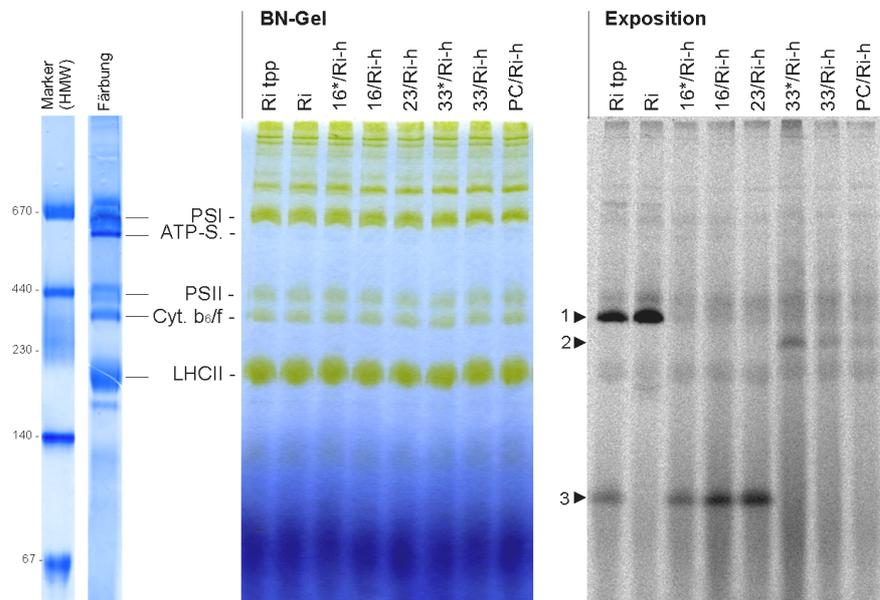


Abb. 3-7 **Assemblierung des authentischen und verschiedener chimärer Rieske-Proteine in Komplexe der Thylakoidmembran isolierter Spinatchloroplasten.** Dargestellt sind die Exposition eines 5-13%igen *Blue native* (BN)-Gels (rechts), das entsprechende Gel (Mitte) sowie der mitgeführte HMW-Marker und eine gefärbte Spur des *Blue native*-Gels (links). Als colorierte Banden sind nach dem Gellauf die fünf Photosynthesekomplexe erkennbar: Photosystem I (PSI), ATP-Synthase (ATP-S.), Photosystem II (PSII), Cytochrom b₆/f-Komplex (Cyt. b₆/f) und Lichtsammelkomplex vom PSII (LHCII). Die Thylakoide wurden nach dem Organellimport der oben angegebenen Vorstufenproteine gewonnen (ca. 30 µg Chl. entsprechende Menge), mit Digitonin solubilisiert und nativ aufgetrennt. Die Exposition zeigte drei verschiedene Banden (1 bis 3), wobei Bande 1 dem Cyt. b₆/f-Komplex entspricht. Das apparente Molekulargewicht für Bande 2 liegt bei ca. 280 kDa, für Bande 3 bei ca. 100 kDa.

So assemblierte das authentische Rieske-Protein erwartungsgemäß in den Cytochrom b₆/f-Komplex (Komplex 1), ebenfalls die Rieske tpp-Variante. Neben der Markierung des Cytochrom b₆/f-Komplexes tauchte bei dieser Form des Rieske-Proteins eine weitere Bande im unteren Teil des Gels auf (Komplex 3), die vom Laufverhalten abgeleitet eine Größe von ca. 100 kDa aufwies. Diese Bande erschien in unterschiedlicher Intensität

ebenfalls bei Verwendung der chimären Proteine mit Tat-spezifischen Signalpeptid (16*/Ri-h, 16/Ri-h und 23/Ri-h). Jedoch kam es in diesen drei Fällen nicht zur Markierung des Cytochrom b_6/f -Komplexes, folglich auch nicht zur Integration der chimären Proteine in diesen Komplex. Für die Chimären mit Sec-spezifischem Signalpeptid, und hier am auffälligsten für das 33*/Ri-h Protein, ließ sich im BN-Gel ein Komplex von ca. 280 kDa detektieren (Abb. 3-7; Komplex 2). Ist für den Komplex 1 die Identifikation als Cytochrom b_6/f -Komplex sicher, läßt sich über die Zusammensetzung der Komplexe 2 und 3 nur spekulieren. Da das Auftreten des Komplexes 2 auf die chimären Proteine mit Sec-Signal beschränkt ist, könnte es sich hierbei um den Komplex der Sec-Translokase handeln. Eine Translokation der luminalen Domäne erfolgt über diesen Transportweg zwar offensichtlich nicht, eine Markierung der Sec-Translokase durch Bindung des 33 kDa-Signalpeptids ist deswegen jedoch nicht ausgeschlossen. Eine detailliertere Analyse dieses Komplexes ist im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

Da der Komplex 3 nicht beim authentischen Rieske-Protein sondern erst nach Generierung einer TPP-Schnittstelle auftritt, legt das die Vermutung nahe, daß dieser Komplex die durch die TPP freigesetzte luminal Domäne des Rieske-Proteins enthält. Auch die Chimären mit Tat-Signalpeptid besitzen eine TPP-Schnittstelle, die, wie oben bereits beschrieben, nach der Translokation des Proteins auch genutzt wird und zur Abspaltung der luminalen Domäne führt. Da im Falle der Chimären nur dieses Prozessierungsprodukt vor Proteaseabbau geschützt ist, unterstützt das die Annahme, das der Komplex 3 die luminal Domäne enthält. Diese Vermutung ließ sich durch eine denaturierende Auftrennung der Proteinkomplexe des BN-Gels in der zweiten Dimension (2D) bestätigen (Abb. 3-8). Obwohl die Signale des 2D-Gels zum Teil sehr schwach sind, läßt sich erkennen, daß die Auftrennung des Komplexes 3 (Position 5 im BN-Gel) ausschließlich ein Signal von 14 kDa, der Größe der luminalen Domäne entsprechend, lieferte. Die Intensität des Signals ist für das Protein 23/Ri-h am stärksten, für die zwei Chimären mit dem 16 kDa-Signalpeptid und für das Rieske tpp-Protein sind die Signale in der zweiten Dimension nur sehr schwach. Dies korreliert allerdings mit den Signalstärken der einzelnen Proteine für den Komplex 3 im BN-Gel. Die Auflösung des Cytochrom b_6/f -Komplexes in der zweiten Dimension zeigte, daß hier lediglich das vollständige, reife Protein mit dem Molekulargewicht von 20 kDa integriert werden konnte, nicht jedoch die luminal Rieske-Domäne allein.

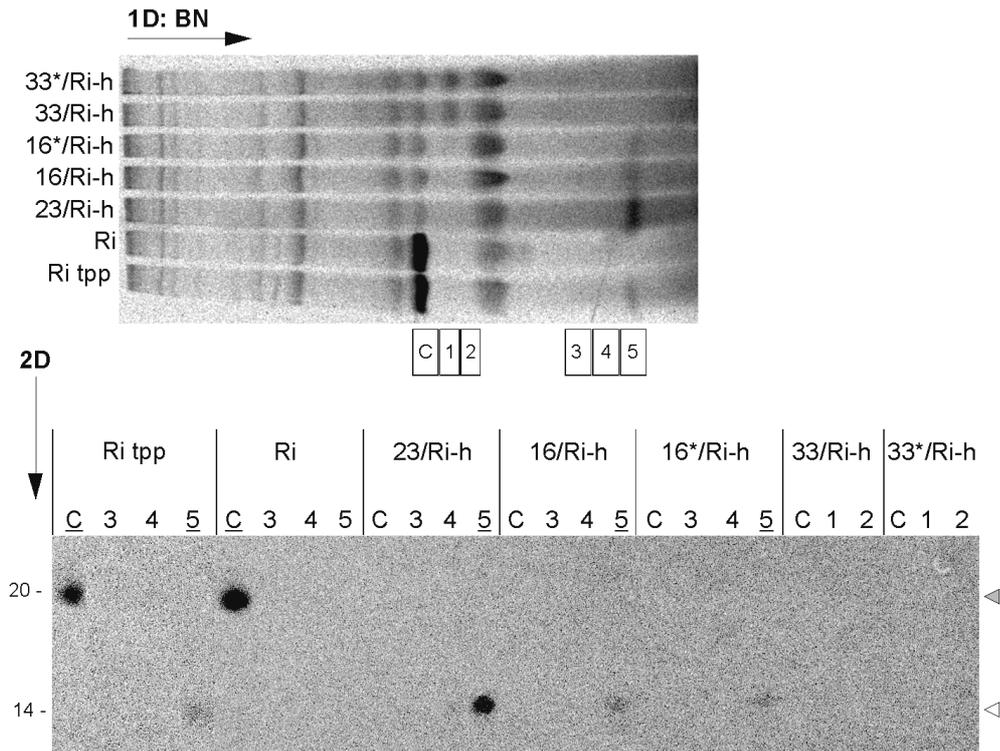


Abb. 3-8 Auftrennung von Membrankomplexen in der zweiten Dimension (2D). Wie für Abb. 3-7 beschrieben, wurden die Thylakoide nach dem Import der entsprechenden Vorstufenproteine in isolierte Spinachchloroplasten solubilisiert und mittels BN-PAGE aufgetrennt (erste Dimension, 1D, oben). Aus diesem Gel wurden die gekennzeichneten Bereiche (Cyt. b_6/f [C] und 1 bis 5) ausgeschnitten und in einem 15 %igen SDS-Gel analysiert (2D, unten). Die Bereiche, in denen Signale detektiert wurden, sind unterstrichen. Die graue Pfeilspitze kennzeichnet das reife Rieske-Protein, die weiße Pfeilspitze die durch die TPP freigesetzte luminal Domäne.

Die Assemblierungsfähigkeit in den Cytochrom b_6/f -Komplex beschränkte sich auf das authentische Rieske-Protein und die Rieske tpp-Variante. Die chimären Proteine wurden nicht in diesen Komplex eingebaut. Dies mag allerdings darin begründet liegen, daß trotz Manipulation der TPP-Schnittstelle die nahezu vollständige Prozessierung der chimären Proteine die Verbindung zwischen Transmembranhelix und luminaler Domäne zerstörte und somit kein stabiles Fusionsprotein in der Thylakoidmembran vorlag, das in den Cytochrom b_6/f -Komplex hätte integriert werden können. Somit kann die Frage nach der Spezifität der Membranhelix für die Assemblierungsfähigkeit des Rieske-Proteins in den Cytochrom b_6/f -Komplex nicht endgültig beantwortet werden. Die luminal Domäne allein reicht zumindest nicht aus, um eine Interaktion mit dem Cytochrom b_6/f -Komplex zu erreichen. Um ein stabiles Fusionsprotein mit Membrananker auch nach der Fusion mit fremden $\Delta pH/Tat$ -Signalen zu erhalten, müßte eine drastischere Veränderung an der TPP-Schnittstelle durchgeführt werden, damit die Prozessierung vollständig blockiert wird. Erst dann ließe sich möglicherweise eine Aussage darüber machen, ob der Rieske-Membrananker funktionell durch ein Signalpeptid ersetzbar ist.

Die Auftrennung des 280 kDa-Komplexes (Komplex 2), der durch die 33 kDa-Fusionsproteine markiert wurde, ergab in der zweiten Dimension leider kein Signal (Abb. 3-8, Position 1 und 2). Die Ursachen hierfür sind unbekannt.

Alle bis jetzt beschriebenen Ergebnisse wurden durch die Nutzung isolierter Chloroplasten aus Spinat erzielt. Um sicher zu gehen, daß das beobachtete Transportverhalten der chimären Proteine nicht nur für die verwendete Pflanzenspezies spezifisch ist, wurden die gezeigten Importversuche mit isolierten Plastiden aus Erbse wiederholt. Im Erbsensystem zeigten sich prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie zuvor für den Import in Spinatplastiden beschrieben (Abb. 3-5 B). Da jedoch die Thylakoidtransportrate für das Rieske-Protein in Erbsenchloroplasten im Vergleich zu der in Spinatplastiden deutlich herabgesetzt ist, befand sich generell weniger Protein in den Thylakoidfraktionen. Die luminaire Rieske-Domäne wurde auch im Erbsensystem nur in Abhängigkeit von Δ pH/Tat-spezifischen Signalpeptiden über die Thylakoidmembran transportiert, die Menge ist jedoch nur sehr gering. Außerdem scheint es in den Erbsenchloroplasten sowohl im Stroma als auch in den Thylakoiden verstärkt zur Degradation des importierten Proteins zu kommen. Dies war besonders in der Stromafraktion für das chimäre Protein 33*/Ri-h zu erkennen, wo es vermehrt zu Bildung von kleineren Degradationsprodukten kam (Abb. 3-5 B). Außerdem erfolgte die Prozessierung dieses chimären Proteins zum stromalokalisierten Intermediat in Erbsen- bzw. Spinatchloroplasten an zwei unterschiedlichen Stellen innerhalb des Transitpeptids (Abb. 3-9).

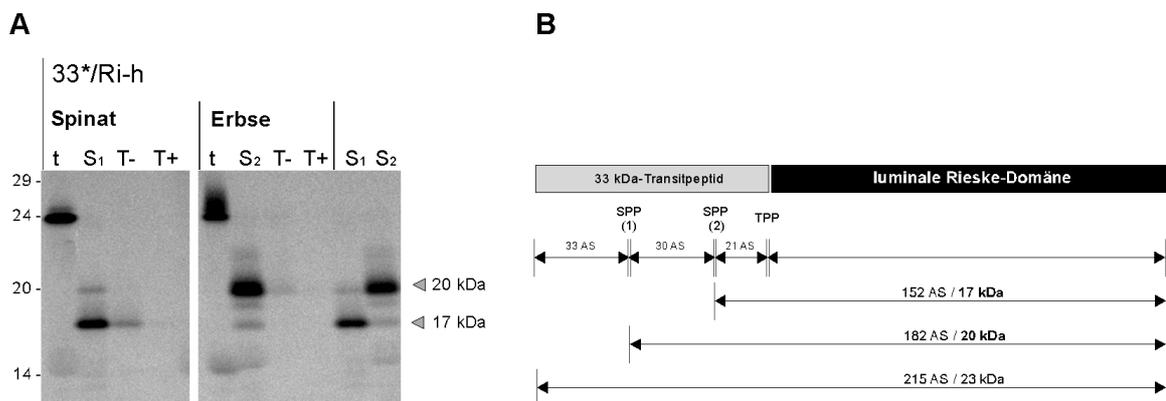


Abb. 3-9 Prozessierung des chimären Proteins 33*/Ri-h durch die SPP in Erbse und Spinat. Dargestellt ist die Exposition eines 10-17%igen Gradientengels (A) und die Prozessierungsmöglichkeiten des 33 kDa-Transitpeptids (B). Das Protein 33*/Ri-h wurde in Erbsen- bzw. Spinatplastiden importiert und die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Analyse des gesamten Transitpeptids über das Programm ChloroP ergab die Position SPP (1) als stromale Prozessierungsstelle. Die Analyse der 51 C-terminalen AS des Transitpeptids ergab die Position SPP (2). Die AS bzw. die abgeleiteten Molekulargewichte der verschiedenen Prozessierungsformen sind angegeben (B).

Wird die Länge des Chloroplastenimportsignals über das Programm ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, Emanuelsson et al., 1999) bestimmt, beträgt das theoretische Molekulargewicht des Intermediats, bestehend aus dem 33 kDa Signalpeptid und der luminalen Domäne etwa 20 kDa (182 AS). Damit scheint im Erbsenstroma primär die vorhergesagte Prozessierungsstelle genutzt zu werden, im Spinatstroma dagegen akkumuliert hauptsächlich ein Produkt von 17 kDa. Das Vorhersageprogramm ChloroP findet 30 Aminosäurereste abwärts der mutmaßlichen SPP-Schnittstelle (*score* 0,557) eine zweite Prozessierungsstelle mit geringerer Wahrscheinlichkeit (*score* 0,45). Diese 30 Aminosäurereste entsprechen einem Molekulargewicht von 3,1 kDa. Somit läßt sich der Größenunterschied von rund 3 kDa zwischen den Prozessierungsprodukten des 33*/Ri-h Proteins in Erbse und Spinat durch das Vorhandensein von zwei potentiellen SPP-Schnittstellen erklären. Durch das Programm SignalP wurde auch für das um 30 Aminosäuren verkürzte Signalpeptid (Länge: 21 AS), das durch Nutzung der zweiten potentiellen SPP-Schnittstelle erzeugt wird, noch ein vollständiges Thylakoidtransportsignal mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,0 vorhergesagt (Daten nicht gezeigt).

Die Assemblierung der authentischen und chimären Proteine in Komplexe der Thylakoidmembran zeigte in Erbse ein vergleichbares Bild zu den Ergebnissen, die zuvor durch den Einsatz von Spinatplastiden erhalten wurden (Abb. 3-10).

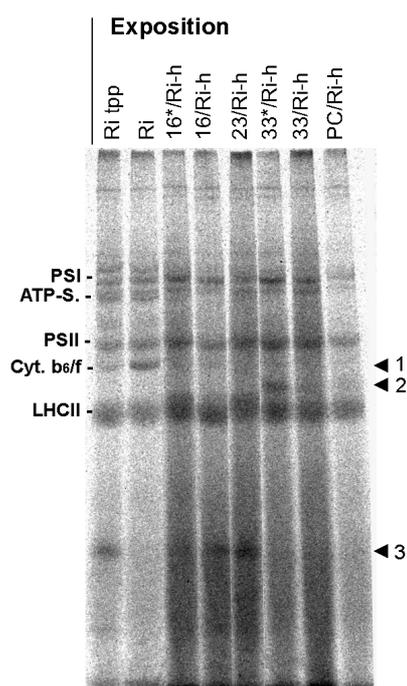


Abb. 3-10 Assemblierung des authentischen und verschiedener chimärer Rieske-Proteine in die Thylakoidmembran von Erbsenplastiden. Dargestellt ist die Exposition eines 5-13%igen BN-Gels. Das Experiment wurde analog den Angaben in Abb. 3-7 durchgeführt, nur diesmal mit Erbsenplastiden. Der Cytochrom b_6/f -Komplex (1) sowie die Komplexe 2 und 3 sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Da wie bereits erwähnt, die Thylakoidtransportrate von frisch importierten Proteinen im Erbsensystem nicht besonders hoch ist, sind nur schwache Signale für die Komplexe 1 (Cytochrom b_6/f -Komplex) bis 3 zu erkennen, die sich kaum von den Hintergrundbanden abheben. Aus einem unbekanntem Grund war die unspezifische Markierung der Photosynthesekomplexe in Erbsenplastiden viel stärker als es zuvor im Spinatsystem beobachtet wurde. Dennoch kann man aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse mit Spinat- und Erbsenplastiden davon ausgehen, daß die beobachtete Integration der chimären Proteine in die Komplexe der Thylakoidmembran spezifisch ist und nicht von der verwendeten Chloroplastenart bestimmt wird. Im nächsten Schritt wurde versucht, die Identität des Komplexes 2 näher zu bestimmen.

3.1.2.4 Versuche zur Identifizierung der BN-Gel-Komplexe

Die chimären Proteine, bestehend aus luminaler Rieske-Domäne und Sec-spezifischem Signalpeptid, werden zwar nicht über die Thylakoidmembran transportiert, markieren jedoch einen Thylakoidmembrankomplex mit einer Größe von etwa 280 kDa (Abb. 3-7). Es lag die Vermutung nahe, daß es sich dabei um die Sec-Translokase handeln könnte, die das angebotene Substrat zwar binden, aber aufgrund des Faltungszustands nicht transportieren kann.

Die plastidäre Sec-Translokase enthält die zwei Membranprotein-Untereinheiten cpSecY und cpSecE. Im Transport-aktiven Zustand kommt eine dritte, normalerweise im Stroma vorliegende Untereinheit, cpSecA, dazu (Yuan et al., 1994; Mori & Cline, 2001). Für die cpSecE-Untereinheit aus *Arabidopsis* wurde ein Molekulargewicht von etwa 16 kDa, für die cpSecY-Untereinheit von etwa 44 kDa ermittelt (Schünemann et al., 1999). Plastidäre SecA-Proteine haben eine durchschnittliche Größe von 110 kDa, wie es für die entsprechenden Proteine aus Erbse, Spinat und Mais gezeigt wurde (Yuan et al., 1994; Nohara et al., 1995; Berghöfer et al., 1995; Voelker et al., 1997). Unter nativen Bedingungen wurde cpSecA aus Erbse als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 200-250 kDa isoliert (Yuan et al., 1994). Für den membranständigen cpSecYE-Translokasekomplex aus *Arabidopsis* konnte mittels Gelfiltration eine Größe von etwa 180 kDa ermittelt werden (Schünemann et al., 1999). Dieser Komplex enthält eine unbekannt Anzahl von cpSecE- und cpSecY-Molekülen, möglicherweise auch bislang nicht identifizierte Untereinheiten. Somit weicht der in der Literatur beschriebene Komplex rund 100 kDa von dem im BN-Gel beobachteten etwa 280 kDa großen Komplex 2 ab. Da es sich

um zwei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Proteinkomplexgröße (Gelfiltration bzw. BN-PAGE) und um zwei verschiedene Pflanzenspezies (*Arabidopsis* bzw. Spinat) handelte, sollte versucht werden, die Position der Sec-Translokase aus Spinat im BN-Gel durch *Western*-Analyse zu bestimmen. Zur Vorbereitung wurden Thylakoidmembranen aus isolierten Spinatchloroplasten mittels Digitonin solubilisiert und über BN-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden cpSecA und cpSecY mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3-11). Zum Vergleich erfolgte der Nachweis des Cytochrom b_6/f -Komplexes mittels Rieske-Antikörper (Abb. 3-11).

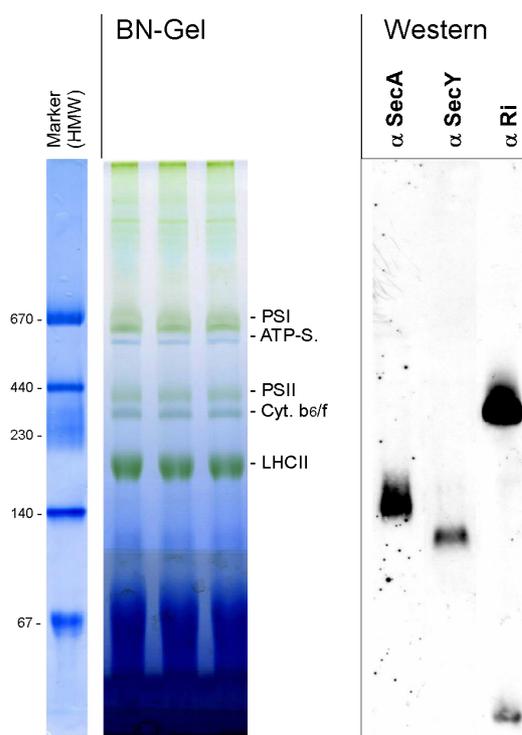


Abb. 3-11 Immunlokalisierung plastidärer Sec-Komponenten im *Blue native*-Gel. Spinathylakoide wurden solubilisiert und zusammen mit dem HMW-Marker mittels *Blue native*-PAGE aufgetrennt (BN-Gel, links). Die Proteinkomplexe wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert und in einzelne Streifen zerschnitten, die separat mit den Antikörpern gegen cpSecA, cpSecY und Rieske (α SecA, α SecY, α Ri) behandelt wurden. Die Detektion erfolgte durch eine ECL-Reaktion (*Western*, rechts).

Durch die beiden Sec-Antikörper wurde je ein Komplex im BN-Gel detektiert, die sich in ihrem Laufverhalten jedoch unterscheiden. So reagierte der cpSecA-Antikörper mit einem Komplex von etwa 155 kDa; der cpSecY-Antikörper erkannte dagegen einen Komplex von ca. 120 kDa. Damit scheint im Transport-inaktiven Zustand der membrangebundene Anteil des cpSecA-Pools mit der cpSecYE-Translokase nicht in Verbindung zu stehen.

Die apparente Größe des detektierten cpSecA-Komplexes liegt mit ca. 155 kDa zwischen der theoretischen Größe der Monomer- (110 kDa) und der Dimerform. Der hier beobachtete cpSecY-haltige Komplex weicht mit seiner Größe von 120 kDa etwa 60 kDa

von dem aus *Arabidopsis thaliana* über Gelfiltration gereinigten cpSecYE-Komplex ab (Schünemann et al., 1999).

Um einen Eindruck von den Größen der Monomere zu bekommen, wurden die Komplexe des BN-Gels in einer zweiten, denaturierenden Dimension (2D) aufgetrennt. Dazu wurden die in Abb. 3-12 gekennzeichneten Bereiche aus dem nativen Gel ausgeschnitten und mittels SDS-PAGE und anschließendem *Western blot* analysiert. Dabei detektierte der SecA-Antikörper eine Bande von ca. 116 kDa, der SecY-Antikörper reagierte mit einem Protein von etwa 45 kDa.

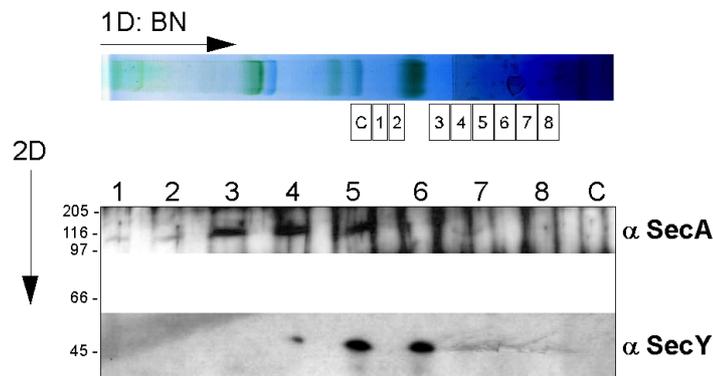


Abb. 3-12 Immunonachweis plastidärer Sec-Komponenten nach Auftrennung in der zweiten Dimension (2D). Proteinkomplexe solubilisierter Spinathylakoide wurden wie zu Abb. 3-11 beschrieben in der ersten Dimension in einem *Blue native*-Gel aufgetrennt (1D: BN, oben), die gekennzeichneten Gelbereiche (Cyt. b₆/f [C] und 1 bis 8) wurden ausgeschnitten und die enthaltenen Komplexe wurden parallel auf zwei 12 %igen SDS-Minigel aufgetrennt (2D), die anschließend einer *Western*-Analyse mit Antikörpern gegen cpSecA und cpSecY unterzogen wurden (α SecA, α SecY). Die Detektion erfolgte über die ECL-Rektion (unten).

Beide Signale lassen sich gut mit den theoretischen Molekulargewichten von 110 kDa für cpSecA bzw. 46 kDa für cpSecY vereinbaren (Berghöfer et al., 1995; Schüneman et al., 1999). Die Verteilung des cpSecA-Proteins im BN-Gel ist hauptsächlich auf den Bereich 3 bis 5 begrenzt, das cpSecY-Protein ist im Bereich 5 und 6 zu finden. Somit gibt es hier eine räumliche Überschneidung von cpSecA und cpSecY im Bereich 5. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Auftrennung von Proteinkomplexen im BN-Gel nicht immer gleich gut funktioniert und der Versuch, gleiche Gelbereiche in verschiedenen Spuren auszuschneiden, etwas fehleranfällig ist.

Ein sehr schwaches Signal läßt sich für das cpSecA-Protein auch in den Bereichen 1 und 2, die der Position des Komplexes 2 entsprechen, erkennen. Dagegen läßt sich cpSecY in diesem Bereich nicht nachweisen. Damit besteht die Möglichkeit, daß cpSecA an dem durch 33(33*)/Ri-h markierten Komplex 2 beteiligt ist.

Die bisherige *Western*-Analyse wurde im Gegensatz zu den Importversuchen mit den radioaktiv markierten chimären Rieske-Proteinen, mit Thylakoiden ohne externes Transportsubstrat durchgeführt. Dies könnte der Grund für die unterschiedlichen Komplexzusammensetzungen bzw. -größen sein. Die Sec-Translokase sollte im Transportaktiven Zustand, d.h. in Gegenwart eines Transportsubstrates, aufgrund des Zusammenfindens von cpSecA und dem *Precursor* mit dem membranständigen cpSecYE-Komplex an Größe zunehmen. So wurde ein weiterer Versuch zur Identifikation der Sec-Translokase im BN-Gel durchgeführt. Diesmal wurden die isolierten Spinatchloroplasten zuvor unter Importbedingungen mit dem Sec-Substrat 33 kDa-Protein (Yuan & Cline, 1994), das durch Überexpression in *E. coli* gewonnen wurde, inkubiert. Die Anwesenheit des Transportsubstrates im Chloroplastenstroma und damit die Verfügbarkeit für die Sec-Translokase, wurde über *Western*-Analyse mit dem 33 kDa-Antikörper nachgewiesen (Abb. 3-13). Zur Beeinflussung der Sec-abhängigen Translokation wurden den Importansätzen zum Teil Inhibitoren zugegeben. Dabei kamen ein nicht-hydrolysierbares ATP-Analogon (AMP-PNP, Adenosin-5'-[$\beta\gamma$ -imido]triphosphat) sowie Natrium-Azid zum Einsatz. Beide Substanzen blockieren die ATPase-Aktivität und damit die Motorfunktion des cpSecA-Proteins, das zum Arretieren des Transportsubstrats in der Translokationspore führt (Oliver et al., 1990; Knott et al., 1994; van der Wolk et al., 1997). Anschließend wurden die Thylakoide isoliert, solubilisiert und mittels BN-PAGE aufgetrennt. Der Antikörpernachweis erfolgte gegen cpSecA und cpSecY (Abb. 3-13). Der *Western* für den cpSecA-Nachweis läßt eine Größenzunahme des cpSecA-haltigen Komplexes in Gegenwart des Transportsubstrates und AMP-PNP vermuten (Abb. 3-13, Spur 3). Die Größe dieser Banden (270 bzw. 320 kDa) stimmt ungefähr mit dem Laufverhalten des Komplexes 2 in Abb. 3-7 überein. In Abwesenheit des Transportsubstrates ist die Größenzunahme des cpSecA-Komplexes nicht zu beobachten (Spur 6). Auch in Gegenwart von Azid kam es nicht zu Größenveränderung des cpSecA-haltigen Komplexes (Spur 2). Die Größenzunahme unter Einfluß des AMP-PNP ließ sich allerdings nur mit dem SecA-Antikörper beobachten, der Einsatz des SecY-Antikörpers ergab dagegen unter den gleichen Versuchsbedingungen keine Veränderungen im Bandenmuster (Abb. 3-13). Statt dessen ließen sich mit dem SecY-Antikörper im Vergleich zu Abb. 3-11 in allen Ansätzen zwei weitere Banden detektieren, die mit dem PSII und dem Cytochrom b_6/f -Komplex comigrierten.

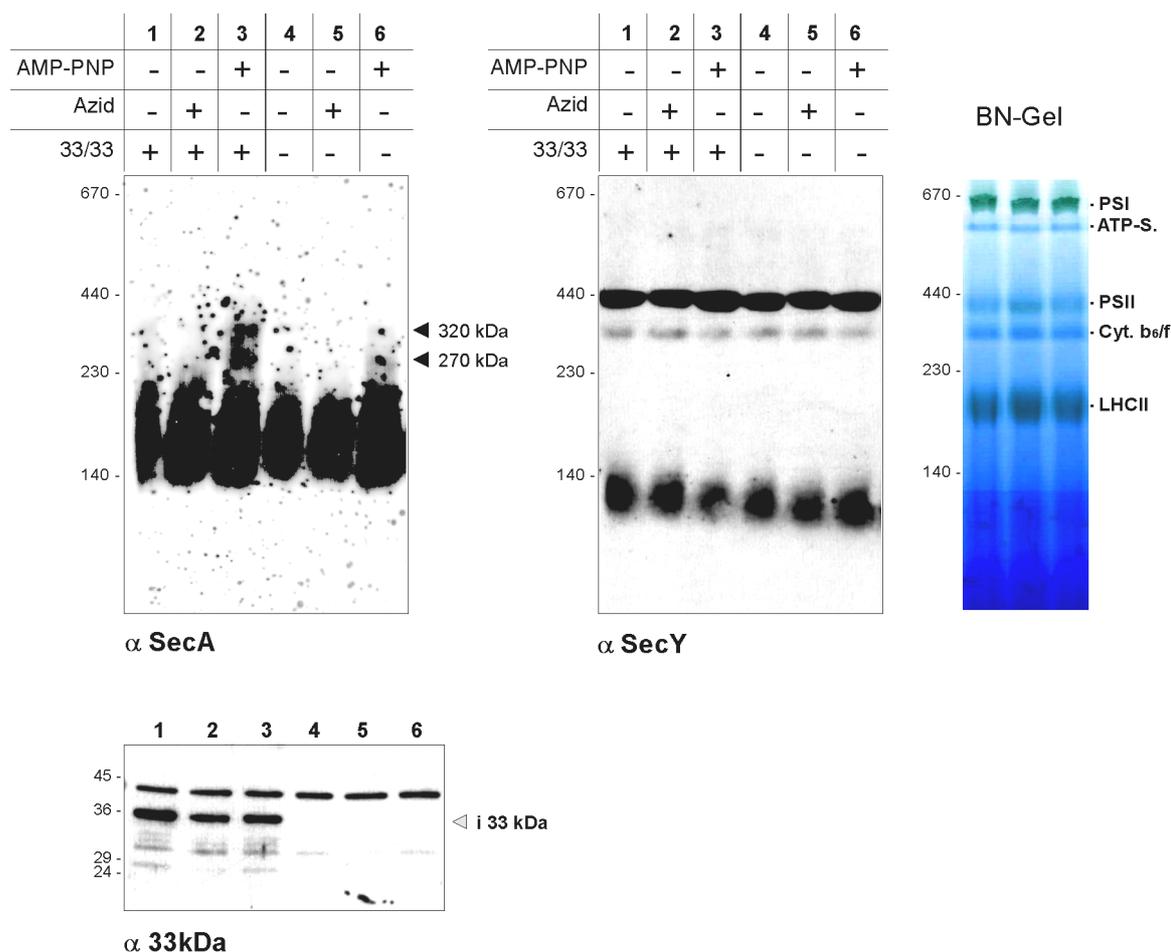


Abb. 3-13 Immunonachweis plastidärer Sec-Komponenten im Blue native-Gel unter verschiedenen Transportbedingungen. Spinachchloroplasten wurden unter Importbedingungen in Gegenwart (Ansatz 1 bis 3) oder Abwesenheit (Ansatz 3 bis 6) des Sec-Substrates 33 kDa-Protein (33/33, 5 μ M) mit Na-Azid (4 mM), AMP-PNP (5 mM) oder ohne Inhibitoren inkubiert. Die Thylakoide (2 x ca. 30 μ g Chl.) wurden solubilisiert, über BN-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran transferiert, die mit Antikörpern gegen cpSecA bzw. cpSecY behandelt wurde (α SecA, α SecY). Die Detektion erfolgte über ECL-Reaktion (oben, links und Mitte). Ein Ausschnitt des Blue native-Gels ist oben rechts abgebildet. Der Nachweis des 33 kDa-Transportsubstrates erfolgte durch Western-Analyse der Stromafractionen der Ansätze 1-6, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden (unten, α 33kDa). Das Stromaintermediat des 33 kDa Proteins (i 33kDa) ist mit einem Pfeil markiert.

Ob es sich hierbei um eine unspezifische Reaktion oder um einen spezifischen Nachweis der cpSecY-abhängigen Integration des D1-Proteins in den PSII-Komplex bzw. der Cytochrom f Untereinheit in den Cytochrom b₆/f-Komplex handelt, ist noch unklar (Rothstein et al., 1985; Nohara et al., 1996; Zhang et al., 2001). Da durch den SecY-Antikörper keine Größenänderung des Komplexes in Anwesenheit eines Transportsubstrates und AMP-PNP gezeigt werden konnte, bleibt die Frage nach der Position der Transport-aktiven Sec-Translokase im BN-Gel vorerst unbeantwortet. Durch die beobachtete Größenveränderung des cpSecA-haltigen Komplexes hin zur Position des Komplexes 2 (Abb. 3-7), ist eine Beteiligung von cpSecA am Komplex 2 zumindest nicht ausgeschlossen.

3.1.3 Der Einfluß der luminalen Rieske-Domäne auf den Transportprozeß

Der Thylakoidtransport des Rieske Fe/S-Proteins wird vom N-terminalen Membrananker vermittelt, der zwar nur schwache Merkmale eines Signalpeptids aufweist, jedoch funktionell als Thylakoidtransportsignal fungieren kann (Madueno et al., 1994; Molik, 2000). Die Erkenntnisse, die bereits im Rahmen der Diplomarbeit über die Qualität des Rieske-Membranankers als Transportsignal gewonnen wurden, zeigten, daß er nur suboptimal funktioniert, d.h. in Kombination mit anderen Passagierproteinen kein effektiver Thylakoidtransport erreicht werden kann (Molik, 2000). Andererseits ergab auch der Austausch des Membranankers gegen ein typisches Signalpeptid keinen gesteigerten Thylakoidtransport der luminalen Rieske-Domäne (Kapitel 3.1.2.2). Ohnehin wurde die luminaire Domäne nur in Abhängigkeit eines $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -spezifischen Signals transportiert; Sec-spezifische Signale dagegen ermöglichten keinen Transport über die Thylakoidmembran. Dies deutete darauf hin, daß die luminaire Domäne durchaus einen gewissen Einfluß auf das Transportverhalten des Rieske-Proteins hat. Dabei war zu vermuten, daß dieser Einfluß im Faltungszustand der luminalen Domäne begründet liegt, da die $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Translokase (im Gegensatz zur Sec-Translokase) in der Lage ist, gefaltete Proteine zu transportieren (Robinson & Bolhuis, 2004). So sollte im weiteren Verlauf der Arbeit der Blick auf die luminaire Domäne fokussiert werden, um herauszufinden, welchen Modifikationen sie unterworfen ist, welche Faktoren daran beteiligt sind und ob diese Prozesse den verzögerten Thylakoidtransport bewirken.

3.1.3.1 Blockierung des Thylakoidtransports

Ein weiterer Hinweis darauf, daß die luminaire Domäne einen Einfluß auf den Transportprozeß hat, ließ sich aus den Versuchen mit isolierten Thylakoiden ableiten. Obwohl die meisten $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -Substrate mit guter Effizienz auch in isolierte Thylakoidvesikel transportiert werden können (Mould et al., 1991; Klösigen et al., 1992; Nielsen et al., 1994), war dies für die luminaire Rieske-Domäne, weder in Abhängigkeit vom authentischen Thylakoidtransportsignal noch mit Hilfe des typischen $\Delta\text{pH}/\text{Tat}$ -spezifischen Signalpeptids des 23 kDa-Proteins (23/Ri-h) nicht möglich (Abb. 3-14 A).

Daß diese Inkompatibilität tatsächlich durch die luminaire Domäne verursacht wird, wurde durch die Transportfähigkeit eines chimären Proteins unterstützt, in dem die luminaire

Domäne durch das reife 23 kDa-Protein ausgetauscht wurde (Ri tpp/23; Abb. 3-14 B). Also ist der Rieske-Membrananker durchaus in der Lage, bestimmte Passagiere, hier das reife 23 kDa-Protein, in isolierte Thylakoide zu dirigieren. Die luminaire Prozessierung des chimären Intermediats setzt das reife 23 kDa-Protein frei, wenn auch mit geringerer Effizienz als im Kontrollansatz mit dem authentischen 23 kDa-Protein (23/23; Abb. 3-14 B). Neben dem reifen 23 kDa-Protein zeigte sich im Ri tpp/23-Ansatz auch ein chimäres Intermediat von 29 kDa, das ebenfalls gegenüber der externen Protease Thermolysin überwiegend resistent war (Abb. 3-14 B, T+). Hierbei könnte es sich um ein Translokationsintermediat handeln, das zwar bereits über die Membran transportiert aber noch nicht terminal prozessiert wurde und somit vielleicht noch in Kontakt mit der Translokase war. Ähnliches wurde bereits für das chimäre Protein 16/23 (zusammengesetzt aus den 16 und 23 kDa-Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates) beobachtet (Berghöfer & Klösigen, 1999).

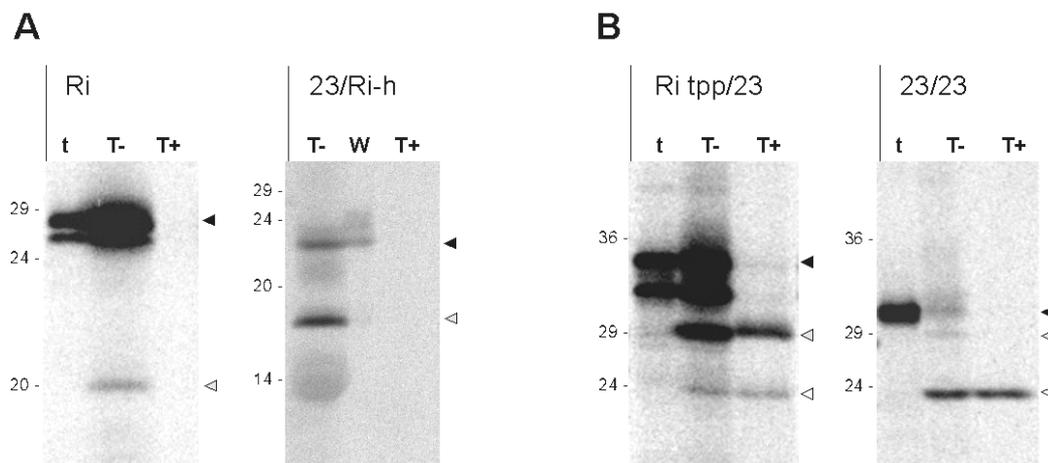


Abb. 3-14 *In thylakoido-Import authentischer und chimärer Rieske bzw. 23 kDa-Proteine.* Dargestellt sind Expositionen 10-17,5%iger Gradientengele (Laemmli, 1970). Der Thylakoidtransport wird verhindert (A) oder ist möglich (B). Der Import der angegebenen Vorstufenproteine erfolgte in isolierte Erbsenthylakoide in Gegenwart von Stromaextrakt. Die Thylakoide blieben anschließend entweder unbehandelt (T-), wurden in HM-Puffer gewaschen (W) oder mit Thermolysin behandelt (T+). Stöchiometrische Mengen der Thylakoidfraktionen (7,5 µg Chl. entsprechend) wurden zusammen mit dem Translationsansatz (t) mittels SDS-PAGE analysiert. Schwarze Pfeilspitzen markieren die Vorstufenproteine, graue die Stomaprozessierungsprodukte und weiße die Thylakoidprozessierungsprodukte. Der Größenmarker (in kDa) ist jeweils links vom Bild angegeben.

Das Unvermögen isolierter Thylakoide, die luminaire Rieske-Domäne selbst in Gegenwart eines adäquaten Transportsignals zu transportieren, könnte durch den hochverdünnten Stromaextrakt bedingt sein, der für das Rieske-Protein möglicherweise keine ausreichenden Transportbedingungen bietet. So scheint die Anwesenheit des intakten Organells für den Thylakoidtransport des Rieske-Proteins notwendig zu sein. Daraus ergab sich die Überlegung, daß vielleicht das nach Organellimport im Stroma akkumulierte Rieske-

Protein in einem Thylakoidtransport-kompetenten Zustand vorliegt und somit nach Gewinnung dieses Stromas von isolierten Thylakoiden aufgenommen werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde ein kombinierter Organell-Thylakoidtransport als Versuchsansatz gewählt. Dazu wurde das Rieske-Protein zunächst in intakte Organellen importiert; anschließend konnte ein Großteil des importierten Rieske-Proteins durch Präparation des Stromas dieser Organellen gewonnen und mit frischen Thylakoiden inkubiert werden. In diesem Versuch wurden Chloroplasten bzw. Thylakoide nicht nur aus Spinat sondern auch aus Erbse eingesetzt und zum Teil miteinander kombiniert (Abb. 3-15).

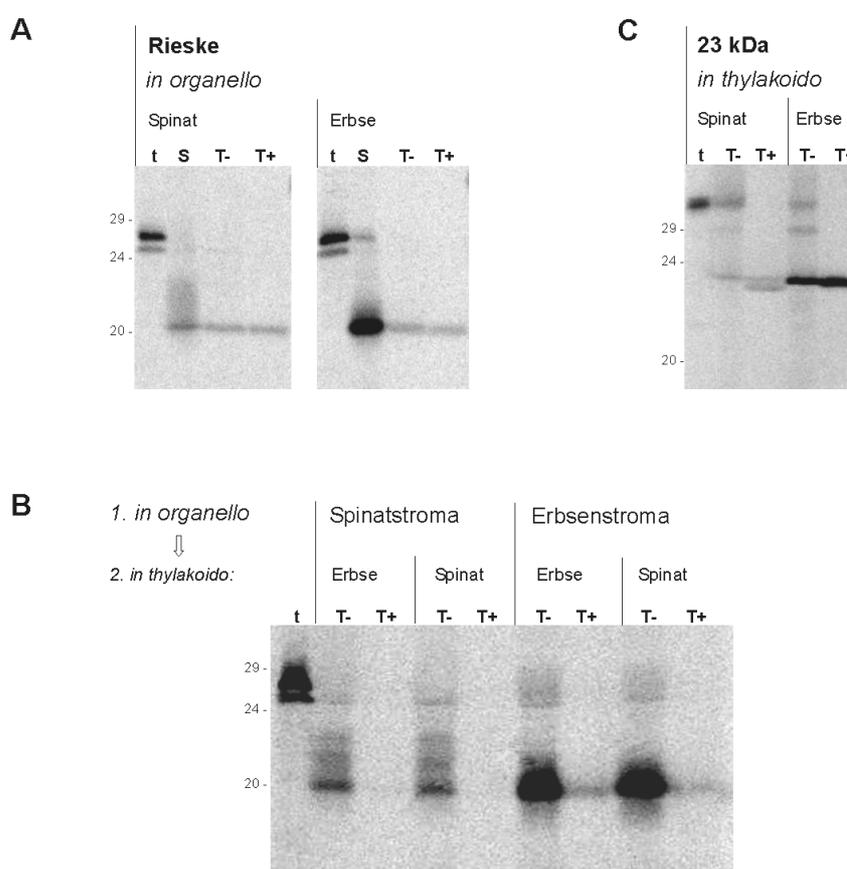


Abb. 3-15 Kombination von *in organello*- und *in thylakoido*-Import. Dargestellt sind Expositionen von 10-17,5%igen SDS-Gradientengelen (Laemmli, 1970) Das Rieske-Vorstufenprotein wurde in einem ersten Schritt in isolierte Spinat- bzw. Erbsenchloroplasten importiert (A). Anschließend wurde aus diesen Organellen das Stroma gewonnen und mit frischen Thylakoiden aus Erbse bzw. Spinat inkubiert. Die Thylakoide wurden mit Thermolysin versetzt (T+) oder blieben unbehandelt (T-). Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend exponiert (B). Der Thylakoidtransport (Erbse bzw. Spinat) des 23 kDa-Proteins als Kontrolle ist unter (C) dargestellt.

