

**Funktionelle Charakterisierung minorer Komponenten des plastidären
Kompartiments und ihre Bedeutung für thylakoidale
Signaltransduktionsprozesse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von
Petra Weber
aus Mainz-Mombach
10.04.2001

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. G. Herrmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2001

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
1. Einleitung	9
1.1 Die dynamische Struktur der Thylakoidmembran	9
1.2 Koordination von Kurz- und Langzeitadaptationen des Photosyntheseapparates durch reversible Proteinphosphorylierungen	11
1.3 Regulation des Phosphorylierungszustandes von Thylakoidmembranproteinen	13
1.4 Elemente pflanzlicher Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme	17
1.5 Funktionelle Rolle von Proteinen mit Tetratricopeptid-"repeat"-Motiv	20
1.6 Immunophilin-sensitive Enzymaktivitäten in der zellulären Signaltransduktion	22
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme	25
2.1.2 Längen- und Molekulargewichtsstandards	25
2.1.3 Bakterienstämme und Phagen	25
2.1.4 Vektoren	26
2.1.5 Plasmide	26
2.1.6 BAC-Filter zur physikalischen Kartierung	26
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide	26
2.1.8 Antiseren	28
2.1.9 Puffer und Lösungen	28
2.1.10 Medien für die Anzucht von Bakterien	29
2.1.11 Pflanzenmaterial	29
2.1.12 Cyanobakterienstämme und Anzuchtmedien	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	30
2.2.2 Methoden zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	31
2.2.2.1 Isolierung von gesamtgenomischer DNS aus Pflanzen	31
2.2.2.2 Isolierung von Plastiden-DNS aus Spinatchloroplasten	31
2.2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNS aus Pflanzengewebe	32
2.2.2.4 Radioaktive Markierung von DNS durch "random priming"	32
2.2.2.5 Radioaktive Markierung von RNS	33
2.2.2.6 Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen	34
2.2.2.6.1 "Southern"-Transfer von DNS	34
2.2.2.6.2 "Northern"-Transfer von RNS	35
2.2.2.7 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Nukleinsäurefragmenten	35

2.2.3	Analyse von <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	36
2.2.3.1	Anzuchtbedingungen	36
2.2.3.2	Bestimmung der Pigmentkonzentration und Extinktionseigenschaften	36
2.2.3.3	Extraktion von Gesamtmembranen	36
2.2.3.4	Isolierung von gesamtgenomischer DNS	37
2.2.3.5	Isolierung von Gesamt-RNS und Herstellung von cDNS durch reverse Transkription	37
2.2.3.6	Untersuchung des <i>in vivo</i> -Translationsmusters durch "pulse/chase"-Markierung	39
2.2.4	Herstellung transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	39
2.2.4.1	Herstellung von T-DNS-Konstruktionen für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i> L.	39
2.2.4.2	Herstellung und Transformation kompetenter Agrobakterien	40
2.2.4.3	Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i> L.	40
2.2.4.4	Selektion und Analyse transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	41
2.2.5	Methoden zur Isolierung und Analyse von Proteinen	42
2.2.5.1	Gesamtproteinextrakte aus Pflanzengewebe	42
2.2.5.2	Isolierung von Thylakoidmembranen aus intakten Plastiden	42
2.2.5.3	Isolierung von AMS-Fraktionen mit Kinaseaktivität	43
2.2.5.4	Aufreinigung von Proteinkomplexen aus Thylakoidmembranen	44
2.2.5.4.1	Auftrennung supramolekularer Proteinkomplexe partiell solubilisierter Thylakoidmembranen	44
2.2.5.4.2	Aufreinigung von PSI, ATP-Synthase und Cytochrom <i>b/f</i> -Komplex	45
2.2.5.4.3	Isolierung von PSII-LHCII-Superkomplexen	47
2.2.5.5	Präparation von PSII-Partikeln (BBY-Membranen)	48
2.2.5.6	Subfraktionierung von Thylakoidmembranen mittels "phase-partition"	49
2.2.5.7	Bestimmung der Topographie von Thylakoidmembranproteinen	50
2.2.5.8	Präparation lumenaler Proteine	51
2.2.5.9	Import von Proteinen in intakte Spinatchloroplasten	51
2.2.5.9.1	Transkription und Translation <i>in vitro</i>	51
2.2.5.9.2	<i>In organello</i> -Import	53
2.2.5.10	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von Proteinen	55
2.2.5.10.1	Phosphorylierung isolierter Thylakoidmembranen und AMS-Fraktionen	55
2.2.5.10.2	Nachweis kinaseaktiver Polypeptide	55
2.2.5.10.3	Identifizierung von "response regulator"-Proteinen	57
2.2.5.11	<i>In vitro</i> -Bindestudien	58
2.2.5.11.1	"South-Western"-Analyse von Protein-DNS-Interaktionen	58
2.2.5.11.2	Ca ²⁺ - "mobility-shift" zum Nachweis Calcium-bindender Proteine	59
2.2.5.12	Expression rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i>	60

2.2.5.12.1	Expressionssysteme	60
2.2.5.12.2	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	60
2.2.5.12.3	Aufreinigung rekombinanter Proteine	60
2.2.5.12.3.1	Aufreinigung unter nativen Bedingungen	60
2.2.5.12.3.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie an Sepharose-4B	61
2.2.5.12.3.3	Aufreinigung von "His-tag"-Proteinen durch Nickel-Affinitätschromatographie	62
2.2.5.12.3.4	Aufreinigung der rekombinanten Sensor kinase EnvZ aus <i>E. coli</i>	62
2.2.5.13	Gewinnung polyklonaler Antikörper in Kaninchen	63
2.2.5.13.1	Herstellung von Antigenen für die Immunisierung	63
2.2.5.13.2	Immunisierung und Bluten von Kaninchen	63
2.2.5.14	Immunologischer Nachweis von Proteinen	64
2.2.5.14.1	"Western"-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen nach Towbin et al. (1979)	64
2.2.5.14.2	Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen	64
2.2.5.15	Proteingelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)	65
2.2.5.16	Anfärben von Proteingelen	66
2.2.5.17	Fluorographie und "phosphorimaging" von Proteingelen	67
2.2.5.18	Aufreinigung und Konzentrierung von Proteinen für die Mikrosequenzierung	67
2.2.5.19	Computergestützte Sequenzanalysen	68
3.	Ergebnisse	69
3.1	Untersuchungen zur Identifizierung kinaseaktiver Komponenten in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten	69
3.1.1	Nachweis kinaseaktiver Polypeptide in der subthylakoidalen AMS-Fraktion	70
3.1.2	Charakterisierung der 64 kDa-Komponente AMS6	72
3.1.2.1	Trennung von AMS6 und Polyphenoloxidase (62 kDa) in hochauflösenden Gelsystemen	72
3.1.2.2	AMS6 als integrale Komponente der Thylakoidmembranen von Spinatchloroplasten	73
3.1.2.3	Subthylakoidale Lokalisation von AMS6	74
3.1.2.4	Korrelation zwischen AMS6 und der redoxkontrollierten Aktivität der potentiellen LHCII-Kinase	77
3.1.3	Analyse der 58 kDa-Komponente AMS9	78
3.1.3.1	AMS9 als periphere Komponente der Thylakoidmembranen von Spinatchloroplasten	79
3.1.3.2	Subthylakoidale Lokalisation von AMS9	80

3.1.3.3	Biochemische Charakterisierung der Histidinkinase-Mutante Δ slr0311 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	82
3.1.3.4	Untersuchung der posttranslationalen Prozessierung der rekombinanten Histidinkinase slr0311 in <i>E. coli</i>	87
3.2	Funktionelle Charakterisierung des kernkodierten Polypeptids TTP30	88
3.2.1	<i>In organello</i> -Import des <i>in vitro</i> -Translationsproduktes in intakte Spinatchloroplasten	90
3.2.2	Ermittlung der Genkopienzahl für TTP30 im Genom höherer Pflanzen	93
3.2.3	Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen das rekombinante Vorläuferprotein	96
3.2.4	Analyse der potentiellen Kinaseaktivität des rekombinanten Vorläuferproteins	99
3.2.5	Untersuchung der Bispezifität des Antikörpers gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311	101
3.2.6	Analyse der potentiellen "response regulator"-Eigenschaften von TTP30	102
3.2.7	"South-Western"-Analyse der potentiellen DNS-bindenden Eigenschaften von TTP30	105
3.2.8	Untersuchung der Ca^{2+} -bindenden Eigenschaften von TTP30	108
3.2.9	Herstellung von T-DNS-Konstruktionen für die Agrobakterienvermittelte Transformation von <i>A. thaliana</i> L.	109
3.2.10	"Southern"- und "Northern"-Analyse transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	110
3.3	Charakterisierung der regulatorischen Rolle des komplexen Immunophilins TLP40 im Lumen von Thylakoidmembranen	112
3.3.1	Einfluß von Azid und Nigericin auf die Translokation des <i>in vitro</i> -Translationsproduktes in das Lumen von Thylakoidmembranen	114
3.3.2	Assoziation von TLP40 mit dem Cytochrom <i>b/f</i> -Komplex	116
3.3.3	Untersuchung der reversiblen Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran	118
3.3.3.1	Herstellung rekombinanter Domänen- und Punktmutanten zur Identifizierung essentieller Interaktionsbereiche von TLP40	118
3.3.3.2	Überexpression und Aufreinigung der mutierten Polypeptide	121
3.3.3.3	Etablierung eines wässrigen Zwei-Phasen-Polymersystems zur Durchführung von <i>in vitro</i> -Bindestudien	122
3.3.4	Einfluß von TLP40 auf die Aktivität der membranintegralen Proteinphosphatase	124
3.3.4.1	Subthylakoidale Lokalisation der membranintegralen Proteinphosphatase vom Typ 2A	124
3.3.4.2	Einfluß von Cyclosporin A und Peptiden mit Peptidyl-prolylbindungen auf die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine	125
3.3.4.3	Einführung einer Punktmutation zur Erhöhung der Sensitivität von TLP40 gegenüber Cyclosporin A	127
3.3.5	Herstellung von T-DNS-Konstruktionen für die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts für TLP40 in <i>A. thaliana</i> L.	129

3.3.6	Biochemische Charakterisierung der Rotamase mutante Δ sl10408 in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	131
3.3.6.1	Phänotypische Merkmale von Δ sl10408 unter Niedriglichtbedingungen	132
3.3.6.2	Untersuchung der Degradation der Phycobilisomen unter Stickstoffmangelbedingungen	133
3.3.6.3	Untersuchung der Transkription der Phycobiliproteine Allophycocyanin und Phycocyanin	134
3.3.6.4	Analyse des <i>in vivo</i> -Translationsmusters unter Niedriglichtbedingungen	134
3.3.6.5	Einfluß von Lichtstreß und niedrigen Umgebungstemperaturen auf den Phänotyp von Δ sl10408	136
4.	Diskussion	138
4.1	Multiple Kinaseaktivitäten in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten	139
4.1.1	AMS6 als integraler Bestandteil der Granalamellen	140
4.1.2	AMS9 als periphere Komponente von Stromathylakoidmembranen	141
4.2	Bedeutung der kernkodierte Polypeptide TTP30 und TLP40 für die Modulation der thylakoidalen Dynamik	145
4.2.1	Analyse der funktionellen Rolle von TTP30 im plastidären Kompartiment	145
4.2.2	Regulatorische Funktion des komplexen Immunophilins TLP40 in der thylakoidalen Signaltransduktion	154
4.3	Ausblick	158
5.	Zusammenfassung	160
6.	Literaturverzeichnis	163
7.	Publikationen	180
	Danksagung	181
	Lebenslauf	182

AbkürzungenAllgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Enzyme

<i>A. thaliana</i> L.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Linné
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AMS	Ammoniumsulfat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	"bacterial artificial chromosome"
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CHAPS	[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonsäure
CsA	Cyclosporin A
CsCl	Cäsiumchlorid
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,3-Dithiothreit
E	Enzymeinheit
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
GST	Glutathionsulfotransferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HM	Homogenisierungsmedium
Hsp	"heat shock protein"
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NBT	Nitroblau-tetrazolium-chlorid
NTA	Nitrilessigsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	"plastid encoded RNA-polymerase"
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIase	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> -Isomerase (Rotamase)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. oleracea</i> L.	<i>Spinacia oleracea</i> Linné
SW	"swing out"
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]glycin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

Basen, Nukleotide und Nukleinsäuren

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymin
U	Uracil
rNTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat (ATP, CTP, GTP, UTP)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	"copy"-DNS, DNS-Kopie der RNS
RNS	Ribonukleinsäure
T-DNS	Tumor-DNS aus dem tumorinduzierenden (Ti-)Plasmid von <i>A. tumefaciens</i>

Aminosäuren

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

Maßeinheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
Ci	Curie
Da	Dalton
g	Gramm
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampère
μE	Mikroeinsteinstunde
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
UpM	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Gene

<i>atpB</i>	Gen für die β -Untereinheit der ATP-Synthase
<i>cab</i>	Gene für die Chlorophyll <i>a/b</i> -bindenden Apoproteine des LHCII
<i>ndhF</i>	Gen für die ND5-Untereinheit der NADH-Dehydrogenase
<i>ndhD</i>	Gen für die ND4-Untereinheit der NADH-Dehydrogenase
<i>petA</i>	Gen für Cytochrom <i>f</i> des Cytochrom <i>b/f</i> -Komplexes
<i>petD</i>	Gen für Untereinheit IV des Cytochrom <i>b/f</i> -Komplexes
<i>psaA</i>	Gen für die PSI-A-Untereinheit des PSI-Reaktionszentrums
<i>psaC</i>	Gen für die PSI-C-Untereinheit des PSI-Reaktionszentrums
<i>psbA</i>	Gen für das D1-Protein des PSII-Reaktionszentrums
<i>psbB</i>	Gen für das CP47-Protein des PSII-Antennenkomplexes
<i>psbC</i>	Gen für das CP43-Protein des PSII-Reaktionszentrums
<i>psbD</i>	Gen für das D2-Protein des PSII-Reaktionszentrums
<i>rbcl</i>	Gen für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase

Proteine und Proteinkomplexe

C	Carboxyterminus eines Proteins
N	Aminoterminal eines Proteins
CP29	29 kDa-Apoprotein des PSII-Antennenkomplexes
CP43	43 kDa-Apoprotein des PSII-Reaktionszentrums
Cyt <i>b/f</i>	Cytochrom <i>b/f</i> -Holokomplex
D1	34 kDa-Apoprotein des Photosystem II-Reaktionszentrums
D2	32 kDa-Apoprotein des Photosystem II-Reaktionszentrums
LHCII	Antennenkomplex des Photosystem II
PC	Plastocyanin
PP2A	Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A
PPO	Diphenol:O ₂ Oxidoreduktase
PQ	Plastoquinon
PQH ₂	Plastoquinol (Plastohydrochinon)
PSI	Photosystem I-Holokomplex
PSII	Photosystem II-Holokomplex
Rieske	Rieske Eisen-Schwefel Protein des Cytochrom <i>b/f</i> -Komplexes

Proteinmotive

TPR	Tetratricopeptid-"repeat"-Motiv
LZip	Leucin-"zipper"-Motiv
HLH	"helix-loop-helix"-Motiv

1. Einleitung

Die Photosynthese ist von fundamentaler Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Lebens auf der Erde. Dieser hoch regulierte biochemische Prozeß stellt einen der licht- und temperaturempfindlichsten Vorgänge in Pflanzen und Cyanobakterien dar (Berry und Björkman, 1980; Weis und Berry, 1988; Havaux und Tardy, 1996). Pflanzen sind an ihrem natürlichen Standort Veränderungen der Lichtintensität und -qualität ausgesetzt. Diese können ein Ungleichgewicht in der Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen PSI und PSII in der Thylakoidmembran verursachen und dadurch zur Verminderung der photosynthetischen Effizienz führen. Neben der Photoinaktivierung des photosynthetischen Elektronentransportes kann die Sonnenenergie auch eine Schädigung des Photosyntheseapparates hervorrufen (Prasil et al., 1992; Aro et al., 1993; Sonoike et al., 1995). Pflanzen haben daher eine Reihe von Schutz- und Anpassungsmechanismen entwickelt, um die Folgen einer Beeinträchtigung der Photosyntheseleistung unter widrigen Umweltbedingungen zu minimieren. Die molekularen Einzelheiten der pflanzlichen Signaltransduktionswege, auf denen derartige Anpassungen basieren, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Offenbar spielen auch die Thylakoidmembranen selbst in diesem Zusammenhang eine wesentliche Rolle.

1.1 Die dynamische Struktur der Thylakoidmembran

Die Thylakoidmembran des Chloroplasten katalysiert die photosynthetische Energiekonversion, bei der Lichtenergie über elektrische in chemische Metaboliten umgewandelt wird. Ihr dualer genetischer Ursprung (Herrmann, 1997) und die lateral heterogene Verteilung der Photosynthesekomplexe stellen charakteristische Merkmale dieser spezialisierten biologischen Membran dar (Abb. 1). Die strukturelle Organisation der photosynthetischen Membran höherer Pflanzen in gestapelte und ungestapelte Bereiche spiegelt ihre funktionelle Differenzierung wider. Mit Ausnahme des Cytochrom *b/f*-Komplexes sind die Proteinkomplexe PSII, PSI, ATP-Synthase sowie LHCI lateral heterogen verteilt (Andersson und Anderson, 1980). Die laterale Heterogenität ist kein statisches Merkmal der photosynthetischen Membran. Im Gegenteil, Thylakoidmembranen höherer Pflanzen stellen hochdynamische Strukturen dar, die eine Reihe von Anpassungsmechanismen zur Aufrechterhaltung der photosynthetischen Effizienz unter Streßbedingungen entwickelt haben (Weis und Berry, 1988; Schöffel et al., 1998). In diesem Zusammenhang kommt der reversiblen Phosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen, neben der Energieableitung über den Xanthophyllzyklus, eine zentrale Bedeutung zu (Allen, 1992; Demmig-Adams und Adams, 1996; Eskling et al., 1997; Gilmore, 1997; Gal et al., 1997; Rintamäki et al., 1997; Vener et al., 1998). Weiterhin ist die koordinierte Degradation und Neusynthese geschädigter Photosystemuntereinheiten, vor allem des meist nur kurzlebigen, wasserspaltenden PSII, für die Aufrechterhaltung der Photosyntheseleistung und die langfristige Anpassung des Photosyntheseapparates an jahreszeitliche Schwankungen unabdingbar (Adam, 1996; Andersson und Aro, 1997).

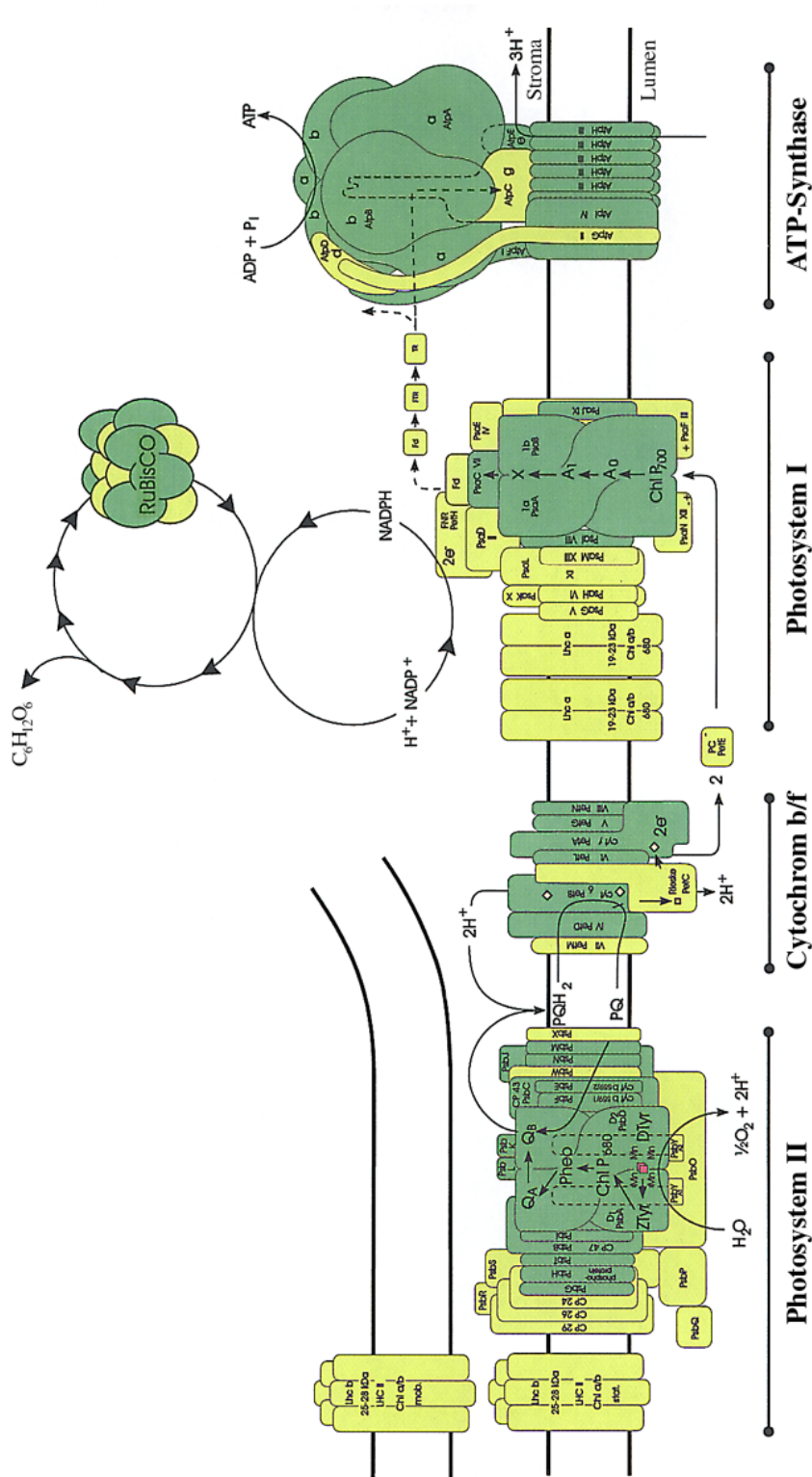


Abb. 1: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation der Thylakoidmembran höherer Pflanzen in gestapelte Grana- und ungestapelte Stromalamellen und der lateral heterogenen Verteilung der Proteinkomplexe dualen genetischen Ursprungs (grün: plastidär kodierte, gelb: kernkodierte Polypeptiduntereinheiten; mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. R.G. Herrmann).

An den genannten physiologischen Prozessen sind eine Reihe auxiliärer Proteine beteiligt, wie beispielsweise Proteinkinasen und -phosphatasen (Vener et al., 1998), Faltungshilfen ("chaperone"), Proteasen (Adam, 2000; Sokolenko et al., 1997) und zahlreiche Komponenten, die für die Biogenese der photosynthetischen Multienzymkomplexe erforderlich sind (Herrmann, 1996). Biochemische Natur und strukturelle Eigenschaften dieser auxiliären Komponenten sowie ihre subplastidäre Lokalisation sind bislang weitgehend unbekannt. Die Identifizierung ihrer Nuklein- und Aminosäuresequenzen ist daher für die Aufklärung der zugrundeliegenden Signaltransduktionsmechanismen von zentraler Bedeutung.

1.2 Koordination von Kurz- und Langzeitadaptationen des Photosyntheseapparates durch reversible Proteinphosphorylierungen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen an Threonin-, Serin-, Histidin- oder Tyrosinresten stellt einen universellen molekularen Regulationsmechanismus dar, über den die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Zielproteine moduliert werden können. Im Zusammenhang mit Adaptations- und Reparaturprozessen zur Aufrechterhaltung der Photosyntheseleistung ist die reversible Phosphorylierung einer Reihe von Thylakoidmembranproteinen auch in photosynthetischen Organismen an der Signaltransduktion beteiligt (Stone und Walker, 1995; Hardie, 1996). Der Phosphorylierungszustand der Zielproteine, insbesondere Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes (Bennett, 1979, 1980), wird von Proteinkinasen und -phosphatasen katalysiert, die antagonistisch wirken. Die reversible Modifikation dieser Zielproteine unterliegt einer Redoxkontrolle auf der Ebene des Plastochinons (Allen, 1992; Vener et al., 1995, 1997, 1998; Gal et al., 1997). Zudem werden lichtinduzierte Konformationsänderungen des Substrats (trimerer LHCII-Komplex bzw. CP43), verbunden mit einer Exposition der Phosphorylierungsstelle hin zur verantwortlichen Proteinkinase, diskutiert (Zer et al., 1999; Vink et al., 2000).

In Chloroplasten höherer Pflanzen sind reversible Proteinphosphorylierungen an mindestens drei wesentlichen Prozessen beteiligt: (1) an der als "state I/state II-transition" bekannten kurzzeitigen Anpassung des Absorptionsquerschnittes am PSII, die die Energieverteilung innerhalb des Membransystems, vor allem zwischen den Photosystemen II und I, reguliert, (2) an der Koordination der Stabilität, der Degradation und des Umsatzes der Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums und wahrscheinlich (3) an der koordinierten Expression plastidärer und nukleärer Gene.

"State I/state II-transition"

Der als "state I/state II-transition" bezeichnete Vorgang basiert auf der reversiblen Assoziation des LHCII-Komplexes mit den Photosystemen II bzw. I infolge seiner Phosphorylierung durch eine lichtaktivierte, redoxkontrollierte Proteinkinase (Allen, 1992; Gal et al., 1997). Auf diese Weise wird einer Verminderung der photosynthetischen Effizienz infolge transienter

Veränderungen der Lichtintensität und -qualität durch Anpassung des Absorptionsquerschnittes am PSII entgegengewirkt (Andersson und Barber, 1996; Melis, 1996; Park et al., 1997). In diesem thylakoidalen Signaltransduktionsprozeß kommt dem Cytochrom *b/f*-Komplex die Funktion eines Redoxsensors über das PQH₂/PQ-Verhältnis zu, das Auskunft über die Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen II und I gibt (Vener et al., 1995, 1997, 1998; Gal et al., 1997; Zito et al., 1999). Eine hohe PQH₂-Konzentration zeigt einen Elektronenstau vor dem PI an und aktiviert die Proteinkinase, die LHCII phosphoryliert.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung der redoxkontrollierten LHCII-Kinase ist die Identifizierung eines 15 kDa-Polypeptids aus *Chlamydomonas reinhardtii*, das mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex assoziiert sein soll und unter "state II"-Bedingungen reversibel phosphoryliert werden kann, interessant (Hamel et al., 2000). Es handelt sich um ein membranintegrales Protein mit zwei hydrophilen Domänen, die in das Thylakoidlumen bzw. in das Stroma exponiert sind. Die Funktion des als Untereinheit V bezeichneten Proteins, das auch in Thylakoidmembranen aus Spinat serologisch nachgewiesen werden konnte (Hamel et al., 2000), ist bislang unbekannt. Eine Beteiligung an der redoxkontrollierten Aktivierung der thylakoidalen LHCII-Kinase über einen transmembranen Effekt unter Beteiligung seiner hydrophilen Domänen wird diskutiert.

Koordination der Stabilität, der Degradation und des Umsatzes der Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums

Infolge der oxygenen Photosynthese wird die Funktionsleistung des PSII durch das Auftreten photooxidativer Schäden unter Lichtstreß beeinträchtigt (Aro et al., 1993; Ohad et al., 1994; Keren et al., 1997; Anderson et al., 1998). Das Ausmaß der Schädigung ist dabei vom Redoxzustand des Chinon-Akzeptors Q_A des PSII abhängig (siehe Übersichtsartikel von Melis, 1999). Übersteigt die Rate der photooxidativen Schädigung das Ausmaß der Reparatur, kommt es zur Photoinhibition. Die Stabilität, Degradation und Umsatzrate des PSII-Reaktionszentrums werden über den Phosphorylierungszustand seiner Polypeptiduntereinheiten (D1, D2, CP43 und das Produkt des *psbH*-Gens) koordiniert (Andersson und Aro, 1997; Barber et al., 1997; Kruse et al., 1997; Baena-Gonzalez et al., 1999). Das D1-Protein weist von allen Thylakoidmembranproteinen die höchste Umsatzrate infolge lichtinduzierter, photooxidativer Schädigung auf (Mattoo und Edelman, 1987). Phosphorylierte D1-Polypeptide sind gegenüber proteolytischer Degradation stabilisiert. Ihr Abbau in den ungestapelten Regionen der photosynthetischen Membran kann nur nach vorangegangener Dephosphorylierung erfolgen (Koivuniemi et al., 1995; Rintamäki et al., 1996). Auf diese Weise wird die D1-Degradation mit der Integration und der Assemblierung einer neusynthetisierten Untereinheit in den PSII-Holokomplex koordiniert.

Koordination plastidärer und nukleärer Genexpression

Das Sonnenlicht spielt nicht nur als Energiequelle für die Photosynthese eine wichtige Rolle, sondern beeinflusst auch die Biogenese des Chloroplasten und die Transkription photosynthetischer Gene. Der duale genetische Ursprung der Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran und das kompartimentierte genetische System der Pflanzenzelle erfordern eine quantitativ, zeitlich und räumlich koordinierte Interaktion von Kerngenom und Plastom (Herrmann, 1997). Das Ausmaß plastidärer Genexpression wird wesentlich von der Konzentration und der Halbwertszeit kernkodierter Faktoren bestimmt, die auf transkriptionaler, posttranskriptionaler sowie translationaler Ebene wirken (Rochaix, 1992, 1996; Mayfield et al., 1995; Sugita und Sugiura, 1996; Goldschmidt-Clermont, 1998; Leon et al., 1998). Neben der Kontrolle des Kerns auf die plastidäre Genexpression muß ein Rückkopplungsmechanismus vom Organell zum Kern bestehen. In diesem Zusammenhang spielen der Redoxzustand der Plastide und der Phosphorylierungszustand regulatorischer Faktoren eine wesentliche Rolle (Danon und Mayfield, 1994; Levings und Siedow, 1995). Beispielsweise wird die Initiation der *psbA*-Transkription in *Sinapis alba* L. durch die Phosphorylierung zweier Sigma-ähnlicher Transkriptionsfaktoren kontrolliert (Baginski et al., 1997). Ihr Phosphorylierungszustand ist von der Aktivität einer Proteinkinase (PTK, "plastid transcription kinase") abhängig, die mit der plastidären RNS-Polymerase (PEP) assoziiert sein soll, und moduliert ihre Interaktion mit dem Transkriptionsapparat (Baginski et al., 1999). Die Aktivität der Proteinkinase PTK wird ihrerseits durch Phosphorylierung reguliert und ist vom Redoxzustand der photosynthetischen Elektronentransportkette abhängig. Die Expression der kernkodierten *cab*-Gene für die Chlorophyll *a/b*-bindenden Apoproteine des LHCII-Komplexes soll dagegen über den Phosphorylierungszustand eines plastidären Repressorproteins reguliert werden (Escoubas et al., 1995). Im phosphorylierten Zustand wird der Repressor aus dem Organell in der Kern transloziert und inhibiert dort die Transkription der *cab*-Gene. Sein Phosphorylierungszustand ist von der Aktivität einer Proteinkinase abhängig, die über den Redoxzustand des Plastochinons kontrolliert wird.

1.3 Regulation des Phosphorylierungszustandes von Thylakoidmembranproteinen

Die reversible Phosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen steht mit der Optimierung der photosynthetischen Effizienz und der Minimierung photooxidativer Schäden am PSII in Verbindung. Die Identifizierung der verantwortlichen Enzymaktivitäten und ihre subplastidäre Lokalisation ist für das Verständnis der Dynamik der Thylakoidmembranen höherer Pflanzen essentiell. Trotz intensiver Forschungsarbeiten sind die Komponenten des thylakoidalen Proteinkinase/-phosphatase-Systems und ihre kodierenden Sequenzen bislang weitgehend unbekannt.

Thylakoidale Proteinkinasen

Die differentielle Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes unter gegebenen Lichtintensitäten und Redoxbedingungen weist auf die Existenz multipler Proteinkinasen in der Thylakoidmembran hin (Rintamäki et al., 1997; Carlberg et al., 1999). Während die Untereinheiten des LHCII-Komplexes bereits unter niedrigen Lichtintensitäten und in Gegenwart thioloxidierender Substanzen maximal phosphoryliert sind, nimmt die Phosphorylierungsrate der Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums mit der Lichtintensität und in Gegenwart thiolreduzierender Substanzen zu. Die Aktivität der verantwortlichen Proteinkinasen soll in beiden Fällen über die Bindung von Plastochinon an die Q_o -Stelle des Cytochrom *b/f*-Komplexes reguliert werden (Vener et al., 1995, 1997; Gal et al., 1997; Snyders und Kohorn, 1999; Zito et al., 1999). Im Falle der LHCII-Kinase wird zudem eine kooperative Beteiligung des Ferredoxin-Thioredoxin-Systems diskutiert (Rintamäki et al., 2000).

Die Existenz einer redoxkontrollierten LHCII-Kinase ist seit den Arbeiten von Gal et al. (1990, 1992) und Frid et al. (1992) bekannt. Nach dem Modell von Rintamäki et al. (2000) soll die Aktivierung der membranintegralen LHCII-Kinase unter niedrigen Lichtintensitäten erhebliche Konformationsänderungen hervorrufen, durch die eine Disulfidbrücke innerhalb des Enzyms vor Reduktion geschützt wird. Mit steigender Lichtintensität wird diese Disulfidbrücke zunehmend exponiert und kann so durch das Ferredoxin-Thioredoxin-System reduziert werden. Auf diese Weise kann es zur Inaktivierung der LHCII-Kinase trotz reduziertem Zustand der Q_o -Stelle am Cytochrom *b/f*-Komplex kommen. Die Phosphorylierung der LHCII-Polypeptide wird auf diese Weise mit dem Redoxzustand des Organells gekoppelt und erreicht bereits unter geringen Lichtintensitäten ihr Maximum. Die Identität der verantwortlichen, redoxkontrollierten LHCII-Kinase ist bis heute unbekannt. Eine 64 kDa-Komponente, die lange Zeit als potentieller Kandidat für die redoxkontrollierte Kinaseaktivität angesehen wurde (Coughlan und Hind, 1986; Gal et al., 1990), ist inzwischen als Polyphenoloxidase identifiziert worden (Hind et al., 1995; Sokolenko et al., 1995). Dieses kernkodierte, Cu^{2+} -bindende Enzym ist *in vivo* im Thylakoidlumen lokalisiert und stellt ein effizientes Phosphorylierungssubstrat u.a. für eine bislang nicht identifizierte thylakoidale Proteinkinase dar (Sokolenko et al., 1995). In *A. thaliana* L. wurde dagegen kürzlich eine thylakoidassoziierte Proteinkinase (TAK, 55 kDa) isoliert, die LHCII-Polypeptide *in vitro* auf redoxkontrollierte Weise phosphorylieren soll (Snyders und Kohorn, 1999).

Im Gegensatz zur Aktivierung der membranintegralen LHCII-Kinase erfordert die reversible Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums keinen aktiven Cytochrom *b/f*-Komplex (Vener et al., 1995; Gal et al., 1997). Die reversible Phosphorylierung des D1-Polypeptids scheint den bisher letzten Schritt in der Evolution der Phosphorylierung von PSII-Untereinheiten darzustellen. Sie kommt nur bei Samenpflanzen vor. In Cyanobakterien und Rotalgen, denen Chlorophyll *b*-haltige Lichtsammelkomplexe fehlen, wurde bislang keine Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums nachgewiesen (Pursiheimo et

al., 1998). Die Phosphorylierung von LHCII-Polypeptiden ist mit der Ausbildung der Granastapel einhergegangen und reguliert unter anderem die Energieverteilung zwischen den beiden lateral heterogen verteilten Photosystemen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der strukturellen Organisation der Thylakoidmembranen höherer Pflanzen in gestapelte und ungestapelte Regionen und dem Ursprung der reversiblen Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums wird derzeit diskutiert. Die Identität der Proteinkinase(n), die für die Phosphorylierung der PSII-Polypeptide verantwortlich ist (sind), ist nicht bekannt. Für die Existenz multipler thylakoidaler Proteinkinasen spricht der Nachweis von mindestens vier kinaseaktiven Polypeptiden im Molekulargewichtsbereich von 30 bis 85 kDa in subthylakoidalen Fraktionen aus Spinatchloroplasten (Sokolenco et al., 1995; Weber et al. 1998). In einer weiterführenden Arbeit haben Vink et al. (1998) drei kinaseaktive Polypeptide von 33, 45 und 64 kDa identifiziert, die mit dem PSII-Reaktionszentrum assoziiert sein sollen. Darunter soll die 64 kDa-Komponente die PSII-Polypeptide D1 und CP43 *in vitro* auf redoxunabhängige Weise phosphorylieren. Die kodierenden Sequenzen dieser mutmaßlichen Proteinkinasen sind bislang nicht isoliert worden.

Die kälteinduzierte Phosphorylierung des Chlorophyll-bindenden Antennenproteins CP29, die wiederum einer andersartigen Kinetik folgt, scheint auf Mais-Pflanzen beschränkt zu sein. Dabei soll es sich um einen bislang unbekanntem Mechanismus zum Schutz vor Photoinhibition unter Kältestreß handeln (Bergantino et al., 1995; Croce et al., 1996). Durch die phosphorylierungsabhängige Reorganisation der Pigmente im Chlorophyll-Protein-Komplex soll weniger Anregungsenergie zum PSII-Reaktionszentrum weitergeleitet werden. Die verantwortliche Proteinkinase soll in den Granastapeln zwischen PSII und Cytochrom *b/f*-Komplex lokalisiert sein und der Redoxkontrolle unterliegen. Bislang ist unklar, ob es sich um einen universellen Anpassungsmechanismus an tiefe Temperaturen handelt. In Thylakoidmembranen anderer höherer Pflanzen konnte bislang keine kälteinduzierte Phosphorylierung von CP29 nachgewiesen werden (M. Swiatek, persönliche Mitteilung).

Proteinphosphatasen im Chloroplasten

Die reversible Phosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen spielt nicht nur für eine balanzierte Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen eine wichtige Rolle (Bennett, 1991; Allen, 1992), sondern koordiniert auch deren Stabilität, Degradation und Umsatz (Andersson und Aro, 1997; Barber et al., 1997; Kruse et al., 1997; Baena-Gonzalez et al., 1999). Analog zur Phosphorylierung der Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes scheinen auch an ihrer Dephosphorylierung multiple Aktivitäten beteiligt zu sein. Bislang sind membranintegrale, membranassoziierte und im Stroma lösliche Phosphataseaktivitäten identifiziert worden (Sun et al., 1989; Kieleczawa et al., 1992; Hammer et al., 1995; 1997; Vener et al., 1999).

Im Zusammenhang mit der Isolierung von Bestandteilen des thylakoidalen Signaltransduktionssystems ist eine membranintegrale Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A identifiziert worden (Vener et al., 1999). Die membranintegrale Proteinphosphatase soll präferentiell Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums dephosphorylieren. Eukaryotische Serin-/Threoninphosphatasen werden anhand biochemischer und pharmakologischer Eigenschaften in die PPP- und die PPM-Familie eingeteilt. Die PPP-Familie umfaßt Proteinphosphatasen vom Typ PP1, PP2A und PP2B, sowie SIT4, PP5, PPQ, PPV, PPX, PPY und PPZ, wogegen PP2C, ABI1 und KAPP-1 aus *A. thaliana* L., die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase sowie SpoIIE aus *Bacillus subtilis* zur PPM-Familie gehören (siehe Übersichtsartikel von Barford, 1996). Proteinphosphatasen vom Typ 2A sind Bestandteil verschiedener eukaryotischer Signaltransduktionswege und wirken vielfach als negative Regulatoren von Proteinkinasekaskaden (Millward et al., 1999). Die heterotrimeren Proteinkomplexe setzen sich aus einer katalytischen C-Untereinheit (36 kDa) sowie zwei regulatorischen Untereinheiten A (65 kDa) und B (variable Größe) zusammen. Ihre Aktivität wird durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. die Phosphorylierung oder Carboxymethylierung der C-Untereinheit, sowie Interaktionen mit Effektormolekülen reguliert (Guo und Damuni, 1993; Tolstykh et al., 2000; Wu et al., 2000). Die Aktivität der thylakoidalen Proteinphosphatase soll durch direkte oder indirekte Interaktion mit dem komplexen Immunophilin TLP40 im Lumen von Thylakoidmembranen reguliert werden (Fulgosi et al., 1998; Vener et al., 1999). Eine solche Interaktion war bislang nur zwischen der Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase vom Typ 2B (Calcineurin) und den Immunophilinen Cyclophilin A bzw. FKBP12 in Gegenwart und Abwesenheit der Immunsuppressiva Cyclosporin A bzw. FK506 bekannt (Liu et al., 1992; Cardenas et al., 1994).

Die Stabilität, die Degradation und der Umsatz des PSII-Reaktionszentrums werden über den Phosphorylierungszustand seiner Polypeptiduntereinheiten koordiniert (Koivuniemi et al., 1995; Rintamäki et al., 1996). Die lateral heterogene Verteilung der verantwortlichen Enzymaktivitäten ermöglicht eine differentielle Dephosphorylierung der Untereinheiten funktioneller und geschädigter PSII-Reaktionszentren (Rintamäki et al., 1996). Die Degradation des D1-Proteins oxidativ geschädigter Reaktionszentren erfolgt nach seiner Dephosphorylierung in zwei energieabhängigen Schritten. Dabei erfolgt die endoproteolytische Spaltung des D1-Proteins durch eine bislang nicht identifizierte, GTP-abhängige Protease in den Granalamellen und führt zu Abbauprodukten von 10 bzw. 23 kDa (Spetea et al., 1999). Das N-terminale 23 kDa-Fragment soll anschließend durch eine ATP-abhängige FtsH-Protease in den Stromalamellen degradiert werden (Lindahl et al., 2000).

Die Stabilität des LHCII-Komplexes ist bei gegebener Lichtintensität ebenfalls von dem Phosphorylierungszustand seiner Polypeptiduntereinheiten abhängig (Lindahl et al., 1995). Die Phosphorylierung der LHCII-Polypeptide erreicht, wie bereits erwähnt, unter niedrigen Lichtintensitäten ein Maximum und führt zur Dissoziation der peripheren LHCII-Population vom

PSII. Es kommt zur lateralen Migration in die ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran, in denen die Assoziation mit dem PSI erfolgen kann. Bei anhaltend hohen Lichtintensitäten wird die dephosphorylierungsabhängige Degradation der peripheren LHCII-Population durch eine ATP-abhängige Protease in den Stromalamellen induziert (Yang et al., 1998). Zur Aktivierung der energieabhängigen Protease vom Cystein- oder Serintyp ist die längerfristige Einstrahlung hoher Lichtintensitäten erforderlich. Auf diese Weise werden kurz- und längerfristige Anpassungen des Absorptionsquerschnittes am PSII, denen die Phosphorylierung von LHCII-Polypeptiden und deren laterale Migration in die ungestapelten Thylakoidmembranregionen gemeinsam ist, koordiniert.

Hammer et al. (1997) konnten im Stroma von Chloroplasten ein 29 kDa-Polypeptid identifizieren, das LHCII-Komplexe *in vitro* dephosphorylieren kann. Die Fähigkeit, sowohl Phosphoserin- als auch -threoninreste als Substrat nutzen zu können, und die Sensitivität gegenüber Natriumfluorid und EDTA unterscheiden diese lösliche Proteinphosphatase von der beschriebenen membranintegralen Aktivität.

1.4 Elemente pflanzlicher Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssysteme

In Prokaryoten erfolgt die Wahrnehmung und Weiterleitung extra- und intrazellulärer Signale über eine konservierte Signaltransduktionskaskade, die als Zwei-Komponenten-System bezeichnet wird (siehe Übersichtsartikel von Hoch und Silhavy, 1995, sowie Chang und Stewart, 1998). Die Signaltransduktion wird durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom Histidinrest einer Sensorkinase auf den Asparaginsäurerest des zugehörigen "response regulators" vermittelt ("His-Asp phosphorelay"; Abb. 2).

Sensorkinasen bestehen aus einer N-terminalen "input"- und einer C-terminalen "transmitter"-Domäne (Parkinson und Kofoid, 1992). Die Reizwahrnehmung erfolgt über die "input"-Domäne und führt nach der Dimerisierung des Enzyms zu seiner Autophosphorylierung an dem Histidinrest in der "transmitter"-Domäne. "Response regulator"-Proteine (nachfolgend auch als Regulator-Proteine bezeichnet) setzen sich aus einem N-terminalen "receiver"-Modul mit dem Asparaginsäurerest und einer C-terminalen "output"-Domäne zusammen. Die Aktivität der "output"-Domäne hängt entscheidend vom Phosphorylierungszustand des "receiver"-Moduls ab. Die Phosphorylierung des konservierten Asparaginsäurerestes in der "receiver"-Domäne eines "response regulators" kann nicht nur über die zugehörige Sensorkinase, sondern auch durch niedermolekulare Phosphorylgruppenüberträger, wie z.B. Acetylphosphat, vermittelt werden (Lukat et al., 1992). Auf diese Weise ist die Identifizierung mutmaßlicher Regulator-Proteine *in vitro* möglich. Bakterielle Zwei-Komponenten-Systeme sind unter anderem an der Osmoregulation, der Chemotaxis und der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Igo et al., 1990; Mizuno und Mizushima, 1990; Bourret et al., 1991; Jones und Aizawa, 1991; Macnab, 1992).

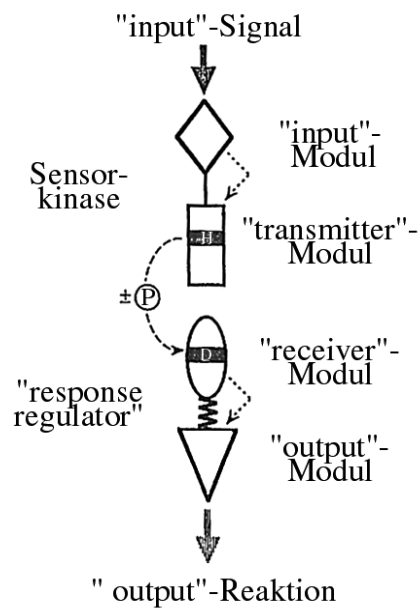


Abb. 2: Schematische Darstellung eines klassischen Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystems (modifiziert nach Pratt und Silhavy, 1995). Veränderungen des extra- und intrazellulären Milieus ("input"-Signal) werden über das "input"-Modul einer Sensor-kinase wahrgenommen und durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom Histidinrest (H) in ihrer "transmitter"-Domäne auf den Asparaginsäurerest (D) in dem "receiver"-Modul des zugehörigen Regulator-Proteins in eine physiologische Reaktion ("output"-Signal) umgewandelt.

Der "multistep phosphorelay" stellt eine Variante des relativ einfachen prokaryotischen Zwei-Komponenten-Systems dar. Diese Art der Signaltransduktion enthält mehrere sequentielle Phosphorylierungsereignisse, bei denen Phosphorylgruppen abwechselnd zwischen Histidin- und Asparaginsäureresten übertragen werden (Appelby et al., 1996). An der Übertragung sind energiereiche Intermediate beteiligt, die eine Phosphohistidintransfer-Domäne (HPt) besitzen, selbst aber keine katalytische Aktivität ausüben (Ishige et al., 1994; Appelby, 1996). Der "multistep phosphorelay" stellt einen universellen Signaltransduktionsmechanismus in Pro- und Eukaryoten dar und ist beispielsweise an der Sporulation von *B. subtilis* und der Osmoregulation von *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt (Burbulys et al., 1991; Posas et al., 1996).

Innerhalb der Prokaryoten sind cyanobakterielle Zwei-Komponenten-Systeme ungleich komplexer. In *Synechocystis* sp. PCC6803 sind mehr als 80 Polypeptide als Bestandteile von Zwei-Komponenten-Systemen identifiziert worden (Mizuno et al., 1996). Im Hinblick auf die Evolution der Signaltransduktionsmechanismen höherer Pflanzen ist unter anderem die Identifizierung der cyanobakteriellen Sensor-kinase slr0473 von Bedeutung. Dieses Protein wird aufgrund seiner Phytochrom-ähnlichen "input"-Domäne als Prototyp pflanzlicher Phytochrome diskutiert (Mizuno et al., 1996). In höheren Pflanzen sind in den letzten Jahren zahlreiche Elemente von "phosphorelay"-Systemen identifiziert worden. Neben Histidinkinassen, "response regulator"-ähnlichen Proteinen und HPt-Domänen wurden auch hybride Histidinkinassen isoliert, die Kinasedomäne und "receiver"-Modul in einem Molekül enthalten. Einige sind als Rezeptoren an der Ethylen- (ETR1, ETR2, ERS2, EIN4) und Cytokinin-Signaltransduktion (CKI1) in *A. thaliana* L. beteiligt (Kakimoto, 1996; Schaller, 1997; Hua und Meyerowitz, 1998). Homologe Ethylenrezeptoren wurden in *Lycopersicon esculentum* L. identifiziert (Wilkinson et al., 1995;

Lashbrook et al., 1998; Tieman und Klee, 1999). Die hybride Sensorkinase ATHK1 aus *A. thaliana* L. soll dagegen als Osmosensor zelluläre Veränderungen des osmotischen Drucks an eine MAP-Kinasekaskade weiterleiten, analog zur Aktivierung der HOG1 MAP-Kinasekaskade aus Hefe durch den SLN1-YPD1-SSK1 "multistep phosphorelay" (Urao et al., 1999; Posas et al., 1996).

Rezeptorkinasen höherer Pflanzen bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne ("input"-Modul), die über ein Transmembransegment mit der intrazellulären Serin-/Threoninkinase-Domäne ("transmitter"-Modul) gekoppelt ist (Walker, 1994). Derartige Proteine sind beispielsweise an der Zelldifferenzierung und der Entwicklung von Pflanzen beteiligt (siehe Übersichtsartikel von Becraft, 1998). Die Serin-/Threonin-Signatur unterscheidet pflanzliche Rezeptorkinasen von denen tierischer Systeme, in denen hauptsächlich Tyrosinkinasen als Rezeptoren identifiziert worden sind (Yarden und Ullrich, 1988; Ullrich und Schlessinger, 1990). Tierische Proteinkinasen, die Serin- oder Threoninreste phosphorylieren sind dagegen kaum bekannt (Georgi et al., 1990; Mathews und Vale, 1991; Lin et al., 1992; Schaller und Bleecker, 1993), und die Elemente von Zwei-Komponenten-Systemen scheinen bei Tieren überhaupt nicht vorzukommen. Das deutet auf einen unterschiedlichen Ursprung der Komponenten pflanzlicher und tierischer Signalperzeptionssysteme hin (Urao et al., 2000a). Ein Teil der Regulatormoleküle höherer Pflanzen stammt vermutlich von cyanobakteriellen Genen ab, die durch horizontalen Gentransfer vom Endosymbionten in den Kern der Wirtszelle gelangt sind. In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung eines plastidär kodierten "response regulator"-Proteins vom OmpR-Typ in Chloroplasten der Rotalge *Heterosigma akashiwo* von Bedeutung (Jacobs et al., 1999). Dieses Protein soll an der Regulation der plastidären Genexpression beteiligt sein.

In *A. thaliana* L. wurden bislang 14 kernkodierte Regulator-ähnliche Proteine (ARR1 - 14) identifiziert, die in zwei Klassen eingeteilt werden (Imamura, 1999). Regulator-Proteine vom Typ A und B unterscheiden sich in der Länge ihrer C-terminalen Extension, die dem bakteriellen Prototyp eines "response regulator"-Proteins (CheY) fehlt (D'Agostino und Kieber, 1999). Während die meisten prokaryotischen "response regulator"-Proteine als Transkriptionsfaktoren an der Regulation der Genexpression beteiligt sind, wurden in höheren Pflanzen bislang nur wenige Komponenten mit DNS-bindenden Eigenschaften identifiziert (Sakai et al., 1998; Lohrmann et al., 1999).

Das His-Asp "phosphorelay"-System ist durch die Beteiligung von Proteinen mit mehr als einer funktionellen Domäne gekennzeichnet und kann in der Regel negativ reguliert werden. Beispielsweise wirkt die zur Raf-Familie gehörende Proteinkinase CTR1 als negativer Regulator der Ethylen-Signaltransduktion in *A. thaliana* L. (Kieber et al., 1993). Durch die Phosphorylierung regulatorischer Schlüsselkomponenten und durch vielfältige Protein-Protein-Interaktionen ist es möglich, verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege zu vernetzen (Appelby et al., 1996; Urao et al., 2000b). Die Vernetzung kann auf verschiedenen Ebenen

erfolgen, beispielsweise stromauf- oder -abwärts von MAP-Kinasekaskaden (Hirt, 1999). Durch den His-Asp "phosphorelay" wird zudem ein Schwellenwert für die minimale Stärke und Dauer eines Reizes etabliert (Sakakibara et al., 2000). Da der Phosphotransfer zwischen Histidin und Asparaginsäure stöchiometrisch ist, ist damit nur eine geringfügige Änderung der freien Energie verbunden.