Der *in organello*-Import des Rieske-Proteins zeigte die typische Verteilung des importierten Proteins zwischen Stroma und Thylakoiden (Abb. 3-15 A). Dabei akkumulierte das frisch importierte Protein verstärkt im Stroma der Erbsenplastiden. Sowohl das Stroma der Erbsen- als auch der Spinatplastiden wurde präpariert und

anschließend mit frischen Thylakoiden aus beiden Spezies inkubiert (Abb. 3-15 B, *in thylakoido*). In diesem Versuchsansatz war es nur für das aus dem Erbsenstroma gewonnene Rieske-Protein möglich, in geringen Umfang in isolierte Thylakoide transportiert zu werden (Abb. 3-15 B, Spur T+). Dabei erfolgte die Translokation sowohl in Erbsenthylakoide als auch, mit leicht abgeschwächter Effizienz, in Spinatthylakoide. Wie der *in thylakoido*-Kontrollansatz mit dem 23 kDa-Protein zeigte, weisen Erbsen- und Spinatthylakoide grundsätzlich unterschiedliche Transportkompetenzen auf (Abb. 3-15 C). In den Ansätzen mit Spinatstroma konnte kein Weitertransport des dort vorliegenden Rieske-Proteins in frische Thylakoide beobachtet werden (Abb. 3-15 B). Zumindest das im Erbsenstroma befindliche Rieske-Protein liegt in einem Transport-kompetenten Zustand vor. Daraus ergibt sich die Frage, welche Bedingungen erfüllt sein müssen, um dem Rieske-Protein die Passage der Thylakoidmembran zu ermöglichen. Wie bereits erwähnt, könnte der Faltungszustand der luminalen Domäne einen Einfluß auf die Transportfähigkeit des Proteins haben. Eine weitere denkbare Modifikation innerhalb der luminalen Domäne könnte der Einbau des Fe/S-Zentrums sein. Deshalb sollte es ein Ziel dieser Arbeit sein, die stromalen Interaktionspartner des Rieske-Proteins zu identifizieren und die damit verbundenen Modifikation des Proteins aufzuzeigen. Dazu sollte als erstes die Frage nach der Bedeutung des Fe/S-Zentrums für den Thylakoidtransport beantwortet werden.

3.1.3.2 Das Transportverhalten der Fe/S-Ligandenmutanten

Die Beteiligung des Rieske-Proteins an der photosynthetischen Elektronentransportkette ist auf die Anwesenheit eines [2Fe-2S]-Zentrums zurückzuführen. Dabei erfolgt die koordinative Bindung der Eisenatome über je zwei Cystein- bzw. Histidinreste innerhalb der luminalen Domäne (Zhang et al., 1996). Im Fall des plastidären Rieske-Proteins aus Spinat sind folgende Aminosäurereste an der Bindung beteiligt: Cys107, His109, Cys125, His128 (Abb. 3-16). Für das mitochondriale Rieske-Protein aus Hefe wurde bereits gezeigt, daß die Veränderung einer Fe/S-bindenden Aminosäure den Einbau des Cofaktors verhindert (Graham & Trumpower, 1991). Deshalb sollte für das plastidäre Rieske-Protein aus Spinat der Einfluß des [2Fe-2S]-Zentrums auf das Transportverhalten durch den Einsatz von sogenannten Fe/S-Ligandenmutanten im *in organello*-Experiment getestet werden. Dabei standen aus früheren Arbeiten des Labors folgende Mutanten zur Verfügung: I124S (Isoleucin 124 wurde zu Serin mutiert), C125S und C127S (Kanauchov, 1998).

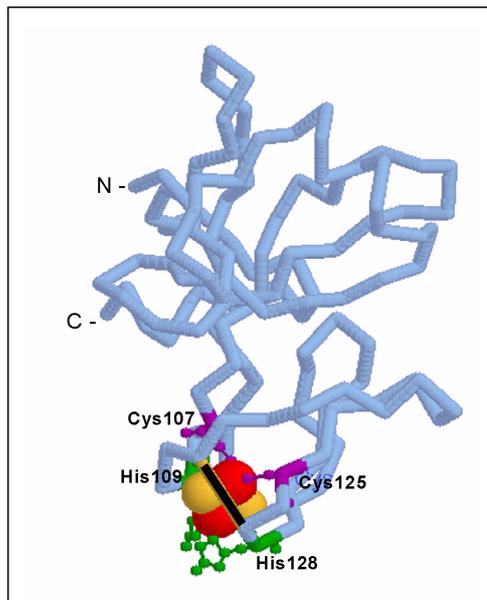


Abb. 3-16 Struktur der luminalen Domäne des Rieske-Proteins. Dargestellt sind die 139 C-terminalen Aminosäuren des plastidären Rieske-Proteins aus Spinat, nach Carrel et al., 1997. Das [2Fe-2S]-Zentrum ist in Form von roten und gelben Kugeln zu erkennen. Die an der Bindung beteiligten Aminosäuren (Liganden) sind hervorgehoben (Cys107, His108, Cys125, His128). Die das Fe/S-Zentrum stabilisierende Disulfidbrücke zwischen Cys112 und Cys127 ist als schwarzer Balken dargestellt.

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Mutante H128Q erstellt. Während bei den beiden Mutanten C125S und H128Q direkte Fe/S-Liganden ausgetauscht wurden (Fe/S-Ligandenmutanten im engeren Sinne), ist die Mutante C127S in der Ausbildung einer Sekundärstruktur-stabilisierenden Disulfidbrücke gestört (Abb. 3-16). Die Veränderung in der Mutante I124S ist dagegen irrelevant für den Einbau des Fe/S-Zentrums und dient als Negativkontrolle. Alle vier Mutanten des Rieske-Proteins wurden als radioaktiv markierte *Precursor* für *in organello*-Experimente eingesetzt (Abb. 3-17).

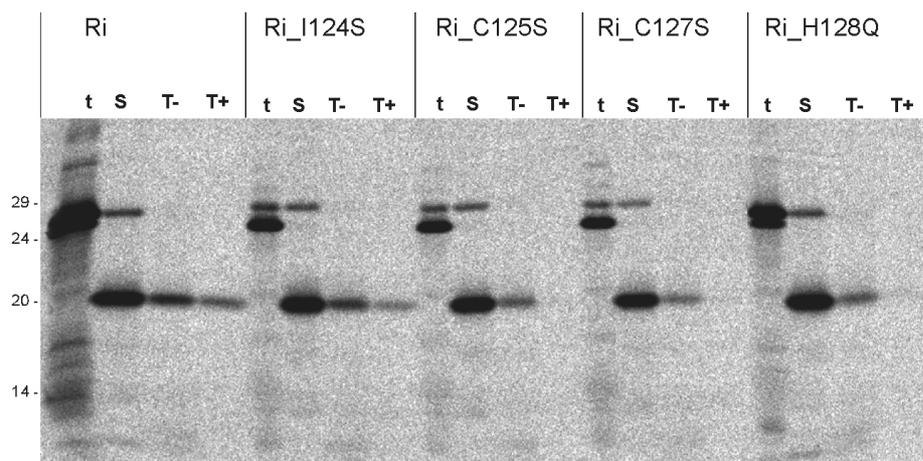


Abb. 3-17 Import der Rieske Fe/S-Ligandenmutanten in isolierte Spinatchloroplasten. Dargestellt ist die Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (Laemmli, 1970). Neben dem authentischen Rieske-Protein wurden verschiedene Rieske-Mutanten mit Einzelaminosäureaustauschen eingesetzt. Die betroffenen AS stellen Liganden zur [2Fe-2S]-Cluster Bindung dar (C125S, H128Q) oder sind zur Ausbildung der Disulfidbrücke erforderlich (C127S). Die Mutante I124S stellt die Negativkontrolle dar. Für weitere Details siehe Text zu Abb. 3-1.

Das Transportverhalten der Mutanten C125S, C127S und H128Q war im Vergleich zum authentischen Rieske-Protein stark verändert. In allen drei Fällen fand sich zwar ein Teil des importierten Proteins in der Thylakoidfraktion (T-), dieser wurde aber durch die zugegebene Protease fast vollständig degradiert (T+). Folglich kam es nur zur Membranassoziation, aber nicht zum Transport des jeweiligen Proteins. Nur für die Mutante H128Q läßt sich ein geringer Protease-resistenter Anteil in der T+ Spur erkennen. Nur die Mutante I124S zeigte dagegen keine auffällige Veränderung in ihrem Transportverhalten.

Aus dem Verhalten der Fe/S-Ligandenmutanten C125S und H128Q läßt sich ableiten, daß die Verhinderung des Fe/S-Einbaus einen Einfluß auf den Thylakoidtransport des Rieske-Proteins hat. Dabei zeigte der Austausch eines Cystein-Liganden einen etwas stärkeren Wirkung als der Austausch eines Histidinrestes. Die verhinderte Ausbildung der Disulfidbrücke in der Mutante C127S beeinträchtigt die Thylakoidtransportrate ebenfalls massiv. Um zu überprüfen, ob eine Assoziation der Mutanten mit Komplexen der Thylakoidmembran erfolgte, wurden die unbehandelten Thylakoide (T-) solubilisiert und auf einem BN-Gel aufgetrennt (Abb. 3-18).

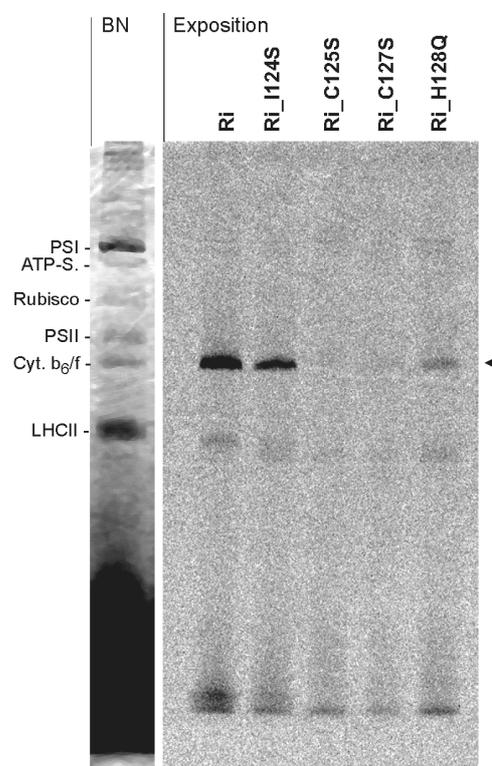


Abb. 3-18 Assemblierung der Fe/S-Ligandenmutanten in Komplexe der Thylakoidmembran. Dargestellt ist die Exposition eines 5-13%igen *Blue native*-Gels sowie ein Streifen des unbehandelten Gels (BN). Der Versuch wurde mit den oben angegebenen Proteinen und isolierten Spinatchloroplasten durchgeführt. Der Cytochrom b_6/f -Komplex ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Für weitere Details siehe Text zu Abb. 3-7.

Dabei zeigte sich, daß tatsächlich die Fe/S-Ligandenmutante H128Q in geringem Umfang in den Cytochrom b_6/f -Komplex integriert wurde. Dagegen ist für die Mutanten C125S und C127S keine Komplexassemblierung nachweisbar. Das authentische Rieske-Protein und die Mutante I124S zeigten dagegen erwartungsgemäß eine deutliche Assemblierung in den Cytochrom b_6/f -Komplex (Abb. 3-18).

Für das auffällig veränderte Thylakoidtransportverhalten der Fe/S-Ligandenmutanten gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte der Thylakoidtransport der Mutanten mit normaler Effizienz erfolgen, allerdings kommt es aufgrund des fehlenden [2Fe-2S]-Zentrums zum vorzeitigen Abbau des nicht verwendbaren Proteins. Die zweite Erklärungsmöglichkeit geht von einer Verhinderung des Thylakoidtransports aufgrund des fehlenden [2Fe-2S]-Zentrums aus. Da die zweite Möglichkeit als Arbeitshypothese angenommen wurde, sollte sie näher untersucht werden. So lag die Überlegung nahe, sich genauer den stromalokalisierten Anteil des Rieske-Proteins bzw. der Fe/S-Ligandenmutanten anzuschauen. Dazu wurden die Stromafraktionen der jeweiligen Proteine nach erfolgtem Import in isolierte Spinatchloroplasten gewonnen und nicht nur mittels SDS-PAGE, sondern parallel auch auf nicht-denaturierenden *Colorless native*-Gelen (CN-Gel) aufgetrennt. Für diesen Versuch wurden die Mutanten I124S, C125S und C127S sowie das authentische Rieske-Protein eingesetzt (Abb. 3-19). Es ist zu erkennen, daß die frisch importierten Proteine im Stroma in Form von verschiedenen hochmolekularen Komplexen vorliegen. Dabei fällt auf, daß einige Banden in allen vier Ansätzen zu finden sind, wie z.B. der prominente Komplex bei ca. 440 kDa und die Bande um 140 kDa. Dagegen zeigten die Komplexe um 67 kDa unterschiedliches Laufverhalten in den verschiedenen Ansätzen. So verhielt sich die Mutante I124S gleich dem authentischen Rieske-Protein, während die beiden Fe/S-Ligandenmutanten C125S und C127S in der 67 kDa-Bande zueinander und zum authentischen Protein ein verändertes Laufverhalten zeigten.

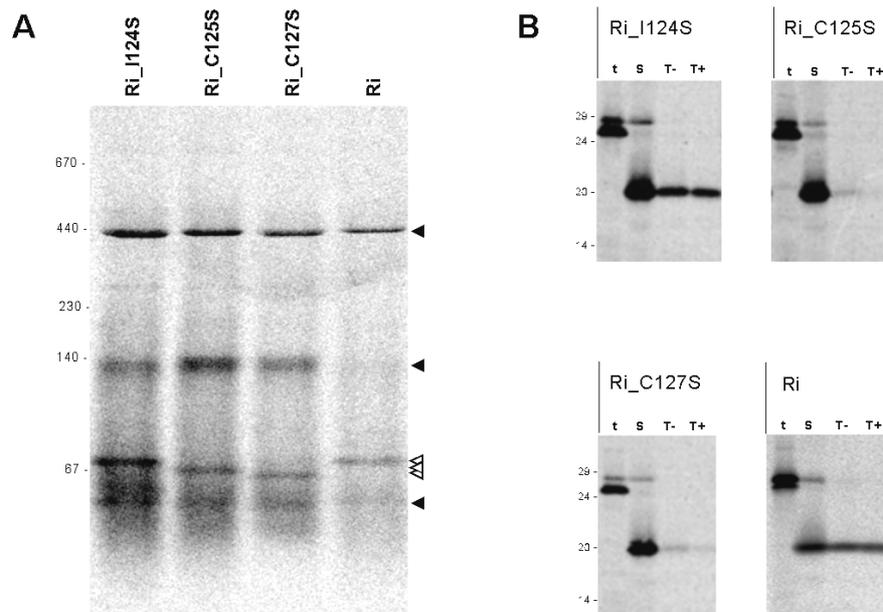


Abb. 3-19 Native Auftrennung (CN) von Stromakomplexen nach Import der Rieske Fe/S-Ligandenmutanten. Dargestellt ist die Exposition eines 5-18 %igen *Colorless native* (CN)-Gels (A) sowie eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (B). Die angegebenen Proteine wurden in isolierte Spinachchloroplasten importiert. Die gewonnenen Fraktionen wurden entweder nativ aufgetrennt (Stroma, jeweils ca. 25 µg Chlorophyll entsprechend, A) oder mittels SDS-PAGE (B). Die schwarzen Pfeile unter (A) kennzeichnen einheitliche Komplexe, weiße Pfeile kennzeichnen Komplexe, die bei den verwendeten Proteinen unterschiedlich sind. Als Größenstandard wurde der HMW-Marker verwendet.

Die Unterschiede in der Intensität der einzelnen Banden ist vermutlich auf die unterschiedliche Anhäufung der jeweiligen Proteine im Stroma zurückzuführen (Abb. 3-19 B, Spur S). Da sich durch die gezielten Aminosäureaustausche innerhalb des authentischen Rieske-Proteins z.T. deutliche Veränderungen im Bandenmuster der Stromakomplexe ergaben, läßt dies einen stromalokalisierten Fe/S-Einbau vermuten. Zusätzliche Indizien, die diese Arbeitshypothese unterstützen, werden im weiteren Verlaufe der Arbeit dargestellt.

3.1.3.3 Die Analyse des 440 kDa-Komplexes

Die Identifikation des in Abb. 3-19 A dargestellten 440 kDa-Komplexes soll im Mittelpunkt dieses Kapitels stehen. Um zu bestimmen, welche Prozessierungsform des Rieske-Proteins in diesem Komplex vorliegt, wurde im Anschluß an die native Elektrophorese eine zweite, denaturierenden Auftrennung durchgeführt. Aufgrund der intensiven Markierung wurde zu diesem Zweck die Mutante C125S eingesetzt (Abb. 3-20). Diese 2D-Analyse ergab, daß der 440 kDa-Komplex sowohl das Vorstufen- als auch das reife Protein enthält. Alle anderen Komplexe wurden dagegen nur durch die reife prozessierte Form des Rieske-Proteins markiert (Abb. 3-20).

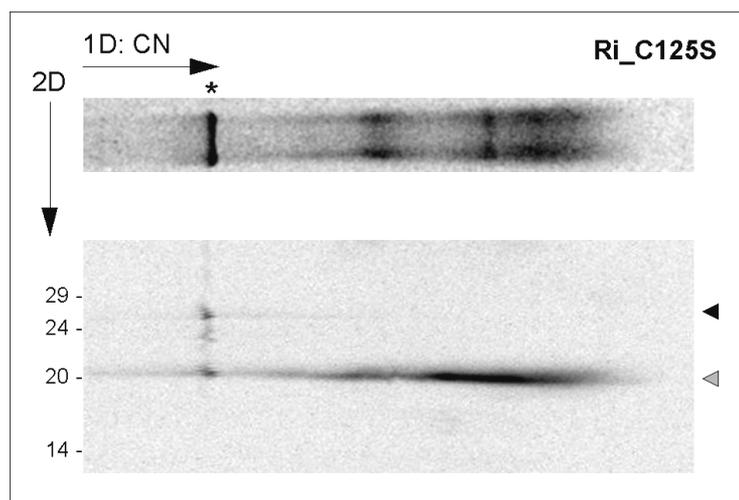


Abb. 3-20 Auftrennung von Stromakomplexen in der zweiten Dimension (2D). Dargestellt ist die Exposition eines CN-Gelstreifens (aus Abb. 3-19) und die daraus resultierende Auftrennung in einem 15%igen SDS-Gel (Laemmli, 1970). Für diesen Versuch wurde die Mutante Ri_C125S benutzt. Die schwarze Pfeilspitze markiert das Vorstufenprotein, die graue Pfeilspitze das reife Protein.

In der Literatur fanden sich Hinweise darauf, daß es sich bei dem 440 kDa-Komplex um Cpn60 (*chaperonin*), das plastidäre, zu Hsp60 homologe Faltungschaperon, handeln könnte (Lubben et al., 1989). Da dem Labor Antikörper gegen das Hsp60-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* zur Verfügung standen, konnte eine *Western*-Analyse durchgeführt werden. Es ist bekannt, daß die Stabilität zwischen Cpn60 (Hsp60) und seinem Substrat sensitiv gegenüber hohen ATP-Konzentrationen ist (Milos & Roy, 1984; Lubben et al., 1989; Madueno et al., 1993, Boston et al., 1996). So wurde nach Organellimport des authentischen Rieske-Proteins und der Mutante C125S, jeweils der Hälfte des reisolierten Stomas 5 mM ATP zugesetzt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Die Proben wurden mittels CN-PAGE nativ aufgetrennt und zum einen exponiert, zum andern der *Western*-Analyse mit Antikörpern gegen das Hsp60-Protein aus Hefe unterzogen (Abb. 3-21). Die Exposition ergab, daß die Stabilität des 440 kDa-Komplex tatsächlich von der ATP-Konzentration abhängig war. So ist in Gegenwart von 5 mM ATP die Intensität der beobachteten Komplexe weitaus geringer als in den Ansätzen ohne zusätzliches ATP. Demgegenüber hat die ATP-Konzentrationen keinen Einfluß auf die Stabilität der übrigen Komplexe. Der Antikörpernachweis des Cpn60-Komplexes über die enzymatische Reaktion der alkalischen Phosphatase ergab eine Bande auf der Höhe des radioaktiv markierten 440 kDa-Komplexes sowie eine Bande um 67 kDa, die aber nicht mit den radioaktiv markierten Banden in diesem Bereich korreliert (Abb. 3-21).

Durch nachträgliche Exposition der Nitrocellulosemembran konnte die Übereinstimmung im Laufverhalten der über Antikörper bzw. Radioaktivität detektierten 440 kDa-Bande eindeutig gezeigt werden. Die vom Hsp60-Antikörper detektierte Bande um 67 kDa stellt vermutlich Monomere Cpn60-Moleküle dar, die ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 60 kDa aufweisen.

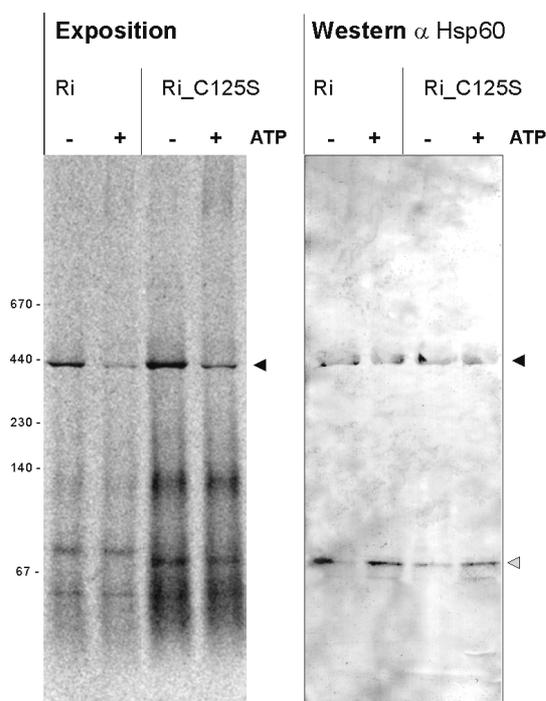


Abb. 3-21 Identifizierung des stromalen 440 kDa-Komplexes als Cpn60. Dargestellt ist die Exposition sowie die *Western*-Analyse (α Hsp60) eines 5-18%igen CN-Gels, auf dem Stromafraktionen, die nach Import der angegebenen Proteine in Spinachchloroplasten gewonnen worden waren, nativ aufgetrennt wurden. Die Hälfte des jeweiligen Stromaextraktes wurde zuvor mit 5 mM ATP versetzt (+ ATP) und für 15 min auf Eis inkubiert, die zweite Hälfte wurde unbehandelt inkubiert (- ATP). Der Hsp60 Antikörpernachweis erfolgte über die Reaktion der alkalischen Phosphatase, die Membran wurde anschließend zum Nachweis der Radioaktivität auf einer Phosphorimagerplatte exponiert. So war (über eine zuvor angebrachte radioaktive Markierung auf der Membran) zu erkennen, daß die 440 kDa-Bande der Exposition mit der Hsp60 Antikörperbande co-migrierte (schwarze Pfeilspitze). Die graue Pfeilspitze markiert ein weiteres Hsp60-Antikörpersignal, daß vermutlich Cpn60-Monomeren entspricht.

Im assemblierten Cpn60-Komplex sind dann 2×7 Monomere zu einem etwa 840 kDa Tetradecamer vereinigt. Als Co-Chaperone binden dann noch eine bislang unbekannt Anzahl von Cpn21-Monomeren und eventuell auch Cpn10-Moleküle an diesen Komplex (Levy-Rimler et al., 2002). Damit steigt die theoretische Größe des kompletten Cpn60-Komplexes auf über 900 kDa. Die hier beobachtete 440 kDa-Bande stellt somit entweder Cpn60-Subkomplexe dar oder Cpn60-Komplexe mit ungewöhnlichem Laufverhalten auf CN-Gelen. Für Cpn60-Tetradecamere wurde bereits eine ATP-abhängige Dissoziation in kleinere Komplexe beschrieben (Hemmingsen & Ellis, 1986; Musgrove et al., 1987; Roy et al., 1988).

Ob es tatsächlich zu einer direkten Interaktion zwischen dem Cpn60-Komplex und dem frisch importierten Rieske-Protein im Stroma kommt, sollte durch Co-Immünpräzipitation überprüft werden (Kapitel 2.2.11). Der Versuch wurde so durchgeführt, daß zunächst das radioaktiv markierte Rieske-Vorstufenprotein mit isolierten Spinatchloroplasten unter Importbedingungen inkubiert wurde, um anschließend die Stromafraktion zu gewinnen. Diesem Extrakt wurden Hsp60-Antikörper zugegeben, die zuvor an ProteinA-Sepharose gebunden worden waren. Die Antigen-Antikörperbindung erfolgte eine Stunde entweder bei 4 °C oder bei Raumtemperatur (20 °C). Zur weiteren Anreicherung des Rieske-Proteins in der Stromafraktion wurde einigen Ansätzen Nigericin, ein Hemmstoff des $\Delta pH/Tat$ -Weges, zugegeben. Alternativ zum Hsp60-Antikörper wurden auch verschiedene andere Antikörper zur Co-Immünpräzipitation eingesetzt, so gegen zwei weitere Faltungsproteine, Hsp70 und Rubisco-Aktivase (RuA) sowie gegen zwei Proteintransportkomponenten, cpSecA und *Ffh* (*Fifty four homologue* aus *E. coli*, homolog zum cytosolischen und plastidären SRP54; Lührink et al., 1992; Schünemann et al., 1998). Da die eingesetzten Antikörper nicht alle gegen das entsprechende Spinatprotein gerichtet waren (Tab. 2-2), wurde zuvor getestet, ob es zu einer Erkennung des gewünschten Antigens in Spinatplastiden kommt (Abb. 3-22).

So erkannte der SecA-Antikörper, neben gewissen Kreuzreaktionen, das korrekte Antigen cpSecA auf Höhe der 116 kDa-Markerbande. Die Hsp70-Antikörper reagierten mit zwei Proteinen von ca. 60 bzw. 70 kDa. Ein stromalokalisiertes Spinatprotein vom Hsp70-Typ, das ein apparentes Molekulargewicht von 75 kDa zeigte, wurde bereits charakterisiert (Wang et al., 1993), zwei weitere Proteine von etwa 70 kDa wurden aus Genomsequenzdaten abgeleitet (Guy & Li, 1998). So könnten beide hier beobachteten Hsp70-Antikörpersignale spezifisch sein. Auch die Rubisco-Aktivase kommt in zwei Isoformen vor, die in Spinat Größen von 41 kDa bzw. 45 kDa aufweisen (Werneke et al., 1989). Dies korreliert sehr gut mit den Reaktionen des RuA-Antikörpers (Abb. 3-22).

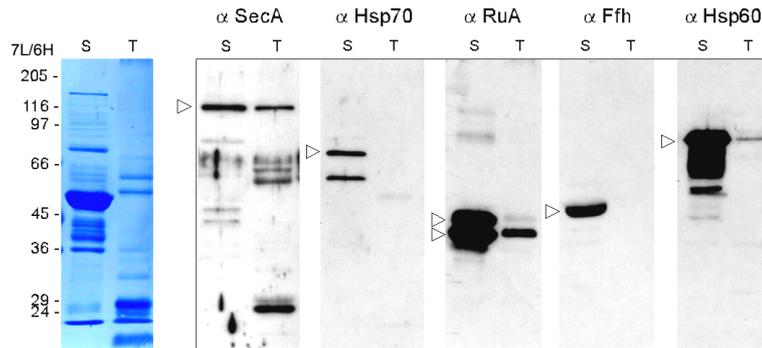


Abb. 3-22 *Western-Analyse zum Nachweis verschiedener Antigene in Spinatplastiden.* Vorbereitend zur Co-Immunpräzipitation wurden die dafür eingesetzten Antikörper auf die Erkennung des entsprechenden Antigens in Spinatchloroplasten getestet. Dazu wurden jeweils stöchiometrische Mengen Stroma (S) und Thylakoide (T, 3 μ g Chlorophyll entsprechend) auf einem 10%igen SDS-Minigel aufgetrennt. Die verwendeten Antikörper wurden wie in Tab. 2-2 angegeben verdünnt. Die Detektion erfolgte über die ECL-Reaktion. Die vermutlich spezifischen Signale sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Ein Teil der Coomassiegefärbten PVDF-Membran ist links abgebildet. Als Größenstandard wurde neben dem 7L-Marker auch der 6H-Marker (205-116-97-66-45-29 kDa) eingesetzt.

Die Größe des plastidären *Ffh*-Homologen, cpSRP54, liegt bei 54 kDa (Schünemann et al., 1998). Der *Ffh*-Antikörper reagierte spezifisch mit einem Protein von ca. 50 kDa, unmittelbar unterhalb der großen Untereinheit der Rubisco.

Die plastidären Hsp60-Proteine (Cpn60) besitzen Molekulargewichte zwischen 60 und 63 kDa. Die hier detektierten Signale des Hsp60-Antikörpers erstrecken sich etwa über einen Größenbereich von 60 bis 80 kDa (Abb. 3-22).

Außer zu cpSecA wurden in verschiedenen Arbeiten Interaktionen des Rieske-Proteins mit den hier aufgezählten Proteinen gezeigt (Hsp70, Rubisco-Aktivase und cpSRP54; High et al., 1997; Karnauchov, 1998). Diese Beobachtung konnte hier jedoch in keinem Fall bestätigt werden. Weder für Hsp70, Rubisco-Aktivase oder cpSRP54, noch für cpSecA konnte eine Interaktion mit dem Rieske-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3-23). Dagegen ließ sich mit dem Hsp60-Antikörper ein signifikanter Anteil des im Stroma befindlichen Rieske-Proteins präzipitieren (Abb. 3-23). Dabei fällt auf, daß in jedem Fall das reife Protein, aber auch überproportional das Vorläuferprotein zu finden ist. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der 2D-Analyse, die zeigte, daß der 440 kDa-Komplex sowohl das reife Rieske-Protein als auch den Vorläufer enthält (Abb. 3-20). Die zusätzliche Anreicherung des Rieske-Proteins im Stroma, ausgelöst durch den Hemmstoff Nigericin, führte zu einer verstärkten Co-Immundefällung des reifen Proteins durch den Hsp60-Antikörper. Die Präzipitation des *Precursors* scheint hier allerdings etwas schwächer auszufallen. Die Stabilität der Komplexe ist außerdem von der Temperatur, bei der die Immundefällung durchgeführt wurde, abhängig. So erfolgte bei 4 °C eine stärkere Präzipitation des reifen Rieske-Proteins als bei 20 °C.

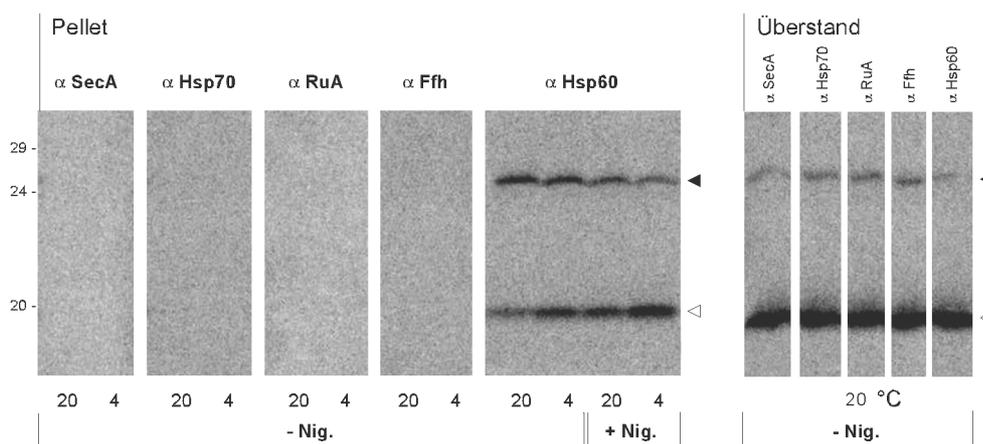


Abb. 3-23 Co-Immunpräzipitation des importierten, radioaktiv markierten Rieske-Proteins aus dem Stromaextrakt. Dargestellt ist die Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels, auf dem Pellet- und Überstandfraktionen (1/8 Vol.) aufgetrennt wurden. Dazu wurde das radioaktiv markierte Rieske-Vorstufenprotein in isolierte Spinatchloroplasten importiert, der Stromaextrakt wurde reisoliert und mit den angegebenen Antikörpern (gebunden an ProteinA-Sepharose) 1 h entweder bei RT (20 °C) oder im Kühlraum (4 °C) inkubiert. Die Importversuche wurden z.T. in Gegenwart von 4 μ M Nigericin durchgeführt (+ Nig.). Vorstufenprotein (schwarze Pfeilspitze) und reifes Rieske (weiße Pfeilspitze) sind gekennzeichnet.

Die Auftragung der Überstände (jeweils 1/8 Vol.) zeigt, daß in allen Ansätzen vergleichbare Mengen an stromalokalisierten Rieske-Protein vorhanden war (Abb. 3-23).

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem 440 kDa-Komplex des CN-Gels um eine direkte Interaktion des importierten Rieske-Proteins mit dem Chaperon Cpn60 handelt. Dabei scheint diese Interaktion in einer früher Phase der Stromapassage des Proteins stattzufinden, da neben dem reifen Protein auch ein Großteil der noch unprozessierten Vorläuferform an diesen Komplex bindet.

3.2 Kandidaten der plastidären Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie (ISC)

Da während der Stromapassage des Rieske-Proteins anscheinend eine Cpn60-abhängige Faltung erfolgt, stellt sich die Frage, ob damit gleichzeitig der Einbau des [2Fe-2S]-Clusters verbunden ist. Denn erst durch die korrekte Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der luminalen Domäne werden die Cofaktor-bindenden Aminosäurereste so in räumliche Nähe gebracht, daß es möglich wird, das [2Fe-2S]-Zentrum zu integrieren.

Über den eigentlichen Prozeß, der im Chloroplasten zur Integration von Fe/S-Zentren führt, war zu Beginn dieser Arbeit recht wenig bekannt. Es konnte zwar gezeigt werden, daß isolierte Chloroplasten in der Lage waren, Apo-Ferredoxin in seine [2Fe-2S]-gebundene

Holoform zu überführen, allerdings blieb zunächst unklar, wie dieser Prozeß im einzelnen abläuft und welche Faktoren daran beteiligt sind (Takahashi et al., 1986; Suzuki et al., 1991). Sämtliche Informationen, die es zu diesem Zeitpunkt zum Thema Fe/S-Cluster-Assemblierung gab, stammten aus bakteriellen bzw. mitochondrialen Systemen. Vor allem in Hefemitochondrien konnten bereits eine Vielzahl von beteiligten Proteinen identifiziert werden (Mühlenhoff & Lill, 2000). Um einen Eindruck diesbezüglich von der Situation in Plastiden zu bekommen, sollte versucht werden, Kandidaten, die an der dortigen Fe/S-Cluster-Assemblierung beteiligt sind, aufzuspüren und auf mögliche Interaktionen mit dem Rieske-Protein zu testen.

3.2.1 Die Basis zur Identifizierung der ISC-Kandidaten

Die erstmalige Beschreibung eines Enzyms, das am Prozeß der Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung beteiligt ist, erfolgte 1993 (Zheng et al., 1993). So wurde für das als NifS bezeichnete Protein eine Cystein-Desulfurase-Aktivität gezeigt, d.h. die Aminosäure Cystein wird in Alanin und Enzym-gebundenen Schwefel gespalten, der unter reduzierenden Bedingungen als Sulfid vorliegt (Zheng et al., 1993; Zheng et al., 1994). Das NifS-codierende Gen ist Teil des zuvor in dem Stickstoff-fixierenden Bakterium *Azotobacter vinelandii* entdeckten *nif* (*nitrogen-fixation*)-Operons, das neben *nifS* die Gene *iscA_{nif}*, *nifU*, *nifV*, *cysE1* u.a. enthält (Jacobson et al., 1989 a). Die *nif*-Genprodukte stellen zwar keine strukturellen Komponenten des Stickstoff-fixierenden Nitrogenasekomplexes dar, waren aber für dessen Aktivität essentiell (Jacobson et al., 1989 b; Evans et al., 1991; Kennedy & Dean, 1992). Die Aktivität der Nitrogenase wird durch Bindung von 20 Schwefel- und 19 Eisenatomen sowie einem Molybdänatom erreicht (Dean et al., 1993; Einsle et al., 2002). Die Deletion von *nifS* führte zwar zu einer drastische Abnahme aber nicht zu einer vollständigen Blockierung der Nitrogenase-Aktivität (Jacobson et al., 1989 a). Somit ging man davon aus, daß für die Nitrogenase-Restaktivität ein anderes Fe/S-Assemblierungssystem verantwortlich war (Frazzon et al., 2002). Dies führte zur Entdeckung eines zweiten, NifS-ähnlichen Proteins, das aufgrund seiner Beteiligung an einem allgemeinen Fe/S-Zentrum-Biosyntheseweg als IscS (*Isc*, *Iron-sulfur-cluster formation*) bezeichnet wurde (Flint, 1996; Zheng et al., 1998). Charakteristisch für alle NifS/IscS-Proteine ist die Bindung von Pyridoxalphosphat (PLP) als Cofaktor über die Seitenkette eines konservierten Lysinrestes (Zheng et al., 1993). Darüber hinaus gibt es

einen konservierten Cysteinrest, der als aktives Zentrum und Bindungsort des freigesetzten Schwefels fungiert (Abb. 3-24 A). Das *IscS*-codierende Gen ist Teil des *isc*-Operons, das außerdem Orthologe zu den Genen *nifU* (*iscU*) und *iscA_{nif}* (*iscA*) des *nif*-Operons enthält. Darüber hinaus codiert es für zwei Chaperone vom DnaJ/Hsp40- (HscA) bzw. DnaK/Hsp70-Typ (HscB) sowie für ein Ferredoxin (Fdx).

Das im *nif*-Operon von *A. vinelandii* codierte NifU-Protein zeigt eine Drei-Domänen-Struktur (Abb. 3-24 B). Die N-terminale Domäne trägt drei Cysteinreste, die zur transienten Bindung eines Eisen-Schwefel-Zentrums dienen; die zentrale Domäne dagegen koordiniert über vier Cysteinreste ein permanentes [2Fe-2S]-Zentrum, die C-terminale Domäne ist durch das Vorhandensein eines Thioredoxin-Motivs (Cys-x-x-Cys) gekennzeichnet. Die orthologen *IscU*-Proteine, codiert im *isc*-Operon, bzw. die eukaryontischen Homologen ISU sind wesentlich kleiner als NifU, da sie nur der N-terminalen Domäne entsprechen (Abb. 3-24 B). *IscU*/*ISU*-Proteinen wird eine zentrale Rolle beim Aufbau des Fe/S-Clusters zugeschrieben: sie stellen eine Art Gerüstproteine dar, die über die drei konservierten Cysteinseitenketten transient den neuen Fe/S-Cluster binden, bevor er auf ein Apoprotein übertragen wird (Agar et al., 2000; Mühlhoff & Lill, 2000). Sie stellen in Hefemitochondrien eine essentielle Komponente der Fe/S-Cluster-Biosynthese dar (Garland et al., 1999; Schilke et al., 1999).

Eine zweite Gruppe von Proteinen, die als NFU bezeichnet werden, entsprechen dagegen der C-terminalen Domäne des NifU-Proteins (Abb. 3-24 B). NFU-Proteine wurden ebenfalls in Pro- und Eukaryonten gefunden, sind dort aber anscheinend nicht essentiell (Garland et al., 1999; Schilke et al., 1999; Agar et al., 2000). Den NFU-Proteinen wird ebenfalls die Fähigkeit zur transienten Bindung von Fe/S-Zentren zugeschrieben (Léon et al., 2003).

Zu der zentralen NifU-Domäne wurden bislang keine homologen Proteine gefunden; man vermutet aber, daß das im *isc*-Operon codierte Ferredoxin die Funktion dieser Domäne übernimmt.

Als Alternative zum *IscU*/*ISU* bzw. NFU wird auch das *IscA*/*ISA* als Gerüstprotein zum Aufbau und zur transienten Bindung eines neuen Fe/S-Clusters diskutiert (Krebs et al., 2001, Wollenberg et al., 2003). So verfügen die Mitglieder dieser Proteinfamilie ebenfalls über drei konservierte Cysteinreste, die im sogenannten *IsaI*- und *IsaII*-Motiv integriert sind (Kaut et al., 2000; Abb. 3-24 C).

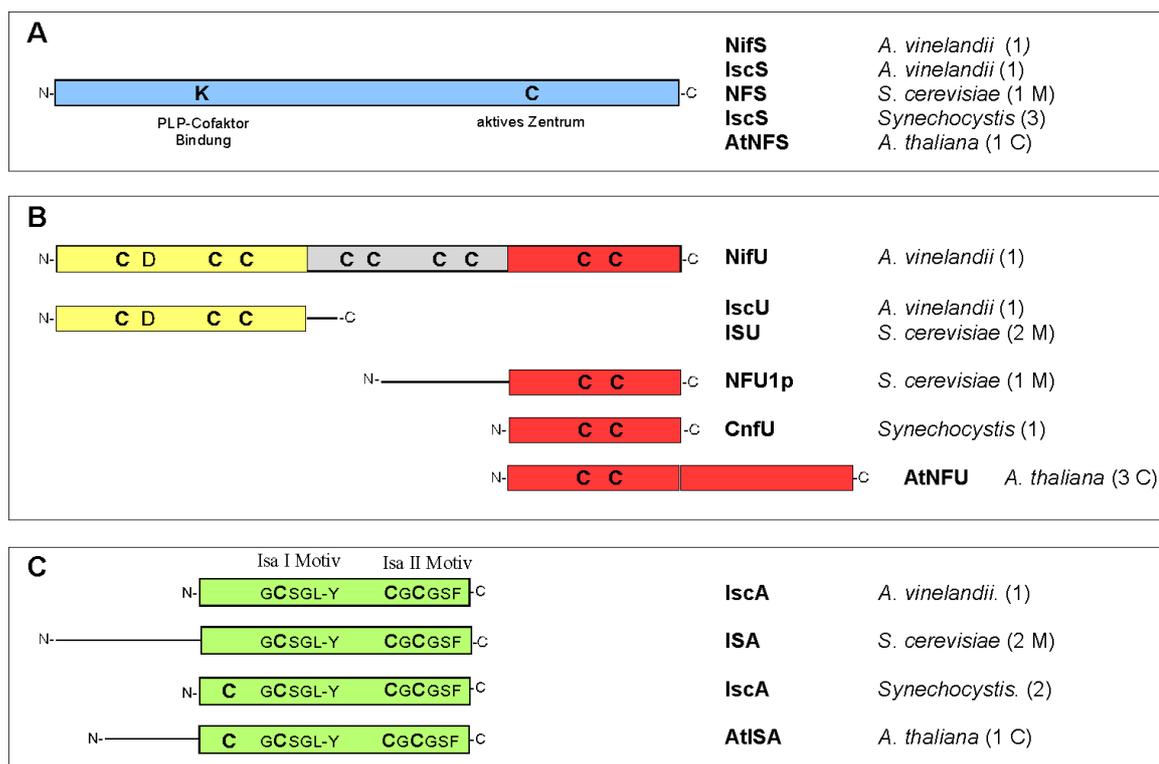


Abb. 3-24 Schematische Darstellung der ISC (*iron-sulfer-cluster formation*)-Proteine. Gezeigt sind charakteristische Aminosäuren/Sequenzmotive der NifS/IscS/NFS (**A**), NifU/ISU/NFU (**B**) bzw. IscA/ISA Komponente (**C**) aus verschiedenen Organismen (*Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Synechocystis PCC6803*, *Arabidopsis thaliana*). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Homologen des jeweiligen Proteins an, die Lokalisierung in eukaryontischen Organismen ist mit M (Mitochondrium) bzw. C (Chloroplast) angegeben. Die aufgeführten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* wurden im Rahmen dieser Arbeit identifiziert.

Mittlerweile wurden Homologe zu diesen *isc*-Genen bzw. Genprodukten in einer Vielzahl von Pro- und Eukaryonten identifiziert, z.B. *E. coli*, *B. subtilis*, *Synechocystis PCC6803*, *R. prowazekii*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens* u.v.a.. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei dem ISC-abhängigen Fe/S-Cluster-Biosyntheseweg um einen generellen und hochkonservierten Prozeß handelt.

In den bislang analysierten Eukaryonten scheint die Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese hauptsächlich eine Aufgabe der Mitochondrien zu sein. So stellte sich die Frage, ob in pflanzlichen Zellen auch im zweiten endosymbiontischen Organell, den Plastiden, eine dem Isc-System ähnliche Maschinerie zur Bildung von Fe/S-Zentren vorhanden ist. Da das Genom für den pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* bereits komplett sequenziert wurde (*Arabidopsis genome initiative*, 2000), sollte es möglich sein, dort vorhandene Homologe zu den *isc*-Genen zu identifizieren.

3.2.2 Identifizierung und Klonierung der ISC-Kandidaten

Zum Sequenzvergleich mit Hilfe des Programms BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Altschul et al., 1990) wurden zum einen die ISC-Proteine aus *Synechocystis PCC6803*, einem nahen Verwandten des Chloroplastenvorläufers, als Grundlage herangezogen. Da aber im Hefesystem bereits mehr Komponenten der Fe/S-Cluster-Assemblierungsmaschinerie bekannt waren als in *Synechocystis* (Mühlenhoff & Lill, 2000), wurden außerdem die entsprechenden Proteinsequenzen aus *Saccharomyces cerevisiae* zur Homologiesuche im *Arabidopsis thaliana*-Genom eingesetzt. So waren in *Synechocystis* Homologe (Anzahl) zu folgenden Fe/S-Assemblierungsproteinen bekannt: IscS (3), IscA (2), NFU (1; Seidler et al., 2001). Auf Grundlage dieser Proteinsequenzen konnten mit Hilfe von BLAST für IscS zwei, für IscA drei und für NFU vier Kandidaten im *Arabidopsis*-Genom gefunden werden. Durch das Programm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>, Emanuelsson et al., 2000) wurde anschließend die vermutliche intrazelluläre Lokalisierung dieser Proteine bestimmt. Diese Vorhersage ergab, daß je ein Protein der IscS- und IscA-Familie plastidär lokalisiert sein sollte. Die vier NFU-Kandidaten, die der C-terminalen Domäne des NifU-Proteins entsprechen, verteilen sich laut Vorhersage im Verhältnis 1:3 auf Mitochondrien und Plastiden. Zur eigentlich essentiellen N-terminalen NifU-Domäne konnten nur mitochondriale aber keine entsprechenden plastidären Proteine in *A. thaliana* identifiziert werden. Interessanterweise konnte auch für *Synechocystis* kein IscU/ISU-homologes Protein gefunden werden (Seidler et al., 2001).

Ein zusammenfassender Aminosäurevergleich zwischen den Proteinen der NifS/IscS/NFS-, NifU/ISU/NFU- bzw. IscA/ISA-Familie ist in Tab. 3-1 dargestellt. Dabei wurden jeweils die entsprechenden Proteine aus *Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Synechocystis PCC 6803* mit den identifizierten Kandidaten aus *Arabidopsis thaliana* verglichen. Die Proteine aus *Synechocystis* zeigten erwartungsgemäß in allen drei Vergleichen die größten Homologiewerte zu den *Arabidopsis*-Proteinen. Die Identitätswerte lagen zwischen 49 % zu AtNFU1 und 70 % zu AtNFU2 bzw. AtNFU3. Die Aminosäuresequenzen der NFS- bzw. der ISA-Kandidaten wiesen ca. 60 % Identität zum entsprechenden *Synechocystis*-Protein auf (Tab. 3-1).

Tab. 3-1 Aminosäurevergleiche zwischen IscS/NFS- (A) NifU/NFU- (B) und IscA/ISA-Proteinen (C).

A	IscS <i>A. vinelandii</i> O31269	NFS1p <i>S. cerevisiae</i> NP-009912	IscS1 <i>Synechocystis</i> sll0704	IscS2 <i>Synechocystis</i> slr0387	IscS3 <i>Synechocystis</i> slr0077	AtNFS <i>A. thaliana</i> NP-172325
IscS		55	38	46	23	22
NFS1p			39	50	24	24
IscS1				38	23	24
IscS2					26	24
IscS3						62

B	NifU* <i>A. vinelandii</i> P05340	NFU1p* <i>S. cerevisiae</i> NP-012884	CnfU <i>Synechocystis</i> ssl2667	AtNFU1 <i>A. thaliana</i> NP-567219	AtNFU2 <i>A. thaliana</i> NP-567735	AtNFU3 <i>A. thaliana</i> NP-568715
NifU		33	39	36	39	42
NFU1p			26	26	29	28
CnfU				49	70	70
AtNFU1					29	29
AtNFU2						55

C	IscA <i>A. vinelandii</i> AAC 24474	ISA1p <i>S. cerevisiae</i> NP-013073	ISA2p <i>S. cerevisiae</i> NP-015392	IscA1 <i>Synechocystis</i> slr1417	IscA2 <i>Synechocystis</i> slr1565	AtISA <i>A. thaliana</i> NP-172520
IscA		39	28	38	38	35
ISA1p			18	36	25	17
ISA2p				30	25	20
IscA1					36	60
IscA2						35

Angaben in % Aminosäure-Identität. Der Vergleich wurde mit dem Programm *MegAlign* (*DNA Star*) nach der Methode *ClustalW* (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Die jeweils größten Identitätswerte der *Arabidopsis*-Proteine sind hervorgehoben (**fett**). Im Tabellenkopf ist neben dem Proteinnamen und dem entsprechenden Organismus auch die Protein- bzw. Gen-Identifikationsnummer angegeben.

Das für die Fe/S-Cluster-Synthese notwendige Ferredoxin der Hefemitochondrien wird als YAH1p (*yeast adrenodoxin homologue*) bezeichnet (Lange et al., 2000), die dazugehörige Reduktase ist ARH1p (*adrenodoxin reductase homologue*; Lacour et al., 1998; Manzella et al., 1998). Für *Synechocystis* war zu dem Zeitpunkt kein homologes Protein zu YAH1p oder ARH1p bekannt. So erfolgte die Suche nach homologen Proteinen in *Arabidopsis* durch den Sequenzvergleich mit den beiden Hefeproteinen. Dabei konnte nur für YAH1p ein *Arabidopsis*-Protein mit geringer Homologie identifiziert werden. Die vorhergesagte Chloroplastenlokalisierung durch das Programm TargetP ist mit einem RC-Wert von 5 außerdem sehr unsicher (RC, *Reliability Class*, Zuverlässigkeit, 1 = höchste

Zuverlässigkeit, 5 = geringste Zuverlässigkeit). Darüber hinaus verfügt das *Arabidopsis*-Protein nur über drei der vier Fe/S-Zentrum-bindenden Cysteinreste des Hefeferredoxins. Somit ist unwahrscheinlich, daß es sich bei AtYAH um ein Ferredoxin handelt.

Als letzte Gruppe standen noch die Chaperone aus, die im *isc*-Operon durch die beiden Gene *hscA* und *hscB* codiert werden. In Hefemitochondrien wurde für das Homologe von HscA (SSQ1 vom DanK/Hsp70-Typ) und für das Homologe von HscB (JAC1 [*J-type accessory chaperone*] vom DnaJ/Hsp40-Typ) eine Mitwirkung an der Fe/S-Zentrum-Biosynthese gezeigt (Strain et al., 1998; Kim et al., 2001; Lutz et al., 2001). Die Suche nach ähnlichen Proteinen in *Arabidopsis*-Datenbanken ergab zwei plastidäre Kandidaten für den DnaJ/Hsp40-Typ, die allerdings in ihrer Größe sehr differieren (160 bzw. 465 AS für die jeweiligen Vorstufenproteine). Ein Homologes zum SSQ1-Protein wurde ebenfalls gefunden, allerdings erwies sich dieses Protein als Mitochondrien-lokalisiert.

Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Daten sind in Tab. 3-2 und 3-3 zusammengefaßt. So zeigt Tab. 3-2 Angaben zur Gen- und Proteinidentifizierung, den in dieser Arbeit verwendeten Namen des Proteins und die Bezugsquelle für die entsprechende cDNA. In Tab. 3-3 sind Länge und Molekulargewichte der Vorläufer- bzw. reifen Proteine dargestellt, so wie sie sich aus den Vorhersageergebnissen von TargetP bzw. ChloroP ergeben.

Tab. 3-2 Protein- und Genidentifizierung der ISC-Kandidaten sowie die jeweilige Bezugsquelle.

Typ	Proteinname	Protein ID	Gen-Locus	cDNA-Quelle
NifU/ IscU/ NFU	AtNFU1	NP-567219	At4g01940	RIKEN
	AtNFU2	NP-567735	At4g25910	PCR*
	AtNFU3	NP-568715	At5g49940	RIKEN
NifS/IscS/NFS	AtNFS	NP-172325	At1g08490	RIKEN
IscA/ISA	AtISA	NP-172520	At1g10500	University of Illinois
HscB/ Hsp40/DnaJ/ JAC	AtJAC1	NP-179378	At2g17880	RIKEN
	AtJAC2	NP-197715	At5g23240	DNA Stock Center
Fdx/YAH	AtYAH	NP-566309	At3g07480	RIKEN

RIKEN: BioResource Center, RIKEN Tsukuba Institute, Japan

University of Illinois: Department of Plant Biology, Urbana, Illinois, USA

DNA Stock Center: Ohio State University, Arabidopsis Biological Resource Center, DNA Stock Center, USA

(*) AtNFU2 wurde wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben durch PCR auf der Basis von cDNA amplifiziert.

Tab. 3-3 Zusammenfassung der Proteindaten und der Vorhersageergebnisse für die ISC-Kandidaten.

Protein	Vorläufer		Vorhersage		reifes Protein	
	AS	kDa _{theor.}	Lokalisierung TargetP (RC)	TP-Länge, AS ChloroP	AS	kDa _{theor.}
AtNFU1	231	25	Cp (1)	69	162	18
AtNFU2	236	26	Cp (2)	39	137	15
AtNFU3	235	26	Cp (1)	16	209	23
AtNFS	463	51	Cp (1)	35	428	47
AtISA	180	20	Cp (1)	55	125	14
AtJAC1	160	18	Cp (1)	39	120	13
AtJAC2	465	51	Cp (1)	38	427	47
AtYAH	159	18	Cp (5)	25	134	15

AS, Aminosäure; Cp, Chloroplast; TP, Transitpeptid; RC, *Reliability Class*, Zuverlässigkeit, 1 = höchste Zuverlässigkeit, 5 = geringste Zuverlässigkeit.

3.2.3 Importverhalten der ISC-Kandidaten

Die Richtigkeit der TargetP-Vorhersage sollte zunächst durch *in vitro*-Importversuche mit isolierten Chloroplasten überprüft werden. Dazu wurden die cDNAs aller in Tab. 3-2 aufgeführten Kandidaten nach Erhalt bzw. nach Amplifikation mittels PCR (AtNFU2, Kapitel 2.2.3) mit dem für *in vitro*-Transkription/Translation optimierten pBAT-Vektor kloniert. Die Synthese der Vorstufenproteine erfolgte *in vitro* durch Transkription der entsprechenden cDNA und anschließender Translation der mRNA im zellfreien Reticulocytenslysat in Gegenwart der [³⁵S]-markierten Aminosäure Methionin. Die markierten Proteine konnten nun durch Inkubation mit isolierten Chloroplasten auf ihre Importkompetenz bzw. innerplastidäre Sortierung hin überprüft werden. Da zu Beginn der Arbeit erst zwei der acht Kandidaten in Form einer cDNA vorlagen, wurden diese beiden Proteine (AtNFU2 und AtISA) auf ihren Import in Spinat- bzw. Erbsenchloroplasten getestet. (Abb. 3-25). Da es sich hierbei zunächst um einen Vorversuch handelte, erfolgte nach dem Importexperiment noch keine Trennung von Stroma und Thylakoiden zur Klärung der innerplastidären Sortierung. Die Plastiden wurden stattdessen nach dem Import nur gewaschen und ein Teil des Ansatzes wurde mit der Protease Thermolysin behandelt (C+), während die zweite Hälfte unbehandelt blieb (C-). Das Ergebnis zeigt deutlich, daß

es sich bei den ausgewählten *Arabidopsis*-Kandidaten AtNFU2 und AtISA tatsächlich um plastidenlokalisierte Proteine handelt, da sie beide mit guter Effizienz sowohl in Spinat- als auch auch in Erbsenchloroplasten transportiert und zum reifen Protein prozessiert wurden (Abb. 3-25). Dabei erfolgte der Import von AtNFU2 in Spinatchloroplasten effizienter als in Erbsenplastiden. In jedem Fall wurde durch die Behandlung mit Thermolysin lediglich der an die Hüllmembran gebundene Vorläufer abgebaut, während das reife Protein innerhalb des Organells vor dem Proteaseangriff geschützt war. Die apparenten Molekulargewichte der Vorläufer- und reifen Proteine stimmten mit den theoretischen bzw. berechneten Werten überein (Tab. 3-3 und 3-4).

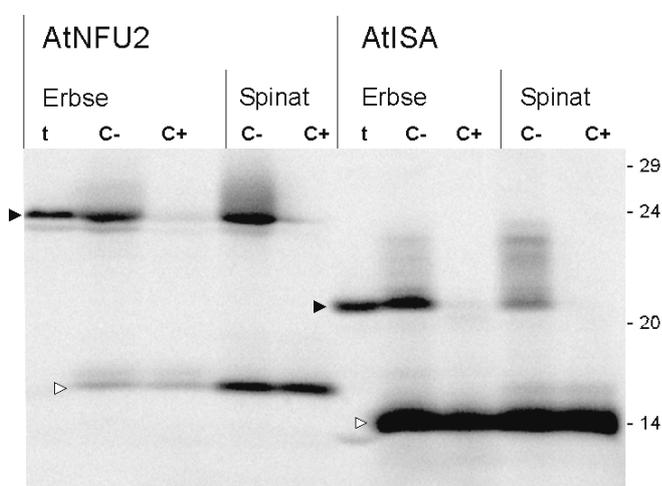


Abb. 3-25 *In organello*-Import von AtNFU2 und AtISA in isolierte Erbsen- bzw. Spinatchloroplasten. Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (Laemmli, 1970). Nach dem Import wurden die Plastiden gewaschen und entweder mit Thermolysin behandelt (C+) oder unbehandelt gelassen (C-). Vorstufenproteine und reife Proteine sind durch schwarze bzw. weiße Pfeilspitzen markiert.

Nachdem die cDNAs von allen acht Kandidaten zur Verfügung standen, wurde zur Klärung der innerplastidären Sortierung der Organellimport mit allen acht Vorstufenproteinen durchgeführt und im Anschluß Stroma und Thylakoide getrennt voneinander analysiert. Der Import erfolgte nun in isolierte Spinatchloroplasten (Abb. 3-26). Der Versuch ergab, daß offenbar alle acht ausgewählten Kandidaten ein Plastidenimportsignal besitzen, da sie von den intakten Chloroplasten aufgenommen wurden. Die Importraten differierten jedoch für die verschiedenen Proteine sehr stark. So wurde das AtISA-Protein mit sehr guter Effizienz importiert, während die Transportrate für das Ferredoxin-Homologe AtYAH nur gering war.

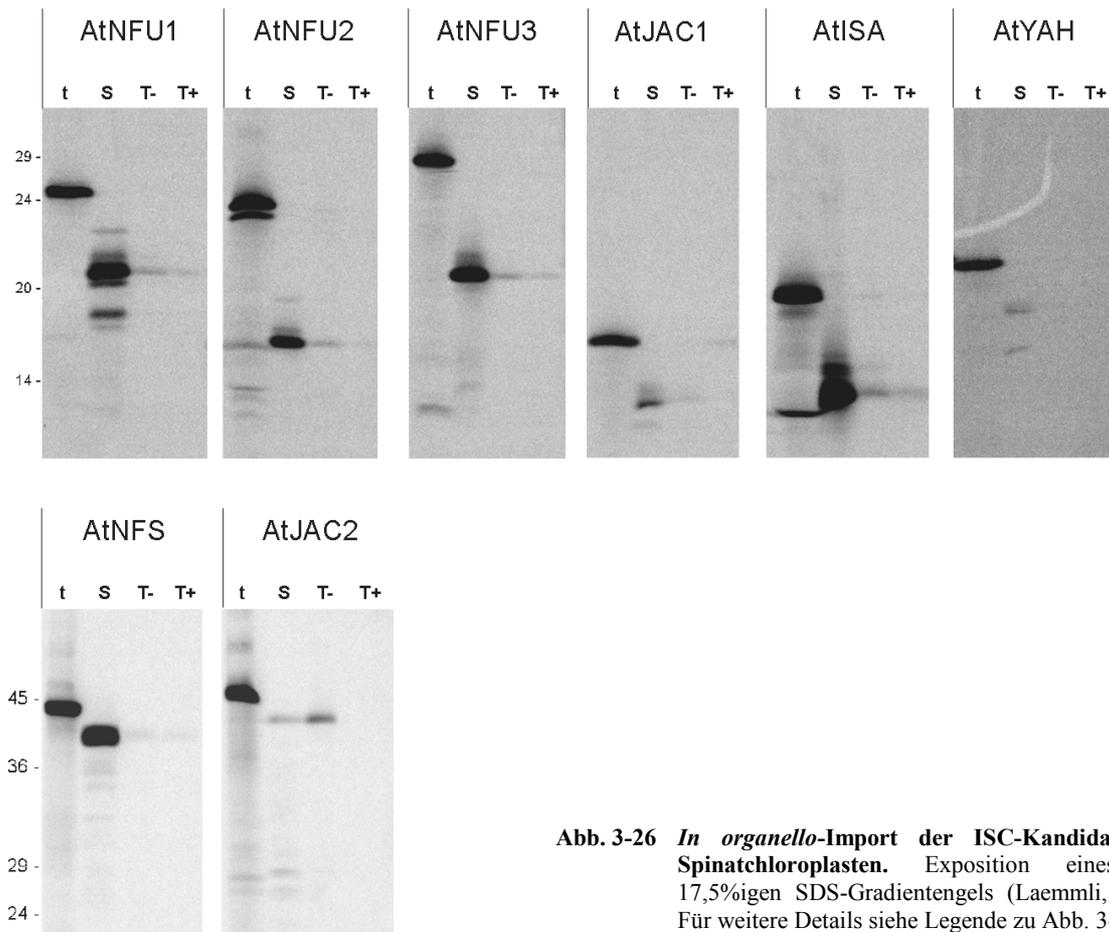


Abb. 3-26 In organello-Import der ISC-Kandidaten in Spinachchloroplasten. Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (Laemmli, 1970). Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 3-1.

Dieses Ergebnis korreliert jedoch gut mit den Vorhersagen des Programms TargetP, das für dieses Protein auch nur eine geringe Wahrscheinlichkeit der Chloroplastenlokalisierung vorhergesagt hatte (*RC* 5, siehe Tab. 3-3). Deshalb bleibt vorerst unsicher, ob es sich bei AtYAH tatsächlich um ein Plastidenprotein handelt.

Auch die beide JAC-Proteine vom DnaJ/Hsp40-Typ sind durch eine geringe Importrate gekennzeichnet, obwohl sie von TargetP mit hoher Wahrscheinlichkeit als plastidenlokalisiert eingestuft wurden (*RC* 1 siehe Tab. 3-3). Interessanterweise liegt der überwiegende Teil des AtJAC2-Proteins in der Thylakoidfraktion vor (Abb. 3-26; T-). Durch den Einsatz von Thermolysin wird dieser Anteil jedoch vollständig degradiert, d.h. AtJAC2 assoziiert vorwiegend mit der stromalen Seite der Thylakoidmembran, wird aber nicht in die Thylakoide transportiert. AtJAC1 dagegen ist fast ausschließlich im Stroma zu finden, denn nur ein Bruchteil des importierten Proteins liegt an der Thylakoidmembran gebunden vor (Abb. 3-26).

Auch bei den übrigen Kandidaten (AtNFU1-3, AtISA und AtNFS) findet man immer einen deutlichen Anteil der reifen Proteine in den Thylakoidfraktionen, obwohl der weitaus größere Anteil dieser Proteine nach dem Import stromalokalisiert ist (Abb. 3-26). Im

Gegensatz zu AtJAC1 und AtJAC 2 wurden diese Proteine jedoch nicht durch die Zugabe von Thermolysin vollständig abgebaut, so daß in einigen Fällen auch in den behandelten Thylakoidfraktionen eine geringe Menge der entsprechenden reifen Proteine zu finden waren. Da die Nutzung von TargetP nur die Vorhersage des Organellimportsignals - im Fall der Chloroplasten eines stromadirigierenden Transitpeptids - ermöglicht, kann die Frage nach der innerplastidären Sortierung damit nicht vollständig beantwortet werden. Das Vorhandensein eines zusätzlichen thylakoiddirigierenden Signalpeptids läßt sich allerdings durch die Nutzung des Programms SignalP erkennen. Allerdings ergab diese Vorhersage, daß keines der hier gezeigten Proteine über ein Signalpeptid verfügt und folglich nicht in den Thylakoiden lokalisiert sein sollte. Warum trotzdem ein geringer Anteil dieser Proteine anscheinend proteaseresistent in der Thylakoidfraktion vorlag, bleibt somit unklar. Möglicherweise mag eine kompakte Faltung, die Bindung an die Lipidschicht oder an andere unbekannte Faktoren einen gewissen Schutz der Proteine vor Proteolyse bewirken.

Die apparenten Molekulargewichte der Vorläufer- bzw. der reifen Proteine wurde anhand des Laufverhaltens eines Standardmarkers (7L) errechnet und sind in Tab. 3-4 den theoretischen Molekulargewichten gegenübergestellt aufgelistet. Dabei zeigte sich, daß für die Proteine kleiner und mittlerer Größe (bis 30 kDa) beide Werte ziemlich gut übereinstimmen, nur für die Proteine mit einem Molekulargewicht > 40 kDa (AtJAC2 und AtNFS) wichen der theoretische und apparente Wert stärker voneinander ab.

Tab. 3-4 Vergleich von theoretischen und apparenten Molekulargewichten der ISC-Kandidaten (nach Abb. 3-26).

Protein	Vorläuferprotein		reifes Protein	
	kDa (theoretisch)	kDa (apparent)	kDa (theoretisch)	kDa (apparent)
AtNFU1	25	26	18	20
AtNFU2	26	25	15	16
AtNFU3	26	28	23	20
AtNFS	51	44	47	41
AtISA	20	19	14	14
AtJAC1	18	16	13	13
AtJAC 2	51	45	47	42
AtYAH	18	20	15	18/16

Zum Vergleich wurden einige der oben aufgeführten Vorläuferproteine auch in Erbsenchloroplasten importiert (Abb. 3-27).

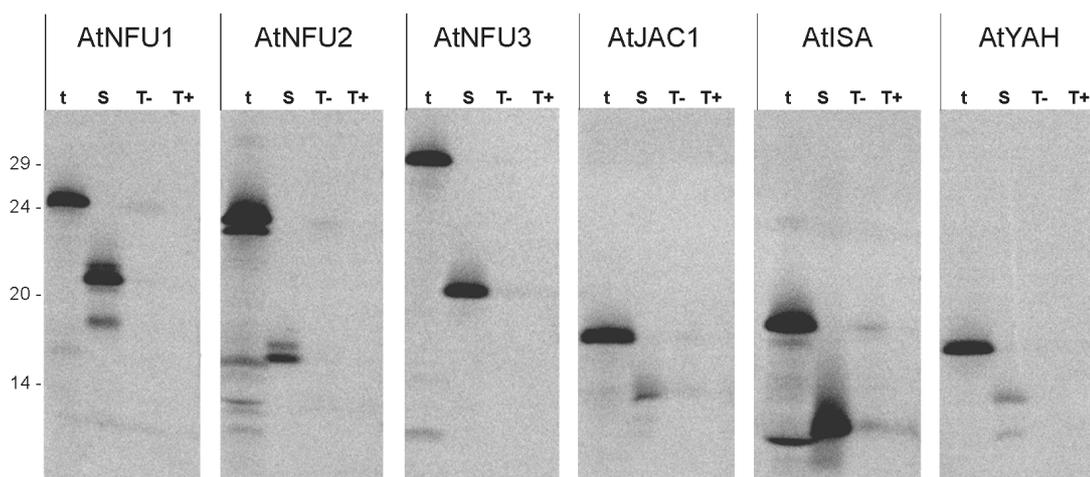


Abb. 3-27 In organello-Import ausgewählter ISC-Kandidaten in Erbsenchloroplasten. Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (Laemmli, 1970). Für weitere Details siehe Abb. 3-1.

Auch in diesem System konnten alle verwendeten Proteine importiert und prozessiert werden. Allerdings wurde hier lediglich für AtISA ein geringer Anteil des reifen Proteins auch in der proteasebehandelten Thylakoidfraktion gefunden (Abb. 3-27; T+). Die Lokalisierung der drei NFU-Proteine beschränkte sich im Erbsen-Importsystem, anders als bei Spinatplastiden beobachtet, nur auf die Stromafraktion. Die Proteine AtJAC1 und AtYAH verhielten sich im Erbsenimport vergleichbar zum Import in Spinatchloroplasten.

3.2.4 Komplexe der ISC-Kandidaten im Stroma

Nachdem nun die Stromalokalisierung der ausgewählten Kandidaten für die plastidäre Fe/S-Cluster-Assemblierung durch *in vitro*-Import in isolierte Chloroplasten gezeigt wurde, sollte im nächsten Schritt nach stromalen Interaktionen dieser Proteine geschaut werden. Um einen ersten Eindruck von der Situation der importierten Proteine im Stroma zu bekommen, wurden die nach dem Import gewonnenen Stromafraktionen über native Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Gelsysteme benutzt: zum einen das Tris-Glycin-System (TG), das eine SDS-freie Variante des Laemmli-Systems darstellt (Laemmli, 1970) und zum anderen das *Colorless native*-System (CN), bei dem es sich um eine Abwandlung des *Blue native*-Gelsystems handelt, das so statt für membranständige für lösliche Proteinkomplexe geeignet ist (Schägger et al., 1994; Kapitel 2.2.8). Die native Auftrennung des Stromas nach Import der verschiedenen Vorläufer in isolierte Spinatchloroplasten erfolgte parallel auf einem TG- und einem CN-Gel (Abb. 3-28 und 3-29 A).

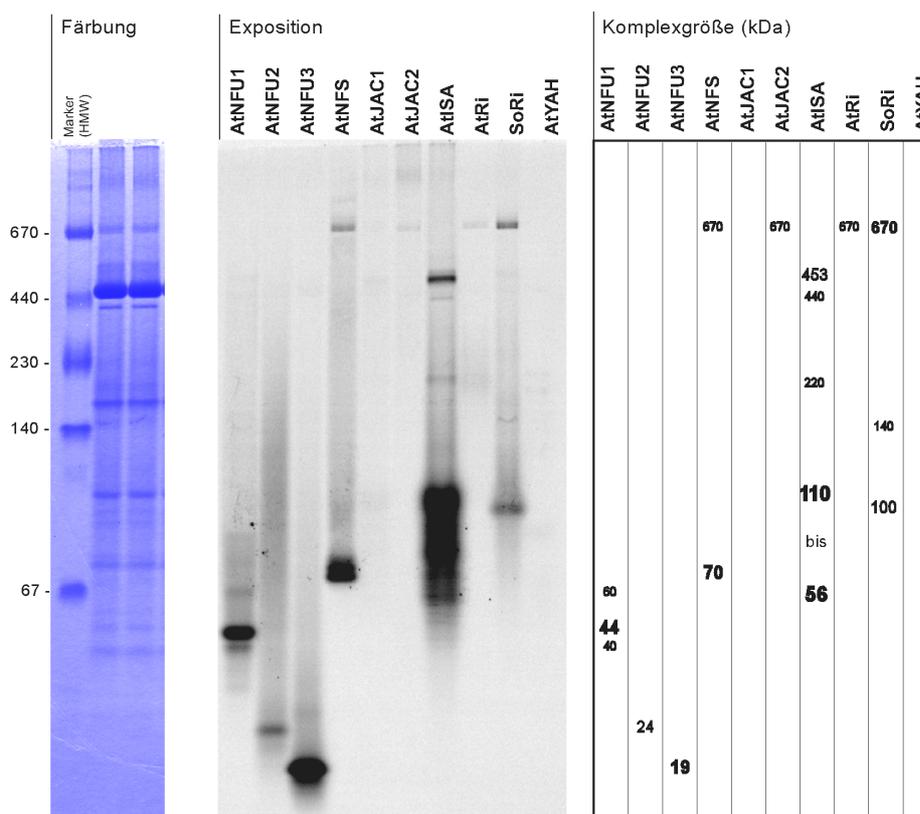


Abb. 3-28 Native Auftrennung (TG-Gel) von Stromaextrakten nach Import der ISC-Kandidaten in isolierte Spinatchloroplasten. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Coomassie-gefärbten 5-13%igen Tris-Glycin (TG)-Gels einschließlich des mitgeführten Größenstandards (links), die Exposition des vollständigen Gels (Mitte) und die apparenten Molekulargewichte der dort sichtbaren Komplexe, die anhand des Größenstandards berechnet wurden (rechts). Die angegebenen Proteine wurden in isolierte Spinatchloroplasten importiert, die Stromafraktionen wurden anschließend isoliert und jeweils ca. 15 µg Chl. entsprechende Mengen wurde nativ aufgetrennt.

Die native Auftrennung der Stromafraktionen ergab, daß die frisch importierten ISC-Kandidaten durchaus in Form von Proteinkomplexen vorliegen. Dabei zeigte sich, daß prinzipiell beide Gele die gleichen Muster erkennen lassen, jedoch scheint das Tris-Glycin-Gelsystem für die Auftrennung von kleineren Proteinkomplexen besser geeignet zu sein (Abb. 3-28 und 3-29 A). So erfolgte die Größenbestimmung der Proteinkomplexe anhand ihres Laufverhaltens im TG-Gel (Abb. 3-28). Der größte Komplex wies im TG-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 670 kDa auf, im CN-Gel lief dieser Komplex bei 440 kDa. Da die beiden mitgeführten Rieske-Proteine (aus *Arabidopsis* und Spinat) ebenfalls diesen Bandenshift von 670 auf 440 kDa erkennen lassen und die 440 kDa-Bande im CN-Gel bereits als Cpn60-haltiger Komplex identifiziert wurde (siehe 3.1.3.3), kann man davon ausgehen, daß es sich bei der 670 kDa-Bande im TG-Gel ebenfalls um Cpn60 handelt. Neben den Rieske-Proteinen zeigten auch AtNFS und die beiden AtJAC Proteine eine schwache Interaktion mit dem Cpn60-Komplex. Der Hauptkomplex des AtNFS Protein lag jedoch bei etwa 70 kDa (Abb. 3-28).

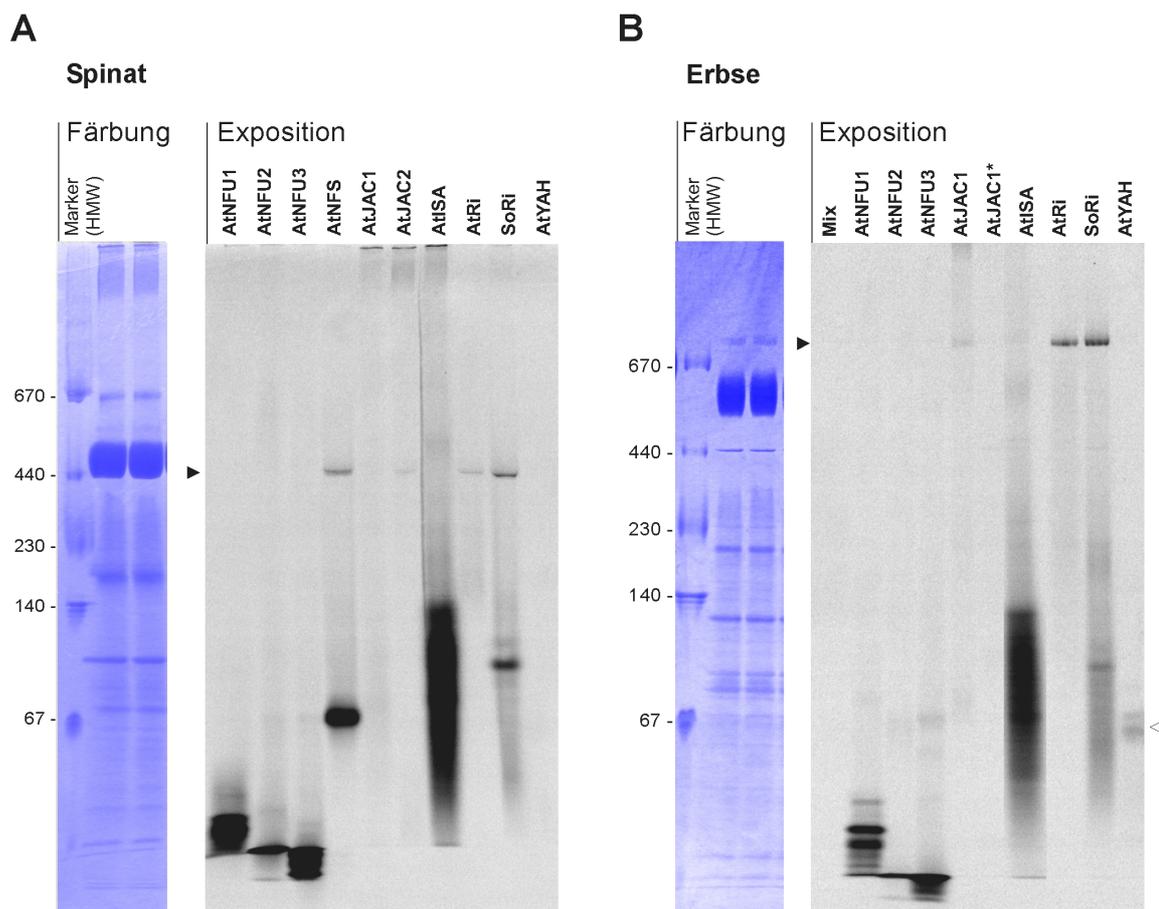


Abb. 3-29 Native Auftrennung (CN-Gel) von Stromaextrakten nach Import der ISC-Kandidaten in isolierte Spinat- bzw. Erbsenchloroplasten. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt des Coomassie-gefärbten 5-13%igen *Colorless native* (CN)-Gels einschließlich des mitgeführten Größenstandards sowie die Exposition des vollständigen Gels, auf denen Stromaextrakte der Spinat- (A) bzw. Erbsenplastiden (B) aufgetrennt wurden. Die angegebenen Proteine wurden in die jeweiligen isolierten Plastiden importiert, die Stromafraktionen wurden anschließend reisoliert und ca. 15 µg Chl. entsprechende Menge wurde nativ aufgetrennt. Das mit (*) gekennzeichnete Protein wurde in Weizenkeimextrakt (Promega) synthetisiert. Schwarze Pfeilspitzen markieren den Cpn60-Komplex. Der weiße Pfeil deutet auf den AtYAH-Komplex hin, der nur bei Verwendung von Erbsenplastiden detektiert werden konnte

Da bereits aus dem Bakterien- und Hefesystem bekannt ist, daß IscS/NFS-Proteine funktionell als Homodimer vorliegen (Zheng et al., 1993; Jaschkowitz & Seidler, 2000; Mühlhoff et al., 2004), könnte es sich bei dieser 70 kDa-Bande um die dimere Form des AtNFS handeln. Auch von den IscA/ISA-Proteinen weiß man, daß sie Homodimere und sogar Tetramere bilden (Ollagnier-de-Choudens et al., 2001; Wu et al., 2002; Ollagnier-de-Choudens et al., 2003; Wollenberg et al., 2003; Bilder et al., 2004). Da der hier analysierte ISA-Kandidat als Monomer eine Größe von nur 14 kDa aufweist, handelt es sich bei den Banden im nativen Tris-Glycin-Gel, im Bereich von ca. 56 bis 110 kDa, wahrscheinlich um Multimere des AtISA-Proteins (Abb. 3-28). Dabei würde die untere Grenze von 56 kDa gut mit der Größe für ein AtISA-Tetramer korrelieren, 110 kDa würde durch ein Octamer erreicht. Natürlich könnten auch Interaktionen mit anderen Proteinen für die Ausbildung

dieser Komplexe verantwortlich sein. Dies ist zumindest für die hochmolekularen Komplexe von 220 bzw. 440/453 kDa sehr wahrscheinlich. Es zeigte sich außerdem, daß die AtISA-haltigen Komplexe sich zum Teil mit den Komplexen anderer Proteine überschneiden, so mit dem 100 kDa-Komplex des Rieske-Proteins und dem 70 kDa-Komplex von AtNSF. Dies mag auf heterogene Komplexe hindeuten, an denen möglicherweise beide Komponenten beteiligt sind.

Die Komplexe der drei NFU-Proteine sind relativ klein und laufen alle unterhalb der 67 kDa-Markerbande (Abb. 3-28 und 3-29 A). Dabei ist für AtNFU3 das Auftreten als Monomer wahrscheinlich, AtNFU1 könnte dem Laufverhalten nach hauptsächlich als Dimer vorliegen. Beide Proteine zeigten als Monomer im SDS-Gel eine apparente Größe von 20 kDa (Abb. 3-26). Die Größe des AtNFU2-Komplexes liegt mit etwa 24 kDa zwischen der Monomer- und Dimergröße von 16 bzw. 31 kDa. Deshalb ist für AtNFU2 schwer abzuschätzen, ob die beobachtete Bande die monomere oder die dimere Form darstellt.

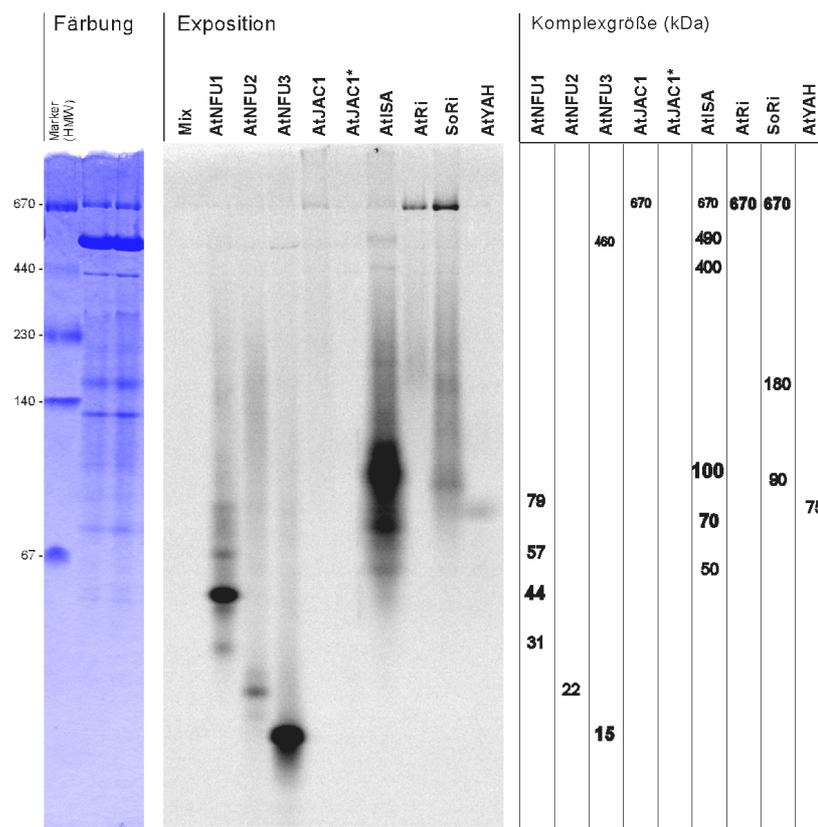


Abb. 3-30 Native Auftrennung (TG-Gel) von Stromaextrakten nach Import der ISC-Kandidaten in isolierte Erbsenchloroplasten. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Coomassie-gefärbten 5-13%igen Tris-Glycin (TG)-Gels einschließlich des mitgeführten Größenstandards (links), die Exposition des vollständigen Gels (Mitte) und die apparenten Molekulargewichte der dort sichtbaren Komplexe, die anhand des Größenstandards berechnet wurden (rechts). Die angegebenen Proteine wurden in isolierte Erbsenchloroplasten importiert, die Stromafraktionen wurden anschließend reisoliert und ca. 15 µg Chl. entsprechende Menge wurde nativ aufgetrennt. Das mit (*) gekennzeichnete Protein wurde in Weizenkeimextrakt (Promega) synthetisiert.

Das Ferredoxinhomologe AtYAH ergab bei der Verwendung von Spinatchloroplasten in beiden Gelsystemen kein Signal. Durch den Einsatz von Erbsenplastiden konnte jedoch für dieses Protein ein stromaler Komplex von ca. 75 kDa gezeigt werden (Abb. 3-29 B und 3-30). Ansonsten ergab die Verwendung von Erbsenplastiden an Stelle der Spinatchloroplasten nur leichte Veränderungen des zuvor beobachteten Bandenmusters: So kam es beim AtISA-Protein zu einer Abschwächung der Banden um 450 kDa und beim Rieske-Protein tauchte eine diffuse Bande bei ca. 180 kDa auf, die bei der Verwendung von Spinatplastiden bei ca. 140 kDa lag (Abb. 3-28 und 3-30).

Die Auftrennung der Stromafraktionen aus Erbse mittels CN-Gel (Abb. 3-29 B) zeigte im Vergleich zum TG-Gel (Abb. 3-30) keine derart drastische Veränderung im Laufverhalten des 670 kDa-Komplexes, wie sie zuvor bei der Verwendung von Spinatplastiden beobachtet wurde (Abb. 3-28 und 3-29 A). Ansonsten ist das Bandenmuster der CN-Gelaufreinigung für Erbse- und Spinatstroma vergleichbar (Abb. 3-29).

3.2.5 Interaktionen der ISC-Kandidaten mit dem Rieske-Protein

Da die hier verwendeten ISC-Kandidaten im nativen Zustand durchaus in Form von Proteinkomplexen vorliegen, sollte überprüft werden, ob es zu Interaktionen mit dem Rieske-Protein kommt, das schließlich einen potentiellen [2Fe-2S]-Cluster-Akzeptor des ISC-Systems darstellt.

Eine Möglichkeit zur Erkennung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Co-Immunpräzipitation (Kapitel 2.2.11). Dazu wurde der eine Partner, in diesem Fall der ISC-Kandidat als radioaktiv markierter Vorläufer, gemeinsam mit dem potentiellen Interaktionspartner, hier dem Rieske-Protein in unmarkierter, überexprimierter Form in isolierte Spinatchloroplasten importiert. Anschließend wurde von diesen Organellen die Stromafraktion gewonnen und mit Antikörpern gegen das Rieske-Protein inkubiert. Kam es nun innerhalb des Stromas zu einer direkten Interaktion zwischen dem unmarkierten Rieske-Protein und dem ISC-Kandidaten, sollte durch den Einsatz der Rieske-Antikörper das radioaktiv markierte ISC-Protein co-präzipitiert werden können. Als ISC-Kandidaten wurden die drei AtNFU-Proteine sowie das AtISA-Protein eingesetzt, da laut Literaturrecherche bei diesen Proteinen die Wahrscheinlichkeit einer Substratinteraktion am größten zu sein schien. Zusammen mit dem überexprimierten Rieske-Protein wurden sie in isolierte Spinatchloroplasten importiert, von denen anschließend das Stroma gewonnen und zur Co-Immunpräzipitation genutzt wurde (Abb. 3-31).

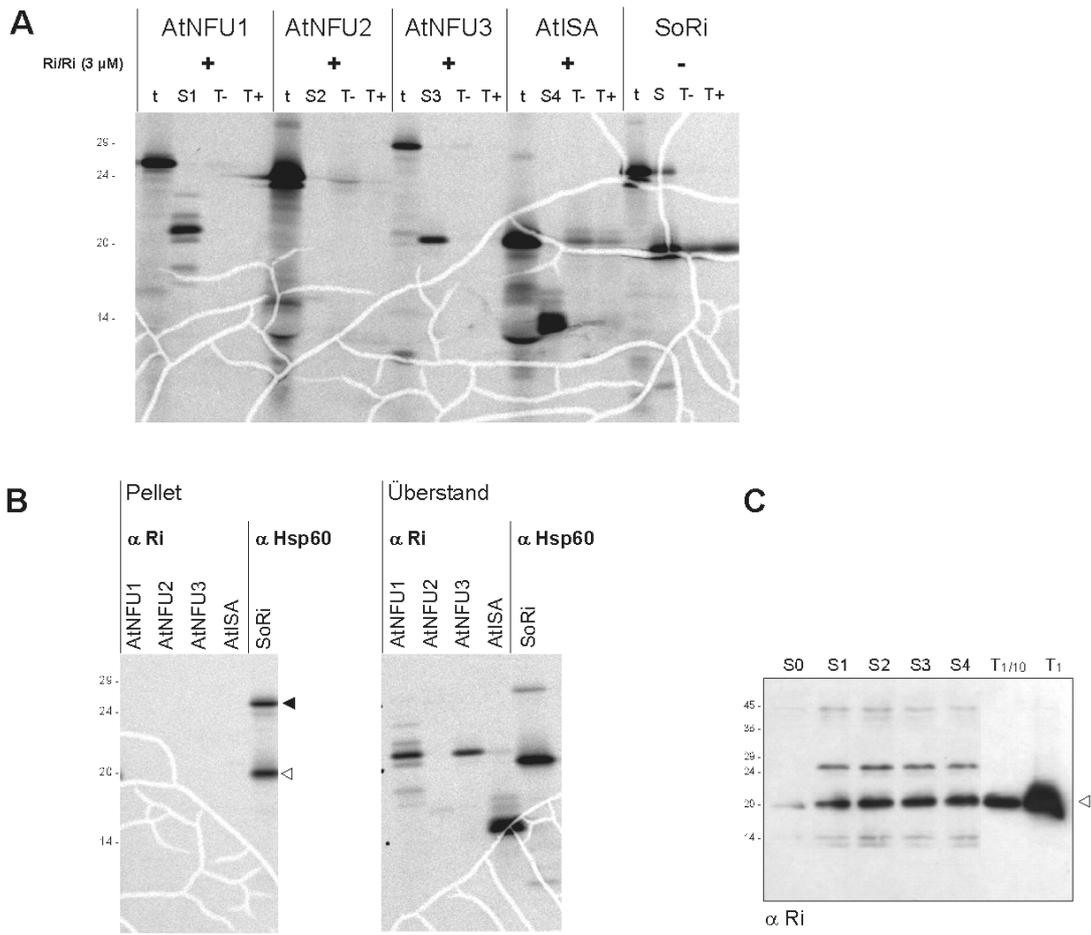


Abb. 3-31 Co-Immünpräzipitation der radioaktiv markierten ISC-Kandidaten mit Hilfe des Rieske-Antikörpers. Expositionen von 10-17,5%igen SDS-Gradientengelen (**A** und **B**) bzw. über ECL detektierte Antikörperreaktionen (**C**). Die radioaktiv markierten ISC-Kandidaten wurden zusammen mit 3 μ M des nicht-markierten, überexprimierten Rieske-Vorstufenproteins in isolierte Spinachchloroplasten importiert. Das Stroma wurde anschließend reisoliert und mit Rieske-Antikörpern (gebunden an ProteinA-Sepharose) 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Importfraktionen (**A**) und die Fraktionen der Immünfällung (Pellet und Überstand [1/10 Vol], **B**) wurden mittels SDS-PAGE und Exposition analysiert. Die Anwesenheit des unmarkierten Rieske-Proteins in den Stromafraktionen wurde durch *Western*-Analyse gezeigt (**C**). Dazu wurden jeweils 3 μ g Chlorophyll entsprechende Menge des Stromas zusammen mit der stöchiometrischen Menge Thylakoide (T₁) bzw. einem 1/10 dieser Menge (0,3 μ g Chl., T_{1/10}) auf einem 15%igen SDS-Minigel aufgetrennt. Die Stromafraktion „S0“ stammt von Chloroplasten, die nicht für einen Importversuch verwendet wurden (Negativkontrolle). Als Positivkontrolle für die Co-Immünfällungen wurde das radioaktiv markierte Rieske-Vorstufenprotein importiert und mit den Hsp60-Antikörpern co-präzipitiert. Das Rieske-Vorstufenprotein ist mit einem schwarzen Pfeil, das reife Protein mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet.