1.5 Funktionelle Rolle von Proteinen mit Tetratricopeptid-"repeat"-Motiv

Proteine mit Tetratricopeptid-"repeat" (TPR)-Motiv wurden erstmals im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus in Eukaryoten beschrieben (Hirano et al., 1990; Sikorski et al., 1990; King et al., 1995). Es handelt sich um eine degenerierte Sequenz aus 34 Aminosäureresten, die drei- bis sechzehnmal wiederholt vorliegen kann. Die TPR-Konsensussequenz wird in die beiden Subdomänen A und B unterteilt, die bei einer α -helikalen Konfiguration von 3,6 Aminosäureresten pro Windung auf gegenüberliegenden Seiten angeordnet sind. (Abb. 3 A). Jede TPR-Einheit besteht aus einem Paar amphipatischer, antiparalleler α -Helices, die stereochemisch komplementär angeordnet und über einen Prolin-induzierten "geknickten" Bereich verbunden sind.

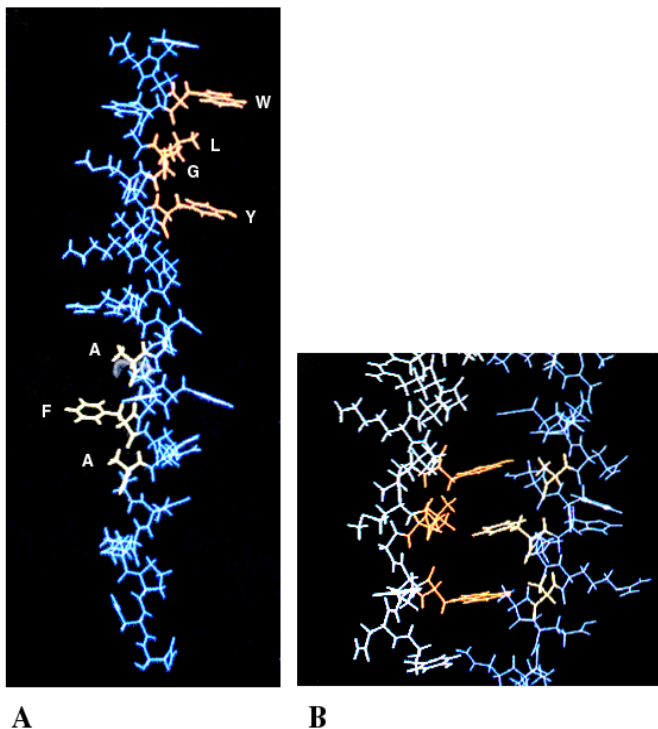


Abb. 3: Dreidimensionale, graphische Darstellung der TPR-"snap"-Helix des nuc2⁺-Proteins aus *Schizosaccharomyces pombe* (nach Hirano et al., 1990). (A) Darstellung eines Tetratricopeptid-"repeats". Die konservierten Aminosäurereste W1, L4, G5 und Y8 der Region A (orange) bzw. die Reste A17, F21 und A24 der Region B (hellgelb) liegen auf gegenüberliegenden Seiten der α -Helix. (B) Darstellung einer TPR-Einheit bestehend aus zwei amphipatischen, antiparallelen α -Helices. Die antiparallele Orientierung resultiert aus der Assoziation der Regionen A (orange) und B (hellgelb) verschiedener α -Helices über das "knob/hole"-Bindemotiv.

Benachbarte TPR-Motive sind so gepackt, daß eine rechtsgewundene "snap"-Helix mit Knopf/Gruben ("knob/hole")-Struktur resultiert (Hirano et al., 1990; Abb. 3 B). Diese Art der räumlichen Anordnung steht mit der Erkennung von Zielproteinen im Zusammenhang (Das et al., 1998). Durch Mutagenese und Deletionsstudien wurde gezeigt, daß TPR-Motive an der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Smith et al., 1995a; Tzamarias und

Struhl, 1995). Neben der Regulation des Zellzyklus wird eine Beteiligung an der Kontrolle der Transkription und Translation, dem Proteinimport in Mitochondrien und Peroxisomen, der Regulation der Aktivität von Proteinkinasen und -phosphatasen sowie der Proteinfaltung diskutiert (Goebel und Yanagida, 1991; Schlossmann et al., 1994; Lamb et al., 1995).

Proteine mit multiplen TPR-Motiven vermitteln vielfach die Assemblierung/Disassemblierung von Multienzymkomplexen. Das Adaptorprotein Hop enthält zwei TPR-Domänen und ermöglicht die Assoziation der molekularen Faltungshilfen Hsp70 und Hsp90 (Chang et al., 1997; Frydman und Höfeld, 1997; Chen und Smith, 1998; Johnson et al., 1998). Während die TPR1-Domäne des Adaptorproteins ein C-terminales Heptapeptid von Hsp70 spezifisch erkennt, bindet die TPR2-Domäne ein C-terminales Pentapeptid von Hsp90. Die singuläre TPR-Bindestelle von Hsp90 kann neben Hop mit einer Reihe weiterer Proteine mit TPR-Domäne interagieren. Dazu zählen die Immunophiline FKBP51, FKBP52 und Cyp40 sowie die Serin-/Threoninphosphatase PP5 (Pratt und Toft, 1997; Dolinski et al., 1998; Marsh et al., 1998; Buchner, 1999). Auf diese Weise kann die TPR-"snap"-Helix die Interaktion von Komponenten verschiedener zellulärer Prozesse vermitteln.

Proteine mit TPR-Domänen weisen strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zu 14-3-3-Proteinen auf (Das et al., 1998). Die 14-3-3-Domänen bilden Homodimere mit 9 antiparallel angeordneten α -Helices pro Monomer. Die ubiquitären 14-3-3-Proteine sind an Signaltransduktionsprozessen durch die direkte Interaktion mit Proteinen beteiligt, die an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert sind. Auf diese Weise wird die Aktivität verschiedener Proteinkinasen, wie z.B. Raf-1, Bcr oder PKC aus Säugern (Fantl et al., 1994; Reuther et al., 1994; Pallas et al., 1994), aber auch der Nitratreduktase und der Saccharosephosphat-Synthase im Chloroplasten reguliert (Bachmann et al., 1996; Toroser et al., 1998).

Durch Homodimerisierung von TPR- oder 14-3-3-Domänen kann ein Protein mit zwei Ligandenbindestellen entstehen, das mit verschiedenen Zielproteinen interagieren kann. Die Komplexität der Protein-Protein-Interaktionen kann durch Heterodimerisierung gesteigert werden, indem die TPR- oder 14-3-3-Domänen die Assemblierung von Zielproteinen verschiedener zellulärer Prozesse in einem makromolekularen Komplex ermöglichen können (Muslin et al., 1996). TPR-Domänen vermitteln aber nicht nur die Interaktion eines Proteins mit anderen regulatorischen Komponenten oder Multienzymkomplexen, sondern können auch autoinhibitorische Funktionen ausüben. Im Falle der Proteinphosphatase PP5 induziert die Bindung mehrfach ungesättigter Fettsäuren an die TPR-Domäne Konformationsänderungen, die zur Aktivierung der Phosphataseaktivität führen (Chen und Cohen, 1997). Die Abspaltung der TPR-Domäne durch partielle Restriktion hat den gleichen stimulierenden Effekt. Die hauptsächlich im Kern menschlicher Zellen lokalisierte PP5 soll an der Regulation der Transkription beteiligt sein (Chen et al., 1994a).

Die Biogenese der Chloroplasten höherer Pflanzen erfordert die Koordination von Kerngenom und Plastom (Gray, 1992; Herrmann, 1997). An diesem komplexen Entwicklungsprozeß sind zahlreiche Kernfaktoren beteiligt, die die plastidäre Genexpression auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und translationaler Ebene regulieren. Kernkodierte Proteine mit TPR-Motiven sind im Zusammenhang mit der Stabilität plastidärer Transkripte in *C. reinhardtii* beschrieben worden (Boudreau et al., 2000). Das im Stroma lokalisierte Nac2-Protein enthält neun TPR-Motive und soll als Bestandteil eines hochmolekularen Proteinkomplexes an der Prozessierung, der Stabilität und/oder der Translation der *psbD*-mRNS beteiligt sein. Ein analoges Protein, Mbb1, besitzt zehn TPR-Motive und soll ebenfalls mit einem multimeren Proteinkomplex assoziiert sein, der mit dem 5'-untranslatierten Bereich der *psbB*-mRNS interagiert (Vaistij et al., 2000).

1.6 Immunophilin-sensitive Enzymaktivitäten in der zellüären Signaltransduktion

Immunophiline katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolyl (Xaa-Pro)-Bindungen und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Proteinfaltung (Fischer et al., 1989; Takahashi et al., 1989). Als Faltungskatalysatoren kommen sie überall dort in Pro- und Eukaryoten vor, wo Polypeptidketten in eine native Konformation gebracht werden müssen. Sie finden sich beispielsweise im Cytoplasma, im Kern, im Endoplasmatischen Retikulum, und bei höheren Pflanzen auch in Mitochondrien und Chloroplasten (Koletsky et al., 1986; Breiman, 1992; Lippuner et al., 1994; Luan et al., 1994; Fulgosi et al., 1998). Die weite Verbreitung und zelluläre Verteilung der Immunophiline spiegelt ihre konservierte Natur und ihre Beteiligung an zahlreichen zellulären Prozessen wider (Gasser et al., 1990).

Die Einteilung der Immunophiline in die drei strukturell nicht verwandten Familien Cyclophiline, FK506-bindende Proteine (FKBPs) und Parvuline basiert auf der Inhibition ihrer Isomeraseaktivität durch spezifische Immunsuppressoren (Dolinski et al., 1997). Cyclophiline bilden stöchiometrische Komplexe mit Cyclosporin A (CsA) aus, wogegen FKBPs durch FK506 und das strukturell verwandte Rapamycin gehemmt werden (Metcalf und Richards, 1990; Schreiber, 1991). Die Cyclophilin/CsA- bzw. FKBP/FK506-Komplexe inhibieren ihrerseits Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von T-Lymphocyten führen (siehe Übersichtsartikel von Walsh et al., 1992). Ursache hierfür ist ihre Interaktion mit der Ca²⁺-/Calmodulin-abhängigen Serin-/Threoninphosphatase 2B (Calcineurin; Liu et al., 1991a). Die Interaktion von Parvulinen des PIN-Typs mit Zielproteinen, die an Serin- oder Threoninresten N-terminal von Prolinresten phosphoryliert sind, ist dagegen für die Regulation der Mitose in Eukaryoten wichtig (Lu et al., 1999).

In höheren Pflanzen sind eine Reihe von Immunophilinen aus der Cyclophilin- und FKBP-Familie identifiziert worden (Luan et al., 1994; Buchholz et al., 1994; Hueros et al., 1998; Kurek et al., 1999). Viele der pflanzlichen Cyclophiline werden von einer Genfamilie codiert, wie z.B.

ROC1 - ROC7 aus *A. thaliana* L. (Lippuner et al., 1994; Chou und Gasser, 1997; Jackson und Söll, 1999). Im Genom von *Spinacia oleracea* L. soll dagegen nur eine Kopie für das im Thylakoidlumen lokalisierte Immunophilin TLP40 existieren (Fulgosi, 1999). TLP40 wird aufgrund der strukturellen Eigenschaften seiner C-terminalen Domäne zur Familie der Cyclophiline gezählt. Die reversible Assoziation von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran soll die Aktivität einer bislang nicht identifizierten, thylakoidalen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A (Vener et al., 1999) regulieren, ähnlich der Regulation der Aktivität der menschlichen Proteinphosphatase Calcineurin durch die Interaktion mit den Immunophilinen FKBP12 und Cyclophilin A (Liu et al., 1991a; Cardenas et al., 1994). Auf diese Weise scheint die Proteinfaltung im Thylakoidlumen mit der Dephosphorylierung geschädigter Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums an der Außenseite der Thylakoidmembran und damit mit dem Umsatz des PSII-Holokomplexes koordiniert zu werden. Die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine ist von der lumenalen Konzentration ungefalteter Polypeptide abhängig und temperatursensitiv (Rokka et al., 2000). Die Hitzeinwirkung führt zur Entstapelung der Thylakoidmembranen und erleichtert die laterale Migration phosphorylierter Membranproteine. Die hitzeinduzierte Aktivierung der thylakoidalen Proteinphosphatase soll mit der Dissoziation von TLP40 von der Innenseite der Thylakoidmembran im Zusammenhang stehen. Den gleichen stimulierenden Effekt hat eine submillimolare CsA-Konzentration. Die geringe Sensitivität von TLP40 gegenüber nanomolaren CsA-Konzentrationen ist ein charakteristisches Merkmal prokaryotischer Peptidyl-prolyl *cis-trans*-Isomerasen (Rotamasen, PPIasen). Diese Eigenschaft wird auf das Fehlen eines Tryptophanrestes zurückgeführt, der in den meisten eukaryotischen Immunophilinen konserviert ist und für die Erkennung des Immunsuppressors essentiell sein soll (Liu et al., 1991b).

Das Konzept einer regulatorischen Interaktion zwischen Immunophilinen und Proteinphosphatasen wird durch das kürzlich in *A. thaliana* L. identifizierte Cyclophilin ROC7 unterstützt (Jackson und Söll, 1999). Seine Interaktion mit der katalytischen Untereinheit einer cytoplasmatischen Proteinphosphatase vom Typ 2A beeinflusst auxinabhängige Wachstumsprozesse. Im Gegensatz zu der von Vener et al. (1999) beschriebenen thylakoidalen Proteinphosphatase wird die cytoplasmatische Aktivität durch die Anwesenheit von Cyclosporin A nicht beeinflusst. Das im Kern und Cytoplasma lokalisierte Immunophilin FKBP66 aus Mais soll mit Calmodulin und einem bislang nicht identifizierten cytosolischen Protein von 36 kDa interagieren (Hueros et al., 1998). Dabei könnte es sich ebenfalls um die katalytische Untereinheit einer Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A handeln.

Immunophiline sind für das Überleben einer Zelle unter moderaten Bedingungen im allgemeinen nicht essentiell, spielen aber für die Proteinfaltung und Assemblierung von Multienzymkomplexen unter Streßbedingungen eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang sind die auffallenden funktionellen Parallelen zwischen Immunophilinen und den Mitgliedern der Hsp70-Familie von Bedeutung. Beide Familien erleichtern das Überleben von Zellen, die hohen

Temperaturen ausgesetzt sind, und enthalten Mitglieder, deren Expression durch Streß induziert werden kann. Die Expression des plastidären Cyclophilins CyP B aus *Vicia faba* und des Immunophilins FKBP77 aus Weizen wird beispielsweise durch Hitze induziert (Luan et al., 1994; Kurek et al., 1999).

Die Kombination der Rotamasedomäne mit dem bereits beschriebenen TPR-Motiv führt zu außerordentlich komplexen Proteinen, die verschiedene zelluläre Prozesse modulieren können. Solche multifunktionellen Proteine sind beispielsweise als Bestandteile der Hsp70/Hsp90-Maschinerie identifiziert worden (Pratt und Toft, 1997; Dolinski et al., 1998; Marsh et al., 1998; Buchner, 1999; Scheufler et al., 2000). Das Cyclophilin CyP40 kann über seine C-terminale TPR-Domäne nicht nur mit Hsp90 interagieren (siehe Abschnitt 1.5), sondern beeinflusst über seine stabile Interaktion mit der N-terminalen DNS-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors c-Myb auch dessen Aktivität (Hunter, 1998). Damit wird deutlich, daß komplexe Immunophiline nicht nur als einfache Faltungskatalysatoren fungieren, sondern durch die *cis-trans*-Isomerisierung von Partnermolekülen und durch Protein-Protein-Interaktionen verschiedene Signaltransduktionsprozesse modulieren und/oder miteinander vernetzen können.

Ziel dieser Arbeit war es, Komponenten des thylakoidalen Kinasesystems zu identifizieren und durch die strukturelle und funktionelle Analyse der beiden kernkodierten, komplexen Polypeptide TTP30 und TLP40 einen tieferen Einblick in die Regulation der Dynamik der Thylakoidmembran zu erhalten. Beide Polypeptide sind im Zusammenhang mit der Isolierung und Aufreinigung von Bestandteilen des thylakoidalen Proteinkinase/-phosphatase-Systems identifiziert worden und zeichnen sich durch eine bislang einzigartige molekulare Struktur aus (Fulgosi, 1999).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Radiochemikalien und Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in *p.a.* Qualität von folgenden Firmen bezogen: J.T. Baker B.V., Deventer (NL); Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Difco Laboratories, Detroit (USA); Fluka, Neu-Ulm; ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt; Riedel de Hën AG, Hannover; Roche GmbH, Mannheim; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe; Serva Feinbiochemika, Heidelberg, und Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen.

Radiochemikalien stammten von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg.

Restriktionsendonukleasen und zugehörige Puffer wurden von MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs GmbH (NEB; Schwalbach) sowie von Roche GmbH (Mannheim) bezogen. DNS- und RNS-modifizierende Enzyme, Polymerasen und Proteasen stammten von MBI Fermentas GmbH, Sigma-Aldrich GmbH und Roche GmbH, dNTPs von Carl Roth GmbH + Co.

Weitere spezielle Chemikalien, Enzyme und Materialien sind bei den jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

2.1.2 Längen- und Molekulargewichtsstandards

Die Größe von DNS-Fragmenten wurde mit Hilfe der "1 kb ladder" von Gibco BRL, Eggenstein, ermittelt. Zur Abschätzung der Molekulargewichte von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen wurde der ungefärbte Standard SDS VII-L von Sigma-Aldrich GmbH (Deisenhofen) oder der bereits gefärbte Marker "SeeBlue" von Novex/Anamed (Offenbach) verwendet.

2.1.3 Bakterienstämme und Phagen

<i>E. coli</i> DH5 α	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Studier und Moffat (1986)
<i>E. coli</i> M15	Qiagen GmbH, Hilden
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen, Groningen (NL)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	Hoekema et al. (1983)
<i>S. oleracea</i> L. λ gt11-cDNS-Bibliothek	Dr. A. Nazissian, München
<i>A. thaliana</i> L. pGAD-cDNS-Bibliothek	Clontech GmbH, Heidelberg

2.1.4 Vektoren

pBluescript II SK ⁻ und KS ⁺	Stratagene GmbH, Heidelberg
pGEX-6-P1	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
pRSET5a und b	Rosenberg et al. (1987)
pQE30	Qiagen GmbH, Hilden
pThioHisA	Invitrogen, Groningen (NL)
PCR-Vektor	Dr. S. Miséra, München
pGPTV-bar 35S-nos	Becker et al. (1992)

2.1.5 Plasmide

pHAI085	N-terminales Trunkat der Sensorkinase EnvZ (Prof. Dr. T. Mizuno, Nagoya, Japan)
PC/PC	Plastocyanin-Vorläufer in pBluescript II (Prof. Dr. R.B. Klösgen, Halle)

2.1.6 BAC-Filter zur physikalischen Kartierung

Die genomische Sequenz des plastidär lokalisierten Polypeptids TTP30 wurde mit Hilfe einer *A. thaliana* L. BAC-Bibliothek physikalisch kartiert. Es handelt sich dabei um gesamtgenomische DNS aus *A. thaliana* L. Wurzelkallus-Suspensionen, die nach ihrer Restriktion mit *EcoRI* in den Vektor pBeloBAC-Kan inseriert wurde. Daraus resultierten 10752 BAC-Klone mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 100 kb, die in 48 × 48 Blöcken aus je 8 Klonen auf Nylonmembranen punktförmig aufgebracht wurden ("3 × 3 duplicate filter"). Jeder Filter enthielt insgesamt 18432 Klone, die auf 9216 individuelle BAC-Klone zurückgehen. Anzahl und Insertionsgröße der BAC-Klone entsprachen einer sieben- bis achtfachen Genomabsättigung. Der in dieser Arbeit verwendete BAC-Filter stammt vom Ressourcen-Zentrum im Deutschen Humangenomprojekt (RZPD) am Max Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin (siehe dazu auch Mozo et al., 1998a, 1998b, 1999).

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Sequenzierung (T7, M13 "forward" bzw. "reverse", pQEIV) sowie die nachfolgend aufgezählten, sequenzspezifischen Oligonukleotide stammten von MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) und Metabion GmbH (Martinsried).

TTP30-spezifische Oligonukleotide

TTP30precursor.fwd	5'-TAGGATCCATGGCGACGGTGCTCGG-3'
TTP30precursor.rev	5'-TTAAGCTTTCATCTCTGAAGAAAGAGTG-3'
TTP30.mature1	5'-TTGGATCCCTACCGTACGATGTCGTG-3'
TTP30.mature2	5'-ATGGATCCCAGCTATGGGGGGAG-3'
TTP30MinCterm.rev	5'-CCCAAGCTTAGCCAACAGGAGGTTTCCAC-3'
TTP30TPRfwd.BamHI	5'-TAGGATCCGCTCAATTGATGTTTGAAGTGG-3'

TTP30TPRrev.EcoRI	5'-TAGAATTCCGACGATGCATAGCTGTCATAG-3'
TTP30Sacl.fwd	5'-ATCGAGCTCATGGCGGCGGTTATTGGAAAC-3'
TTP30Sacl.rev	5'-TAGGAGCTCAGAACTCTATCGCTCGTCC-3'
TTP30XbaI.fwd	5'-TGCTCTAGAATGGCGGCGGTTATTGGAAAC-3'
TTP30XbaI.rev	5'-GTCTAGAAGAACTCTATCGCTCGTCC-3'
30kDa.F	5'-CGTTGTTACTTGACGTTAACTC-3'
30kDa.R	5'-CTCGGTTCTTCTCCATACCGAC-3'

TLP40-spezifische Oligonukleotide

MAT5'BamHI	5'-CGGGATCCGTGCTTATATCTGGTCCACCG-3'
TLP40mature.rev	5'-TTGAATTCCTATCCGGCAATTTTGTAAAGTTG-3'
TLR/MinPHOS-Nde	5'-GGAATTTCCATATGTTAAAGCAGGCTTCTCGTGC-3'
TLR/MinLZIP-Nde	5'-GGAATTTCCATATGGCAGGGCTGGCTGAATC-3'
TLP40Δ2.BamHI	5'-CGCGGATCCTTAAAGCAGGCTTCTCGTGC-3'
TLP40Δ3.BamHI	5'-CGCGGATCCGCAGGGCTGGCTGAATC-3'
TLP40Immunoph.fwd	5'-GGAATTTCCATATGAATTGTGTTTTTTCGTATTGTTCTTG-3'
TLP40Imm.BamHI	5'-TAGGATCCAATTGTGTTTTTTCGTATTGTTCTTG-3'
TLP40Immunoph.PC	5'-TGCACTGCAGAATTGTGTTTTTTCGTATTGTTCTTG-3'
TLP40PBSfwd.XhoI	5'-ACCGCTCGAGGACCCAGAAGCTCTGTTGAG-3'
TLP40PBS.rev	5'-TTGAATTCACACCACGGTCTTTCTTTG-3'
TLP40L394W.fwd	5'-CTGAAAGAAAGTGAATGGACC-3'
TLP40L394W.rev	5'-GGTCCATTCATTTCTTTTCAG-3'
TLP40L137A.fwd	5'-CAGAAACCAGCTGAGGAC-3'
TLP40L137A.rev	5'-ATGTCCTCAGCTGGTTTCTG-3'
TLP40L166A.fwd	5'-TCTCGTGCAGCAAAGAATGGC-3'
TLP40L166A.rev	5'-TCTTTGCTGCACGAGAAGCCT-3'
TLP40R120I.fwd	5'-AAGCTCTGTTGATTTATGCATTG-3'
TLP40R120I.rev	5'-ATAAATCAACAGAGCTTCTGG-3'
TLP40R157I.fwd	5'-TCTGTTGAGATCAACTTAAAGC-3'
TLP40R157I.rev	5'-TGCTTTAAGTTGATCTCAACAG-3'
TLP40R184I.fwd	5'-GAAAGACATCGGTGTGGAATTG-3'
TLP40R184I.rev	5'-TCCACACCGATGTCTTTCTTTG-3'
TLP40Sacl.fwd	5'-CGAGCTCATGGCGGCGGCTTGCCTC-3'
TLP40Sacl.rev	5'-CGAGCTCAGCAATCTTGAGGCTATCAGTG-3'
TLP40XbaI.fwd	5'-TGCTCTAGAATGGCGGCGGCTTGCCTC-3'
TLP40XbaI.rev	5'-TGCTCTAGAAGCAATCTTGAGGCTATCAGTG-3'

Synechocystis-spezifische Oligonukleotide

AMS9Syn5'BamNde	5'-CGGGATCCCATATGAATTACTTGCACAAATATC-3'
AMS9Syn3'HindNot	5'-CCCAAGCTTGCTTGCGGCCGCTTACTTACTCCCGAATGACGGTG-3'
SAMS9.Histag	5'-CCCAAGCTTCTAGCGATGGCGATGGCGATGTTACTCCCGAATGACGGTG-3'
SAMS9LeuZip.XhoI	5'-ACCGCTCGAGGAGGTGATAAAGCGGGATGGG-3'
SAMS9LeuZip.EcoRI	5'-TTGAATTCGAAGTTCCTTTGATTGTGCAGAG-3'
sll0408.fwd	5'-ATGGGGGCGTTGAAGTGGG-3'
sll0408.rev	5'-TCAACTATTGCCGTTAACTAAATTG-3'
apcA.fwd	5'-ATGAGTATCGTCACGAAATC-3'
apcA.rev	5'-CTAGCTCATTTTTCCGATAAC-3'
apcB.fwd	5'-ATGCAAGACGCAATTACGG-3'
apcB.rev	5'-CTAGCTCAAGCCAGAGCAG-3'
cpcA.fwd	5'-ATGAAAACCCCTTAACTG-3'
cpcA.rev	5'-CTAGCTCAGAGCATTGATGG-3'
cpcB.fwd	5'-ATGTTTCGACGTATTCCTCGGG-3'
cpcB.rev	5'-CTAGGCTACGGCAGCAGCG-3'

Oligonukleotide für die Promotorregionen plastidärer Gene

atpB.fwd	5'-AACTAAGTCCCAGTACGATAG-3'
atpB.rev	5'-GTACCGGACCAATAATTTGAG-3'

psaA.fwd	5'-CTAAAATACTAAATCTAAGTTGCAC-3'
psaA.rev	5'-TCCAGATCCATGTAGTAGTTTC-3'
psbA.fwd	5'-CAATTCACCTCCATTATTCAC-3'
psbA.rev	5'-CTTTCGCTTTCGCGTCTCTC-3'
psbB.fwd	5'-TCTTACCAACATAGCCTTCC-3'
psbB.rev	5'-CAGCAACCAGAGCTGTATGC-3'
psbD.fwd	5'-TGCTGGAATGGAAAGATTTCG-3'
psbD.rev	5'-CAAGGAAAGAGCAATAGACC-3'

pGPTV-bar-spezifische Oligonukleotide

nos	5'-TACATGCTTAACGTAATTCAACAG-3'
35S	5'-ATCCTTCGCAAGACCCTTCC-3'

weitere Oligonukleotide

PC-TPfwd.XhoI	5'-TTCTCGAGATGGCCACCGTCGCTTCC-3'
PC-TPrev.PstI	5'-TGCACTGCAGGGCCATGGCGTTTCCGGC-3'
OmpR.BamHI	5'-CGCGGATCCATGCAAGAGAACTACAAGATTC-3'
OmpR.EcoRI	5'-TAGAATTCTCATGCTTTAGAGCCGTCC-3'

2.1.8 Antiseren

Der kolorimetrische Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte mit polyklonalen Antikörperkonjugaten mit alkalischer Phosphatase ("goat-anti-rabbit IgG alkaline phosphatase") von Sigma-Aldrich GmbH (Deisenhofen). Bei dem auf Chemilumineszenz beruhenden Nachweisverfahren wurde ein polyklonales Antikörperkonjugat mit Peroxidase ("goat-/mouse-anti-rabbit IgG horseradish peroxidase") derselben Firma oder das Western-Breeze™ Immunodetektionssystem von Invitrogen (Groningen, Niederlande) verwendet.

Proteine mit phosphorylierten Threoninresten wurden mit einem polyklonalen Phosphothreonin-Antikörper von Zymed Laboratories (San Francisco, USA) nachgewiesen. Zum Nachweis der thylakoidalen Proteinphosphatase wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die katalytische Untereinheit der menschlichen Phosphatase vom Typ 2A von Calbiochem (Bad Nauheim) verwendet. Der polyklonale Antikörper gegen die lumenale Polyphenoloxidase aus Spinat stammte von Prof. Dr. T. Kuwabara, Japan. Zum Nachweis der Polypeptiduntereinheiten der Phycobilisomen von *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde der Antikörper Phyc5A von Prof. Dr. A. Grossman, USA, verwendet.

2.1.9 Puffer und Lösungen

<u>1× TE</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
<u>50× TAE</u>	2 M	Tris
	1 M	Natriumazetat
	20 mM	EDTA
		pH 7,4 - 7,6

<u>10× TBE</u>	890 mM 890 mM 10 mM	Tris Borsäure EDTA
<u>10× PBS</u>	1,37 M 0,27 M 0,43 M 0,15 M	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
<u>10× MOPS-Puffer</u>	200 mM 50 mM 10 mM	MOPS Natriumazetat, pH 7,0 EDTA
<u>20× SSC</u>	3 M 0,3 M	NaCl Trinatriumcitratdihydrat pH 7,2
<u>20× SSPE</u>	3,6 M 0,2 M 20 mM	NaCl NaH ₂ PO ₄ EDTA pH 7,4
<u>100× Denhardt</u>	2% (w/v) 2% (w/v) 2% (w/v)	Rinderserumalbumin Ficoll 400 Polyvinylpyrrolidon
<u>Chloroform-Lösung</u>	240 ml 10 ml	Chloroform Isoamylalkohol

2.1.10 Medien für die Anzucht von Bakterien

<u>LB-Medium</u> (1 l)	10 g 5 g 5 g	Baktopepton (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) NaCl Hefeextrakt (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
<u>Indikatorplatten</u>	10 g 5 g 5 g 15 g	Baktopepton NaCl Hefeextrakt Agar (ICN GmbH, Meckenheim)

Nach dem Autoklavieren wurden 1 ml 100 mg/ml Ampicillin, 3 ml 20 mg/ml X-Gal und 1,25 ml 24 mg/ml IPTG zugegeben.

<u>YEB-Medium</u>	5 g 1 g 1 g 5 g 2 mM	Rinderextrakt (Difco, Detroit, USA) Hefeextrakt Baktopepton Saccharose MgSO ₄ pH 7,4 mit KOH
-------------------	----------------------------------	--

2.1.11 Pflanzenmaterial

Für biochemische Analysen wurde vorwiegend käuflich erworbener Spinat verwendet. Zur Isolierung von Gesamt-RNS und -DNS wurde *Spinacia oleracea* L. var. Monatol im

Gewächshaus angezogen. Für die Herstellung transgener Pflanzen wurde *Arabidopsis thaliana* L., Ökotyp Columbia (Col-0), verwendet. Transgene Gerstenpflanzen (*Hordeum vulgare* L. *chlorina-f2*) stammten von Prof. Dr. R. Bassi (Verona, Italien).

2.1.12 Cyanobakterienstämme und Anzuchtmedien

Synechocystis sp. PCC6803 Wildtyp- und Mutantenstämme stammen aus dem Labor von Prof. Dr. Shestakov (Moskau, Rußland). Verwendet wurden ein antibiotikasensitiver (WT-) und ein kanamycinresistenter Wildtypstamm (WT+), die gentamycinresistente Rotamasemutante Δ slI0408 sowie die kanamycinresistente Histidinkinase-Mutante Δ slr0311.

<u>10× BG-11-Medium</u> (1 l)	15,0 g	NaNO ₃
	0,40 g	K ₂ HPO ₄
	0,75 g	MgSO ₄ × 7 H ₂ O
	0,36 g	CaCl ₂ × 2 H ₂ O
	0,06 g	Zitronensäure
	0,06 g	Eisenammoniumcitrat
	0,01 g	Magnesium-EDTA
	0,20 g	Na ₂ CO ₃
		pH 7,0 mit HCl
<u>1000× Spurenelemente</u> (1 l)	2,86 g	H ₃ BO ₃
	1,81 g	MnCl ₂ × 4 H ₂ O
	0,22 g	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O
	0,39 g	Na ₂ MoO ₄ × H ₂ O
	0,08 g	CuSO ₄ × 5 H ₂ O
	0,05 g	Co(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O
<u>1× BG-11-Medium</u> (1 l)	100 ml	10× BG-11-Medium
	1 ml	1000× Spurenelemente

Zur Herstellung von festem Medium wurden 15 g Agar (Difco, Detroit, USA) zugegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Folgende in der vorliegenden Arbeit angewandten Standardmethoden wurden nach Sambrook et al. (1989) oder Ausubel et al. (1993) durchgeführt:

- Verdauung und Agarose-Gelelektrophorese von DNS
- Bestimmung der DNS-Konzentration
- Ligation von DNS mit T4-DNS Ligase
- Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der CaCl₂-Methode
- Transformation von *E. coli*-Zellen
- Isolierung von Plasmid-DNS nach Birnboim und Doly (1979)
- Aufreinigung von Plasmid-DNS im CsCl-Gradienten
- Amplifikation von DNS durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.2 Methoden zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Isolierung von gesamtgenomischer DNS aus Pflanzen

<u>Aufschlußpuffer</u>	7 M	Harnstoff
	250 mM	NaCl
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1% (w/v)	N-Laurylsarkosinat
	20 mM	EDTA

Vor Gebrauch wurde eine Konzentration von 0,25% (v/v) 2-Mercaptoethanol eingestellt.

<u>PEG-Lösung</u>	1,6 M	NaCl
	13% (w/v)	PEG 8000

4 g Blattmaterial von 10 bis 14 Tage alten Spinatkeimlingen wurde im Mörser in Gegenwart von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen. Nach Zugabe von 4 bis 6 ml Aufschlußpuffer wurde das Gemisch weitere 1 bis 2 Minuten gemörsert, in ein HW40-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten unter gelegentlichem Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml 1 : 1 (v/v) Phenol : Chloroform zugegeben, die Phasen durch vorsichtiges "Vortexen" 30 Sekunden gemischt, 5 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und dann 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die DNS durch Zugabe von 5 ml Isopropanol unter Schwenken ausgefällt und dann 5 Minuten bei 7000 UpM sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% (v/v) Ethanol wurde die sedimentierte DNS in 500 µl 1× TE resuspendiert und zur Beseitigung von RNS über Nacht bei 4°C mit 20 µg/ml RNase A inkubiert. Nach erneuter Extraktion mit 1 Volumen Phenol/Chloroform und dann mit 1 Volumen Chloroform wurde die DNS aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 Volumen PEG-Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur ausgefällt, 15 Minuten bei 7000 UpM sedimentiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich über Nacht bei 4°C in 200 µl 1× TE gelöst. Die DNS-Konzentration wurde durch Vergleich mit λ-DNS bekannter Konzentration im Agarosegel abgeschätzt. Bis zu ihrer Verwendung wurde die gesamtgenomische DNS bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.2 Isolierung von Plastiden-DNS aus Spinatchloroplasten

<u>50/20-Puffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	20 mM	EDTA

Aus 120 g Spinatblättern wurden intakte Chloroplasten isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.2). Die Plastiden wurden in wenig 50/20-Puffer in Gegenwart von 1% (w/v) SDS 1 Stunde bei 37°C unter Schwenken aufgeschlossen. Anschließend wurde die Plastiden-DNS durch Zugabe von 1 Volumen 1 : 1 (v/v) Phenol : Chloroform extrahiert, 10 Minuten bei 11.000 UpM zentrifugiert und die wässrige Phase erneut mit 1 Volumen Chloroform extrahiert. Die Plastiden-DNS wurde aus der wässrigen Phase mit 2 Volumen 20 : 1 (v/v) 100% Ethanol : 3 M Natriumazetat (pH 5,2) 30 Minuten bei -20°C ausgefällt und anschließend 15 Minuten bei 11.000 UpM sedimentiert. Das

Sediment wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und in 1× TE resuspendiert. Zur Beseitigung von RNS wurde die Probe über Nacht bei 4°C mit 10 µg/ml RNase A inkubiert, erneut mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert, in 70% (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich in 1× TE resuspendiert. Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Bis zu ihrer Verwendung wurde die Plastiden-DNS bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNS aus Pflanzengewebe

Die Isolierung zellulärer Gesamt-RNS aus 10 bis 14 Tage alten Spinatkeimlingen erfolgte modifiziert nach Kirby (1968) und Palmiter (1974). Diese Methode basiert auf der Beseitigung von Proteinen durch Phenol/SDS-Extraktion und anschließender Trennung der Nukleinsäuren durch spezifische Fällung der RNS mit Lithiumchlorid.

<u>Aufschlußpuffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	2% (w/v)	SDS

Vor Gebrauch wurde 200 µg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) zugegeben.

4 g Pflanzenmaterial wurden im Mörser in Gegenwart von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen. Das Zellpulver wurde portionsweise zu 20 ml auf 50°C vorgewärmtem Isolierungspuffer gegeben. Nach 10minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad wurde das Gemisch in ein HW40-Zentrifugenröhrchen mit 15 ml 1 : 1 (v/v) Phenol : Chloroform überführt, 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und dann 10 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit Phenol/Chloroform und anschließend mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/20 Volumen 3 M Natriumazetat, pH 6,0, und 1 Volumen eiskaltem Isopropanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden 20 Minuten bei 10.000 UpM sedimentiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen (maximal 10 Minuten) in 5 ml 1× TE gelöst. Zur Beseitigung der DNS wurde die hochmolekulare RNS durch Zugabe von 1 Volumen 8 M LiCl über Nacht auf Eis im Kühlraum ausgefällt und dann 20 Minuten bei 10.000 UpM sedimentiert. Nach dem Waschen mit 70% (v/v) Ethanol wurde das Sediment in 1 ml 1× TE resuspendiert. Die RNS-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm ermittelt und die Qualität der RNS-Präparation in einem 1,3%igen MOPS-Agarosegel überprüft. Die RNS-Lösung wurde in Gegenwart von 2 Volumen 20 : 1 (v/v) 100% Ethanol : 3 M Natriumazetat bei -70°C gelagert.

2.2.2.4 Radioaktive Markierung von DNS durch "random priming"

Bei der "random priming"-Reaktion nach Feinberg und Vogelstein (1983) hybridisieren Hexanukleotide an einzelsträngige DNS und dienen dann dem Klenow-Enzym als "primer" für

die Synthese des jeweils komplementären Nukleinsäurestranges. Während dieser Reaktion erfolgt der Einbau radioaktiver Nukleotide.

<u>Nukleotidgemisch</u>	0,5 mM	dATP
	0,5 mM	dGTP
	0,5 mM	dTTP

Hexanukleotid-Gemisch in 10× Reaktionspuffer (Roche GmbH, Mannheim)

<u>Reaktionsansatz</u>	x µl	DNS (100 ng)
	5,0 µl	Hexanukleotid-Gemisch
	6,0 µl	Nukleotidgemisch
	2,5 µl	Klenow-Enzym (2 E/µl; Roche GmbH)
	2,0 µl	10 µCi/µl [α - ³² P]dCTP
	ad 50,0 µl	mit ddH ₂ O

Die DNS wurde zunächst 5 Minuten bei 100°C im entsprechenden Volumen ddH₂O denaturiert und nach kurzer Inkubationszeit auf Eis mit den übrigen Bestandteilen des Reaktionsansatzes gemischt. Die nachfolgende Inkubationszeit bei 37°C betrug je nach Länge des zu markierenden DNS-Fragmentes zwischen 30 und 60 Minuten. Anschließend wurden die nicht eingebauten Radionukleotide durch Gelfiltration in einer Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Vor ihrer Hybridisierung wurden die aufgereinigten DNS-Sonden erneut 5 Minuten bei 100°C denaturiert.

2.2.2.5 Radioaktive Markierung von RNS

Für die radioaktive Markierung von Gesamt-RNS aus Spinat (siehe Abschnitt 2.2.2.3) wurde die Polynukleotidkinase-Reaktion verwendet. Dabei wird die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe der RNS übertragen. Die Herstellung radioaktiv markierter RNS-Sonden zum Nachweis von Antisens- bzw. Sens-Transkripten in transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen (siehe Abschnitt 2.2.4.4) erfolgte dagegen durch *in vitro*-Transkription der entsprechenden T-DNS-Konstruktionen in Gegenwart von [α -³²P]UTP.

Polynukleotidkinase-Reaktion

Für eine Markierungsreaktion wurden 5 bis 10 µg DNaseI-behandelte Gesamt-RNS aus 10 Tage alten Spinatkeimlingen (siehe Abschnitt 2.2.3.5) zur Beseitigung von Sekundärstrukturen 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden folgende Bestandteile zugegeben:

	2,0 µl	Polymerasepuffer (10×; NEB)
	5,0 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 E/µl; NEB)
	3,0 µl	[γ - ³² P]ATP (10 µCi/µl)
	ad 20,0 µl	mit ddH ₂ O

Die Markierungsreaktion wurde nach 30 Minuten bei 37°C durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA beendet. Anschließend wurden die nicht eingebauten Radionukleotide durch Gelfiltration in einer

Sephadex-G50-Säule abgetrennt. Vor ihrer Hybridisierung wurde die aufgereinigte RNS-Sonde erneut 5 Minuten bei 65°C denaturiert.

In vitro-Transkription

Bei diesem Markierungsverfahren wurde entweder (a) Plasmid-DNS stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt linearisiert oder (b) die entsprechende cDNS-Sequenz durch PCR in Gegenwart vektor- bzw. genspezifischer Oligonukleotide aus Plasmid-DNS amplifiziert und anschließend unter der Kontrolle des T3- bzw. T7-Promotors der komplementäre RNS-Strang synthetisiert.

<u>Reaktionsansatz</u>	2,0 µl	10× Polymerasepuffer (NEB)
	2,0 µl	0,1 M DTT
	0,5 µl	10 E/µl RNase-Inhibitor (MBI, St. Leon)
	4,0 µl	2,5 mM rNTPs ohne UTP
	2,4 µl	100 µM UTP
	x µl	DNS (100 ng)
	5,0 µl	[α- ³² P]UTP
	1,0 µl	50 E/µl T7- bzw. T3-RNS-Polymerase
	ad 20,0 µl	mit ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 2 Stunden bei 37°C und nach Zugabe von 1 µl DNaseI (Roche GmbH, Mannheim) weitere 15 Minuten bei der gleichen Temperatur inkubiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 1 Volumen 1 : 1 (v/v) Phenol : Chloroform und dann mit 1 Volumen Chloroform extrahiert, die radioaktiv markierte RNS durch Zugabe von 2 Volumen 20 : 1 (v/v) 100% Ethanol : 3 M Natriumazetat (pH 5,2) 30 Minuten bei -20°C ausgefällt und dann 10 Minuten bei 11.000 UpM sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen (maximal 5 Minuten) in 20 µl ddH₂O resuspendiert. Zur Beseitigung von Sekundärstrukturen wurde die radioaktiv markierte RNS-Sonde vor der Hybridisierung 5 Minuten bei 60°C denaturiert.

2.2.2.6 Immobilisierung von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

2.2.2.6.1 "Southern"-Transfer von DNS

<u>Denaturierungslösung</u>	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
<u>Neutralisierungslösung</u>	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris/HCl
		pH 7,0

Zur Ermittlung der Genkopienzahl von TTP30 im Genom von *S. oleracea* L. wurden 3,5 µg Gesamt-DNS aus 10 bis 14 Tage alten Spinatkeimlingen 4 Stunden bei 37°C mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 Minuten in Denaturierungslösung

inkubiert, kurz mit ddH₂O gewaschen und dann 45 Minuten neutralisiert. Der Transfer der DNS auf Nylonmembran (Biodyne B, PALL Filtron, Dreieich) erfolgte über Nacht unter Verwendung der Kapillar-Technik mit 10× SSC als Transferpuffer. Die Membran wurde nach dem Transfer der DNS 5 Minuten in 6× SSC gewaschen und anschließend 1 Stunde bei 80°C inkubiert.

2.2.2.6.2 "Northern"-Transfer von RNS

<u>RNS-Ladepuffer</u>	570 µl	Formamid
	170 µl	37% (w/v) Formaldehyd
	130 µl	10× MOPS-Puffer
	4 µl	10 mg/ml Ethidiumbromid
	130 µl	1% (w/v) Bromphenolblau
<u>Hydrolysepuffer</u>	50 mM	NaOH
	10 mM	NaCl

In der denaturierenden Formaldehyd-Gelelektrophorese wurden RNS-Moleküle unter Beseitigung von Sekundärstrukturen ihrer Länge nach aufgetrennt. Dazu wurde eine 1,5%ige Agaroselösung in ddH₂O hergestellt und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 10× MOPS-Puffer (1× Endkonzentration) und 37% (w/v) Formaldehyd (6,6% (w/v) Endkonzentration) gemischt. 50 µg Gesamt-RNS aus 10 bis 14 Tage alten Spinatkeimlingen wurden vor dem Gellauf 10 Minuten bei 60°C in wenig RNS-Ladepuffer denaturiert und dann kurz auf Eis inkubiert. Als Laufpuffer wurde 1× MOPS-Puffer verwendet. Der Transfer der RNS auf Nylonmembran (Biodyne B, PALL Filtron, Dreieich) erfolgte mit Hilfe der Kapillar-Technik in 10× SSC. Die Membran wurde anschließend 5 Minuten in 2× SSC gewaschen und dann 1 Stunde bei 80°C inkubiert.

2.2.2.7 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Nukleinsäurefragmenten

<u>Hybridisierungslösung</u>	5×	SSPE
	5×	Denhardt
	0,2% (w/v)	SDS
	200 µg/ml	Heringssperma-DNS
<u>Waschlösung I</u>	2×	SSC
	0,1% (w/v)	SDS
<u>Waschlösung II</u>	1×	SSC
	0,1% (w/v)	SDS

Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Nylonmembran bei der gewünschten Temperatur mindestens 3 Stunden in Hybridisierungslösung inkubiert. Nach Beendigung der Vorhybridisierung wurde die radioaktive Sonde 5 Minuten bei 100°C (DNS) bzw. 60°C (RNS) denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und dann in 5 ml frischer Hybridisierungslösung über Nacht mit der Membran inkubiert. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch mehrere aufeinanderfolgende Waschschriffe entfernt. Radioaktive Signale wurden anschließend durch

Exposition eines Röntgenfilms oder durch "phosphoimaging" nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.2.5.17).

2.2.3 Analyse von *Synechocystis* sp. PCC6803

2.2.3.1 Anzuchtbedingungen

Synechocystis sp. PCC6803 Wildtyp- bzw. Mutanten-Kulturen wurden bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ und $24,5^\circ\text{C}$ unter kontinuierlichem Schütteln angezogen. Das Wachstum erfolgte in $1\times$ BG-11-Medium (Allen, 1968), dem je nach Kultur entweder kein Antibiotikum (WT-) oder $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin (WT+ und $\Delta\text{slr}0311$) bzw. $0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin ($\Delta\text{slI}0408$) zugegeben wurde. Die Zelldichte der Kulturen wurde durch Messung der Extinktion bei 800 nm ermittelt und als Bezugsgröße herangezogen.

2.2.3.2 Bestimmung der Pigmentkonzentration und Extinktionseigenschaften

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde 1 ml Kultur entnommen und 3 Minuten bei 11.000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in $20 \mu\text{l}$ ddH_2O aufgenommen und nach Zugabe von $980 \mu\text{l}$ 100% Methanol erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktion der Pigmente im Überstand bei 666 nm ermittelt. Die Pigmentkonzentration (mg/ml) wurde über die Formel $26,84 \times E_{666\text{nm}}$ berechnet.

Die Pigmentzusammensetzung der Zellen wurde durch Messung der Extinktion im Wellenlängenbereich von 350 bis 750 nm in 2 nm -Schritten ermittelt (Uvikon Spektrophotometer 922, Biotek Kontron Instruments, Italien). Die graphische Darstellung erfolgte in Form einer Kurve, aus der die Extinktionsmaxima der verschiedenen Pigmente (Carotinoide, Chlorophyll *a*, Phycobiliproteine) hervorgehen.

2.2.3.3 Extraktion von Gesamtmembranen

<u>Puffer 1</u>	500 mM	Saccharose
	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,0
	15 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
<u>Puffer 2</u>	10 mM	Tricin/NaOH, pH 7,5
	175 mM	Saccharose
	30 mM	DTT

50 ml Kultur wurden 5 Minuten bei 3500 UpM sedimentiert und anschließend in maximal $200 \mu\text{l}$ Puffer 1 resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte nach Zugabe von 1 Volumen Glasperlen (B. Braun, Melsungen), äquilibriert in Puffer 1, durch "Vortexen" für dreimal 2 Minuten mit dazwischenliegenden Inkubationen auf Eis. Der grüne Überstand wurde in ein

frisches Reaktionsgefäß überführt, und die sedimentierten Glasperlen wurden so lange mit Puffer 1 gewaschen, bis sie vollständig entfärbt waren. Die Überstände wurden vereinigt und zur Beseitigung von Zelltrümmern 10 Minuten bei 2000 UpM zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Membranen wurden anschließend 1 Stunde bei 15.000 UpM sedimentiert, in Puffer 1 gewaschen und schließlich in wenig Puffer 2 resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Membranfraktionen wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

2.2.3.4 Isolierung von gesamtgenomischer DNS

<u>STET-Puffer</u>	8% (w/v)	Saccharose
	5% (v/v)	Triton X-100
	50 mM	EDTA, pH 8,0
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0

<u>Lysozymbilösung</u>	30 mg/ml	Lysozym (Fluka, Neu-Ulm)
------------------------	----------	--------------------------

Es wurden 1,5 ml Kultur 5 Minuten bei 3500 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml 1× TE gewaschen, erneut zentrifugiert und dann in 270 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Chloroform wurde das Gemisch 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend 1 Stunde bei 37°C mit 45 µl Lysozymbilösung und nach Zugabe von 100 µl 10% (w/v) SDS weitere 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Die vollständige Lyse der Zellen wurde nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl und 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Braunfärbung angezeigt. Nach zweimaliger Extraktion mit je 1 Volumen Chloroform wurde die DNS aus der wässrigen Phase mit 1 Volumen Isopropanol 20 Minuten bei Raumtemperatur ausgefällt und anschließend 30 Minuten bei 11.000 UpM sedimentiert. Das Sediment wurde dreimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich in 25 µl 1× TE aufgenommen. Die DNS-Konzentration wurde wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben ermittelt. Bis zu ihrem weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Isolierung von Gesamt-RNS und Herstellung von cDNS durch reverse Transkription

Zur Analyse der Genexpression von *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- und Mutantenstämmen wurde zunächst Gesamt-RNS isoliert und daraus mit Hilfe der reversen Transkription unter Verwendung eines Hexanukleotidgemisches einzelsträngige cDNS hergestellt. Die cDNS diente in einer nachfolgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) als Matrize für sequenzspezifische Oligonukleotide. Auf diese Weise wurde die Transkription der Gene für die Untereinheiten der Phycobiliproteine Allophycocyanin und Phycocyanin untersucht.

Isolierung von Gesamt-RNS

Es wurden 50 ml *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- bzw. Mutantenkultur 5 Minuten bei 3500 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in Gegenwart von flüssigem Stickstoff im Mörser zu feinem Pulver zermahlen, mit 1 ml Trizol-Lösung (Gibco BRL, Eggenstein) versetzt und anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde in einem Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform 2 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt und dann 15 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde die RNS aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 Minuten bei Raumtemperatur ausgefällt, 15 Minuten bei 12.000 UpM sedimentiert und nach dem Waschen in 70% (v/v) Ethanol in 40 µl ddH₂O aufgenommen. Die RNS-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion bei 260 bzw. 280 nm ermittelt.