Daß beide Partner tatsächlich im Stroma vorlagen, wurde für die ISC-Kandidaten durch Autoradiographie (Abb. 3-31 A, B), für das Rieske-Protein durch *Western*-Analyse gezeigt (Abb. 3-31 C). Dabei erfolgte der Chloroplastenimport von AtNFU1, AtNFU3 und AtISA in ausreichendem Umfang (Abb. 3-51 A und B, Überstand). Allerdings ergab die Co-Immünfällung mit Antikörpern gegen das Rieske-Protein in keinem der drei Fälle eine Präzipitation der radioaktiv markierten AtNFU/AtISA-Proteine (Abb. 3-31 B; Pellet). Für das AtNFU2-Protein ist zu erkennen, daß der Import in die Plastiden nur sehr ineffizient erfolgte. In diesem Fall hat der Einsatz von 3 μ M Rieske-Vorläuferprotein eine zu starke

Kompetition an der Chloroplastenhülle bewirkt. Somit war eine Co-Präzipitation durch den Rieske-Antikörper schon aufgrund der geringen AtNFU2-Menge unmöglich.

Dagegen konnte im Kontrollansatz mit Hilfe der Hsp60-Antikörper das radioaktiv markierte Rieske-Protein co-präzipitiert werden (Abb. 3-31 B; Pellet). Der Grund dafür, daß keine Interaktion zwischen dem Rieske-Protein und den Kandidaten der plastidären Fe/S-Cluster-Assemblierung zu sehen war, könnte daran liegen, daß eine solche Interaktion nur kurzzeitig auftritt und/oder von instabiler Natur ist.

Deshalb wurde in einem alternativen Ansatz auf die langwierige Prozedur der Immunfällung verzichtet und stattdessen die gewonnenen Stromaextrakte direkt auf einem nativen Gel aufgetrennt. Die Idee hinter diesem Experiment war, daß eine Interaktion zwischen beiden Partnern im Stroma zu einer Verschiebung der im nativen Gel beobachteten Proteinkomplexe führen sollte. Um jeweils beide Interaktionspartner im Chloroplastenstroma vorliegen zu haben, wurden wiederum Doppelimporte durchgeführt. Sowohl das *in vitro* translatierte, radioaktiv markierte ISC-Kandidatenprotein als auch das Rieske-Protein, in überexprimierter, nicht markierter Form, wurden mit isolierten Spinatchloroplasten inkubiert. Dabei wurden zwei verschiedene Rieske-Vorstufenproteine verwendet, zum einen das authentische Protein aus Spinat (Ri/Ri), zum anderen das Fusionsprotein FNR/Ri, bei dem der reife Teil des Rieske-Proteins mit dem FNR-Transitpeptid kombiniert wurde. Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß dieses Fusionsprotein eine höhere Importrate in isolierte Chloroplasten zeigt, als das authentische Rieske-Vorstufenprotein und im Stroma ebenfalls korrekt prozessiert wird (Clausmeyer, 1992). Als Negativkontrolle wurde die unmarkierte, überexprimierte Vorläuferform der authentischen Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR/FNR) eingesetzt, die als Fe/S-freies Enzym keine Interaktion mit den ISC-Proteinen eingehen sollte. Als ISC-Proteine wurden AtNFU3, AtNFS und AtISA ausgewählt. Die Importversuche wurden unter Standardbedingungen durchgeführt, das Stroma wurde anschließend reisoliert und nativ über ein Tris-Glycin Gel aufgetrennt. Die Exposition dieses Gels machte die ISC-Proteinhaltigen Komplexe sichtbar (Abb. 3-32).

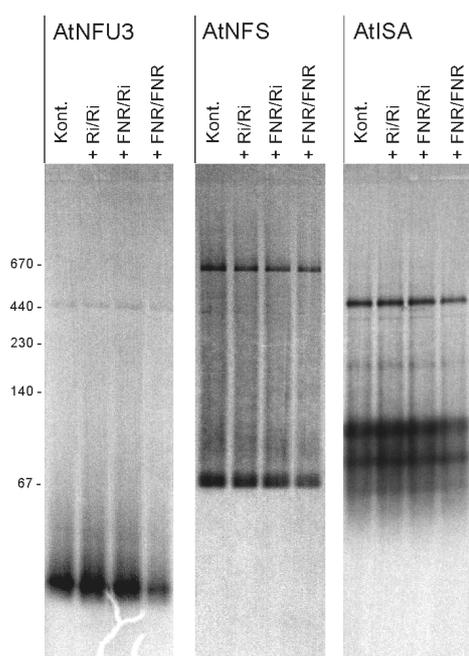


Abb. 3-32 Co-Import von ISC-Kandidaten und dem Rieske-Protein mit anschließender, nativer Auftrennung (TG-Gel) der Stromakomplexe. Exposition eines 5-13%igen Tris-Glycin (TG)-Gels. Die oben angegebenen ISC-Kandidaten wurden als radioaktiv markierte Vorstufen allein (Kont.) bzw. zusammen mit den nicht-markierten Proteinen (Ri/Ri, FNR/Ri, FNR/FNR; jeweils 4 μ M) in isolierte Spinatchloroplasten importiert. Das Stroma wurde isoliert und nativ aufgetrennt (jeweils 25 μ g Chlorophyll entsprechend).

Dabei zeigten sich jedoch nicht die erhofften Bandenverschiebungen, die auf eine substratspezifische Interaktion, in diesem Fall mit dem Rieske-Protein, hingewiesen hätten. Alle Ansätze zeigten das gleiche Bandenmuster, egal ob bzw. welches Substrat in überexprimierter Form vorhanden war (Abb. 3-32). So erfolgte die Ausbildung der ISC-Komplexe wie zuvor beobachtet (Abb. 3-28). Jedoch ließen sich in diesem Versuch im Fall des AtISA drei distinkte Banden in dem sonst durchgängig geschwärmten Bereich erkennen, die eine apparente Größe von 106, 75 bzw. 56 kDa aufwiesen.

Da unter den hier gewählten Bedingungen keine Interaktion zwischen den ISC-Kandidaten und dem Rieske Protein gezeigt werden konnte, sollte versucht werden mit Hilfe des rekonstituierten IscA1-Proteins aus *Synechocystis* eine funktionelle Verbindung zum Rieske-Protein aufzuzeigen.

3.2.6 Das IscA1-Protein aus *Synechocystis* PCC6803

Für das IscA1-Protein (*slr1417*) aus *Synechocystis* konnte bereits gezeigt werden, daß es als Dimer einen transient gebundenen [2Fe-2S]-Cluster auf Apo-Ferredoxin übertragen kann. Sogar der Aufbau eines [4Fe-4S]-Zentrums, das z.B. zur Aktivierung des Enzyms Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS)-Reduktase nötig ist, war durch IscA1 möglich (Wollenberg et al., 2003). Deshalb sollte dieses System genutzt werden, um herauszufinden, ob ein transient an IscA1 gebundener [2Fe-2S]-Cluster auch auf das plastidäre Rieske-Protein von Spinat übertragen werden kann. Die dazu notwendigen Vorarbeiten wurden in

der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Seidler (Biochemie der Pflanzen, Fakultät Biologie, Ruhr-Universität Bochum; Kapitel 2.2.12) durchgeführt. Dort war bereits die Methodik etabliert, das durch Überexpression in *E. coli* gewonnene IscA1-Protein aus *Synechocystis* unter anaeroben Bedingungen zu rekonstituieren, d.h. mit einem Fe/S-Cluster auszustatten (IscA_{rek}). Dabei wurde sowohl die chemische Methode (Sulfid und Fe²⁺) als auch die enzymatische Methode (IscS, Cystein und Fe²⁺) zur Rekonstitution genutzt (Kapitel 2.2.12). Die Übertragung des rekonstituierten [2Fe-2S]-Zentrums von IscA_{rek} auf ein Apoprotein war dann sowohl unter anaeroben, als auch unter aeroben Bedingungen möglich, wie es am Beispiel des Ferredoxins gezeigt werden konnte (Abb. 3-33).

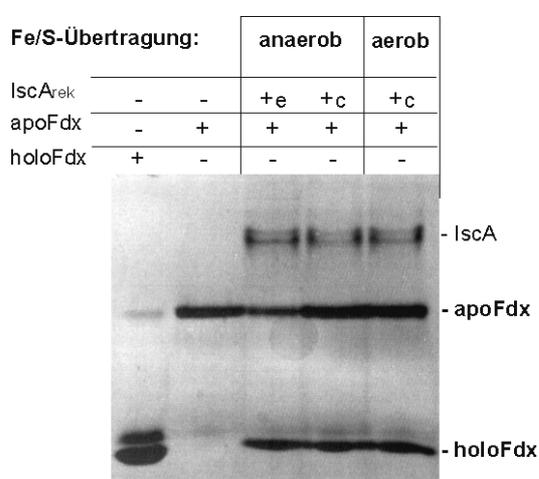


Abb. 3-33 Übertragung des IscA1-gebundenen [2Fe-2S]-Zentrums auf Ferredoxin (*Synechocystis*). Dargestellt ist ein gefärbtes (*stains all*, Sigma-Aldrich) 20%iges natives Tris-Glycin-Minigel mit 20 mM DTT. Die Rekonstitution des IscA (*Synechocystis*) erfolgte entweder enzymatisch (e) oder chemisch (c) wie in Kapitel 2.2.12 beschrieben. Die anschließende Übertragung des IscA-gebundenen [2Fe-2S]-Clusters auf Ferredoxin (*Synechocystis*) wurde unter anaeroben bzw. aeroben Bedingungen durchgeführt. Holo- und Apoform des Ferredoxins (jeweils 5 µg Protein geladen) sowie das IscA-Protein sind markiert.

Die Trennung von Apo- und Holoform des Ferredoxins erfolgte durch native Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Aufgrund ihrer kompakten Struktur zeigt die Holoform ein schnelleres Laufverhalten als die Fe/S-Zentrum-freie Apoform (Takahashi et al., 1986).

Analog zu diesem Prinzip sollte es möglich sein, eine IscA_{rek}-vermittelte Modifikation des Rieske-Proteins durch ein verändertes Laufverhalten im nativen Gel zu detektieren. Dazu wurde sowohl der Vorläufer als auch das reife Rieske-Protein *in vitro* translatiert und mit dem rekonstituierten IscA1-Protein, das von der AG Seidler zur Verfügung gestellt worden war, bei Raumtemperatur (20 °C) bzw. auf Eis eine Stunde inkubiert. Der Kontrollansatz enthielt kein IscA_{rek}. Alle Proben wurde auf einem nativen, reduzierenden (20 mM DTT) Tris-Glycin-Gel aufgetrennt, das anschließend exponiert wurde (Abb. 3-34). Dieser

Versuch ergab jedoch keine $IscA_{rek}$ -abhängige Veränderung im Laufverhalten der Rieske-Proteine; sowohl Vorläufer als auch reifes Rieske-Protein zeigten in den Ansätzen mit und ohne $IscA_{rek}$ jeweils identische Bandenmuster (Abb. 3-34). Somit ist offenbar das rekonstituierte $IscA1$ -Protein aus *Synechocystis* nicht in der Lage das Fe/S-Zentrum auf das plastidäre Rieske-Protein aus Spinat zu übertragen. Entweder gibt es auch *in vivo* keine funktionelle Interaktion zwischen $IscA_{rek}$ und dem Rieske-Protein, d.h. der Einbau erfolgt auf einem anderen Weg als beim Ferredoxin; oder es kommt zwar zu einer Interaktion, die jedoch aufgrund ihrer Instabilität bzw. Kürze mit den hier gewählten Methoden nicht detektierbar ist. Außerdem wird der Faltungszustand des Rieske-Proteins für eine Fe/S-Cluster-Assemblierung von entscheidender Bedeutung sein.

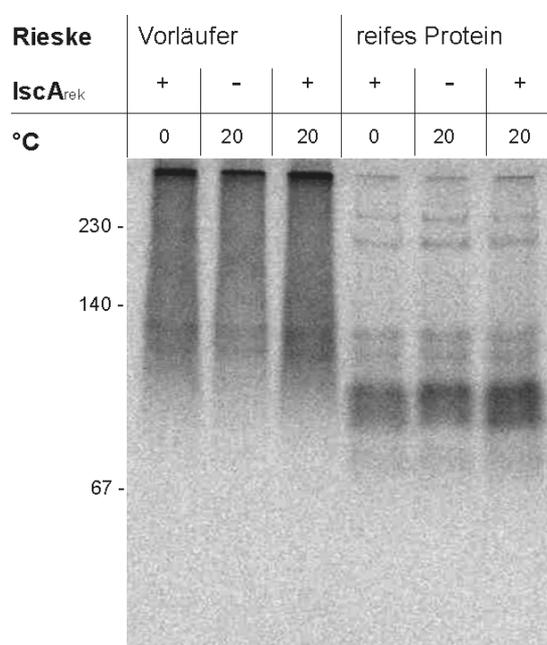


Abb. 3-34 Ansatz zur Übertragung des $IscA1$ -gebundenen $[2Fe-2S]$ -Zentrums auf das Rieske-Protein. Exposition eines 10-17,5%igen Tris-Glycin-Gels mit 20 mM DTT. Jeweils 2 μ l des *in vitro*-Translationsansatzes (Rieske Vorläufer bzw. reifes Protein), der für 1 h bei RT (20 °C) bzw. auf Eis (0 °C) mit dem $[2Fe-2S]$ -Cluster-gebundenen $IscA$ ($IscA_{rek}$) inkubiert worden war (Kapitel 2.2.12), wurden nativ aufgetrennt.

Um die Bedingungen, gerade hinsichtlich des Faltungszustandes, stärker an *in vivo*-Bedingungen anzupassen, wurde der Versuchsansatz folgendermaßen modifiziert: Das *in vitro* synthetisierte Rieske-Protein wurde zunächst in isolierte Erbsenplastiden importiert und anschließend mit dem Stromaextrakt reisoliert. Da das Rieske-Protein im Stroma Cpn60-gebunden vorliegt, kann man annehmen, daß zumindest ein Teil des so gewonnenen Proteins in einem Faltungszustand vorliegt, der den Fe/S-Cluster-Einbau ermöglichen sollte. Der so gewonnene Stromaextrakt wurde mit dem rekonstituierten $IscA$ aus *Synechocystis* versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur (20 °C) bzw. auf Eis (0 °C)

inkubiert (Kapitel 2.2.12). Die anschließende Detektion einer funktionellen Verbindung zwischen $IscA_{rek}$ und dem Rieske-Protein erfolgte diesmal nicht über die native Gelelektrophorese, sondern durch die Quantifizierung des anschließend durchgeführten Transportversuchs mit dem Rieske-haltigen Stromaextrakt und isolierten Erbsenthylakoiden (20 min bei 25 °C im Licht; Abb. 3-35). Wie bereits in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben, ließ sich das aus Erbsenstroma reisolierte Rieske-Protein in geringem Umfang in isolierte Thylakoide transportieren; der direkte Thylakoidtransport des *in vitro* synthetisierten Rieske-Proteins war dagegen nicht möglich (Abb. 3-15, 3-16). Wenn dieses Thylakoidtransportdefizit auf den fehlenden Fe/S-Cluster zurückzuführen ist und eine $IscA_{rek}$ -vermittelte [2Fe-2S]-Übertragung auf das Rieske-Protein erfolgen kann, sollte eine Steigerung des Rieske-Thylakoidtransports durch die zuvor erfolgte Inkubation mit $IscA_{rek}$ möglich sein.

Alle Fraktionen des so durchgeführten Experiments wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Exposition des Gels analysiert (Abb. 3-35). Um auszuschließen, daß $IscA_{rek}$ eine unspezifische Wirkung auf den Thylakoidtransport hat, wurde ein Fe/S-Zentrum-freies Protein, das 23 kDa-Protein, als Negativkontrolle mitgeführt (Abb. 3-35). Der Organellimport des 23 kDa-Proteins erfolgte allerdings in Gegenwart von Nigericin, da nur so eine Akkumulation dieses $\Delta pH/Tat$ -Substrats im Stroma möglich war.

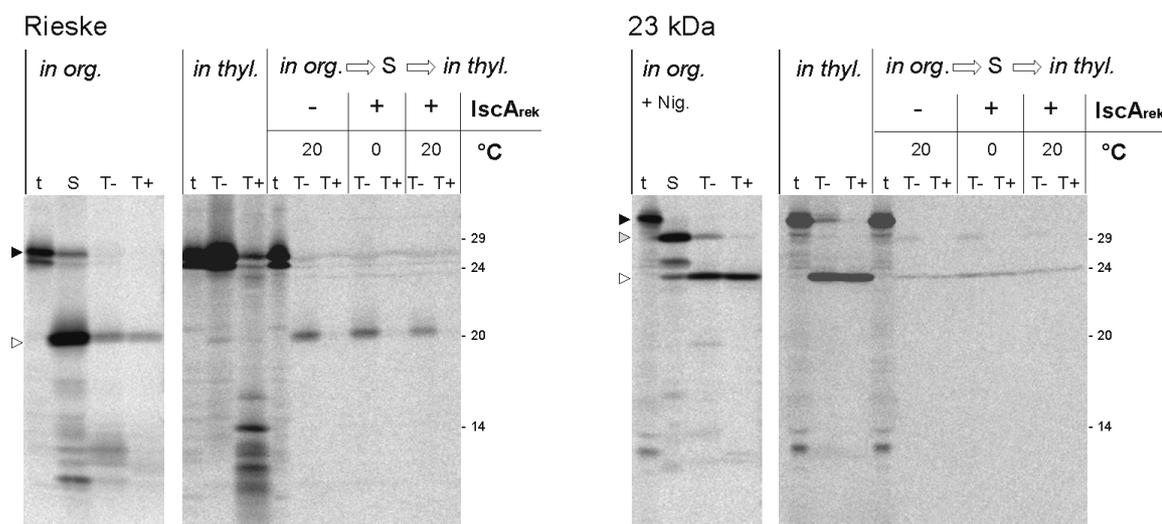


Abb. 3-35 Kombination von Organellimport – $IscA_{rek}$ -Inkubation – Thylakoidimport. Expositionen von 10-17,5%igen SDS-Gradientengelen (Laemmli, 1970). Das *in vitro* synthetisierte Rieske-Protein (links) bzw. das 23 kDa-Protein (rechts) wurde zuerst in isolierte Erbsenchloroplasten importiert (*in org.*), das Stroma wurde anschließend gewonnen und mit $IscA_{rek}$ 1 h bei RT (20 °C) oder auf Eis (0 °C) inkubiert (Kapitel 2.2.12). Danach wurde mit diesen Anätzen jeweils ein 30 μ g Chl. entsprechendes Erbsenthylakoidpellet resuspendiert und 25 min bei 25 °C im Licht inkubiert (*in org.* -> S -> *in thyl.*). Zusätzlich wurde ein Standard-Thylakoidtransport mit Stroma durchgeführt (*in thyl.*). Die Hälfte jeder Thylakoidfraktion wurde mit Thermolysin behandelt (T+), die andere Hälfte blieb unbehandelt (T-). Der Organellimportansatz mit dem 23 kDa-Protein wurde in Gegenwart von 6 μ M Nigericin durchgeführt (+ Nig.). Pfeilspitzen markieren die Vorläufer (schwarz), die Produkte der Stroma- (grau) bzw. Thylakoidprozessierung (weiß).

Die Ergebnisse der *in organello*-Importversuche zeigen, daß beide Proteine, das Rieske- und das 23 kDa-Protein, in ausreichenden Mengen im Stroma vorlagen (Abb. 3-35, *in org.*, Spur S). Die Isolierung des Stromas dieser Organellen und die erneute Inkubation mit isolierten Thylakoiden ergab sowohl für das Rieske- als auch für das 23 kDa-Protein nur eine sehr geringe Thylakoidtransportrate (Abb. 3-35, Ansatz: - IscA_{rek}). Im Fall des 23 kDa-Proteins ist dies vermutlich auf die im Stromaextrakt noch vorhandene Nigericin-Menge zurückzuführen, die bei erneuter Inkubation mit Thylakoiden zur Hemmung des Δ pH/Tat-abhängigen Transports führte. Eine Steigerung der Thylakoidtransportrate für das 23 kDa-Protein durch die Zugabe von IscA_{rek} konnte erwartungsgemäß nicht beobachtet werden (Abb. 3-35, Ansatz: + IscA_{rek}). Allerdings war es auch im Fall des Rieske-Proteins nicht möglich, die geringe Thylakoidtransporteffizienz durch die Inkubation des Stromaextraktes mit IscA_{rek} zu erhöhen (Abb. 3-35, Ansatz: + IscA_{rek}). So bleibt weiterhin die Frage nach einer IscA-Beteiligung am Einbau des Rieske Fe/S-Zentrums offen.

Der direkte *in thylakoido*-Transport war nur für das 23 kDa-Protein möglich, da hier das reife Protein proteasegeschützt in den Thylakoiden vorlag (Abb. 3-35, *in thyl.*, T+). Der *in thylakoido*-Ansatz mit dem *in vitro* synthetisiertem Rieske-Protein zeigte dagegen kein proteaseresistentes Produkt auf der Höhe des reifen Proteins (20 kDa; Abb. 3-35, *in thyl.*, T+). Somit war der direkte Transport des Rieske-Proteins in isolierte Thylakoide, wie bereits in Abb. 3-14 dargestellt, wiederum nicht möglich.

3.3 Die Suche nach stromalen Rieske-Interaktionspartnern

Im letzten Kapitel lag der Schwerpunkt auf dem Prozeß der „Fe/S-Cluster Assemblierung“. Es wurde gezielt nach Proteinen gesucht, die an diesem Prozeß beteiligt sein könnten, und diese wurden dann auf eine mögliche Interaktion mit dem Rieske-Protein hin getestet. Um nun generell nach stromalen Rieske-Interaktionspartnern zu suchen, mußte eine andere Strategie gewählt werden. Dazu sollte eine im Stroma akkumulierende Variante des Rieske-Proteins in *Arabidopsis thaliana* exprimiert werden, die über eine C-terminale Markierung (*tag*) die Reinigung von möglichen Rieske-Komplexen, d.h. Rieske-Proteinen inklusive gebundener Interaktionspartner, ermöglicht.

3.3.1 Die Expression mutierter Rieske-Proteine aus Spinat in *A. thaliana*

3.3.1.1 Das Rieske-KK-Protein

Die Expression des Rieske-Proteins in *Arabidopsis thaliana* bietet die Möglichkeit, unter *in vivo*-Bedingungen größere Mengen des zu analysierenden Proteins zu akkumulieren und über die angefügte Markierung (HA-tag) aus dem Pflanzenextrakt heraus zu reinigen. Das Ziel dieses Ansatzes war, neben dem Rieske-Protein mögliche Interaktionspartner mitzureinigen und anschließend durch massenspektrometrische Analyse zu identifizieren.

Da jedoch das authentische Rieske-Protein *in vivo* nur in der Thylakoidmembran zu finden ist (Abb. 3-3) und somit die Suche nach stromalen Interaktionspartnern nicht erfolgreich sein kann, mußte eine stromaakkumulierende Variante zur Expression eingesetzt werden. Bei Substraten des Δ pH/Tat-Weges, zu denen das Rieske-Protein gehört, läßt sich sehr einfach durch Veränderung des essentiellen Zwillingsarginin-Motivs (RR) zu einem Zwillingslysin (KK) der Thylakoidtransport unterbinden und somit eine Akkumulation des Proteins im Stroma erreichen. Im Fall des Rieske-Proteins liegt das Zwillingsarginin-Motiv in abgewandelter Form - als Lysin-Arginin-Sequenz (KR) - vor. Somit sollte es möglich sein, durch den Austausch einer einzigen Aminosäure eine gravierende Veränderung im Transportverhalten des Rieske-Proteins zu erreichen.

Wie das Ergebnis des zunächst durchgeführten *in organello*-Importversuchs zeigt, konnte im Gegensatz zum authentischen Rieske-KR-Protein das Rieske-KK-Protein nicht über die Thylakoidmembran transportiert werden (Abb. 3-36 A). Statt dessen reicherte es sich wie erwartet quantitativ in der Stromafraktion an. Die native Auftrennung der Stromafraktionen mittels CN-PAGE ergab für beide Proteine das gleiche Bandenmuster (Abb. 3-36 B), d.h. die Mutation von KR zu KK hat anscheinend keinen Einfluß auf die Ausbildung der nachweisbaren Stromakomplexe und setzt somit die Interaktionsfähigkeit des Rieske-Proteins nicht herab. Neben dem bereits analysierten Cpn60-Komplex von 440 kDa finden sich drei weitere Banden unbekannter Zusammensetzung mit Größen von ca. 130 kDa, 70 kDa bzw. 50 kDa. Aufgrund der *in organello*-Versuche, konnte man davon ausgehen, daß mit dem Rieske-KK-Protein ein gutes Werkzeug zur Isolierung solcher Komplexe zur Verfügung steht.

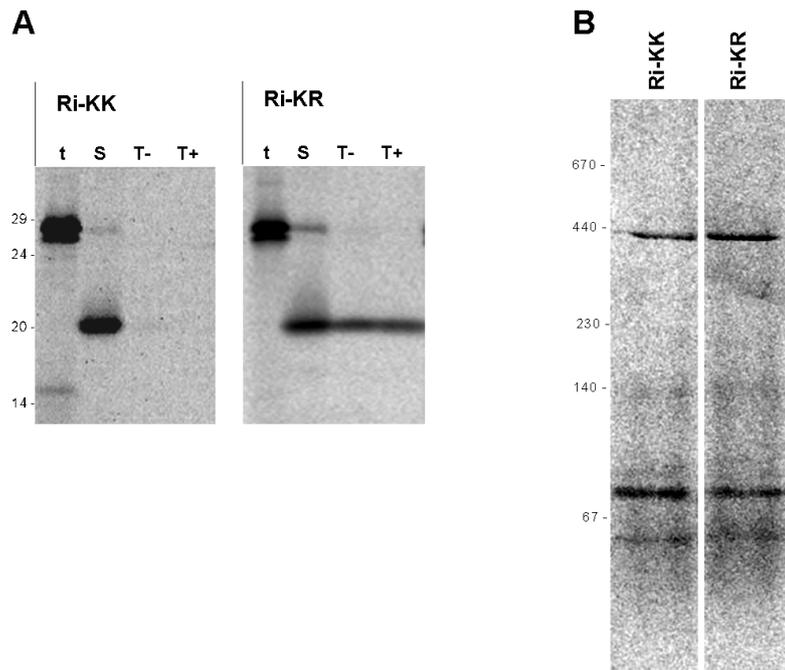


Abb. 3-36 Vergleich des Transportverhaltens zwischen dem authentischen Rieske-Protein (Ri-KR) und der stromaakkumulierenden Variante (Ri-KK). Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels, auf dem die Importfraktionen analysiert wurden (A) sowie eines 5-18%igen *Colorless native*-Gels mit nativ aufgetrennten Stromafractionen (B). Der Importversuch wurde mit Spinachchloroplasten durchgeführt. Detektierte Proteinkomplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 3-1 bzw. Abb. 3-19.

3.3.1.2 Der Einfluß des HA-Peptids auf Transport und Assemblierung des Rieske-Proteins

Sowohl das authentische Rieske-KR- als auch das mutierte Rieske-KK-Protein aus Spinat, die zur Expression in *A. thaliana* eingesetzt werden sollte, wurde mit einem C-terminalen HA-tag (9 AS-Peptid) ausgestattet. Um einen Eindruck von der Wirkung des HA-Peptids auf das Transport- und Assemblierungsverhalten des Rieske-Proteins zu bekommen, wurden im Voraus *in vitro*-Transportversuche mit den HA-markierten Proteinen durchgeführt. So wurden neben dem authentischen (Ri-KR) und dem Rieske-KK-Protein (Ri-KK) auch die entsprechenden HA-markierten Versionen (Ri-KR_{HA}, Ri-KK_{HA}) *in vitro* synthetisiert und in isolierte Chloroplasten importiert (Abb. 3-37 A). Der Vergleich beider Rieske-KR-Versionen zeigt, daß das HA-markierte Protein einen deutlich geringeren Thylakoidtransport aufweist (Abb. 3-37 A). Somit scheint der angefügte HA-tag einen gewissen Einfluß auf die Thylakoidtransportrate des Rieske-Proteins zu haben. Für die beiden Rieske-KK-Versionen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen dem HA-markierten und dem unmarkierten Protein beobachtet werden. Hier erfolgte in beiden Fällen nur eine schwache Bindung der Proteine an die Thylakoidmembran (Abb. 3-37 A).

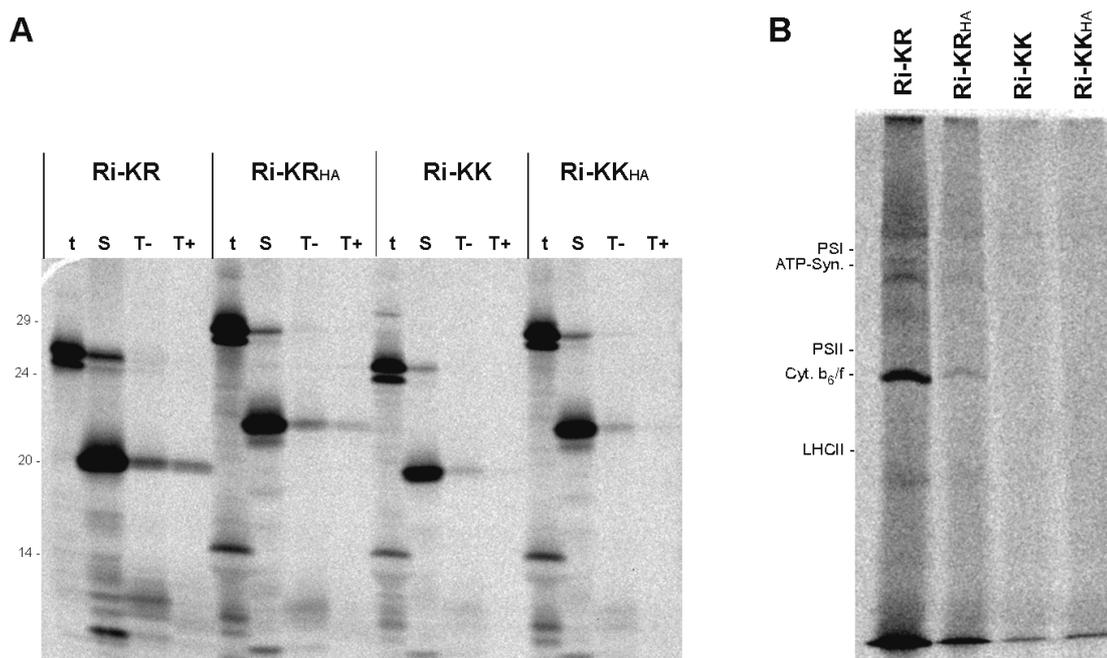


Abb. 3-37 *In organello*-Import und Assemblierung der HA-markierten und unmarkierten Rieske-Proteine in Erbsenchloroplasten. Expositionen eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (A) sowie eines 5-13%igen *Blue native*-Gels (B). Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 3-1 bzw. Abb. 3-7.

Zur Analyse der Assemblierung in den Cytochrom b_6/f -Komplex wurden unbehandelte Thylakoide (T- Fraktion) aller vier Ansätze solubilisiert und mittels *Blue native*-PAGE aufgetrennt (Abb. 3-37 B). Hier wird der Unterschied zwischen HA-markierter und unmarkierter Version wesentlich deutlicher. Während das authentische Protein (Ri-KR) mit guter Effizienz in den Cytochrom b_6/f -Komplex integriert wurde, zeigte die HA-markierte Version (Ri-KR_{HA}) nur eine sehr geringe Assemblierungsrate. Somit ist die Assemblierung des Rieske-Proteins in den Cytochrom b_6/f -Komplex trotz HA-tag prinzipiell möglich, allerdings mit herabgesetzter Effizienz. Der membrangebundene Anteil der beiden Rieske-KK-Proteine (Ri-KK und Ri-KK_{HA}) lag nicht im Cytochrom b_6/f -Komplex vor.

Der Einfluß des HA-Peptids sollte aber nicht nur auf den Thylakoidtransport und die Assemblierung, sondern auch auf die Bildung von stromalen Komplexen hin analysiert werden. Dazu wurden wiederum die HA-markierten und unmarkierten Proteine *in vitro* synthetisiert und mit isolierten Erbsenchloroplasten inkubiert. Die Importe mit den beiden Rieske-KR-Proteinen wurden einmal unter Standardbedingungen und einmal in Gegenwart von Nigericin durchgeführt. Zum Vergleich wurde das 23 kDa-Protein, ebenfalls in Gegenwart von Nigericin importiert. Nach der Importreaktion wurden die Plastiden standardmäßig aufgearbeitet, und die dabei gewonnenen Stromafraktionen unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3-38 A). Alle Importfraktionen wurden außerdem mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3-38 B).

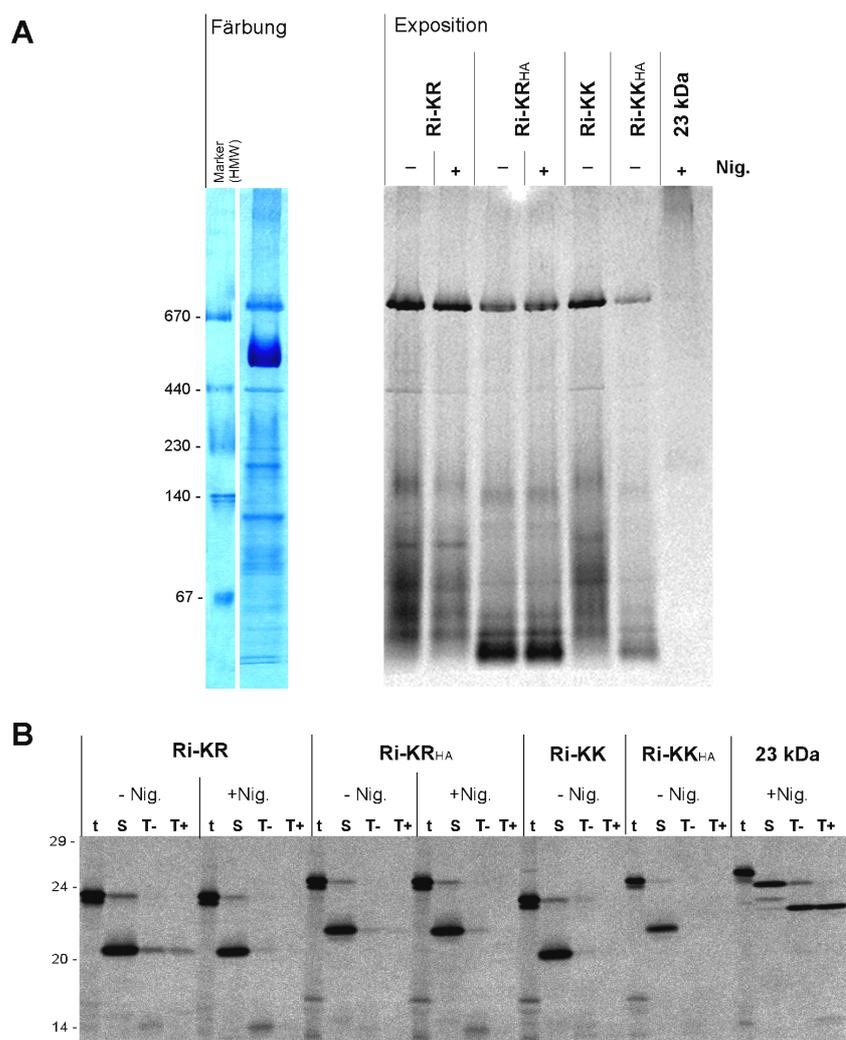


Abb. 3-38 Native Auftrennung (CN-Gel) der Stromaextrakte nach Import der HA-markierten und unmarkierten Rieske-Proteine in isolierte Erbsenchloroplasten. Expositionen bzw. Coomassiefärbung eines 5-13%igen *Colorless native* (CN)-Gels (A) sowie die Exposition eines 10-17,5%igen SDS-Gradientengels (B). Der Organellimport wurde teilweise in Gegenwart von 6 μ M Nigericin (+ Nig.) oder nach Standardprotokoll durchgeführt (-Nig.). Jeweils ca. 25 μ g Chl. entsprechende Menge des Stromextraktes wurden nativ aufgetrennt (A). Der HMW-Marker wurde als Größenstandard mitgeführt. Für weitere Details siehe Legende zu Abb. 3-1 bzw. Abb. 3-19.

Der Vergleich der nativ aufgetrennten Stromafraktionen von HA-markierter und unmarkierter Version zeigte einige Unterschiede im Komplexmuster auf. So ist im Vergleich zum authentischen Rieske-KR-Protein die HA-markierte Version in ihrer Bindungseffizienz an den Cpn60-Komplex leicht herabgesetzt, die Bildung eines ca. 100 kDa-Komplexes wird nicht mehr beobachtet und ein großer Teil des Proteins migriert nahe der Lauffront, d.h. es lag vermutlich als Monomer vor. Vergleichbare Veränderungen ließen sich auch für das Rieske-KK_{HA}-Protein beobachten.

So ergab der direkte Vergleich der HA-markierten und unmarkierten Proteine, daß die neun Aminosäurereste des HA-Peptids, zumindest in den kurzzeitigen *in vitro*-Versuchen die

Assemblierungs- und Interaktionsfähigkeit des Rieske-Proteins beeinträchtigen, jedoch nicht vollständig inhibieren.

Der Einsatz von Nigericin, das durch die Blockierung des Thylakoidtransports eine weitere Anhäufung des Proteins im Stroma bewirkt, hatte dagegen keinen erkennbaren Einfluß auf die Ausbildung der verschiedenen Proteinkomplexe. Das 23 kDa-Protein, das erst durch den Einsatz von Nigericin im Stroma akkumulierte, bildete so gut wie keine Komplexe aus. Nur im Bereich zwischen 180 und 200 kDa war ein schwaches Signal zu erkennen (Abb. 3-38 A). Obwohl Rieske- und 23 kDa-Protein Substrate der Δ pH/Tat-Translokase darstellen, verhalten sie sich doch offensichtlich im Stroma vollkommen anders.

3.3.1.3 Expression von Rieske-KR_{HA} und Rieske-KK_{HA} in *A. thaliana*

Da zumindest unter *in vitro*-Bedingungen für das Rieske-KR_{HA}-Protein ein funktioneller Transport trotz HA-tag gezeigt werden konnte (Abb. 3-37), sollten nun beide HA-markierten Proteine (Rieske-KR_{HA} und Rieske-KK_{HA}) in *A. thaliana* exprimiert werden. Die Expression erfolgte unter Kontrolle des lichtregulierten *PsaD2*-Promotors (Lübberstedt et al., 1994; Bolle et al., 1996). Die einzelnen Klonierungsschritte sind in Abb. 2-2 zusammenfassend dargestellt und im Kapitel 2.2.4 genauer beschrieben. Für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer (Kapitel 2.2.22) wurde der T-DNA-Vektor *pGreenII 0129* ausgewählt, der neben dem Zielkonstrukt auch einen Selektionsmarker, das Gen für die Hygromycinresistenz, in das Genom von *A. thaliana* einbrachte. Nach der Transformation von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen mit dem Rieske-KR bzw. Rieske-KK-Konstrukt, konnte so die Selektion der Transformanden (F1-Generation) auf Hygromycin-haltigen Sterilkulturplatten erfolgen (Abb. 3-40). Dabei konnten für die Version Rieske-KK_{HA} 5 Transformanden identifiziert werden, für die Version Rieske-KR_{HA} wurden aus der Vielzahl von Positiven 5 Pflanzen weiter kultiviert. Alle hier beobachteten Pflanzen der F1-Generation waren phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die so selektierten Pflanzen wurden nach etwa 3 Wochen auf Erde umgesetzt und unter Kurztagbedingungen weiter kultiviert.

Etwa 6 Wochen später wurde erstes Pflanzenmaterial geerntet (1 Blatt je Pflanze), um die Expression der eingebrachten Gene überprüfen zu können. Neben den beiden transgenen Pflanzen wurde auch Material vom Wildtyp analysiert. Nach Aufschluß des Pflanzenmaterials wurde es mit hypotonischen Puffer versetzt und durch Zentrifugation in eine Membranfraktion (Pellet) und in eine (alle löslichen Proteine enthaltende) lösliche Fraktion (Überstand) getrennt (Kapitel 2.2.13). Nach der Auftrennung alle Fraktionen

mittels SDS-PAGE konnte eine *Western*-Analyse mit Antikörpern gegen das HA-Peptid durchgeführt werden (Tab. 2-2 und Abb. 3-39). Die unterschiedlichen Bandenmuster der beiden Fraktionen, die durch Coomassiefärbung der PVDF-Membran sichtbar wurden, lassen auf eine erfolgreiche Trennung der löslichen Proteine von den Membranproteinen schließen. So sind nach Coomassiefärbung der PVDF-Membran in der löslichen Fraktion die großen bzw. kleinen Untereinheit der Rubisco und in der Membranfraktion die LHC-Proteine als Banden deutlich zu erkennen (Abb. 3-39).

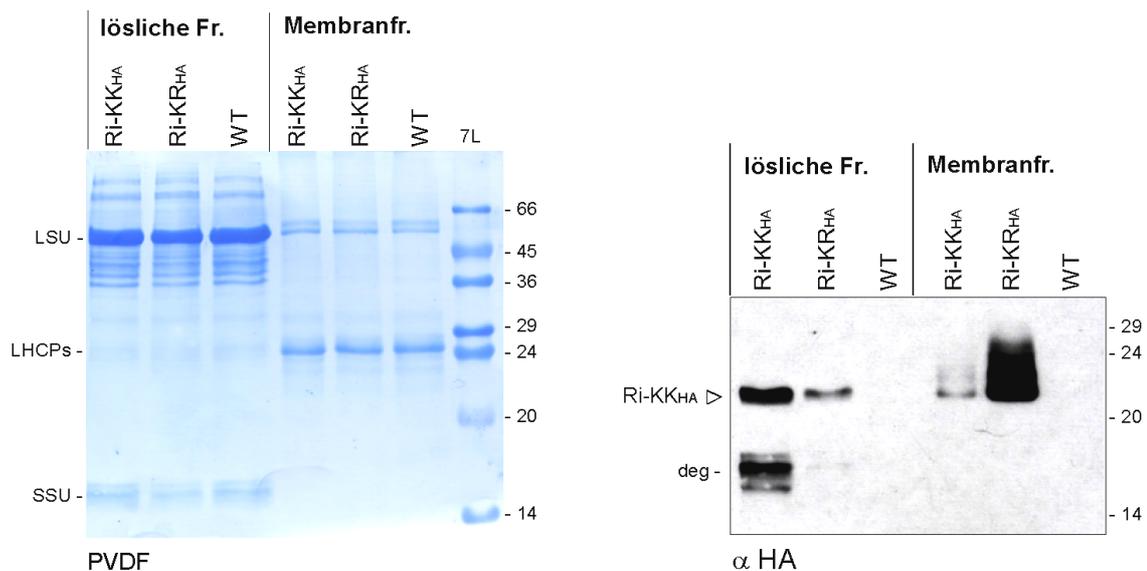


Abb. 3-39 *Western*-Analyse der Rieske-KK_{HA}- und Rieske-KR_{HA}-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen der F1-Generation. Dargestellt ist die ECL-Detektion der HA-markierten Rieske-Proteine in den Fraktionen der Membranproteine bzw. der löslichen Proteine aus *Arabidopsis*-Pflanzenextrakten mit Hilfe des HA-spezifischen Antikörpers (α HA, rechts). Die Banden des Rieske-KK_{HA}-Proteins (Ri-KK_{HA}) sowie die ca. 16 kDa-Degradationsprodukte (deg) sind markiert. Die verwendete PVDF-Membran wurde mit Coomassie gefärbt (links). Zur Analyse wurden jeweils 10 μ g lösliche Proteine bzw. die dazu stöchiometrische Menge der Membranfraktion aufgetrennt (15%iges SDS-Minigel). Große (LSU) und kleine (SSU) Untereinheit der Rubisco sowie die LHC-Apoproteine (LHCPs) sind gekennzeichnet.

Der eingesetzte HA-Antikörper ergab, wie vermutet, in den beiden Fraktionen des Wildtypextrakts kein Signal, d.h. er zeigt keine unspezifischen Kreuzreaktionen. Die Extrakte aus den transgenen Pflanzen ließen dagegen deutliche Antikörperreaktionen erkennen (Abb. 3-39), d.h. sowohl das Rieske-KR_{HA} als auch das Rieske-KK_{HA}-Protein wurden in *A. thaliana* synthetisiert. Wie bereits durch die *in vitro*-Versuche gezeigt (Abb. 3-37,) erhöht sich durch den C-terminalen HA-tag das Molekulargewicht um etwa 1 kDa, womit das reife Rieske-KR(KK)_{HA}-Protein eine Größe von ca. 21 kDa aufweist.

Erwartungsgemäß waren die detektierten Proteinmengen sowie die Verteilung zwischen der löslichen und der Membranfraktion für beide Rieske-Versionen unterschiedlich. So befand sich das Rieske-KR_{HA}-Protein fast ausschließlich in der Membranfraktion, so wie es

in vivo auch für das interne *Arabidopsis*-Protein gefunden wurde (Abb. 3-3). Das Rieske-KK_{HA}-Protein akkumulierte dagegen zum überwiegenden Teil im Stroma, war aber dort offenbar Abbauprozessen ausgeliefert, wie die ca. 16 kDa-Degradationsprodukte belegen (Abb. 3-39). Ein geringer Anteil des Rieske-KK_{HA}-Proteins befand sich auch in der Membranfraktion, was auf einen Thylakoidtransport trotz mutierten Transportsignals hindeutet. Durch diesen ersten Antikörpernachweis konnte gezeigt werden, daß die beiden Versionen des Rieske-Proteins aus Spinat in *A. thaliana* synthetisiert werden, und daß die Rieske-KK_{HA}- im Gegensatz zur KR_{HA}-Version tatsächlich im Stroma akkumuliert.

Nach diesem ersten allgemeinen Proteinnachweis, sollten die fünf vorhandenen Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Pflanzen einzeln auf die Anwesenheit des HA-markierten Proteins getestet werden, um so eine Pflanze mit möglichst hoher Akkumulationsrate auswählen zu können. Diese fünf selektierten Rieske-KK_{HA}-Transformanten wurden nach ihrem Erscheinen auf der jeweiligen Selektionsplatte als 3-1 (Platte 3 Pflanze 1) 3-2, 5-1, 5-2 und 5-3 bezeichnet (Abb. 3-40).

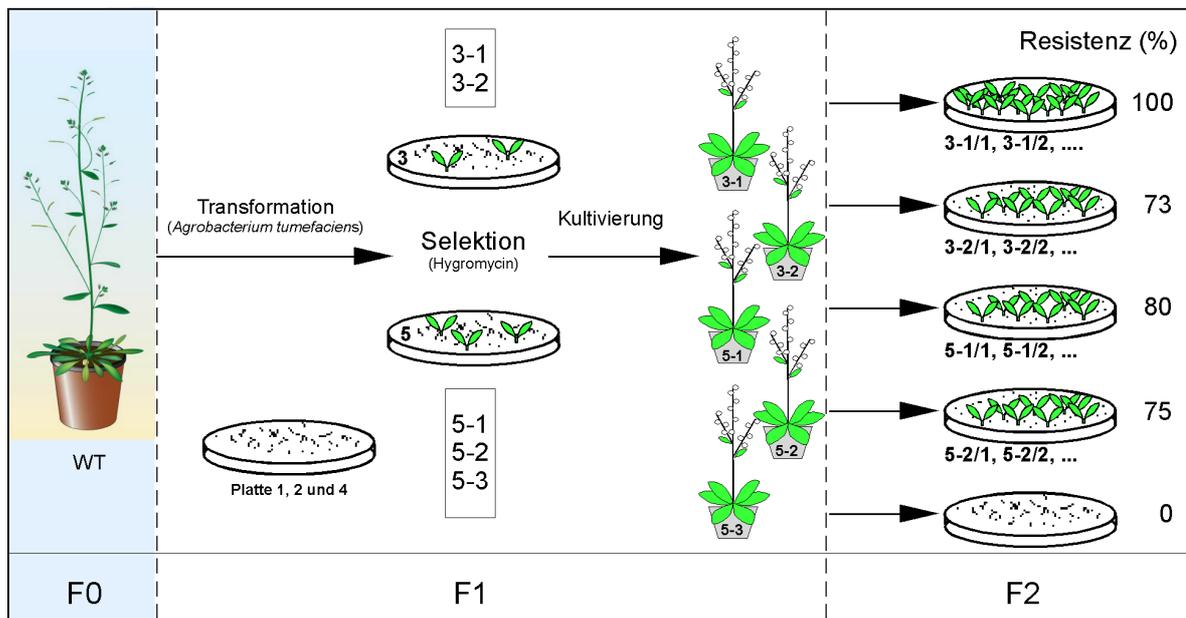


Abb. 3-40 Schematische Darstellung zur Selektion und Nomenklatur transgener *Arabidopsis*-Pflanzen (Rieske-KK_{HA}-exprimierend). Für die F2-Generation ist die Hygromycin-Resistenz von jeweils 100 Keimlingen in % angegeben. Weitere Einzelheiten im Text.

Der Antikörpernachweis des Rieske-KK_{HA}-Proteins in den Pflanzen der F1-Generation zeigte große Unterschiede in der Expression auf (Abb. 3-41). In der Pflanze 3-1 konnte durch den HA-Antikörper kein Protein nachgewiesen werden. Die Pflanzen 3-2, 5-1 und 5-2 zeigten dagegen klar die Anwesenheit des Rieske-KK_{HA}-Proteins. Dabei waren die

nachgewiesenen Mengen im Gesamtextrakt der Pflanzen 3-2 und 5-1 vergleichbar, der Extrakt von 5-2 ergab ein etwas stärkeres Signal, hier wurde auch ein Teil als ca. 16 kDa Degradationsprodukt (Abb. 3-39 A, deg) detektiert. Die Pflanze 5-3 zeigte die weitaus stärkste Akkumulation des Rieske-KK_{HA}-Proteins. Dabei lag ungefähr die Hälfte als reifes Protein, die andere Hälfte als Degradationsprodukt vor. Durch den Einsatz des Rieske-Antikörpers, der sowohl das interne *Arabidopsis*-Protein als auch das zusätzlich exprimierte Spinatprotein erkennt, wurde deutlich, daß die Menge des Rieske-Proteins aus Spinat im Vergleich zum *Arabidopsis*-Protein eher gering ist, da es nur als sehr schwache Bande oberhalb des internen Proteins nachzuweisen ist (Abb. 3-41 B). Da neben den *Arabidopsis*-Gesamtproteinextrakten auch Thylakoidproteine aus Spinat und der überexprimierte Rieske-Vorläufer der *Western*-Analyse unterzogen wurde, war eindeutig zu erkennen, daß es sich bei der 21 kDa-Bande um das reife, durch den HA-tag im Laufverhalten leicht veränderte Rieske-Protein handelt.

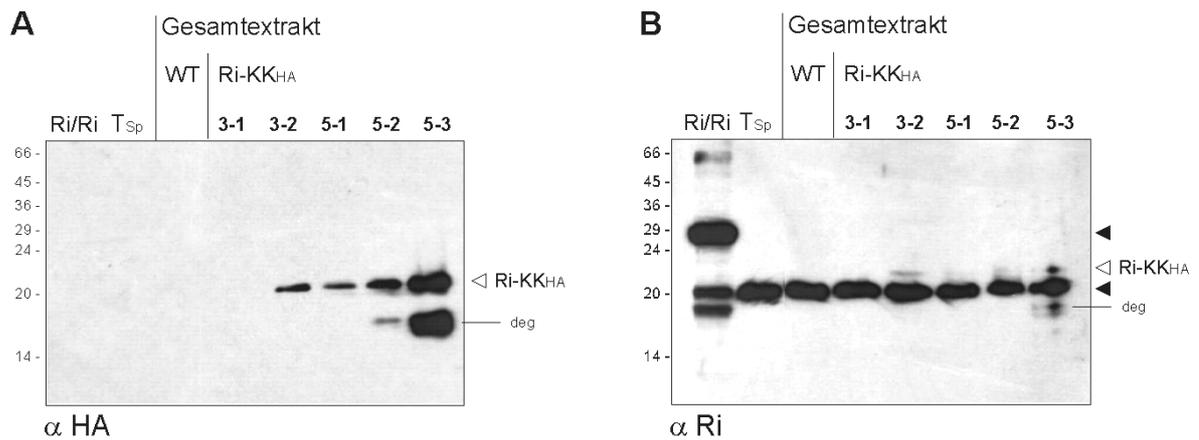


Abb. 3-41 *Western*-Analyse von Gesamtproteinextrakten aus den Rieske-KK_{HA}-Pflanzen der F1-Generation. ECL-Detektion. Neben den Extrakten der Rieske-KK_{HA}-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen (3-1, 3-2, 5-1, 5-2, 5-3, jeweils ca. 3 mg FM) und dem *Arabidopsis*-Wildtyp (WT), wurden Spinatthylakoide (T_{Sp}, 1,5 µg Chl.) und das Rieske-Vorstufenprotein (Ri/Ri) auf einem 17%igen SDS-Minigel aufgetrennt. Zum Nachweis wurden HA-Antikörper (links) bzw. Rieske-Antikörper (rechts) eingesetzt. Die Vorstufe bzw. das *Arabidopsis*-interne reife Rieske-Protein sind durch schwarze Pfeile, das Rieske-KK_{HA}-Protein (Ri-KK_{HA}) ist durch einen weißen Pfeil gekennzeichnet. Degradationsprodukte sind ebenfalls markiert (deg).

Da jedoch eine Reinigung von stromalen Rieske-Komplexen mehr Pflanzenmaterial erforderte, wurden die nachfolgenden Generationen kultiviert. Die genetische Verteilung des Resistenzmarkers in der F2-Generation zeigte, daß in den Pflanzen 3-2, 5-1 und 5-2 jeweils eine Einzelsinsertion des Rieske-KK_{HA}-Konstrukts vorlag (durchschnittlich 75 % der Pflanzen waren hygromycinresistent; Abb. 3-40). Die einheitliche Kopienanzahl des Rieske-KK_{HA}-Konstrukts war vermutlich die Ursache für eine ähnliche Expressionsstärke in der F1-Generation (Abb. 3-41).

Die Samen der Pflanze 3-1 brachten zu 100 % resistente Nachkommen hervor, was auf eine Mehrfachinsertion zurückzuführen ist. Daß in der Pflanze 3-1 kein Rieske-KK_{HA}-Protein nachgewiesen werden konnte, mag in einem Co-Repressionseffekt, ausgelöst durch mehrere Kopien des eingebrachten Konstrukts, begründet liegen.

Aus unbekanntem Gründen fehlte sämtlichen F2-Keimlingen aus den Samen der Pflanze 5-3, die die stärkste Rieske-KK_{HA}-Expression zeigte (Abb. 3-41 A), die Hygromycinresistenz (Abb. 3-40). Somit stand die Linie 5-3 für weitere Analysen nicht mehr zur Verfügung.

Aus den übrigen drei Pflanzen wurde die Linie 5-2 zur Expression des Rieske-KK_{HA}-Proteins ausgewählt. Ein begrenzter Anteil der Pflanzen der nachfolgenden F2-Generation, bezeichnet als 5-2/1, 5-2/2 und 5-2/3, wurden mittels HA-Antikörpernachweis auf Expression des Rieske-KK_{HA}-Proteins getestet. Dazu wurden lösliche Proteine und Membranproteine getrennt voneinander analysiert (Kapitel 2.2.13). Dabei zeigten die Extrakte aller drei Pflanzen vergleichbare HA-Antikörpersignale (Abb. 3-42). So befand sich der überwiegende Teil des Rieske-KK_{HA}-Proteins in den löslichen Fraktionen; der Anteil der 16 kDa-Degradationsprodukte war in den einzelnen Pflanzenextrakten jedoch unterschiedlich hoch.

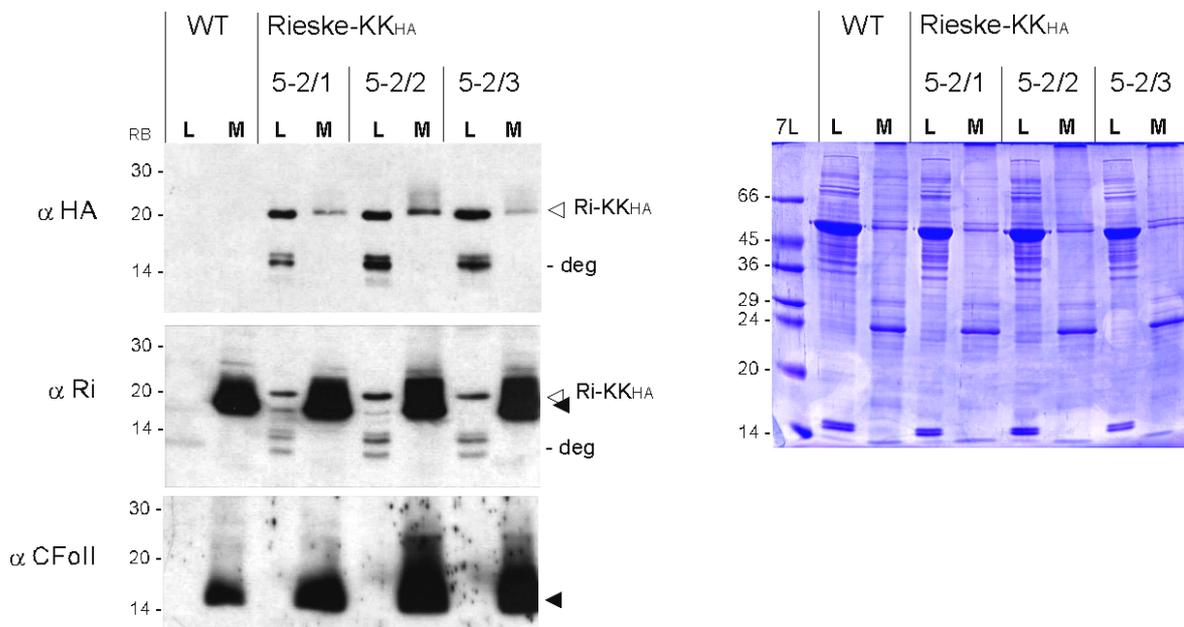


Abb. 3-42 *Western-Analyse von Extrakten Rieske-KK_{HA}-exprimierender Pflanzen der F2-Generation.* ECL-Detektion (links) und das entsprechende Coomassie-gefärbte Minigel (rechts). Aus den angegebenen Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Pflanzen sowie dem *Arabidopsis*-Wildtyp (WT) wurden lösliche Proteine (L) und Membranproteine (M) extrahiert und auf 15%igen SDS-Minigelen aufgetrennt (je 10 μ g lösliche Proteine und stöchiometrisch gleiche Menge der Membranproteine). Das Rieske-KK_{HA}-Protein (Ri-KK_{HA}) ist mit einer weißen Pfeilspitze gekennzeichnet, die Degradationsprodukte sind ebenfalls markiert (deg). Schwarze Pfeilspitzen deuten auf die internen *Arabidopsis*-Proteine Rieske bzw. CFoll.

Die Membranfraktion von 5-2/1 und 5-2/3 enthielt im Vergleich zur löslichen Fraktion nur einen geringen Anteil des Rieske-KK_{HA}-Proteins. Dieser Anteil lag für die Extrakte der Pflanze 5-2/2 schon deutlich höher (Abb. 3-42).

Durch den Rieske-Antikörper konnte noch einmal gezeigt werden, daß sich in der löslichen Fraktion der *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen kein Rieske-Protein befindet (Abb. 3-42). Nur in den löslichen Fraktionen der transgenen Pflanzen wurde das entsprechende Antigen detektiert. Neben dem Doppeldegradationsprodukt, das bereits durch den HA-Antikörper erkannt wurde, detektierte der Rieske-Antikörper weitere Degradationsprodukte.

Daß die Abtrennung der Membranfraktion methodisch gut funktionierte, erfolgte durch den Nachweis von membranständigen Antigenen. Dazu zählt zwar auch das Rieske-Protein, da aber der Einsatz des entsprechenden Antikörpers nur im Wildtypextrakt für diesen Nachweis sinnvoll war, wurde außerdem der Nachweis des CFoII-Proteins, einer Untereinheit der ATP-Synthase, durchgeführt (Abb. 3-42). So konnte dieses Antigen in allen Fällen ausschließlich in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Somit kann man davon ausgehen, daß die gewählte Methode zur Trennung beider Proteinfractionen erfolgreich war, und das der lösliche Anteil des Rieske-Proteins nicht auf eine Kontamination durch Membranvesikel zurückzuführen ist.

Die hier beschriebenen Pflanzen wurden auf Homo-bzw. Heterozygotie getestet. Dazu wurden die Samen der F2-Pflanzen auf Selektionsplatten ausgelegt und durch die Aufspaltung der F3-Generation konnten Rückschlüsse auf den genetischen Status der Elternpflanze gezogen werden. Heterozygote F2-Pflanzen zeigten in der nächsten Generation eine Verteilung von $\frac{1}{4}$ nicht-resistente (WT) zu $\frac{3}{4}$ resistente Pflanzen. Ist die Elternpflanze homozygot gewesen, waren alle Nachkommen resistent gegenüber dem Selektionsantibiotikum Hygromycin. So wurden als heterozygot die Pflanzen 5-2/1 und 5-2/2, als homozygot die Pflanze 5-2/3 identifiziert. Die homozygote Pflanzenlinie 5-2/3 wurde für die weiteren Analysen benutzt, da so auch bei direkter Aussaat auf Erde zu 100 % transgene Pflanzen erwartet werden konnten.

Da bis zu diesem Zeitpunkt keine genaue Zuordnung der erhaltenen HA-Antikörpersignale zum Stroma bzw. der Thylakoidmembran des Chloroplasten gezeigt wurde war, sollte durch eine Chloroplastenisolierung aus Pflanzen der transgenen Linie 5-2/3 der Nachweis geliefert werden. Dies erforderte ein Vielfaches des Pflanzenmaterial, das für eine einfache Aufarbeitung von löslichen und membranständigen Proteinen nötig ist. Außerdem ist die

Ausbeute an intakten *Arabidopsis*-Chloroplasten bei weitem nicht so ergiebig, wie es bei Erbse oder Spinat der Fall ist. Jedoch konnte durch die Isolierung und Fraktionierung von *Arabidopsis*-Chloroplasten (Kapitel 2.2.14) verbunden mit dem Immunonachweis des HA-Peptids eindeutig gezeigt werden, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein in den Plastiden lokalisiert ist (Abb. 3-43).

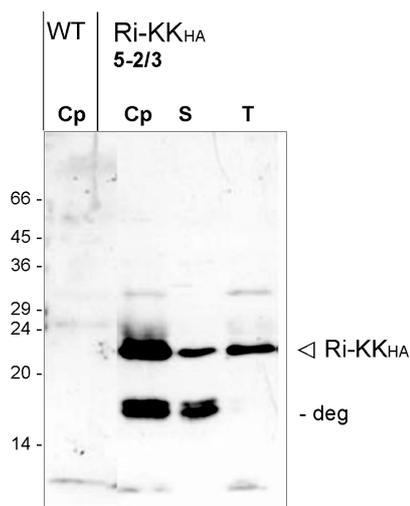


Abb. 3-43 Chloroplastenisolierung aus Rieske-KK_{HA}-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen, Fraktionierung und *Western*-Analyse. Der Nachweis erfolgte mit HA-spezifischen Antikörpern und ECL-Reaktion. Jeweils 5 µg Chl. entsprechende Menge Chloroplasten (Cp), Stroma (S, 5 µg Chl. entspricht 3 µg Protein) und Thylakoide (T) der Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Pflanzen (Linie 5-2/3) wurden auf einem 15%igen SDS-Minigel analysiert. Chloroplasten von *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen (WT) wurden ebenfalls aufgetragen.

Die Menge des thylakoidlokalisierten Rieske-KK_{HA}-Proteins war in diesem Fall sogar vergleichbar mit der im Stroma befindlichen Menge. So scheint der Anteil des membranständigen Rieske-KK_{HA}-Proteins größeren Schwankungen unterworfen zu sein. Die bereits beschriebenen ca. 16 kDa-Degradationsprodukte sind hier verstärkt sichtbar und lassen sich eindeutig der Stromafraktion zuordnen.

Da sich die Expression des Rieske-KK_{HA}-Proteins unter Kontrolle eines lichtregulierten Promotors befindet, war interessant zu sehen, ob es zu einer Lichtphasen-abhängigen Anhäufung des Proteins kommt. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen, mit einer 8 stündigen Lichtphase (8.00 bis 16.00 Uhr) kultiviert. Pflanzenmaterial der Linie 5-2/3 wurde nun zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und einer *Western*-Analyse unterzogen (Abb. 3-44).

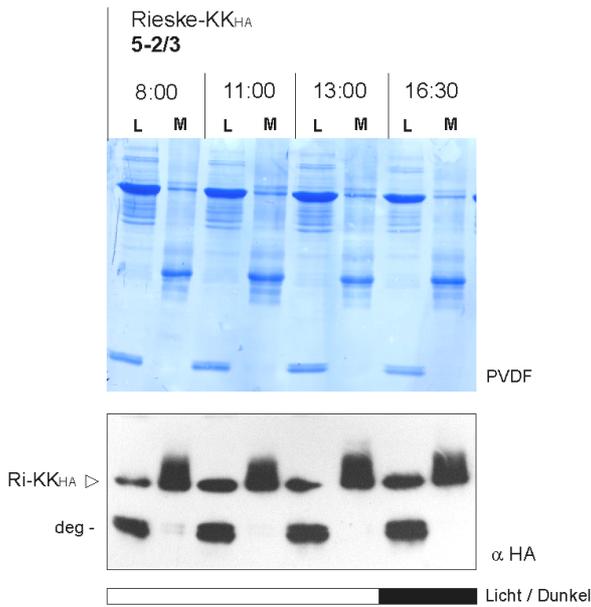


Abb. 3-44 *Western-Analyse der Rieske-KK_{HA}-Pflanzenextrakte, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden.* Das Pflanzenmaterial wurde zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (in flüssigen N₂ eingefroren), jeweils 10 µg lösliche Proteine und die stöchiometrisch gleiche Menge Membranproteine wurden auf einem 15%igen SDS-Minigel aufgetrennt. Die Pflanzen standen unter Kurztagbedingungen (Licht: 8:00 – 16:00 Uhr; Balkendarstellung)

Dabei zeigte sich, daß während der Licht- und zu Beginn der Dunkelphase keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind. Lediglich zu Beginn der Lichtphase (8:00 Uhr) ließ sich etwas weniger Rieske-KK_{HA}-Protein in der löslichen Fraktion durch den HA-Antikörper nachweisen. Auffällig war, daß auch bei diesen Proben ein bedeutender Anteil des reifen Rieske-KK_{HA}-Proteins in der Membranfraktion, also in den Thylakoiden vorlag. Eine genaue Analyse der Membranfraktion ist im anschließenden Kapitel dargestellt.

3.3.2 Die Membranfraktion der Rieske-KK(KR)_{HA}-exprimierenden Pflanzen

Wie in Abb. 3-43 und 3-44 zu erkennen war, befindet sich ein beachtlicher Anteil des Rieske-KK_{HA}-Proteins in der Membran- bzw. Thylakoidfraktion. Dagegen konnte nach Import in isolierte Chloroplasten kaum eine Assoziation des Rieske-KK_{HA}-Proteins mit der Thylakoidmembran beobachtet werden (Abb. 3-36 und 3-37). So stellte sich die Frage, ob das Rieske-KK_{HA}-Protein *in vivo* über die Thylakoidmembran transportiert wird oder nur über hydrophobe Wechselwirkung an die stromale Seite der Membran assoziiert. Um dies zu beantworten, wurden Thylakoide aus der Pflanzenlinie 5-2/3 isoliert und zum einen mit verschiedenen Proteasen, zum anderen mit chaotropen Salzen bzw. alkalischen Lösungen behandelt (Kapitel 2.2.15). Die Thylakoidproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper analysiert. Dazu wurden neben den HA-Antikörpern auch Rieske-Antikörper und, als Kontrolle, Antikörper gegen die luminalen 33 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparates eingesetzt. Die Reaktionen des HA-

Antikörpern ließen erkennen, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein sensitiv gegenüber externen Proteasen ist, denn es wurde durch Trypsin und ProteinaseK vollständig abgebaut, wohingegen Thermolysin einen geringeren Effekt hatte (Abb. 3-45 A). Im Gegensatz dazu zeigten sowohl das interne Rieske-Protein als auch das luminaire 33 kDa-Protein eine deutliche Resistenz gegenüber allen drei Proteasen. Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein, anders als das authentische Protein, nur an die stromale Seite der Thylakoidmembran assoziierte.

Um mehr Informationen über die Art dieser Assoziation zu bekommen, wurden die Thylakoidmembranen auch mit chaotropen Salzen bzw. alkalischen Lösungen behandelt.

Über die Größe ihrer Hydrathülle beeinflussen chaotrope Salze die hydrophoben Kräfte, die für die Interaktion von Proteinen verantwortlich sein können. Als destabilisierend wirkende Anionen wurden Bromid- (Br^-) und Thiocyanationen (SCN^-) eingesetzt, wobei der Effekt der Br-Ionen geringer eingeschätzt wird als der der SCN-Ionen.

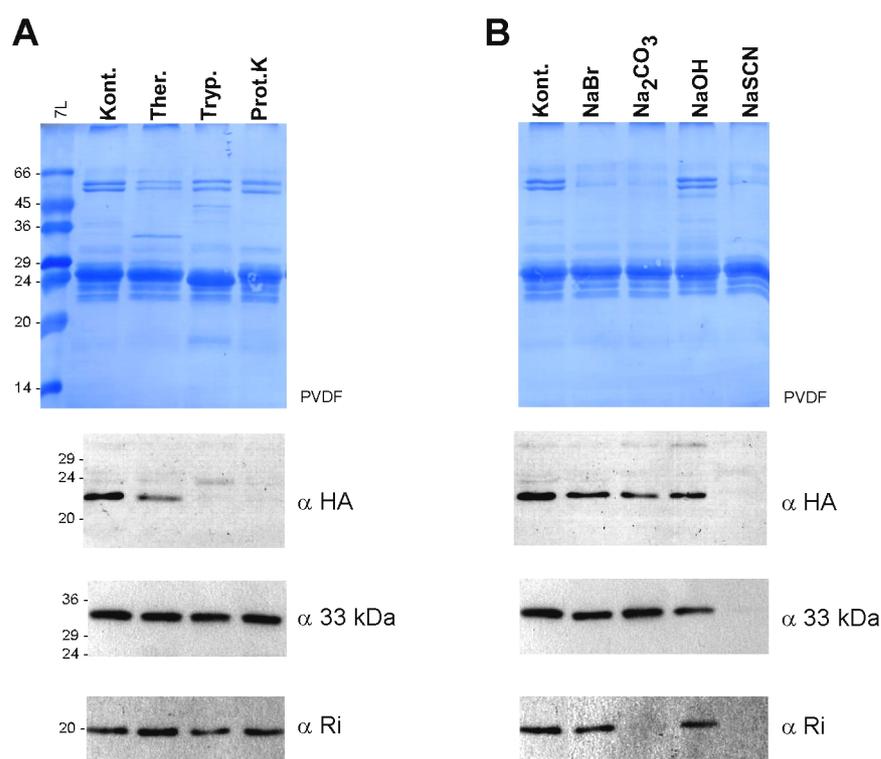


Abb. 3-45 **Behandlung der Thylakoide von Rieske-KK_{HA}-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen.** Dargestellt sind *Western*-Analysen (ECL-Detektion) und die entsprechende PVDF-Membranen nach Coomassiefärbung. Unter (A) sind die Proteasebehandlungen und unter (B) die Extraktionen mit alkalischen/chaotropen Lösungen gezeigt. Die Thylakoide wurden mit folgenden Proteasekonzentrationen jeweils 45 min auf Eis behandelt: Thermolysin (Ther.) 100 µg/ml, Trypsin (Tryp.) 50 µg/ml, ProteinaseK (Prot.K) 15 µg/ml. Die Extraktion der Membranproteine erfolgte mit 2 M NaBr, 0,1 M Na₂CO₃, 0,1 M NaOH bzw. 2 M NaSCN ebenfalls 45 min auf Eis (Kont., in HM-Puffer). Auf 15%igen SDS-Minigelen wurde jeweils die 5 µg Chlorophyll entsprechende Menge an Thylakoidproteinen aufgetragen. Die *Western*-Analysen erfolgten mit den angegebenen Antikörpern (siehe Tab. 2-2).

Der Einsatz von alkalischen Lösungen dagegen verändert die Ladungsmuster der Proteinseitenketten, die für elektrostatische Wechselwirkungen mit anderen Membrankomponenten verantwortlich sind. Hierfür kamen die beiden Lösungen 0,1 M Na₂CO₃ (pH 11,4) und 0,1 M NaOH (pH 13) zum Einsatz. Die Thylakoidmembranen wurden 45 min auf Eis mit den unterschiedlichen Lösungen inkubiert, zweimal mit HM-Puffer gewaschen und mittels SDS-PAGE und *Western* analysiert. Der Kontrollansatz wurde nur in HM-Puffer inkubiert. Obwohl das Rieske-KK_{HA}-Protein für die extern zugegebenen Proteasen gut zugänglich war, zeigte es hier eine unerwartete Stabilität gegenüber der Extraktion mit Salz- bzw. Alkali-Lösungen (Abb. 3-45 B). Weder durch die alkalischen Lösungen 0,1 M Na₂CO₃ oder 0,1 M NaOH noch durch die chaotrope Wirkung der Bromidionen ließ sich das Rieske-KK_{HA}-Protein aus der Thylakoidmembran herauslösen. Nur durch die Einsatz von 2 M NaSCN wurde das Protein vollständig aus der Membran extrahiert. Da es unter diesen Bedingungen auch zur Zerstörung der Membranstrukturen kommt, werden durch Thiocyanationen sogar luminale Proteine, wie z.B das 33 kDa-Protein, freigesetzt (Abb. 3-45 B).

Kurioserweise scheint das Rieske-KK_{HA}-Protein stabiler in die Thylakoidmembran integriert zu sein, als das authentische/interne *Arabidopsis*-Protein. Dies wurde nicht nur durch die Behandlung mit Thiocyanationen, sondern auch durch Natriumcarbonat aus der Thylakoidmembran extrahiert (Abb. 3-45, α Ri). Das Rieske-KR_{HA}-Protein verhielt sich ähnlich dem authentischen Rieske-KR-Protein aus *Arabidopsis* (Daten nicht gezeigt).

Ob nun der Anteil des membrangebundenen Rieske-KK_{HA}-Proteins in Form von heterogenen Komplexen vorliegt, sollte durch die Anwendung der *Blue native*-Technik geklärt werden. Dazu wurden neben Rieske-KK_{HA}- auch Rieske-KR_{HA}-exprimierende Pflanzen sowie der *Arabidopsis*-Wildtyp genutzt, um Thylakoidmembranen zu gewinnen. Die Proteinkomplexe wurden mittels Digitonin aus der Membran herausgelöst und auf einem *Blue native*-Gel aufgetrennt. Der *Western* erfolgte mit Antikörpern gegen das HA-Peptid bzw. das Rieske-Protein (Abb. 3-46). So reagierte der Rieske-Antikörper in allen drei Proben mit dem internen *Arabidopsis*-Protein und markierte wie vermutet den Cytochrom b₆/f-Komplex. Der HA-Antikörper ergab dagegen nur mit dem Rieske-KR_{HA}-Proteins ein Signal. Somit wurde das Spinatprotein genauso wie das interne Rieske-Protein in den Cytochrom b₆/f-Komplex von *Arabidopsis thaliana* eingebaut. Dies bedeutet, daß der C-terminal angefügte HA-tag auch unter *in vivo*-Bedingungen die Integration in Proteinkomplexe nicht verhindert.

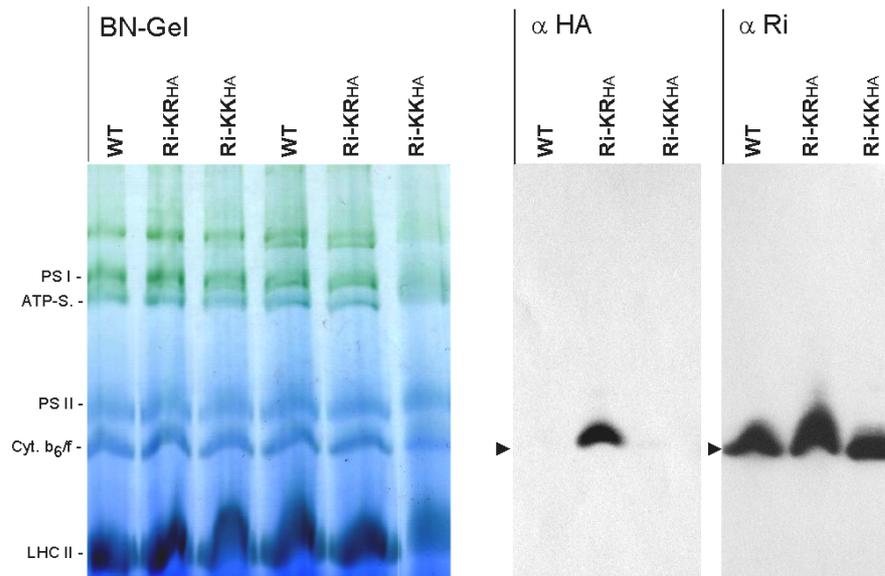


Abb. 3-46 *Western-Analyse der solubilisierten Thylakoidmembranen aus Rieske-KR_{HA}- und Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen.* Dargestellt ist ein 5-13%iges *Blue native*-Gel, in dem solubilierte *Arabidopsis*-Thylakoide (je 30 µg Chl.) vom Wildtyp (WT) bzw. von Rieske-KR_{HA}- und Rieske-KK_{HA} (KR_{HA} und KK_{HA})-exprimierenden Pflanzen aufgetrennt wurden (BN-Gel, links). Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die *Western*-Analyse (ECL-Detektion) mit Antikörpern gegen das HA-Peptid bzw. das Rieske-Protein (αHA und αRi, rechts). Die Position des Cytochrom b₆/f-Komplexes ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Ob die Integrations des HA-markierten Spinatproteins in den Cytochrom b₆/f-Komplex von *Arabidopsis* auch zur Funktionalität des Proteins führt, läßt sich hier nicht beantworten. Wichtiger ist jedoch, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein nicht durch den HA-Antikörper im BN-Gel detektiert werden konnte, so daß man davon ausgehen kann, daß es weder im Cytochrom b₆/f-Komplex noch in einem anderen, durch Digitonin solubilisierbaren Komplex, vorlag. Dieses Ergebnis untermauert die Annahme, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein nur mit der stromalen Seite der Thylakoidmembran assoziiert vorliegt und nicht über die Membran transportiert wird.

Daß es sich bei dem Signal im BN-Gel tatsächlich um das Rieske-KR_{HA}-Protein handelt, konnte durch die Auftrennung der Untereinheiten des Cytochrom b₆/f-Komplexes in einer zweiten Dimension bestätigt werden. Auch hier wurde Material vom Wildtyp sowie der transgenen Rieske-KR_{HA}- bzw. Rieske-KK_{HA}-Pflanzen eingesetzt. Durch die Reaktion des HA-Antikörpers konnte im Fall des Rieske-KR_{HA}-Materials ein sehr starkes Signal beobachtet werden (Abb. 3-47). Die genaue Größe dieses Bande läßt sich aufgrund ihrer Intensität und damit Ausdehnung nur schwer bestimmen, sie liegt aber zwischen 20 und 24 kDa und damit im Bereich des reifen Rieske-KR_{HA}-Proteins (ca. 21 kDa).

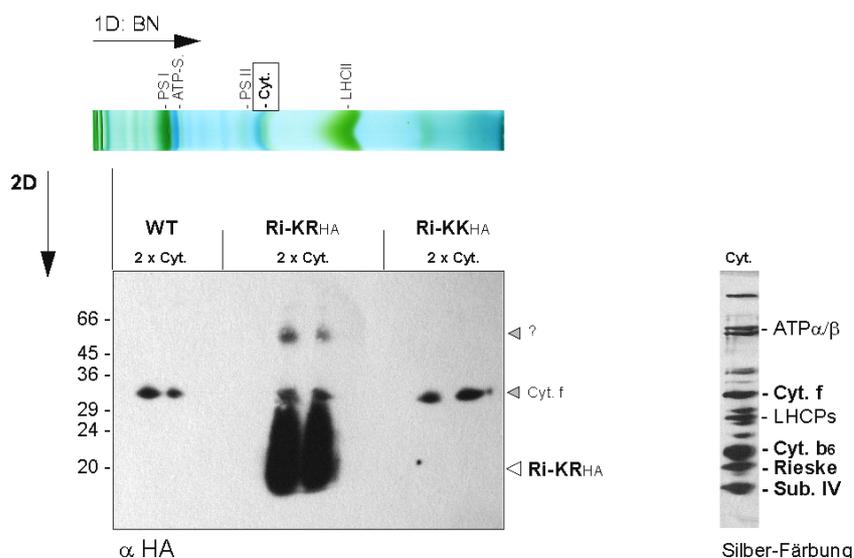


Abb. 3-47 Auftrennung von Cytochrom b_6/f -Komplexen in der zweiten Dimension (2D) mit anschließender *Western*-Analyse. Solubilisierte *Arabidopsis*-Thylakoide (30 μg Chl.) des Wildtyps (WT) sowie der Rieske-KR_{HA}- und Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Pflanzen (Ri-KR_{HA} und Ri-KK_{HA}) wurden in der ersten Dimension mittels BN-PAGE aufgetrennt (1D: BN). Bereiche des Cytochrom b_6/f -Komplexes wurden jeweils 2x ausgeschnitten und einer 2D-Auftrennung in einem 15%igen SDS-Minigel unterzogen (2 x Cyt.). Eine *Western*-Analyse mit HA-spezifischen Antikörpern und ECL-Detektion schloß sich an (unten). Unspezifische Reaktionen sind mit einer grauen Pfeilspitze markiert. Außerdem wurde ein Bereich des Cytochrom b_6/f -Komplexes (Cyt.) nach der 2D-Auftrennung mittels Silberfärbung visualisiert (rechts).

Neben diesem spezifischen HA-Signal wurden auch zwei unspezifische Reaktionen deutlich: So zeigte sich in allen drei Proben ein Signal zwischen 29 und 36 kDa, das mit dem Spot der Cytochrom *f*-Untereinheit korrelierte. Dieses Signal wurde vermutlich durch die Reaktivität der Häm-Gruppe des *c*-Typ Cytochrom *f* hervorgerufen (Vargas et al., 1993). Im Fall der Rieske-KR_{HA}-Probe wurde ein weiteres Signal bei ca. 60 kDa erhalten, dessen Ursache unklar ist.

Auch ein letzter Versuch, das Rieske-KK_{HA}-Protein im *Blue native*-Gel aufzuspüren, blieb erfolglos. Diesmal wurde ein kompletter BN-Gelstreifen in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit HA-Antikörpern analysiert (Abb. 3-48). Allerdings kam es in diesem Versuch nur an Stellen mit hoher Proteinkonzentration zu unspezifischen HA-Antikörperreaktionen (Abb. 3-48 B).

Somit läßt sich zusammenfassend sagen, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein zwar über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen mit der Thylakoidmembran interagieren kann, es aber weder zu einer Translokation der luminalen Domäne über die Membran noch zu einer Integration in einen Proteinkomplex kommt. Dagegen wird das auf dem Spinatprotein basierende Rieske-KR_{HA}-Protein über die Thylakoidmembran transportiert und in den Cytochrom b_6/f -Komplex eingebaut, der HA-tag stellt also keine zu starke Behinderung dar.

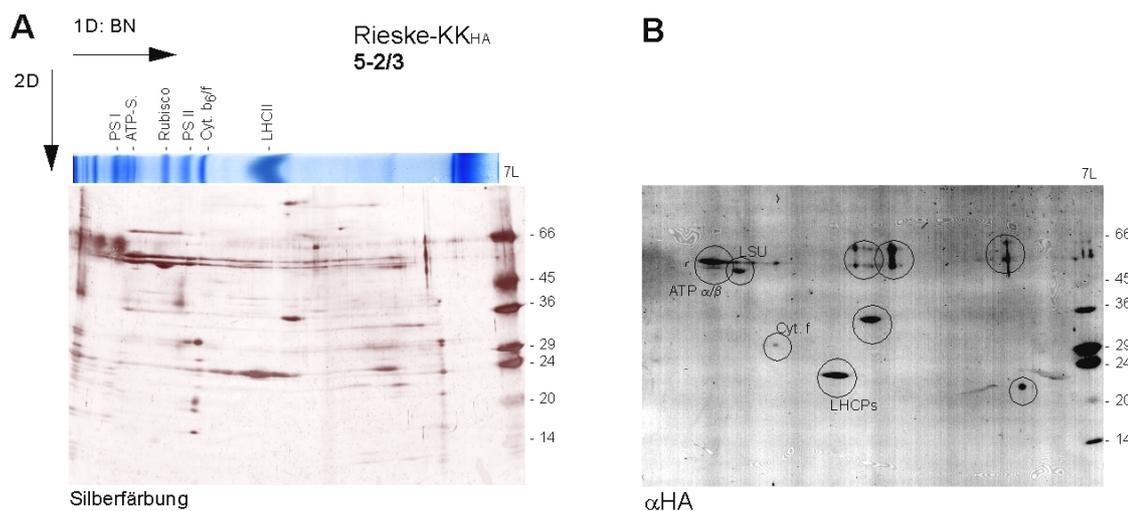


Abb. 3-48 Auftrennung der Proteinkomplexe eines *Blue native*-Gelstreifens in der zweite Dimension (2D) mit anschließender *Western*-Analyse. Rieske-KK_{HA}-Thylakoide (Linie 5-2/3) wurden solubilisiert und in der ersten Dimension mittels BN-PAGE nativ aufgetrennt (1D: BN; A). Ein Streifen dieser Auftrennung wurde einer 2D-Analyse durch SDS-PAGE unterzogen (15%iges SDS-Gel nach Laemmli, 1970). Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, die mit HA-Antikörpern, in Verbindung mit einer ECL-Reaktion, behandelt wurde (α HA; B). Das 2D-Gel wurde nach dem Transfer einer Silberfärbung unterzogen (A).

3.3.3 Die lösliche Fraktion der Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Pflanzen

Nachdem der membrangebundene Anteil des in *Arabidopsis thaliana* exprimierten Rieske-KK_{HA}-Proteins genauer betrachtet wurde, sollte nun die Analyse des löslichen Anteils folgen, bevor es zur Reinigung des Rieske-KK_{HA}-Proteins einschließlich gebundener Interaktionspartner kommt.

Um einen ersten Eindruck davon zu bekommen, ob das Rieske-KK_{HA}-Protein auch unter *in vivo*-Bedingungen, also im Stroma von *A. thaliana*, in Form von hochmolekularen Komplexen vorliegt, die später gereinigt werden können, wurde die lösliche Fraktion des transgenen Pflanzenextraktes 5-2/3 in zwei unterschiedlichen nativen Gelen aufgetrennt. Komplexe, die das Rieske-KK_{HA}-Protein enthalten, konnten anschließend durch HA-Antikörper detektiert werden (Abb. 3-49). Zur Kontrolle wurde die lösliche Fraktion des Wildtyp-Extrakts mit aufgetrennt. So konnte eine leichte Antikörperreaktion mit einem hochmolekularen Komplex (vermutlich Rubisco) als unspezifisch eingestuft werden. Die spezifischen Reaktionen des HA-Antikörpers zeigten sowohl für die Auftrennung im Tris-Glycin-Gel (TG-Gel) als auch im *Colorless native*-Gel (CN-Gel) je drei distinkte Banden, die apparente Größen von ca. 80, 132 und 185 kDa (TG-Gel) bzw. 44, 50 und 57 kDa (CN-Gel) aufwiesen.

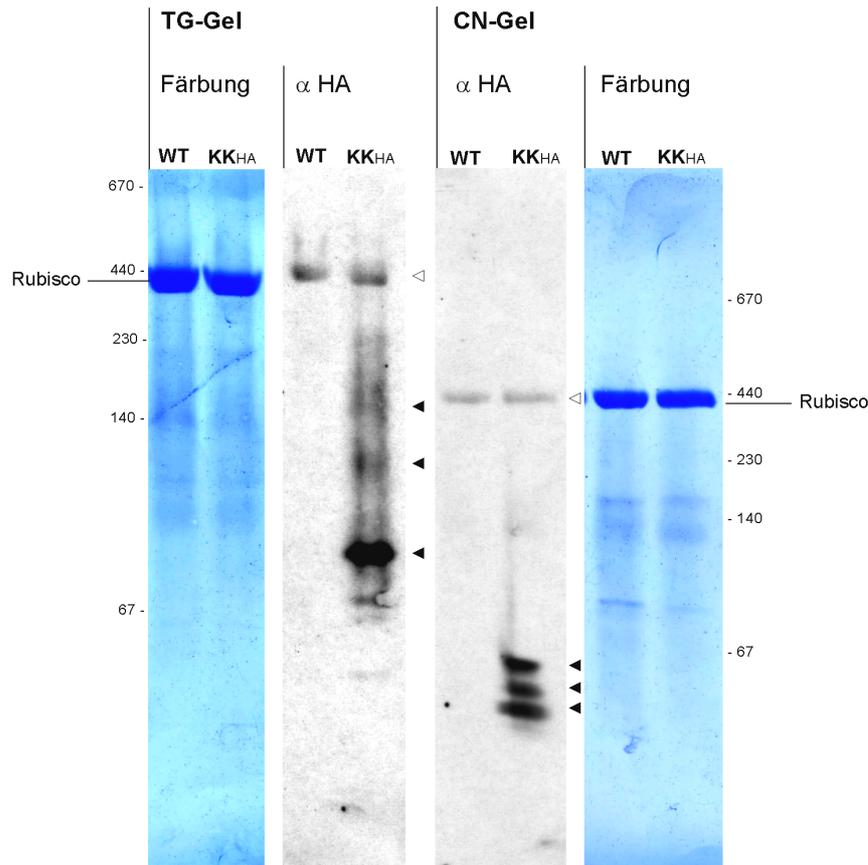


Abb. 3-49 *Western-Analyse der nativ aufgetrennten löslichen Fraktion von Rieske-KK_{HA}-exprimierenden Arabidopsis-Pflanzen.* Dargestellt sind ECL-Detektionen der HA-Antikörpernachweise (α HA, Mitte) sowie die entsprechende PVDF-Membranen nach Coomassiefärbung (außen). Jeweils 30 μ g lösliche Proteine des Wildtyps (WT) bzw. der Rieske-KK_{HA}-Linie 5-2/3 (KK_{HA}) wurden sowohl auf einem 5-13%igen Tris-Glycin (TG)-Gel als auch auf einem *Colorless native* (CN)-Gel gleicher Prozentigkeit nativ aufgetrennt. Die Größen des mitgeführten HMW-Markers sind jeweils außen angegeben. Die mit Pfeilspitzen markierten Banden haben demnach errechnete Größen von 80, 132 und 185 kDa im TG-Gel bzw. von 44, 50 und 57 kDa in CN-Gel. Der Rubisco-Holoenzymkomplex ist in beiden Fällen gekennzeichnet.

Obwohl das Laufverhalten dieser Komplexe offensichtlich sehr stark durch das verwendete Gelsystem beeinflusst wurde, läßt sich erkennen, daß es auch *in vivo* zur Bildung von Rieske-KK_{HA}-haltigen Proteinkomplexen kommt. Damit bestand die Möglichkeit zur Reinigung und Charakterisierung der in diesen Komplexen vorliegenden Rieske-Interaktionspartner.