Herstellung von cDNS durch reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNS durch das Enzym reverse Transkriptase in den komplementären cDNS-Erststrang umgeschrieben. Verunreinigungen mit DNS müssen durch eine vorangehende DNaseI-Behandlung der RNS zunächst beseitigt werden. Die Effizienz dieser Behandlung kann durch PCR, bei der die DNaseI-behandelte RNS als Matrize dient, überprüft werden.

DNaseI-Behandlung

<u>10× DNaseI-Puffer</u>	400 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	MgCl ₂

Es wurden 5 bis 10 µg RNS-Lösung mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 175 µl gebracht. Nach Zugabe von 20 µl 10× DNaseI-Puffer, 4 µl 10 E/µl DNaseI (Roche GmbH, Mannheim) und 0,5 µl 40 E/µl RNasin (Promega GmbH, Mannheim) wurde der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daran schlossen sich zwei Extraktionsschritte mit je 1 Volumen 1 : 1 (v/v) Phenol : Chloroform und ein Schritt mit 1 Volumen Chloroform an. Anschließend wurde die RNS durch Zugabe von 2,5 Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat (pH 5,2) über Nacht bei -20°C aus der wässrigen Phase ausgefällt. Die sedimentierte RNS wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und dann in 13,4 µl ddH₂O resuspendiert. Die Vollständigkeit der DNaseI-Behandlung wurde durch PCR mit 1 µl DNaseI-behandelter RNS als Matrize in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide überprüft.

Reverse Transkription

Es wurden 12,4 µl der DNaseI-behandelten RNS und 1 µl 10× Hexanukleotidgemisch (Roche GmbH, Mannheim) 5 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend folgende Bestandteile dazugeben:

0,2 µl	40 E/µl RNasin (Promega GmbH, Mannheim)
0,4 µl	0,1 M DTT (Gibco, BRL, Eggenstein)
8,0 µl	5× Reverse Transkriptase-Puffer (Gibco BRL, Eggenstein)
16,0 µl	2 mM dNTPs (Roth GmbH, Karlsruhe)
1,0 µl	200 E/µl SuperScript™ Reverse Transkriptase (Gibco BRL)

Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 12 µl 2 N NaOH, 8 µl 50 mM EDTA und 20 µl ddH₂O zugegeben, und der Ansatz wurde 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die einzelsträngige cDNS durch Zugabe von 96 µl 1 M Tris/HCl, pH 7,5, und 440 µl 100% Ethanol ausgefällt, 30 Minuten bei 12.000 UpM sedimentiert und nach dem Waschen mit 70% (v/v) Ethanol in 25 bis 50 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.3.6 Untersuchung des *in vivo*-Translationsmusters durch "pulse/chase"-Markierung

Wildtyp- und Mutantenkulturen gleicher Zelldichte wurden unter Niedriglichtbedingungen (50 µE/m² × Sekunde⁻¹) in Gegenwart von 1 µl L-³⁵S-Methionin/ml Kultur bei 24,5°C inkubiert. Nach 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten wurden jeweils 2 ml Kultur entnommen. Die Translation wurde durch Zugabe von 200 µg/ml Chloramphenicol gestoppt. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten bei 7500 UpM sedimentiert und in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Die *in vivo*-Translationsprodukte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.15), und das Translationsmuster wurde nach dem Trocknen des Gels durch Autoradiographie analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.17).

2.2.4 Herstellung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

2.2.4.1 Herstellung von T-DNS-Konstruktionen für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* L.

Die N-terminale kodierende Sequenz von TTP30 bzw. TLP40 wurde durch PCR in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide aus der pGAD-cDNS-Bibliothek von *A. thaliana* L. amplifiziert. Über diese Oligonukleotide wurden die erforderlichen Restriktionsschnittstellen an den 5'- bzw. 3'-Enden der Amplifikate eingeführt. Die DNS-Fragmente wurden nach ihrer Restriktion mit *SacI* und *XbaI* in Antisens- bzw. Sens-Orientierung in die entsprechenden Schnittstellen des binären Vektors pGPTV-bar 35S-nos kloniert. Folgende sequenzspezifischen Oligonukleotide wurden zur Herstellung der T-DNS-Konstruktionen verwendet (siehe auch Abschnitt 2.1.7):

TTP30 <i>SacI</i> .fwd + TTP30 <i>XbaI</i> .rev	540 bp Antisens-Fragment
TTP30 <i>XbaI</i> .fwd + TTP30 <i>SacI</i> .rev	540 bp Sens-Fragment
TLP40 <i>SacI</i> .fwd + TLP40 <i>XbaI</i> .rev	393 bp Antisens-Fragment
TLP40 <i>XbaI</i> .fwd + TLP40 <i>SacI</i> .rev	393 bp Sens-Fragment

2.2.4.2 Herstellung und Transformation kompetenter Agrobakterien

Die Herstellung kompetenter Agrobakterien erfolgte nach der Gefrier-/Auftau-Methode von Holsters et al. (1987).

<u>Rifampicin-Stammlösung</u>	50 mg/ml	in DMSO
<u>Kanamycin-Stammlösung</u>	100 mg/ml	in ddH ₂ O
<u>YEB-Rifampicin-Medium</u>	0,10 mg/ml	YEB-Medium Rifampicin
<u>YEB-Rifampicin-Kanamycinplatten (1 l)</u>	15,0 g 0,10 mg/ml 0,05 mg/ml	YEB-Medium Agar (Difco, Detroit, USA) Rifampicin Kanamycin

Zur Herstellung kompetenter Agrobakterien wurden 5 ml YEB-Rifampicin-Medium mit 50 µl *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Stammkultur inokuliert und 2 Tage bei 28°C angezogen. Zwei Milliliter dieser Vorkultur wurden in 50 ml YEB-Rifampicin-Medium überführt und bis zum Erreichen einer E_{600nm} von 1,0 bei 28°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 20 Minuten bei 3500 UpM sedimentiert, in 1 ml 10 mM CaCl₂ resuspendiert und in 100 µl-Portionen bei -70°C gelagert.

Für die Transformation kompetenter Agrobakterien wurden 2 µl Plasmid-DNS mit 100 µl gefrorenen, kompetenten Agrobakterien 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Rifampicin-Medium wurde der Ansatz 2 bis 4 Stunden bei 28°C angezogen und dann auf zwei YEB-Rifampicin-Kanamycin-Platten ausgestrichen. Mit den nach 2 bis 3 Tagen bei 28°C sichtbaren Kolonien wurden je 5 ml YEB-Rifampicin-Kanamycin-Medium angeimpft. Die cDNS-Insertionen wurden durch PCR in Gegenwart der Vektor-spezifischen Oligonukleotide nos und 35S (siehe Abschnitt 2.1.7) in der Agrobaktériensuspension nachgewiesen. Von den transformierten Agrobakterien wurden Stammkulturen bestehend aus 700 µl 70% (v/v) Glycerin und 300 µl Übernachtskultur angelegt und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C gelagert.

2.2.4.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* L.

Die *in planta*-Transformation von *A. thaliana* L. erfolgte durch die Vakuuminfiltration nach Bechthold et al. (1993).

<u>10× B5-Makro-Salze</u>	25,0 g	KNO ₃
	1,5 g	CaCl ₂ × 2 H ₂ O
	2,5 g	MgSO ₄ × 7 H ₂ O
	1,5 g	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O
	1,34 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,4 g	Eisen(III)-NaEDTA

<u>1000× B5-Mikro-Salze</u>	0,75 g	KJ
	3,0 g	H ₃ BO ₃
	10,0 g	MnSO ₄ × H ₂ O
	2,0 g	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O
	0,25 g	Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O
	25 mg	CuSO ₄ × 5 H ₂ O
	25 mg	CoCl ₂ × 6 H ₂ O
<u>100× B5-Vitamine (100 ml)</u>	0,1 g	Nikotinsäure
	1,0 g	Thiaminiumchlorid
	0,1 g	Pyridoxolhydrochlorid
	10,0 g	Myo-Inosit
<u>Infiltrationsmedium (1 l)</u>	50 ml	10× Makro-Salze
	0,5 ml	1000× Mikro-Salze
	10 ml	100× B5-Vitamine
	50 g	Saccharose
		pH 5,8 mit KOH

Nach dem Autoklavieren wurden 10 µl 1 mg/ml Benzylaminopurin zugegeben.

Es wurden 25 ml YEB-Rifampicin-Kanamycin-Medium mit 25 µl Stammkultur transformierter Agrobakterien inokuliert und 1 Tag bei 28°C inkubiert. Die Vorkultur wurde in 500 ml frisches Medium überführt und bis zum Erreichen einer E_{600nm} von 1,2 weiterhin bei 28°C angezogen (1 bis 2 Tage). Die Zellen wurden 10 Minuten bei 4000 UpM sedimentiert und anschließend dreimal in je 100 ml Infiltrationsmedium gewaschen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 3750 UpM wurden die sedimentierten Zellen in 100 ml Infiltrationsmedium aufgenommen, und der Ansatz wurde auf zwei 50 ml Sarstedt-Gefäße verteilt. Je ein 50 ml-Ansatz wurde in eine Magentabox überführt, diese mit Infiltrationsmedium bis zum Rand aufgefüllt. Darin wurden jeweils 6 *Arabidopsis*-Pflanzen kopfüber je 15 Minuten unter Vakuum (Diaphragma Vakuumpumpe MD 4C, Vacuubrand GmbH + Co.) mit der Agrobaktériensuspension infiltriert. Auf diese Weise wurden pro T-DNS-Konstruktion 12 *Arabidopsis*-Pflanzen behandelt. Zur Verbesserung der Transformationseffizienz wurde die Infiltration der Pflanzen nach 10 Tagen erneut wie beschrieben durchgeführt.

2.2.4.4 Selektion und Analyse transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

<u>Selektionsplattenmedium (1 l)</u>	50 ml	10× Makro-Salze
	0,5 ml	1000× Mikro-Salze
	10 ml	100× B5-Vitamine
	15 g	Saccharose
	8 g	Agar (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
		pH 5,8 mit KOH

Nach dem Autoklavieren wurden 120 µl DL-Phosphinotricin (250 mg/ml; Riedel de Häen AG, Hannover) und 2 ml Cefotaxim (100 mg/ml; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) zugegeben.

Nach dem Abreifen der infiltrierten Pflanzen wurden die Samen geerntet und die Integration der T-DNS-Konstruktionen in das Genom der T1-Pflanzen über ihre Resistenz gegenüber dem Herbizid Phosphinotricin ("BASTA") nachgewiesen. Dazu wurden die sterilisierten Samen (400 bis 500 Stück pro Infiltrationsereignis) auf Selektionsplatten mit 30 mg/l Phosphinotricin ausplattiert, 2 Tage bei 4°C gelagert und anschließend bei einer Lichtintensität von ca. 100 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ in der Klimakammer (25°C) angezogen. Resistente Keimlinge mit gut entwickeltem Wurzelsystem wurden in Erde überführt und 4 bis 6 Tage später mit 0,1% (v/v) "BASTA"-Lösung (Agrevo) angesprüht. Zum Nachweis der T-DNS-Insertionen wurde gesamtgenomische DNS aus den resistenten T1-Pflanzen isoliert (siehe Abschnitt 2.2.2.1) und in einer nachfolgenden PCR in Gegenwart der Vektor-spezifischen Oligonukleotiden nos und 35S (siehe Abschnitt 2.1.7) als Matrize eingesetzt. Die Expression der Antisens- bzw. Sens-Transkripte in den transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde mit Hilfe der "Northern"-Analyse untersucht (siehe Abschnitt 2.2.2.6.2). Die radioaktiv markierten RNS-Sonden wurden wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben durch *in vitro*-Transkription aus den entsprechenden T-DNS-Konstruktionen hergestellt.

2.2.5 Methoden zur Isolierung und Analyse von Proteinen

2.2.5.1 Gesamtproteinextrakte aus Pflanzengewebe

<u>Aufschlußpuffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	2 mM	EGTA
	10 mM	EDTA

Vor Gebrauch wurde eine DTT-Konzentration von 10 mM DTT eingestellt.

Es wurden 200 mg Blattmaterial in Gegenwart von flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermahlen und anschließend in 1 Volumen Aufschlußpuffer 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1 Volumen Aufschlußpuffer wurde das Homogenat entweder direkt verwendet (Gesamtzellextrakt) oder durch 1 Lage Miracloth (100 μm ; Calbiochem, Bad Nauheim) filtriert. Im Filtrat (Gesamtmembranfraktion) verbliebene Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 5000 UpM abgetrennt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976).

2.2.5.2 Isolierung von Thylakoidmembranen aus intakten Plastiden

<u>1× Homogenisierungsmedium</u>	330 mM	Sorbit
	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,6
	2 mM	EDTA
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	MnCl ₂

Vor Gebrauch wurde eine Natriumascorbat-Konzentration von 5 mM eingestellt.

<u>PBF-Percoll-Stammlösung</u>	3% (w/v)	PEG 6000
	1% (w/v)	BSA
	1% (w/v)	Ficoll 400

in Percoll (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) gelöst

<u>Gradientenlösungen</u>	45% (v/v) bzw.	85% (v/v)	PBF-Percoll
		330 mM	Sorbit
		50 mM	HEPES/KOH, pH 7,6
		2 mM	EDTA
		1 mM	MgCl ₂

<u>Lysepuffer</u>	10 mM	HEPES/KOH, pH 8,0
	5 mM	MgCl ₂

<u>STKM-Puffer</u>	200 mM	Saccharose
	20 mM	Tricin/NaOH, pH 8,0
	3 mM	KCl
	3 mM	MgCl ₂

Es wurden $n \times 60$ g Blattmaterial im Waring Blendor in $n \times 170$ ml Homogenisierungsmedium zerkleinert. Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Miracloth (100 μ m, Calbiochem, Schwalbach) filtriert, anschließend 2 Sekunden bei 5000 UpM zentrifugiert und ohne Bremse sedimentiert. Das Sediment wurde mit einem Pinsel vorsichtig in je 4 ml Medium pro 60 g Blattmaterial gelöst und auf diskontinuierliche Percollgradienten, bestehend aus 10 ml 85%iger und 12 ml 45%iger Gradientenlösung, geladen. Die Trennung von intakten und gebrochenen Chloroplasten erfolgte während der 10minütigen Zentrifugation bei 10.000 UpM im Ausschwingrotor (JS13.1, Beckman Coulter). Gebrochene Chloroplasten im oberen Bereich der 45%igen Gradientenlösung wurden entfernt. Die intakten Plastiden an der Phasengrenze zwischen 45%iger und 85%iger Gradientenlösung wurden vorsichtig abgenommen und Percollreste durch zweimaliges Waschen mit 10 Volumen Medium entfernt. Die Chloroplasten wurden 5 Sekunden bei 5000 UpM zentrifugiert, ohne Bremse sedimentiert und schließlich in wenig Medium aufgenommen. Der Chlorophyllgehalt wurde nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt.

Zur Isolierung der Thylakoidmembranen wurden die Chloroplasten bei einer Chlorophyllkonzentration von 0,75 mg/ml 10 Minuten auf Eis in Lysepuffer aufgebrochen und dann 5 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Aufreinigung stromaler Proteine verwendet. Die sedimentierten Thylakoidmembranen wurden zweimal in Lysepuffer gewaschen und schließlich in STKM-Puffer resuspendiert. Der Chlorophyllgehalt der Thylakoidmembranen wurde bestimmt, und die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch portionsweise bei -70°C gelagert.

2.2.5.3 Isolierung von AMS-Fraktionen mit Kinaseaktivität

Die Isolierung von Cytochrom *b/f*-Komplex angereicherten AMS-Fraktionen erfolgte nach der Methode von Gal et al. (1992, 1995).

<u>Natriumcholat-Stammlösung</u>	20% (w/v)	Natriumcholat (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
<u>Octylglucopyranosid-Stammlösung</u>	500 mM	Octyl- β -D-glucopyranosid (ICN GmbH, Meckenheim)
<u>Resuspendierungspuffer</u>	25 mM 25 mM	Octyl- β -D-glucopyranosid Tris/HCl, pH 7,5

Aus 600 g Spinatblättern wurden intakte Chloroplasten wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben isoliert und durch osmotischen Schock aufgebrochen. Die gewaschenen Thylakoidmembranen wurden mit STKM-Puffer auf einen Chlorophyllgehalt von 1,5 mg/ml eingestellt. Die Solubilisierung der Thylakoidmembranen und die Fällung integraler Proteinkomplexe erfolgte durch wechselweise Zugabe von 0,5 M Octyl- β -D-glucopyranosid (28 mM Endkonzentration) und 20% (w/v) Natriumcholat (0,5% (w/v) Endkonzentration) sowie festem Ammoniumsulfat (10% Sättigung). Nach 30minütigem Rühren bei 4°C wurde die Suspension 1 Stunde bei 40.000 UpM zentrifugiert (70 Ti; Beckman Coulter). Das Sediment wurde verworfen. Im Überstand wurde durch portionsweise Zugabe von festem Ammoniumsulfat eine Sättigung von 40% eingestellt, die Suspension 30 Minuten bei 4°C gerührt und anschließend 20 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Proteine im Überstand wurden durch eine Sättigung von 55% Ammoniumsulfat, wie beschrieben, ausgefällt und 20 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Das Sediment (AMS-Fraktion) wurde in 0,5 bis 1,0 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen, portioniert und bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C gelagert. Die Kinaseaktivität der subthylakoidalen AMS-Fraktion wurde, wie in Abschnitt 2.2.5.10.2 beschrieben, überprüft.

2.2.5.4 Aufreinigung von Proteinkomplexen der Thylakoidmembran

2.2.5.4.1 Auftrennung supramolekularer Proteinkomplexe partiell solubilisierter Thylakoidmembranen

Die Auftrennung der supramolekularen Proteinkomplexe partiell solubilisierter Thylakoidmembranen in kontinuierlichen Saccharosegradienten erfolgte modifiziert nach Müller und Eichacker (1999) und Eshaghi et al. (1999).

<u>Homogenisierungsmedium</u>	300 mM 50 mM 5 mM	Saccharose NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 MgCl ₂
<u>Lysepuffer</u>	5 mM	MgCl ₂
<u>Resuspendierungspuffer</u>	400 mM 50 mM 15 mM	Saccharose MES, pH 6,5 NaCl
<u>Waschpuffer</u>	20 mM 5 mM 15 mM	MES, pH 6,5 MgCl ₂ NaCl

<u>TMK-Puffer</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	10 mM	MgCl ₂
	20 mM	KCl

10% (w/v) n-Dodecyl-β-D-maltosid (DM) in TMK-Puffer

Gradientenlösungen 0,1 und 1,0 M Saccharose in TMK-Puffer mit 0,06% (v/v) DM

Es wurden 100 g Spinatblätter in 200 ml Homogenisierungsmedium im Waring Blendor zerkleinert, das Homogenat wurde durch 4 Lagen Miracloth (100 µm, Calbiochem) filtriert und anschließend 3 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in Medium resuspendiert und erneut 5 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Chloroplasten wurden in Lysepuffer 5 Minuten auf Eis durch osmotischen Schock aufgebrochen und nach Zugabe von 1 Volumen Resuspendierungspuffer 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Thylakoidmembranen wurden in Waschpuffer resuspendiert, 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert und in TMK-Puffer resuspendiert. Thylakoidmembranen, entsprechend 0,4 mg Chlorophyll, wurden 5 Minuten bei 5000 UpM sedimentiert und anschließend in 100 µl TMK-Puffer resuspendiert. Die Solubilisierung der Membranen erfolgte nach Zugabe von 300 µl 2% (w/v) DM in TMK-Puffer für 10 Minuten auf Eis. Nicht solubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 15.000 UpM sedimentiert, der grüne Überstand auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten (0,1 - 1,0 M) geladen und 16 Stunden bei 36.000 UpM (SW41, Beckman Coulter) zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient entweder manuell von unten nach oben oder mit Hilfe eines Fraktionssammelgerätes (Eigenbau, Werkstatt) von oben nach unten in 400 µl-Portionen unterteilt. Je 70 µl der Proteinfractionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.15) und anschließend auf Nitrozellulosemembran immobilisiert. Die Polypeptiduntereinheiten der thylakoidalen Proteinkomplexe wurden mit Hilfe spezifischer Antiseren lokalisiert (siehe Abschnitt 2.2.5.14.2).

2.2.5.4.2 Aufreinigung von PSI, ATP-Synthase und Cytochrom *b/f*-Komplex

<u>Homogenisierungsmedium</u>	300 mM	Saccharose
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM	NaCl

Kurz vor Gebrauch wurde eine Konzentration von 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol eingestellt.

<u>Lysepuffer</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
-------------------	-------	------------------

4M NaCl

<u>Resuspendierungspuffer</u>	250 mM	Saccharose
	10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	5 mM	KCl
	3 mM	MgCl ₂

0,5 M Octyl-β-D-glucopyranosid

20% (w/v) Natriumcholat

<u>Dialysepuffer</u>	30 mM	Tris/Succinat, pH 6,5
	0,5 mM	EDTA
	0,2% (v/v)	Triton X-100

20% (w/v) Triton X-100Gradientenlösungen für ATP-Synthase und Cytochrom *b/f*-Komplex

7% (w/v) bzw. 30% (w/v)	Saccharose
30 mM	Tris/Succinat, pH 6,5
0,2% (v/v)	Triton X-100

Gradientenlösung für PSI und PSII

5% (w/v) bzw. 30% (w/v)	Saccharose
20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
0,2% (v/v)	Triton X-100

Es wurden 500 g Spinatblätter im Waring Blendor portionsweise in je 2 Volumen Homogenisierungsmedium zerkleinert. Das Homogenat wurde durch 2 Lagen Miracloth (100 µm, Calbiochem) filtriert und dann 90 Sekunden bei 3200 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 ml Medium resuspendiert, wie beschrieben zentrifugiert und anschließend in 10 bis 20 ml Medium pro Zentrifugenbecher aufgenommen. Die Lyse der Chloroplasten erfolgte durch Zugabe von 20 Volumen Lysepuffer für 5 bis 10 Minuten auf Eis. Durch Zugabe von 4 M NaCl wurde eine Endkonzentration von 0,2 M eingestellt. Die Thylakoidmembranen wurden dann 10 Minuten bei 8000 UpM sedimentiert und mit Resuspendierungspuffer auf einen Chlorophyllgehalt von 1 mg/ml gebracht. Die Solubilisierung der Thylakoidmembranen erfolgte in Gegenwart von 30 mM Octyl-β-D-glucopyranosid, 0,5% (w/v) Natriumcholat und Ammoniumsulfat (10% Sättigung) unter Rühren für 30 Minuten auf Eis. Die unter diesen Bedingungen noch nicht solubilisierten Photosysteme wurden 1 Stunde bei 49.000 UpM sedimentiert (70Ti, Beckman Coulter). Der Überstand wurde für die Aufreinigung der ATP-Synthase und des Cytochrom *b/f*-Komplexes verwendet, das Sediment bis zur Aufreinigung der beiden Photosysteme bei -70°C gelagert.

Aufreinigung von ATP-Synthase und Cytochrom *b/f*-Komplex

Aus dem Überstand der Ultrazentrifugation wurden ATP-Synthase und Cytochrom *b/f*-Komplex durch stufenweise Fällung mit Ammoniumsulfat weiter aufgereinigt und im nachfolgenden Saccharosegradienten voneinander getrennt. Dazu wurde im Überstand durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat zunächst eine Sättigung von 30% eingestellt. Die Suspension wurde 20 Minuten auf Eis gerührt und dann 10 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert. Die genannten Proteinkomplexe wurden aus dem Überstand durch eine Sättigung von 60% Ammoniumsulfat wie beschrieben ausgefällt und schließlich 10 Minuten bei 10.000 UpM sedimentiert. Das Sediment wurde in wenig Dialysepuffer resuspendiert und dann 1 Stunde bei 4°C gegen denselben Puffer dialysiert. Je 1 ml Dialysat wurde auf einen 7 bis 30%igen Saccharosegradienten (10 ml) geladen und die beiden Proteinkomplexe 18 Stunden bei 40.000 UpM voneinander getrennt. Nach der Zentrifugation befand sich der Cytochrom *b/f*-Komplex als

bräunliche Bande im oberen Drittel des Gradienten, während die ATP-Synthase in der unteren Hälfte akkumulierte. Der Gradient wurde mit Hilfe eines Fraktionssammelgerätes (Eigenbau, Werkstatt) von oben nach unten in 400 µl-Portionen unterteilt. Die Polypeptidzusammensetzung von je 70 µl der Proteinfractionen wurde nach SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.5.15) durch Silberfärbung untersucht (siehe Abschnitt 2.2.5.16).

Aufreinigung von PSI

Das Sediment der Ultrazentrifugation wurde mit Lysepuffer auf einen Chlorophyllgehalt von 1,5 mg/ml eingestellt. Durch tropfenweise Zugabe von 20% (v/v) Triton X-100 wurde eine Endkonzentration von 2% (v/v) erreicht und die Suspension 30 Minuten auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.000 UpM befanden sich PSI und die Antennen-Komplexe des PSII im Überstand. Je 1 ml Überstand wurde auf einen 5 bis 30%igen Saccharosegradienten (10 ml) geladen und 18 h bei 40.000 UpM zentrifugiert. Die Gradienten wurden wie oben beschrieben fraktioniert, und die Proteinzusammensetzung der Fraktionen wurde im SDS-Polyacrylamidgel analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.15).

2.2.5.4.3 Isolierung von PSII-LHCII-Superkomplexen

Die Isolierung von PSII-LHCII-Superkomplexen aus Thylakoidmembranen erfolgte nach der Methode von Eshaghi et al. (1999).

<u>Homogenisierungsmedium</u>	50 mM 300 mM 5 mM	HEPES, pH 7,5 Saccharose MgCl ₂
<u>Lysepuffer</u>	5 mM	MgCl ₂
<u>Resuspendierungsspuffer</u>	50 mM 400 mM 15 mM 5 mM	MES, pH 6,0 Saccharose NaCl MgCl ₂
<u>Waschpuffer</u>	25 mM 10 mM 5 mM	MES, pH 6,0 NaCl MgCl ₂
<u>MNMβ-Puffer</u>	25 mM 10 mM 5 mM 2 M	MES, pH 6,0 NaCl MgCl ₂ Glycinbetain
<u>MNCβ-Puffer</u>	25 mM 10 mM 5 mM 2 M 0,03% (w/v)	MES, pH 5,7 NaCl CaCl ₂ Gylcinbetain n-Dodecyl-β-D-maltosid
<u>Gradientenlösungen</u>	20%, 10%, bzw. 0,5% (w/v)	Saccharose in MNCβ-Puffer

Es wurden 100 g Spinatblätter in 200 ml Homogenisierungsmedium im Waring Blendor zerkleinert, das Homogenat wurde durch 4 Lagen Miracloth (100 μm , Calbiochem) filtriert und anschließend 3 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Chloroplasten wurden in Medium gewaschen und anschließend in Lysepuffer 5 Minuten auf Eis durch osmotischen Schock aufgebrochen. Nach Zugabe von 1 Volumen Resuspendierungspuffer wurden die Thylakoidmembranen 10 Minuten bei 3000 UpM sedimentiert, in Waschpuffer resuspendiert und erneut 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Membranen wurden in MNM β -Puffer aufgenommen, und der Chlorophyllgehalt wurde nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt.

Zur Herstellung der diskontinuierlichen Saccharosegradienten wurden pro SW28-Zentrifugenröhrchen 4 ml 20%ige (w/v) Saccharoselösung vorgelegt. Dieses Saccharosekissen wurde in 2 ml-Schritten mit einem Gemisch aus 0,5 und 10%iger (w/v) Saccharoselösung so überschichtet, daß schließlich von unten nach oben ein diskontinuierlicher Gradient von 10 bis 0,5% (w/v) Saccharose vorlag. Thylakoide entsprechend 0,5 mg Chlorophyll/ml wurden in Gegenwart von 1% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid in MNM β -Puffer solubilisiert und anschließend auf einen vorbereiteten Saccharosegradienten geladen. Die Trennung von trimeren LHCII-Komplexen, PSI-Monomeren und PSII-LHCII-Superkomplexen erfolgte während der 14stündigen Zentrifugation bei 27.000 UpM (SW28; Beckman Coulter). Die Proteinkomplexe wurden mit Hilfe einer Spritze abgenommen, in Centricon-Einheiten (Amicon, Beverly, USA; 10 kDa "cut-off") konzentriert und ihre Polypeptidzusammensetzung im SDS-Polyacrylamidgel (siehe Abschnitt 2.2.5.15) untersucht.

2.2.5.5 Präparation von PSII-Partikeln (BBY-Membranen)

Die Isolierung von Granapartikeln, die mit PSII angereichert sind und als BBY-Membranen bezeichnet werden, erfolgte nach der Methode von Berthold et al. (1981) und Arellano et al. (1994).

Thylakoidmembranen wurden aus 100 g Spinatblättern isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.4.1), in Waschpuffer aufgenommen, erneut 10 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert und anschließend mit Waschpuffer ein Chlorophyllgehalt von 2,67 mg/ml eingestellt. Nach tropfenweiser Zugabe von 1/3 Volumen 20% (v/v) Triton X-100 wurde die Suspension 20 Minuten auf Eis gerührt. Stärke und nicht solubilisiertes Material wurden anschließend durch Zentrifugation für 4 Minuten bei 9000 UpM abgetrennt. Die BBY-Membranen im Überstand wurden 30 Minuten bei 19.000 UpM sedimentiert, in Waschpuffer resuspendiert, erneut 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und schließlich in Resuspendierungspuffer aufgenommen. Die Qualität der Präparation wurde über das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis nach Arnon (1949) abgeschätzt, das bei $\leq 1,8$ liegen sollte.

2.2.5.6 Subfraktionierung von Thylakoidmembranen mittels "phase-partition"

Die Thylakoidmembranen höherer Pflanzen zeichnen sich durch eine strukturelle Differenzierung in gestapelte und ungestapelte Bereiche aus, die sich in der lateral heterogenen Verteilung von Proteinkomplexen, Lipiden und Pigmenten widerspiegelt. Neben der Isolierung einzelner Proteinkomplexe (siehe Abschnitt 2.2.5.4), bietet die Isolierung von Membranvesikeln, in denen die Komponenten in ihrer natürlichen Lipidumgebung erhalten bleiben, eine weitere Möglichkeit zur Subfraktionierung. Nach der mechanischen Zerstörung des Thylakoidsystems können die Membranfragmente im wässrigen Zwei-Phasen-Polymersystem aufgrund unterschiedlicher Oberflächeneigenschaften voneinander getrennt werden. Die Subfraktionierung der Thylakoidmembran nach Andersson (1986) führte zur Trennung von "right side-out"- und "inside-out"-Vesikeln.

<u>Waschpuffer</u>	50 mM	Saccharose
	50 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	10 mM	NaCl
<u>"Press"-Puffer</u>	100 mM	Saccharose
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	5 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
<u>Niedrigsalzpuffer</u>	100 mM	Saccharose
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	5 mM	NaCl
<u>Resuspendierungspuffer</u>	500 mM	Saccharose
	5 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	2,5 mM	NaCl
<u>Zwei-Phasen-System</u> (25 g)	5,8% (w/v)	Dextran 500 (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg)
	5,8% (w/v)	PEG 4000
	20 mM	Saccharose
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	5 mM	NaCl
<u>"Top"-Phase</u>	1,5% (w/v)	Dextran 500
	7,5% (w/v)	PEG 4000
	20 mM	Saccharose
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	5 mM	NaCl

Die Chloroplasten wurden wie in Abschnitt 2.2.5.4.1 beschrieben isoliert, durch osmotischen Schock aufgebrochen und 5 Minuten bei 5000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Thylakoidmembranen wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und schließlich in einem Gesamtvolumen von 9 ml in "Press"-Puffer aufgenommen. Das Thylakoidsystem wurde zweimal in der Yeda-Press bei 100 bar mechanisch zerstört. Die Membranfragmente wurden anschließend 30 Minuten bei 9000 UpM zentrifugiert. Die Stromalamellen im Überstand wurden 1 Stunde bei 20.000 UpM sedimentiert und dann in Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Die sedimentierten

Granalamellen wurden in Niedrigsalzpuffer aufgenommen, zweimal bei 100 bar mit der Yeda-Press behandelt, 5 Minuten bei 3000 UpM sedimentiert und anschließend in Niedrigsalzpuffer resuspendiert. Die Trennung von "inside-out"- und "right side-out"-Vesikeln erfolgte anschließend in wässrigen Zwei-Phasen-Polymersystemen. Dazu wurden auf jedes Zwei-Phasen-System 2 ml Vesikelsuspension und 3 ml Niedrigsalzpuffer geladen. Die Ansätze wurden solange auf Eis inkubiert, bis die Temperatur innerhalb der Systeme 2 bis 3°C erreicht hatte. Dann wurden die Dextran- und die PEG-Phase durch vierzigmalige Inversion gemischt und sofort 3 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Die obere Phase mit den "right side-out"-Vesikeln wurde abgenommen und durch frische "top"-Phase ergänzt. Der Vorgang wurde noch zwei- bis viermal wiederholt. Die gewaschenen "inside-out"- bzw. "right side-out"-Vesikel wurden mit 1 Volumen Niedrigsalzpuffer verdünnt, 30 Minuten bei 30.000 UpM zentrifugiert und schließlich in Resuspendierungspuffer aufgenommen. Die Qualität der Präparation wurde über das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis abgeschätzt, das im Falle der "right side-out"-Vesikel bei 2,8, im Falle der "inside-out"-Vesikel bei 2,3 liegen sollte.

2.2.5.7 Bestimmung der Topographie von Thylakoidmembranproteinen

Proteine, die mit der Thylakoidmembran über schwache hydrophobe Wechselwirkungen assoziiert sind, können durch chaotrope Anionen, wie z.B. Bromid, abgelöst werden. Elektrostatische Wechselwirkungen werden dagegen durch alkalische Lösungen gestört. Die Sensitivität eines Proteins gegenüber Proteasen gibt zudem Aufschluß über seine Topographie, insbesondere über die Orientierung hydrophiler Domänen integraler Komponenten.

<u>Resuspendierungspuffer</u>	10 mM HEPES/KOH, pH 8,0 5 mM MgCl ₂
<u>chaotrope Salzlösungen</u>	2 M NaBr, 2 M NaSCN bzw. 0,1 M Na ₂ CO ₃ in Resuspendierungspuffer
<u>0,1 M NaOH in Resuspendierungspuffer</u>	
<u>Protease-Stammlösungen</u>	2 mg/ml Thermolysin, 1 mg/ml Trypsin bzw. 10 mg/ml Proteinase K (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
<u>Inhibitor-Stammlösungen</u>	0,5 M EDTA (Thermolysin), 1 mg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor bzw. 0,1 M PMSF (Proteinase K)

Thylakoidmembranen wurden aus intakten Chloroplasten durch osmotischen Schock isoliert (siehe Abschnitt 2.2.5.4.1), in Resuspendierungspuffer gewaschen und einer Chlorophyllkonzentration von 0,5 mg/ml entsprechend in den verschiedenen chaotropen bzw. alkalischen Lösungen resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde die Behandlung durch Zugabe von 2 Volumen Resuspendierungspuffer beendet. Die extrahierten Polypeptide wurden durch Zentrifugation für 40 Minuten bei 30.000 UpM von den sedimentierenden

Membranen getrennt und aus dem Überstand durch Zugabe von 4 Volumen 100% Aceton 30 Minuten bei -20°C ausgefällt.

Für die Behandlung mit Proteasen wurden die Thylakoidmembranen (0,5 mg Chlorophyll/ml) in Resuspendierungspuffer aufgenommen und mit 100 µg/ml Thermolysin, 10 µg/ml Trypsin bzw. 15 µg/ml Proteinase K 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 mM EDTA (Thermolysin), 50 µg/ml Trypsininhibitor bzw. 2 mM PMSF (Proteinase K) gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend 40 Minuten bei 30.000 UpM zentrifugiert und die Proteine im Überstand wie oben beschrieben ausgefällt. Die Proteinzusammensetzung aller Fraktionen wurde nach SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.5.15) und "Western"-Transfer mit Hilfe spezifischer Antikörper untersucht (siehe Abschnitt 2.2.5.14).

2.2.5.8 Präparation lumenaler Proteine

Proteine im Thylakoidlumen sind gegenüber proteolytischen Aktivitäten im Stroma des Chloroplasten geschützt. Mechanische Disruption des Thylakoidsystems, z.B. durch Ultraschallwellen, setzt das Thylakoidlumen frei und ermöglicht eine proteolytische Spaltung der zuvor unzugänglichen lumenalen Proteine.

Thylakoidmembranen wurden entweder aus intakten Spinatchloroplasten, wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben, isoliert oder durch differentielle Zentrifugation (siehe Abschnitt 2.2.5.4.1) gewonnen und mit Homogenisierungsmedium auf eine Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml gebracht. Die lumenalen Proteine wurden durch Beschallung (Branson Sonifier) für viermal je 5 Sekunden mit dazwischenliegenden Inkubationen auf Eis in Gegenwart und Abwesenheit von 10 µg/µl Trypsin freigesetzt und durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 40.000 UpM von den sedimentierenden Membranpartikeln getrennt. Die Konzentrierung der Proben erfolgte entweder durch Acetonfällung (siehe Abschnitt 2.2.5.7) oder unter Verwendung von Centricon-Einheiten (Amicon, Beverly, USA; "cut-off" von 10 kDa).

2.2.5.9 Import von Proteinen in intakte Spinatchloroplasten

2.2.5.9.1 Transkription und Translation *in vitro*

Transkription *in vitro*

Die plastidäre Lokalisation der kernkodierte Polypeptide TTP30 und TLP40 wurde mit Hilfe des *in organello*-Imports überprüft. Dazu wurden die entsprechenden cDNS-Sequenzen in pBluescript II kloniert, und die CsCl-gereinigte Plasmid-DNS wurde stromabwärts vom Transkriptionsstartpunkt linearisiert. Anschließend wurde unter der Kontrolle des T7-Promotors der komplementäre RNS-Strang synthetisiert.

<u>5× Ribomax-Puffer</u>	400 mM 60 mM 10 mM 200 mM 15 mM 25 E/ml	HEPES/KOH, pH 7,5 MgCl ₂ Spermidin DTT rNTPs anorganische Pyrophosphatase aus Hefe
<u>Transkriptionsansatz</u>	5,0 µl 0,8 µl x µl 0,9 µl ad 25,0 µl	5× Ribomax-Puffer RNasin (40 E/µl; Promega GmbH, Mannheim) linearisierte Plasmid-DNS (2 µg) T7-RNS-Polymerase (40 E/µl; NEB, Schwalbach) mit ddH ₂ O
<u>MOPS-Agarosegel</u>	1,3%	Agarose in 1× MOPS
<u>Laufpuffer</u>	1×	MOPS

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 2 Stunden bei 37°C und nach erneuter Zugabe von 0,9 µl T7-RNS-Polymerase weitere 2 Stunden bei der gleichen Temperatur inkubiert. Für die Analyse der RNS-Qualität und -Quantität wurde 1 µl Transkriptionsansatz auf ein 1,3%iges MOPS-Agarosegel geladen. Der verbleibende Ansatz wurde mit sterilem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht und mit 1 Volumen 1 : 1 (v/v) Phenol : Chloroform extrahiert. Die RNS im Überstand wurde mit 2 Volumen 20 : 1 (v/v) 100% Ethanol : 3 M Natriumazetat (pH 5,2) ausgefällt und in diesem Zustand bei -70°C gelagert.

Translation *in vitro*

Die *in vitro*-Translation der synthetisierten mRNA erfolgte im Retikulozytenlysat (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg). Die optimalen Translationsbedingungen wurden zuvor in Testansätzen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen ermittelt. Für die radioaktive Markierung der Translationsprodukte mit L-³⁵S-Methionin wurden 30 bis 60 µl der *in vitro* synthetisierten mRNA 15 Minuten bei 11.000 UpM sedimentiert, 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und dann im entsprechenden Volumen ddH₂O resuspendiert. Der *in vitro*-Translationsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Aminosäuregemisch ohne Methionin (je 1 mM)	3,0 µl
L- ³⁵ S-Methionin	2,1 µl
0,7 M KCl	x µl*
10 mM Magnesiumazetat	y µl*
Retikulozytenlysat	9,0 µl
mRNA in ddH ₂ O	ad 37,5 µl

*für die jeweilige mRNA zu optimieren

Die Reaktionsansätze wurden 90 Minuten bei 30°C inkubiert und dann bis zur Durchführung des Importexperiments auf Eis gehalten.

2.2.5.9.2 *In organello-Import*

<u>Resuspendierungspuffer</u>	50 mM 330 mM	HEPES/KOH, pH 7,6 Sorbit
<u>Waschpuffer I</u>	50 mM 330 mM	HEPES/KOH, pH 8,0 Sorbit
<u>Waschpuffer II</u>	10 mM	Tricin/NaOH
<u>Waschpuffer III</u>	10 mM 100 mM	Tricin/NaOH, pH 8,0 Saccharose
<u>Protease-Stammlösungen</u>	2 mg/ml 1 mg/ml	Thermolysin (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) Trypsin (Sigma-Aldrich GmbH)

Die Isolierung intakter Chloroplasten erfolgte ausgehend von 120 g Spinatblättern unter Verwendung diskontinuierlicher Percollgradienten wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben. Die gewaschenen Plastiden wurden in Resuspendierungspuffer aufgenommen und bis zur Durchführung des Importexperiments im Dunkeln auf Eis gehalten.

Importreaktion

Für jede Importreaktion wurden intakte Chloroplasten entsprechend einer Chlorophyllkonzentration von 0,2 mg/ml in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit folgenden Bestandteilen gemischt:

1 M HEPES/KOH, pH 8,0	12,0 µl
2 M Sorbit	32,0 µl
250 mM Methionin	12,0 µl
0,1 M ATP	2,4 µl
Translationsansatz	30,0 µl
Chloroplasten	x µl
ddH ₂ O	ad 240,0 µl

Die Importreaktion wurde nach 30 Minuten bei 25°C und $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ durch Zugabe von 260 µl kaltem Waschpuffer I auf Eis gestoppt. Die Chloroplasten wurden 1 Minute bei 4500 UpM sedimentiert und durch Schwenken in 1 ml Waschpuffer I resuspendiert. Proteine, die in dieser Zeit nicht importiert oder nur mit der Hüllmembran assoziiert waren, wurden durch Inkubation der Chloroplasten mit 100 µg/ml Thermolysin oder 10 µg/ml Trypsin für 20 Minuten auf Eis entfernt. Die Proteasebehandlung wurde durch Zugabe von 20 µl 0,5 M EDTA (Thermolysin) bzw. 50 µl 1 mg/ml Trypsininhibitor beendet. Intakte Chloroplasten wurden über ein 45%iges Percoll-Kissen durch Zentrifugation für 8 Minuten bei 8000 UpM zurückgewonnen und in 1 ml Waschpuffer I aufgenommen.

Fraktionierung der intakten Chloroplasten

Zur Ermittlung der subplastidären Lokalisation der importierten Proteine wurden die Chloroplasten nach dem Importexperiment subfraktioniert. Dazu wurden die in Waschpuffer I aufgenommenen Chloroplasten 1 Minute bei 6000 UpM sedimentiert und dann in 1 ml Waschpuffer II für 15 Minuten auf Eis lysiert. Durch Zugabe von 32 µl 4 M NaCl wurden solche Proteine, die nur locker mit der Thylakoidmembran assoziiert waren, 5 Minuten auf Eis von der Membran abgelöst. Thylakoidmembranen und Stromafraktion wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 UpM voneinander getrennt. Die löslichen Proteine der Stromafraktion wurden durch Zugabe von 4 Volumen 100% Aceton 30 Minuten bei -20°C ausgefällt. Die sedimentierten Thylakoidmembranen wurden zweimal mit Waschpuffer III gewaschen und anschließend in zwei 200 µl-Portionen geteilt. Eine Hälfte der Thylakoidmembranen wurde mit 100 µg/ml Thermolysin oder 10 µg/ml Trypsin 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die andere Hälfte wurde ohne Zugabe von Proteasen auf Eis gehalten. Die Proteasebehandlung wurde durch Zugabe des entsprechenden Inhibitors beendet, und die Membranen wurden 5 Minuten bei 13.000 UpM sedimentiert. Die ausgefallenen stromalen Proteine (siehe oben) und die sedimentierten Thylakoidmembranen wurden in jeweils 50 µl 5× Probenpuffer resuspendiert und 2 Minuten bei 100°C denaturiert. Die Proteinfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.15) und die radioaktiv markierten Proteine, wie in Abschnitt 2.2.5.17 beschrieben, nachgewiesen.

Untersuchung des Translokationsweges über die Thylakoidmembran

Die verschiedenen Translokationswege, durch die Polypeptide in Chloroplasten und in bzw. über die Thylakoidmembran transportiert werden, können durch ihre Sensitivität gegenüber spezifischen Inhibitoren voneinander unterschieden werden. Der ΔpH-abhängige Weg wird durch Ionophoren, wie z.B. Nigericin, gehemmt, wogegen die Sensitivität gegenüber Azid den Sec-abhängigen Weg kennzeichnet.

<u>Importreaktion:</u>	<u>Nigericin</u>	<u>Azid</u>
Chloroplasten (80 µg Chlorophyll)	x µl	x µl
1M HEPES/KOH, pH 8,0	12 µl	12 µl
2 M Sorbit	32 µl	32 µl
250 mM Methionin	18 µl	18 µl
1 M MgCl ₂	2,25 µl	-
1 M KCl	2,25 µl	-
0,1 M ATP	12 µl	2,4 µl
ddH ₂ O	<u>y µl</u>	<u>y µl</u>
	215 µl	217 µl

Um den Einfluß von Nigericin auf die Translokationseffizienz zu überprüfen, wurden die isolierten Plastiden vor dem Importexperiment 20 Minuten belichtet. Anschließend wurde der transthylakoidale pH-Gradient durch Zugabe von 2,8 µM Nigericin und 5minütiger Inkubation

auf Eis zerstört. Sollte dagegen der Einfluß von Natriumazid untersucht werden, wurden die isolierten Chloroplasten zunächst 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 mM Natriumazid zugegeben. Nach der Zugabe des Translationsproduktes (20 µl) wurden die Importansätze 30 Minuten bei 25°C im Licht inkubiert. Die Aufarbeitung der Chloroplasten und ihre Subfraktionierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.5.10 *In vitro*-Phosphorylierung von Proteinen

Die Anwesenheit endogener Proteinkinasen in intakten Chloroplasten, Thylakoidmembranen oder AMS-Fractionen wurde durch die Phosphorylierung ihrer spezifischen Substrate in Gegenwart von [γ -³²P]ATP als Phosphorylgruppen-Donor nachgewiesen. Die Identität der Proteinkinasen wurde durch die Renaturierung ihrer Aktivität nach SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.5.15) entweder direkt im Gel nach Hutchcroft et al. (1991) oder nach ihrer Immobilisierung auf PVDF-Membranen (siehe Abschnitt 2.2.5.14.1) modifiziert nach Celenza und Carlson (1986) nachgewiesen.

2.2.5.10.1 Phosphorylierung isolierter Thylakoidmembranen und AMS-Fractionen

<u>Phosphorylierungspuffer</u>	50 mM	Tricin/NaOH, pH 7,8
	100 mM	Sorbit
	5 mM	MgCl ₂
	10 mM	NaF
	0,05 µCi/µl	[γ - ³² P]ATP

Chloroplasten bzw. Thylakoidmembranen entsprechend 150 µg Chlorophyll oder 20 bis 50 µg der AMS-Fraktion (siehe Abschnitt 2.2.5.3) wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl 30 Minuten bei 25°C in Phosphorylierungspuffer bei einer Lichtintensität von 50 µE/m² × Sekunde⁻¹ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl 0,1 M ATP auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Proteinfractionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Komponenten wie in Abschnitt 2.2.5.15 beschrieben nachgewiesen.

2.2.5.10.2 Nachweis kinaseaktiver Polypeptide

"In Gel"-Renaturierung

<u>Waschlösung I</u>	20% (v/v)	Isopropanol
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
<u>Waschlösung II</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,3% (v/v)	2-Mercaptoethanol
<u>Denaturierungspuffer</u>	6 M	Guanidiniumhydrochlorid
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	0,3% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	1 mM	EDTA

<u>Renaturierungspuffer</u>	50 mM 1 mM 0,04% (v/v) 0,30% (v/v) 4 mM	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA Tween-20 2-Mercaptoethanol DTT
<u>Reaktionspuffer</u>	30 mM 10 mM 140 µCi	Tris/HCl, pH 7,5 MnCl ₂ [γ- ³² P]ATP
<u>Waschlösung III</u>	50 mM 20% (w/v)	Tris/HCl, pH 7,5 Amberlite IRA-402 (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
<u>Fixierer</u>	10% (v/v) 5% (v/v) 1% (w/v)	Isopropanol Eisessig Natriumpyrophosphat
<u>Färbelösung</u>	0,1% (w/v) 25% (v/v) 10% (v/v)	Coomassie R-250 Isopropanol Eisessig
<u>Entfärber</u>	10% (v/v) 5% (v/v)	Isopropanol Eisessig

Es wurden 20 bis 50 µg der AMS-Fraktion (siehe Abschnitt 2.2.5.3) auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel, das 1 mg/ml HistonIII-S (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) enthielt, aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.15). Anschließend wurde das Gel dreimal 20 Minuten in Waschlösung I und dreimal 20 Minuten in Waschlösung II geschwenkt. Nach zweimal je 30 Minuten Inkubation in Denaturierungspuffer wurden die Proteine über Nacht bei 4°C in Renaturierungspuffer renaturiert. Die Phosphorylierungsreaktion erfolgte durch Schwenken in Reaktionspuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nicht gebundene Radioaktivität wurde durch mehrmaliges Waschen des Gels in Waschlösung III entfernt. Das Gel wurde nach dem Färben (siehe Abschnitt 2.2.5.16) und Trocknen auf einer "phosphoimage"-Platte bis zu 5 Tage exponiert. Die radioaktiv markierten Polypeptide wurden wie in Abschnitt 2.2.5.17 beschrieben analysiert.

Renaturierung von Proteinen nach Immobilisierung auf PVDF-Membranen

<u>Denaturierungspuffer</u>	7 M 50 mM 50 mM 2 mM	Guanidiniumhydrochlorid Tris/HCl, pH 9,5 DTT EDTA pH 8,3 mit HCl
<u>Renaturierungspuffer</u>	10 mM 140 mM 2 mM 2 mM 0,10% (v/v) 0,05% (w/v)	Tris/HCl, pH 7,5 NaCl DTT EDTA Nonidet P-40 HistonIII-S oder Casein (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) pH 7,4 mit NaOH

<u>Blockierungspuffer</u>	1,2% (w/v) 30 mM	HistonIII-S, Casein oder BSA (Roth GmbH, Karlsruhe) Tris/HCl, pH 7,5
<u>Reaktionspuffer</u>	30 mM 10 mM 2 mM 1 mM 140 µCi	Tris/HCl, pH 7,5 MgCl ₂ MnCl ₂ CaCl ₂ [γ- ³² P]ATP
<u>Waschpuffer I</u>	30 mM	Tris/HCl, pH 7,5
<u>Waschpuffer II</u>	30 mM 0,05 % (v/v)	Tris/HCl, pH 7,5 Nonidet P-40
<u>Waschpuffer III</u>	1 M KOH	in 30 mM Tris/HCl, pH 7,5

Es wurden 20 bis 50 µg der AMS-Fraktion (siehe Abschnitt 2.2.5.3) durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wie in Abschnitt 2.2.5.14.1 beschrieben auf PVDF-Membran (Hybond™-P, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) immobilisiert. Die Membran wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur in Denaturierungspuffer geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen in Waschpuffer I wurden die immobilisierten Proteine über Nacht bei 4°C in Renaturierungspuffer renaturiert, und zugleich wurde das Kinasesubstrat HistonIII-S bzw. Casein an die Membran gebunden. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation in Blockierungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Phosphorylierungsreaktion erfolgte durch Schwenken der Membran in Reaktionspuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 Minuten mit Waschpuffer I, einmal 10 Minuten mit Waschpuffer II und erneut 10 Minuten mit Waschpuffer I gewaschen. Unspezifisch an die Membran gebundene Radioaktivität wurde durch 5minütige Inkubation in Waschpuffer III entfernt, die Membran anschließend in Waschpuffer I neutralisiert und nach dem Trocknen 1 bis 4 Tage auf einer "phosphoimage"-Platte wie in Abschnitt 2.2.5.17 beschrieben exponiert.

2.2.5.10.3 Identifizierung von "response regulator"-Proteinen

Proteine mit "response regulator"-Eigenschaften können durch Zugabe eines geeigneten Phosphorylgruppen-Donors an einem konservierten Asparaginsäurerest phosphoryliert und auf diese Weise identifiziert werden. Für den Nachweis der potentiellen "response regulator"-Eigenschaften des rekombinanten TTP30-Vorläufers wurde eine N-terminal verkürzte Form der Sensorkinase EnvZ aus *E. coli* als Phosphorylgruppen-Überträger verwendet.

<u>TEDG-Puffer</u>	50 mM 0,5 mM 2 mM 10% (v/v)	Tris/HCl, pH 8,0 EDTA DTT Glycerin
--------------------	--------------------------------------	---

Sephadex-G75 in TEDG-Puffer

<u>Reaktionspuffer</u>	50 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	0,08 µCi/µl	[γ- ³² P]ATP in TEDG-Puffer

Die aufgereinigte, rekombinante Sensor kinase EnvZ (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.4) wurde 20 Minuten bei 37°C in Reaktionspuffer autophosphoryliert. Nicht eingebaute Radionukleotide wurden durch Gelfiltration in einer Sephadex-G75-Säule abgetrennt. Anschließend wurde die phosphorylierte Sensor kinase mit dem rekombinanten TTP30-Vorläufer (siehe Abschnitt 2.2.5.12.2) 15 Minuten bei Raumtemperatur in Reaktionspuffer ohne [γ-³²P]ATP inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5× Probenpuffer gestoppt. Die Proteinfractionen wurden sofort durch SDS-PAGE bei 4°C aufgetrennt, und das Gel wurde nach dem Trocknen auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.5.11 *In vitro*-Bindestudien**2.2.5.11.1 "South-Western"-Analyse von Protein-DNS-Interaktionen**

"Helix-turn-helix" (HTH)-Motive treten häufig in Nukleinsäure-bindenden Proteinen auf. Dieses Motiv besteht aus zwei α-Helices, die über einen Arm aus maximal vier negativ geladenen Aminosäureresten mit β-Faltblattstruktur verbunden sind. Die Länge dieses Arms wird zur Unterscheidung von HTH- und dem strukturell eng verwandten "helix-loop-helix" (HLH)-Motiv herangezogen, das für die Bindung zweiwertiger Kationen verantwortlich sein soll. Die Unterscheidung von DNS-bindendem HTH- und Kationen-bindendem HLH-Motiv ist allerdings nicht strikt (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.1). DNS-bindende Proteine können u.a. über die "South-Western"-Analyse identifiziert werden. Mit dieser Methode wurde die *in vitro*-DNS-Bindeaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers untersucht, der eine mutmaßliche "helix-loop-helix"-Domäne in seinem N-terminalen Abschnitt enthält.

<u>Puffer A</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	10% (v/v)	Glycerin
	2,5% (v/v)	Nonidet P-40
	5% (w/v)	Rinderserumalbumin
	0,02% (w/v)	NaN ₃
	10 µg/ml	Heringssperma-DNS (denaturiert)
	1 mM	DTT

<u>Puffer B</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	75 mM	NaCl
	0,13% (w/v)	Rinderserumalbumin
	0,02% (w/v)	NaN ₃
	10 µg/ml	Heringssperma-DNS (denaturiert)
	1 mM	DTT

<u>Waschpuffer I</u>	Puffer B ohne Rinderserumalbumin
----------------------	----------------------------------

<u>Waschpuffer II</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,02% (w/v)	NaN ₃
	10 µg/ml	Heringssperma-DNS (denaturiert)
	1 mM	DTT

TTP30 wurde in Form des Vorläufermoleküls in *E. coli* M15-Zellen wie in Abschnitt 2.2.5.12.2 beschrieben exprimiert und aus der unlöslichen Proteinfraction unter nativen Bedingungen aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.1). Die Proteinfraction wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.15) und anschließend auf Nitrozellulosemembran (Biotrace NT, PALL Filtron, Dreieich) immobilisiert (siehe Abschnitt 2.2.5.14.1). Die Renaturierung der immobilisierten Proteine erfolgte über Nacht bei 4°C in Puffer A; zugleich wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Die Membran wurde 5 Minuten in Puffer B gewaschen und dann mit 100 ng radioaktiv markierter Plastiden-DNS (siehe Abschnitt 2.2.2.4) bzw. 2,5 µg Plastiden-RNS (siehe Abschnitt 2.2.2.5) 1 Stunde bei Raumtemperatur in Puffer B geschwenkt. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch zweimaliges Waschen in Waschpuffer I bzw. II für jeweils 10 Minuten entfernt und die Membran anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.5.11.2 Ca²⁺- "mobility-shift" zum Nachweis Calcium-bindender Proteine

Proteine, deren Aktivität durch die reversible Bindung zweiwertiger Kationen, wie z.B. Calcium, reguliert wird, zeichnen sich durch ein als EF-Hand bezeichnetes "helix-loop-helix"-Motiv aus (siehe vorangegangenen Abschnitt). Die Bindung von Calciumionen an ein Protein mit EF-Hand-Domäne kann sein Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel verändern. Dieser Ansatz wurde dazu genutzt, daß "helix-loop-helix"-Motiv im N-terminalen Abschnitt von TTP30 auf seine Calcium-bindenden Eigenschaften hin zu untersuchen.

<u>TEF-Puffer</u>	10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,1 mM	EDTA
	25 mM	NaF

Der rekombinante TTP30-Vorläufer (siehe Abschnitt 2.2.5.12.2) wurde in Gegenwart und Abwesenheit von 10 mM CaCl₂ in TEF-Puffer 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein paralleler Ansatz enthielt zusätzlich 20 mM EDTA, das eine mögliche Bindung von Calciumionen an das EF-Hand-Motiv durch ihre Komplexierung unterbinden sollte. Als Negativkontrolle diente BSA. Nach Zugabe von 5× Probenpuffer wurde das Laufverhalten der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 untersucht (siehe Abschnitt 2.2.5.16).

2.2.5.12 Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

2.2.5.12.1 Expressionssysteme

Mit Hilfe prokaryotischer Expressionsvektoren können größere Mengen rekombinanten Proteins *in vivo* in *E. coli* Zellen synthetisiert werden. Für die Expression des TTP30-Vorläufers wurde der pQE30-Vektor (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet, über den ein sechsfacher "His-tag" am N-Terminus des rekombinanten Proteins eingeführt wurde. Die Expression des Fremdproteins erfolgte im *E. coli* Stamm M15[pREP4]. Dieser trägt ein Repressorplasmid, dessen Genprodukt die Expressionsrate am starken Phagen-T5-Promotor reguliert.

Die Expression trunkater Formen von TTP30 bzw. TLP40 erfolgte unter Verwendung der pRSET5-Vektoren im *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS unter der Kontrolle des T7-Promotors. Für die Herstellung rekombinanter Domänen- und Punktmutanten von TLP40 wurde der GST-Fusionsvektor pGEX-6-P1 (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) im gleichen *E. coli* Stamm verwendet.

2.2.5.12.2 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Je 3 ml LB-Ampicillin-Medium wurden mit je 1 Bakterienkolonie angeimpft und die Bakterien über Nacht bei 37°C angezogen. Die Hälfte dieser Übernachtskultur wurde in 30 ml frisches Medium überführt und bis zum Erreichen einer E_{600nm} von 0,8 bei 37°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde 1 ml Kultur entnommen (nicht induzierte Kontrolle). Die Synthese des Fremdproteins wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Akkumulation des rekombinanten Proteins anhand einer Expressionskinetik verfolgt. Dazu wurde nach 1, 2, 3 und 4 Stunden jeweils 1 ml Kultur entnommen, sedimentiert und, wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben, aufgereinigt.

2.2.5.12.3 Aufreinigung rekombinanter Proteine

2.2.5.12.3.1 Aufreinigung unter nativen Bedingungen

<u>Lysepuffer</u>	300 mM	NaCl
	50 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
	10 mM	Imidazol (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)

Vor Gebrauch wurde 1 mg/ml Lysozym zugegeben.

Die sedimentierten Bakterienzellen (siehe Abschnitt 2.2.5.12.2) wurden in je 100 µl Lysepuffer aufgenommen und 30 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zellen viermal je 5 Sekunden mit dazwischenliegenden Inkubationen auf Eis beschallt und dann 30 Minuten bei 11.000 UpM zentrifugiert. Die löslichen Proteine im Überstand wurden abgenommen, und die

sedimentierte unlösliche Fraktion wurde in 100 µl Lysepuffer ohne Lysozym resuspendiert. Zur Lokalisation der rekombinanten Proteine wurden je 20 µl lösliche bzw. unlösliche Proteinfraction gemeinsam mit der nicht-induzierten Kontrolle auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.15).

2.2.5.12.3.2 **Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie an Sepharose-4B**

1× PBS

20% (v/v) Triton X-100

Glutathion-Sepharose-4B in 1× PBS (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg)

<u>Protease-Puffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 7,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
<u>Glutathionelutionspuffer</u>	10 mM	Glutathion, reduziert (Roche GmbH, Mannheim)
	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0

Es wurden 400 ml einer transformierten Bakterienkultur 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG 10 Minuten bei 3750 UpM sedimentiert. Das Sediment wurde in 50 µl 1× PBS pro ml Kultur resuspendiert, viermal je 5 Sekunden mit dazwischenliegenden Inkubationen auf Eis beschallt (Branson Sonifier), und anschließend wurde durch Zugabe von 20% (v/v) Triton X-100 eine Endkonzentration von 1% im Lysat eingestellt. Lösliche und unlösliche Proteinfractionen wurden nach 30minütiger Inkubation bei 4°C durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 10.000 UpM getrennt. Die lösliche Fraktion mit dem rekombinanten Fusionsprotein wurde durch einen Bakterienfilter (ø 0,45 µm, Millipore GmbH, Eschborn) filtriert und anschließend auf eine äquilibrierte Glutathion-Sepharose-4B-Säule geladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen der Säule mit 1× PBS und dann mit Proteasepuffer entfernt. Anschließend wurden 40 µl "PreScission"-Protease (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) pro Milliliter Glutathion-Sepharose-4B in Proteasepuffer auf die Säule gegeben. Das rekombinante Protein wurde über Nacht bei 4°C von der Glutathionsulfotransferase (GST, 26 kDa) abgespalten. Die an die Säule gebundene GST-Domäne wurde durch dreimaliges Waschen mit 1 ml Glutathionelutionspuffer pro ml Sepharose-4B abgelöst und die Säulenmatrix mit 1× PBS und dann mit 20% (v/v) Ethanol regeneriert.

2.2.5.12.3.3 Aufreinigung von "His-tag"-Proteinen durch Nickel-Affinitätschromatographie

Die Expression des TTP30-Vorläufers im pQE30-System führt zu einem sechsfachen "His-tag" am N-Terminus des rekombinanten Proteins (siehe Abschnitt 2.2.5.12.2), der die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichte.

<u>Lysepuffer</u>	8 M	Harnstoff
	100 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	Tris/HCl
		pH 8,0
<u>Waschpuffer</u>		Lysepuffer, pH 6,3
<u>Elutionspuffer</u>		Lysepuffer, pH 4,5

Die 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG sedimentierten Bakterienzellen (30 ml) wurden solange bei Raumtemperatur in 200 µl Lysepuffer inkubiert, bis die Lösung transparent geworden war. Zur Beseitigung von Zelltrümmern wurde das Lysat 10 Minuten bei 15.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 50 µl 50% (w/v) Nickel-NTA-Agarose (Qiagen GmbH, Hilden) 30 Minuten bei Raumtemperatur gemischt. An die Nickelionen gebundene, rekombinante Proteine wurden von nichtgebundenen durch kurze Zentrifugation für 10 Sekunden bei 15.000 UpM getrennt. Das Sediment wurde zweimal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen, und die gebundenen Proteine wurden anschließend mit dreimal 25 µl Elutionspuffer von der Nickelmatrix eluiert. Die Zusammensetzung der Proteinfractionen wurde nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE analysiert (siehe Abschnitt 2.2.5.15).

2.2.5.12.3.4 Aufreinigung der rekombinanten Sensorkinase EnvZ aus *E. coli*

Die Aufreinigung der rekombinanten Sensorkinase EnvZ aus *E. coli* erfolgte nach der Methode von Aiba et al. (1989).

<u>TSD-Puffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	250 mM	Saccharose
	1 mM	DTT
<u>Gradientenlösungen</u>	30%, 40%, bzw. 53% (w/v)	Saccharose in TSD-Puffer
<u>TGT-Puffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	6 M	Guanidiniumchlorid
	0,005% (v/v)	Tween-80
<u>TTG-Puffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	0,005% (v/v)	Tween-80
	2 mM	Glutathion, reduziert (Merck Eurolab GmbH, Darmstadt)
	0,02 mM	Glutathion, oxidiert (Merck Eurolab GmbH)

<u>Dialysepuffer</u>	50 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	0,05% (v/v)	Tween-80
	2 mM	2-Mercaptoethanol

NaCl-Lösungen 100, 150, 200, 250, 300, bzw. 400 mM NaCl in Dialysepuffer

Die prokaryotische Sensor kinase EnvZ wurde in einer N-terminal verkürzten Form (pHAI085) in *E. coli* exprimiert und die Bakterienkultur (viermal je 500 ml) anschließend 15 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 150 ml TSD-Puffer gewaschen, erneut 15 Minuten bei 7500 UpM sedimentiert und anschließend in 30 ml TSD-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl DNaseI (Roche GmbH, Mannheim) erfolgte der mechanische Aufschluß der Bakterienzellen in der French-Press bei einem Druck von 7500 Psi. Das Lysat wurde auf einen Saccharosestufengradienten (30%/40%/53%; 30 ml) geladen und 15 Stunden bei 26.000 UpM (SW28) zentrifugiert. Das Sediment wurde in wenig TGT-Puffer resuspendiert und mit TTG-Puffer zehnfach verdünnt. Anschließend wurde durch Zugabe von festem Guanidiniumchlorid eine Endkonzentration von 1 M eingestellt. Der Ansatz wurde 24 Stunden auf Eis im Kühlraum inkubiert, 2 Tage gegen Dialysepuffer dialysiert und anschließend auf eine DEAE-Trisacrylsäule (Bio-Rad GmbH, München) geladen. Nach dem Waschen der Säule mit Dialysepuffer wurde das rekombinante Protein durch einen Natriumchloridgradienten steigender Konzentration eluiert. Die Eluate wurden getrennt gesammelt, 2 Tage bei 4°C dialysiert und mit Hilfe von Centricon-Einheiten (Amicon, Beverly, USA) mit einem "cut off" von 10 kDa konzentriert. Die Qualität der Präparation wurde anschließend im SDS-Polyacrylamidgel überprüft (siehe Abschnitt 2.2.5.15).

2.2.5.13 Gewinnung polyklonaler Antikörper in Kaninchen

2.2.5.13.1 Herstellung von Antigenen für die Immunisierung

Rekombinante Proteine wurden in präparativen SDS-Polyacrylamidgelen angereichert (siehe Abschnitt 2.2.5.15) und wie in Abschnitt 2.2.5.14.1 beschrieben auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die immobilisierten Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung [1% (w/v) Ponceau S Merck Eurolab GmbH, Darmstadt), 2% (v/v) Eisessig] angefärbt und die rekombinanten Proteinbanden ausgeschnitten. Die Membranstreifen wurden in ddH₂O entfärbt, an der Luft getrocknet, in 1 cm lange Stücke geschnitten und bis zum weiteren Gebrauch in Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Kurz vor der Immunisierung eines Kaninchens wurde ein solcher Membranstreifen in 200 µl DMSO aufgelöst.

2.2.5.13.2 Immunisierung und Blüten von Kaninchen

Vor der Immunisierung wurde einem 2 bis 3 Wochen alten Kaninchen 15 ml Blut entnommen, und das gewonnene Prä-Immuserum wurde auf störende Kreuzreaktionen hin überprüft. Für die erste Immunisierung wurde das vorbereitete Antigen mit 200 µl Titermax ("complete adjuvans";

Pierce Chemical Company, Rockford, USA) gemischt und dem Kaninchen injiziert. Nach 10 Tagen erfolgte eine erneute Immunisierung. Diesmal wurde das Antigen mit 200 µl Freund'schem Adjuvans ("incomplete adjuvans"; Pierce Chemical Company, Rockford, USA) gemischt und injiziert. 10 Tage nach der zweiten Immunisierung wurden 40 ml Blut entnommen. Das Blut wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann über Nacht bei 4°C gelagert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 3700 UpM wurde der Überstand abgenommen, erneut 20 Minuten bei 10.000 UpM zentrifugiert und dann mit 0,01% (w/v) Natriumazid versetzt. Das gewonnene Antiserum wurde portionsweise bei -20°C gelagert.

2.2.5.14 Immunologischer Nachweis von Proteinen

2.2.5.14.1 "Western"-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen nach Towbin et al. (1979)

<u>Transferpuffer</u>	192 mM	Glycin
	25 mM	Tris

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (siehe Abschnitt 2.2.5.15) wurden unter Verwendung einer Naß-Transferapparatur (Eigenbau, Werkstatt) auf Nitrozellulose- (Biotrace NT, PALL Filtron, Dreieich) oder PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore GmbH, Eschborn, bzw. Hybond™-P, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) immobilisiert. PVDF-Membranen wurde vor dem Transfer mit 100% Methanol benetzt und anschließend kurz mit ddH₂O gewaschen. Der Elektrottransfer erfolgte in Abhängigkeit von dem verwendeten Gelsystem für 3 bis 4 Stunden bei 380 mA im Kühlraum. Nach dem Transfer wurden Nitrozellulosemembranen 20 Minuten bei 80°C inkubiert. Der Molekulargewichtsstandard SDS-VII (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) wurde anschließend durch Färbung mit Ponceau S markiert. PVDF-Membranen mit dem vorgefärbtem Marker "SeeBlue" (Novex/Anamed, Offenbach) wurden sofort weiterverwendet.

2.2.5.14.2 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Kolorimetrisches Detektionsverfahren

<u>Lösung 1</u>	1×	PBS
	1% (v/v)	Tween-20
	5% (w/v)	Milchpulver
<u>Lösung 2</u>	1×	PBS
	1% (v/v)	Tween-20
<u>Lösung 3</u>	100 mM	Diethanolamin, pH 9,0
	1 mM	MgCl ₂
<u>Sekundärer Antikörper</u>	"anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate" (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)	

Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die vorbereitete Nitrozellulosemembran 1 Stunde bei Raumtemperatur in Lösung 1 geschwenkt. Anschließend wurde die Membran 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem gewünschten primären Antikörper (1 : 500 bis 1 : 1000 in Lösung 1) inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Membran für 10 Minuten in Lösung 1 erfolgte die Bindung des sekundären Antikörpers (1 : 30.000 in Lösung 1) an den primären Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 Minuten mit Lösung 2 und dann mit Lösung 3 gewaschen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Inkubation der Membran in 30 ml Lösung 3 mit 1,5 mg BCiP und 3 mg NBT (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) nachgewiesen. Die Farbreaktion wurde nach Erreichen der gewünschten Intensität durch Waschen der Membran in ddH₂O gestoppt.

Chemilumineszenzverfahren

<u>Reaktionslösung I</u>	2,5 mM	Luminol in DMSO (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
	400 µM	p-Coumarsäure in DMSO (Sigma-Aldrich GmbH)
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,5
<u>Reaktionslösung II</u>	0,02% (v/v)	H ₂ O ₂
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,5
<u>Sekundärer Antikörper</u>		"anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate" (Sigma-Aldrich GmbH)

Die Blockierung der unspezifischen Bindestellen, die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper sowie das Waschen erfolgte wie oben beschrieben. Die in Lösung 1 gewaschene Membran wurde anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert (1 : 20.000 in Lösung 1) und dann viermal in Lösung 2 gewaschen. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden die beiden Reaktionslösungen I und II zu gleichen Teilen gemischt, die Membran wurde damit 1 Minute benetzt und dann zwischen Folie 1 bis 30 Minuten auf einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.5.15 Proteingelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

<u>40% (w/v) Acrylamid-Lösung (11)</u>	386,7 g	Acrylamid (Serva, Heidelberg)
	13,3 g	N,N'-methylenbisacrylamid (Serva, Heidelberg)
<u>1× Laufpuffer</u>	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS

<u>5× Probenpuffer</u>	10% (w/v)	SDS
	40% (w/v)	Saccharose
	1 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl, pH 6,8
	20% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,001% (w/v)	Bromphenolblau

Für die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde das diskontinuierliche Gelsystem nach Laemmli (1970) verwendet. Standardmäßig wurden 10%ige Gele hergestellt. In einigen Fällen wurde durch die Verwendung linearer Gradientengele von 9 - 15% oder 10 - 17% eine bessere Auflösung erzielt. Für eine Hochauflösung im Molekulargewichtsbereich von 45 bis 65 kDa wurde ein 7,5%iges Gelsystem verwendet.

2.2.5.16 Anfärben von Proteingelen

Zum Nachweis von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen standen Färbemethoden unterschiedlicher Sensitivität zur Verfügung. Routinemäßig wurde eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blau R-250 durchgeführt. Zum Nachweis minorer Polypeptide wurde eine Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1985) verwendet.

Färbung mit Coomassie R-250

<u>Färbelösung</u>	45% (v/v)	Methanol
	9% (v/v)	Eisessig
	0,2% (w/v)	Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
<u>Entfärber</u>	20% (v/v)	Methanol
	7% (v/v)	Eisessig

Die Polyacrylamidgele wurden in Abhängigkeit von ihrer Stärke und der Prozentigkeit des verwendeten Gelsystems bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur in Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte unter mehrmaligem Wechseln des Entfärbers, bis der Hintergrund maximal reduziert war. Die gefärbten Gele wurden entweder sofort getrocknet oder konnten mehrere Tage in Entfärber aufbewahrt werden.

Silberfärbung von Proteingelen

<u>Fixierer</u>	50% (v/v)	Methanol
	12% (v/v)	Essigsäure
	0,05% (v/v)	Formaldehyd
<u>Thiosulfatlösung</u>	0,02% (w/v)	Na ₂ S ₂ O ₃
<u>Silbernitratlösung</u>	0,2% (w/v)	AgNO ₃
	0,03% (v/v)	Formaldehyd
<u>Entwickler (1 l)</u>	6,0% (w/v)	Na ₂ CO ₃
	0,02% (v/v)	Formaldehyd
	4,0 mg	Na ₂ S ₂ O ₃

<u>Stopp-Lösung</u>	50% (v/v)	Methanol
	12% (v/v)	Essigsäure
<u>Aufbewahrungslösung</u>	50% (v/v)	Methanol

Die Proteingele wurden mindestens 1 Stunde fixiert, dreimal 20 Minuten mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen und dann genau 1 Minute in Thiosulfatlösung inkubiert. Nach kurzem Waschen mit ddH₂O, 20minütigem Schwenken in Silbernitratlösung und erneutem Waschen in ddH₂O wurden die Proteinbanden entwickelt. Dieser Vorgang wurde nach Erreichen der gewünschten Signalintensität durch Schwenken des Gels in Stopp-Lösung beendet. Silbergefärbte Gele wurden entweder zwischen Zellophan getrocknet oder konnten längere Zeit in Aufbewahrungslösung gelagert werden.

2.2.5.17 Fluorographie und "phosphoimaging" von Proteingelen

SDS-Polyacrylamidgele, in denen ³H-Leucin-markierte *in vitro*-Translationsprodukte aufgetrennt worden waren, wurden zur Steigerung der Signalintensität einer Behandlung mit Salicylsäure unterzogen. Die Coomassie-gefärbten Gele wurden dazu zweimal 15 Minuten in Wasser gewaschen und anschließend 20 Minuten in 16% (w/v) Natriumsalicylsäure (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) inkubiert. Die Gele wurden nach dem Trocknen auf einem Röntgenfilm bei -70°C exponiert.

Gele, in denen mit ³²P- oder ³⁵S-markierte Proteine aufgetrennt worden waren, wurden nach dem Färben mit Coomassie R-250 und Trocknen entweder direkt auf einem Röntgenfilm exponiert oder unter Verwendung des Fuji BAS-1500 "phosphoimagers" mit dem zugehörigen Programm TINA 2,09g (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet.

2.2.5.18 Aufreinigung und Konzentrierung von Proteinen für die Mikrosequenzierung

<u>CAPS-Transferpuffer</u>	10 mM	CAPS, pH 11,0 (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen)
	20% (v/v)	Methanol
<u>Färbelösung</u>	0,1% (w/v)	Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich GmbH)
	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Eisessig
<u>Entfärber</u>	50% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Eisessig

Um Auskunft über die Identität ausgewählter Proteinbanden zu erhalten, wurden diese in aufeinanderfolgenden, präparativen Gelsystemen angereichert, aufgereinigt und schließlich für die Sequenzierung in der Gasphase auf PVDF-Membran (Hybond™-P, Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) immobilisiert. Der Elektrotransfer erfolgte unter Verwendung einer "semi-dry"-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) in CAPS-Transferpuffer. In den genannten

Puffern und Lösungen wurde eine DTT-Konzentration von 5 bis 8 mM eingestellt, um eine N-terminale Blockierung des zu sequenzierenden Polypeptids zu vermeiden. Eine ausreichende Proteinkonzentration war an einer deutlich sichtbaren Proteinbande nach dem Anfärben der PVDF-Membran mit Coomassie G-250 zu erkennen.

2.2.5.19 Computergestützte Sequenzanalysen

Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Algorithmen BLAST (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997) oder FASTA (Pearson und Lipman, 1988) ausgewertet. Sequenzvergleiche wurden unter Verwendung von CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Die Sequenzanalysen erfolgten mit den GCG-Programmen (Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package) unter HUSAR (Unix Sequence Analysis Resources, Heidelberg).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Identifizierung kinaseaktiver Komponenten in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten

Die reversible Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes wird auf die Aktivität multipler, aller Wahrscheinlichkeit nach thylakoidintegraler Proteinkinasen zurückgeführt (Rintamäki et al., 1997; Carlberg et al., 1999). Die Anzahl und Natur der verantwortlichen Enzyme ist Gegenstand intensiver Forschung, die in den letzten Jahren zur Identifizierung einer Reihe von thylakoidalen Kinaseaktivitäten geführt hat (Gal et al., 1997; Weber et al., 1998; Snyders und Kohorn, 1999; Zer et al., 1999). Die subplastidäre Lokalisation dieser mutmaßlichen Proteinkinasen und die sie kodierenden Gene sind weitgehend unbekannt. Im Gegensatz dazu sind die Regulationsmechanismen, durch die ihre Aktivität moduliert werden soll, relativ gut charakterisiert. Die Redoxkontrolle der Enzymaktivitäten auf der Ebene des Plastochinons deutet auf eine funktionelle, möglicherweise auch räumliche Assoziation mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex hin. Aus diesem Grund erfolgte der biochemische Nachweis kinaseaktiver Komponenten in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten in der vorliegenden Arbeit auf der Basis sogenannter AMS-Fractionen (Gal et al., 1992). Bei der AMS-Fraktion handelte es sich um eine Anreicherung membranintegraler Polypeptide der photosynthetischen Membran, die durch geeignete Detergentien solubilisiert und anschließend durch Zugabe von Ammoniumsulfat steigender Sättigung stufenweise ausgefällt wurden (siehe Abschnitt 2.2.5.3). Im Falle der AMS-Fraktion aus Spinatthylakoidmembranen erwies sich eine Detergenzkonzentration von 28 mM n-Octyl- β -D-glucopyranosid in Gegenwart von 0,5% (w/v) Natriumcholat als optimal. Die subthylakoidale Proteinfraction aus der Fällung mit einer AMS-Sättigung von 55% zeichnete sich durch einen hohen Gehalt an Cytochrom *b/f*-Komplexen aus und enthielt mehr als 20 verschiedene Polypeptide im Bereich von 10 bis >66 kDa (Abb. 4 A).

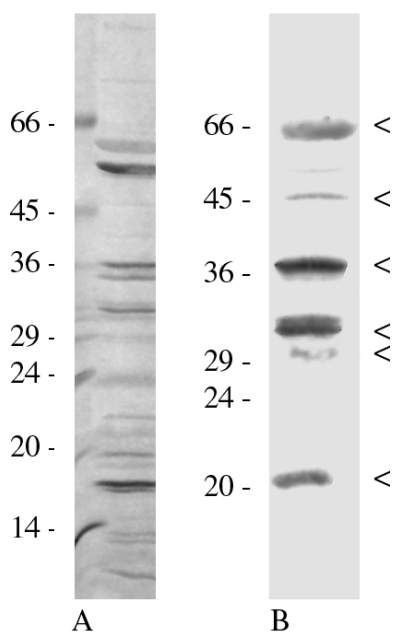


Abb. 4: Polypeptidmuster der subthylakoidalen AMS-Fraktion aus Spinat und serologischer Nachweis von AMS-Polypeptiden mit Phosphothreoninresten. (A) Silberfärbung der AMS-Polypeptide nach ihrer Auftrennung in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. (B) "Western"-Analyse der AMS-Polypeptide nach ihrer Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran mit einem polyklonalen Antikörper gegen Phosphothreoninreste (Zymed Laboratories, 1 : 1000 verdünnt). Phosphorylierte Polypeptide sind mit einem Pfeilkopf markiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Der Phosphorylierungszustand der AMS-Polypeptide direkt nach ihrer Präparation war für den biochemischen Nachweis kinaseaktiver Komponenten von zentraler Bedeutung. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen phosphorylierte Threoninreste konnten sechs thylakoidale Phosphoproteine von ~20, ~31, ~32, ~36, ~45 und ~66 kDa eindeutig in der AMS-Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 4 B, Pfeilköpfe). Daraus folgt, daß auf die Phosphorylierungsstelle dieser AMS-Polypeptide in der nachfolgenden *in vitro*-Phosphorylierung keine Phosphorylgruppe vom ATP mehr übertragen werden konnte.

3.1.1 Nachweis kinaseaktiver Polypeptide in der subthylakoidalen AMS-Fraktion

Die *in vitro*-Phosphorylierung der AMS-Fraktion sollte Aufschluß über die Anwesenheit aktiver Proteinkinasen und die Natur phosphorylierbarer Zielproteine geben. In Gegenwart von [γ - 32 P]ATP konnten mindestens 20 AMS-Polypeptide im Molekulargewichtsbereich von 10 bis >66 kDa durch die Aktivität endogener Proteinkinasen *in vitro* phosphoryliert werden (Abb. 5 A, Spur 1). Das Ausmaß und die Intensität der phosphorylierten AMS-Polypeptide waren unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen nahezu identisch (Abb. 5 A, Spuren 2 und 3) und von der Anwesenheit unspezifischer Kinasesubstrate, wie z.B. HistonIII-S oder Casein, unabhängig (Abb. 5 A, Spuren 4 und 5). Demgegenüber war die Phosphorylierungsrate thylakoidaler Polypeptide in Gegenwart von $K_4Fe(CN)_6$ deutlich reduziert (Abb. 5 B, Spur 3), während die Anwesenheit von 1,3-Dithiothreit (DTT) die Aktivität der endogenen Proteinkinasen offensichtlich nicht wesentlich beeinflusste (Abb. 5 B, Spur 2).

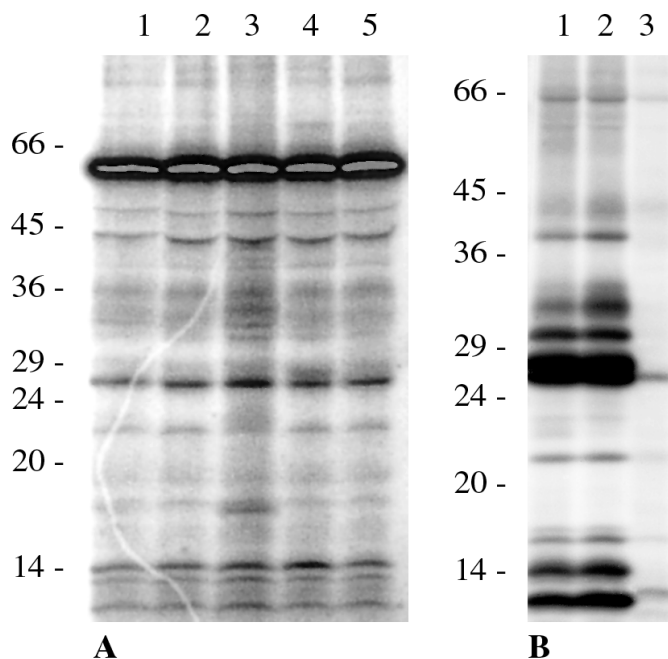


Abb. 5: *In vitro*-Phosphorylierung von AMS-Polypeptiden (A) bzw. Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten (B) unter verschiedenen Redoxbedingungen. Autoradiogramme 9 - 15%iger SDS-Polyacrylamidgele. Die Phosphorylierungsreaktionen erfolgten in Abwesenheit (1) oder in Gegenwart von 5 mM DTT (2) bzw. 1 mM $K_4Fe(CN)_6$ (3). Der Einfluß unspezifischer Kinasesubstrate auf das *in vitro*-Phosphorylierungsmuster der AMS-Fraktion wurde durch ihre Inkubation mit HistonIII-S (4) bzw. Casein (5) analysiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Um zwischen autophosphorylierenden, membranintegralen Proteinkinasen und der Phosphorylierung von Zielproteinen unterscheiden zu können, wurden die potentiellen Proteinkinasen in der subthylakoidalen AMS-Fraktion zunächst durch denaturierende Gelelektrophorese von ihren mutmaßlichen Substraten getrennt. Danach wurden die (kinaseaktiven) Polypeptide entweder direkt im SDS-Polyacrylamidgel oder nach ihrer Immobilisierung auf PVDF-Membran (siehe Abschnitt 2.2.5.10.2) renaturiert. Unabhängig von dem verwendeten Renaturierungsverfahren konnten in mehreren parallelen Ansätzen mindestens sechs kinaseaktive AMS-Polypeptide im Molekulargewichtsbereich von 30 bis >66 kDa nachgewiesen werden (Abb. 6 A). Die Anwesenheit des unspezifischen Kinasesubstrats HistonIII-S ergab teilweise ein vergleichbares Muster; es war insbesondere für die Renaturierung der Aktivitäten im Molekulargewichtsbereich von >30 kDa nicht erforderlich (Abb. 6 B).

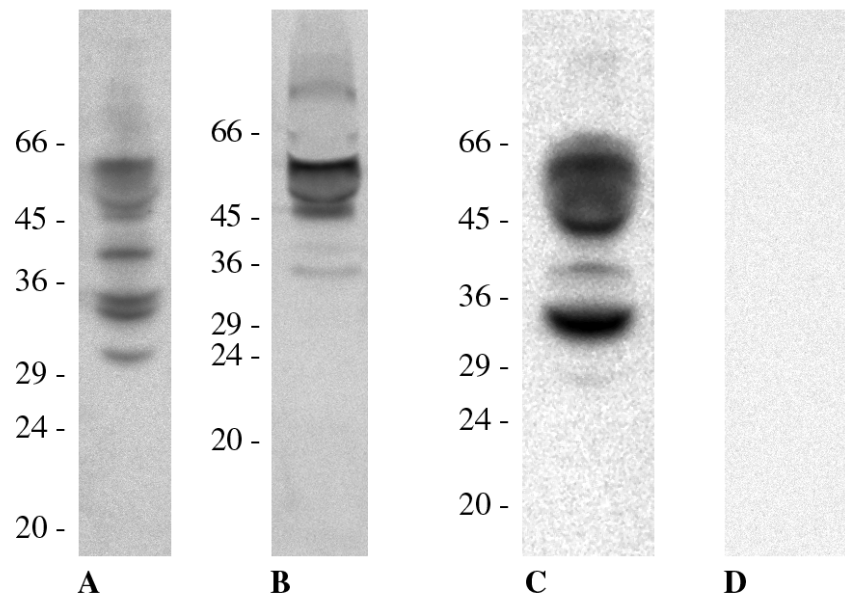


Abb. 6: Autoradiogramm kinaseaktiver AMS-Polypeptide nach der Renaturierung ihrer Aktivität in einem 9%igen SDS-Polyacrylamidgel ohne (A) und mit HistonIII-S (B). Die Natur der phosphorylierten Reste wurde durch die Behandlung der Polyacrylamidgele mit 1,5 M HCl (C) oder 1,5 M KOH (D) untersucht. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die Behandlung der SDS-Polyacrylamidgele mit Säuren und Basen sollte Auskunft über die Natur der phosphorylierten Reste in den renaturierten AMS-Polypeptiden geben. Phosphorylierte Aminosäurereste in Proteinen werden generell in *O*-, *N*- und Acyl-Phosphate eingeteilt. Während die *O*-Phosphatbindungen von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten gegenüber Säuren stabil sind, hydrolysieren die *N*-Phosphatbindungen von Arginin-, Histidin- und Lysinresten unter diesen Bedingungen rasch (Martensen, 1984; Fujitakti und Smith, 1984). Im basischen Milieu kommt es dagegen zur Hydrolyse von Phosphoserin- und -threoninresten, wogegen Phosphotyrosinreste und *N*-Phosphate gegenüber Basen relativ stabil sind (ihre Hydrolyse erfordert die längerfristige Einwirkung starker Basen bei gleichzeitig hoher Temperatur). Wie Abbildung 6 C zeigt, hatte die

Einwirkung von 1,5 M HCl keinen Einfluß auf die Intensität der phosphorylierten AMS-Polypeptide. Im Gegensatz dazu kam es in Gegenwart von 1,5 M KOH zur vollständigen Hydrolyse der phosphorylierten Aminosäurereste (Abb. 6 D). Die Säurestabilität der Renaturierungssignale und ihre Sensitivität gegenüber Basen weisen auf eine Phosphorylierung an Serin- und/oder Threoninresten hin.

Von den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen kinaseaktiven AMS-Polypeptiden sind die 64 kDa- und die 58 kDa-Komponente im Folgenden näherer charakterisiert worden. AMS-Polypeptide mit entsprechenden Molekulargewichten waren Gegenstand früherer Untersuchungen, die bislang weder zur Identifizierung der kodierenden Sequenzen, noch zur Aufklärung der subplastidären Lokalisation der als AMS6 (64 kDa) bzw. AMS9 (58 kDa) bezeichneten Proteine geführt hatten (Fulgosi, 1999).

3.1.2 Charakterisierung der 64 kDa-Komponente AMS6

Die Identität des 64 kDa-Polypeptids AMS6 war im Zusammenhang mit der Isolierung der redoxkontrollierten LHCII-Kinase, der ein entsprechendes Molekulargewicht zugeschrieben wird, von besonderem Interesse. Dieses AMS-Polypeptid, von dem nur die N-terminale Aminosäuresequenz (LTYEEALEQSVNADVGAEFDA) bekannt ist, konnte bislang selbst in hochauflösenden Gelsystemen nicht von der redoxkontrollierten Kinaseaktivität getrennt werden. Das aminoterminal Peptid aus AMS6 zeigte keine Homologie zu bekannten Proteinen aus der Datenbank und wurde zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers verwendet. Auf diese Weise konnte ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 64 kDa in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten nachgewiesen werden. Die Monospezifität des Antiserums ermöglichte die biochemische Charakterisierung der 64 kDa-Komponente AMS6 in der vorliegenden Arbeit.

3.1.2.1 Trennung von AMS6 und Polyphenoloxidase (62 kDa) in hochauflösenden Gelsystemen

Die *in vitro*-Phosphorylierung der subthylakoidalen AMS-Fraktion hat zum Nachweis von mindestens 20 verschiedenen Phosphoproteinen im Bereich von 10 bis >66 kDa geführt (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Polypeptidbande mit der stärksten Signalintensität (~62 kDa; Pfeilkopf) konnte bereits 2 Minuten nach der Inkubation der AMS-Fraktion mit [γ - 32 P]ATP nachgewiesen werden (Abb. 7 A, Spur 2) und war nach ca. 30 Minuten maximal phosphoryliert (Abb. 7 A, Spur 7). Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß diese phosphorylierte Polypeptidbande in dem verwendeten 9%igen Gelsystem mehr als einem Phosphoprotein entspricht, konnte die 62 kDa-Proteinbande serologisch eindeutig mit der Polyphenoloxidase (Diphenol:O₂ Oxidoreduktase, PPO) korreliert werden (Abb. 7 B, Spuren 1 bis 10). Die Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers mit zwei weiteren Polypeptiden von 32 bzw. 54 kDa spricht für eine (auto)proteolytische Degradation der *in vivo* im Thylakoidlumen lokalisierten PPO nach der

Zerstörung des Thylakoidsystems (Abb. 7 B, Pfeilköpfe). Es ist bekannt, daß pflanzliche Polyphenoloxidasen durch proteolytische Spaltung von einer latent inaktiven in eine aktive Konformation überführt werden können (Tolbert, 1973; Mayer und Harel, 1979; Mayer, 1987; Kuwabara und Katoh, 1999).

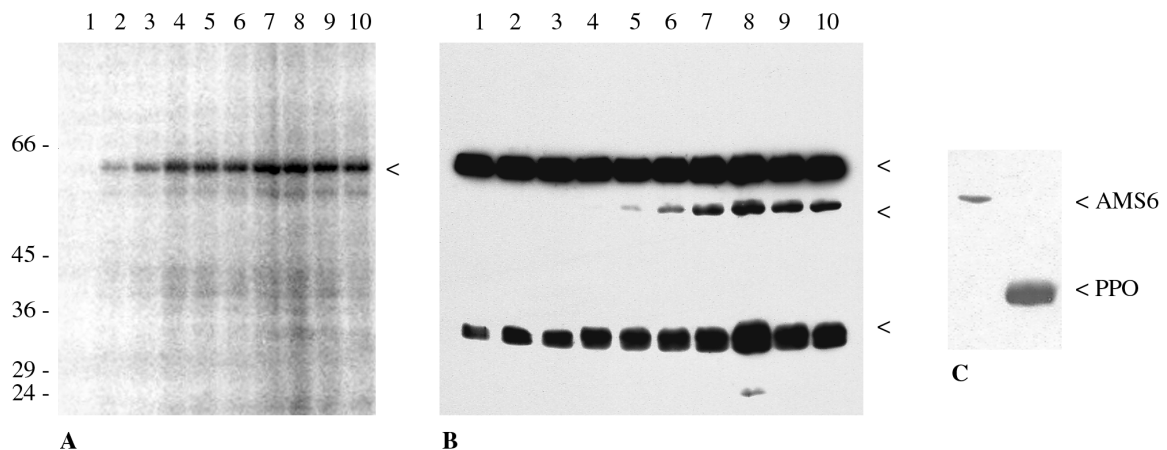


Abb. 7: Kinetik der *in vitro*-Phosphorylierung von AMS-Polypeptiden und Identifizierung des am stärksten phosphorylierten Polypeptids (Pfeilkopf). (A) Autoradiogramm *in vitro* phosphorylierter AMS-Polypeptide nach ihrer Auftrennung in einem 9%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Phosphorylierungsreaktion wurde nach 0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, bzw. 60 Minuten (1 bis 10) durch Zugabe von 0,6 mM ATP gestoppt. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton. (B) "Western"-Analyse der AMS-Polypeptide nach ihrer Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran mit dem polyklonalen Antikörper gegen die lumenale Polyphenoloxidase (PPO; 1 : 1000). Die Pfeilköpfe markieren die reife PPO und ihre (auto)proteolytischen Degradationsprodukte. (C) Serologischer Nachweis von AMS6 und PPO in der subthylakoidalen AMS-Fraktion nach ihrer Auftrennung in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel und Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembran. Zum Nachweis von AMS6 wurde der polyklonale Antikörper gegen das N-terminale Peptid der 64 kDa-Komponente verwendet (1 : 1000).

Die *in vitro*-Phosphorylierung von AMS-Polypeptiden hat gezeigt, daß die lumenale PPO einer bislang nicht identifizierten, membranintegralen Proteinkinase als Substrat dienen kann. Um zwischen potentieller Kinaseaktivität (64 kDa) und dem phosphorylierbaren Substrat (62 kDa) unterscheiden zu können, wurden die AMS-Polypeptide in einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach ihrer Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran serologisch untersucht. Die hochauflösende Trennung der Polypeptide im Molekulargewichtsbereich von 45 bis 65 kDa ermöglichte die eindeutige Differenzierung der 64 kDa-Komponente AMS6 von der phosphorylierbaren PPO (Abb. 7 C).

3.1.2.2 AMS6 als integrale Komponente der Thylakoidmembranen von Spinatchloroplasten

Die Behandlung von Thylakoidmembranen mit chaotropen bzw. alkalischen Lösungen gibt Auskunft über die Art der Wechselwirkung eines Proteins mit der photosynthetischen Membran. Die Sensitivität eines Polypeptids gegenüber Proteasen gibt zudem Aufschluß über seine

Topographie, insbesondere über die Orientierung hydrophiler Domänen integraler Komponenten (siehe Abschnitt 2.2.5.7). AMS6 verhielt sich in Gegenwart chaotroper bzw. alkalischer Lösungen wie ein typisches, integrales Membranprotein. Nach der Extraktion der Thylakoidmembranen mit 2 M NaBr bzw. 0,1 M Na₂CO₃ blieb es vollständig membrangebunden (Abb. 8, Spuren 3 bzw. 7). Durch die Behandlung mit 2 M NaSCN bzw. 0,1 N NaOH wurde weniger als die Hälfte des Proteins aus der Membran extrahiert (Abb. 8, Spuren 5 und 6 bzw. 9 und 10). Das deutet darauf hin, daß AMS6 sowohl über hydrophobe als auch elektrostatische Kräfte in der Thylakoidmembran inseriert ist. Seine Sensitivität gegenüber Trypsin läßt vermuten, daß das N-terminale, antigene Epitop der proteolytischen Aktivität im Stroma zugänglich ist. Degradationsprodukte einer stromal exponierten hydrophilen Domäne konnten mit dem Antikörper gegen den N-Terminus von AMS6 allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 8, Spuren 11 bzw. 12). Möglicherweise wurde das antigene Epitop im N-terminalen Abschnitt des Proteins durch die proteolytische Spaltung mit Trypsin zerstört. Der fehlende Nachweis von Abbauprodukten nach der Behandlung der Thylakoidmembranen mit Thermolysin oder Proteinase K (nicht gezeigt) unterstützt diese Annahme.

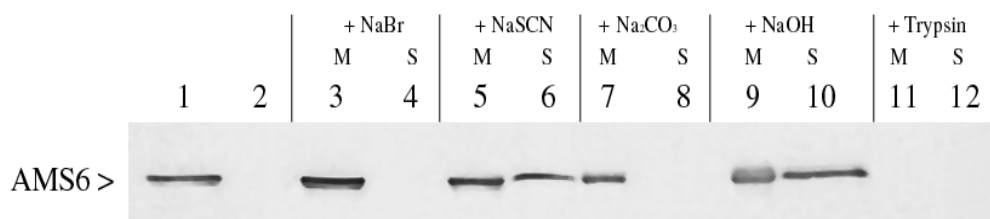


Abb. 8: Extraktion von Thylakoidmembranen mit chaotropen und alkalischen Lösungen und Behandlung mit Trypsin. "Western"-Analyse der Proteinfractionen mit dem polyklonalen Antikörper gegen den N-Terminus von AMS6 (1 : 1000). Thylakoidmembranen (entsprechend 0,5 mg Chlorophyll) aus Spinatchloroplasten wurden zur Beseitigung peripherer Polypeptide mit 2 M NaBr, 2 M NaSCN, 0,1 M Na₂CO₃, bzw. 0,1 N NaOH behandelt. Die Zugänglichkeit proteolytischer Erkennungssequenzen in der 64 kDa-Komponente wurde durch die Behandlung der Thylakoidmembranen mit Trypsin untersucht. Thylakoidmembranen ohne jeglichen Zusatz dienten als Kontrolle (1). Die extrahierten Polypeptide bzw. die proteolytischen Abbauprodukte (S; 2, 4, 6, 8, 10, bzw. 12) und die Membranfraktionen (M; 3, 5, 7, 9, bzw. 11) wurden in einem 10 - 22%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran immobilisiert.

3.1.2.3 Subthylakoidale Lokalisation von AMS6

Zur Ermittlung der subthylakoidalen Lokalisation von AMS6 wurden Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten in Gegenwart von 1,5% (w/w) n-Dodecyl-β-D-maltosid partiell solubilisiert und die supramolekularen Proteinkomplexe in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.4.1). Der serologische Nachweis der 64 kDa-Komponente erfolgte nach der Immobilisierung der unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennten Polypeptiduntereinheiten der thylakoidalen Proteinkomplexe (Abb. 9).

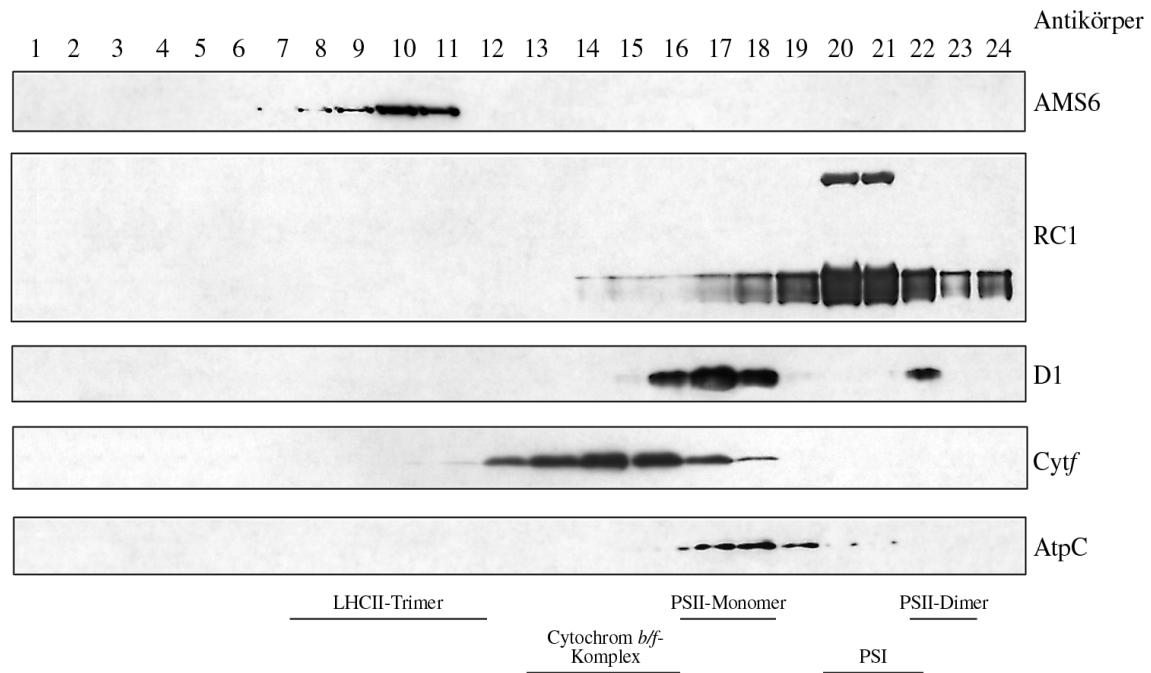


Abb. 9: Subthylakoidale Lokalisation von AMS6. Thylakoidmembranen (entsprechend 0,4 mg Chlorophyll) wurden in Gegenwart von n-Dodecyl- β -D-maltosid partiell solubilisiert und die supramolekularen Proteinkomplexe in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (0,1 - 1,0 M) nach Müller und Eichacker (1999) aufgetrennt. Der Gradient wurde von links nach rechts fraktioniert, und die Polypeptidzusammensetzung der Fraktionen wurde nach ihrer Auftrennung in einem 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgel und Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran durch "Western"-Analyse untersucht. Zum Nachweis von AMS6 wurde der Antikörper gegen das N-terminale Peptid verwendet (1 : 1000). Die Proteinkomplexe PSI, PSII, Cytochrom *b/f* bzw. ATP-Synthase wurden mit polyklonalen Antisera gegen das PSI-Reaktionszentrum (RC1), das D1-Polypeptid (jeweils 1 : 1000), gegen Cytochrom *f* (Cyt*f*) bzw. die Gamma-Untereinheit der ATP-Synthase (AtpC) nachgewiesen (jeweils 1 : 3000). Die Lokalisation des trimeren LHCII-Komplexes in den Fraktionen 8 bis 12 wurde in einem parallelen Ansatz ermittelt und ist hier nur schematisch dargestellt.