Da es vermutlich zu einer Cpn60-abhängigen Faltung des Rieske-Proteins im Stroma kommt, sollte zunächst der Faltungszustand des in *A. thaliana* exprimierten Rieske-KK_{HA}-Proteins analysiert werden. Ein weit verbreiteter und einfacher Ansatz zur Bearbeitung dieser Fragestellung ist die Behandlung des Proteins mit der Protease Trypsin. Liegt das Rieske-KK_{HA}-Protein in einer kompakten, gefalteten Form vor, so sollte der Abbau durch eine externe Protease nur beschränkt möglich sein. Eine offenkettige Struktur dagegen bietet gute Angriffsmöglichkeiten für die Protease. Für diesen Versuch wurde Trypsin in

steigender Konzentration (1-2,5-5-10-20-40 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Die unbehandelten und proteasebehandelten Fraktionen löslicher Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer *Western*-Analyse mit Antikörpern gegen das HA-Peptid unterzogen (Abb. 3-50 A). Dabei zeigte sich, daß das Rieske-KK_{HA}-Protein eine gewisse Stabilität gegenüber Trypsin besitzt. So konnte bis zu einer Trypsin-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ das reife Protein mit der bekannten Größe von 21 kDa detektiert werden. Ab 2,5 $\mu\text{g/ml}$ begann zwar ein deutlicher Abbauprozess, wobei allerdings zwei relativ große Degradationsprodukte von 19 bzw. 15 kDa entstanden (Abb. 3-50 A). Auch bei der maximal eingesetzten Trypsinkonzentration (40 $\mu\text{g/ml}$) lag noch ein deutlicher Anteil als 19 kDa-Produkt vor. Durch die Spezifität von Trypsin für positiv geladenen Aminosäurereste (Lysin und Arginin), lassen sich anhand der Rieske-Aminosäuresequenz die Schnittstellen und die entstehenden Degradationsprodukte ableiten (Abb. 3-50 B).

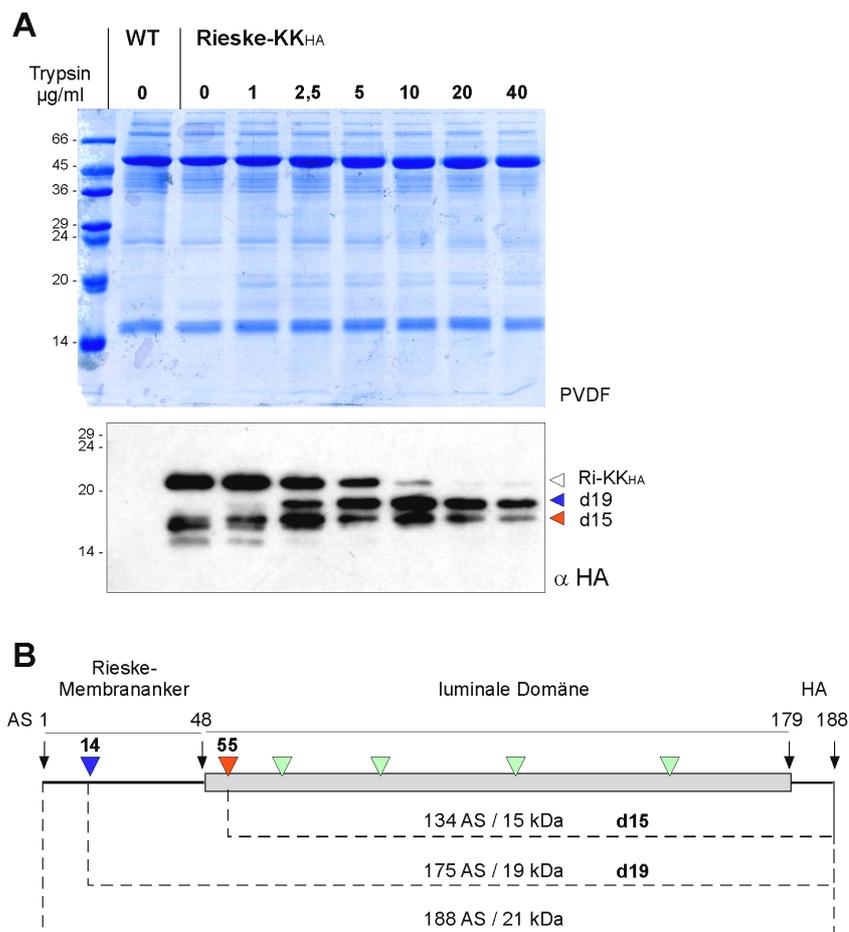


Abb. 3-50 *Western*-Analyse nach Trypsinbehandlung der löslichen Proteinfraction aus Rieske-KK_{HA}-Pflanzen. Die lösliche Proteinfraction wurde mit den oben angegebenen Trypsinkonzentrationen 1 h auf Eis behandelt. Jeweils 10 μg Protein wurden anschließend auf einem 17%igen SDS-Minigel analysiert. Der *Western blot* wurde mit HA-spezifischen Antikörpern (αHA) durchgeführt. Die entsprechende PVDF-Membran wurde anschließend mit Coomassie gefärbt (A). Die Trypsinschnittstellen innerhalb des Rieske-Proteins und die daraus resultierenden Fragmente sind unter (B) dargestellt. Das Rieske-KK_{HA}-Protein sowie die Degradationsprodukte d19 und d15 sind unter (A) gekennzeichnet.

So befindet sich eine Trypsinschnittstelle vor dem hydrophoben Bereich des Membranankers (AS 14), eine weitere kurz hinter diesem Bereich (AS 55). Diese beiden Prozessierungsstellen sind vermutlich für die Entstehung des 19 bzw. 15 kDa-Produkts verantwortlich (Abb. 50 A). Darüber hinaus gibt es im luminalen Teil fünf weitere Schnittstellen, die zumindest bei einer gewissen Menge des Rieske-KK_{HA}-Proteins unzugänglich für die Protease waren. Damit scheint das Protein im Stroma in einer gefalteten Struktur vorzuliegen.

3.3.4 Die Reinigung von Rieske-KK_{HA}-haltigen Komplexen

Die Reinigung des stromalokalisierten Rieske-KK_{HA}-Proteins erfolgte über eine Anti-HA-Affinitätsmatrix (Kapitel 2.2.16). Wie in den Experimenten zuvor, wurden die löslichen Proteine aus den Pflanzenextrakten der transgenen Linie 5-2/3 bzw. des Wildtyps isoliert und unter nativen Bedingungen auf eine Säule, die die Anti-HA-Affinitätsmatrix enthielt, aufgetragen. Da die Elution unter möglichst schonenden Bedingungen erfolgen sollte, wurde im ersten Versuch ein kompetierender Überschuss des HA-Peptides (1 mg/ml) auf die Säule gegeben. Die Säule wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und die erste Eluatfraktion wurde aufgefangen (E1). Die Säule wurde in einem zweiten Durchgang wiederum mit einem HA-Peptid-Überschuss für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dies ergab die Fraktionen des zweiten Eluats (E2). Auch die auf die Säule aufgetragene Probe (P) sowie der Durchlauf (D) und die Waschfraktionen (W1 bis W3) wurden gesammelt und anschließend zusammen mit den Eluaten mittels SDS-PAGE und *Western blot* analysiert (Abb. 3-51).

Es zeigte sich, daß die Bindung des Rieske-KK_{HA}-Proteins an die Affinitätsmatrix quantitativ erfolgte. So konnte in der Probe (P), die auf die Säule appliziert wurde, das Rieske-KK_{HA}-Protein nachgewiesen werden; in der Durchlauf fraktion (D) war dagegen kein Signal mehr zu erkennen. Die Waschung der Säulenmatrix löste das gebundene Protein nicht ab (W1 bis W3), aber auch die Elution durch einen HA-Peptid-Überschuss war nicht effektiv (E1 und 2). Erst durch den zweite Elutionsschritt (1 h bei RT) konnte eine geringe Menge des Rieske-KK_{HA}-Proteins von der Säule gelöst werden (Abb. 3-51, Spur E2^b). Somit schien die Methode der nativen Reinigung nicht erfolgversprechend.

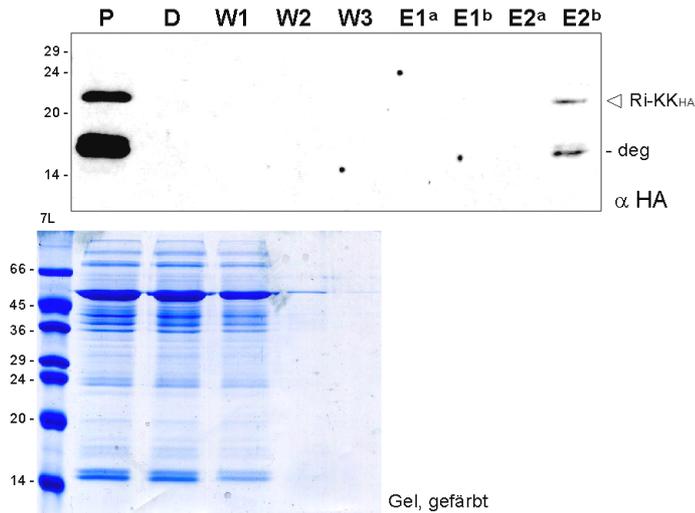


Abb. 3-51 Reinigung I des Rieske-KK_{HA}-Proteins über eine HA-Affinitätssäule. Dargestellt ist die *Western*-Analyse (HA-Antikörper, α HA) der einzelnen Reinigungsfraktionen und das entsprechende 15%ige SDS-Minigel. Jeweils 10 μ g Protein (1/200 Vol.) der auf die Säule aufgetragenen Probe (**P**) und des nichtgebundenen Materials (Durchlauf, **D**) sowie diesem Volumen entsprechende Menge der Waschfraktionen (**W1-3**) wurden zusammen mit je 1/100 Vol. (**a**) bzw. 1/20 Vol. (**b**) der 2 Eluatfraktionen (**E1**: mit 300 μ l HA-Peptid [1mg/ml] 15 min bei 37 °C eluiert; **E2**: mit 200 μ l HA-Peptid [1mg/ml] 1h bei RT eluiert) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Rieske-KK_{HA}-Protein sowie die Degradationsprodukte (deg) sind gekennzeichnet.

Im zweiten Versuch wurde eine andere, denaturierende Elutionsmethode gewählt. Statt mit dem kompetierenden HA-Peptid, wurde die Säule 5 min mit 0,1 M Glycin pH 2,0 bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Fraktion wurde als Eluat 1 (E1) aufgefangen. Ein identisch wiederholter Elutionsschritt ergab die Fraktion E2. Anschließend wurde die Säule laut Protokoll regeneriert, ebenfalls mit 0,1 M Glycin pH 2,0. Zur Kontrolle der erfolgreichen Elution wurde diesmal auch die Regenerierungsfraktionen (R) aufgefangen und zusammen mit den bereits bekannten Fraktionen (P, D, W, E) über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels HA-Antikörpern analysiert (Abb. 3-52 A).

Auch diesmal war die Bindung des Rieske-KK_{HA}-Proteins an die Säulenmatrix erfolgreich. Darüber hinaus war es durch den Einsatz von 0,1 M Glycin pH 2,0 möglich, das gebundene Protein vollständig von der Säule zu lösen (E1, E2), so daß in den Regenerierungsfraktionen kein Rieske-KK_{HA}-Protein mehr detektiert werden konnte (R1, R2). Da so gezeigt werden konnte, daß die Isolierung des Rieske-KK_{HA}-Proteins aus der Fraktion löslicher *Arabidopsis*-Proteine heraus möglich ist, sollte nun geklärt werden, ob es dabei auch zur Reinigung von Rieske-Interaktionspartnern gekommen ist. Dazu wurden die beiden Fraktionen E1 und E2, vereinigt, in ihrem Volumen reduziert (*Microcon*, Ausschlußgröße 3 kDa, MILLIPORE) und zusammen mit dem Wildtyp-Eluat auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden im Anschluß daran durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 3-52 B). Der Vergleich zwischen dem analog behandelten Wildtyp- und dem Mutantenextrakt läßt einige gemeinsame Banden erkennen, bei denen es sich um

unspezifisch an die Säule gebundene Proteine bzw. um abgelöste Antikörper handelt. Darüber hinaus zeigten sich aber auch Proteine, die spezifisch für das Eluat der Rieske-KK_{HA}-Mutante waren. Dazu zählen natürlich das Rieske-KK_{HA}-Protein selbst und die beiden Degradationsprodukte von ca. 16 kDa (Abb. 3-52 B).

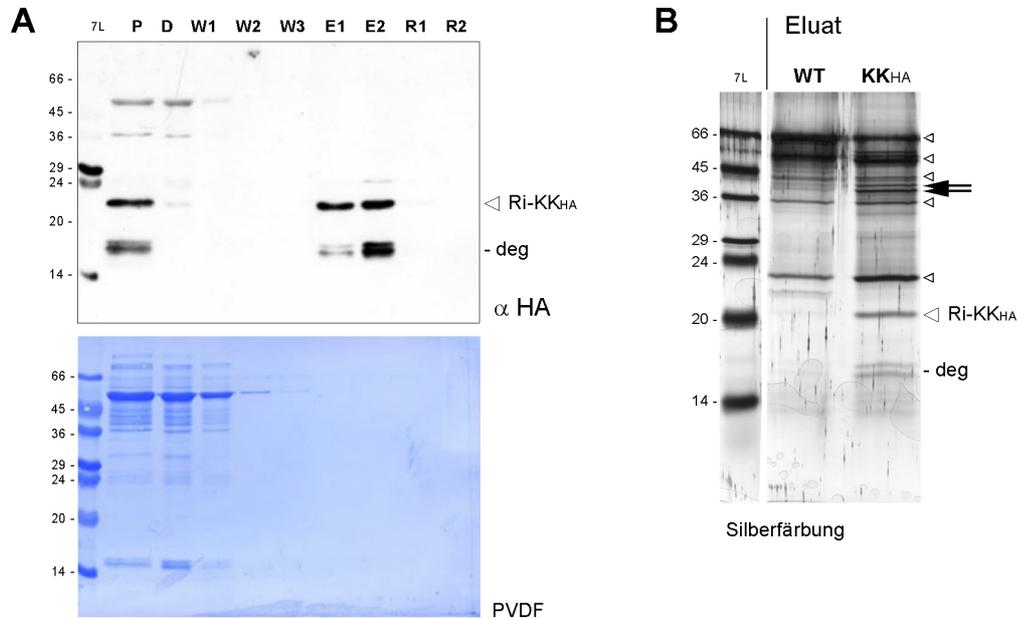


Abb. 3-52 Reinigung II des Rieske-KK_{HA}-Proteins über eine HA-Affinitätssäule. Dargestellt ist die *Western*-Analyse (HA-Antikörper, α HA) der einzelnen Reinigungsfraktionen und die entsprechende PVDF-Membran nach Coomassiefärbung (A). Jeweils 10 μ g Protein (1/200 Vol.) der auf die Säule aufgetragenen Probe (P) und des nichtgebundenen Materials (Durchlauf, D) sowie diesem Volumen entsprechende Menge der Waschfraktionen (W1-3) wurden zusammen mit je 1/60 Vol. der 2 Eluatfraktionen (E1: mit 500 μ l 0,1 M Glycin pH 2,0 5 min bei RT eluiert; E2: mit nochmals 500 μ l 0,1 M Glycin pH 2,0 5 min bei RT eluiert) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Rieske-KK_{HA}-Protein ist durch eine weiße Pfeilspitze gekennzeichnet, das Degradationsprodukt ist beschriftet (deg). Die Eluate wurden aufkonzentriert und zusammen mit der analog erstellten Wildtypprobe (WT) auf einem 15%igen SDS-Minigel aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung visualisiert (B). Die unspezifischen Banden sind mit kleinen weißen Pfeilspitzen markiert, die schwarzen Pfeile deuten auf Mutanten-spezifische Banden.

Zusätzlich gab es im Bereich von 40-45 kDa zwei Banden, die im Wildtyp-Eluat nicht detektierbar waren (Abb. 3-52 B, schwarze Pfeile). Die massenspektrometrische Analyse der kleineren, intensiveren Bande ergab, daß es sich hierbei um die Rubisco-Aktivase handelt. Für *Arabidopsis* sind 2 Formen der Rubisco-Aktivase bekannt, die aufgrund des alternativen Spleißens einer gemeinsamen mRNA synthetisiert werden und Molekulargewichte von 44 kDa bzw. 47 kDa aufweisen (Werneke et al., 1989). Da allerdings nicht auszuschließen ist, daß die Rubisco-Aktivase durch unspezifisch an die Säule gebundene Rubisco-Komplexe gereinigt wurde, wie der Immunnachweis der SSU in der Eluatfraktion belegt (Daten nicht gezeigt), ist eine vorsichtige Interpretation dieses Ergebnisses erforderlich.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Transport des kerncodierten Rieske Fe/S-Proteins vom Eintritt in den Chloroplasten bis zum endgültigen Wirkort, dem Cytochrom b_6/f -Komplex in der Thylakoidmembran, näher analysiert werden. Das charakteristische Transportverhalten des Rieske-Proteins unter *in vitro*-Bedingungen warf die Frage nach den Ursachen dafür auf. So bestand einerseits die Möglichkeit, daß die Transportretardierung des Rieske-Proteins durch das nicht-ideale Signal (den N-terminalen Membrananker als fragmentarisches $\Delta pH/Tat$ -Signal) verursacht wird, andererseits könnte auch die hydrophile luminaire Domäne den Transportprozeß beeinflussen. Tatsächlich war ein deutlicher Einfluß der luminalen Domäne zu erkennen, so daß man davon ausgehen kann, daß es im Stroma zu einer Modifikation des Rieske-Proteins, insbesondere der luminalen Domäne kommt. Diese Prozesse, die das Rieske-Protein verändern, sind vermutlich an die Funktion proteinogener Faktoren gebunden. Diese stromalokalisierten Prozesse und die daran beteiligten Interaktoren des Rieske-Proteins galt es zu identifizieren, um so den Ablauf des Transportprozesses für das Rieske-Protein besser verstehen zu können.

4.1 Das Rieske-Protein als besonderes $\Delta pH/Tat$ -Substrat

Der Import des *in vitro* synthetisierten Rieske-Vorstufenproteins in isolierte Chloroplasten hatte gezeigt, daß das reife Protein nicht wie erwartet quantitativ über die Thylakoidmembran transloziert wird, sondern vielmehr zu einem erheblichen Teil im Stroma akkumuliert (Abb. 3-1).

Dieses *in vitro*-Transportverhalten ist in doppelter Hinsicht ungewöhnlich, da eine solche Anhäufung des Rieske-Proteins im Stroma unter *in vivo*-Bedingungen nicht nachweisbar war (Abb. 3-3) und eine stromale Akkumulation anderer $\Delta pH/Tat$ -Transportsubstrate bislang in diesem Umfang nicht beobachtet wurde. So zeigen sechs von sieben weiteren bislang analysierten Substraten der plastidären $\Delta pH/Tat$ -Translokase (16 kDa- und 23 kDa-Protein, *PsaN*, *PsbT*, *P16* und *Ptft*) während solcher *in vitro*-Versuche einen quantitativen Transport der importierten Proteine bis in die Thylakoide (Clausmeyer et al., 1993; Nielsen et al., 1994; Kapazoglou et al., 1995; Mant et al., 1999; Summer et al., 2000). Nur für das

luminale Protein *Hcf136* wurde auch eine gewisse Menge an Stromaintermediat beschrieben (Hynds et al., 2000).

Alle bislang identifizierten Substrate der plastidären Δ pH/Tat-Translokase, mit Ausnahme des Rieske-Proteins, verfügen über das charakteristische Zwillingsarginin (RR)-Motiv. Eine Mutation des RR-Motivs hat in allen Fällen eine drastische Auswirkung auf die Transporteffizienz der Substrate, wie es im plastidären System z.B für das 23 kDa-Protein gezeigt wurde (Chaddock et al., 1995). Auch im bakteriellen System wird die Translokation von Proteinen über den Tat-Weg durch Veränderungen im Zwillingsarginin-Motiv stark inhibiert bzw. komplett verhindert (Dreusch et al., 1997; Halbig et al., 1999; Stanley et al., 2000). Unter den authentischen bakteriellen Tat-Substraten finden sich bislang nur zwei Proteine mit Abweichungen zum Zwillingsarginin-Motiv. So besitzt die Penicillinamidase aus *E. coli* ein RNR-Motiv (Ignatova et al., 2002) und die Tetrathionatreduktase-Untereinheit B (*TtrB*) aus *Salmonella enterica* eine KR-Sequenz, wie es auch beim Rieske-Protein der Fall ist (Hinsley et al., 2001). Daß allerdings das Fehlen des Zwillingsarginins und die statt dessen vorhandene KR-Sequenz für den retardierten Transport des Rieske-Proteins verantwortlich ist, kann ausgeschlossen werden, da eine Mutation von KR zu RR den Transportprozeß nicht beschleunigen konnte (Molik, 2000).

Eine weitere Besonderheit des Rieske-Proteins als Δ pH/Tat-Substrat ist, daß es sich um ein Membranprotein handelt. Der Hauptteil des Proteins, die C-terminale hydrophile Domäne, ist ins Thylakoidlumen exponiert. Die Translokation von Membranproteinen ist für die Δ pH/Tat-Translokase die Ausnahme. Unter den bisher analysierten plastidären Δ pH/Tat-Substraten verfügt nur noch *Pfif* über einen Membrananker (Summer & Cline, 1999). Allerdings ist der Transport dieses Proteins auch unabhängig vom Zwillingsarginin und sogar unabhängig vom Signalpeptid möglich (Summer et al., 2000). Auch aus dem bakteriellen Tat-System sind erst vereinzelt Beispiele für die Translokation von Membranproteinen bekannt (Sargent et al., 2002; Hatzixanthis et al., 2003). Hier ist der überwiegende Anteil der Tat-Substrate ebenfalls hydrophiler Natur.

Das Rieske-Protein ist das bislang einzige charakterisierte Substrat der plastidären Δ pH/Tat-Translokase, das durch die Bindung eines Cofaktors, dem [2Fe-2S]-Zentrum, gekennzeichnet ist. Dagegen ist im bakteriellen System neben dem konservierten

Zwillingsarginin-Motiv die Bindung von Cofaktoren die Gemeinsamkeit vieler Tat-Substrate (Berks, 1996; Berks, 2000).

So hat man mit dem plastidären Rieske-Protein ein Δ pH/Tat-Substrat in der Hand, das sich einerseits durch die Bindung des Cofaktors gut in die Reihe der typischen bakteriellen Tat-Proteine eingliedert, sich andererseits aber durch die Abweichung vom hoch konservierten Zwillingsarginin-Motiv und durch seinen Membrananker deutlich von den anderen bislang analysierten Δ pH/Tat-Substraten unterscheidet.

4.2 Das plastidäre Rieske-Protein aus *Arabidopsis thaliana*

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur das plastidäre Rieske-Protein aus Spinat (*Spinacia oleracea*, SoRi), sondern auch das entsprechende Protein aus *Arabidopsis thaliana* (AtRi) eingesetzt. Beide Proteine haben in ihrer reifen Form eine Länge von je 179 Aminosäuren und sind in ihren Aminosäuresequenzen zu 86 % identisch. Im Gegensatz zum reifen Teil weichen die Transitpeptide beider Vorstufenproteine in Länge und Aminosäuresequenz stärker voneinander ab. So verfügt das Spinatprotein über ein relativ ausgedehntes Transitpeptid von 68 Aminosäuren, dagegen besitzt das Transitpeptid des *Arabidopsis*-Proteins nur eine Länge von 50 Aminosäuren. Dies ergibt für das Rieske-Vorstufenprotein aus *A. thaliana* ein theoretisches Molekulargewicht von 25 kDa. Die *in vitro*-Synthese des entsprechenden Proteins ergab jedoch nur eine Größe von ca. 23 kDa (Abb. 3-1, Spur t). Diese Abweichung um ca. 2 kDa läßt sich durch die Verwendung eines cDNA-Klones erklären, der auf einer unvollständig bzw. alternativ gespleißten mRNA basierte (Abb. 3-2). So wurde ein Vorstufenprotein synthetisiert, dessen Transitpeptid nicht die erwarteten 50, sondern nur 31 Aminosäuren umfaßte. Jedoch reichte auch dieses kurze Transitpeptid aus, um das Rieske-Protein in isolierte Chloroplasten zu dirigieren (Abb. 3-1). Damit sind die bei der kurzen Version fehlenden 19 N-terminalen Aminosäuren des regulären Rieske-Transitpeptids für den Chloroplastenimport nicht erforderlich. Ein vergleichender Import mit beiden möglichen Rieske-Vorstufenproteinen aus *A. thaliana* könnte die Bedeutung dieser 19 N-terminalen Aminosäuren aufklären. Es ist möglich, daß sie unter *in vitro*-Bedingungen unerheblich sind und ihre Anwesenheit erst *in vivo* von Bedeutung ist, so z.B. für die organellspezifische Sortierung innerhalb der Zelle. Ob beide Varianten der mRNA bzw. der Vorstufenproteine auch *in vivo* vorkommen, ist unbekannt. Allerdings findet man beide Varianten in den NCBI-Datenbanken (NM-178964/NP-

849295 für die kurze Version, NM-116566/NP-192237 für die lange Version). Knight et al. (2002) beschränkten sich allerdings in ihrer Arbeit zur Expressionsanalyse des *petC*-Gens, das für das Rieske-Protein codiert, in *A. thaliana* auf die lange Version, d.h. die mit dem 50 AS langen Transitpeptid. Auch die plastidären Rieske-Proteine aus Erbse und Tabak verfügen über ein Transitpeptid von 50 Aminosäuren (Madueno et al., 1992; Salter et al., 1992). Das entsprechende Protein aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* kommt dagegen mit einem kürzeren, nur 29 AS-umfassenden Transitpeptid aus (de Vitry, 1994), das darüber hinaus auffällige Ähnlichkeit zum 31 AS-langen Transitpeptid der kurzen Version des *Arabidopsis*-Proteins aufweist. Somit ist es vorstellbar, daß auch *in vivo*, d.h. in *Arabidopsis thaliana* beide Versionen des Rieske-Vorstufenproteins präsent sind.

4.3 Die Rieske-Signalankerdomäne

Die Signalankerdomäne (Membrananker mit Signalpeptidfunktion) umfaßt die ersten 49 Aminosäuren des reifen Rieske-Proteins aus *Spinacia oleracea*, wobei die Reste 20 bis 42 aufgrund ihrer Hydrophobizität vermutlich die membrandurchspannende Helix ausbilden (Abb. 3-4 B). Die Fähigkeit des Membranankers als Thylakoidtransportsignal zu fungieren, wurde mit Hilfe chimärer Konstrukte für das Rieske-Protein aus Erbse gezeigt (Madueno et al., 1994). Die genaue Betrachtung dieses Transportsignals und der Vergleich mit charakteristischen $\Delta pH/Tat$ -Signalpeptiden, z.B. vom 23 kDa-Protein des Wasserspaltungsapparats, läßt jedoch nur wenige Gemeinsamkeiten erkennen (Abb. 3-4). Dies führte zu der Vermutung, daß die *in vitro* beobachtete Transportverzögerung in der Unvollkommenheit des Membranankers als Transportsignal begründet sein könnte. Allerdings verbesserte der Austausch des Membranankers gegen verschiedene Signalpeptide die Thylakoidtransporteffizienz für die luminalen Domäne nicht (Abb. 3-5). Daraus konnte geschlußfolgert werden, daß der Membrananker nicht der wesentliche Grund für den verlangsamten Thylakoidtransport des Proteins ist.

Die Versuche zur Integration der luminalen Domäne in die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran in Abhängigkeit vom verwendeten Transportsignal, ergaben zwei interessante Aspekte: (i) Die nach Thylakoidprozessierung freigesetzte luminalen Domäne wird nicht in den Cytochrom b_6/f -Komplex, sondern in einen Komplex von ca. 100 kDa integriert (Abb. 3-7 und 3-10, Komplex 3), und (ii) die Kombination von Sec-Signalpeptiden mit der luminalen Rieske-Domäne führt zur Markierung eines Membrankomplexes von ca. 280 kDa (Abb. 3-7 und 3-10, Komplex 2). Letztere

Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um den Komplex der plastidären Sec-Translokase handeln könnte. Der 100 kDa-Komplex (Komplex 3) dagegen könnte die monomere Form des Cytochrom b_6/f -Komplexes darstellen. Bevor dies näher erläutert wird, erfolgt zunächst eine genauere Betrachtung des Komplexes 2.

Komplex 2 – Die plastidäre Sec-Translokase?

Die Vermutung, daß es sich bei dem 280 kDa-Komplex tatsächlich um den Komplex der plastidären Sec-Translokase handelt, konnte zwar nicht endgültig bestätigt werden, es gelang jedoch die beiden Komponenten cpSecA und cpSecY im *Blue native*-Gel durch Antikörper zu detektieren (Abb. 3-11). Dabei lag die Größe des cpSecY-haltigen Komplexes bei 120 kDa, cpSecA war in einen 155 kDa-Komplex involviert.

Damit liegt die Größe der vom SecA-Antikörper detektierten Bande zwischen den Molekulargewichten der monomeren (ca. 110 kDa) und dimeren Form des cpSecA-Proteins. Aus dem bakteriellen System ist bekannt, daß SecA unter physiologischen Bedingungen dimerisiert (Akita et al., 1991; Shilton et al., 1998; Doyle et al., 2000), allerdings wurden auch monomere und oligomere Formen beobachtet (Woodbury et al., 2002; Duong, 2003; Or et al., 2004). So zeigten SecA-Dimere eine Dissoziation in Abhängigkeit von sauren Phospholipiden und einigen Detergenzien (dazu zählt allerdings nicht das hier verwendete Digitonin; Or et al., 2002; Benach et al., 2003). Somit ist es möglich, daß cpSecA als Monomer gebunden an der Thylakoidmembran vorliegt (Abb. 3-11) und erst die Zugabe eines Transportsubstrats die Dimerisierung bewirkt (Benach et al., 2003).

Der im Rahmen dieser Arbeit in Spinatthylakoiden detektierte cpSecY-haltige Komplex von 120 kDa steht der als 180 kDa-Komplex durch Gelfiltration gereinigten cpSecYE-Translokase aus *A. thaliana* gegenüber (Schünemann et al., 1999). Die beiden Untereinheiten cpSecY und cpSecE wurden als 44 kDa- bzw. 16 kDa-Proteine detektiert (Schünemann et al., 1999). Theoretisch würde ein dimerer Translokase-Komplex (Bessonneau et al., 2002) eine Größe von 120 kDa erreichen und somit genau dem in Abb. 3-11 detektierten Anti-cpSecY-Signal entsprechen. Jedoch wurde die Assoziation von Alb3, einer chaperonartigen Insertase von ca. 45 kDa, mit der plastidären Sec-Translokase gezeigt (Klostermann et al., 2002; Kuhn et al., 2003). Diese zusätzliche Untereinheit, die zwar vermutlich nicht stabil mit der Translokase interagiert (Klostermann et al., 2002), würde einen dimeren Sec-Translokase-Komplex auf 165 kDa vergrößern.

Zhang et al. (2001) detektierten im *Blue native*-Gel einen cpSecY-haltigen Komplex von ca. 100 kDa. Sie verwendeten ebenfalls Spinatthylakoide, solubilisierten diese aber statt mit Digitonin mit 1 % Dodecylmaltosid. Dies mag den Größenunterschied von 20 kDa zwischen den beiden Komplexen erklären.

Die Variabilität der methodischen Ansätze führte zu unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der plastidären Sec-Translokase. Eine Dynamik dieses Komplexes erschwert vermutlich die Identifizierung des transportaktiven Zustands. Selbst für die wesentlich intensiver analysierte Sec-Translokase aus *E. coli* wurden je nach Bedingung monomere, dimere, trimere und tetramere Zustände gefunden (Manting et al., 2000; Yahr & Wickner, 2000; Collinson et al., 2001; Bessonneau et al., 2002; Breyton et al., 2002; Duong, 2003; van den Berg et al., 2004). Somit ist es schwierig, eine endgültige Aussage darüber zu machen, welche Zusammensetzung der hier detektierte cpSecY-haltige Komplex tatsächlich hat.

Es war jedoch eindeutig zu erkennen, daß weder der cpSecY- noch der cpSecA-haltige Komplex mit dem ca. 280 kDa umfassenden Komplex 2 der Importversuche co-migrierte. (Abb. 3-7). Durch die Zugabe eines Sec-spezifischen Transportsubstrats (hier: 33 kDa-Protein) konnte eine Größenzunahme des cpSecA-haltigen Komplexes auf ca. 270 bzw. 320 kDa beobachtet werden, allerdings nur in Anwesenheit des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen AMP-PNP (Abb. 3-13, Spur 3). Jedoch wurde durch den SecY-Antikörper im gleichen Ansatz keine Veränderung der Komplexe beobachtet (Abb. 3-13), wie es für eine Assemblierung zur Transport-aktiven Translokase zu erwarten gewesen wäre.

Somit besteht die Möglichkeit, daß zumindest cpSecA am Komplex 2 beteiligt ist. Die Größe von 280 kDa für diesen Komplex 2 würde ungefähr einem cpSecA-Dimer (ca. 220 kDa) mit gebundenem Transportsubstrat (ca. 20 kDa) entsprechen.

Komplex 3 – Die monomere Form des Cytochrom b_6/f -Komplexes?

Die luminal Domäne des Rieske-Proteins konnte nur in Kombination mit dem authentischen Membrananker in den Cytochrom b_6/f -Komplex integriert werden (Abb. 3-7). Der Austausch des Membranankers gegen Tat-spezifische Signalpeptide ließ zwar eine Translokation der luminalen Domäne über die Thylakoidmembran erkennen, die Integration dieser Chimären erfolgte jedoch nicht in den Cytochrom b_6/f -Komplex, sondern in einen Komplex von ca. 100 kDa (Komplex 3; Abb. 3-7). Durch denaturierende

Auftrennung in der zweiten Dimension wurde deutlich, daß dieser Komplex nur die luminaire Domäne, nicht aber das unprozessierte chimäre Protein enthielt (Abb. 3-8).

Es besteht die Hypothese, daß es sich bei dem 100 kDa-Komplex im *Blue native*-Gel um die monomere Form des Cytochrom b_6/f -Komplexes handeln könnte. Auch Huang et al. (1994) beschrieben einen ca. 100 kDa monomeren Cytochrom b_6/f -Komplex für solubilisierte und über *Blue native*-PAGE separierte Spinatthylakoide.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die funktionelle Struktur des Cytochrom b_6/f -Komplexes ein Dimer aus 2 x 8 Untereinheiten darstellt (Graan & Ort, 1986; Huang et al., 1994; Breyton et al., 1997; Poggese et al., 1997; Kurisu et al., 2003). Die Konversion des Dimerzustandes in Monomere wurde in dem Modell von Breyton et al. (1997) als Rieske-abhängig postuliert. Die Strukturaufklärung des dimeren Cytochrom b_6/f -Komplexes bestätigte die zentrale Rolle des Rieske-Proteins (Kurisu et al., 2003). So ist es die Aufgabe von zwei Rieske-Proteinen, beide Monomere kreuzartig miteinander zu verbinden, wobei Membrananker und luminaire Domäne eines Moleküls Anteil an beiden Monomeren haben (Kurisu et al., 2003; Abb. 4-2). Somit liegt die Vermutung nahe, daß das Fehlen des Membranankers, wie es nach der Prozessierung der hier verwendeten chimären Proteine der Fall ist, die Dimerisierung der Cytochrom b_6/f -Komplex-Monomere verhindert.

4.4 Die Bedeutung der luminalen Rieske-Domäne für den Thylakoidtransport

Der Transport von gefalteten Proteinen

In chimären Proteinen ist der Transport der luminalen Rieske-Domäne nur in Abhängigkeit eines $\Delta pH/Tat$ -spezifischen Signalpeptids möglich (Abb. 3-5). Dies legte die Vermutung nahe, daß die luminaire Domäne einen Einfluß auf den Transportvorgang hat. Auch die Importexperimente mit isolierten Thylakoiden unterstützen diese Hypothese. In diesem Versuchssystem war der Transport der luminalen Rieske-Domäne weder in Abhängigkeit eines fremden $\Delta pH/Tat$ -Signalpeptids (23 kDa-Protein) noch in Gegenwart des Rieske-Membranankers als authentisches Thylakoidtransportsignal zu beobachten gewesen (Abb. 3-14 A). Daß der Membrananker allerdings in der Lage ist, den Transport von Passagierproteinen auch in isolierte Thylakoidvesikel zu ermöglichen, wurde durch das Importverhalten des chimären Ri tpp/23-Proteins deutlich (Abb. 3-14 B).

Erst durch die Kombination von Organell- und Thylakoidimport ist es gelungen, einen gewissen Anteil des zuvor in Plastiden importierten Rieske-Proteins nach der Freisetzung aus dem Stroma auch in isolierte Thylakoide zu transportieren (Abb. 3-15). Dies deutet auf eine stromalokalisierte „Vorbereitung“ des Proteins für den anschließenden Thylakoidtransport hin. Vermutlich spielen sowohl die Faltung des Proteins als auch der Einbau des [2Fe-2S]-Clusters eine wichtige Rolle bei dieser Transportvorbereitung. Obwohl beide Prozesse vermutlich im Stroma ablaufen (Nuccio et al., 1998; Kapazoglou et al., 2000), liegen bislang noch keine konkreten Beweise dafür vor.

Die Vermutung, daß eine Faltung des Rieske-Proteins im Stroma erfolgt, wird durch die Fähigkeit des Δ pH/Tat-Mechanismus nahegelegt, gefaltete Proteine transportieren zu können, wie es sowohl für Bakterien als auch für Chloroplasten gezeigt wurde (Robinson, 2000; Palmer & Berks, 2003). Dagegen ist der Sec-Weg auf den Transport entfalteter Proteine beschränkt (Pugsley, 1993).

Neben dem Rieske-Protein wurde auch für andere Substrate eine Einschränkung des Thylakoidtransports beobachtet. So konnte das Reporterprotein GFP (*Green Fluorescent Protein*) nur durch Δ pH/Tat-Signalpeptide in die Thylakoide isolierter Chloroplasten transportiert werden (Marques et al., 2003). Die Expression dieser GFP-Fusionen in *Arabidopsis thaliana* bestätigte diese *in vitro*-Beobachtungen (Marques et al., 2004). Im bakteriellen System konnte gezeigt werden, daß tatsächlich die Faltung der GFP-Moleküle den Transport über den Sec-Weg verhindert (Feilmeier 2000). Nur ungefaltete und damit inaktive GFP-Moleküle ließen sich über den Sec-Weg transportieren; der Transport von gefaltetem, aktivem GFP blieb jedoch auf den Tat-Weg beschränkt (Feilmeier et al., 2000; Thomas et al., 2001).

Auch bei authentischen bakteriellen Tat-Substraten wurde durch den Austausch des Signalpeptids gegen ein Sec-spezifisches Signal die Translokation der aktiven Form verhindert (Faury et al., 2004). So zeigen Kulturen des Bakteriums *Streptomyces lividans* eine extrazelluläre Xylase-Aktivität, die einen Tat-abhängigen Transport der Xylase C-Untereinheit erfordert. Durch den Austausch des Tat-Signals gegen ein Sec-Signal konnte keine extrazelluläre Xylase-Aktivität mehr nachgewiesen werden, das Protein ließ sich aber dennoch durch Antikörper auch außerhalb der Zelle detektieren (Faury et al., 2004). Diese Beispiele zeigen, daß der Faltungszustand der Substrate einen Einfluß auf die Translokationsfähigkeit hat. Somit könnte auch im Fall des Rieske-Proteins das Unvermögen der Sec-Translokase zum Transport der luminalen Domäne auf deren Faltung zurückzuführen sein.

Die Interaktion mit Chaperonen

Die Hypothese, daß es im Stroma zur Faltung des Rieske-Proteins kommt, wird durch die nachgewiesene Interaktion mit dem Cpn60-Komplex unterstützt (Abb. 3-21 und 3-23). Cpn60 stellt die zum bakteriellen GroE und mitochondrialen Hsp60 homologe Faltungsmaschinerie der Plastiden dar (Hemmingsen et al., 1988; Ostermann et al., 1989; Boston et al., 1996; Miernyk, 1999). Der Faltungskomplex der Plastiden wurde wegen seiner Beteiligung an der Assemblierung des Rubisco-Holokomplexes ursprünglich als „Rubisco-Bindungsprotein“ beschrieben (Barraclough & Ellis, 1980; Hemmingsen et al., 1988; Goloubinoff et al., 1989). Jedoch konnte ebenfalls die Interaktion des Chaperonins mit anderen Proteinen gezeigt werden, so z.B. mit der β -Untereinheit der ATP-Synthase, der Glutamin-Synthetase und der Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR; Lubben et al., 1989; Tsugeki & Nishimura et al., 1993). Auch für das Rieske-Protein aus Erbse wurde eine schwache Interaktion mit dem Cpn60-Komplex nachgewiesen (Madueno et al., 1993). In diesem Fall enthielt der Cpn60-Komplex allerdings zum überwiegenden Teil das reife Rieske-Protein und nur einen kaum erkennbaren Anteil des Vorstufenproteins. Im Vergleich dazu, zeigte die hier durchgeführte Co-Immunpräzipitation eine präferentielle Interaktion der Vorstufenmoleküle mit dem Cpn60-Komplex (Abb. 3-23). Dies deutet auf eine frühe Interaktion des Rieske-Proteins mit der Faltungsmaschinerie hin, die bereits vor der Abspaltung des Transitpeptids erfolgt. Eine solche frühe Interaktion von importierten Proteinen mit dem Cpn60-Komplex wird auch durch die Daten von Kessler & Blobel (1996) unterstützt, die eine Assoziation der Faltungsmaschinerie mit den Transportkomponenten der inneren Chloroplastenhülle zeigten.

Außer der Interaktion zum Cpn60-Komplex konnten im Rahmen dieser Arbeit durch Co-Immunpräzipitation keine weiteren Interaktionspartner des Rieske-Proteins identifiziert werden (Abb. 3-23). So wurde weder für die beiden Chaperone Hsp70 und Rubisco-Aktivase noch für die Transportkomponenten cpSRP54 und cpSecA eine Verbindung zum Rieske-Protein nachgewiesen.

Die Arbeit von Madueno et al. (1993) zeigt, daß durch den Einsatz von Hsp70-Antikörpern ein Teil des zuvor importierten Rieske-Proteins aus dem Stroma heraus co-präzipitiert werden kann. Dagegen interpretiert Karnauchov (1998) eine ursprünglich beobachtete leichte Hsp70-Interaktion des Rieske-Proteins als unspezifisch, d.h. Cpn60-vermittelt.

Andererseits wird eine Hsp70-Interaktion mit Transitpeptiden als Grundlage der ATP-getriebenen Translokation von Vorstufenproteinen über die Hüllmembran des

Chloroplasten angesehen (Scott & Theg, 1996). Durch einen Algorithmus wurde vorhergesagt, daß mehr als 95 % aller Transitpeptide über mindestens ein Hsp70-Bindemotiv verfügen (Rüdiger et al., 1997; Rial et al., 2000; Zhang et al., 1999; Ivey et al., 2000). Dieses Motiv ist durch einen recht hydrophoben Kern von vier bis fünf Aminosäuren (hauptsächlich Leucin) und flankierenden Regionen, die basische Reste enthalten, gekennzeichnet. Obwohl ein solches Motiv auf den ersten Blick nicht in der Aminosäuresequenz des Rieske-Proteins aus Spinat vorhanden ist, schließt dies noch nicht die Bindungsfähigkeit für Hsp70-Moleküle aus.

In der Arbeit von Karnauhov (1998) wurde auch die Interaktion der Rubisco-Aktivase zum Rieske-Proteins nachgewiesen. In diesen Experimenten wurde Histidin-markiertes Rieske-Protein mit Stromaextrakt inkubiert und anschließend über eine Histidin-Affinitätssäule gereinigt. Allerdings könnte die so mitgereinigte Rubisco-Aktivase aus der Bindung an den Rubisco-Komplex resultieren, dessen große und kleine Untereinheiten sich ebenfalls im Eluat befanden. Auch durch den in der vorliegenden Arbeit gewählten Ansatz zur Identifizierung von Rieske-Interaktionspartnern (Expression und Reinigung einer HA-markierten, stromaakkumulierenden Rieske-Variante in *A. thaliana*) konnte die Rubisco-Aktivase aus dem Eluat durch massenspektroskopische Analyse identifiziert werden (Abb. 3-52 B). Allerdings ist auch hier nicht auszuschließen, daß dies auf den unspezifisch an die Säulenmatrix gebundenen Rubisco-Komplex zurückzuführen ist. Eine weiterführende Diskussion folgt in Kapitel 4.6.

Die Interaktion des Rieske-Proteins mit cpSRP54, der Transportkomponente des SRP-Weges wurde von High et al. (1997) gezeigt. Neben dem Rieske-Protein wurden auch Cytochrom f und LHCP als cpSRP54-Bindungspartner identifiziert. Nur LHCP ist als SRP-Transportsubstrat bekannt, wohingegen für Cytochrom f eine cpSecA-abhängige Translokation nachgewiesen wurde (Nohara et al., 1996; Röhl & van Wijk., 2001). Somit ist auch die Bedeutung der von High et al. (1997) beobachteten cpSRP54-Rieske-Interaktion, die sogar noch um einiges schwächer war als die zu Cytochrom f, unklar. Außerdem wurde für das Rieske-Protein der Transport über den Δ pH/Tat-Weg eindeutig gezeigt (Molik et al., 2001), und es gibt bislang keine Indizien für die Beteiligung von SRP-Komponenten an diesem Transportweg.

Der Einbau von Cofaktoren

Die *in organello*-Importversuche mit den Rieske-Fe/S-Ligandenmutanten, die in Cofaktor-bindenden bzw. Disulfidbrücken-ausbildenden Aminosäuren verändert waren, zeigten eine starke Inhibierung (H128Q) bis vollständige Blockierung des Thylakoidtransports (C125S und C127S; Abb. 3-17). Eine geringfügige Assemblierung der Fe/S-Ligandenmutante H128Q in den Cytochrom b_6/f -Komplex konnte beobachtet werden (Abb. 3-18). In dieser Mutante könnte es durch eine eventuell vorhandene Wasserstoffbrückenbindung vom Ser130 zum Schwefel zur Stabilisierung des Cofaktors kommen. Das Vorhandensein einer solchen Bindung wurde für das mitochondriale Rieske-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt (Gutierrez-Cirlos et al., 2002). Dort ist der Cofaktor-bindende Histidinrest (His181) und der Wasserstoffbrücken-bildende Serinrest (Ser183) durch eine Aminosäure voneinander getrennt. Da diese Aminosäurekonstellation auch im plastidären Rieske-Protein vorhanden ist, könnte dort ebenfalls eine Wasserstoffbrückenbindung vorliegen.