Das 64 kDa-Polypeptid AMS6 war unter den gewählten Bedingungen überwiegend mit den trimeren LHCII-Komplexen (~60 kDa) assoziiert (Abb. 9, Spuren 8 bis 11). Um festzustellen, ob die Komigration durch ähnliche Sedimentationskoeffizienten der Proteine in dem kontinuierlichen Saccharosegradienten hervorgerufen wurde, oder AMS6 tatsächlich Bestandteil des LHCII-Komplexes ist und möglicherweise an der reversiblen Assoziation/Dissoziation des Antennenkomplexes mit dem PSII teilnimmt, wurden PSII-LHCII-Superkomplexe nach der Methode von Eshaghi et al. (1999) isoliert. Dazu wurden Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten in Gegenwart von Glycinbetain, das hochmolekulare Proteinkomplexe stabilisiert, partiell solubilisiert (siehe Abschnitt 2.2.5.4.3). Die Trennung der trimeren LHCII-Komplexe, PSI-Monomere und PSII-LHCII-Superkomplexe erfolgte anschließend in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten. Auch unter diesen Bedingungen war AMS6 fast ausschließlich mit den trimeren LHCII-Komplexen (Abb. 10, Spur 2), nicht aber mit den PSII-LHCII-Superkomplexen assoziiert (Abb. 10, Spur 3). Das deutete darauf hin, daß AMS6 kein fester Bestandteil des LHCII-Komplexes ist und nicht an dessen reversibler Assoziation mit dem PSII teilnimmt. Die Akkumulation von AMS6 in den Granastapeln (Abb. 10, Spur 6) ließ aber

vermuten, daß seine Komigration mit dem LHCII-Komplex nicht nur auf einen ähnlichen Sedimentationskoeffizienten in dem kontinuierlichen Saccharosegradienten zurückzuführen ist, sondern auch eine funktionelle Ursache haben kann.

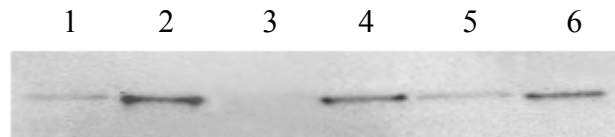


Abb. 10: "Western"-Analyse von PSI-Monomeren (1), trimeren LHCII-Komplexen (2) und PSII-LHCII-Superkomplexen (3) sowie Thylakoidmembranen (4), Stroma- (5) und Granalamellen (6) aus Spinatchloroplasten nach ihrer Auftrennung in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel und Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran mit dem polyklonalen Antiserum gegen den N-Terminus von AMS6 (1 : 1000).

Diese Annahme wurde durch die Analyse der Gerstenmutante *chlorina-f2* überprüft, die aufgrund eines Chlorophyll *b*-Defektes keinen funktionellen LHCII-Komplex assemblieren kann, obwohl die Chlorophyll-bindenden LHCII-Apoproteine exprimiert werden (Ryrie, 1983; Karukstis und Sauer, 1984).

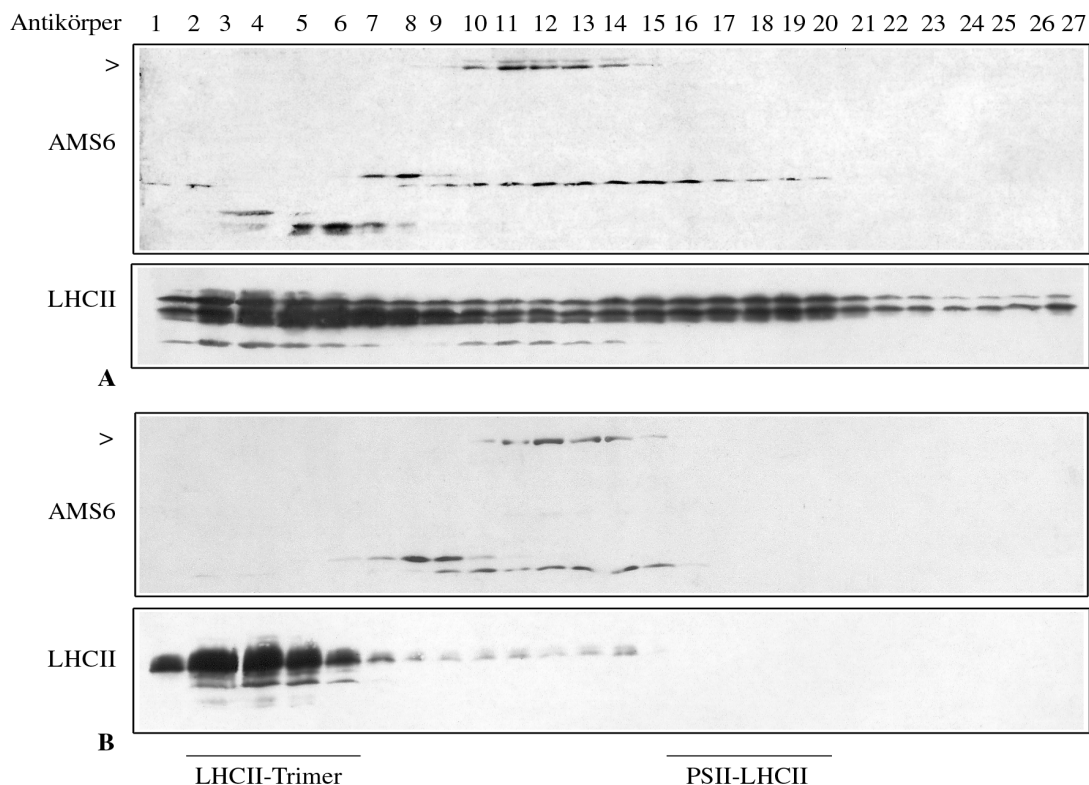


Abb. 11: "Western"-Analyse partiell solubilisierter Thylakoidmembranen aus *Hordeum vulgare* L. Wildtyp-Pflanzen (A) und der Chlorophyll *b*-Mutante *chlorina-f2* (B). Die supramolekularen Proteinkomplexe der Thylakoidmembranen wurden wie unter Abb. 9 beschrieben in kontinuierlichen Saccharosegradienten nach Müller und Eichacker (1999) aufgetrennt und die Gradientenfraktionen nach ihrer Auftrennung in 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen immobilisiert. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte von links nach rechts. Für den serologischen Nachweis des potentiellen Gerstenhomologs von AMS6 (Pfeilköpfe) wurde der Antikörper gegen den N-Terminus des Spinatproteins verwendet (AMS6, 1 : 1000); LHCII-Polypeptide wurden mit dem Antikörper 34-II-3 nachgewiesen (LHCII, 1 : 3000).

Mit dem Antikörper gegen den N-Terminus von AMS6 aus Spinat wurde sowohl in den partiell solubilisierten Thylakoidmembranen aus Wildtyp-Gerstenpflanzen (Abb. 11 A, Spuren 10 bis 14) als auch der Mutante (Abb. 11 B, Spuren 11 bis 15) unter anderem ein Polypeptid von 55 kDa (Pfeilkopf) serologisch nachgewiesen. Bislang ist unklar, ob es sich dabei um das homologe Gerstenprotein handelt, zumal die 55 kDa-Komponente im Wildtyp nicht mit den trimeren LHCII-Komplexen assoziiert war (Abb. 11 A, Spuren 3 bis 7) und der Antikörper gegen den N-Terminus des Spinatproteins mit einer Reihe weiterer Proteine im Molekulargewichtsbereich von < 55 kDa (unspezifische) Kreuzreaktionen zeigte.

3.1.2.4 Korrelation zwischen AMS6 und der redoxkontrollierten Aktivität der potentiellen LHCII-Kinase

Die 64 kDa-Komponente AMS6 galt bislang als vielversprechender Kandidat für die redoxkontrollierte LHCII-Kinase, da das Protein, wie bereits erwähnt, selbst in hochauflösenden Gelsystemen nicht von der Kinaseaktivität getrennt werden konnte. Durch die Perfusionschromatographie von AMS-Polypeptiden ist es nun gelungen, AMS6 eindeutig von der membranintegralen LHCII-Kinase zu trennen. Seine serologisch ermittelte Lokalisation in den Proteinfractionen 20 bis 24 (Abb. 12) war nicht mit dem Maximum der Kinaseaktivität korreliert (Abb. 12, Fraktion 16).

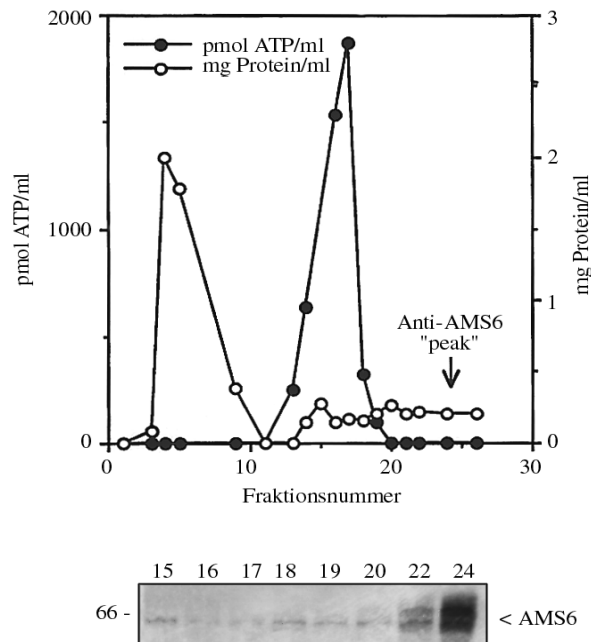


Abb. 12: Aufreinigung kinaseaktiver AMS-Polypeptide mittels Perfusionschromatographie an einer POROS-PI-Säule und serologischer Nachweis von AMS6 (mit freundlicher Genehmigung von Prof. I. Ohad). Die Proteinfractionen wurden nach ihrer Auftrennung in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel auf PVDF-Membran immobilisiert und anschließend kinaseaktive Polypeptide in Gegenwart von HistonIII-S auf der Membran renaturiert (Aktivität graphisch dargestellt). Für die "Western"-Analyse der Proteinfractionen wurde die PVDF-Membran im Anschluß an die Renaturierung mit dem polyklonalen Antikörper gegen den N-Terminus von AMS6 inkubiert (1 : 1000). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die physiologische Bedeutung von AMS6 in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten ist unklar. Seine Aufreinigung mit der redoxkontrollierten Kinaseaktivität, mit der das membranintegrale Protein jedoch nicht identisch ist, und seine Akkumulation in den Granastapeln legen eine regulatorische Funktion der 64 kDa-Komponente in der Modulation des Absorptionsquerschnittes am PSII nahe.

3.1.3 Analyse der 58 kDa-Komponente AMS9

In einem früheren Ansatz zur Isolierung kinaseaktiver AMS-Polypeptide wurde die interne Aminosäuresequenz (IQLETARLY) der 58 kDa-Komponente AMS9 ermittelt (Fulgosi, 1999). Die Homologie dieses Nonapeptids zu der potentiellen Histidinkinase slr0311 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 war für die Aufklärung der funktionellen Rolle von AMS9 in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten ausschlaggebend. Zudem konnte mit dem polyklonalen Antikörper, der gegen die rekombinante cyanobakterielle Histidinkinase hergestellt worden war, ein Polypeptid von 58 kDa in der photosynthetischen Membran von Spinatchloroplasten nachgewiesen werden.

Das immunologische Sichten einer λ gt11-cDNS-Bibliothek aus Spinat mit dem slr0311-Antikörper hat zur Isolierung von Phagen mit zwei Typen von Insertionen geführt (Fulgosi, 1999). Erstere ermöglichten die Identifizierung des komplexen Polypeptids TTP30 (siehe Abschnitt 3.2). Im zweiten Fall resultierte ein DNS-Fragment von ~200 bp (SAMS2A) mit Homologie zu der Histidinkinase DokA aus *Dictyostelium discoideum*. Ausgehend von diesem DNS-Fragment wurde ein cDNS-Klon mit einer Länge von 1,7 kb isoliert. Die Nukleinsäuresequenz zeigte Homologie zu zwei DNS-bindenden Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* L. (tcp2) und *Glycine max* L. (tcp3), nicht aber zur Ausgangssequenz SAMS2A. Ursache hierfür war vermutlich ein Mikrosatellitenmotiv innerhalb des 200 bp langen cDNS-Fragments, das zur Isolierung einer Reihe von nicht verwandten Proteinen geführt hat. Dieses Motiv erstreckt sich fast über die gesamte Länge der SAMS2A-Sequenz (nicht gezeigt), die dadurch für das Sichten von cDNS-Bibliotheken ungeeignet war.

Die Identifizierung der mutmaßlichen Proteinkinase AMS9 mit molekularbiologischen Methoden erforderte detailliertere Sequenzinformationen auf Aminosäureebene für die Ableitung sequenzspezifischer Oligonukleotide. Aus diesem Grund wurde ein kinaseaktives AMS-Polypeptid mit einem AMS9 entsprechenden Molekulargewicht von 58 kDa durch SDS-PAGE präparativ angereichert und N-terminal sequenziert (siehe Abschnitt 2.2.5.18). Es resultierte ein Gemisch aus verschiedenen Aminosäuresequenzen unterschiedlicher Abundanz, die vermutlich auf eine Kontamination mit Polypeptiden ähnlichen Molekulargewichtes zurückzuführen sind (Abb. 13).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
D	L	V	V	L	A	V	D	D	H	V	A	V
t	E	I	G	V	T	A	G	A	R	A	D	A
	V	G	N	D		L	A	V		R	G	L
		E	F	t		T		L		G		G
			L	E		G		E		L		
			D			E		N		E		
			E	Y		D		h		D		
						N						

Abb. 13: Ergebnis der N-terminalen Mikrosequenzierung des präparativ aufgereinigten, kinaseaktiven AMS-Polypeptids von 58 kDa. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

Die aminoterminalen Hauptsequenz DLVVLAVDDHVAV zeigte jeweils 70% Homologie zu einem DNS-bindenden Protein aus *Pseudomonas aeruginosa* (P24908) sowie dem Zwei-Komponenten "response regulator"-Protein YdfH aus *Bacillus subtilis* (G69780). Damit verstärkten sich die Hinweise darauf, daß die 58 kDa-Komponente Bestandteil eines thylakoidalen Signaltransduktionssystems sein könnte. Diese Annahme wurde in den folgenden biochemischen Untersuchungen überprüft.

3.1.3.1 AMS9 als periphere Komponente der Thylakoidmembranen von Spinatchloroplasten

Die Behandlung der Thylakoidmembranen mit chaotropen und alkalischen Lösungen identifizierte AMS9 als peripheren Bestandteil der photosynthetischen Membran. Sowohl chaotrope Salze unterschiedlicher Stärke (2 M NaBr bzw. 2 M NaSCN) als auch 0,1 M NaOH lösten das Protein nahezu vollständig von der Thylakoidmembran ab (Abb. 14, Spuren 4, 6, bzw. 8).

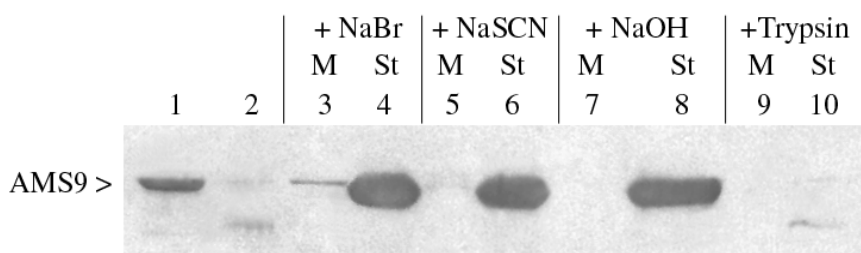


Abb. 14: Extraktion von AMS9 mit chaotropen und alkalischen Lösungen und Sensitivität gegenüber Trypsin. "Western"-Analyse mit dem polyklonalen Antikörper gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 (1 : 1000). Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wurden wie unter Abb. 8 beschrieben ohne (1) bzw. mit 2 M NaBr, 2 M NaSCN oder 0,1 N NaOH sowie mit Trypsin behandelt. Die extrahierten Polypeptide bzw. die proteolytischen Abbauprodukte (S; 2, 4, 6, 8, bzw. 10) und die verbleibenden Membranfraktionen (M; 3, 5, 7, bzw. 9) wurden nach ihrer Auftrennung in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosemembran immobilisiert.

Die Sensitivität des 58 kDa-Polypeptids gegenüber Trypsin deutet auf eine Assoziation mit der Stromaseite der Thylakoidmembran hin (Abb. 14, Spur 9). Mit dem Antikörper gegen die cyanobakterielle Histidinkinase konnten keine Abbauprodukte in der Stromafraktion nachgewiesen werden (Abb. 14, Spur 10). Das sprach dafür, daß das antigene Epitop des pflanzlichen Proteins der proteolytischen Aktivität im Stroma zugänglich war und zerstört wurde.

3.1.3.2 Subthylakoidale Lokalisation von AMS9

Die subthylakoidale Lokalisation von AMS9 wurde wie in Abschnitt 3.1.2.3 beschrieben untersucht. Unter den gewählten Bedingungen war die 58 kDa-Komponente hauptsächlich mit dem PSI assoziiert (Abb. 15, Spuren 15 bis 18).

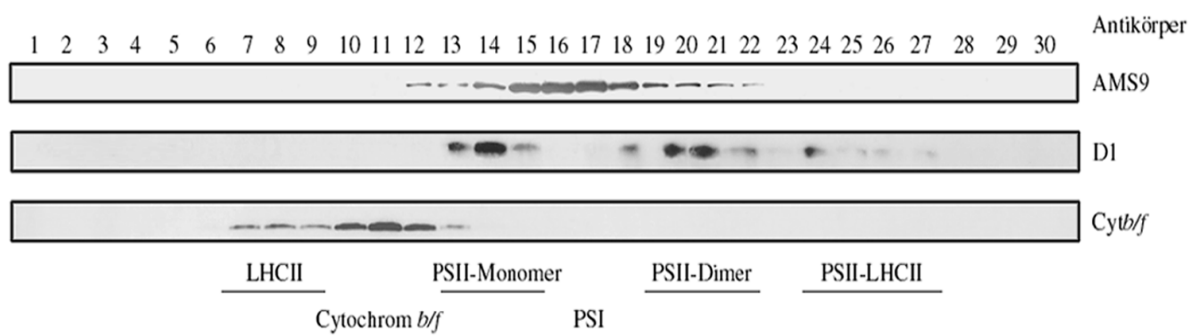


Abb. 15: Subthylakoidale Lokalisation von AMS9. Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wurden wie unter Abb. 9 beschrieben partiell solubilisiert. Die Fraktionierung des kontinuierlichen Saccharosegradientens nach Eshaghi et al. (1999) erfolgte von links nach rechts. Die Polypeptidzusammensetzung der Fraktionen wurde nach ihrer Auftrennung in einem 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgel und der Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran durch "Western"-Analyse mit verschiedenen Antisera untersucht. Für den serologischen Nachweis von AMS9 wurde der Antikörper gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 (1 : 1000) verwendet; zur Lokalisation des PSII und des Cytochrom *b/f*-Komplexes wurden Antisera gegen das D1-Polypeptid (1 : 1000) bzw. gegen Cytochrom *b_s* und *f* (1 : 3000) eingesetzt. Die Positionen des LHCII-Komplexes und des PSI wurden in einem parallelen Ansatz ermittelt und sind hier nur schematisch dargestellt.

Die Assoziation von AMS9 mit dem PSI war konsistent mit seiner Akkumulation in den ungestapelten Stromalamellen (Abb. 16, Spur 2) sowie den Granarandbereichen (nicht gezeigt). Die serologische Analyse der Proteinfractionen aus der Präparation der PSII-LHCII-Superkomplexe bestätigte die Komigration mit dem PSI (Abb. 16, Spur 5).

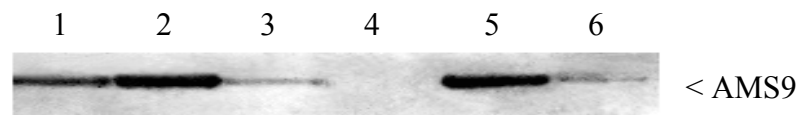


Abb. 16: "Western"-Analyse von Thylakoidmembranen (1), Stromalamellen (2) und Granalamellen (3) sowie von trimeren LHCII-Komplexen (4), PSI-Monomeren (5) und PSII-LHCII-Superkomplexen (6) aus Spinatchloroplasten nach der Auftrennung der Proteinfractionen in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel und Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembran mit dem polyklonalen Antiserum gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 (1 : 1000).

Die Komigration der potentiellen Proteinkinase AMS9 mit dem PSI in den ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran warf die Frage nach der Natur und Anzahl phosphorylierbarer PSI-Polypeptide auf. Aus diesem Grund wurden die supramolekularen Proteinkomplexe der photosynthetischen Membran wie in Abschnitt 3.1.2.3 beschrieben isoliert und vor der Auftrennung ihrer Polypeptiduntereinheiten durch SDS-PAGE in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durch die Aktivität endogener Proteinkinasen *in vitro* phosphoryliert (Abb. 17, Spuren 1 bis 28). Parallel dazu wurden die beiden Photosysteme PSI und PSII getrennt von der ATP-Synthase und dem Cytochrom *b/f*-Komplex wie in Abschnitt 2.2.5.4.2 beschrieben aufgereinigt und ihre Polypeptiduntereinheiten phosphoryliert (nicht gezeigt).

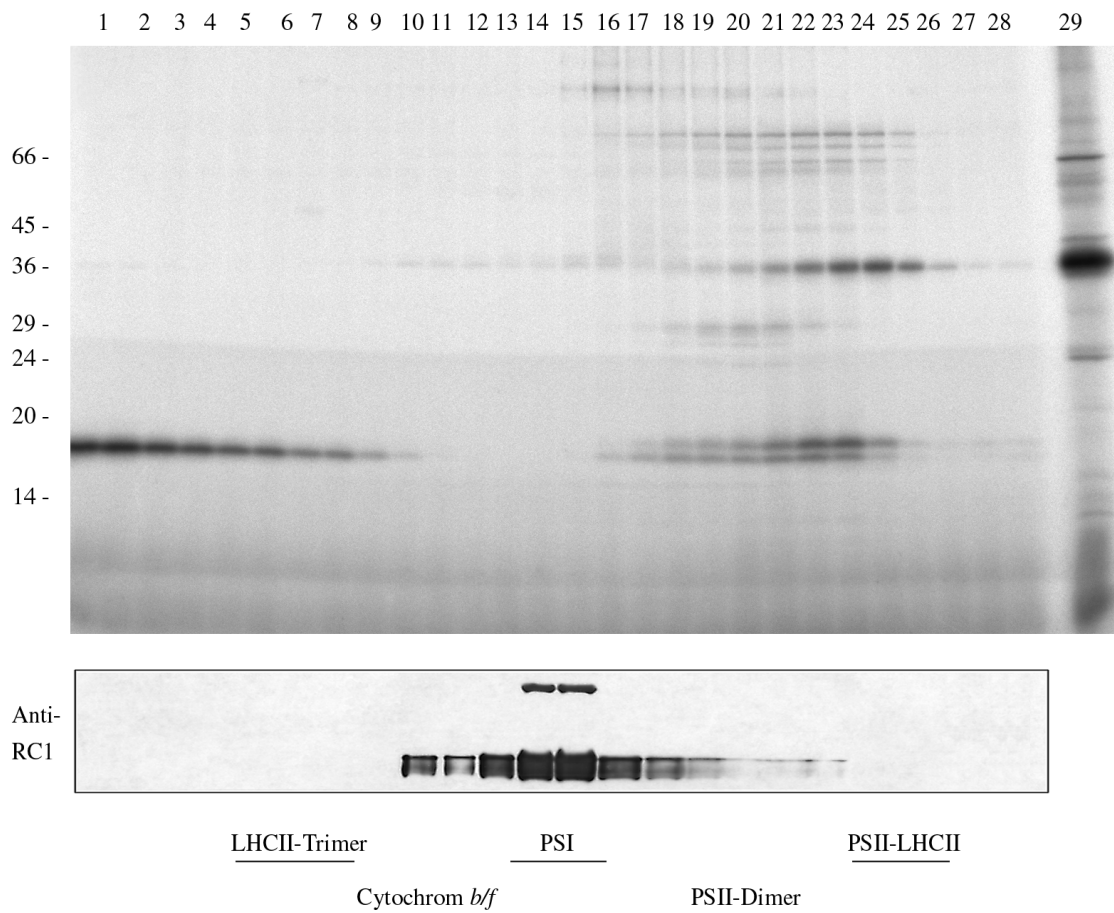


Abb. 17: *In vitro*-Phosphorylierung der supramolekularen Proteinkomplexe partiell solubilisierter Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten. Autoradiogramm eines 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgels. Die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran wurden wie unter Abb. 9 beschrieben in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Fraktionierung des Gradientens nach Müller und Eichacker (1999) erfolgte von links nach rechts. Vor ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Gradientenfractionen (1 bis 28) mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht solubilisierter Thylakoidmembranen (29). Die Lokalisation der PSI-Polypeptide wurde mit einem polyklonalen Antiserum gegen das Reaktionszentrum des PSI ermittelt (Anti-RC1, 1 : 1000). Die Positionen der übrigen thylakoidalen Proteinkomplexe wurden in einem parallelen Ansatz bestimmt und sind hier schematisch dargestellt. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Mit beiden Verfahren konnten keine Phosphoproteine nachgewiesen werden, die eindeutig mit dem PSI assoziiert waren (Abb. 17, Spuren 13 bis 15). Mögliche Ursachen hierfür waren entweder (a) suboptimale Phosphorylierungsbedingungen, (b) die räumliche Trennung von Kinase(n) und Substrat(en) während der partiellen Solubilisierung der Thylakoidmembranen oder (c) der Phosphorylierungszustand der Polypeptiduntereinheiten des PSI vor der *in vitro*-Phosphorylierung (siehe Abschnitt 3.1). Für den zweiten Fall spricht die Tatsache, daß die Phosphorylierung von Thylakoidmembranen aus Tabakchloroplasten vor ihrer Solubilisierung zum Nachweis eines Phosphopolypeptids von 58 kDa geführt hat, das in dem nachfolgenden kontinuierlichen Saccharosegradienten eindeutig mit dem PSI komigrierte. Weiterführende serologische Analysen unterstützten die Annahme, daß es sich dabei um eine autophosphorylierte Form der potentiellen Proteinkinase AMS9 handeln könnte (A. Hepp, persönliche Mitteilung).

3.1.3.3 Biochemische Charakterisierung der Histidinkinase-Mutante Δ slr0311 in *Synechocystis* sp. PCC6803

Die interne Aminosäuresequenz aus AMS9 besitzt, wie erwähnt, Homologie zu der cyanobakteriellen Histidinkinase slr0311. Dabei handelt es sich um ein überwiegend hydrophiles Protein mit einem kurzen N-proximalen, hydrophoben Abschnitt, über den die Interaktion mit der photosynthetischen Membran erfolgen könnte (siehe dazu auch Abschnitt 4.1.2). Die Inaktivierung des *slr0311*-Gens durch Transformation und homologe Rekombination sollte daher zum Verständnis der funktionellen Rolle von AMS9 in der Thylakoidmembran von Spinachchloroplasten beitragen. Dazu wurde das Gen für die potentielle Histidinkinase slr0311 im Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 durch Insertion einer Kanamycinkassette zerstört.

Die kanamycinresistenten Δ slr0311-Kulturen zeigten weder unter niedrigen ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$), noch hohen Lichtintensitäten ($300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$) phänotypische Unterschiede gegenüber den ebenfalls antibiotikaresistenten Wildtypkulturen (nicht gezeigt). Dieser Befund spiegelte sich in den Spektraleigenschaften der absorbierenden Pigmente wider. Die Extinktionsmaxima des Chlorophyll *a*, der Carotinoide und der Phycobiliproteine aus Wildtyp- und Mutantenkulturen waren unter den untersuchten Wachstumsbedingungen nahezu identisch (Abb. 18).

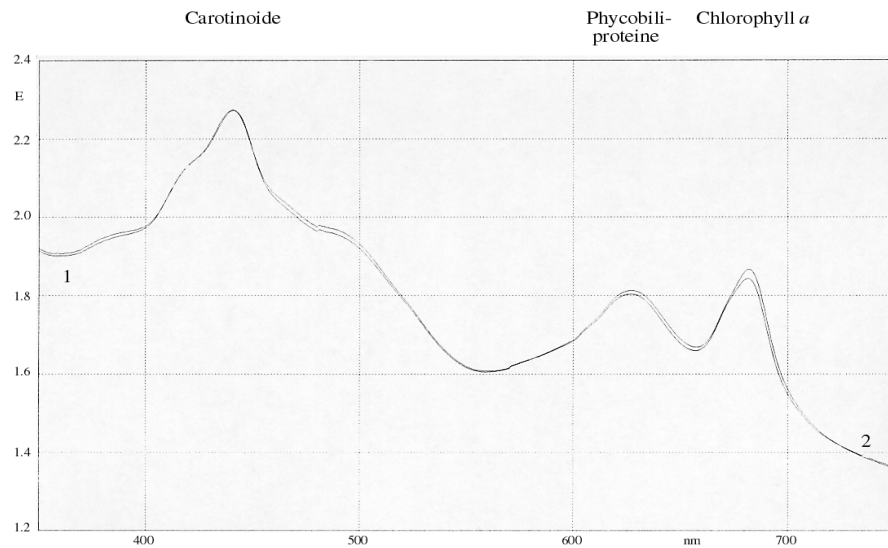


Abb. 18: Spektraleigenschaften der Pigmente aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1) und Δ slr0311-Kulturen (2). Die Zelldichte der 10 Tage bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ angezogenen Kulturen wurde durch Messung der Extinktion bei 800 nm äquilibriert. Die Extinktionsmessung erfolgte anschließend im Wellenlängenbereich von 350 bis 750 nm in 2 nm-Schritten. Die Extinktionsmaxima der Carotinoide, der Phycobiliproteine und des Chlorophyll *a* sind markiert.

Das Polypeptidmuster von Phycobilisomen- und Gesamtmembranfraktionen aus Wildtyp- und Δ slr0311-Kulturen unter verschiedenen Lichtintensitäten zeigte ebenfalls weder auffällige quantitative noch qualitative Unterschiede (Abb. 19, Spuren 1 bis 4 (WT) bzw. 5 bis 8 (Δ slr0311)).

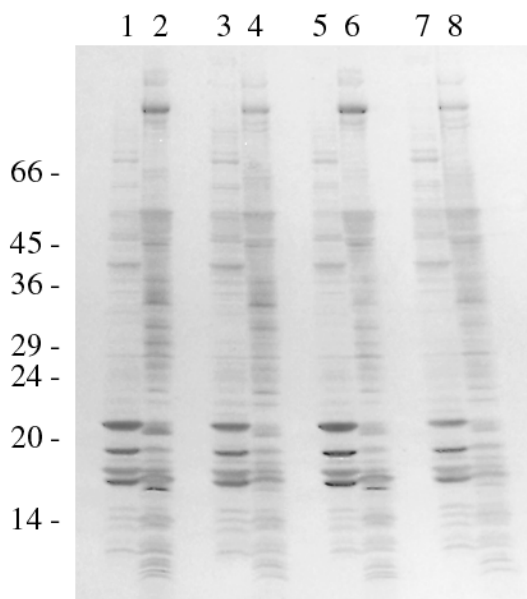


Abb. 19: Einfluß unterschiedlicher Lichtintensitäten auf das Polypeptidmuster von Phycobilisomenfraktionen (1, 3, 5, bzw. 7) und Gesamtmembranen (2, 4, 6, bzw. 8) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1 bis 4) und Δ slr0311-Kulturen (5 bis 8). Die Anzucht der Kulturen erfolgte für 4 Tage bei $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ (1 und 2 bzw. 5 und 6) oder 2 Tage bei $300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ (3 und 4 bzw. 7 und 8) und $24,5^\circ\text{C}$. Phycobilisomenfraktionen und Gesamtmembranen (entsprechend $35 \mu\text{g}$ Protein) wurden in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, und das Polypeptidmuster wurde anschließend durch Silberfärbung analysiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Zur Aufklärung der physiologischen Funktion der mutmaßlichen Sensorkinase *slr0311* in *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde zunächst das *in vitro*-Phosphorylierungsmuster von Zellextrakten und Gesamtmembranen unter verschiedenen Redoxbedingungen untersucht. Sowohl in Anwesenheit reduzierender als auch oxidierender Agentien waren die Anzahl und die Intensität der Phosphoproteine in den Membranfraktionen aus Wildtyp- und Δ *slr0311*-Kulturen weitgehend vergleichbar (Abb. 20, Spuren 1 bis 3 (WT) bzw. 5 bis 7 (Δ *slr0311*)). Auffällige Unterschiede konnten nur im Hinblick auf das Phosphorylierungsmuster von Zellextrakten festgestellt werden (Abb. 20, Spuren 4 bzw. 8). Die starke Phosphorylierung von Polypeptiden im Molekulargewichtsbereich <14 kDa in der Mutante steht aber vermutlich nicht mit dem Defekt des *slr0311*-Gens im Zusammenhang.

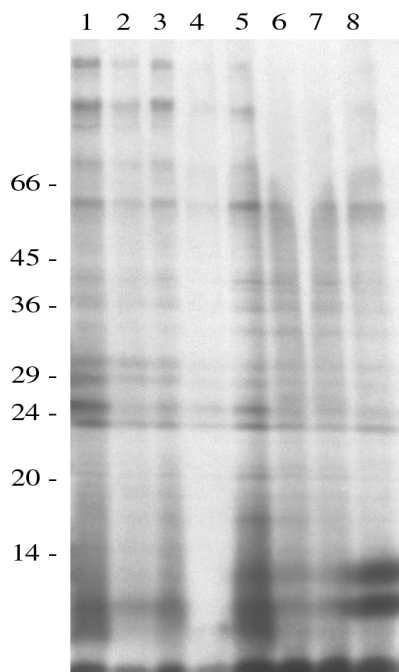


Abb. 20: *In vitro*-Phosphorylierung von Gesamtmembranen und Zellextrakten aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- und Δ *slr0311*-Kulturen, angezogen bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$. Autoradiogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels. Gesamtmembranen (entsprechend $35 \mu\text{g}$ Protein) aus Wildtyp- (1 bis 3) bzw. Δ *slr0311*-Kulturen (5 bis 7) wurden in Gegenwart von $1 \text{ mM K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 bzw. 5), 5 mM DTT (2 bzw. 6) oder ohne jegliche Zugabe (3 bzw. 7) mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Parallel dazu wurden Zellextrakte in Abwesenheit oxidierender bzw. reduzierender Agentien phosphoryliert (4 bzw. 8). Das Phosphorylierungsmuster der Proteinfractionen wurde nach SDS-PAGE durch Autoradiographie analysiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Durch die "pulse/chase"-Markierung der *in vivo*-Translationsprodukte von Wildtyp- und Δ *slr0311*-Kulturen unter niedrigen Lichtintensitäten (siehe Abschnitt 2.2.3.6) konnte ein möglicher Einfluß der *slr0311*-Gendisruption auf translationaler Ebene ausgeschlossen werden. Mit Ausnahme eines relativ stark markierten 60 kDa -Polypeptids (Abb. 21, Spuren 8 bis 10, Pfeilkopf) unterschied sich das *in vivo*-Translationsmuster der Mutante (Abb. 21, Spuren 6 bis 10) nicht wesentlich von dem des Wildtyps (Abb. 21, Spuren 1 bis 5). Die 60 kDa -Komponente, die bereits 15 Minuten nach der Inkubation der Mutante mit $\text{L-}^{35}\text{S}$ -Methionin nachgewiesen werden konnte, stand nicht mit dem *slr0311*-Gendefekt im Zusammenhang. Dieses Polypeptid wurde auch in dem *in vivo*-Translationsmuster der Rotamasemutante Δ *slr0408* detektiert (siehe Abschnitt 3.3.6.4).

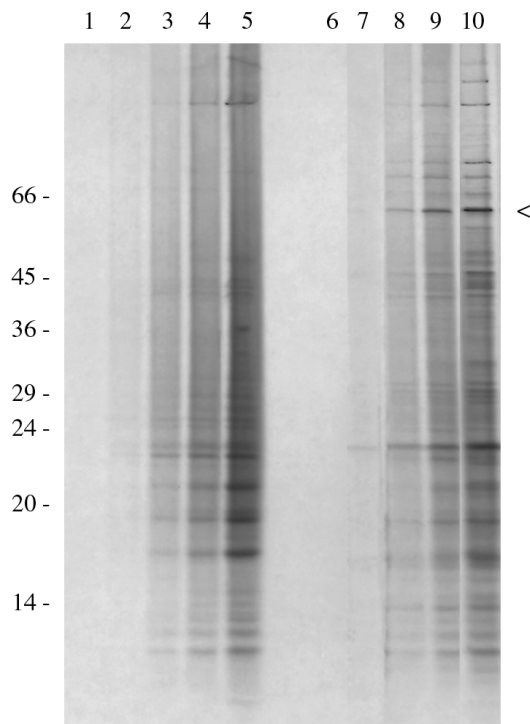


Abb. 21: Autoradiogramm der *in vivo*-Translationsprodukte von *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1 bis 5) und Δ slr0311-Kulturen (6 bis 10). Die Kulturen wurden 3 Tage bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ angezogen und dann bei gleicher Zelldichte mit $\text{L-}^{35}\text{S}$ -Methionin inkubiert. Nach 0, 5, 15, 30, bzw. 60 Minuten (Spuren 1 bis 5 bzw. 6 bis 10) wurden jeweils 2 ml Kultur entnommen und die *in vivo*-Translationsprodukte nach dem Abstoppen der Translation mit Chloramphenicol in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Pfeilkopf hebt ein besonders stark markiertes Polypeptid von ~ 60 kDa in der Mutante hervor. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Um Auskunft darüber zu erhalten, ob die Zerstörung des Gens für die potentielle Histidinkinase die Photosyntheseleistung der Mutante beeinflusst, wurde die Chlorophyllfluoreszenz der *Synechocystis* sp. PCC6803-Kulturen in Gegenwart des Herbizids Diuron (DCMU) gemessen. Diuron inhibiert den photosynthetischen Elektronentransport im PSII und reduziert dadurch das Ausmaß an photochemischem "quenching". Die im Vergleich zum Wildtyp geringere maximale Quantenausbeute (F_v/F_{max}) der Mutante deutete auf eine Störung des Energietransfers von den Phycobilisomen zu den beiden Photosystemen bzw. zwischen PSII und PSI hin (Abb. 22 A). Eine mögliche Ursache hierfür könnte das gegenüber dem Wildtyp deutlich höhere PSII/PSI-Verhältnis der Histidinkinase-Mutante sein, das vor kurzem bei der Aufnahme von 77 K-Spektren ermittelt wurde und auf einen geringeren Anteil an PSI in der photosynthetischen Membran von Δ slr0311 hinweist (Dr. A. Sokolenko, persönliche Mitteilung). Die "state I/state II-transition" war dagegen von der Gendisruption nicht betroffen (Abb. 22 B). Im Hinblick auf die Polypeptidzusammensetzung der Proteinkomplexe PSI, PSII, des Cytochrom *b/f*-Komplexes und der Phycobilisomen konnten unter den untersuchten Wachstumsbedingungen jedoch weder quantitative, noch qualitative Unterschiede zwischen Wildtyp- und Δ slr0311-Kulturen als mögliche Ursache für einen gestörten Energietransfer festgestellt werden (Abb. 23 A bis D, Spuren 1 (WT) bzw. 2 (Δ slr0311)).

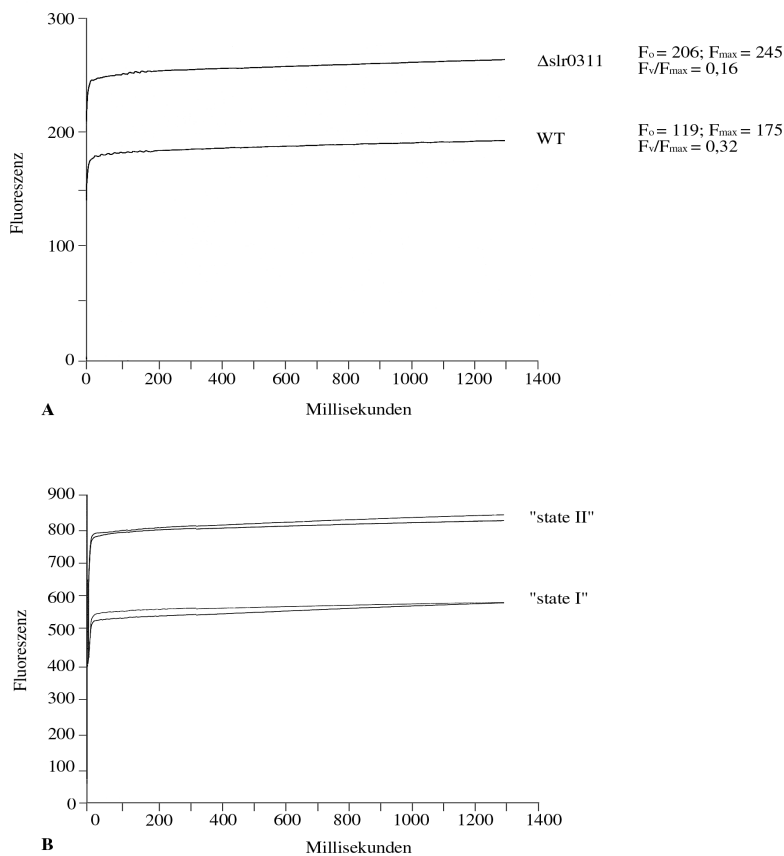


Abb. 22: Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz in Gegenwart von DCMU (**A**) sowie der "state I/state II-transition" (**B**) von *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (WT) und $\Delta slr0311$ -Kulturen gleicher Zelldichte. Die Kulturen wurden 4 Tage bei $50 \mu E/m^2 \times Sekunde^{-1}$ angezogen. Der photosynthetische Elektronentransport im PSII wurde durch die Zugabe von DCMU inhibiert. Die maximale Quantenausbeute des PSII spiegelt der Quotient F_v/F_{max} wider.

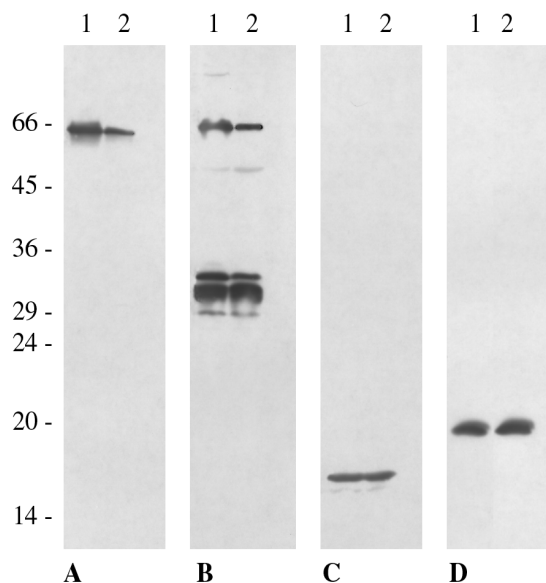


Abb. 23: "Western"-Analyse von Gesamtmembranen (**A bis C**) und Phycobilisomenfraktionen (**D**) 5 Tage alter *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1) und $\Delta slr0311$ -Kulturen (2), angezogen bei einer Lichtintensität von $50 \mu E/m^2 \times Sekunde^{-1}$. Der serologische Nachweis des PSI-Reaktionszentrums (**A**), des D1-Polypeptids des PSII (**B**) und des Rieske-Proteins des Cytochrom *b/f*-Komplexes (**C**) erfolgte mit polyklonalen Antikörpern gegen die homologen Proteine aus *S. oleracea* L. (jeweils 1 : 1000). Die Polypeptidunter-einheiten der Phycobilisomen wurden mit dem *Synechocystis*-spezifischen Antikörper Phyc5A (1 : 5000) nachgewiesen (**D**). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

3.1.3.4 Untersuchung der posttranslationalen Prozessierung der rekombinanten Histidinkinase slr0311 in *E. coli*

Die Expression der cyanobakteriellen Histidinkinase slr0311 in *E. coli* führte zu einem rekombinanten Protein von ~66 kDa, dessen Größe nicht mit seinem errechneten Molekulargewicht (85 kDa) übereinstimmte. Zur Überprüfung einer möglichen posttranslationalen Prozessierung der Sensorkinase im bakteriellen Expressionssystem wurde das rekombinante Protein N-terminal sequenziert. Die Vollständigkeit der N-terminalen Sequenz schloß eine aminoternale Prozessierung aus und ließ eine Verkürzung am C-Terminus vermuten. Diese Annahme wurde durch die Einführung eines sechsfachen "His-tag"-Epitops am C- bzw. N-Terminus der Sensorkinase überprüft, das mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden sollte. Für die Einführung des N-terminalen "His-tags" wurde zunächst die slr0311-cDNS-Sequenz durch PCR in Gegenwart der sequenzspezifischen Oligonukleotide AMS9Syn5'BamNde und AMS9Syn3'HindNot (siehe Abschnitt 2.1.7) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 amplifiziert. Das Amplifikat wurde nach seiner Restriktion mit *Bam*HI und *Hind*III in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pQE30 kloniert, über den das rekombinante Protein einen sechsfachen "His-tag" an seinem N-Terminus erhielt. Das C-terminale Epitop wurde durch PCR in Gegenwart der sequenzspezifischen Oligonukleotide AMS9Syn5'BamNde und SAMS9.Histag in die slr0311-cDNS eingeführt und das Amplifikat nach seiner Restriktion mit *Bam*HI und *Hind*III in den Expressionsvektor pRSET5a kloniert. Mit den genannten Plasmiden wurden *E. coli* M15 (pQE30) bzw. BL21(DE3)pLysS (pRSET5a) transformiert.

Nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG lag die rekombinante Histidinkinase mit dem C-terminalen "His-tag" in der unlöslichen Proteinfraction vor (Abb. 24 A, Spuren 2 und 4); die Sensorkinase mit dem N-terminalen Epitop befand sich dagegen in der löslichen Proteinfraction (Abb. 24 B, Spuren 3 und 5). Die beiden rekombinanten Polypeptide unterschieden sich geringfügig in ihrem Molekulargewicht, da für ihre Expression in *E. coli* verschiedene Systeme (pQE bzw. pRSET) verwendet worden waren. Obwohl eine Verkürzung der Sensorkinase am N-Terminus ausgeschlossen werden konnte (siehe oben), konnte mit dem "His-tag"-spezifischen Antiserum (Anti-Tetra-His; Qiagen GmbH) weder das C- noch das N-terminale Epitop der rekombinanten Sensorkinase nachgewiesen werden (Abb. 24 C, Spuren 1 bzw. 2). Die fehlende Kreuzreaktion des Antikörpers mit der N-terminal "markierten" Sensorkinase, die neben dem rekombinanten TTP30-Vorläufer (Abb. 24 C, Spur 4, Pfeilkopf) als Positivkontrolle für die Spezifität des Antikörpers dienen sollte, ist vermutlich auf ihre vergleichsweise schwache Expression im pQE-System zurückzuführen. Eine gesicherte Aussage über die mögliche C-terminale Prozessierung von slr0311 in *E. coli* war daher nicht möglich.

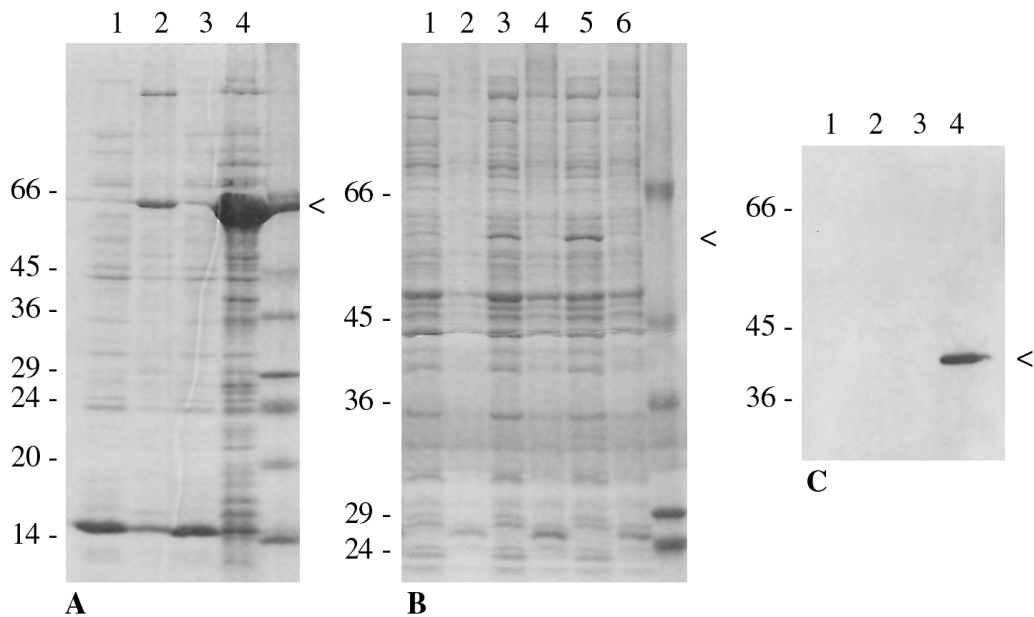


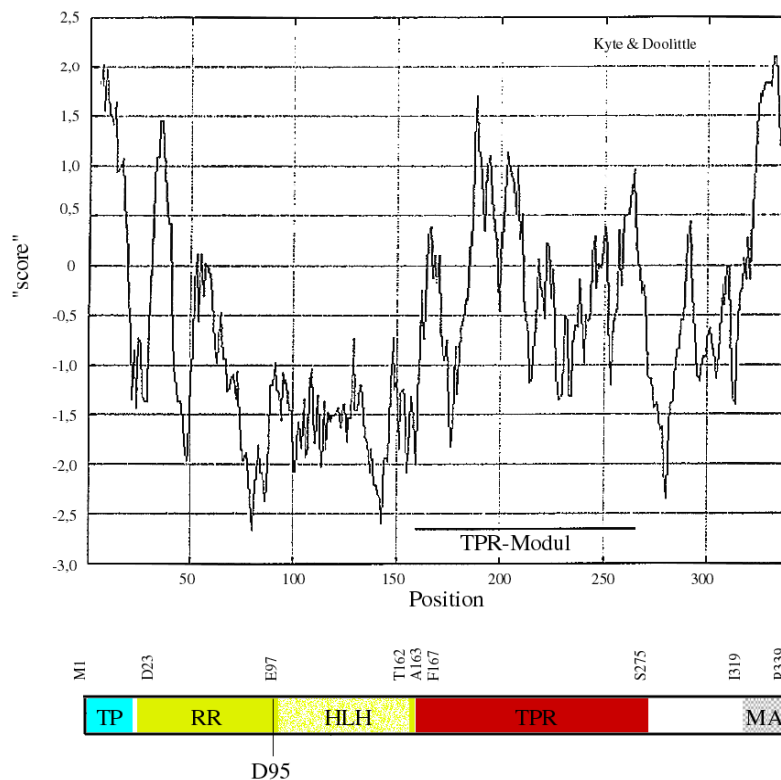
Abb. 24: Expression der cyanobakteriellen Histidinkinase slr0311 in *E. coli* und Untersuchung ihrer möglichen posttranslationalen Prozessierung. Vor und nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG wurde je 1 ml Bakterienkultur unter nativen Bedingungen aufgeschlossen und das Polypeptidmuster der Proteinfractionen nach ihrer Auftrennung in einem 9%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 untersucht. (A) Expression der potentiellen Sensorkinase mit dem C-terminalen "His-tag" (Pfeilkopf). Lösliche bzw. unlösliche Proteinfractionen vor (1 bzw. 2) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (3 bzw. 4). (B) Expression der Sensorkinase mit dem N-terminalen "His-tag" (Pfeilkopf). Lösliche bzw. unlösliche Proteinfractionen vor (1 bzw. 2), 2 (3 bzw. 4) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (5 bzw. 6). Das geringere Molekulargewicht der rekombinanten Histidinkinase mit dem N-terminalen Epitop ist auf die Verwendung des pQE- anstelle des pRSET-Expressionssystems zurückzuführen. (C) Serologischer Nachweis des C- (1) bzw. N-terminalen (2) "His-tags" der rekombinanten Sensorkinase mit einem polyklonalen Antikörper gegen ein vierfaches "His-tag"-Epitop (Anti-Tetra-His, Qiagen GmbH, 1 : 1000). Der rekombinante TTP30-Vorläufer (Pfeilkopf), der ein N-terminales "His-tag"-Epitop besitzt, in den unlöslichen Proteinfractionen vor (3) und nach Zugabe von IPTG (4) diente als Positivkontrolle für die Spezifität des Antiserums. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

3.2 Funktionelle Charakterisierung des kernkodierte Polypeptids TTP30

Die cDNS-Sequenz für das kernkodierte Polypeptid TTP30 ist durch das immunologische Sichten einer λ gt11-cDNS-Bibliothek aus Spinat mit dem polyklonalen Antikörper gegen das cyanobakterielle Homologe von AMS9 isoliert worden (siehe Abschnitt 3.1.3). Die Datenbankanalyse seiner Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz hat zu einem bislang unbekanntem Protein mit einer bemerkenswerten molekularen Struktur geführt (Fulgosi, 1999). Seine Bezeichnung geht auf ein zentral angeordnetes Tetratricopeptid-"repeat" (TPR)-Motiv (A163 - S275) sowie seine mutmaßliche Lokalisation in der Thylakoidmembran zurück ("tetratricopeptide repeat containing thylakoid protein of 30 kDa").

Die Hydrophathieanalyse der Aminosäuresequenz von TTP30 läßt ein überwiegend hydrophiles Protein vermuten, das über einen hydrophoben, C-terminalen Anker (I319 bis R339) in der Thylakoidmembran inseriert sein könnte (Abb. 25). Der N-terminale Abschnitt weist

charakteristische Merkmale einer "response regulator"-Domäne (D23 bis F167), ähnlich CheY aus Bakterien, auf und enthält ein potentiell "helix-loop-helix"-Motiv (E97 bis T162), das in einer Reihe von regulatorischen Proteinen vorkommt, welche an der Kontrolle der Genexpression in Eukaryoten beteiligt sind. Die funktionelle Charakterisierung von TTP30 in Spinatchloroplasten erfolgte in der vorliegenden Arbeit auf der Basis der genannten strukturellen Eigenschaften seiner Aminosäuresequenz.



```

MATVLGTLVLPVDLTLPAKIVSDHRKKLRLLPYDVVLSLGLPRRDKEFQLWGENLSLGRLSFSRKSNAVE 70
YSSGDENGNNGEEGGDDEPVFDWETEMRKRVKEIEEMRELEKKAEEELQGRIDDEGSDGSGVDETEEE 140
KKMRVRKELEKVAKEQAERRATAOLMFELGOKAYGRGMYKRSIEFFEAALTIIPRPTLFGGEIQIWLAMA 210
YEANSRHADCIALYKKLEKGHPSVSIIRQAELRYILEAPKIKITOEEMVTIPLIGNSYDYSASSWTDKS 280
KDSEQVIGSSTTNAPSSRDYAGDLLKWKPPVGLENNRIFWAAVTLFGLVGAALFLQR 339

```

Abb. 25: Hydropathieanalyse (nach Kyte und Doolittle, 1982) der Aminosäuresequenz von TTP30 und schematische Darstellung der funktionellen Domänen (modifiziert nach Fulgosi, 1999). Das überwiegend hydrophile Protein weist einen kurzen hydrophoben Abschnitt am C-Terminus auf (kursiv), der als potentieller Membrananker (MA) fungieren könnte. Die "response regulator"-ähnliche Domäne (RR) reicht von D23 bis F167 und enthält die mögliche Phosphorylierungsstelle Asparaginsäure 95 (D95, grün hervorgehoben). Das daran angrenzende, mutmaßliche "helix-loop-helix"-Motiv (HLH) reicht in das Tetratricopeptid-"repeat"-Modul (TPR, unterstrichen). Die aminoterminale Sequenz besitzt charakteristische Merkmale eines plastidären Transitpeptids (TP).

3.2.1 *In organello*-Import des *in vitro*-Translationsproduktes in intakte Spinat-chloroplasten

Die N-terminale Aminosäuresequenz von TTP30 beginnt mit einem hochkonservierten MA-Dipeptid, das für viele plastidäre Transitsequenzen charakteristisch ist (van Heijne et al., 1989). Das Programm SignalSeq unter HUSAR deutet auf eine mögliche Prozessierung an dem Aminosäurerest A18 hin, die zu einem reifen Protein von ~34 kDa führt. Die subplastidäre Lokalisation und Topographie des kernkodierten Polypeptids TTP30 wurde mit Hilfe des *in organello*-Imports untersucht. Durch *in vitro*-Transkription der TTP30-cDNS und anschließende *in vitro*-Translation der RNS in Gegenwart von L-³⁵S-Methionin wurde zunächst ein radioaktiv markiertes Vorläuferprotein (~37 kDa) im Retikulozytenlysat hergestellt. Das *in vitro*-Translationsprodukt (Abb. 26, Spur 1) wurde in intakte Spinatchloroplasten transportiert und war nach seiner Prozessierung proteasesensitiv in der Thylakoidmembran inseriert (Abb. 26, Spuren 3 und 4). Auffällig war, daß auch nach 60 Minuten noch zwei Polypeptide von 35 und 34 kDa in der Membranfraktion nachgewiesen werden konnten (Abb. 26, Spur 12, Pfeilköpfe). Das deutet darauf hin, daß TTP30 zwar mit guter Effizienz in die isolierten Spinatchloroplasten transportiert wurde, seine Prozessierung und Integration in die Thylakoidmembran aber nur sehr langsam erfolgt sind. Dadurch fand sich weniger als die Hälfte des importierten Polypeptids zur Größe des reifen Proteins (~34 kDa) prozessiert. Der größere Teil lag dagegen in Form eines "Prozessierungsintermediates" (~35 kDa) vor.

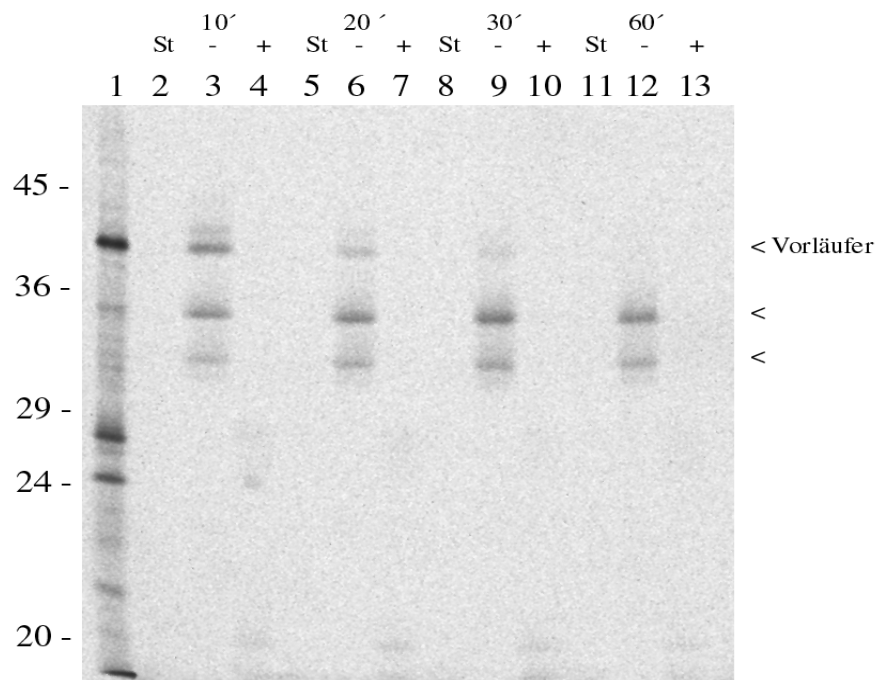


Abb. 26: Kinetik des *in organello*-Imports des *in vitro* translatierten TTP30-Vorläufers in intakte Spinatchloroplasten. Autoradiogramm eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels. Die Importreaktionen wurden nach 10 (2 bis 4), 20 (5 bis 7), 30 (8 bis 10), bzw. 60 Minuten (11 bis 13) gestoppt, die Chloroplasten anschließend lysiert und in Stroma (St; 2, 5, 8, bzw. 11) und Thylakoidmembranen fraktioniert. Ein Teil der Membranfraktionen wurde ohne Protease (-; 3, 6, 9, bzw. 12), der andere Teil mit Thermolysin (+; 4, 7, 10, bzw. 13) auf Eis inkubiert. Die Positionen des TTP30-Vorläufers und zweier mutmaßlicher prozessierter Formen sind mit Pfeilköpfen markiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die Extraktion der nach dem Import aus den intakten Spinachchloroplasten isolierten Thylakoidmembranen mit chaotropen Lösungen zeigte, daß beide Polypeptide stabil in der Membran inseriert waren. Nach der Behandlung der Membranen mit 2 M NaBr, 0,1 M Na₂CO₃, bzw. 2 M NaSCN fanden sich die radioaktiv markierten, prozessierten Polypeptide ausschließlich in der Membranfraktion (Abb. 27, Spuren 9, 12, bzw. 15, Pfeilköpfe). Die Behandlung der Thylakoidmembranen mit Proteasen unterschiedlicher Spezifität führte zu jeweils zwei proteolytischen Fragmenten von ca. ~34 und ~31 kDa (Thermolysin; Abb. 27, Spur 4) bzw. ~32 und ~31 kDa (Trypsin; Abb. 27, Spur 7) in der Membranfraktion. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Hydropathieanalyse (siehe oben), nach der TTP30 über einen kurzen C-terminalen Anker in der Thylakoidmembran inseriert sein und eine größere hydrophile Domäne in das Stroma exponieren sollte. Bei einer derartigen Orientierung des Proteins wäre ein Abbauprodukt von ~2 kDa in der Membranfraktion zu erwarten gewesen, entsprechend der Größe des hydrophoben C-terminalen Bereichs (I319 bis R339). Die Schnittstellen innerhalb der hydrophilen Domäne sind daher entweder konformationsbedingt nicht für die proteolytische Aktivität im Stroma zugänglich oder der hydrophile Bereich ist in das Lumen der Thylakoidmembranen exponiert und dadurch geschützt.

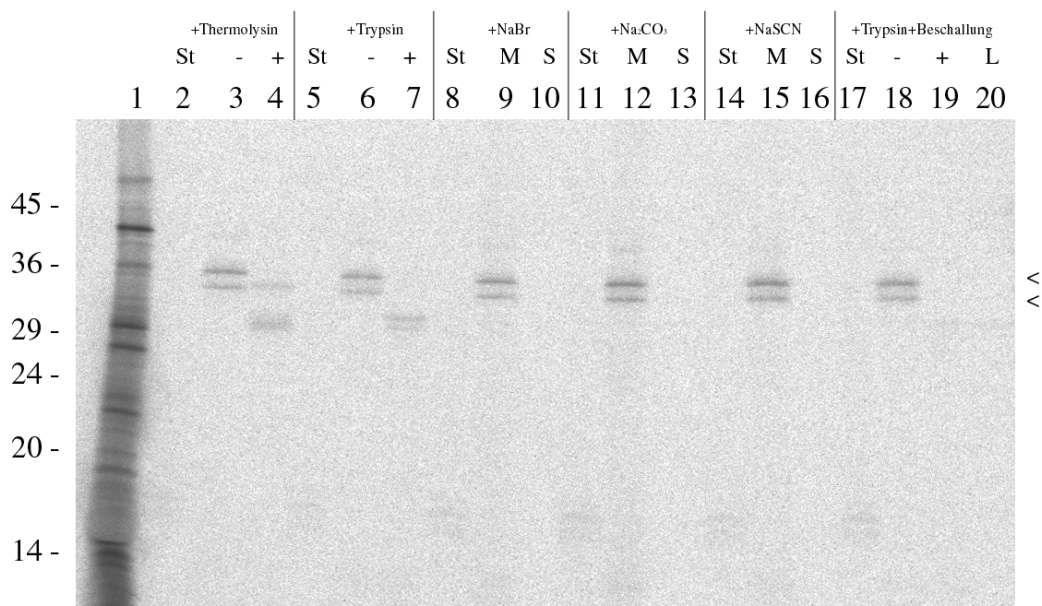


Abb. 27: Extraktion der *in vitro* importierten TTP30-Vorstufe mit chaotropen Lösungen und Sensitivität gegenüber Proteasen unterschiedlicher Spezifität. Autoradiogramm eines 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgels. Stroma (St; 2, 5, 8, 11, 14, bzw. 17) und Thylakoidmembranen wurden nach dem Import des *in vitro* translatierten Vorläuferproteins (1) aus den intakten Spinachchloroplasten isoliert. Für die Proteasebehandlung wurde ein Teil der Thylakoidmembranen ohne (-; 3, 6 und 18), der andere Teil mit Thermolysin (+; 4) bzw. Trypsin (+; 7 und 19), auf Eis inkubiert. Der Einfluß chaotroper Salze wurde durch Extraktion der Thylakoidmembranen mit 2 M NaBr, 0,1 M Na₂CO₃ oder 2 M NaSCN untersucht, und die Membranfraktionen (M; 9, 12, bzw. 15) und die extrahierten Proteine (S; 10, 13, bzw. 16) wurden anschließend voneinander getrennt. Die mögliche lumenale Orientierung der hydrophilen Domäne von TTP30 wurde durch Beschallung der Thylakoidmembranen in Gegenwart von Trypsin und die anschließende Trennung von Membran- (+; 19) und Lumenfraktion (L; 20) analysiert. Die beiden potentiellen prozessierten TTP30-Polypeptide sind durch Pfeilköpfe markiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Zur Aufklärung der topographischen Orientierung von TTP30 in der photosynthetischen Membran wurden die Thylakoidmembranen nach dem Import in Gegenwart von Trypsin beschallt und anschließend Membranfraktion und Thylakoidlumen voneinander getrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.8). Weder in der Membranfraktion noch im Thylakoidlumen konnten radioaktiv markierte, proteolytische Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 27, Spuren 19 und 20). Das Fehlen eines Abbauproduktes von ~2 kDa in der Membranfraktion könnte darauf zurückzuführen sein, daß der C-terminale hydrophobe Bereich kein Methionin enthält und somit bei Verwendung von L-³⁵S-Methionin in der *in vitro*-Translation unmarkiert bleibt. Die *in vitro*-Translation wurde daher in Gegenwart von ³H-Leucin durchgeführt und dabei unter anderem die vier Leucinreste L326, L330, L335, bzw. L337 im C-terminalen Abschnitt radioaktiv markiert. Die geringe Reichweite des β -Strahlers Tritium und die niedrige Importrate des *in vitro*-Translationsproduktes (nicht gezeigt) ließen mit diesem Ansatz jedoch keine Aussage über die Topographie von TTP30 zu.

Um Auskunft über die Bedeutung des hydrophoben Bereichs für die thylakoidale Lokalisation von TTP30 *in vitro* zu erhalten, wurde eine C-terminal verkürzte Form des Vorläufers hergestellt und anschließend der *in organello*-Import der *in vitro* translatierten, trunktaten Vorstufe untersucht (Abb. 28). Der trunkate Vorläufer (M1 bis G312) wurde mit geringer Effizienz in die intakten Spinatchloroplasten importiert (Abb. 28, Spur 2). Die Akkumulation mehrerer "Prozessierungsintermediate" unterschiedlicher Größe im Stroma (Abb. 28, Pfeilköpfe) und spricht dafür, daß TTP30 über den hydrophoben C-terminalen Abschnitt mit der Thylakoidmembran interagieren kann.

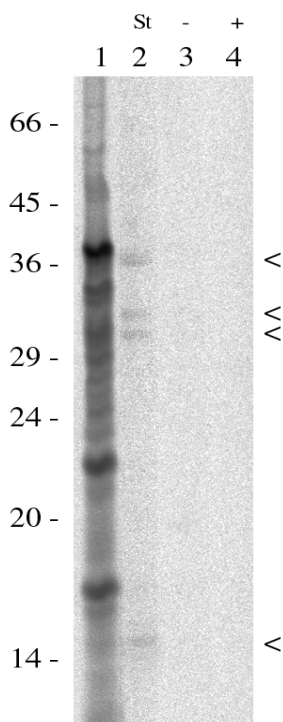


Abb. 28: *In organello*-Import der C-terminal verkürzten TTP30-Vorstufe in intakte Spinatchloroplasten. Autoradiogramm eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels. Die Chloroplasten wurden nach dem Import des *in vitro* translatierten trunktaten Vorläuferproteins (1) lysiert und in Stroma (St; 2) und Thylakoidmembranen fraktioniert. Ein Teil der Thylakoidmembranen wurde ohne Protease (-; 3), der andere Teil mit Thermolysin (+; 4) auf Eis inkubiert. Die Pfeilköpfe markieren "Prozessierungsintermediate" im Stroma. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Für die Herstellung des C-terminal verkürzten Vorläuferproteins wurde die TTP30-cDNS abzüglich der achtzig 3'-terminalen Nukleinsäurereste durch PCR in Gegenwart der sequenzspezifischen Oligonukleotide TTP30precursor.fwd und TTP30MinC-term.rev (siehe Abschnitt 2.1.7) amplifiziert, mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pRSET5a kloniert.

3.2.2 Ermittlung der Genkopienzahl für TTP30 im Genom höherer Pflanzen

Die Kombination des TPR-Motivs mit der "response regulator"-ähnlichen Domäne in einem einzigen Molekül verleihen TTP30 eine für plastidäre Komponenten bisher nicht beschriebene, komplexe molekulare Struktur. Seine Aminosäuresequenz zeigt nur zu drei weiteren Proteinen aus der Datenbank eine gewisse Homologie (Abb. 29).

	1				50
soy14198	MATVLGTLVL	PVDLTLPAKI	VSDHRKKLRL	LPYDVVLSLG	LPR.....
slr1052	-----	-----	-----	-----	-----
ycf37	-----	-----	-----	-----	-----
atorf03	MAAVIGNVAL	LLDVNSHRTV	VTDRR..IRL	TVVDVVVLNLQ	KRDSHSHVSH
	51				100
soy14198RDKEF	QLWGENLSLG	RLSFSRKSNA	VEYSSGDENG	NGNGEEE...
slr1052	-----	-----	-----	-----	-----
ycf37	-----	-----	-----	-----	-----
atorf03	YAALSSNKPL	ESDGEARVRR	FLTRGKANSR	ANAVDFDDAG	SSDEESSDGG
	101				150
soy14198	.GGGDDEP..	.VFDWETEMR	KRVKEIEEMR	ELEKKABELQ	GRIDDEGSDG
slr1052	-----	-----	-----	-----	-----
ycf37	-----	-----	-----	-----	-----
atorf03	GGGGDEEEEE	EYFDVEKERK	RRAKEFHDTK	ELERKABELQ	YKIDEEG...
	151				200
soy14198	SGVDETEEEK	KMRVRKELEK	VAKEQAERRA	<u>TAQLMFE.LG</u>	<u>QKAYGRGMVK</u>
slr1052	-----	-----	---MGSEYQG	QFEQKFE.EG	KAAFDRGRYR
ycf37	-----	-----	-----	-----	-----
atorf03	..DDSEKK	RMRVKRELQK	VAQEQAERRK	TAEMLFE.LG	QKAYGKGMYG
	201				250
soy14198	<u>RSIEFFEAAL</u>	<u>TIIPRPTLFG</u>	<u>GEIQIWLAMA</u>	<u>YEANSRHADC</u>	<u>IALYKKLEKG</u>
slr1052	QSISLFEEAV	KLSAGASRRG	GEAQLWLAMA	HQASGDLPTA	KQICRKLVR.
ycf37	RRENTFSKL	QKQLQNTKGT	AQEYYQLGSI	YLDKKLYSQS	INLFOKALK.
atorf03	RAIEFLEGAL	TIIPRPTLFG	GEIQIWLAMA	YEANNRHADC	IDLYQQLEKK
	251				300
soy14198	<u>HPSVSIIRQA</u>	<u>AELRYILEAP</u>	<u>KIKITOBEEMV</u>	<u>TIPLIGNSYD</u>	<u>SYASSW</u> TDKS
slr1052	HPHPECRKQG	QQVLEILQAP	QLTRPKEWLT	PIPDLTQEN	TKPTTPRMAR
ycf37	.MAEQVEPEN	QALIYNAMGY	ACFAQEQFDL	AIRHYKDALK	LYPDYVIALN
atorf03	HPSPGIRRQA	SELRYILQAP	KLKISQEEMV	TIPMIGSSYD	SYAVTWSDK
	301				350
soy14198	KDSEQVIGSS	TTNAFPSSRD	YAGDLLKWKP	PVGLENNRIF	WAAVTLFSGL
slr1052	RR..RRLPEP	TPIQPEDTR.	KMNTKNGFI	FAAIAFLAVL
ycf37	NLANVYEKKQ	MVNKALETY.QE	TLAIEPNKV	AQRANSLKK
atorf03	RDKERRMNAS	TTNQLNSSDD	FLGKLLVWRP	VVGMEKNRVF	WLALTLWFGL
	351				
soy14198	VGAALFLQR				
slr1052	LGFTYWLS-				
ycf37	RLVET----				
atorf03	VGAALILQR				

Abb. 29: Paarweiser Vergleich der Aminosäuresequenz von TTP30 aus *S. oleracea* L. (soy14198) mit potentiell homologen Proteinen aus *A. thaliana* L. (atorf03) bzw. *Synechocystis* sp. PCC6803 (slr0152 und ycf37). Die Aminosäuresequenzen wurden über das Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) miteinander verglichen. Das potentielle TPR-Motiv in TTP30 ist eingerahmt.

Dazu zählen ein nicht näher charakterisierter Leserahmen aus *A. thaliana* L. (orf03; X97485), dessen Aminosäuresequenz der des Spinatproteins zu 67% entspricht, sowie die beiden hypothetischen Proteine slr1052 (D90902) und ycf37 (D63999) aus *Synechocystis* sp. PCC6803, die 36% bzw. 30% Homologie zu einem Teilabschnitt der TTP30-Aminosäuresequenz zeigen. Die Homologie beschränkt sich im Wesentlichen auf das zentrale TPR-Motiv und den C-proximalen Bereich von TTP30.

Zur Ermittlung der Genkopienzahl für TTP30 im Genom von *Spinacia oleracea* L. wurde gesamtgenomische DNS aus 10 Tage alten Keimlingen isoliert und mit *Hind*III außerhalb der kodierenden Sequenz von TTP30 geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran transferiert. Für die "Southern"-Analyse wurde zum einen die cDNS für die TTP30-Vorstufe (1020 bp), zum anderen die cDNS-Sequenz für das zentrale TPR-Motiv (338 bp) radioaktiv markiert (Abb. 30).

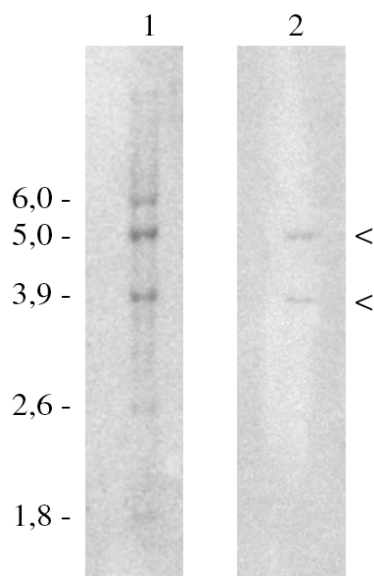


Abb. 30: "Southern"-Analyse gesamtgenomischer DNS aus 10 Tage alten Spinatkeimlingen. Autoradiogramm der unter stringenten Bedingungen gewaschenen Nylonmembran. Pro Spur wurden 3,5 µg *Hind*III-geschnittene, gesamtgenomische DNS auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran immobilisiert und mit der ³²P-markierten cDNS für den TTP30-Vorläufer (1) bzw. das interne TPR-Motiv (2) hybridisiert. Die Pfeilköpfe markieren DNS-Fragmente, die von beiden cDNS-Sonden detektiert wurden. Links: DNS-Fragmentlängen in Kilobasenpaaren

Die erstgenannte Sonde detektierte sechs genomische DNS-Fragmente mit einer Länge von 1,8, 2,6, 3,9, 5,0, 6,0 und > 6,0 kb (Abb. 30, Spur 1). Zwei DNS-Fragmente (3,9 und 5,0 kb) wurden auch von der internen TPR-Sonde erfaßt (Abb. 30, Spur 2, Pfeilköpfe). Das deutet darauf hin, daß entweder mehrere Kopien für TTP30 im Genom von *S. oleracea* L. existieren oder Intronsequenzen im Gen vorkommen, die *Hind*III-Schnittstellen enthalten. Die "Northern"-Analyse von Gesamt-RNS aus 10 Tage alten Spinatkeimlingen führte unter Verwendung der radioaktiv markierten Vorläufer-Sonde unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nur zu einem Transkript von ~2,0 kb (nicht gezeigt). Sollten tatsächlich mehrere Gene für TTP30 im Genom von *S. oleracea* L. vorhanden sein, werden diese entweder in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Pflanze und/oder exogenen Faktoren, wie z.B. der Lichtintensität oder der Temperatur, differentiell exprimiert, oder es handelt sich um nicht transkribierte Pseudogene.

Die genomische Sequenz von TTP30 wurde mit einer BAC-Bibliothek aus *A. thaliana* L. Wurzelkallus-Suspensionen physikalisch kartiert (siehe Abschnitt 2.1.6). Die Anzahl und die Insertionslänge der BAC-Klone entsprachen einer ~achtfachen Genomabsättigung. Die Hybridisierung der radioaktiv markierten TTP30-cDNS (1237 bp) mit neun BAC-Klonen deutete daher zunächst auf ein einziges Gen für TTP30 im Genom von *A. thaliana* L. hin. Durch Datenbankanalysen konnten die identifizierten BAC-Klone jedoch fünf verschiedenen Kopplungsgruppen zugeordnet werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnis der physikalischen Kartierung von BAC-Klonen aus *A. thaliana* L. Wurzelkallus-Suspensionen mit der ³²P-markierten TTP30-cDNS. Die Zuordnung der Hybridisierungssignale zu den einzelnen Kopplungsgruppen entspricht den Angaben in der TAIR-Datenbank (RZPD, Berlin). Für weitere Einzelheiten siehe Text.

BAC-Klon	Kopplungsgruppe	Position auf dem Chromosom (kb)
IGF 10K10	Chromosom I	4482 - 4563
IGF 16O24	Chromosom II	1170 - 1209
IGF 2B24	Chromosom III	2345 - 2485
IGF 14B24; 4O24	Chromosom III	7684 - 7752
IGF 11F7	Chromosom III	7718 - 7786
IGF 8A6	Chromosom IV	6384 - 6468
IGF 2A6	Chromosom V	1750 - 1855
IGF 4K10	Chromosom V	2205 - 2240

Die auf dem Chromosom III lokalisierten BAC-Klone IGF 14B24 und IGF 4O24 waren identisch und überlappten mit dem Klon IGF F11F7, wogegen der BAC-Klon IGF 2B24 in einer Entfernung von ca. 5200 kb lokalisiert wurde (Abb. 31). Die Klone IGF 2A6 und IGF 4K10 sind im Abstand von 350 kb auf dem Chromosom 5 angeordnet. Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz mehrerer TTP30-Genkopien im Genom von *A. thaliana* L.

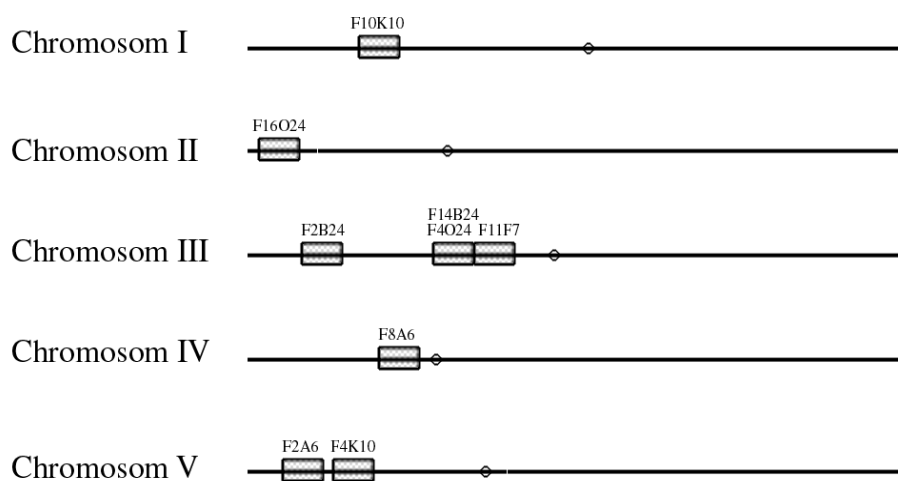


Abb. 31: Schematische Darstellung der physikalischen Positionen der identifizierten BAC-Klone auf den Chromosomen I bis V von *A. thaliana* L. Die Lage des Zentromers ist durch einen Kreis angedeutet. Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. Für weitere Einzelheiten, siehe auch Tabelle 1.

3.2.3 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen das rekombinante Vorläuferprotein

Die Aufklärung der funktionellen Rolle von TTP30 in Spinat erforderte die subplastidäre Lokalisation des pflanzlichen Proteins. Mit einem spezifischen Antikörper gegen den rekombinanten TTP30-Vorläufer sollte geklärt werden, ob das Polypeptid *in vivo* Bestandteil der Thylakoidmembran ist. Dazu wurde aus der TTP30-cDNS durch Restriktion mit *HincI* ein 1269 bp langes DNS-Fragment herausgeschnitten, mit glatten Enden ("blunt end") in den *SmaI* geschnittenen, dephosphorylierten Expressionsvektor pQE30 kloniert, über den das rekombinante Protein einen sechsfachen "His-tag" am N-Terminus erhielt. Mit diesem Plasmid wurde *E. coli* M15 transformiert. Das rekombinante Vorläuferprotein fand sich bereits 1 Stunde nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction (Abb. 32 A, Spur 4, Pfeilkopf). In dieser konnte es über seinen N-terminalen "His-tag" mit einem Epitop-spezifischen Antikörper (Anti-Penta-His, Qiagen GmbH) serologisch nachgewiesen werden (Abb. 32 B, Spuren 4, 6 und 8).

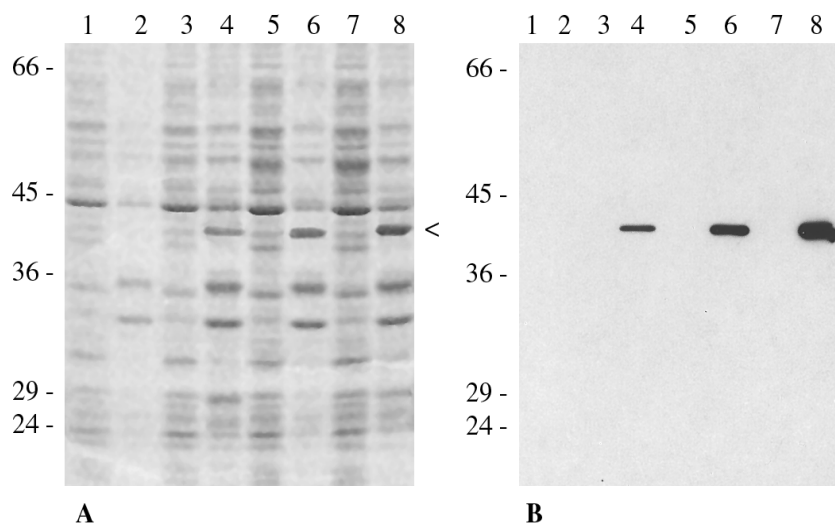


Abb. 32: Expression und serologischer Nachweis des rekombinanten TTP30-Vorläufers (Pfeilkopf) in *E. coli*. (A) Polypeptidmuster der unter nativen Bedingungen aufgereinigten löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen vor (1 bzw. 2) bzw. 1 (3 bzw. 4), 3 (5 bzw. 6) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (7 bzw. 8). Die Proteinfractionen wurden nach ihrer Auftrennung in einem 11%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. (B) Serologischer Nachweis des N-terminalen "His-tag"-Epitops des rekombinanten Vorläufers in der unlöslichen Proteinfraction 1, 3, bzw. 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (4, 6, bzw. 8) mit einem polyklonalen Antikörper gegen einen vierfachen "His-tag" (1 : 1000, Qiagen GmbH). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die Einführung des "His-tag"-Epitops am N-Terminus des rekombinanten Proteins sollte seine Aufreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichen (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.3). Wie Abbildung 33 zeigt, konnte weder unter nativen (A) noch denaturierenden Bedingungen (B) eine effiziente Aufreinigung erzielt werden. Der größte Teil des rekombinanten Proteins wurde im Verlauf der Expression in Form unlöslicher "inclusion bodies" in *E. coli* abgelagert und sedimentierte nach der Lyse der Bakterienzellen mit den Zelltrümmern (Abb. 33

A und B, jeweils Spur 8). Weniger als die Hälfte des rekombinanten Vorläufers konnte unter denaturierenden Bedingungen über die Bindung an die Nickelionen aus der löslichen Proteinfraction aufgereinigt werden (Abb. 33 B, Spur 11, Pfeilkopf).

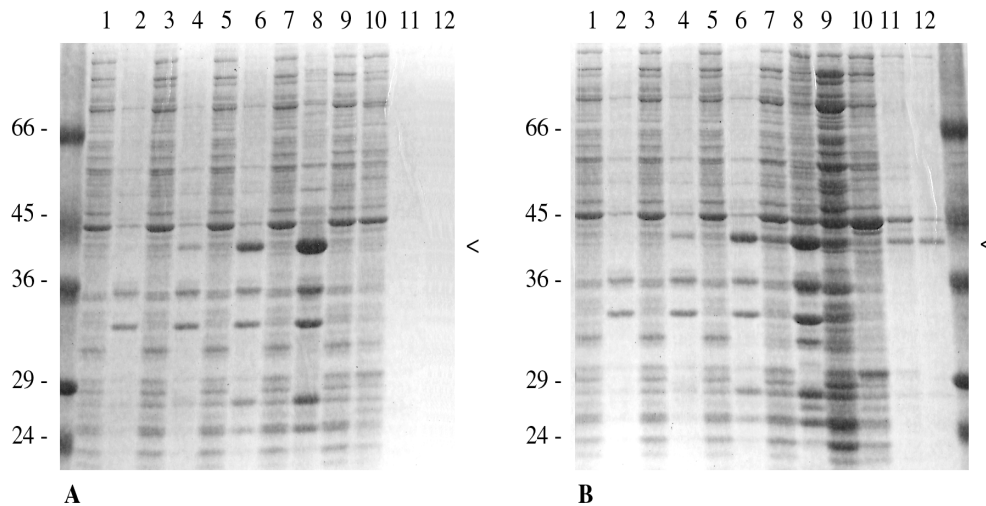


Abb.33: Aufreinigung des rekombinanten TTP30-Vorläufers durch Nickel-Affinitätschromatographie unter nativen (A) und denaturierenden Bedingungen (B). Die Polypeptidzusammensetzung der löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen vor (1 bzw. 2) bzw. 1 (3 bzw. 4) und 3 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG (5 bzw. 6) wurde zusammen mit den Proteinfractionen aus der Nickel-Affinitätschromatographie auf einem 11%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. Für die Bindung des N-terminalen "His-tag"-Epitops an die Ni-NTA-Agarose wurden die Bakterienzellen 4 Stunden nach Zugabe von IPTG unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen lysiert (7 bzw. 8), und der lösliche Anteil der Proteinfraction wurde mit der Nickelmatrix inkubiert. Nicht gebundene Proteine wurden in zwei Waschschriffen entfernt (9 und 10) und anschließend der rekombinante Vorläufer von den Nickelionen eluiert (11, Pfeilkopf). Unter diesen Bedingungen weiterhin an die Nickelmatrix gebundene Proteine zeigt Spur 12. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Aufgrund der geringen Aufreinigungseffizienz wurde für die Herstellung des polyklonalen Antikörpers gegen TTP30 die unlösliche Proteinfraction vier Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG verwendet (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.1). Der rekombinante TTP30-Vorläufer wurde über SDS-PAGE präparativ angereichert, auf Nitrozellulosemembran immobilisiert und die rekombinante Proteinbande nach der Auflösung des Membranstreifens in DMSO portionsweise in ein Kaninchen (H196) injiziert. Die Qualität des daraus gewonnenen Antikörpers wurde nach 2 bis 3 Immunisierungen durch "Western"-Analyse von Thylakoidmembranen und AMS-Fractionen aus Spinat überprüft. Das polyklonale Antiserum zeigte mit dem rekombinanten TTP30-Vorläufer eine starke Kreuzreaktion (nicht gezeigt) und detektierte in pflanzlichen Proteinfractionen ein Polypeptid von ~32 kDa (Abb. 34 A und B). In Abwesenheit des primären Antikörpers wurde allerdings deutlich, daß es sich bei diesem Polypeptid nicht um die reife Form von TTP30 handelt. In dem auf Chemilumineszenz beruhenden Nachweisverfahren wurde ab einer kritischen Chlorophyllmenge von $\geq 4 \mu\text{g}$ die Peroxidaseaktivität des Cytochrom *f* (32 kDa) des Cytochrom *b/f*-Komplexes erfaßt (Abb. 34 D).

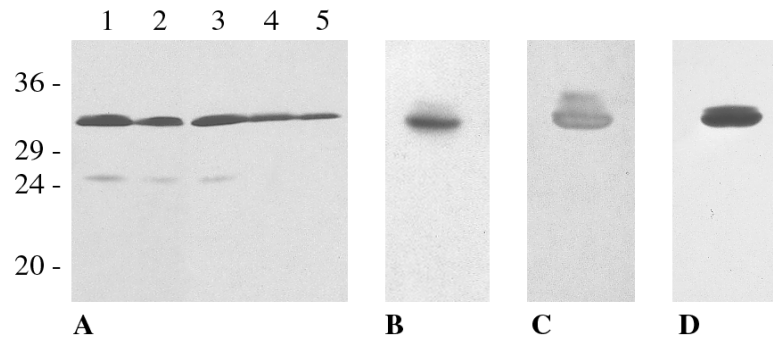


Abb. 34: Spezifität des Antikörpers H196 gegen den rekombinanten TTP30-Vorläufer. (A) "Western"-Analyse von Thylakoid- (1) und BBY-Membranen (2), Grana- (3) und Stromalamellen (4) sowie den Randbereichen der Granastapel (5) mit dem polyklonalen Antikörper H196 (1 : 1000). (B) "Western"-Analyse der subthylakoidalen AMS-Fraktion aus Spinat mit dem Antikörper H196 bzw. (C) mit dem polyklonalen Antiserum gegen Cytochrom *f* (1 : 3000). (D) Nachweis der Peroxidaseaktivität von Cytochrom *f* durch "Western"-Analyse in Abwesenheit eines primären Antikörpers. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Da die Markierung des Antikörpers H196 mit ^{125}I -Protein A sowie Detektionsverfahren auf der Basis alkalischer Phosphatase nicht zu einem serologischen Nachweis von TTP30 in subplastidären Proteinfractionen führten (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde ein weiteres Kaninchen wie oben beschrieben immunisiert. Das daraus gewonnene polyklonale Antiserum (H252) zeigte sowohl mit dem rekombinanten TTP30-Vorläufer (V; Abb. 35 A) als auch dem potentiellen reifen Protein (R; Abb. 35 A) eine starke Kreuzreaktion.

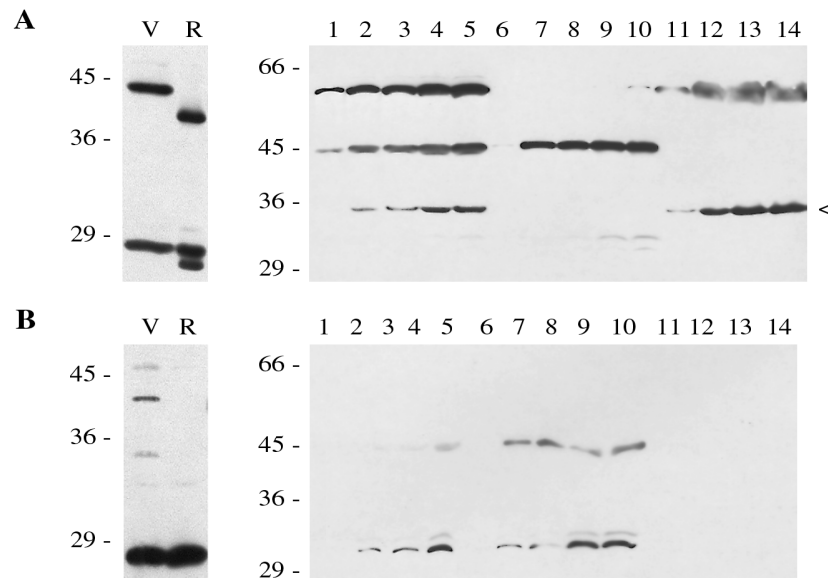


Abb. 35: "Western"-Analyse von Chloroplasten (1 bis 5), Thylakoidmembranen (6 bis 10) und Stromafraktionen (10 bis 14) mit dem erneut hergestellten Antikörper H252 gegen den rekombinanten TTP30-Vorläufer. Die Proteinfractionen wurden in fünf verschiedenen Konzentrationen (entsprechend 2, 4, 6, 8, bzw. 10 μg Chlorophyll) in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran immobilisiert und mit dem Antikörper H252 (A, 1 : 1000) oder dem Prä-Immuneserum (B, 1 : 1000) inkubiert. Die Kreuzreaktion des Antikörpers bzw. des Prä-Immuneserums mit dem rekombinanten Vorläufer (V) und dem potentiellen reifen TTP30-Protein (R) ist jeweils links abgebildet. Der Pfeilkopf markiert die Kreuzreaktion des Antikörpers H252 mit einem 34 kDa-Polypeptid. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

In den pflanzlichen Proteinfraktionen wurde mit dem polyklonalen Antikörper H252 in Chloroplasten (Abb. 35 A, Spuren 1 bis 5) und im Stroma (Abb. 35 A, Spuren 11 bis 14), nicht aber in Thylakoidmembranen (Abb. 35 A, Spuren 6 bis 10) ein 34 kDa-Polypeptid (Pfeilkopf) detektiert. Vor der Immunisierung des Kaninchens mit der rekombinanten TTP30-Vorstufe war diese Komponente nicht nachweisbar (Abb. 35 B). Die serologisch ermittelte Lokalisation von TTP30 im Stroma von Spinatchloroplasten widerspricht allerdings den Ergebnissen des *in organello*-Imports (siehe Abschnitt 3.2.1).

3.2.4 Analyse der potentiellen Kinaseaktivität des rekombinanten Vorläuferproteins

Der Nachweis eines kinaseaktiven AMS-Polypeptids von 34 kDa und die Isolierung der TTP30-cDNS durch das immunologische Sichten einer Spinat λ gt11-cDNS-Bibliothek mit dem Antikörper gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 waren Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von TTP30 an Phosphorylierungsreaktionen in der photosynthetischen Membran. Die mutmaßliche Kinaseaktivität von TTP30 wurde am Beispiel des rekombinanten Vorläufers überprüft. Dazu wurde die unlösliche Proteinfraktion vier Stunden nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.1), und die Polypeptide wurden nach SDS-PAGE direkt im Polyacrylamidgel in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ renaturiert (Abb. 36; siehe Abschnitt 2.2.5.10.2).

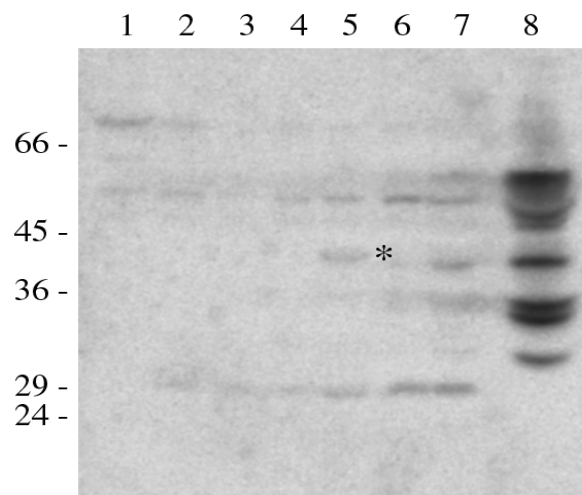


Abb. 36: In Gel-Renaturierung der mutmaßlichen Kinaseaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers in Abwesenheit von HistonIII-S. Autoradiogramm kinaseaktiver Polypeptide in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel. Der rekombinante Vorläufer wurde unter nativen Bedingungen aus *E. coli* aufgereinigt, und die löslichen bzw. unlöslichen Proteinfraktionen vor (2 bzw. 3) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (4 bzw. 5) wurden zusammen mit *E. coli*-Zellen, die entweder nicht (1) oder mit dem insertionsfreien Expressionsvektor pQE30 transformiert worden waren (6 und 7), durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die denaturierten Polypeptide wurden nach ihrer Renaturierung im Polyacrylamidgel mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Die AMS-Fraktion aus Spinat diente als Positivkontrolle (8). Der Stern markiert die Position des (phosphorylierten) rekombinanten TTP30-Vorläufers. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Da die unlösliche Proteinfraction neben dem rekombinanten TTP30-Vorläufer eine Reihe *E. coli*-spezifischer Proteine enthielt, wurden parallel dazu *E. coli* M15-Zellen, die entweder nicht (Abb. 36, Spur 1) oder mit dem insertionsfreien pQE30-Vektor (Abb. 36, Spur 6 (nicht-induziert) bzw. 7 (induziert)) transformiert worden waren, analysiert. Auf diese Weise wurde eine kinaseaktive Komponente von ~38 kDa nachgewiesen, die eindeutig mit dem rekombinanten TTP30-Vorläuferprotein korreliert war (Abb. 36, Spur 5, Stern). Das Auftreten weiterer Phosphoproteine im Molekulargewichtsbereich von 29 bis 36 kDa sowie von 55 bis >66 kDa konnte durch den Vergleich mit den Spuren 1, 6 und 7 auf *E. coli*- und Vektor-spezifische Signale zurückgeführt werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem kinaseaktiven AMS-Polypeptid von 34 kDa möglicherweise um die prozessierte Form von TTP30 handelt, mußte zunächst die Kinaseaktivität des rekombinanten, reifen TTP30-Polypeptids nachgewiesen werden. Dazu wurden die cDNS-Sequenzen für zwei mögliche prozessierte Formen von TTP30 (34 bzw. 35 kDa) durch PCR in Gegenwart der sequenzspezifischen Oligonukleotide TTP30.mature1 bzw. 2 und TTP30precursor.rev (siehe Abschnitt 2.1.7) aus der TTP30-cDNS amplifiziert. Die Amplifikate wurden mit *Bam*HI und *Hind*III verdaut und in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pRSET5a kloniert. Mit diesen Plasmiden wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert und die Proteinsynthese durch Zugabe von IPTG induziert (Abb. 37).

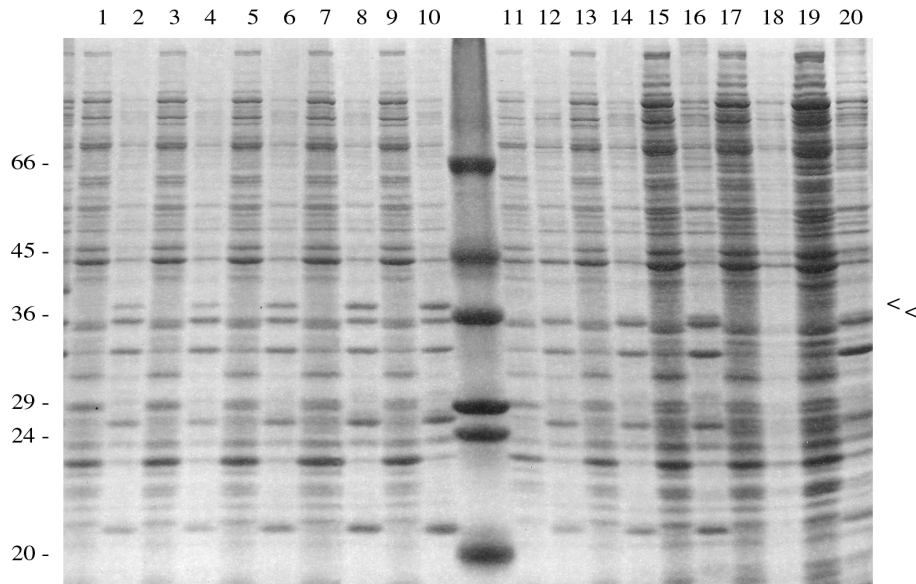


Abb. 37: Expression von TTP30 in zwei möglichen reifen Formen in *E. coli*. Die potentiellen reifen Polypeptide von 35 (1 bis 10) bzw. 34 kDa (11 bis 20) wurden unter nativen Bedingungen aus *E. coli* aufgereinigt und die Polypeptidzusammensetzung der löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen vor (1 bzw. 2 und 11 bzw. 12) und 1 (3 bzw. 4 und 13 bzw. 14), 2 (5 bzw. 6 und 15 bzw. 16), 3 (7 bzw. 8 und 17 bzw. 18) sowie 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (9 bzw. 10 und 19 bzw. 20) in einem 11%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. Die rekombinanten Polypeptide haben im pSET5a-Expressionssystem etwas größere Molekulargewichte als vorhergesagt und sind durch Pfeilköpfe markiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG lagen beide rekombinanten Polypeptide in der unlöslichen Proteinfraction vor (Abb. 37, Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 bzw. Spuren 14, 16 und 20, Pfeilköpfe). Aufgrund der geringen Effizienz ihrer Expression konnte keine Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Eine ausreichende Menge an reifen Polypeptiden für das Renaturierungsverfahren nach Hutchcroft et al. (1991) konnte auch im pQE- bzw. pGEX-Expressionssystem nicht erzielt werden (nicht gezeigt). Die Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen TTP30 und dem kinaseaktiven AMS-Polypeptid konnte daher letztlich nicht geklärt werden.