Bezüglich des Verhaltens der Mutanten C125S, C127S und H128Q zeigt die Arbeit von Kapazoglou et al. (2000) allerdings ein komplett anderes Bild. Hier wurde eine Dreifachmutation des Rieske-Proteins aus Erbse (C107S/H109R/C112S), in der zwei Cofaktor-bindende Aminosäuren sowie eine Disulfidbrücken-ausbildende Aminosäure ausgetauscht wurden, in vergleichbarer Effizienz wie das authentische Protein über die Thylakoidmembran transportiert. Auch die Assemblierung in den Cytochrom b_6/f -Komplex war für beide Proteine in gleichem Umfang möglich (Kapazoglou et al., 2000). Somit ist in diesem Fall weder die Assemblierung des Fe/S-Clusters noch die Ausbildung der Disulfidbrücke Voraussetzung für den Thylakoidtransport des Rieske-Proteins. Dies steht im klaren Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen (Abb. 3-17 und 3-18). Sowohl die Anwesenheit des Cofaktors als auch die Faltung sowie Disulfidbrückenausbildung scheinen für die Thylakoidtranslokation des Rieske-Proteins von entscheidender Bedeutung zu sein. Dies würde für einen selektiven Transport von Cofaktor-tragenden bzw. gefalteten Proteinen durch die plastidäre $\Delta pH/Tat$ -Translokase sprechen.

So wurde bereits für Bakterien ein Kontrollmechanismus postuliert, der nur den Tat-abhängigen Transport von gefalteten Proteinen erlaubt. Dabei ist auf der einen Seite eine Art „Qualitätskontrolle“ der zu transportierenden Substrate, die von der Tat-Translokase selbst durchgeführt wird, denkbar (DeLisa et al., 2003), auf der anderen Seite werden Signalpeptid-spezifische Bindeproteine vermutet, die eine zu frühe Interaktion des

Substrats mit dem Translokasekomplex verhindern und somit die Chaperon-vermittelte Faltung bzw. Cofaktorinsertion ermöglichen (Oresnik et al., 2001; Jack et al., 2004).

Auch für die plastidäre $\Delta pH/Tat$ -Translokase wurde der Transport von gefalteten Proteinen gezeigt (Creighton et al., 1995; Clark & Theg, 1997; Hynds et al., 1998; Marques et al., 2003 und 2004). Allerdings ist noch unklar, ob die Transportkompetenz der plastidären $\Delta pH/Tat$ -Translokase auch auf die Translokation von gefalteten Proteinen beschränkt ist, oder ob zusätzlich ein Transport von ungefalteten Substraten möglich ist (Hynds et al., 1998).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Akkumulation des Rieske-Proteins im Stroma isolierter Chloroplasten hauptsächlich durch die luminale Domäne bedingt ist. Daß Faltung und Cofaktoreinbau Voraussetzung für den Thylakoidtransport sind, wurde durch die Transportversuche mit isolierten Thylakoiden, dem Verhalten der Fe/S-Ligandenmutanten und der Signalpeptidchimären gezeigt. Die Interaktion mit dem Chaperon Cpn60 im Stroma der Chloroplasten ist ein weiteres Indiz für die Translokation des Rieske-Proteins im gefalteten Zustand. Somit konnte für ein Transportsubstrat der plastidären $\Delta pH/Tat$ -Translokase eine Faltungs- und Cofaktor-abhängige Translokation gezeigt werden.

4.5 Die Kandidaten der plastidären Fe/S-Assemblierungsmaschinerie

Da der Einbau des [2Fe-2S]-Zentrums anscheinend Voraussetzung für den Thylakoidtransport des Rieske-Proteins ist, wurde dieser Prozeß genauer analysiert. Ziel war es, durch die Identifizierung beteiligter Komponenten mögliche neue Interaktionspartner des Rieske-Proteins zu finden und so den Transportvorgang besser aufzulösen. Zu Beginn dieser Arbeit standen zum Thema der plastidären Fe/S-Cluster-Biosynthese kaum Informationen zur Verfügung. Man ging zwar davon aus, daß neben Mitochondrien auch die Plastiden in der Lage sind, Fe/S-Cluster zu synthetisieren, die daran beteiligten Komponenten waren allerdings noch unbekannt. So konnte für isolierte (intakte sowie lysierte) Plastiden die Fähigkeit zur Bildung eines Ferredoxin-gebundenen [2Fe-2S]-Clusters gezeigt werden (Takahashi et al., 1986; Suzuki et al., 1991; Takahashi et al., 1990 a). Diese Fähigkeit beschränkte sich auf die Stromafraktion und zeigte eine starke Abhängigkeit von den Photosyntheseprodukten ATP und NADPH (Takahashi et al., 1990

b). Welche proteinogenen Faktoren an der Cofaktor-Assemblierung beteiligt waren, konnte dagegen nicht gezeigt werden.

Die IscS/NFS-Komponente

In *Synechocystis PCC6803* wurden bislang drei IscS-Proteine charakterisiert (*slr0387*; Jaschkowitz & Seidler, 2000; *slr0704* und *slr0077*; Kato et al., 2000). Auf dieser Basis konnte durch Homologievergleiche über das Programm BLAST eine IscS-ähnliche Sequenz im *Arabidopsis*-Genom identifiziert werden, deren Produkt (AtNFS) laut Vorhersage (TargetP) eine Plastidenimportsequenz besitzt. Der Sequenzvergleich zwischen den drei *Synechocystis*-Proteinen und AtNFS zeigte, daß das *Arabidopsis*-Protein eine deutlich stärkere Homologie zu IscS3 (62 % Identität) als zu IscS1 bzw. IscS2 aufweist (24 % Identität; Tab. 3-1). Neben der deutlichen Sequenzähnlichkeit des mutmaßlichen plastidären NFS-Proteins zu dem cyanobakteriellen IscS3 konnten auch für NifS/IscS-Proteine charakteristische Sequenzmotive im AtNFS-Protein identifiziert werden. So erfolgt in bislang charakterisierten NifS/IscS/NFS-Proteinen die Bindung des Pyridoxalphosphat-Cofaktors über einen konservierten Lysinrest, während das Substrat an das aktive Zentrum, einen Cysteinrest, bindet. Beide Reste (Lys275 und Cys418) sind im AtNFS-Protein vorhanden (Abb. 3-24 A). Außerdem sind an der Bindung des Cofaktors bzw. an der Stabilisierung des Cysteins weitere Aminosäuren beteiligt (Kaiser et al., 2000), die ebenfalls im AtNFS-Protein vorliegen (Asp249, Thr144, Gln252, His274, Thr272 und Thr326 bzw. Asn102, Asn224 und Arg433). So konnte man davon ausgehen, daß es sich bei dem als AtNFS identifizierten Protein tatsächlich um eine plastidäre NFS-Komponente handelt. Diese Vermutung wurde durch die Arbeiten von Léon et al. (2002) und Pilon-Smits et al. (2002) bestätigt. Auch sie identifizierten über Sequenzvergleiche ein zu IscS3 homologes Protein (68 %) in *Arabidopsis thaliana*. Das entsprechende Gen (At1g08490) wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Codierungsort für AtNFS beschrieben (Tab. 3-3). Die subzelluläre Lokalisierung des 51 kDa-Genproduktes wurde mittels GFP-Fusion und transienter Expression in *Arabidopsis*-Protoplasten gezeigt und beschränkte sich auf die Plastiden (Léon et al., 2002). Auch die hier verwendete Methode des *in organello*-Transportversuches ergab eine Plastidenlokalisierung des At1g08490-Genproduktes (Abb. 3-26). Die gleiche Methode führte bei Pilon-Smits et al. (2002) ebenfalls zu diesem Ergebnis. Weiterhin konnten beide Arbeitsgruppen eine Desulfuraseaktivität für das plastidäre NFS-Protein aus *A. thaliana* zeigen (Léon et al., 2002; Pilon-Smits et al., 2002).

Somit wurde bestätigt, daß das im Rahmen dieser Arbeit als AtNFS identifizierte Protein tatsächlich eine NFS-Komponente darstellt (Abb. 4-1).

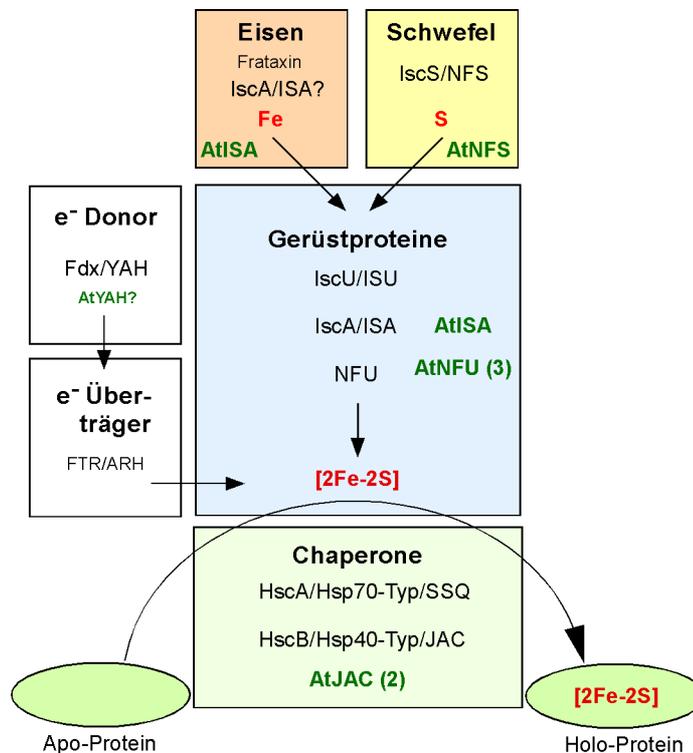


Abb. 4-1 Modell zur Fe/S-Cluster-Synthese (nach Literaturangaben). Dargestellt sind wesentliche Komponenten der Fe/S-Cluster-Synthese und die entsprechenden Proteine in Pro-/Eukaryonten (Hefe). Die plastidären Proteine aus *A. thaliana* sind in grün angegeben, die Ziffer in Klammern gibt die jeweilige Anzahl an Homologen an.

Die NFU-Komponente

Obwohl IscU, das Homologe zur N-terminalen NifU-Domäne, eines der konserviertesten Proteine der Natur ist (Hwang et al., 1996), konnte weder für *Synechocystis* noch für Plastiden die Existenz einer solchen IscU/ISU-Komponente nachgewiesen werden (Mühlenhoff & Lill, 2000; Seidler et al., 2001; diese Arbeit). Dafür ist für *Synechocystis* ein Protein mit Homologien zur C-terminalen Domäne des NifU-Proteins bekannt (CnfU, *ssl2667*; Nishio & Nakai, 2000; Abb. 3-24 B). Auf Basis dieser Proteinsequenz konnten im Rahmen dieser Arbeit für *A. thaliana* drei Proteine mit Homologien von 50-70 % zu CnfU identifiziert werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Plastidenlokalisierung besitzen (Tab. 3-1 B, 3-2 und 3-3).

Ein typisches Merkmal plastidärer sowie cyanobakterieller NFU-Proteine ist das Vorhandensein von zwei NFU-Domänen in Folge. Allerdings enthält nur die erste Domäne

die beiden konservierten Cysteinreste in Form eines Cys-x-x-Cys-Motivs (Abb. 3-24), das vermutlich eine transiente Fe/S-Cluster-Bindung ermöglicht (Léon et al., 2003, Touraine et al., 2004; Tong et al., 2003). Deshalb werden NFU-Proteine auch als Alternative zur Gerüst-Komponente IscU/ISU angesehen (Abb. 4-1), die aufgrund ihres Fehlens weder in *Synechocystis* noch in Plastiden eine Rolle spielen kann. Dies deutet darauf hin, daß der Mechanismus der Fe/S-Cluster-Biosynthese in Plastiden bzw. Cyanobakterien Unterschiede zu dem bekannten Weg der Bakterien bzw. Mitochondrien aufweisen könnte.

Für alle drei identifizierten NFU-Proteine (AtNFU1-3) konnte die vorhergesagte Plastidenlokalisierung durch Importversuche mit isolierten Chloroplasten bestätigt werden (Abb. 3-26, 3-27). Dabei zeigte der Einsatz von Erbsenplastiden eine ausschließliche Stromalokalisierung der aufgenommenen NFU-Proteine (Abb. 3-27). Der Import in Spinatchloroplasten ließ neben der deutlichen Stromaakkumulation auch eine leichte Bindung der NFU-Proteine an die Thylakoidmembran erkennen. Dieser membrangebundene Anteil war sogar zum Teil proteaseresistent (Abb. 3-26). Yabe et al. (2004) zeigten allerdings für AtNFU1 und AtNFU3 durch *Western*-Analyse eine rein stromale Lokalisierung für diese beiden Proteine.

Die Charakterisierung der plastidären NFU-Proteine aus *A. thaliana* wurde von Léon et al. (2003) durchgeführt. In dieser Publikation konnten die selben drei Proteine als plastidäre NFU-Kandidaten identifiziert werden, wie es im Rahmen dieser Arbeit erfolgt ist. Neben der Plastidenlokalisierung, konnte die Funktionalität von AtNFU1 und AtNFU3 durch die Komplementation einer $\Delta isu1 \Delta nfu1$ -Hefemutante gezeigt werden (Léon et al., 2003). Die Überexpression von AtNFU3 ergab, daß dieses Protein in der Lage ist, einen labilen Fe/S-Cluster zu binden (Léon et al., 2003).

Die Analyse einer $\Delta AtNFU3$ -Mutante, die einen *dwarf*-Phänotyp ausbildet, ergab eine starke Reduktion der PSI-Untereinheiten PsaA, B, C, D (PsaD 2x[4Fe-4S], PsaA+B [4Fe-4S]) sowie des stromalokalisierten [2Fe-2S]-Ferredoxins. Auch die Aktivität zur Assemblierung des Ferredoxin-Cofaktors war auf ca. 1/3 der Wildtypaktivität gesunken (Yabe et al., 2004). Jedoch konnte keine Reduktion des Rieske-Proteins beobachtet werden (Yabe et al., 2004). Touraine et al. (2004) detektierten in der $\Delta AtNFU3$ -Mutante sogar die doppelte Konzentration des Rieske-Proteins im Vergleich zum Wildtyp. Somit scheinen die drei plastidären NFU-Proteine eine unterschiedliche Substrat- bzw. Cluster-Spezifität zu besitzen. Dabei gibt es offensichtlich keine Verbindung zwischen AtNFU3 und dem Rieske-Protein. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß AtNFU1 bzw. AtNFU2 an der

Assemblierung des Rieske [2Fe-2S]-Clusters beteiligt ist. Es ist natürlich auch nicht auszuschließen, daß eine NFU-unabhängige Assemblierung des Rieske [2Fe-2S]-Clusters erfolgt, denn mit der IscA/ISA-Komponente gibt es ein drittes potentiell Gerüstprotein (Abb. 4-1; Krebs et al., 2001; Seidler et al., 2001; Wu et al., 2002; Wollenberg et al., 2003; Ollagnier-de-Choudens et al., 2004).

Die IscA/ISA-Komponente

Als Grundlage zur Identifizierung plastidärer IscA/ISA-Kandidaten in *A.thaliana* dienten die beiden bekannten IscA-Proteine aus *Synechocystis* (IscA1, *slr1417* und IscA2, *slr1565*). So konnte durch das Programm BLAST ein *Arabidopsis*-Protein mit deutlicher Homologie zu IscA1 (60 % AS-Identität) identifiziert werden (AtISA; Tab. 3-1 C und Tab. 3-2). Dieser ISA-Kandidat enthält die drei konservierten Cysteinreste, die im Isal- und IsalI-Motiv integriert sind (Abb. 3-24 C; Kaut et al., 2000). Diese drei Cysteine sind wahrscheinlich an der transienten Bindung eines [2Fe-2S]-Clusters beteiligt (Wollenberg et al., 2003; Bilder et al., 2004; Cupp-Vickery et al., 2004). Ein zusätzlicher Cysteinrest im N-terminalen Teil des Proteins ist eine Gemeinsamkeit mit den beiden Proteinen aus *Synechocystis*. Die Funktion dieses Cysteinrestes ist noch unklar, für die transiente Bindung eines [2Fe-2S]-Zentrums scheint er unbedeutend zu sein (Wollenberg et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bereits gut analysierte IscA1-Protein aus *Synechocystis* genutzt. Dabei sollte untersucht werden, ob das Rieske-Protein ein Akzeptor eines IscA1-gebundenen [2Fe-2S]-Zentrums darstellt. Allerdings konnten durch die hier verwendeten Methoden weder eine direkte Interaktion noch eine funktionelle Verbindung zwischen dem Rieske-Protein und IscA1 beobachtet werden (Abb. 3-34 und 3-35). Auch die Optimierung des Faltungszustandes durch Import des Rieske-Proteins in isolierte Chloroplasten und anschließende Inkubation des isolierten Stromas mit rekonstituierten IscA1 (IscA_{rek}) ließ keine Übertragung des [2Fe-2S]-Zentrums erkennen (Abb. 3-35).

Somit war es nicht möglich, eine funktionelle Verbindung zwischen dem IscA1 aus *Synechocystis* und dem plastidären Rieske-Protein aus Spinat aufzuzeigen. Dies mag vermutlich nicht am verwendeten heterologen System liegen, da neben der Art-internen Fe/S-Übertragung (auf das Ferredoxin aus *Synechocystis*), auch der Transfer des IscA1-gebundenen [2Fe-2S]-Clusters auf das Ferredoxin von *Bacillus subtilis* bzw. *Catharanthus roseus* gezeigt werden konnte (Wollenberg et al., 2003). Durch diesen artübergreifenden Transfer, geht man davon aus, daß eine spezifische IscA-Bindestelle im Substrat

(Akzeptor) nicht vorhanden ist (Wollenberg et al., 2003). Auch Ollagnier-de-Choudens et al. (2004) diskutieren eine fehlende Akzeptorspezifität für die bakterielle IscA/SufA-Komponente.

Möglich ist natürlich auch, daß die gewählten Methoden zur Auflösung einer Interaktion des Rieske-Proteins mit der Fe/S-Assemblierungsmaschinerie nicht optimal waren, so daß eine vorhandene Interaktion aufgrund ihrer Kurzlebigkeit oder Labilität nicht erfaßt werden konnte (Abb. 3-31 und 3-32). So war es Wollenberg et al. (2003) nicht möglich, eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen IscA1 und Ferredoxin nachzuweisen, obwohl es offensichtlich zu einer funktionellen Verbindung zwischen beiden Proteinen kam.

Andererseits konnten Ollagnier-de-Choudens et al. (2004) zeigen, daß im bakteriellen System eine stabile Protein-Protein-Interaktion zwischen der IscA-Komponente SufA und dem Cluster-Akzeptor Biotinsynthase besteht. Aus der resultierenden Kinetik der Cluster-Übertragung entwickelten sie folgendes Modell: es kommt schnell zur Ausbildung eines Donor-Akzeptor-Komplexes, die Übertragung des Clusters dagegen erfolgt relativ langsam; anschließend dissoziiert der Komplex in Apo-Donor und Holo-Akzeptor. Interessanterweise ließ sich die Stabilität des Donor-Akzeptor-Komplexes durch den Einsatz einer Fe/S-Ligandenmutante (C53A) um ein Vielfaches erhöhen. Da in diesem Fall allerdings nur eine geringfügige Übertragung des SufA-gebundenen [2Fe-2S]-Clusters auf den Akzeptor erfolgte, geht man von einem Cystein-initiierten Transferprozeß aus (Ollagnier-de-Choudens et al., 2004). Somit bleibt die Möglichkeit, die vorhandenen Rieske Fe/S-Ligandenmutanten auf ihre Interaktionsfähigkeit mit dem rekonstituierten IscA1-Protein aus *Synechocystis* zu testen.

Ein deutlicher Unterschied zwischen dem Fe/S-Zentrum der Ferredoxine und dem der Rieske-Proteine, liegt in der Bindungsart des Cofaktors. Während die Ferredoxin-Cluster durch vier Cysteinreste koordiniert werden, erfolgt die Bindung der Rieske-Cluster über je zwei Cystein- und Histidinreste. Dies mag der entscheidende Punkt sein, der die Art und Weise der Cluster-Assemblierung bestimmt. Da an einem solchen Prozeß vielleicht Komponenten beteiligt sind, die hier noch gar nicht in Betracht gezogen wurden, mag die Einordnung des Rieske-Proteins in das Fe/S-Cluster-Biosynthesenetzwerk bislang erschweren.

Als eine weitere Funktion der IscS/ISA-Komponente wird die Bindung und Bereitstellung von Eisen-Ionen diskutiert (Morimoto et al., 2002; Ding & Clark, 2004; Ding et al., 2004; Abb. 4-1). So zeigte das in *E. coli* exprimierte IscA1-Protein neben der Fähigkeit einen

[2Fe-2S]-Cluster zu binden, auch eine starke Affinität zu Eisen-Ionen (Morimoto et al., 2002). Auch die beiden ISA-Proteine aus *S. cerevisiae* spielen nicht nur bei der Fe/S-Cluster-Synthese, sondern auch bei der Eisenhomöostase der Mitochondrien eine entscheidende Rolle (Schilke et al., 1999; Jensen & Culatto, 2000; Pelzer et al., 2000). Da bislang für pflanzliche ISA-Proteine jegliche Beschreibung fehlt, bleibt vorerst unbekannt, welche konkrete Funktion sie im Chloroplasten erfüllen.

Die ISC-Kandidaten bilden Komplexe im Stroma

Die *in vitro* synthetisierten und in isolierte Chloroplasten transportierten ISC-Kandidaten liegen im Stroma zum Teil in Form hochmolekularer Proteinkomplexe vor (Abb. 3-28 bis 3-30).

Dabei ließ sich AtNFU1, das ein apparentes Molekulargewicht von 20 kDa zeigte, als ca. 40 kDa-Komplex im nativen Gel nachweisen (Abb. 3-28), so daß es sich hierbei vermutlich um Homodimere handelt. Dagegen scheint AtNFU3 auch unter nativen Bedingungen als Monomer vorzuliegen, da es als Bande von nur ca. 20 kDa, dem apparenten Molekulargewicht des reifen Proteins, nachzuweisen war (Abb. 3-28). Dies läßt sich mit den Ergebnissen von Yabe et al. (2004) vereinbaren, die eine Dimerisierung von in *E. coli* exprimiertem AtNFU3, nur in Abhängigkeit eines transient gebundenen [2Fe-2S]-Zentrums beobachteten. Kam es zur Übertragung des Cofaktors auf ein Apo-Protein, zerfielen die Dimere in ihre Untereinheiten. (Yabe et al., 2004). Vermutlich lag im Fall des AtNFU3 die Bindung eines Fe/S-Zentrums nicht vor, so daß eine Dimerisierung nicht möglich war. Da es im Fall von AtNFU1 offenbar zur Bildung von stabilen Dimeren kam, ist es möglich, daß hier ein anderer Dimerisierungsmechanismus zu Grunde liegt.

Der überwiegende Teil des importierten AtNFS-Proteins lag unter nativen Bedingungen in einem ca. 70 kDa-Komplex vor, der vermutlich die dimere Form des Proteins darstellt (Abb. 3-28 und 3-29 A). Neben dieser 70 kDa-Bande, konnte ein geringer Anteil des AtNFS-Proteins in Abhängigkeit vom verwendeten Gelsystem als 670 bzw. 440 kDa-Komplex detektiert werden, der bereits als Cpn60-Komplex identifiziert worden war (Abb. 3-28 und 3-29 A).

Pilon-Smits et al. (2002) zeigten die Dimerisierung von AtNFS, indem sie einen ca. 80 kDa-Komplex durch Gelfiltration aus *A. thaliana* reinigten. Auch für andere NifS/IscS/NFS-Proteine wurde der funktionelle Zustand in Form eines Homodimers

beschrieben (Zheng et al., 1993; Jaschkowitz & Seidler, 2000; Mühlenhoff et al., 2004). Somit ist sehr wahrscheinlich, daß auch das in isolierte Chloroplasten importierte AtNFS-Protein Homodimere ausbildet, die bei nativer Elektrophorese einem ca. 70 kDa-Komplex entsprechen.

In isolierte Chloroplasten transportiertes AtISA-Protein bildete eine Vielzahl von hochmolekularen Komplexen aus, wobei der überwiegende Teil des importierten Proteins im nativen Tris-Glycin-Gel im Bereich zwischen 56 und 110 kDa detektiert wurde (Abb. 3-28 und 3-32). Eine genauere Auflösung ergab für diesen Bereich drei distinkte Banden von 56, 75 bzw. 106 kDa (Abb. 3-32). Da das reife AtISA-Protein ein Molekulargewicht von 14 kDa besitzt; könnte es sich bei dem 56 kDa-Komplex um Tetramere und bei dem 106 kDa-Komplex um Oktamere handeln. Auch für andere IscA/ISA-Proteine aus Pro- und Eukaryonten wurden bereits dimere, tetramere und multimer Aggregationen beschrieben (Ollagnier-de-Choudens et al., 2001; Wu et al., 2002; Ollagnier-de-Choudens et al., 2003, Wollenberg et al., 2003). Die Aufklärung der Kristallstruktur des IscA-Proteins aus *E. coli* zeigte, daß Tetramer-Module eine leiterartige IscA-Superhelix aufbauen (Bilder et al., 2004).

Der 75 kDa AtISA-haltige Komplex, der im nativen Gel beobachtet wurde, könnte entweder aus sechs AtISA-Untereinheiten bestehen, was allerdings einem Molekulargewicht von 84 kDa entsprechen würde, oder auf der Interaktion von AtISA mit anderen Proteinen beruhen. So wurde für das IscA2-Protein in *Synechocystis* ein interagierendes Protein von 30 kDa identifiziert (*slr1098*), daß eine Stabilisierung des [2Fe-2S]-Zentrums bewirkt (Morimoto et al., 2002; Morimoto et al., 2003). Durch biochemische und genetische Ansätze wurde für *E. coli* das Chaperon HscA als IscA-Interaktionspartner nachgewiesen (Tokumoto et al., 2002). Diese Beispiele zeigen, daß auch für AtISA die Möglichkeit besteht, mit anderen Proteinen zu interagieren. So könnte der ca. 450 kDa-Komplex, der ebenfalls durch importiertes AtISA markiert wurde (Abb. 3-28), auf die Interaktion mit anderen Proteinkomplexen zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Interaktion von AtISA mit den eisenspeichernden Ferritinkomplexen. Da für IscA/ISA-Proteine die Fähigkeit zur Eisenbindung gezeigt wurde (Morimoto et al., 2002; Ding & Clark 2004; Ding et al., 2004), mag eine solche Interaktion der entscheidende Schritt zur Bereitstellung der Eisenionen für die Fe/S-Cluster-Biosynthese zu sein.

4.6 Die Expression von Rieske-KR_{HA} und Rieske-KK_{HA} in *A. thaliana*

Das Rieske-KK-Protein

Die ausgedehnte Suche nach Rieske-Interaktionspartnern erfolgte mit Hilfe des Rieske-KK_{HA}-Proteins, das in *Arabidopsis thaliana* exprimiert wurde. Durch die Punktmutation im Transportsignal, die die authentische KR-Sequenz in ein Zwillingsslysins (KK) überführte, kommt es für dieses Substrat zur Blockierung des Δ pH/Tat-abhängigen Thylakoidtransports (Abb. 3-36 und 3-37) und damit auch *in vivo* zur Anreicherung des Proteins im Stroma. Die strikte Abhängigkeit des Thylakoidtransports vom Zwillingssarginin-Motiv (im Fall des Rieske-Proteins in Form der KR-Sequenz) wurde sowohl für diverse plastidäre als auch bakterielle Δ pH/Tat-Substrate gezeigt (Chaddock et al., 1995; Gross et al., 1999; Halbig et al., 1999; Stanley et al., 2000; Buchanan et al., 2001; DeLisa et al., 2002; Brüser et al., 2003, Faury et al., 2004). Die Blockierung des Thylakoidtransports für das KK-Derivat unterstützt die Einordnung des Rieske-Proteins als Δ pH/Tat-Substrat (Molik et al., 2001). Im Gegensatz zu dem hier beobachteten Verhalten, zeigten die Arbeiten von Finazzi et al. (2003), die mit *Chlamydomonas reinhardtii* durchgeführt wurden, einen deutlichen Thylakoidtransport für das vergleichbare Rieske-KK-Protein (etwa 30 % der KR-Wildtyp-Transportrate).

Daß die Punktmutation im Rieske-Protein vermutlich nicht die Interaktion mit Stromakomponenten verändert, konnte aus den identischen Bandenmustern für die KR- und KK-Proteine im nativen Gel gefolgert werden (Abb. 3-36 B). Deshalb sollte das stromaakkumulierende KK-Derivat des Rieske-Proteins für die Suche nach Interaktionspartnern, die aufgrund der Banden im nativen Gel vermutet wurden, gut geeignet sein.

Der Einfluß des HA-Peptids

Die in *A. thaliana* synthetisierten Rieske-Proteine waren mit einem HA-tag ausgestattet. Der Vergleich der HA-markierten bzw. unmarkierten Form des Rieske-KR-Proteins unter *in vitro*-Bedingungen zeigte einen deutlichen Einfluß des C-terminal angefügten HA-Peptids auf das Transport- und Assemblierungsverhalten des Proteins (Abb. 3-37 und 3-38). So war die Thylakoidtransportrate und folglich auch die Assemblierung in den

Cytochrom b_6/f -Komplex des Rieske-KR_{HA}-Proteins im Vergleich zum authentischen Rieske-KR-Protein stark herabgesetzt (Abb. 3-37). Auch die Interaktion der frisch importierten Proteine mit stromalen Komponenten wurde bei beiden Versionen (KR und RR) durch das HA-Peptid beeinflusst (Abb. 3-38). Somit scheint zumindest unter *in vitro*-Bedingungen das HA-Peptid das Transport- und Assemblierungsverhalten des Rieske-Proteins negativ zu beeinflussen. Wie stark der HA-Einfluß *in vivo* ist, kann nur schwer abgeschätzt werden. Zumindest konnte trotz HA-Peptid eine deutliche Integration des Rieske-KR_{HA}-Proteins in den Cytochrom b_6/f -Komplex von *A. thaliana* detektiert werden (Abb. 3-46 und 3-47).

Rieske-KK_{HA} assoziiert mit der Thylakoidmembran

Das in *A. thaliana* synthetisierte Rieske-KK_{HA}-Protein zeigte unerwarteterweise eine mehr oder weniger starke Assoziation mit der Thylakoidmembran (Abb. 3-39, 3-42 bis 3-44), die unter *in vitro*-Bedingungen kaum beobachtet wurde (Abb. 3-36 bis 3-38). Eine genauere Analyse dieser membranständigen Proteinmenge mit Hilfe von Proteasen sowie alkalischen und salzhaltigen Lösungen zeigte, daß sich die luminaire Domäne proteasesensitiv auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran befand und nicht über die Membran transportiert wurde. Somit läßt sich für das in *A. thaliana* synthetisierte Rieske-KK_{HA}-Protein eine umgekehrte Topologie im Vergleich zum authentischen Protein vermuten, d.h. der N-terminale Membrananker integriert vermutlich aufgrund seiner starken Hydrophobizität spontan in die Thylakoidmembran und da es nicht zur Translokation der luminalen Domäne kommt, bleibt diese auf der stromalen Seite der Membran.

Daß es nicht zur Interaktion des Rieske-KK_{HA}-Proteins mit Proteinkomplexen der Thylakoidmembran kommt, läßt sich aus den Ergebnissen der *Blue native*-PAGE bzw. der *Western*-Analysen schließen (Abb. 3-44 bis 3-47). So konnte zwar für das Rieske-KR_{HA}-Protein die Assemblierung in den Cytochrom b_6/f -Komplex von *A. thaliana* gezeigt werden, für das Rieske-KK_{HA}-Protein war dies jedoch nicht möglich (Abb. 3-44). Dagegen zeigten Finazzi et al. (2003), daß unter *in vivo*-Bedingungen auch eine Assemblierung des Rieske-KK-Proteins in den Cytochrom b_6/f -Komplex von *Chlamydomonas reinhardtii* möglich ist (ca. 30 % der Rieske-KR-Assemblierungsrate; bestimmt durch Cytochrom *f*-Reduktion). Das Rieske-KK-Protein wurde durch Antikörper in denaturierten Thylakoidfraktionen nachgewiesen, jedoch nicht durch eine Co-Migration mit dem Cytochrom b_6/f -Komplex unter nativen Bedingungen (Finazzi et al., 2003). Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit war es ebenfalls möglich, das Rieske-KK_{HA}-Protein *in vivo* (*A. thaliana*) in der Thylakoidmembran nachzuweisen, jedoch konnte weder eine Integration in den Cytochrom b₆/f-Komplex noch eine Translokation über die Membran belegt werden.

Die Reinigung des Rieske-KK_{HA}-Proteins zusammen mit der Rubisco-Aktivase

Daß es auch *in vivo* zu Interaktionen des Rieske-KK_{HA}-Proteins mit Stromakomponenten kommt, wurde durch die native gelelektrophoretische Auftrennung der löslichen Fraktion und die daraus resultierenden HA-spezifischen *Western*-Signale deutlich (Abb. 3-49). Das Muster der *in vivo*-Komplexe wich allerdings vom zuvor erhaltenen *in vitro*-Muster ab (Abb. 3-38 A und 3-49). Jedoch bestand die Möglichkeit, die für die *in vivo*-Komplexe verantwortlichen Interaktionspartner zu identifizieren.

Die Affinitätsreinigung des im Stroma akkumulierten Rieske-KK_{HA}-Proteins aus dem löslichen Extrakt von *A. thaliana*-Expressionspflanzen über eine HA-Affinitätssäule konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abb. 3-51 und 3-52). Dabei zeigte sich, daß die Elution des Antikörper-gebundenen Proteins durch die Zugabe einer kompetierenden Menge des HA-Peptids fast nicht möglich war, dagegen die Elution mit 0,2 M Glycin pH 2,0 zum Erfolg führte. Neben dem reifen Rieske-KK_{HA}-Protein wurden im *Western blot* auch die ca. 16 kDa-Degradationsprodukte detektiert, die auf einen gewissen *in vivo*-Abbauprozess des Proteins hindeuten. Die Behandlung der löslichen Fraktion mit Trypsin machte allerdings deutlich, daß sich das im Stroma befindliche Rieske-KK_{HA}-Protein in einem kompakt gefalteten Zustand befindet. So konnte auch bei hohen Proteasekonzentration (40 µg/ml) eine stabile Domäne von 19 bzw. 15 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-50 A). Da offenbar nur die zwei N-terminalen Trypsin-Prozessierungsstellen genutzt wurden, kann man davon ausgehen, daß die Schnittstellen innerhalb der luminalen Domäne für die exogene Protease nur schwer zugänglich waren. Dies spricht für eine kompakte und somit gefaltete Struktur der C-terminalen Region.

Gleichzeitig mit dem Rieske-KK_{HA}-Protein konnten zwei weitere Proteine von ca. 45 kDa über die HA-Affinitätssäule gereinigt werden, die im Vergleich zum Wildtypextrakt nicht auftraten (Abb. 3-52 B). Die massenspektroskopische Analyse der kleineren, intensiveren Bande ergab, daß es sich hierbei um die Rubisco-Aktivase (RuA) handelt. Für die Rubisco-Aktivase-mRNA sind zwei Spleißformen bekannt, die in *Arabidopsis thaliana* zu zwei

Proteinen von 44 und 47 kDa führen (Werneke et al., 1989). Somit könnte es sich bei dem zweiten zusätzlich eluierten Protein, daß aufgrund der geringen Intensität der Bande nicht identifiziert werden konnte, um die 47 kDa-Form der Rubisco-Aktivase handeln. Allerdings stellt sich die Frage nach dem Bindungspartner dieser co-eluierten Proteine, da neben der spezifischen Bindung der HA-markierten Proteine an die Säulenmatrix, anscheinend auch eine unspezifische Bindung der Rubisco erfolgte (durch *Western blot* im Eluat nachgewiesen; Daten nicht gezeigt). Somit ist nicht ausgeschlossen, daß die Reinigung der Rubisco-Aktivase auf eine Bindung an den Rubisco-Komplex zurückzuführen ist. Allerdings konnte im analog erstellten Wildtypextrakt die als Rubisco-Aktivase identifizierte Doppelbande nicht detektiert werden (Abb. 3-52 B). Somit besteht die Möglichkeit, daß die Rubisco-Aktivase durch die Bindung an das Rieske-KK_{HA}-Protein über die HA-Affinitätssäule gereinigt wurde, obwohl die Rubisco als Kontamination im Eluat vorhanden war. Die Rubisco-Aktivase gilt zwar als typischer Rubisco-Interaktionspartner, ihre Funktion scheint aber mehr der eines Chaperons zu entsprechen (Sanchez de Jimenez et al., 1995). Aus diesem Grund wird sie auch zur AAA-Familie (*ATPases associated with a variety of cellular activities*) Chaperon-artiger Proteine gezählt (Neuwald et al., 1999). Somit könnte die bislang auf die Rubisco beschränkte Substratspezifität der Rubisco-Aktivase möglicherweise auf andere Proteine, wie z.B. das Rieske-Protein, erweitert werden.

Da allerdings die Co-Immunpräzipitation des Rieske-Proteins mit Hilfe von RuA-spezifischen Antikörpern zu keinem positiven Ergebnis führte, bleibt die Frage nach der Rieske-RuA-Interaktion vorerst offen.

4.7 Das zusammenfassende Modell

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen sich zu dem in Abb. 4-2 dargestellten Modell zum Ablauf des Rieske-Transport- und Assemblierungsprozesses zusammenfassen. Zunächst erfolgt der Transitpeptid-abhängige Organellimport über die generellen Translokasekomplexe der Chloroplastenhülle (Toc/Tic; Abb. 4-2, Schritt 1). Unmittelbar nach Eintritt in den Chloroplasten kommt es zur Bindung an den Cpn60-Komplex und damit zur Faltung der luminalen Rieske-Domäne. Während dieser Bindung wird das stromadirigierende Transitpeptid proteolytisch durch die Stromaprozessierungspeptidase (SPP) entfernt (Schritt 2). Ob die Rubisco-Aktivase (RuA) eine Rolle beim Transportprozess des Rieske-Proteins spielt, ist noch nicht endgültig geklärt. Die Prozesse

zum Einbau des Fe/S-Zentrums sind ebenfalls noch weitgehend spekulativ. Der Nachweis von stromalokalisierten Komponenten der Fe/S-Assemblierungsmaschinerie lassen die Beteiligung der plastidären NFS-, NFU- und/oder ISA-Proteine möglich erscheinen (Schritt 3). Aber es ist auch nicht ausgeschlossen, daß eine völlig eigenständige, noch nicht bekannte Fe/S-Assemblierungsmaschinerie die Rolle im Chloroplasten übernimmt. Neben Interaktionen zur Fe/S-Assemblierungsmaschinerie ist auch die Bindung von Δ pH/Tat-Transportsignal-spezifischen Proteinen denkbar (Schritt 3), wie es bereits für einzelne bakterielle Tat-Substrate gezeigt wurde (Oresnik et al., 2001; Jack et al., 2004). Die Δ pH/Tat-Translokase vermittelt dann den Transfer des gefalteten, Cofaktor-tragenden Rieske-Proteins über die Thylakoidmembran (Schritt 4). Anschließend ist eine laterale Verschiebung des Proteins erforderlich (Schritt 5). Als letzter Schritt erfolgt die Assemblierung des Rieske-Proteins in den Cytochrom b_6/f -Komplex, der daraufhin dimerisieren kann (Schritt 6).

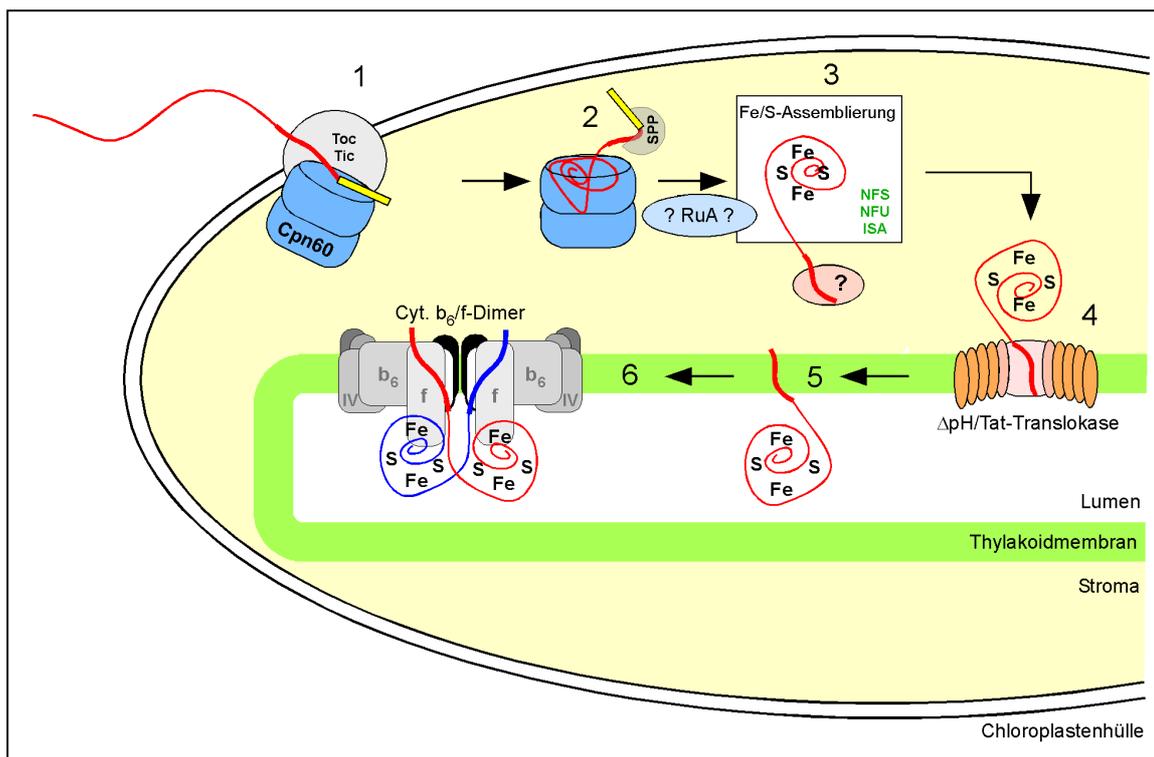


Abb. 4-2 Modell zum Transport und zur Assemblierung des plastidären Rieske Fe/S-Proteins. Einzelheiten im Text.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Transportprozessen des plastidären Rieske Fe/S-Proteins, vom Eintritt in den Chloroplasten bis zum endgültigen Wirkort im Cytochrom b_6/f -Komplex der Thylakoidmembran.

Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war das Transportverhalten des Rieske-Proteins nach dem Import in isolierte Chloroplasten, das durch einen verzögerten Thylakoidtransport verbunden mit einer Akkumulation im Stroma gekennzeichnet ist. Dagegen ließ sich unter *in vivo*-Bedingungen diese auffällige Transportverzögerung nicht beobachten, wie durch die Immundetektion des Rieske-Proteins in unterschiedlichen Pflanzenspezies gezeigt werden konnte.

Das Rieske-Protein wird auf dem $\Delta pH/Tat$ -Weg über die Thylakoidmembran transloziert, besitzt allerdings ein dafür untypisches Transportsignal, in dem das charakteristische Zwillingarginin (RR) durch ein Lysin-Arginin (KR) repräsentiert wird. Darüber hinaus übt das Thylakoidtransportsignal die Funktion eines Membranankers aus. Durch die Verwendung von chimären bzw. mutierten Proteinen war zu erkennen, daß der Membrananker als fragmentarisches $\Delta pH/Tat$ -Signal nicht ausschlaggebend für die Retardierung des Rieske-Proteins im Stroma ist. Einen stärkeren Einfluß auf die Transportverzögerung schien dagegen der hydrophile Teil des Rieske-Proteins, die luminal Domäne, zu haben. So war die Translokation der luminalen Rieske-Domäne nur in Abhängigkeit von einem $\Delta pH/Tat$ -spezifischen Signalpeptid möglich, Sec-Signale dagegen waren nicht in der Lage, die luminal Domäne zu translozieren. Diese Restriktion des Thylakoidtransports für das plastidäre Rieske-Protein ist vermutlich auf den gefalteten Zustand der luminalen Domäne zurückzuführen. Diese Hypothese wird durch die beobachtete Interaktion des Rieske-Proteins mit dem Chaperonkomplex Cpn60 unterstützt. Ob darüber hinaus eine Verbindung zwischen dem Rieske-Protein und der Rubisco-Aktivase, die ebenfalls eine Chaperonfunktion ausübt, besteht, ist noch nicht endgültig geklärt. Zumindest wurde die Rubisco-Aktivase gleichzeitig mit dem in *Arabidopsis thaliana* exprimierten und im Stroma akkumulierenden Rieske-KK_{HA}-Protein über eine HA-Affinitätssäule gereinigt. Eine Verifizierung dieses Ergebnisses steht allerdings noch aus.

Neben der Faltung des Rieske-Proteins wurde auch der Einbau des [2Fe-2S]-Zentrums näher untersucht. Durch das Transportverhalten der Fe/S-Ligandenmutanten wurde deutlich, daß die Insertion des Cofaktors Voraussetzung für den Δ pH/Tat-abhängigen Thylakoidtransport des Rieske-Proteins ist und somit im Stroma erfolgen muß. Aus diesem Grund sollten die am Cofaktor-Einbau beteiligten Proteine identifiziert und auf eine Interaktion mit dem Rieske-Protein hin getestet werden. Die Suche nach potentiellen Komponenten der plastidären Fe/S-Assemblierungsmaschinerie in *Arabidopsis thaliana* ergab drei NFU-Homologe und jeweils ein NFS- bzw. ISA- Homologes. Diese Proteine sind im Stroma der Chloroplasten lokalisiert und liegen dort z.T. in Form von Proteinkomplexen vor. Eine Beteiligung dieser potentiellen Assemblierungsproteine am Einbau des Rieske-Cofaktors konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Damit bleibt vorerst offen, ob im Fall des Rieske-Proteins die hier identifizierten Komponenten an der Fe/S-Assemblierung beteiligt sind oder ob bislang noch unbekannte Proteine diese Rolle übernehmen.