3.2.5 Untersuchung der Bispezifität des Antikörpers gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311

Die fehlende Homologie der Aminosäuresequenz von TTP30 zu der Histidinkinase slr0311 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 ließ eine strukturelle und/oder funktionelle Ursache für die Bispezifität des slr0311-Antikörpers vermuten. Die cyanobakterielle Histidinkinase enthält ein zentrales Leucin-"zipper"-Motiv (L416 bis L468), dessen α -helikale Struktur der des TPR-Motivs von TTP30 ähnelt. Um zu überprüfen, ob die strukturelle Ähnlichkeit die Ursache für die Identifizierung von TTP30 durch das immunologische Sichten der Spinat λ gt11-cDNS-Bibliothek war, wurden die genannten α -helikalen Motive durch PCR in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide aus den entsprechenden cDNS-Sequenzen amplifiziert. Im Falle des TPR-Motivs aus TTP30 wurden die Oligonukleotide TTP30TPRfwd.BamHI und TTP30TPRrev.EcoRI verwendet (siehe Abschnitt 2.1.7). Das Amplifikat wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten, in den Expressionsvektor pGEX-6-P1 kloniert und *E. coli* BL21(DE3)pLysS damit transformiert. Für das Leucin-"zipper"-Motiv aus slr0311 wurden die Oligonukleotide SAMS9LeuZip.XhoI und SAMS9LeuZip.EcoRI eingesetzt. Die Leucin-"zipper"-Sequenz wurde mit *Xho*I und *Eco*RI geschnitten, in den Expressionsvektor pThioHisA kloniert und *E. coli* Top10 damit transformiert. Die Proteinfractionen vor und nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG wurden unter nativen Bedingungen aufgereinigt, nach ihrer Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosemembran immobilisiert und dann mit dem Antikörper gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 inkubiert. Wie Abbildung 38 zeigt, beruht die Bispezifität des slr0311-Antikörpers offenbar nicht auf der strukturellen Ähnlichkeit der α -helikalen Epitope. Das polykonale Antiserum gegen slr0311 erkannte die Leucin-"zipper"-Domäne der cyanobakteriellen Histidinkinase (Abb. 38 A, Spur 2, Pfeilkopf), zeigte aber weder mit der rekombinanten TPR-Domäne (Abb. 38 A, Spuren 3 und 4) noch dem TTP30-Vorläufer eine spezifische Kreuzreaktion (Abb. 38 B, Spuren 1 bis 7). Eine mögliche funktionelle Verbindung von TTP30 und dem pflanzlichen Homolog der cyanobakteriellen Histidinkinase (AMS9) nach Art eines Zwei-Komponenten-Systems wurde ebenfalls überprüft und wird im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

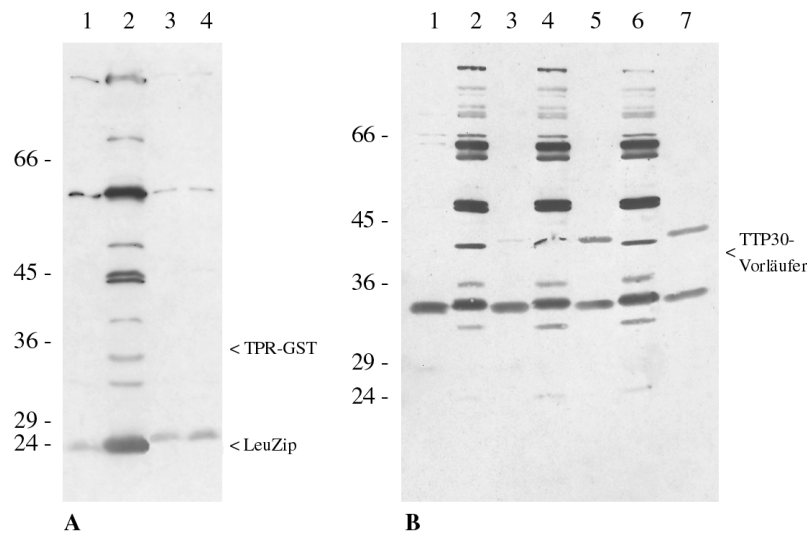


Abb. 38: Untersuchung der Bispezifität des Antikörpers gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311. **(A)** "Western"-Analyse der rekombinanten Leucin-"zipper"-Domäne aus slr0311 (1 und 2, LeuZip) und des TPR-Motivs aus TTP30 (3 und 4, TPR-GST) 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG mit dem polyklonalen slr0311-Antikörper (1 : 1000). Die TPR-Domäne wurde in Fusion mit der Glutathionsulfotransferase (GST) im pGEX-System exprimiert. **(B)** "Western"-Analyse des rekombinanten TTP30-Vorläufers in der löslichen bzw. unlöslichen Proteinfraction vor (1 bzw. 2) und 1 (3 bzw. 4), 3 (4 bzw. 5) sowie 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (6 bzw. 7) mit dem slr0311-Antikörper. Die Position des rekombinanten TTP30-Vorläufers ist durch einen Pfeilkopf markiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

3.2.6 Analyse der potentiellen "response regulator"-Eigenschaften von TTP30

Die N-terminale Aminosäuresequenz von TTP30 weist charakteristische Merkmale einer prokaryotischen "response regulator"-Domäne auf. Die ~140 Aminosäurereste umfassende Domäne (D23 bis F167) schließt ein mutmaßliches "helix-loop-helix"-Motiv ein (siehe dazu auch nachfolgenden Abschnitt). Der Sequenzvergleich mit bekannten "response regulator"-Proteinen, wie z.B. CheY aus Bakterien, identifizierte die konservierten Aminosäurereste D95 (Asparaginsäure; entspricht D57 aus CheY) und K147 (Lysin; entspricht L109 aus CheY) in der Aminosäuresequenz von TTP30 (Fulgosi, 1999). Diese Reste sind für die phosphorylierungsinduzierte Konformationsänderung der "response regulator"-Domäne und damit für die Regulation ihrer Aktivität essentiell (siehe Abschnitt 1.5). Die "response regulator"-Eigenschaften von TTP30 wurden *in vitro* durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe von einem geeigneten Phosphodonor auf den konservierten Asparaginsäurerest (D95) in seiner N-terminalen Domäne untersucht. Als Phosphodonor wurde eine N-terminal verkürzte Form der prokaryotischen Sensorkinase EnvZ verwendet. *In vivo* ist der Phosphorylgruppentransfer zwischen der Histidinkinase EnvZ und ihrem spezifischen "response regulator" OmpR an der Osmoregulation in *E. coli* beteiligt (Pratt und Silhavy, 1995).

Die trunkate Sensorkinase EnvZ wurde über das Expressionsplasmid pHAI085 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. T. Mizuno, Nagoya, Japan) in *E. coli* exprimiert und, wie in Abschnitt 2.2.5.12.3.4 beschrieben, aufgereinigt (Abb. 39 A, Spuren 1 bis 8). Die Kinaseaktivität des aufgereinigten, rekombinanten Proteins wurde in Abwesenheit eines unspezifischen Kinasesubstrats in einem SDS-Polyacrylamidgel in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ renaturiert (Abb. 39 B, Spuren 1 bis 6). Der EnvZ-spezifische "response regulator" OmpR diente als Positivkontrolle für das Phosphotransferexperiment. Die kodierende Sequenz für OmpR wurde durch PCR mit den sequenzspezifischen Oligonukleotiden OmpR.fwd und OmpR.rev aus *E. coli*-DNS amplifiziert und nach Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pRSET5a kloniert. Analog zum rekombinanten TTP30-Vorläufer wurde die unlösliche Proteinfraction 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG für den Phosphotransfer verwendet (Abb. 39 C, Spur 4).

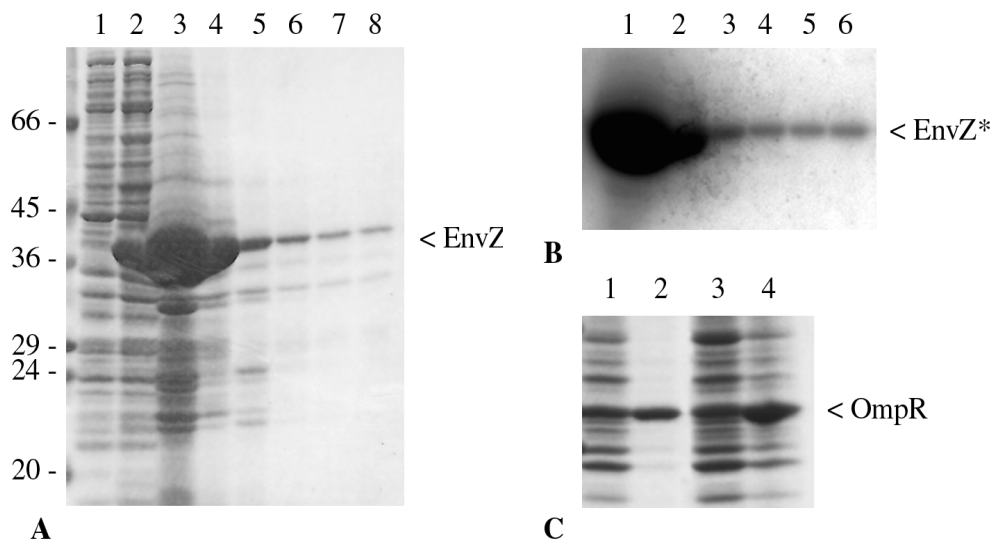


Abb. 39: Expression des Zwei-Komponenten-Systems EnvZ/OmpR in *E. coli* und Nachweis der Kinaseaktivität der rekombinanten Sensorkinase EnvZ. (A) Aufreinigung der N-terminal verkürzten Sensorkinase EnvZ. Die Bakterienzellen wurden 6 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mechanisch aufgebrochen, das Lysat wurde auf einen Saccharosegradienten geladen und dann die unlösliche Proteinfraction nach ihrer Denaturierung mit Guanidiniumchlorid auf eine DEAE-Trisacrylsäule gebunden. Nach der Elution der rekombinanten Sensorkinase mit einem Natriumchloridgradienten steigender Konzentration (100, 150, 200, 250, 300, bzw. 400 mM) (3, 4, 5, 6, 7, bzw. 8) wurde die Qualität der Präparation in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. Zum Vergleich wurden die nicht-induzierte Kontrolle (1) und die unlösliche Proteinfraction 6 Stunden nach Zugabe von IPTG (2) aufgetragen. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton. (B) Autophosphorylierung der rekombinanten Sensorkinase EnvZ. Die Proteinfractionen aus der Elution der Sensorkinase von der DEAE-Säule mit 100 bis 400 mM NaCl (1 bis 6) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, und anschließend wurde die Kinaseaktivität des rekombinanten Proteins in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ im Polyacrylamidgel renaturiert (EnvZ*). Autoradiogramm eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels. (C) Expression des EnvZ-spezifischen "response regulators" OmpR in *E. coli*. Die löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen 1 (1 bzw. 2) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (3 bzw. 4) wurden nach ihrer Auftrennung in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert.

Für das His-Asp-Phosphotransferexperiment wurde die rekombinante Sensorkinase EnvZ zunächst in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ an dem Histidinrest in ihrer "transmitter"-Domäne (siehe Abschnitt 1.4) autophosphoryliert. Nach der Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide wurde entweder der rekombinante TTP30-Vorläufer oder der EnvZ-spezifische "response regulator" OmpR zugegeben. In einem parallelen Ansatz wurde die rekombinante cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 wie beschrieben mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert und anschließend entweder der TTP30-Vorläufer oder OmpR zugegeben. Das Phosphorylierungsmuster der Proteinfractionen wurde nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE durch Autoradiographie analysiert. Die Signalintensität der phosphorylierten Sensorkinase EnvZ (41 kDa; Abb. 40, Spur 1) blieb in Gegenwart des rekombinanten TTP30-Vorläufers unverändert (Abb. 40, Spur 3). Es konnte kein Phosphoprotein nachgewiesen werden, das der Größe der rekombinanten Vorstufe (~38 kDa) entsprach. Das deutet darauf hin, daß keine Phosphorylgruppe vom Histidinrest der Sensorkinase EnvZ auf den Asparaginsäurerest in der "response regulator"-Domäne von TTP30 übertragen worden ist.

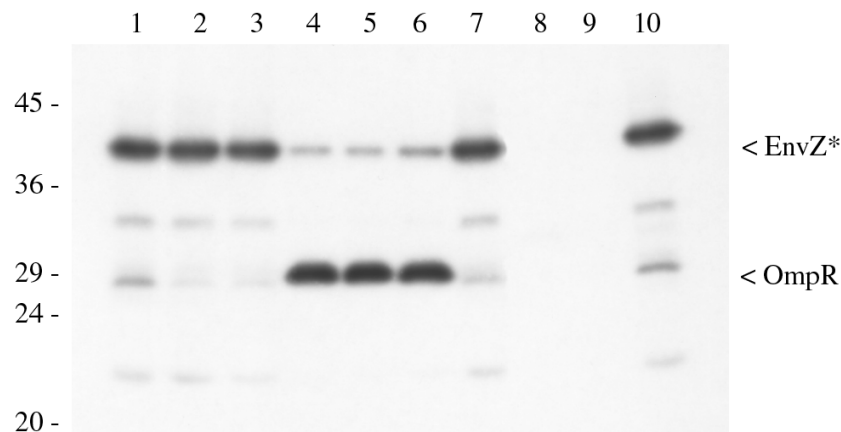


Abb. 40: *In vitro*-Phosphotransferexperiment. Autoradiogramm eines 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgels. Die rekombinante Sensorkinase EnvZ wurde in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ autophosphoryliert (1, EnvZ*) und anschließend der rekombinante TTP30-Vorläufer vor (2) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (4) zugegeben. Analog dazu wurde die Sensorkinase mit ihrem spezifischen "response regulator" OmpR 1 (4) und 4 Stunden (5) nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG inkubiert. Eine mögliche Konkurrenz um die Phosphorylgruppe der Sensorkinase wurde durch die gleichzeitige Zugabe beider "response regulator"-Proteine überprüft (6). Die Inkubation von EnvZ* mit *E. coli*-Zellen, die mit dem insertionsfreien Expressionsvektor pRSET5a transformiert worden waren, diente als Negativkontrolle (7). In einem parallelen Ansatz wurde die rekombinante cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 nach ihrer Inkubation mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ entweder mit dem TTP30-Vorläufer (8) oder mit OmpR gemischt (9). Die *in vitro*-Phosphorylierung von EnvZ in Gegenwart von slr0311 sollte die mögliche Konkurrenz beider Sensorkinasen um die Phosphorylgruppe des ATPs nachweisen (10). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton.

In Gegenwart des EnvZ-spezifischen Regulator-Proteins OmpR war die Signalintensität der Sensorkinase dagegen deutlich reduziert (Abb. 40, Spuren 4 und 5). Das Auftreten eines radioaktiv markierten Polypeptids von ~30 kDa, das mit der Größe des rekombinanten "response regulators" übereinstimmt, spricht für die Übertragung einer Phosphorylgruppe von EnvZ auf

OmpR. Der rekombinante TTP30-Vorläufer konnte dagegen nicht mit OmpR um die Phosphorylgruppe der Sensor kinase konkurrieren (Abb. 40, Spur 6). Im Falle der rekombinanten Histidinkinase slr0311 war weder mit dem rekombinanten TTP30-Vorläufer (Abb. 40, Spur 8) noch dem EnvZ-spezifischen "response regulator" OmpR (Abb. 40, Spur 9) ein Phosphotransfer nachweisbar. Eine Ursache hierfür war vermutlich die fehlende Autophosphorylierung der cyanobakteriellen Histidinkinase, die daher auch nicht mit EnvZ um die Phosphorylgruppe des ATPs konkurrieren konnte (Abb. 40, Spur 10).

3.2.7 "South-Western"-Analyse der potentiellen DNS-bindenden Eigenschaften von TTP30

Der N-terminale Abschnitt der Aminosäuresequenz von TTP30 enthält ein mutmaßliches "helix-loop-helix" (HLH)-Motiv. Dieses Motiv besteht aus zwei α -Helices (~E97 bis ~I124 bzw. ~E136 bis ~T162), die über einen Arm aus 11 negativ geladenen Aminosäureresten mit β -Faltblattstruktur verbunden sind (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.1). Eine Reihe von Proteinen, die ein derartiges Strukturmerkmal enthalten, sind an der Kontrolle der Genexpression in Eukaryoten beteiligt. Dabei spielt die HLH-vermittelte Dimerisierung der Proteine eine entscheidende Rolle für ihre Bindung an DNS. Für ihre Interaktion mit der DNS ist im allgemeinen ein kurzer Sequenzabschnitt aus überwiegend basischen Aminosäureresten verantwortlich, der dem Dimerisierungsmodul direkt benachbart ist.

Die mögliche DNS-Bindeaktivität von TTP30 wurde mit Hilfe der "South-Western"-Analyse untersucht. Dazu wurde das Vorläuferprotein in *E. coli* M15 exprimiert, die unlösliche Proteinfraction nach Induktion der Proteinsynthese unter nativen Bedingungen aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.1) und nach SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran immobilisiert. Plastiden-DNS aus intakten Spinatchloroplasten wurde radioaktiv markiert und anschließend auf die Nitrozellulosemembran hybridisiert. Über die Bindung der radioaktiv markierten Plastiden-DNS wurde ein Polypeptid von ~38 kDa nachgewiesen, das der Größe des rekombinanten TTP30-Vorläufers entsprach (Abb. 41 A, Spur 4, Pfeilkopf). Die Signalstärke dieses Protein-DNS-Komplexes war von der Proteinkonzentration abhängig (Abb. 41 B, Spuren 2 und 5, Pfeilkopf). Das Auftreten weiterer Signale im Molekulargewichtsbereich von 14 bis 50 kDa konnte durch den Vergleich mit *E. coli* M15-Zellen, die entweder nicht (Abb. 41 A, Spur 1) oder mit dem insertionsfreien Expressionsvektor pQE30 transformiert worden waren (Abb. 41 A, Spur 2), größtenteils auf *E. coli*-spezifische Proteine zurückgeführt werden. Als Positivkontrolle für ein DNS-bindendes Protein diente HistonIII-S (Abb. 41 A, Spur 5 bzw. Abb. 41 B, Spuren 3 und 6). Die rekombinante Phosphatasebindedomäne von TLP40 (21 kDa; siehe Abschnitt 3.3.3.1) wurde als Negativkontrolle eingesetzt (Abb. 41 A, Spur 6).

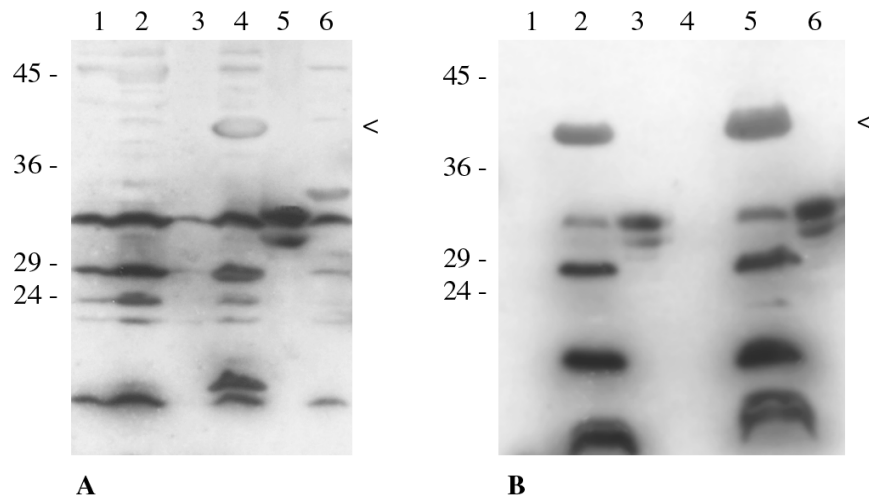


Abb. 41: *In vitro*-DNS-Bindeaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers. Autoradiogramm eines 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgels nach Immobilisierung der Proteinfractionen auf Nitrozellulosemembran und Hybridisierung mit ^{32}P -markierter Plastiden-DNS (100 ng) aus Spinatchloroplasten. (A) "South-Western"-Analyse des rekombinanten TTP30-Vorläufers (Pfeilkopf) vor (3) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (4). *E. coli*-Zellen, die entweder nicht (1) oder mit dem insertionsfreien Expressionsvektor pQE30 (2) transformiert worden waren, und die rekombinante Phosphatasebindedomäne von TLP40 (21 kDa; 6) dienten als Negativkontrollen. HistonIII-S wurde als Positivkontrolle eingesetzt (5). (B) Konzentrationsabhängigkeit des Hybridisierungssignals. "South-Western"-Analyse des rekombinanten TTP30-Vorläufers (Pfeilkopf) in zwei verschiedenen Konzentrationen vor (1 und 4) und nach Zugabe von IPTG (2 und 5). Als Kontrolle diente HistonIII-S (3 und 6). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Der rekombinante TTP30-Vorläufer scheint Plastiden-DNS spezifisch zu binden (Abb. 42 A, Spur 4, Stern). Weder die Hybridisierung mit ^{32}P -markierter gesamtdenomischer DNS (Abb. 42 B) oder Gesamt-RNS (Abb. 42 C) noch mit Plastiden-RNS (Abb. 42 D) führten zu einem Signal, das der Größe des rekombinanten Proteins entsprach.

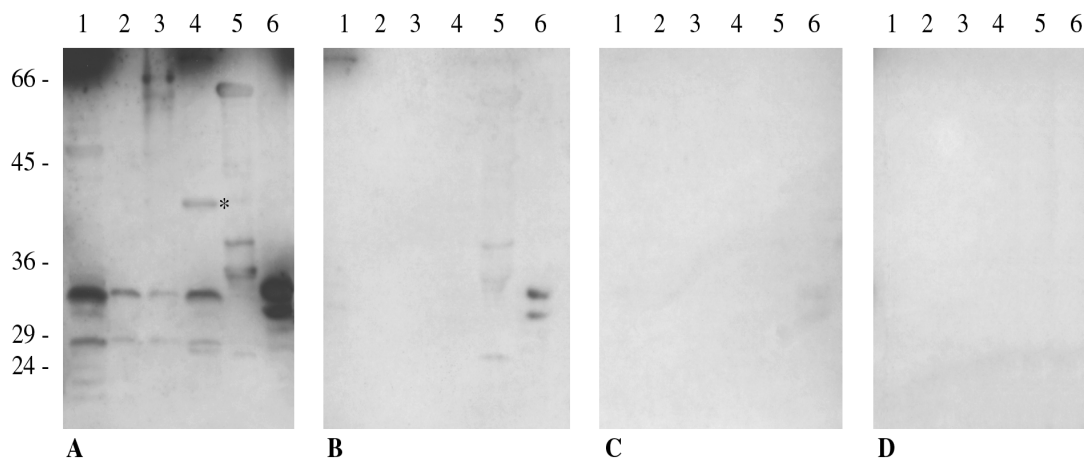


Abb. 42: Spezifität der *in vitro*-DNS-Bindeaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers. Autoradiogramm eines 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgels nach Immobilisierung der Proteinfractionen auf Nitrozellulosemembran. "South-Western"-Analyse des Vorläufers vor (3) bzw. nach Zugabe von IPTG (4; Stern) und Hybridisierung mit ^{32}P -markierter Plastiden-DNS (100 ng) (A), gesamtdenomischer DNS (100 ng) (B), Gesamt-RNS (5 μg) (C) oder Plastiden-RNS (2,5 μg) aus Spinatchloroplasten (D). *E. coli*-Zellen, transformiert mit dem insertionsfreien pQE30-(1) bzw. pRSET5a-Vektor (2) oder der Phosphatasebindedomäne von TLP40 (5), dienen als Negativkontrollen, HistonIII-S diente als Positivkontrolle (6). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Zur Identifikation der Sequenzbereiche, mit denen eine Interaktion *in vitro* erfolgen kann, wurden die Insertionen verschiedener Subklone des Plastidenchromosoms aus Spinat isoliert (Tabelle 2), radioaktiv markiert und wie beschrieben hybridisiert (Abb.43).

Tabelle 2: Subklone des Plastidenchromosoms aus *S. oleracea* L. für die "South-Western"-Analyse der *in vitro*-DNS-Bindeaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

Subklon	Synonym	Klonierter Bereich	Insertionsgröße	Vektor	Insertionsstelle
108-3	<i>psaA</i>	<i>psaA-psaB-rps14-trnfM-trnG</i>	7,7 kb	pBR322	PstI
407-2	<i>rbcL</i>	<i>rbcL-atpB-atpE-trnM</i>	5,0 kb	pBR322	BamHI
408-b	<i>psbD</i>	<i>psbD-trnT-trnE-trnY</i>	4,4 kb	pBR322	BamHI
305	<i>psaC</i>	<i>ndhF-rpl32-orf45-trnL-ycf5-ndhD-psaC-ndhE-ndhG-ndhI-ndhA</i>	11,9 kb	pBluescript II SK ⁻	XhoI
416-3	<i>psbC</i>	<i>psbC-trnS-ycf9-trnG</i>	2,6 kb	pBR322	BamHI
206	<i>psbA</i>	<i>trnH-psbA-trnk-matK-rps16-trnQ-psbK-psbI-trnS-trnG</i>	9,0 kb	pBR322	SalI

Die Klone stammten aus der DNS-Bibliothek des Plastidenchromosoms aus *S. oleracea* L. von Prof. Dr. R.G. Herrmann (München).

In mehreren unabhängigen Ansätzen nahm die Signalintensität des Vorläufer/DNS-Komplexes in der Reihenfolge *psaA* > *rbcL* > *psbD* > *psaC* > *psbC* > *psbA* sichtbar ab (Abb. 43 A bis E, jeweils Spuren 2 und 3). Dagegen war die Signalintensität der Positivkontrolle HistonIII-S unabhängig von der verwendeten DNS-Sonde gleich stark (Abb. 43 A bis E, jeweils Spur 4).

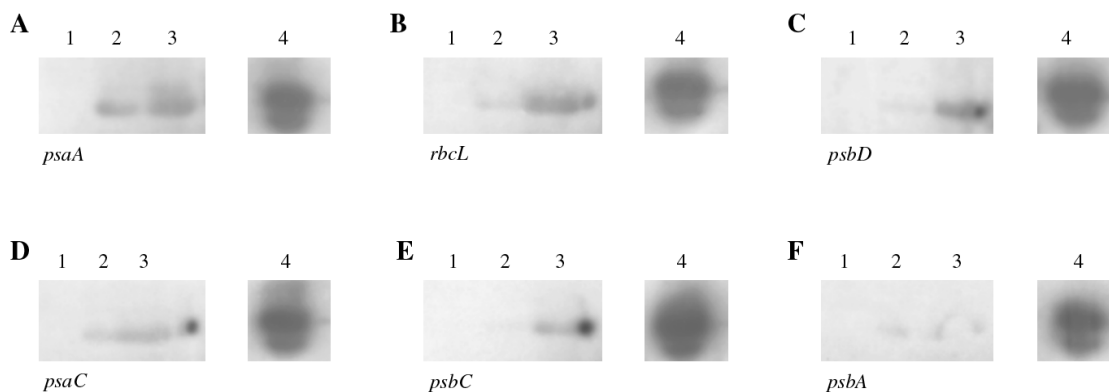


Abb. 43: *In vitro*-DNS-Bindeaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers in Gegenwart verschiedener Subklone des Plastidenchromosoms von *S. oleracea* L. Ausschnitte aus dem Autoradiogramm eines 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgels nach Immobilisierung der Proteinfractionen auf Nitrozellulosemembran. "South-Western"-Analyse des rekombinanten TTP30-Vorläufers vor (1) und in 2 verschiedenen Konzentrationen nach Zugabe von IPTG (2 und 3) und Hybridisierung mit den ³²P-markierten Insertionen der Subklone 108-3 (*psaA*; A), 407-2 (*rbcL*; B), 408-b (*psbD*; C), 305 (*psaC*; D), 416-3 (*psbC*; E) und 206 (*psbA*; F). Als Positivkontrolle für ein DNS-bindendes Protein wurde HistonIII-S verwendet (4). Für weitere Einzelheiten bezüglich der verwendeten Subklone, siehe Tabelle 2.

Die genannten Ergebnisse deuteten darauf hin, daß der rekombinante TTP30-Vorläufer bestimmte Bereiche des Plastidenchromosoms bevorzugt binden kann. Zur Identifikation dieser Sequenzbereiche auf dem Plastidenchromosom von Spinat wurden die Promotorregionen der plastidären Gene *atpB*, *psaA*, *psbA*, *psbB* und *psbD* durch PCR in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide (siehe Abschnitt 2.1.7) aus der Plastiden-DNS von Spinat amplifiziert (Tabelle 3). Die Amplifikate erstreckten sich von der -35 Region bis in die 5'-terminalen 100 bis 200 bp der kodierenden Sequenz des jeweiligen Gens.

Tabelle 3: Promotorregionen verschiedener plastidärer Gene für die "South-Western"-Analyse der *in vitro*-DNS-Bindeaktivität des rekombinanten TTP30-Vorläufers.

Plastidäres Gen	Position auf dem Plastidenchromosom		Produktgröße	Oligonukleotide für Amplifikation
	von	bis		
<i>atpB</i>	53420	52949	471 bp	atpB.fwd + rev
<i>psaA</i>	40851	40412	439 bp	psaA.fwd + rev
<i>psbA</i>	70761	71140	379 bp	psbA.fwd + rev
<i>psbB</i>	1451	1244	207 bp	psbB.fwd + rev
<i>psbD</i>	30544	31628	1084 bp	psbD.fwd + rev

Die Positionen auf dem Plastidenchromosom von *S. oleracea* L. wurden nach den Angaben von Schmitz-Linneweber et al. (2001) ermittelt.

Keine der in Tabelle 3 aufgeführten Promotorregionen, die für die "South-Western"-Analyse ausgewählt worden waren, wurde von dem rekombinanten TTP30-Vorläufer gebunden (nicht gezeigt). Das zeigt, daß die Interaktion von TTP30 mit dem Plastidenchromosom vermutlich in einem anderen Bereich erfolgt und die Bindestelle(n) möglicherweise außerhalb der Promotorregionen plastidärer Gene liegt (liegen).

3.2.8 Untersuchung der Ca²⁺-bindenden Eigenschaften von TTP30

Proteine, deren Aktivität durch die reversible Bindung von Calciumionen reguliert wird, zeichnen sich durch ein als EF-Hand bezeichnetes "helix-loop-helix"-Motiv aus. Die Bindung von Calciumionen an ein solches Modul kann Konformationsänderungen induzieren, welche zu einem veränderten Laufverhalten des Proteins im SDS-Polyacrylamidgel führen. Dieser Ansatz wurde dazu genutzt, das potentielle "helix-loop-helix"-Motiv in der N-terminalen Regulator-ähnlichen Domäne von TTP30 auf seine Calcium-bindenden Eigenschaften zu überprüfen (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.1). Dazu wurde der rekombinante TTP30-Vorläufer (Abb. 44 A bis D, jeweils Spur 2) in *E. coli* exprimiert, unter nativen Bedingungen aus der unlöslichen Proteinfraction aufgereinigt und anschließend in Gegenwart von 10 mM CaCl₂ für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Abb. 44 B). Als Negativkontrollen dienten die mit dem TTP30-

Expressionsplasmid transformierten *E. coli* M15-Zellen vor der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG (Abb. 44 A bis D, jeweils Spur 1) sowie BSA (Abb. 44 A bis D, jeweils Spur 3). Ein paralleler Ansatz enthielt zusätzlich 20 mM EDTA, das eine mögliche Bindung der Calciumionen an das mutmaßliche "helix-loop-helix"-Motiv durch ihre Komplexbildung unterbinden sollte (Abb. 44 C). Weiterhin wurden die Proteinfraktionen in Abwesenheit von Calciumionen mit 20 mM EDTA inkubiert (Abb. 44 D).

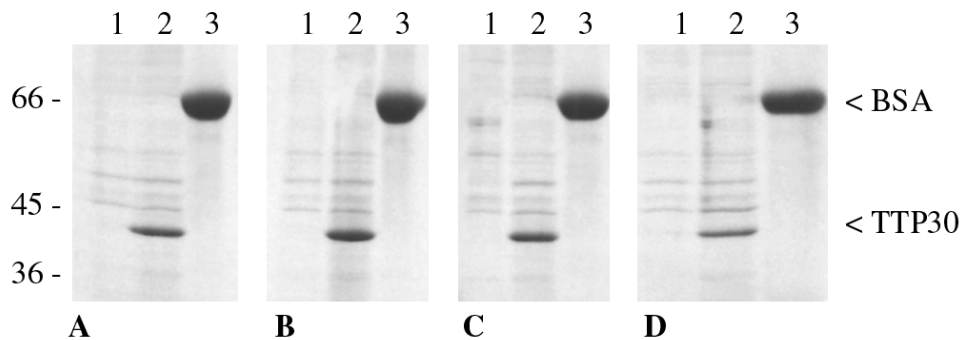


Abb. 44: Analyse der Ca^{2+} -Bindeaffinität des rekombinanten TTP30-Vorläufers durch Ca^{2+} -"mobility-shift". Der rekombinante Vorläufer vor (1) und 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG (2) wurde ohne (A) bzw. mit 10 mM CaCl_2 (B), mit 10 mM CaCl_2 und 20 mM EDTA (C) oder nur mit 20 mM EDTA (D) inkubiert und sein Laufverhalten in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. Als Negativkontrolle diente BSA (3). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die Anwesenheit von Calciumionen beeinflusste das Laufverhalten des rekombinanten TTP30-Vorläufers im SDS-Polyacrylamidgel nicht (Abb. 44 A bis D, jeweils Spur 2). Das deutet darauf hin, daß das potentielle "helix-loop-helix"-Motiv in der N-terminalen Domäne des rekombinanten Proteins entweder (a) konformationsbedingt für die Calciumionen nicht zugänglich war oder (b) überhaupt keine Calciumionen binden kann.

3.2.9 Herstellung von T-DNS-Konstruktionen für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* L.

Für die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts für TTP30 in *A. thaliana* L. wurden die 5'-terminalen 540 bp der kodierenden Sequenz des *Arabidopsis*-Homologs (orf03; siehe Abschnitt 3.2.2) durch PCR in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide aus der pGAD-cDNS-Bibliothek von *A. thaliana* L. amplifiziert (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Dieser Sequenzabschnitt enthält die ersten 70 bp des TPR-Motivs von TTP30. Die cDNS-Sequenz wurde nach ihrer Restriktion mit *SacI* und *XbaI* in Antisens- bzw. Sens-Orientierung in die entsprechenden Schnittstellen des binären Vektors pGPTV-bar 35S-nos kloniert und so unter die Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gestellt (Abb. 45). Mit den genannten Plasmiden wurden kompetente Agrobakterien wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben transformiert. Die

Transformation *in planta* erfolgte durch Vakuuminfiltration von *A. thaliana* L., Ökotyp Columbia (Col-0). Pro T-DNS-Konstruktion wurden 12 Pflanzen infiltriert.

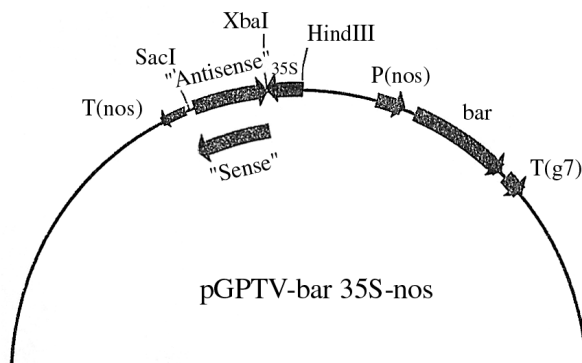


Abb. 45: Schematische Darstellung der T-DNS-Konstruktionen für die Expression des TTP30-Transkripts in Antisens- bzw. Sens-Orientierung in *A. thaliana* L. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

Das pUC19-Derivat pGPTV-bar 35S-nos trägt das Gen für den Selektionsmarker Phosphinotricin (bar) unter der Kontrolle des Nopalinsynthase-Promotors (nos). Transgene Pflanzen der T1-Generation konnten daher durch ihre Unempfindlichkeit gegenüber dem Herbizid Phosphinotricin ("BASTA") identifiziert werden. Pro Infiltrationsereignis wurden 400 bis 500 Samen auf Selektionsmedium ausgelegt. Daraus resultierten insgesamt 17 resistente Antisens- und 15 Sens-Keimlinge der T1-Generation. Die Herbizidresistenz der in Erde überführten Keimlinge wurde durch Ansprühen mit 0,1% (v/v) "BASTA"-Lösung bestätigt. Die T-DNS-Insertionen wurden im Genom der transgenen Pflanzen der T2-Generation nachgewiesen. Dazu wurden pro resistenter T1-Pflanze 100 bis 200 Samen auf Selektionsmedium ausgelegt. Der Anteil an resistenten T2-Keimlingen lag zwischen 20 und 60%, unabhängig davon, ob das TTP30-Transkript in Antisens- oder Sens-Orientierung exprimiert werden sollte. Die Integration der T-DNS-Konstruktionen in das Genom der transgenen T2-Pflanzen wurde durch "Southern"-Analyse nachgewiesen und ihre Auswirkung auf den endogenen TTP30-mRNS-Spiegel durch "Northern"-Analyse untersucht.

3.2.10 "Southern"- und "Northern"-Analyse transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Unter moderaten Wachstumsbedingungen zeigten weder herbizidresistente T1- noch T2-Pflanzen einen auffälligen Phänotyp. Unabhängig davon, ob das Antisens- oder Sens-Transkript für TTP30 exprimiert werden sollte, zeichneten sich die transgenen Pflanzen durch ein gut entwickeltes, reich verzweigtes Wurzelsystem und tiefgrüne Blätter aus.

Zum Nachweis der T-DNS-Insertionen wurde gesamtgenomische DNS aus den Blättern von jeweils 6 "BASTA"-resistenten T2-Pflanzen eines Infiltrationsereignisses isoliert. Für die "Southern"-Analyse wurde die genomische DNS dieser Pflanzen, in denen die T-DNS-Konstruktionen zuvor durch PCR mit den Vektor-spezifischen Oligonukleotiden 35S und nos nachgewiesen worden waren (siehe Abschnitt 2.1.7), aufgrund der geringen DNS-Konzentration

der Einzelpflanzen vereinigt und mit *Hind*III geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden nach ihrer Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel auf Nylonmembran immobilisiert. Zum Nachweis der T-DNS-Insertionen im Genom der Antisens- bzw. Sens-Pflanzen wurden die entsprechenden cDNS-Sequenzen durch PCR in Gegenwart der genannten Vektor-spezifischen Oligonukleotide aus den Plasmiden TTP30S+X/pGPTV (Antisens-Orientierung) bzw. TTP30X+S/pGPTV (Sens-Orientierung) amplifiziert, wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben, radioaktiv markiert und auf die Nylonmembran hybridisiert. Die "Southern"-Analyse bestätigte die Insertion der T-DNS-Konstruktionen in das Genom der transgenen Pflanzen (Abb. 46 A, Spuren 2, 3, 5, und 7, Sterne). Das komplexe Hybridisierungsmuster, das in Abbildung 46 A für 6 der insgesamt 32 transgenen Pflanzen exemplarisch dargestellt ist, ist vermutlich auf die Existenz mehrerer Kopien für TTP30 im Genom von *A. thaliana* L. zurückzuführen (Abb. 46 A, Spur 1), die zusätzlich Intronsequenzen mit *Hind*III-Schnittstellen enthalten (siehe Abschnitt 3.2.2). Weiterhin stellt die "Southern"-Analyse die Summe mehrerer Integrationsereignisse dar, da dafür die genomische DNS aus den Blättern verschiedener T2-Pflanzen eines Infiltrationsexperimentes vereinigt wurde.

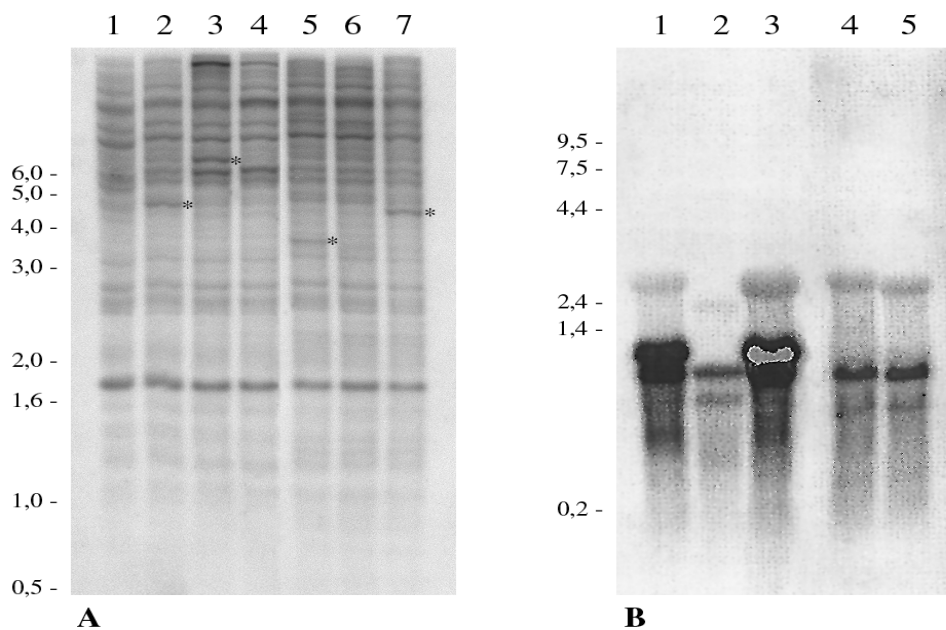


Abb. 46: Nachweis der T-DNS-Konstruktionen im Genom transgener *Arabidopsis*-Pflanzen und Auswirkung ihrer Expression auf den Gehalt an endogener TTP30-mRNS. (A) "Southern"-Analyse gesamtgenomischer DNS transgener Pflanzen der T2-Generation. Pro Spur wurden 2 µg *Hind*III-geschnittene, gesamtgenomische DNS aus Wildtyp- (1) und transgenen Antisens- (2 bis 4) bzw. Sens-Pflanzen (5 bis 7) mit der ³²P-markierten Antisens- (1 bis 4) bzw. Sens-cDNS-Sequenz hybridisiert (5 bis 7). Autoradiogramm der unter stringenten Bedingungen gewaschenen Nylonmembran. Polymorphe Banden in der genomischen DNS transgener Pflanzen sind mit einem Stern markiert. Links: DNS-Längenstandard in Kilobasenpaaren. (B) "Northern"-Analyse von Gesamt-RNS aus transgenen Pflanzen der T2-Generation. Pro Spur wurden 7,5 µg Gesamt-RNS aus Wildtyp- (1 und 4) und transgenen Antisens- (2 und 3) bzw. Sens-Pflanzen (5) unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und nach ihrer Immobilisierung auf Nylonmembran mit der ³²P-markierten Sens- (1 bis 3) bzw. Antisens-RNS-Sonde (4 und 5) hybridisiert. Die unterschiedlich schnelle elektrophoretische Auftrennung der RNS-Proben in dem denaturierenden Agarosegel trotz äquivalenter Konzentrationen hat zur Verschiebung der Spuren 2 und 5 geführt. Links: RNS-Längenstandard in Kilobasenpaaren

Für die "Northern"-Analyse wurde Gesamt-RNS aus jeweils 20 Blättern verschiedener herbizidresistenter T2-Pflanzen eines Infiltrationsereignisses isoliert, unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran transferiert. Der Nachweis des Sens-Transkripts in den transgenen Pflanzen erfolgte mit der radioaktiv markierten Antisens-RNS. Die Repression der endogenen TTP30-mRNS durch das Antisens-Transkript wurde dagegen mit der radioaktiv markierten Sens-RNS nachgewiesen. Zur Herstellung der RNS-Sonden wurden die entsprechenden T-DNS-Konstruktionen durch PCR mit den folgenden Vektor- und sequenzspezifischen Oligonukleotiden aus dem Plasmid TTP30S+X/pBluescript II SK⁻ amplifiziert:

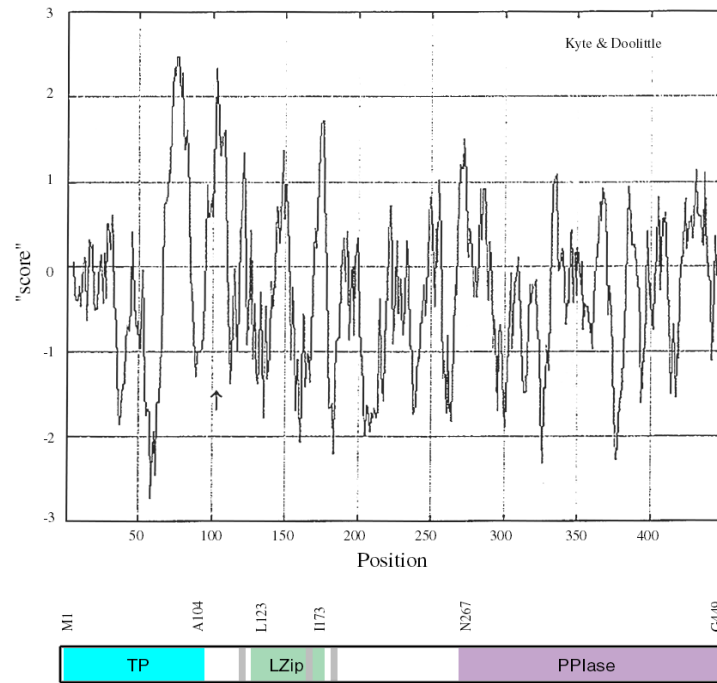
M13.fwd + TTP30XbaI.rev	Antisens-Sonde; T3-Promotor
M13.rev + TTP30SacI.fwd	Sens-Sonde; T7-Promotor

Unter der Kontrolle des T3- bzw. T7-Promotors wurde dann der komplementäre RNS-Strang in Gegenwart von [α -³²P]UTP synthetisiert (siehe Abschnitt 2.2.2.5). Trotz stringenter Bedingungen resultierte ein komplexes Hybridisierungsmuster. Eine Reduktion des endogenen TTP30-mRNS-Spiegels durch das Antisens-Transkript konnte nur in einem Fall nachgewiesen werden (Abb. 46 B, Spur 2). Da die RNS-Proben in dem denaturierenden Agarosegel trotz äquivalenter Konzentrationen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aufgetrennt worden waren, ist das Transkriptmuster der Spuren 2 und 5 nach unten verschoben. Im Hinblick auf die Expression des Sens-Transkripts (Abb. 46 B, Spur 5) konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Möglicherweise war das nur partiell exprimierte Sens-Transkript instabil und wurde in den transgenen Pflanzen rasch abgebaut.

3.3 Charakterisierung der regulatorischen Rolle des komplexen Immunophilins TLP40 im Lumen von Thylakoidmembranen

Biochemische Ansätze zur Identifizierung und Aufreinigung der Bestandteile des thylakoidalen Proteinkinase/-phosphatase-Systems haben zur Isolierung eines minoren Polypeptids von 40 kDa geführt (Fulgosi et al., 1998). Die Identität dieses Proteins, das mit der Aktivität einer membranintegralen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A gemeinsam aufgereinigt wurde (Vener et al., 1999), konnte durch die Isolierung seiner cDNS und die Analyse der strukturellen Eigenschaften seiner Aminosäuresequenz aufgeklärt werden. Bei der als TLP40 bezeichneten Komponente handelt es sich um eines der wenigen bekannten komplexen Immunophiline, die zudem im Lumen von Thylakoidmembranen aus Spinachchloroplasten lokalisiert ist (Fulgosi, 1999). Die Bezeichnung beruht auf der lumenalen Lokalisation und dem Vorhandensein einer Immunophilin-ähnlichen, C-terminalen Domäne ("thylakoid lumenal peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) of 40 kDa"; Abb. 47).

Neben der C-terminalen Rotamasedomäne (N267 bis G449) zeichnet sich TLP40 durch ein N-terminales Leucin-"zipper"-Motiv (L123 bis I173) sowie drei damit teilweise überlappende, mutmaßliche Phosphatasebindestellen (D114 bis R120; G148, K150, S154, E156, R157; E179 bis R 184) aus (Abb. 47).



```

MSSFINHHFYPSVCTSKHALPINPTSPFYLGIPNFRQKSRFMHLTPRCFSRQIDPLDKQKKRSFSVKECA 70
ISLALAAALISGVPSLSWERHAEALTSPVLPDLAVLISGPPIKDPEALLRYALPIDNKAIREVQKPLEDI 140
TESLRVLGLKALDSVERNLKQASRALKNGKSLIIAGLAESKKDRGVELLDKLEAGMGELQQIVENRNREG 210
VAPKQRELLQYVGSVEEDMVDGFPYEVPEEYQTMPLLKGRAVVEMKVKVKDNPNVDNCFRIVLDGYNAP 280
VTAGNFLDLVERHFYDGMEIQRRDGFVVQTGDPEGPAEGFIDPSTEKPRTIPLEIMVEGEKVPVYGSTLE 350
ELGLYKAQTKLPFNAFGTMAMAREEFENNSGSSQIFWLLKESELTPSNANILDGRYAVFGYVTDNQDYLA 420
DLKVGDVIESVQAVSGVDNLVNPTYKIAG 449

```

Abb. 47: Hydropathieanalyse (nach Kyte und Doolittle, 1982) der Aminosäuresequenz von TLP40 und schematische Darstellung der funktionellen Domänen (modifiziert nach Fulgosi, 1999). Das bipartite, aminoterminaler Transitpeptid (TP, blau) des Vorläuferproteins reicht von M1 bis A104. Der Pfeil markiert die Prozessierungsstelle. Die drei potentiellen Phosphatasebindestellen (grau), die teilweise mit der Leucin-"zipper"-Domäne überlappen, sind fettgedruckt. Die Leucin- und Isoleucinreste des Leucin-"zipper"-Motivs (LZip, grün) sind unterstrichen. Die Rotamasedomäne (PPIase, lila) im C-proximalen Abschnitt des Proteins reicht von N267 bis G447. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

Die Aufreinigung von TLP40 mit der Aktivität einer membranintegralen Proteinphosphatase und das Vorhandensein möglicher Phosphatasebindestellen innerhalb seiner N-terminalen Domäne lassen eine regulatorische Interaktion beider Proteine vermuten. Die Aufklärung der funktionellen Rolle von TLP40 war daher im Hinblick auf die Regulation der reversiblen Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen von besonderem Interesse.

3.3.1 Einfluß von Azid und Nigericin auf die Translokation des *in vitro*-Translationsproduktes in das Lumen von Thylakoidmembranen

Die Aminosäuresequenz von TLP40 enthält ein bipartites Transitpeptid, das für lumenale und nukleär kodierte, bitope Thylakoidmembranproteine charakteristisch ist. Die N-terminale Transitsequenz (M1 bis A104) setzt sich aus Motiven zusammen, die für den Import in das Organell sowie die Translokation über die Thylakoidmembran erforderlich sind. Die lumenale Lokalisation des kernkodierten Polypeptids TLP40 wurde mit Hilfe des *in organello*-Imports überprüft. Zugleich sollte der Translokationsweg ermittelt werden, durch den TLP40 über die Thylakoidmembran in das Lumen transportiert wird.

Durch *in vitro*-Transkription der TLP40-cDNS und anschließende *in vitro*-Translation der RNS in Gegenwart von L-³⁵S-Methionin wurde zunächst ein radioaktiv markiertes Vorläuferprotein (~50 kDa) im Retikulozytenlysat hergestellt. Der *in vitro* translatierte Vorläufer (Abb. 48 A, Spur 1, Pfeilkopf) wurde in die intakten Spinatchloroplasten importiert und befand sich nach seiner Prozessierung zum reifen Protein (~41 kDa) ausschließlich in der Membranfraktion (Abb. 48 A, Spur 3). Die lumenale Lokalisation des reifen Proteins wurde durch seine Unempfindlichkeit gegenüber Thermolysin angezeigt (Abb. 48 A, Spur 4).

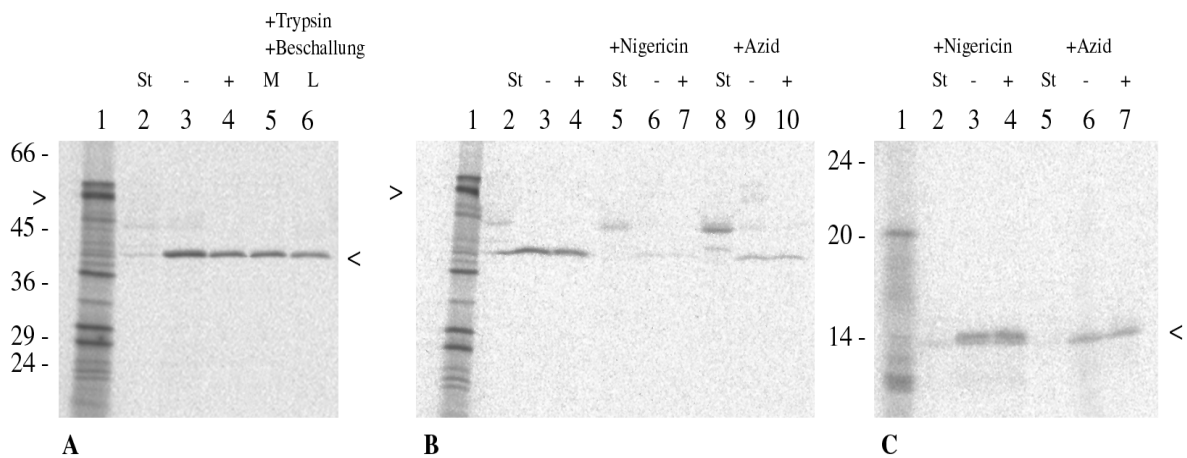


Abb. 48: *In organello*-Import des *in vitro* translatierten TLP40-Vorläufers in intakte Spinatchloroplasten und Untersuchung des Translokationsweges. **(A)** Autoradiogramm eines 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgels. Die Importreaktion wurde nach 30 Minuten gestoppt, die Chloroplasten wurden lysiert und in Stroma (St; 2) und Thylakoidmembranen fraktioniert. Ein Teil der Membranfraktion wurde ohne Zugabe von Protease (-; 3) auf Eis inkubiert, ein anderer Teil mit Trypsin behandelt (+; 4) bzw. in Gegenwart von Trypsin beschallt und anschließend Membranfraktion (M; 5) und Thylakoidlumen (L; 6) getrennt. Der Pfeilkopf markiert die Position des *in vitro* translatierten TLP40-Vorläufers (1). **(B)** Einfluß der Translokationsinhibitoren Nigericin (5 bis 7) bzw. Azid (8 bis 10) auf den *in organello*-Import des *in vitro* translatierten TLP40-Vorläufers (1). Die Chloroplasten wurden wie beschrieben in Stroma (St; 2, 5, bzw. 8) und Thylakoidmembranen fraktioniert. Ein Teil der Membranfraktion wurde ohne Protease (-; 3, 6, bzw. 9) inkubiert, der andere Teil mit Trypsin behandelt (+; 4, 7, bzw. 10). Autoradiogramm eines 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgels. **(C)** Effekt von Nigericin (2 bis 4) und Azid (5 bis 7) auf die Translokation des *in vitro* translatierten Plastocyanin-Vorläufers (1). Stromafraktion (St; 2 bzw. 5) und Thylakoidmembranen vor (-; 3 bzw. 6) und nach Trypsinbehandlung (+; 4 bzw. 7) wurden wie beschrieben nach der Importreaktion aus den intakten Chloroplasten isoliert. Autoradiogramm eines 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgels. Der Pfeilkopf markiert die reife Form des Plastocyanins. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Nach der Beschallung der Thylakoidmembranen konnte ein Teil der Radioaktivität im Lumen nachgewiesen werden (Abb. 48 A, Spur 6), ein anderer Teil blieb dagegen weiterhin mit der Membranfraktion assoziiert (Abb. 48 A, Spur 5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß TLP40 nicht nur "frei" im Lumen vorkommt, sondern auch reversibel mit der Innenseite der Thylakoidmembran assoziiert sein kann.