Zusammenfassend läßt sich aus der Arbeit schließen, daß das plastidäre Rieske-Protein nach Organellimport im Stroma unter der Beteiligung von Cpn60 gefaltet und vermutlich auch mit dem [2Fe-2S]-Zentrum ausgestattet wird. Diese Prozesse verzögern zwar den Transportvorgang, sind aber Voraussetzung für den anschließenden Δ pH/Tat-abhängigen Thylakoidtransport des Proteins.

6 Literatur

- Agar, J.N., Krebs, C., Frazzon, J., Huynh, B.H., Dean, D.R., Johnson, M.K. (2000) IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry*, 39, 7856-62.
- Akita, M., Shinkai, A., Matsuyama, S., Mizushima, S. (1991) SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochem Biophys Res Commun.*, 174, 211-6.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 215, 403-10.
- Annweiler, A., Hipkind, R.A., Wirth, T. (1991) A strategy for efficient in vitro translation of cDNA using the rabbit β -globin leader sequence. *Nucleic Acid Research*, 19, 3750.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Arnon, D.J. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.*, 24, 1-15.
- Barraclough, R., Ellis, R.J. (1980) Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.*, 608, 19-31.
- Bassham, D.C., Bartling, D., Mould, R.M., Dunbar, B., Weisbeck, P., Herrmann, R.G., Robinson, C., (1991) Transport of proteins into chloroplasts: delineation of envelope „transit“ and thylakoid „transfer“ signals within the presequences of three imported thylakoid lumen proteins. *J. Biol. Chem.*, 266, 23606-10.
- Bechthold, N Ellis, J, Pelletier, G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 316, 1194-9.
- Bellafore, S., Ferris, P., Naver, H., Gohre, V., Rochaix, J.D. (2002) Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell.*, 14, 2303-14.
- Benach, J., Chou, Y.T., Fak, J.J., Itkin, A., Nicolae, D.D., Smith, P.C., Wittrock, G., Floyd, D.L., Golsaz, C.M., Gierasch, L.M., Hunt, J.F. (2003) Phospholipid-induced monomerization and signal-peptide-induced oligomerization of SecA. *J Biol Chem.*, 278, 3628-38.
- Bendtsen, J.O., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340, 783-795.
- Berghöfer, J., Karnachov, I., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. (1995) Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecA protein from spinach chloroplasts: evidence for azide-resistance of Sec-dependent protein translocation across thylakoid membranes of spinach. *J. Biol. Chem.*, 270, 18341-6.
- Berghöfer, J. and Klösgen, R.B. (1996) Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecY protein from spinach chloroplasts (Accession No. Z54351). *Plant Physiol.*, 112, 863 (PGR 96-090).
- Berghöfer, J. (1998) Charakterisierung von Komponenten der plastidären Proteintransport-maschinerie. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Berghöfer, J. and Klösgen, R.B. (1999) Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Δ pH) pathway across the thylakoid membrane. *FEBS Lett.*, 460, 328-32.
- Berks, B.C. (1996) A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.*, 22, 393-404.

- Berks, B.C. (2000)** The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.* 35, 260-74.
- Bessonneau, P., Besson, V., Collinson, I., Duong, F. (2002)** The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J.*, 21, 995-1003.
- Bilder, P.W., Ding, H., Newcomer, M.E. (2004)** Crystal structure of the ancient, Fe-S scaffold IscA reveals a novel protein fold. *Biochemistry*, 43, 133-9.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513-24.
- Bogsch, E.G., Brink, S., Robinson, C. (1997)** Pathway specificity for a Δ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a „Sec-avoidance“ motif in the transfer peptide and a „Sec-incompatible“ mature protein, *EMBO J.*, 16, 3851-9.
- Bogsch, E.G., Sargent, F., Stenlay, N.R., Berks, B.C., Robinson, C., Palmer, T. (1998)** An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 273, 18003-6.
- Bolle, C., Herrmann, R.G., Oelmüller, R. (1996)** Intron sequences are involved in the plastid- and light-dependent expression of the spinach *PsaD* gene. *Plant J.*, 10, 919-24.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. (1996)** Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol Biol.*, 32, 191-222.
- Bradford MM. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Breyton, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J.P., Popot, J.L. (1997)** Dimer to monomer conversion of the cytochrome b6 f complex. Causes and consequences. *J Biol Chem.*, 272, 21892-900.
- Breyton, C., Haase, W., Rapoport, T.A., Kuhlbrandt, W., Collinson, I. (2002)** Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature*, 418, 662-5.
- Brink, S., Bogsch, E.G., Edwards, W.R., Hynds, P.J., Robinson, C. (1998)** Targeting of thylakoid proteins by the delta pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjugation with the twin-arginine motif. *FEBS Lett.*, 434, 425-30.
- Brock, J.W., Mills, J.D., Robinson, D., Robinson, C. (1995)** The delta pH-driven, ATP-independent protein translocation mechanism in the chloroplast thylakoid membrane. Kinetics and energetics. *J Biol Chem.*, 270, 1657-62.
- Brüser, T., Yano, T., Brune, D.C., Daldal, F. (2003)** Membrane targeting of a folded and cofactor-containing protein. *Eur J Biochem.*, 270, 1211-21.
- Buchanan, G., Sargent, F., Berks, B.C., Palmer, T. (2001)** A genetic screen for suppressors of *Escherichia coli* Tat signal peptide mutations establishes a critical role for the second arginine within the twin-arginine motif. *Arch Microbiol.*, 177, 107-12.
- Carrell, C.J., Zhang, H., Cramer, W.A., Smith, J.L. (1997)** Biological identity and diversity in photosynthesis and respiration: structure of the lumen-side domain of the chloroplast Rieske protein. *Structure*, 5, 1613-25.
- Castresana, J., Lubben, M., Saraste, M. (1995)** New archaeobacterial genes coding for redox proteins: implications for the evolution of aerobic metabolism. *J Mol Biol.*, 250, 202-10.
- Chaddock, A.M., Mant, A., Karnauchoy, 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 (pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J.*, 14, 2715-22.
- Clark, S.A. and Theg, S.M. (1997)** A folded protein can be transported across chloroplast envelope and thylakoid membranes *Molec. Biol. Cell*, 8, 923-34.

- Clausmeyer, S. (1992)** Import, Sortierung, Assemblierung von kernkodierten Proteinen des Chloroplasten. Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Clausmeyer, S., Klösgen, R.B., Herrmann, R.G. (1993)** Protein import into chloroplasts: the hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *J. Biol. Chem.*, 268, 13869-76.
- Cline, K., Ettinger, W.F., Theg, S.M. (1992)** Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.*, 267, 2688-96.
- Cline, K., Mori, H. (2001)** Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol.*, 154, 719-29.
- Collinson, I., Breyton, C., Duong, F., Tziatzios, C., Schubert, D., Or, E., Rapoport, T., Kuhlbrandt, W. (2001)** Projection structure and oligomeric properties of a bacterial core protein translocase. *EMBO J.*, 20, 2462-71.
- Cramer, W.A., Soriano, G.M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H, Martinez, S.E., Smith, J.L. (1996)** SOME NEW STRUCTURAL ASPECTS AND OLD CONTROVERSIES CONCERNING THE CYTOCHROME b6f COMPLEX OF OXYGENIC PHOTOSYNTHESIS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 477-508.
- Creighton, A.M., Hulford, A., Mant, A., Robinson, D., Robinson, C. (1995)** A monomeric, tightly folded stromal intermediate on the Δ pH-dependent thylakoidal protein transport pathway. *J. Biol. Chem.*, 270, 1663-1669.
- Cupp-Vickery, J.R., Silberg, J.J., Ta, D.T., Vickery, L.E. (2004)** Crystal structure of IscA, an iron-sulfur cluster assembly protein from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.*, 338, 127-37.
- Dalbey, R.E., Robinson, C. (1999)** Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci.*, 24, 17-22.
- Dalbey, R.E., Chen, M. (2004)** Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta.*, 694, 37-53.
- deVitry, C. (1994)** Characterisation of the gene of the chloroplast Rieske-iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*: indications for an uncleaved lumen targeting sequenz. *J. Biol. Chem.* 269, 7603-9.
- Dean, D.R., Bolin, J.T., Zheng, L. (1993)** Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J Bacteriol.*, 175, 6737-44.
- DeLille, J., Peterson, E.C., Johnson, T., Moore, M., Henry, R. (2000)** A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1926-31.
- DeLisa, M.P., Samuelson, P., Palmer, T., Georgiou, G. (2002)** Genetic analysis of the twin arginine translocator secretion pathway in bacteria. *J Biol Chem.*, 277, 29825-31.
- DeLisa, M.P., Tullman, D., Georgiou, G. (2003)** Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100, 6115-20.
- Ding, H., Clark, R.J. (2004)** Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem J.*, 379, 433-40.
- Ding, H., Clark, R.J., Ding, B. (2004)** IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions. *J Biol Chem.*, 279, 37499-504.
- Doyle, S.M., Braswell, E.H., Teschke, C.M. (2000)** SecA folds via a dimeric intermediate. *Biochemistry*, 39, 11667-76.

- Dreusch, A., Burgisser, D.M., Heizmann, C.W., Zumft, W.G. (1997)** Lack of copper insertion into unprocessed cytoplasmic nitrous oxide reductase generated by an R20D substitution in the arginine consensus motif of the signal peptide. *Biochim Biophys Acta.*, 1319, 311-8.
- Duong, F. (2003)** Binding, activation and dissociation of the dimeric SecA ATPase at the dimeric SecYEG translocase. *EMBO J.*, 22, 4375-84.
- Eggermont, K., Goderis, I.J., Broekaert, W.F. (1996)** High-throuput RNA extretion from plant samples based on homogenisation by reciprocal shaking in the presence of a mixture of sand and glas beads. *Plant*
- Einsle, O., Tezcan, F.A., Andrade, S.L., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J.B., Rees, D.C. (2002)** Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor. *Science*, 297, 1696-700.
- El-Demerdash, M., Salnikow, J., Vater, J. (1988)** Evidence for a cytochrome f-Rieske protein subcomplex in the cytochrome b6f system from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys.*, 260, 408-15.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G. (1999)** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, 8, 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. (2000)** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, 300, 1005-1016.
- Evans, D.J., Jones, R., Woodley, P.R., Wilborn, J.R., Robson, R.L. (1991)** Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum* nifUSVWZM gene cluster, including a new gene (nifP) which encodes a serine acetyltransferase. *J Bacteriol.*, 173, 5457-69.
- Faury, D., Saidane, S., Li, H., Morosoli, R. (2004)** Secretion of active xylanase C from *Streptomyces lividans* is exclusively mediated by the Tat protein export system. *Biochim Biophys Acta.*, 699, 155-62.
- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., Phillips, G.J. (2000)** Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 182, 4068-76.
- Finazzi, G., Chasen, C., Wollman, F.A., de Vitry, C. (2003)** Thylakoid targeting of Tat passenger proteins shows no delta pH dependence in vivo. *EMBO J.*, 22, 807-15.
- Flint, D.H. (1996)** *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the nifS gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J Biol Chem.*, 271, 16068-74.
- Franklin, S.E. and Hoffman, N.E. (1993)** Charcterisation of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J. Biol. Chem.* 268, 22175-80.
- Frazzon, J., Fick, J.R., Dean, D.R. (2002)** Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem Soc Trans.*, 30, 680-5.
- Frazzon, J., Dean, D.R. (2003)** Formation of iron-sulfur clusters in bacteria: an emerging field in bioinorganic chemistry. *Curr Opin Chem Biol.*, 7, 166-73.
- 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.
- Garland, S.A., Hoff, K., Vickery, .LE., Culotta, V.C. (1999)** *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J Mol Biol.*, 294, 897-907.
- Goloubinoff, P., Christeller, J.T., Gatenby, A.A., Lorimer, G.H. (1989)** Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphat carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342, 884-9.

- Graan, T., Ort, D.R. (1986)** Quantitation of 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone binding sites in chloroplast membranes: evidence for a functional dimer of the cytochrome b6f complex. *Arch Biochem Biophys.*, 248, 445-51.
- Graham, L.A., Trumpower, B.L. (1991)** Mutational analysis of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein of *Saccharomyces cerevisiae*. III. Import, protease processing, and assembly into the cytochrome bc1 complex of iron-sulfur protein lacking the iron-sulfur cluster. *Biol Chem.*, 266, 22485-92.
- Gross, R., Simon, J., Kroger, A. (1999)** The role of the twin-arginine motif in the signal peptide encoded by the *hydA* gene of the hydrogenase from *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol.*, 172, 227-32.
- Groves, M.R., Mant, A., Kuhn, A., Koch, J., Dubel, S., Robinson, C., Sinning, I. (2001)** Functional characterization of recombinant chloroplast signal recognition particle. *J Biol Chem.*, 276, 27778-86.
- Gutierrez-Cirlos, E.B., Merbitz-Zahradnik, T., Trumpower, B.L. (2002)** Failure to insert the iron-sulfur cluster into the Rieske iron-sulfur protein impairs both center N and center P of the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem.*, 277, 50703-9.
- Guy, C.L., Li, Q.B. (1998)** The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. *Plant Cell.*, 10, 539-56
- Hageman, J., Robinson, C., Smekens, S., Weisbeek, P. (1986)** A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature* 324, 567-9.
- Halbig, D., Wiegert, T., Blaudeck, N., Freudl, R., Sprenger, G.A. (1999)** The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem.*, 263, 543-51.
- Hanahan, D. (1983)** Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-80.
- Hancock, K.R., Phillips, L.D., White, D.W., Ealing, P.M. (1997)** pPE1000: a versatile vector for the expression of epitope-tagged foreign proteins in transgenic plants. *Biotechniques.*, 22, 861-2, 865.
- Hatzixanthis, K., Palmer, T., Sargent, F. (2003)** A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Mol Microbiol.*, 49, 1377-90.
- Haward, S.R., Napier, J.A., Gray, J.C. (1997)** Chloroplast SecA functions as a membrane-associated component of the Sec-like protein translocase of pea chloroplasts. *Eur J Biochem.*, 248, 724-30.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., Mullineaux, P.M. (2000)** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol.*, 42, 819-32.
- Hemmingsen, S.M., Ellis, R.J. (1986)** Purification and properties of ribulosebiphosphate carboxylase large subunit binding protein. *Plant Physiol.*, 80, 269-76.
- Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. (1988)** Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-4.
- Henry, R., Kapazoglou, A., McCaffery, M., Cline, K. (1994)** Differences between lumen targeting domains of chloroplast transit peptides determine pathway specificity for thylakoid transport. *J. Biol. Chem.* 269, 10189-92.
- Henry, R., Carrigan, M., McCaffery, M., Ma, X., Cline, K. (1997)** Targeting determinants and proposed evolutionary basis for the Sec and the delta pH protein transport systems in chloroplast thylakoid membranes. *J. Cell Biol.* 136, 823-32.

- High, S., Henry, R., Mould, R.M., Valent, Q., Meacock, S., Cline, K., Gray, J.C., Luirink, J. (1997)** Chloroplast SRP54 interacts with a specific subset of thylakoid precursor proteins. *J Biol Chem.*, 272, 11622-8.
- Hinsley, A.P., Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B.C. (2001)** A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the 'invariant' arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett.*, 497, 45-9.
- Hoffman, N.E., Franklin, A.E. (1994)** Evidence for a stromal GTP requirement for the integration of a chlorophyll a/b-binding polypeptide into thylakoid membranes. *Plant Physiol.*, 105, 295-304.
- Huang, D., Everly, R.M., Cheng, R.H., Heymann, J.B., Schagger, H., Sled, V., Ohnishi, T., Baker, T.S., Cramer, W.A. (1994)** Characterization of the chloroplast cytochrome b6f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry*, 33, 4401-9.
- 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, 3251-6.
- Hwang, D.M., Dempsey, A., Tan, K.T., Liew, C.C. (1996)** A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution. *J Mol Evol.*, 43, 536-40.
- Hynds, P.J., Plucken, H., Westhoff, P., Robinson, C. (2000)** Different lumen-targeting pathways for nuclear-encoded versus cyanobacterial/plastid-encoded Hcf136 proteins. *FEBS Lett.*, 467 97-100.
- 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, 34868-74.
- Ignatova, Z., Hornle, C., Nurk, A., Kasche, V. (2002)** Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *Escherichia coli* to the Tat translocation machinery. 291, 146-9.
- Ivey, R.A. 3rd, Subramanian, C., Bruce, B.D. (2000)** Identification of a Hsp70 recognition domain within the rubisco small subunit transit peptide. *Plant Physiol.*, 122, 1289-99.
- Iwata, S., Saynovits, M., Link, T.A., Michel, H. (1996)** Structure of a water soluble fragment of the 'Rieske' iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution. *Structure*, 4, 567-79.
- Jack, R.L., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T., Sargent, F. (2004)** Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J.*, 23, 3962-72.
- Jacobson, M.R., Brigle, K.E., Bennett, L.T., Setterquist, R.A., Wilson, M.S., Cash, V.L., Beynon, J., Newton, W.E., Dean, D.R. (1989 a)** Physical and genetic map of the major nif gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol.*, 171, 1017-27.
- Jacobson, M.R., Cash, V.L., Weiss, M.C., Laird, N.F., Newton, W.E., Dean, D.R. (1989 b)** Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet.*, 219, 49-57.
- Jarvis, P., Soll, J. (2002)** Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta.*, 1590, 177-89.
- Jaschkowitz, K., Seidler, A. (2000)** Role of NifS-like protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 in the maturation of FeS proteins. *Biochem.* 39, 3416-23.
- Jensen, L.T., Culotta, V.C. (2000)** Role of *Saccharomyces cerevisiae* ISA1 and ISA2 in iron homeostasis. *Mol Cell Biol.*, 20, 3918-27.
- Kaiser, J.T., Clausen, T., Bourenkow, G.P., Bartunik, H.D., Steinbacher, S., Huber, R. (2000)** Crystal structure of a NifS-like protein from *Thermotoga maritima*: implications for iron sulphur cluster assembly. *J Mol Biol.*, 297, 451-64.

- Kapazoglou, A., Sagliarioco, F., Dure, L. (1995)** PSII-T, a new nuclear encoded luminal protein from photosystem II. Targeting and processing in isolated chloroplasts. *J Biol Chem.*, 270, 12197-202.
- Kapazoglou, A., Mould, R.D., Gray, J.C. (2000)** Assembly of the Rieske-iron-sulphur protein into the cytochrom *b₆f* complex in thylakoid membranes of isolated *pea* chloroplast. *Eur. J. Biochem.* 267, 352-360.
- Karnauchov, I., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. (1997)** Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrom *b₆f* complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 408, 206-10
- Karnauchov, I. (1998)** Mechanisms of intrachloroplast sorting of integral thylakoid membrane protein. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (2000)** Gene cloning, purification, and characterization of two cyanobacterial NifS homologs driving iron-sulfur cluster formation. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 64, 2412-9.
- Kaut, A., Lange, H., Diekert, K., Kispal, G., Lill, R. (2000)** Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *J Biol Chem.*, 275, 15955-61.
- Keegstra, K. Cline, K. (1999)** Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant J.* 11, 557-70.
- Kennedy, C., Dean, D. (1992)** The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Gen Genet.*, 231, 494-8.
- Kessler, F., Blobel, G. (1996)** Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93, 7684-9.
- Kim, R., Saxena, S., Gordon, D.M., Pain, D., Dancis, A. (2001)** J-domain protein, Jac1p, of yeast mitochondria required for iron homeostasis and activity of Fe-S cluster proteins. *J Biol Chem.*, 276, 17524-32.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., Robinson, C. (1987)** Transport of proteins into chloroplasts: partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *J. Biol. Chem.* 262, 16386-16390.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., Williams, R.S., Robinson, C. (1988)** Transport of proteins into chloroplasts: organization, orientation, and lateral distribution of the plastocyanin processing peptidase in the thylakoid network. *J. Biol. Chem.* 263, 18128-32.
- Klösgen, R.B., Brock, I.W., Herrmann, R.G., Robinson, C. (1992)** Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol.*, 18, 1031-4.
- Klösgen, R.B. (1997)** Protein transport into and across the thylakoid membrane. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38, 1-9.
- 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*. 368, 777-81.
- Knight, J.S., Duckett, C.M., Sullivan, J.A., Walker, A.R., Gray, J.C. (2002)** Tissue-specific, light-regulated and plastid-regulated expression of the single-copy nuclear gene encoding the chloroplast Rieske FeS protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 43, 522-31.
- Knott, T.G., Robinson, C. (1994)** The SecA inhibitor, azide reversely blocks the translocation of a subset of proteins across the chloroplast thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 269, 7843-6.
- Kogata, N., Nishio, K., Hirohashi, T., Kikuchi, S., Nakai, N. (1999)** Involvement of a chloroplast homologue of a signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting of thylakoids. *FEBS Lett.* 447, 329-33.

- Koncz, C., Schell, J. (1986)** The promotor of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. & Gen. Genet.*, 204, 383-96.
- Krebs, C., Agar, J.N., Smith, A.D., Frazzon, J., Dean, D.R., Huynh, B.H., Johnson, M.K. (2001)** *IscA*, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *Biochemistry*, 40, 14069-80.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., Dalbey, R.E. (2003)** The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.*, 13, 510-6.
- Kurisu, .G, Zhang, H., Smithm J.L., Cramer, W.A. (2003)** Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 302, 1009-14.
- Lacour, T., Achstetter, T., Dumas, B. (1998)** Characterization of recombinant adrenodoxin reductase homologue (Arh1p) from yeast. Implication in in vitro cytochrome p45011beta monooxygenase system. *J Biol Chem.*, 273, 23984-92.
- Laemmli, U. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- Laidler, V., Chaddock, A.M., Knott, T.G., Walker, D., Robinson, C. (1995)** A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. *J Biol Chem.*, 270, 17664-7.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., Lill, R. (2000)** A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97, 1050-5.
- Leister, D. (2003)** Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet*, 19, 47-56.
- Léon, S. Touraine, B., Briat, J.F., Lobreaux, S. (2002)** The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem J.*, 366, 557-64.
- Léon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J.F., Lobreaux, S. (2003)** Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU-Proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J.*, 371, 823-30.
- Levy-Rimler, G., Bell, R.E., Ben-Tal, N., Azem, A. (2002)** Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Lett.*, 259, 1-5.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J.G., Cline, K., Hoffman, N.E. (1995)** A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational interaction of a protein into thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3789-3793.
- Lill, R., Kispal, G. (2000)** Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci.*, 25, 352-6.
- Lubben, T.H., Donaldson, GK, Viitanen, P.V., Gatenby, A.A. (1989)** Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone. *Plant Cell.*, 1, 1223-30.
- Lübberstedt, T., Bolle, C.E., Sopory, S., Flieger, K., Herrmann, R.G., Oelmüller, R. (1994)** Promoters from genes for plastid proteins possess regions with different sensitivities toward red and blue light. *Plant Physiol.*, 104, 997-1006.
- Luirink, J., High, S., Wood, H., Giner, A., Tollervey, D., Dobberstein, B. (1992)** Signal-sequence recognition by an *Escherichia coli* ribonucleoprotein complex. *Nature*, 359, 741-3.
- Lutz, T., Westermann, B., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2001)** The mitochondrial proteins Ssq1 and Jac1 are required for the assembly of iron sulfur clusters in mitochondria. *J Mol Biol.*, 307, 815-25.
- Madueno, F., Napier, J.A., Cejudo, F.J., Gray, J.C. (1992)** Import and processing of the precursor of the Rieske FeS protein of tobacco chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 20, 289-9.

- Madueno, F., Napier, J.A., Gray, C. (1993)** Newly imported Rieske iron-sulfur protein associates with both cpn 60 and hsp70 in the chloroplast stroma. *Plant Cell* 5, 1865-76.
- Madueno, F., Bradshaw, S.A., Gray, J.C. (1994)** The thylakoid-targeting domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein is located in the N-terminal hydrophobic region of the mature protein. *J. Biol. Chem.* 269, 17458-63.
- Mant, A., Kieselbach, T., Schroder, W.P., Robinson, C. (1999)** Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel thylakoid lumen protein imported by the delta pH-dependent pathway. *Planta.*, 20, 7624-7.
- 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, nucleoside triphosphates, or functional albino3. *J Biol Chem.*, 276, 36200-6.
- Manting, E.H., van Der Does, C., Remigy, H., Engel, A., Driessen, A.J. (2000)** SecYEG assembles into a tetramer to form the active protein translocation channel. *EMBO J.*, 19, 852-61.
- Manzella, L., Barros, M.H., Nobrega, F.G. (1998)** ARH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast*, 14, 839-46.
- Marques, J.P., Dudeck, I., Klösgen R.B. (2003)** Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts. *Mol Genet Genomics.*, 269, 381-7.
- 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, 1697-706.
- 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, 1633-9.
- Mason, J.R., Cammack, R. (1992)** The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol.*, 46, 277-305.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J.B., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B., (1994)** Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoII is imported by a novel, third pathway. *EMBO J.* 13, 1310-17.
- Miernyk, J.A. (1999)** Protein folding in the plant cell. *Plant Physiol.*, 121, 695-703.
- Milos, P., Roy, H. (1984)** ATP-released large subunits participate in the assembly of RuBP carboxylase. *J Cell Biochem.*, 24, 153-62.
- Molik, S. (2000)** Thylakoidtransport und Assemblierung des plastidären Rieske Fe/S-Proteins. Diplomarbeit der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., Klossgen, R.B. (2001)** The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem.*, 276, 42761-6.
- 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, 1529-32.
- Mori, H., Cline, K. (1998)** A signal peptide that directs non-Sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid delta pH pathway. *J. Biol. Chem.* 273, 11405-8.
- Mori, H., Summer, E.J., Cline, K. (1999)** Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J. Cell Biol.* 146(1), 45-56.

- Mori, H., Cline, K. (2001)** Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and DeltapH-dependent pathways. *Biochim Biophys Acta.*, 1541, 80-90.
- Mori, H., Summer, E.J., Cline, K. (2001)** Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Lett.*, 501, 65-8.
- 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, 205-10.
- Morimoto, K., Nishio, K., Nakai, M. (2002)** Identification of a novel prokaryotic HEAT-repeats-containing protein which interacts with a cyanobacterial IscA homolog. *FEBS Lett.*, 519, 123-7.
- Morimoto, K., Sato, S., Tabata, S., Nakai, M. (2003)** A HEAT-repeats containing protein, IaiH, stabilizes the iron-sulfur cluster bound to the cyanobacterial IscA homologue, IscA2. *J Biochem (Tokyo)*, 134, 211-7.
- Motohashi, R., Nagata, N., Ito, T., Takahashi, S., Hobo, T., Yoshida, S., Shinozaki, K. (2001)** An essential role of a TatC homologue of a Delta pH- dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98, 10499-504.
- Mould, R.M., Robinson, C. (1991)** A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 12189-93.
- Mould, R.M., Shackleton, J.B., Robinson, C. (1991)** Protein transport into chloroplasts: requirement for the efficient import of two luminal oxygen-evolving complex proteins into isolated thylakoids. *J. Biol. Chem.* 266, 17268-90.
- Mühlenhoff, U., Lill, R. (2000)** Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1459, 370-82.
- Mühlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K., Kispal, G., Lill, R. (2004)** Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 279, 36906-15.
- Musgrove, J.E., Johnson, R.A., Ellis, R.J. (1987)** Dissociation of the ribulosebisphosphate-carboxylase large-subunit binding protein into dissimilar subunits. *Eur J Biochem.*, 163, 529-34.
- Nakai, M., Goto, A., Nohara, T., Sugita, D., Endo, T. (1994)** Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *J. Biol. Chem.*, 270, 31338-41.
- Neidle EL, Hartnett C, Ornston LN, Bairoch A, Rekik M, Harayama S. (1991)** Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* benABC genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases. *J Bacteriol.*, 173, 5385-95.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., Koonin, E.V. (1999)** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, 9, 27-43.
- Nielsen, V.S., Mant, A., Knoetzel, J., Lindberg Müller, B., Robinson, C. (1994)** Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate cleavage site: role of the delta pH in translocation across the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.*, 269, 3762-6.
- 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, 733-42.
- Nishio, K., Nakai, M. (2000)** Transfer of iron-sulfur cluster from NifU to apoferritin. *J Biol Chem.*, 275, 22615-8.

- Nohara, T., Nakai, M., Goto, A., Endo, T. (1995)** Isolation and characterization of the cDNA for pea chloroplast SecA. Evolutionary conservation of the bacterial-type SecA-dependent protein transport within chloroplasts. *FEBS Lett.*, 364, 305-8.
- Nohara, T., Asai, T., Nakai, M., Sugiura, M., Endo, T. (1996)** Cytochrome f encoded by the chloroplast genome is imported into thylakoids via the SecA-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*, 224, 474-8.
- Nuccio, M.L., Russell, B.L., Nolte, K.D., Rathinasabapathi, B., Gage, D.A., Hanson, A.D. (1998)** The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monoxygenase. *Plant J.*, 16, 487-96.
- Oliver, D.B., Cabelli, R.J., Dolan, K.M., Jarosik, G.P. (1990)** Azide-resistant mutants of *Escherichia coli* alter the SecA protein, an azide-sensitive component of the protein export machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8227-31.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Mattioli, T., Takahashi, Y., Fontecave, M. (2001)** Iron-sulfur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J Biol Chem.*, 276, 22604-7.
- Ollagnier-de Choudens, S., Nachin, L., Sanakis, Y., Loiseau, L., Barras, F., Fontecave, M. (2003)** SufA from *Erwinia chrysanthemi*. Characterization of a scaffold protein required for iron-sulfur cluster assembly. *J Biol Chem.*, 278, 17993-8001.
- Ollagnier-de-Choudens, S., Sanakis, Y., Fontecave, M. (2004)** SufA/IscA: reactivity studies of a class of scaffold proteins involved in [Fe-S] cluster assembly. *J Biol Inorg Chem.*, 9, 828-38.
- Or, E., Navon, A., Rapoport, T. (2004)** Dissociation of the dimeric SecA ATPase during protein translocation across the bacterial membrane. *EMBO J.*, 21, 4470-9.
- Oresnik, I.J., Ladner, C.L., Turner, R.J. (2001)** Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol.*, 40, 323-31.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W., Hartl, F.U. (1989)** Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature*, 341, 125-30.
- Palmer, T., Berks, B.C. (2003)** Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology*, 149, 547-56.
- Pelzer, W., Mühlenhoff, U., Diekert, K., Siegmund, K., Kispal, G., Lill, R. (2000)** Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Lett.*, 476, 134-9.
- Pilon-Smits, E.A., Garifullina, G.F., Abdel-Ghany, S., Kato, S., Mihara, H., Hale, K.L., Burkhead, J.L., Esaki, N., Kurihara, T., Pilon, M. (2002)** Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol.*, 130,):1309-18.
- Poggese, C., Polverino de Laureto, P., Giacometti, G.M., Rigoni, F., Barbato, R. (1997)** Cytochrome b₆/f complex from the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: evidence of dimeric organization and identification of chlorophyll-binding subunit. *FEBS Lett.*, 414, 585-9.
- Portis, A.R. Jr. (1990)** Rubisco activase. *Biochim Biophys Acta.*, 1015, 15-28.
- Pugsley, A.P. (1993)** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 57, 50-108.
- Rensink, W.A., Pilon, M., Weisbeck, P. (1998)** Domains of a transit sequence required for in vivo import in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiol.*, 118, 691-9.
- Rial, D.V., Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A. (2000)** Interaction of the targeting sequence of chloroplast precursors with Hsp70 molecular chaperones. *Eur J Biochem.*, 267, 6239-48.

- Riedel, A., Rutherford, A.W., Hauska, G., Müller, A., Nitschke, W. (1991)** Chloroplast Rieske Center. EPR study on its spectral characteristics, relaxation and orientation properties. *J Biol Chem.* 266, 17838-44
- Rieske, J.S., MacLennan, D.H., Coleman, R. (1964)** Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrom c reductase complex of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. research communications* 15, 338-44.
- Robinson, C., Ellis, R.J. (1984)** Transport of proteins into chloroplasts: Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 142, 337-42.
- Robinson, C., Cai, D., Hulford, A., Brock, I.W., Michl, D., Hazell, L., Schmidt, I., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. (1994)** The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilised for translocation across the thylakoid membrane: evidence for the existence of two translocation systems. *EMBO J.* 13, 279-85.
- Robinson, C. (2000)** The twin-arginine translocation system: a novel means of transporting folded proteins in chloroplast and bacteria. *Biol. Chem.* 381, 89-93.
- Robinson, C., Bolhuis, A. (2004)** Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.*, 694, 135-47.
- 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, 35465-72.
- Rothstein, S.J., Gatenby, A.A., Willey, D.L., Gray, J.C. (1985)** Binding of pea cytochrome f to the inner membrane of *Escherichia coli* requires the bacterial secA gene product. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 82, 7955-9.
- Roy, H., Hubbs, A., Cannon, S. (1988)** Stability and dissociation of the large subunit of Rubisco binding protein complex *in vitro* and *in organello*. *Plant Physiol.*, 86, 50-3.
- Roy, L.M., Barkan, A. (1998)** A SecY homologue is required for the the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gen expression. *J. Cell Biol.* 141, 385-95.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (1997)** Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.*, 16, 1501-7.
- Salter, A.H., Newman, B.J., Napier, J.A., Gray, J.C. (1992)** Import of the precursor of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein by pea chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 20, 569-74.
- Sambrook, J.Fritch, E.R., Maniatis, T., (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd Edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratories.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., Dalbey, R.E. (2000)** YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature*, 406, 637-41.
- Sanchez de Jimenez, E., Medrano, L., Martinez-Barajas, E. (1995)** Rubisco activase, a possible new member of the molecular chaperone family. *Biochemistry*, 34, 2826-31.
- Sargent, F., Berks, B.C., Palmer, T. (2002)** Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch Microbiol.*, 178, 77-84.
- Schäfer, G., Purschke, W., Schmidt, C.L. (1996)** On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol Rev*, 18, 173-88.
- Schägger, H., von Jagow, G. (1991)** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-31.

- Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. (1994)** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220-230.
- Schatz, G., Dobberstein, B. (1996)** Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-26.
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., Craig, E. (1999)** Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96, 10206-11.
- 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, 12177-82.
- Schünemann, D., Gupta, S., Persello-Cartiaux, 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, 10312-6.
- Scott, S.V., Theg, S.M. (1996)** A new chloroplast protein import intermediate reveals distinct translocation machineries in the two envelope membranes: energetics and mechanistic implications. *J Cell Biol.*, 132, 63-75.
- Seidler, A., Jaschkowitz, K., Wollenberg, M. (2001)** Incorporation of iron-sulphur clusters in membrane-bound proteins. *Biochem Soc Trans.*, 29, 418-21.
- Settles, A.M., Martienssen, R. (1998)** Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Trends Cell Biol.*, 8, 494-501.
- Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., Martienssen, R. (1997)** Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* 278, 1467-70.
- Shackleton, J.B., Robinson, C. (1991)** Transport of proteins into chloroplasts. The thylakoidal processing peptidase is a signal-type peptidase with stringent substrate requirements at the -3 and -1 positions. *J. Biol. Chem.* 266, 12152-6.
- Shilton, B., Svergun, D.I., Volkov, V.V., Koch, M.H., Cusack, S., Economou, A. (1998)** Escherichia coli SecA shape and dimensions. *FEBS Lett.*, 436, 277-82.
- Sommer, A., Newman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., Harel, E. (1994)** Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, 105, 1301-11.
- Stanley, N.R., Palmer, T., Berks, B.C. (2000)** The twin arginine consensus motif of the Tat signal peptides is involved in the Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 11591-6.
- Steppuhn, J., Rother, C., Hermans, J., Jansen, T., Salnikow, J., Hauska, G., Herrmann, R.G. (1987)** The complete amino-acid sequence of the Rieske FeS-precursor protein from spinach chloroplasts deduced from cDNA analysis. *Mol. Gen. Genet.* 210, 171-7.
- Strain, J., Lorenz, C.R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G.A., Ta, D.T., Vickery, L.E., Culotta, V.C. (1998)** Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, 273, 31138-44.
- Summer, E.J., Cline, K. (1999)** Red bell pepper chromoplasts exhibit in vitro import competency and membrane targeting of passenger proteins from the thylakoidal sec and DeltapH pathways but not the chloroplast signal recognition particle pathway. *Plant Physiol.*, 119, 575-84.
- Summer, E.J., Mori, H., Settles, A.M., Cline, K. (2000)** The thylakoid Delta pH pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein integration. *J. Biol. Chem.* 275, 23483-90.
- Suzuki, S., Izumihara, K., Hase, T. (1991)** Plastid import and iron-sulfur cluster assembly of photosynthetic ferredoxin isoproteins in maize. *Plant Physiol.*, 97, 375-80.

- Takahashi, Y., Mitsui, A., Hase, T., Matsubara, H. (1986)** Formation of the iron-sulfur cluster of ferredoxin in isolated chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 83, 2434-7.
- Takahashi, Y., Mitsui, A., Matsubara, H. (1990 a)** Formation of the Fe-S Cluster of Ferredoxin in lysed spinach chloroplasts. *Plant Physiol.*, 95, 97-103.
- Takahashi, Y., Mitsui, A., Fujita, Y., Matsubara, H. (1990 b)** Roles of ATP and NADPH in formation of Fe-S clusters of spinach ferredoxin. *Plant Physiol.*, 95, 104-10
- Thomas, J.D., Daniel, R.A., Errington, J., Robinson, C. (2001)** Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.*, 39, 47-53.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80.
- Tokumoto, U., Nomura, S., Minami, Y., Mihara, H., Kato, S., Kurihara, T., Esaki, N., Kanazawa, H., Matsubara, H., Takahashi, Y. (2002)** Network of protein-protein interactions among iron-sulfur cluster assembly proteins in *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, 131, 713-9.
- Tong, W.H., Jameson, G.N., Huynh, B.H., Rouault, T.A. (2003)** Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100, 9762-7.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.H. (1987)** A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.*, 15, 5890.
- Touraine, B., Boutin, J.P., Marion-Poll, A., Briat J.F., Peltier, G., Lobreaux, S. (2004)** Nfu2: a scaffold protein required for [4Fe-4S] and ferredoxin iron-sulphur cluster assembly in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant J.*, 40, 101-11.
- Trumpower, B.L., Gennis, R.B.(1994)** Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation *Annu Rev Biochem*,63, 675-716.
- Tsugeki, R., Nishimura, M. (1993)** Interaction of homologues of Hsp70 and Cpn60 with ferredoxin-NADP+ reductase upon its import into chloroplasts. *FEBS Lett.*, 320, 198-202.
- van den Berg, B., Clemons, W.M. Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., Rapoport, T.A. (2004)** X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, 427, 36-44.
- van der Wolk, J.P., de Wit, J.G., Driessen, A.J. (1997)** The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J.*, 16, 7297-304.
- Vargas, C., McEwan, A.G., Downie, J.A. (1993)** Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem.*, 209, 323-6.
- Voelker, R. and Barkan, A. (1995)** Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J.*, 14, 3905-14.
- Voelker, R., Mendel-Hartvig, J., Barkan, A. (1997)** Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *tha1*, encoding a chloroplast SecA homolog: in vivo role of cp-SecA in thylakoid protein targeting. *Genetics*, 145, 467-78.
- von Heijne, G. (1985)** Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.*, 184, 99-105.
- von Heijne, G., Steppuhn, J., Herrmann, R.G. (1989)** Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.*, 180, 535-545.
- Walker, M.B., Roy, L.M., Coleman, E., Voelker, R., Barkan, A. (1999)** The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*. *J. Cell Biol.*, 147, 267-76.

- Walter, P., Johnson, A.E. (1994)** Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 10, 87-119.
- Wang, H., Goffreda, M., Leustek, T. (1993)** Characteristics of an Hsp70 homolog localized in higher plant chloroplasts that is similar to DnaK, the Hsp70 of prokaryotes. *Plant Physiol.*, 102, 843-50.
- Weidlich, C. (1998)** Charakterisierung des Thylakoidtransportsignals des Rieske-Fe/S-Proteins. Diplomarbeit der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Werneke, J.M., Chatfield, J.M., Ogren, W.L. (1989)** Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, 1, 815-25.
- White, T.J., Arnheim, N., Erlich, H.A. (1989)** The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5, 185-189.
- Whitelegge, J.P., Zhang, H., Aguilera, R., Taylor, R.M., Cramer, W.A. (2002)** Full subunit coverage liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LCMS+) of an oligomeric membrane protein: cytochrome b(6)f complex from spinach and the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Mol Cell Proteomics.*, 1, 816-27.
- Wollenberg, M., Berndtm C, Bill, E., Schwenn, J.D., Seidler, A. (2003)** A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins. *Eur J Biochem.*, 270, 1662-71.
- Woodbury, R.L., Hardy, S.J., Randall, L.L. (2002)** Complex behavior in solution of homodimeric SecA. *Protein Sci.*, 11, 875-82.
- Woolhead, C.A., Thompson, S.J., Moore, M., Tissier, 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, 40841-6.
- Wu, G., Mansy, S.S., Hemann, C., Hille, R., Surerus, K.K., Cowan, J.A. (2002)** Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Isa1. *J Biol Inorg Chem.*, 7, 526-32.
- Yabe, T., Morimoto, K., Kikuchi, S., Nishio, K., Terashima, I., Nakai, M. (2004)** The Arabidopsis chloroplastic NifU-like protein CnfU, which can act as an iron-sulfur cluster scaffold protein, is required for biogenesis of ferredoxin and photosystem I. *Plant Cell.*, 16, 993-1007.
- Yahr, T.L., Wickner, W.T. (2000)** Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. 19, 4393-401.
- Yuan, J. and Cline, K. (1994)** Plastocyanin and the 33 kDa subunit of the oxygen-evolving complex are transported into thylakoids with similar requirements as predicted from pathway specificity. *J. Biol. Chem.* 269, 18463-7.
- Yuan, J., Henry, R., McCaffery, M., Cline, K. (1994)** SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science* 266, 796-8.
- Zhang, H., Carrell, C.J., Huang, D., Sled, V., Ohnishi, T., Smith, J.L., Cramer, W.A. (1996)** Characterization and crystallization of the lumen side domain of the chloroplast Rieske iron-sulfur protein. *J Biol Chem*, 271, 31360-6.
- Zhang, X.P., Elofsson, A., Andreu, D., Glaser, E. (1999)** Interaction of mitochondrial presequences with DnaK and mitochondrial hsp70. *J Mol Biol.*, 288, 177-90.
- Zhang, L., Aro, E.M. (2002)** Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Lett.*, 512, 13-8.
- Zhang, L., Paakkarienen, V., Suorsa, M., Aro, E.M. (2001)** A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem.*, 76, 37809-14.

-
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F., Dean, D.R. (1993)** Cystein desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2754-8.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Dean, D.R. (1994)** Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry.*, 33, 4714-20.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H., Dean, D.R. (1998)** Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273, 13246-72.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, daß ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale),

Sabine Molik

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe an einem so faszinierenden wie auch manchmal frustrierenden Protein (gemeint ist das plastidäre Rieske Fe/S-Protein) zu forschen und die Erkenntnisse dieser Arbeit bis zu einer Dissertation gedeihen zu lassen. Auch wenn die Zeit für Betreuung und Diskussion manchmal eng bemessen war, war es doch eine angenehmes Arbeiten und eine schöne Zeit zwischen Spinat und Retikulocytenlysat.

Bei Dr. Andreas Seidler und Dr. Markus Wollenberg möchte ich mich für die Gastfreundschaft in Bochum sowie die Möglichkeit, etwas über Fe/S-Assemblierung in *Synechocystis* zu lernen, bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen: bei Frau Rose für die vielen Mini-Gele, so manche Lösung im Notfall, die gesteckten Spitzen und die vielen anderen hilfreichen Dinge; bei Frau Kuhnert für die zuverlässigen Bestellaktionen und bei Birgit für die unterhaltsamen Mittagspausen im Kaffeeraum.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Platzer, für die Anzucht und Pflege der Gemüse- (Spinat und Erbse) und *Arabidopsis*-Pflanzen sowie für seine Ausdauer beim Umgang mit der recht eigenwilligen Spinat-Klimakammer (Programm 99).

Dr. Mario Jakob möchte ich danken, daß er mich dazu motiviert hat, ein in Vergessenheit geratenes Experiment zu beenden und so die Diskussion über die Rubisco-Aktivase am Leben zu erhalten.

Für die Kurzweil im Labor möchte ich mich bei Stefan und Manu bedanken. Für die Unterhaltung am Schreibtisch beim Auswerten von Experimenten, Laborbuchschreiben oder Teetrinken geht mein herzlicher Dank an Bianca. Ich danke Peter für die Problemlösungen rund um den Computer.

Für die Unterstützung am Entstehen dieses Schriftwerkes gilt mein Dank Dr. Mario Jakob für die Korrektur der ersten Version sowie Manu und Mandy für die Versuche, den Tippfehlerteufel zu vertreiben.

Mein besonderer Dank geht an Dr. João Pedro Palma Santos Marques für die kompetenten *Agrobacterien*, das breite Unterhaltungsprogramm von superlustig bis „ich bin gelangweilt“ und für alles, was ich von ihm gelernt habe.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klösgen sei für das angenehme Arbeitsklimas gedankt. Ich danke Mandy für ihre Freundschaft.

Ein lieber Dank geht an Martin, für seine Freundschaft und was darüber hinaus geht.

Publikationsliste

Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., Klösgen, R.B. (2001) The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b₆/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J Biol Chem.*, 276, 42761-6.

Klösgen R.B., Molik, S., Frielingsdorf, S., Gutensohn, M., Jakob, M., Marques, J., Hou, B. (2004) Protein transport across the thylakoid membrane. *Endocytobiosis Cell Res.*, 15, 518-26.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Namen: Sabine Molik
Wohnort: 06114 Halle (Saale)
Straße: Windthorststr. 15
Geburtstag/ -ort: 19. August 1976/ Halberstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

Sep. 1983 – Juli 1991 POS „Herman-Matern“, Osterwieck
Sep. 1991 – Aug. 1995 Fallstein-Gymnasium, Osterwieck
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung und Tätigkeit

Okt. 1995 - Okt. 2000 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Abschluß: Diplom-Biologin
Thema der Diplomarbeit: „Thylakoidtransport und Assemblierung des plastidären Rieske Fe/S-Proteins“
Nov. 2000 – Dez. 2001 wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie, Institut für Pflanzenphysiologie
April 2002 – April 2005 Doktorandin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biologie, Institut für Pflanzenphysiologie

Sabine Molik