Zur Aufklärung des Translokationsweges, über den TLP40 in das Thylakoidlumen transloziert wird, wurde der Einfluß spezifischer Inhibitoren auf die Importeffizienz untersucht. Während der Δ pH-abhängige Weg durch Ionophoren, wie z.B. Nigericin, gehemmt wird, kennzeichnet die Sensitivität gegenüber Natriumazid die Sec-abhängige Route. Überraschenderweise kam es sowohl in Gegenwart von Nigericin als auch von Natriumazid zur Akkumulation eines Prozessierungsintermediates (\sim 46 kDa) im Stroma (Abb. 48 B, Spuren 5 und 8). Die insgesamt geringere Importeffizienz in Gegenwart von Nigericin war in mehreren unabhängigen Ansätzen auf den Verlust intakter Chloroplasten im Verlauf ihrer Reisolierung nach dem Importexperiment zurückzuführen. Natriumazid beeinflusst die Proteintranslokation in Spinatchloroplasten offenbar nicht in derselben Weise, wie das von Erbsenchloroplasten bekannt ist. In Gegenwart von 10 mM Natriumazid wurde Plastocyanin in Spinatchloroplasten nicht an der Translokation in das Thylakoidlumen gehindert (Abb. 48 C, Spur 3, Pfeilkopf), wogegen es in Erbsenchloroplasten unter diesen Bedingungen bereits zu einer partiellen Inhibition des Membrantransfers kommt (Berghöfer, 1999). Weitere Informationen über den Einfluß von Natriumazid auf die Translokation von TLP40 könnte daher der *in organello*-Import des *in vitro* translatierten Vorläuferproteins in intakte Erbsenchloroplasten geben.

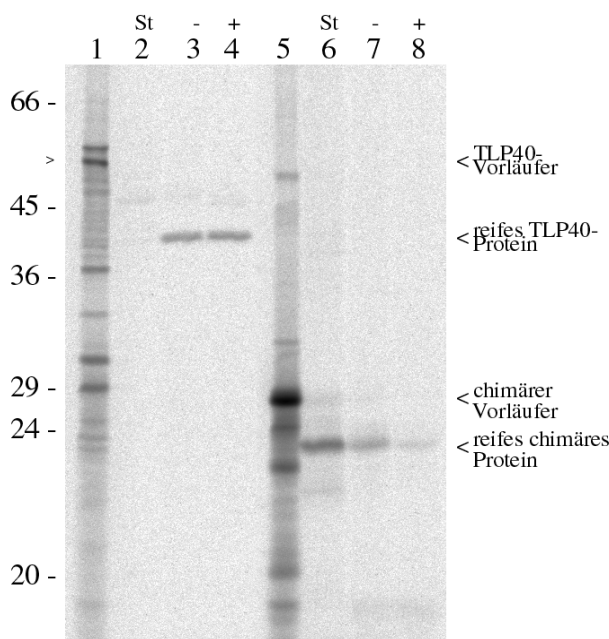


Abb. 49: *In organello*-Import des *in vitro* translatierten chimären Proteins PC/PPIase, das sich aus dem Transitpeptid von Plastocyanin (PC) und der Rotamasedomäne (PPIase) von TLP40 zusammensetzt. Die Chloroplasten wurden nach dem Import des *in vitro* translatierten TLP40-Vorläufers (1, Pfeilkopf) bzw. des chimären Vorläuferproteins (5) in Stroma (St; 2 bzw. 6) und Thylakoidmembranen fraktioniert. Ein Teil der Membranfraktion wurde ohne Protease (-; 3 bzw. 7), der andere Teil mit Thermolysin (+; 4 bzw. 8) inkubiert. Autoradiogramm eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels. Links: Molekulargewichtstandard in Kilodalton

Für die Translokation von TLP40 scheint nicht nur das Transitpeptid essentiell zu sein, sondern auch weitere Bereiche innerhalb der N-terminalen Domäne. Diese Annahme wurde durch den *in organello*-Import eines Fusionsproteins bestätigt, das durch die Verknüpfung der C-terminalen Rotamasedomäne von TLP40 (PPIase, ~21 kDa) mit dem bipartiten Transitpeptid von Plastocyanin (PC) hergestellt wurde (Abb. 49). Das *in vitro* translatierte chimäre Protein (PC/PPIase, ~28 kDa; Abb. 49, Spur 5) wurde in intakte Spinatchloroplasten importiert und akkumulierte nach seiner Prozessierung (~23 kDa) größtenteils im Stroma (Abb. 49, Spur 6). Nur ein geringer Teil der Radioaktivität war mit der Membranfraktion assoziiert (Abb. 49, Spur 7) und zudem der proteolytischen Aktivität im Stroma zugänglich (Abb. 49, Spur 8). Das ist ein Hinweis auf eine Störung der Translokation über die Thylakoidmembran.

3.3.2 Assoziation von TLP40 mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex

Die Ergebnisse der *in organello*-Importexperimente deuteten auf ein Gleichgewicht zwischen TLP40 im Thylakoidlumen und seiner membranassoziierten Form hin. Die subthylakoidale Lokalisation von TLP40 sollte zur Identifikation der Bereiche der photosynthetischen Membran beitragen, mit denen eine Interaktion erfolgen kann. Dazu wurden Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wie in Abschnitt 3.1.2.3 beschrieben partiell solubilisiert und die supramolekularen Proteinkomplexe in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgetrennt. Neben "freiem" TLP40 (Abb. 50, Spuren 3 bis 6) konnte ein membrangebundener Anteil nachgewiesen werden, der unter diesen Bedingungen mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex komigrierte (Abb. 50, Spuren 7 bis 13).

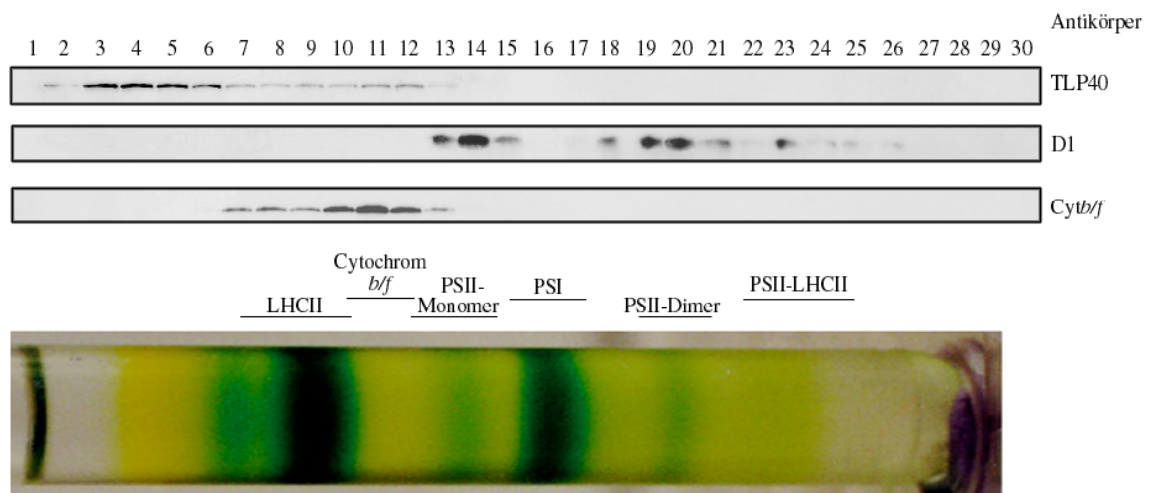


Abb. 50: Subthylakoidale Lokalisation von TLP40. Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wurden wie unter Abb. 9 beschrieben partiell solubilisiert. Die Fraktionierung des kontinuierlichen Saccharosegradientens nach Eshaghi et al. (1999) erfolgte von links nach rechts. Die Polypeptidzusammensetzung der Gradientenfraktionen wurde nach ihrer Auftrennung in einem 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgel und nachfolgender Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran durch "Western"-Analyse mit verschiedenen Antiseren untersucht. Für den Nachweis von TLP40 wurde der polyklonale Antikörper gegen das rekombinante reife Protein (1 : 1000) verwendet. Die Positionen des PSII und des Cytochrom *b/f*-Komplexes wurden mit Antiseren gegen das D1-Polypeptid (1 : 1000) bzw. gegen Cytochrom *b_s* und *f* (1 : 3000) ermittelt. Die Lokalisation des trimeren LHClI-Komplexes und des PSI wurde in parallelen Ansätzen bestimmt und ist hier nur schematisch dargestellt.

Die partielle Solubilisierung von Stromathylakoidmembranen führte zum serologischen Nachweis von TLP40 in den Fraktionen des kontinuierlichen Saccharosegradientens, in denen der Cytochrom *b/f*-Komplex lokalisiert war (Abb. 51 A, Spuren 17 bis 20). In den Proteinfractionen partiell solubilisierter Granalamellen konnte TLP40 dagegen überhaupt nicht nachgewiesen werden (Abb. 51 B). Das deutet auf eine Diskriminierung der Cytochrom *b/f*-Komplexe in den gestapelten Regionen der Thylakoidmembran hin.

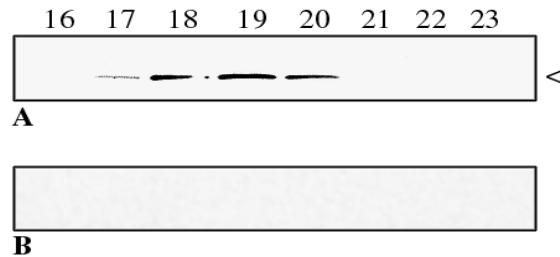


Abb. 51: Lateral heterogene Verteilung von TLP40 (Pfeilkopf) in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten. "Western"-Analyse der Proteinfractionen partiell solubilisierter Stroma- (A) und Granalamellen (B) mit dem polyklonalen Antikörper gegen TLP40 (1 : 1000). Die Fraktionierung des kontinuierlichen Saccharosegradientens nach Eshaghi et al. (1999) erfolgte von links nach rechts. Die Proteinfractionen wurden in 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen immobilisiert. Der Ausschnitt zeigt die Fraktionen 16 bis 23. Die Lokalisation des Cytochrom *b/f*-Komplexes in den Fraktionen 18 bis 20 wurde in einem parallelen Ansatz ermittelt.

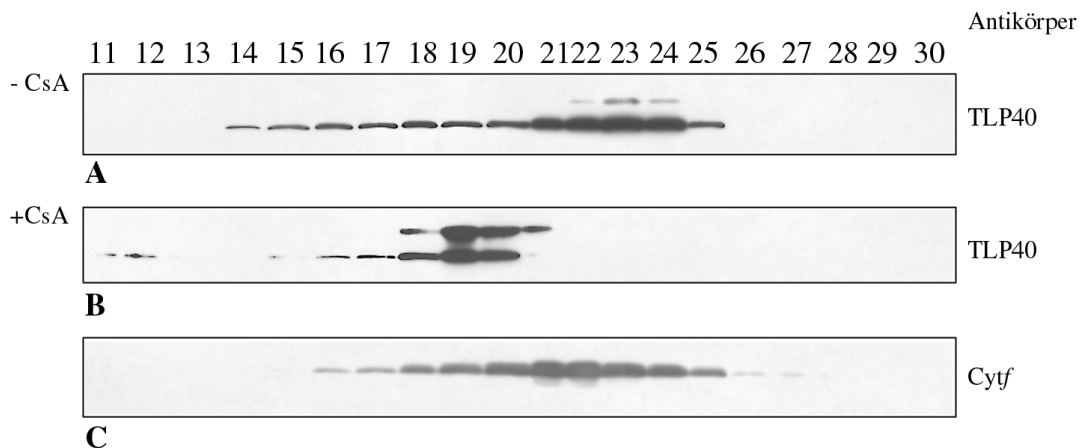


Abb. 52: Einfluß von Cyclosporin A (CsA) auf die Assoziation von TLP40 mit der photosynthetischen Membran. Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wurden in Abwesenheit (A bzw. C) und Gegenwart (B) von 0,4 mM CsA wie unter Abb. 9 beschrieben partiell solubilisiert und die Proteinkomplexe in kontinuierlichen Saccharosegradienten nach Eshaghi et al. (1999) aufgetrennt. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgte von links nach rechts. Die Proteinfractionen wurden nach ihrer Auftrennung in 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen immobilisiert. Für die "Western"-Analyse wurde der polyklonale Antikörper gegen TLP40 (1 : 1000, A und B) oder gegen Cytochrom *f* (1 : 3000, C) verwendet. Der Ausschnitt zeigt die Fraktionen 11 bis 30.

Der Anteil an membranassoziiertem TLP40 kann *in vitro* durch stabilisierende Faktoren, wie Glycinbetain (S. Eshaghi, persönliche Mitteilung), oder destabilisierende Faktoren, wie Hitzeeinwirkung (Rokka et al., 2000), verändert werden. Die partielle Solubilisierung der Thylakoidmembranen in Abwesenheit (Abb. 52 A) und Gegenwart submillimolarer Cyclosporin A-Konzentrationen (Abb. 52 B) verdeutlichte den Einfluß des Immunsuppressors auf die Assoziation von TLP40 mit der photosynthetischen Membran (Abb. 52 A, Spuren 20 bis 25) bzw. Abb. 52 B, Spuren 18 bis 20). In Anwesenheit von Cyclosporin A konnte TLP40 auch in den Proteinfractionen des kontinuierlichen Saccharosegradientens nachgewiesen werden, die nicht mit Proteinkomplexen assoziierte ("freie") Polypeptide und Pigmente enthalten (Abb. 52 B, Spuren 11 und 12). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Anwesenheit des Immunsuppressors die Interaktion von TLP40 mit der photosynthetischen Membran beeinflusst, und läßt vermuten, daß die Rotamaseaktivität von TLP40 dabei eine wichtige Rolle spielt.

3.3.3 Untersuchung der reversiblen Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran

Die Arbeiten von Vener et al. (1999) und Rokka et al. (2000) haben gezeigt, daß die Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine beeinflusst. Die Identifizierung derjenigen Domänen von TLP40, welche für seine reversible Assoziation verantwortlich sind, sollte zum Verständnis des zugrundeliegenden Regulationsmechanismus beitragen. Mit Hilfe von *in vitro*-Bindestudien sollte weiterhin geklärt werden, ob es sich dabei um Protein-Lipid- oder Protein-Protein-Interaktionen handelt.

3.3.3.1 Herstellung rekombinanter Domänen- und Punktmutanten zur Identifizierung essentieller Interaktionsbereiche von TLP40

Zur Identifizierung der Domänen von TLP40, über die seine Assoziation mit der photosynthetischen Membran vermittelt wird, wurden rekombinante Deletionsmutanten hergestellt (Abb. 53). Die Deletionen betrafen das N-terminale Leucin-"zipper"-Motiv, das sowohl partiell ($\Delta 2$) als auch vollständig entfernt wurde ($\Delta 3$), sowie die damit überlappenden, mutmaßlichen Phosphatasebindestellen. Weiterhin wurden die C-terminale Rotamasedomäne (Imm) sowie das potentielle Phosphatasebindemodul (PBS) in *E. coli* exprimiert. Die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen wurden durch PCR in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide aus der TLP40-cDNS amplifiziert und in geeignete Expressionsvektoren kloniert (Tabelle 4).

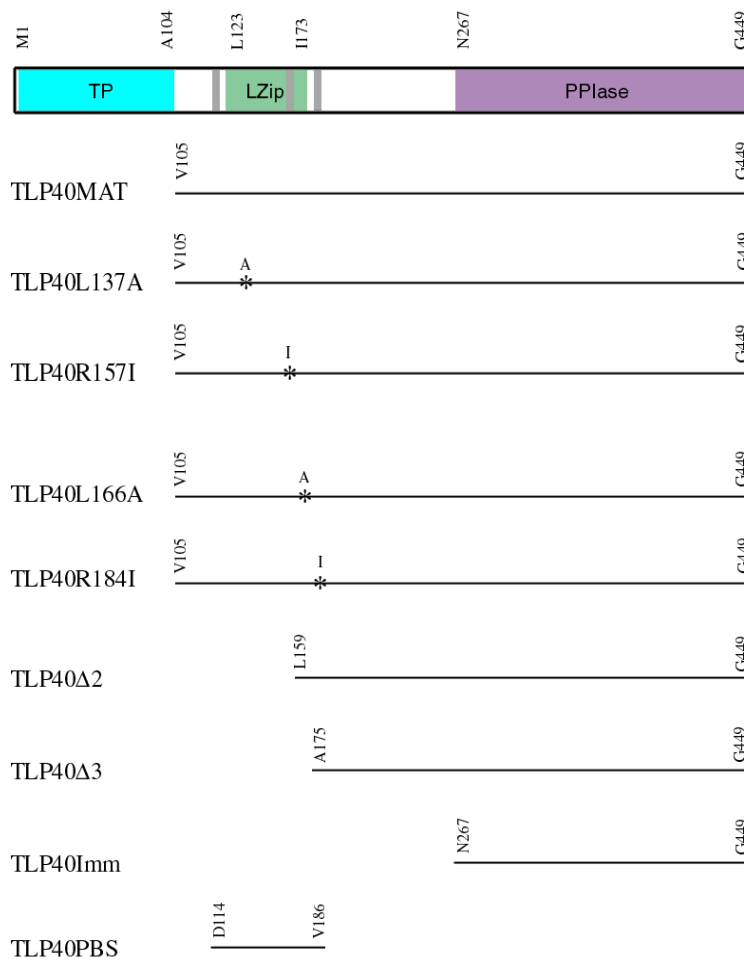


Abb. 53: Schematische Darstellung der deletierten bzw. punktmutierten Aminosäuresequenzen von TLP40 aus Spinat für die Identifizierung essentieller Membraninteraktionsbereiche. Die Sterne heben die Punktmutationen an den Positionen 137, 157, 166, bzw. 184 in der Aminosäuresequenz des reifen TLP40-Polypeptids hervor. Für weitere Einzelheiten, siehe Tabelle 4.

Die Einführung von Punktmutationen in das N-terminale Leucin-"zipper"-Motiv bzw. die potentielle Phosphatasebindedomäne sollte essentielle Aminosäurereste identifizieren (siehe auch Abschnitt 3.3.4.3). Die Aminosäurereste L137 und L166 des Leucin-"zipper"-Motivs wurden gegen Alanin ausgetauscht; die Reste R157 und R184 in der potentiellen Phosphatasebindedomäne wurden durch Isoleucin ersetzt (Abb. 53). Weiterhin wurde der Leucinrest an Position 394 gegen Tryptophan ausgetauscht. Dadurch sollte die Sensitivität des Immunophilins gegenüber Cyclosporin A erhöht werden (siehe dazu Abschnitt 3.3.4.3). Die Punktmutationen wurden in die Sequenz des reifen Proteins eingeführt, um einen störenden Einfluß des Transitpeptids auf die Expression der rekombinanten Polypeptide in *E. coli* zu vermeiden.

Tabelle 4: PCR-gestützte Herstellung rekombinanter Deletions- und Punktmutanten von TLP40 unter Verwendung verschiedener Expressionssysteme. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

Bezeichnung/ Expressionsvektor	amplifizierter Bereich (Molekulargewicht)	Oligonukleotide für die Amplifikation	Insertionsort
TLP40Δ2/pGEX-6-P1	L159 - Stop Leucin-"zipper" teilweise und erste beide Phosphatasebindestellen deletiert; GST-Fusion (58 kDa)	TLP40Δ2.BamHI + TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40Δ3/pGEX-6-P1	A175 - Stop Leucin-"zipper" vollständig und erste beide Phosphatasebindestellen deletiert; GST-Fusion (56 kDa)	TLP40Δ3.BamHI + TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40Imm/pRSET5a	N267 - Stop C-terminale Rotamasedomäne exprimiert (20 kDa)	TLP40Imm.fwd + TLP40mature.rev	NdeI/EcoRI
TLP40Imm/pGEX-6-P1	N267 - Stop nur C-terminale Rotamasedomäne exprimiert; GST-Fusion (46 kDa)	TLP40Imm.fwd + TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40PBS/pThioHisA	D114 - V186 nur Phosphatasebindestelle exprimiert; Thio- redoxin-Fusion (21 kDa)	PBSfwd.XhoI + PBS.rev	XhoI/EcoRI
TLP40PBS/pGEX-6-P1A	D114 - V186 Phosphatasebindestelle exprimiert; GST-Fusion (34 kDa)	PBSfwd.BamHI + PBS.rev	BamHI/EcoRI
TLP40L137A/pGEX-6-P1	V105 - Stop Punktmutation im Leucin-"zipper" des reifen Proteins; GST-Fusion (64 kDa)	1) L137A.fwd + TLP40mature.rev L137A.rev. + Mat5'BamHI 2) Mat5'BamHI+ TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40L166A/pGEX-6-P1	V105 - Stop Punktmutation im Leucin-"zipper" des reifen Proteins; GST-Fusion (64 kDa)	1) L166A.fwd + TLP40mature.rev L166A.rev. + Mat5'BamHI 2) Mat5'BamHI+ TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40R157I/pGEX-6-P1	V105 - Stop Punktmutation in zweiter Phosphatasebinde- stelle des reifen Proteins; GST-Fusion (64 kDa)	1) R157I.fwd + TLP40mature.rev R157I.rev. + Mat5'BamHI 2) Mat5'BamHI+ TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40R184I/pGEX-6-P1	V105 - Stop Punktmutation in dritter Phosphatasebinde- stelle des reifen Proteins; GST-Fusion (64 kDa)	1) R184I.fwd + TLP40mature.rev R184I.rev. + Mat5'BamHI 2) Mat5'BamHI+ TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
vorhandene Mutanten			
TLP40MAT/pRSET5a	V105 - Stop reifes Protein ohne Transitpeptid (38 kDa)	Mat5'BamHI + TLP40mature.rev	BamHI/EcoRI
TLP40Δ2/pRSET5a	L159 - Stop Leucin-"zipper" teilweise und erste beide Phosphatasebindestellen deletiert; C-terminaler "His-tag" (32 kDa)	TLR/MinPhosNde + TLR/Histag	NdeI/EcoRI
TLP40Δ3/pRSET5a	A175 - Stop Leucin-"zipper" und erste beide Phosphatase- bindestellen deletiert; C-terminaler "His-tag" (30 kDa)	TLR/MinLZIPNde + TLR/Histag	NdeI/EcoRI

3.3.3.2 Überexpression und Aufreinigung der mutierten Polypeptide

Mit den in Tabelle 4 (siehe Abschnitt 3.3.3.1) beschriebenen Plasmiden wurden *E. coli* BL21(DE3)pLysS (pRSET5a und pGEX-6-P1) bzw. Top10 (pThioHisA) transformiert, und die Proteinsynthese wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Mit Ausnahme des rekombinanten reifen Proteins (Abb. 54 A, Spur 3) akkumulierten die rekombinanten deletierten Polypeptide fast ausschließlich in der unlöslichen Proteinfraction (Abb. 54 B, Spuren 3, 7, 11, 15, 19, 23, 26, 27, 30, bzw. 34).

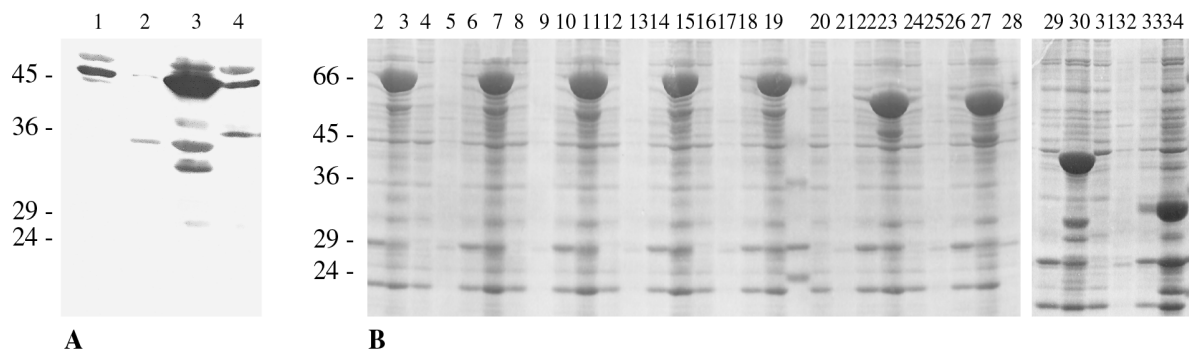


Abb. 54: Expression rekombinanter TLP40 Deletions- und Punktmutanten in *E. coli*. **(A)** Serologischer Nachweis des rekombinanten reifen Proteins (MAT) in den löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen vor (1 bzw. 2) und 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG (3 bzw. 4) mit dem polyklonalen Antikörper gegen TLP40 (1 : 1000). Die unter nativen Bedingungen aufgereinigten Proteinfractionen wurden nach ihrer Auftrennung in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosemembran immobilisiert. **(B)** Expression der Punktmutanten L137A (2 bis 3), L166A (4 bis 7), R157I (8 bis 11), R184I (12 bis 15) und L394W (16 bis 19) sowie der Deletionsmutanten $\Delta 2$ (20 bis 23), $\Delta 3$ (24 bis 27), Imm (28 bis 30) und PBS (31 bis 34). Die Polypeptidzusammensetzung der unter nativen Bedingungen aufgereinigten löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen vor (4 bzw. 5, 8 bzw. 9, 12 bzw. 13, 16 bzw. 17, 20 bzw. 21, 24 bzw. 25, 28, 31 bzw. 32) und 4 Stunden nach Zugabe von IPTG (2 bzw. 3, 6 bzw. 7, 10 bzw. 11, 14 bzw. 15, 18 bzw. 19, 22 bzw. 23, 26 bzw. 27, 29 bzw. 30, 33 bzw. 34) wurde nach ihrer Auftrennung in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. Die Numerierung der Spuren beginnt bei 2, da die lösliche Proteinfraction vor Induktion der Synthese des rekombinanten Polypeptids L137A nicht aufgetragen wurde. Die rekombinanten Punktmutanten und die beiden Deletionsmutanten Imm und PBS wurden im pGEX-System in Fusion mit der Glutathionsulfotransferase (26 kDa) exprimiert und weisen daher entsprechend höhere Molekulargewichte auf. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Rekombinante Polypeptide, die im pGEX-System exprimiert werden, können über ihre Glutathionsulfotransferase-Domäne (GST, 26 kDa) durch Affinitätschromatographie an Sepharose-4B aus der löslichen Proteinfraction aufgereinigt werden (siehe Abschnitt 2.2.5.12.3.2). Dieses Aufreinigungsverfahren ist sehr kostenintensiv und erfordert eine ausreichende Menge an rekombinantem Protein in der löslichen Proteinfraction. Denaturierende Agentien, wie z.B. Harnstoff, stören die Bindung der GST-Domäne an die Sepharose-Matrix. Bislang wurde nur die rekombinante Punktmutante L394W auf diese Weise aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.3.4.3). Die im pRSET-System exprimierten, rekombinanten Deletionsmutanten wurden aus der unlöslichen Proteinfraction, wie in Abschnitt 2.2.5.12.3.1 beschrieben, gewonnen. Im Falle des rekombinanten reifen Proteins wurde auf eine Aufreinigung ganz

verzichtet, da das rekombinante Polypeptid mehr als 70% der löslichen Proteinfraction ausmachte (Abb. 54 A, Spur 3).

3.3.3.3 Etablierung eines wässrigen Zwei-Phasen-Polymersystems zur Durchführung von *in vitro*-Bindestudien

Die reversible Interaktion von TLP40 mit der Thylakoidmembran wurde mit dem Zwei-Phasen-Polymersystem nach Andersson (1986) weitergehend untersucht. Für die Durchführung von *in vitro*-Bindestudien wurden Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten nach der in Abschnitt 2.2.5.6 beschriebenen Methode subfraktioniert und die Vesikelpopulationen "right side-out" bzw. "inside-out" aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in wässrigen Zwei-Phasen-Polymersystemen voneinander getrennt. Da TLP40 im Thylakoidlumen lokalisiert ist und mit der Innenseite der photosynthetischen Membran interagieren soll, wurden für die nachfolgenden *in vitro*-Bindestudien "inside-out"-Vesikel verwendet. Bei diesen Vesikeln war die Innenseite der Thylakoidmembran nach außen gekehrt, und potentielle Bindestellen waren dem exogen zugegebenen Immunophilin zugänglich. Das "Lumen" der Membranpartikel besaß nicht mehr seine ursprüngliche Zusammensetzung und enthielt nur geringe Mengen an endogenem TLP40, die unterhalb der serologischen Nachweisgrenze lagen (Abb. 55, Spuren 1 und 2). Das war eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der Interaktionsstudien, bei denen mögliche Bindestellen für das von außen zugegebene TLP40 frei zugänglich sein mußten. Das durch Anionen-Austauschchromatographie aus dem Thylakoidlumen von Spinatchloroplasten aufgereinigte, reife TLP40 wurde freundlicherweise von S. Eshaghi zur Verfügung gestellt.

Für die *in vitro*-Bindestudien wurde die Polymerkonzentration des Zwei-Phasen-Systems so gewählt, daß - getrennt betrachtet - die Membranvesikel ausschließlich in der unteren Dextranphase akkumulierten, während das exogen zugegebene TLP40 homogen auf Dextran- und PEG-Phase verteilt war (Abb. 55, Spuren 3 und 4). Die "inside-out"-Vesikel und TLP40 wurden anschließend in einem Zwei-Phasen-System miteinander gemischt und sowohl aus der unteren Dextran- und oberen PEG-Phase als auch der Interphase Proben entnommen. Die Proteinfractionen wurden nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran immobilisiert. Der Anteil an TLP40 in den verschiedenen Polymerphasen wurde mit dem polyklonalen Antikörper gegen das rekombinante TLP40-Polypeptid ermittelt (Fulgosi, 1999).

Die Anwesenheit der Membranvesikel schien die homogene Verteilung von TLP40 im Zwei-Phasen-System zu beeinflussen (Abb. 55, Spuren 3 und 4). In Gegenwart der "inside-out"-Vesikel war der Anteil an TLP40 in der oberen PEG-Phase (Abb. 55, Spur 5) gegenüber der unteren Dextran-Phase (Abb. 55, Spur 6) reduziert, was auf eine Interaktion von TLP40 mit den Membranvesikeln hindeutete. Die im Vergleich zu den Spuren 3 und 4 in der Abbildung 55 geringere Intensität der Signale in den Spuren 5 und 6 ist darauf zurückzuführen, daß ein

erheblicher Anteil des exogen zugegebenen Proteins in der Interphase akkumulierte (nicht gezeigt). Das ließ vermuten, daß mit der gewählten Polymerkonzentration von 5,4% bei einer kritischen Temperatur von 3°C noch nicht die optimalen Bedingungen für diese Art der Bindestudie eingestellt worden waren.

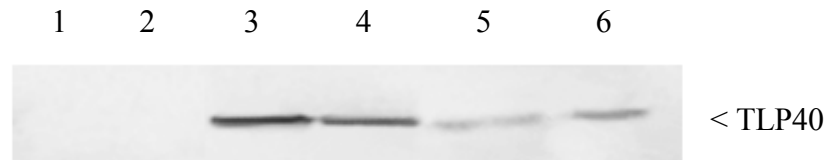


Abb. 55: *In vitro*-Bindestudie zum Nachweis der reversiblen Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran. "Western"-Analyse der oberen PEG- (1, 3, bzw. 5) und unteren Dextranphase (2, 4, bzw. 6) von Zwei-Phasen-Polymersystemen nach Andersson (1986) mit dem polyklonalen Antikörper gegen TLP40 (1 : 1000). Die "inside-out"-Membranvesikel akkumulierten bei einer Polymerkonzentration von 5,4% in der unteren Dextranphase und waren weitgehend frei von endogenem TLP40 (1 und 2). Unter den gleichen Bedingungen war das aus dem Thylakoidlumen von Spinatchloroplasten aufgereinigte, exogen zugegebene TLP40 nahezu homogen auf beide Phasen verteilt (3 und 4). Der Einfluß der Membranvesikel auf die Verteilung von TLP40 wurde nach ihrer Mischung in einem einzigen Zwei-Phasen-Polymersystem untersucht (5 und 6). Für den serologischen Nachweis von TLP40 wurden Proteinfraktionen aus der oberen PEG- und der unteren Dextranphase nach der Auftrennung in einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosemembran immobilisiert.

Zur Identifizierung an der Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran beteiligter Domänen wurden die Bindestudien mit der rekombinanten Leucin-"zipper"-Deletionsmutante ($\Delta 3$) bzw. der Rotamasedomäne (Imm) durchgeführt. In beiden Fällen wurde die unlösliche Proteinfraktion vier Stunden nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG verwendet. Eine Interaktion der rekombinanten Polypeptide mit den Membranvesikeln in der unteren Dextranphase konnte jedoch nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Eine Ursache hierfür war die Anwesenheit *E. coli*-spezifischer Polypeptide in den verwendeten Proteinfraktionen, die die serologische Analyse der Bindestudien durch unspezifische Kreuzreaktionen erheblich erschwerten. Inwieweit die fehlende Interaktion der rekombinanten Proteine auf die Deletion für die Interaktion mit der Vesikelmembran essentieller Bereiche zurückzuführen ist, konnte mit diesem Ansatz leider nicht geklärt werden. Die Durchführung der Bindestudien mit dem rekombinanten reifen Protein, das durch Affinitätschromatographie seiner GST-Domäne an Sepharose 4 B aus der löslichen Proteinfraktion aufgereinigt werden konnte, reduzierte zwar das Ausmaß unspezifischer Kreuzreaktionen des TLP40-Antikörpers mit *E. coli*-Proteinen, konnte aber keinen genaueren Einblick in den der Interaktion zugrundeliegenden Mechanismus geben. Möglicherweise war dafür der Verlust der Rotamaseaktivität des rekombinanten reifen Proteins im Zuge seiner Aufreinigung verantwortlich (S. Eshaghi, persönliche Mitteilung). Bislang ist allerdings offen, ob die Rotamaseaktivität von TLP40 eine notwendige Voraussetzung für seine Assoziation mit der Innenseite der Thylakoidmembran ist.

3.3.4 Einfluß von TLP40 auf die Aktivität einer membranintegralen Proteinphosphatase

Die reversible Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran scheint die katalytische Aktivität einer membranintegralen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A zu regulieren (Vener et al., 1999; siehe auch Abschnitt 3.3.3). Derzeit ist unklar, ob es zu einer direkten Interaktion zwischen TLP40 und lumenal exponierten Aminosäureresten der membranintegralen Proteinphosphatase kommt oder die temporäre Assoziation von TLP40 mit der Lipidphase der Thylakoidmembran und/oder dem Cytochrom *b/f*-Komplex eine regulatorische Funktion übernimmt. Um Aufschluß darüber zu erhalten, mußte zunächst die subthylakoidale Lokalisation der membranintegralen Proteinphosphatase ermittelt werden. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen "freiem" und membrangebundenem TLP40 die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine beeinflusst.

3.3.4.1 Subthylakoidale Lokalisation einer membranintegralen Proteinphosphatase vom Typ 2A

Bei der von Vener et al. (1999) aufgereinigten, thylakoidalen Phosphataseaktivität handelt es sich um einen sehr minoren Bestandteil der photosynthetischen Membran von Spinatchloroplasten. Der serologische Nachweis des pflanzlichen Proteins mit einem polyklonalen Antikörper gegen die katalytische Untereinheit (36 kDa) der menschlichen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A erforderte eine starke Anreicherung des Proteins. Aus diesem Grund wurden die Proteinfraktionen für die Ermittlung der subthylakoidalen Lokalisation (siehe Abschnitt 3.1.2.3) vor ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE in Centricon-Einheiten konzentriert. Auf diese Weise wurde ein Polypeptid von ~39 kDa in den partiell solubilisierten Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten nachgewiesen (Abb. 56, Spuren 17 und 18). Da sich in diesem Bereich des kontinuierlichen Saccharosegradientens nach Müller und Eichacker (1999) die Polypeptiduntereinheiten des PSI, des PSII, der ATP-Synthase sowie des Cytochrom *b/f*-Komplexes überschneiden, war keine eindeutige Zuordnung dieser Komponente zu einem der genannten Proteinkomplexe möglich. Obwohl die Veränderung der Saccharosegradientenkonzentration die Auftrennung der thylakoidalen Proteinkomplexe in diesem Bereich verbesserte, verhinderte die geringe Spezifität des heterologen Antikörpers eine genauere subthylakoidale Lokalisation des oben beschriebenen 39 kDa-Polypeptids. Das zeigt, wie wichtig die Isolierung der kodierenden Nukleinsäuresequenz der thylakoidalen Proteinphosphatase für die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen das pflanzliche Protein ist.

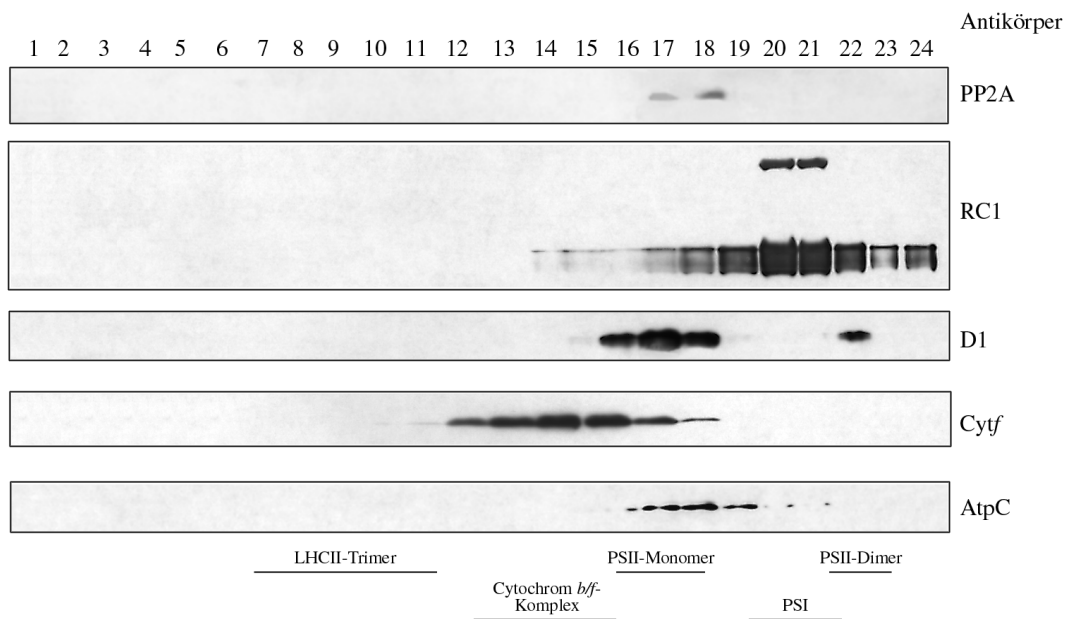


Abb. 56: Subthylakoidale Lokalisation einer mutmaßlichen membranintegralen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A. Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wurden wie unter Abb. 9 beschrieben partiell solubilisiert und die Proteinkomplexe in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten nach Müller und Eichacker (1999) aufgetrennt. Die Fraktionierung des Gradientens erfolgte von links nach rechts. Die Polypeptidzusammensetzung der Gradientenfraktionen wurde nach ihrer Auftrennung in einem 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgel und nachfolgender Immobilisierung auf Nitrozellulosemembran durch "Western"-Analyse mit verschiedenen Antisera untersucht. Für den Nachweis der thylakoidalen Proteinphosphatase wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die katalytische Untereinheit der menschlichen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A verwendet (PP2A; Calbiochem, 1 : 1000). Die Position der Proteinkomplexe PSI, PSII, Cytochrom *b/f* und der ATP-Synthase wurden mit polyklonalen Antisera gegen das PSI-Reaktionszentrum (RC1, 1 : 1000), das D1-Polypeptid (1 : 1000), gegen Cytochrom *f* (1 : 3000) bzw. die Gamma-Untereinheit der ATP-Synthase (AtpC, 1 : 5000) ermittelt. Die trimeren LHCII-Komplexe wurde in einem parallelen Ansatz lokalisiert. Ihre Position ist hier nur schematisch dargestellt.

3.3.4.2 Einfluß von Cyclosporin A und Peptiden mit Peptidyl-prolylbindungen auf die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine

Menschliches Cyclophilin A bildet stöchiometrische Komplexe mit dem Immunsuppressor Cyclosporin A (CsA) aus. Die Bindung des Cyclophilin A/CsA-Komplexes an eine Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2 B (Calcineurin) führt zu ihrer Inhibition (Liu et al., 1992; Cardenas et al., 1994). Im Hinblick auf das komplexe Immunophilin TLP40 im Thylakoidlumen von Spinatchloroplasten wurde eine drastische Steigerung der Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine in Gegenwart submillimolarer CsA-Konzentrationen festgestellt (Vener et al., 1999). Eine erhöhte Konzentration an Peptidsubstraten mit Peptidyl-prolyl (Xaa-Pro)-Bindungen im Thylakoidlumen schien sich dagegen inhibitorisch auf die Dephosphorylierungsrate auszuwirken. Der Einfluß der genannten Substanzen auf die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine war bislang nur in Gegenwart von n-Dodecyl- β -D-maltosid zu beobachten. Das nichtionische Detergenz macht die Thylakoidmembranen für die exogen zugegebenen Effektoren durchlässig und erhöht zugleich

die Löslichkeit von CsA in Wasser. Das ist im Zusammenhang mit der geringen Empfindlichkeit von TLP40 gegenüber CsA-Konzentrationen bis zu 10 μM von Bedeutung. Diese Konzentration entspricht der Grenze der Löslichkeit von CsA in Wasser, die jedoch in Gegenwart von 5 mM n-Dodecyl- β -D-maltosid maximal 0,4 mM erreichen kann (Vener et al., 1999).

Um Auskunft über den Regulationsmechanismus zu erhalten, der die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine moduliert, wurden Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ durch die Aktivität endogener Proteinkinasen wie in Abschnitt 2.2.5.10.1 beschrieben phosphoryliert (Abb. 57, Spuren 1 und 2). Nach der Abtrennung nicht eingebauter Radionukleotide wurde die Dephosphorylierung der thylakoidalen Phosphoproteine durch endogene Proteinphosphatasen in Gegenwart und Abwesenheit von CsA bzw. des synthetischen Peptids N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-Nitroanilid (Sigma-Aldrich GmbH) untersucht.

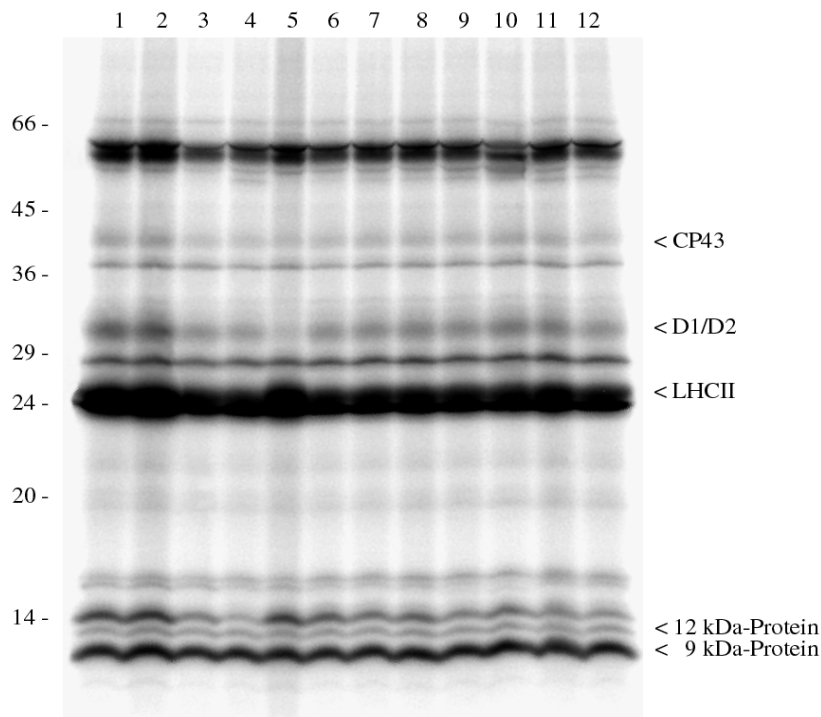


Abb. 57: Einfluß von Cyclosporin A (CsA) und Peptidsubstraten mit Peptidyl-prolyl (Xaa-Pro)-Bindungen auf die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine. Autoradiogramm eines 10 - 17%igen SDS-Polyacrylamidgels. Thylakoidmembranen (entsprechend 1,5 mg Chlorophyll) wurden in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 20 (1) bzw. 30 Minuten (2) *in vitro* phosphoryliert und anschließend ohne (3) oder mit 5 mM n-Dodecyl- β -D-maltosid (DM; 4) weitere 45 Minuten inkubiert. Der Einfluß eines synthetischen Peptidsubstrats mit Xaa-Pro-Bindungen (5) oder von 0,4 mM CsA (6) sowie der rekombinanten TLP40-Deletionsmutanten MAT, PBS, bzw. Imm vor (7, 9, bzw. 11) und nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG (8, 10, bzw. 12) auf die Dephosphorylierungsrate wurde in Gegenwart von 5 mM DM untersucht. Die Positionen der Phosphopolypeptide des PSII und des LHCII sind markiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

In Abwesenheit der genannten Effektoren wurden insbesondere die Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums (D1, D2, CP43) rasch dephosphoryliert (Abb. 57, Spur 3). Das nichtionische Detergenz n-Dodecyl- β -D-maltosid hatte keinen Einfluß auf die Dephosphorylierungsrate (Abb. 57, Spur 4). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Vener et al. (1999) führte die Zugabe eines synthetischen Peptidsubstrats zu einer verminderten Dephosphorylierung der Polypeptide des LHCII-Komplexes (Abb. 55, Spur 5). Die von Vener et al. (1999) beobachtete drastische Beschleunigung der Dephosphorylierungsrate in Gegenwart submillimolarer CsA-Konzentrationen, konnte dagegen nicht bestätigt werden (Abb. 55, Spur 6). Der stimulierende Effekt wurde auf die Ausbildung von TLP40/CsA-Komplexen zurückgeführt, die die Assoziation des Immunophilins mit der Innenseite der Thylakoidmembran unterbinden soll. Die reversible Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der photosynthetischen Membran soll ihrerseits die Aktivität der thylakoidalen Proteinphosphatase auf der Stromaseite modulieren. Eine mögliche Ursache für die fehlende Steigerung der Dephosphorylierungsrate in der vorliegenden Arbeit könnte die geringe Löslichkeit von CsA in Wasser sein. Entgegen den Angaben von Vener et al. (1999) konnte die kritische Konzentration von 0,4 mM selbst in Anwesenheit von 5 mM n-Dodecyl- β -D-maltosid nicht eingestellt werden.

Die Anwesenheit der exogen zugegebenen rekombinanten Deletionsmutanten von TLP40 hatte keinen Einfluß auf die Dephosphorylierungsreaktion. Weder die Anwesenheit des rekombinanten reifen TLP40-Polypeptids (Abb. 57, Spur 8) noch des potentiellen Phosphatasebindemoduls (Abb. 57, Spur 10) bzw. der Rotamasedomäne (Abb. 57, Spur 12) in Gegenwart von n-Dodecyl- β -D-maltosid wirkte sich auf die Dephosphorylierungsrate der thylakoidalen Phosphoproteine aus. Möglicherweise haben die rekombinanten Polypeptide ihren Wirkungsort im Thylakoidlumen trotz der Zugabe des Detergenz nicht erreicht oder konkurrierten mit endogenem TLP40 um die Interaktion mit der photosynthetischen Membran.

3.3.4.3 Einführung einer Punktmutation zur Erhöhung der Sensitivität von TLP40 gegenüber Cyclosporin A

Die Bindung von Cyclosporin A (CsA) an Cyclophiline hemmt ihre Isomeraseaktivität reversibel (Schreiber, 1991). Wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 3.3.4.2), ist TLP40 im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Cyclophilinen gegenüber nanomolaren CsA-Konzentrationen *in vitro* insensitiv. Eine solche Unempfindlichkeit ist von prokaryotischen Cyclophilinen bekannt und wird auf das Fehlen eines Tryptophanrestes zurückgeführt, der in den meisten eukaryotischen Cyclophilinen konserviert ist (Liu et al., 1991b). Dieser Tryptophanrest fehlt in der Aminosäuresequenz von TLP40 ebenfalls. Da der Austausch von Phenylalanin 121 gegen Tryptophan die Sensitivität des *E. coli*-Cyclophilins gegenüber CsA deutlich erhöht, wurde analog dazu der äquivalente Aminosäurerest Leucin an Position 394 in der Aminosäuresequenz von TLP40 gegen Tryptophan ausgetauscht. Die Punktmutation wurde in die Sequenz des reifen Proteins in zwei aufeinanderfolgenden Polymerasekettenreaktionen eingeführt. Die

Primärprodukte des ersten Amplifikationsschrittes dienten in der nachfolgenden PCR als Matrize für die Amplifikation der mutierten Nukleinsäuresequenz für das reife Polypeptid (siehe Tabelle 4). Der Nukleinsäureaustausch wurde durch Sequenzierung überprüft und die mutierte DNS-Sequenz nach ihrer Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI in die entsprechenden Schnittstellen des Expressionsvektors pGEX-6-P1 kloniert. Mit diesem Plasmid wurde anschließend *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformiert. Vier Stunden nach der Induktion der Proteinsynthese mit IPTG fand sich das rekombinante Polypeptid (L394W) zu ~30% in der löslichen Proteinfraction (Abb. 58 A, Spur 3, Pfeilkopf). Aus dieser wurde es über seine GST-Domäne durch Affinitätschromatographie an Sepharose-4B wie in Abschnitt 2.2.5.12.3.2 beschrieben aufgereinigt (Abb. 58 B, Spuren 9 und 10).

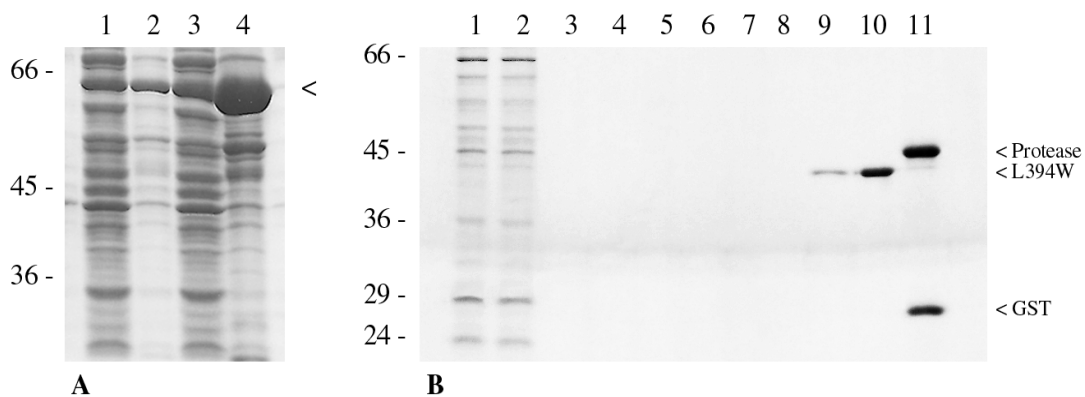


Abb. 58: Expression und Aufreinigung der rekombinanten TLP40-Punktmutante L394W durch Affinitätschromatographie an Sepharose-4B. (A) Polypeptidzusammensetzung der löslichen bzw. unlöslichen Proteinfractionen vor (1 bzw. 2) und 4 Stunden nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG (3 bzw. 4) nach ihrer Auftrennung in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel und Färbung mit Coomassie R-250. Der Pfeilkopf markiert die rekombinante Punktmutante. (B) Aufreinigung des rekombinanten Polypeptids durch Bindung seiner GST-Domäne an Sepharose-4B. Nicht an die Säulenmatrix gebundene Proteine wurde in mehreren Waschschritten (1 bis 8) entfernt. Die Abspaltung des rekombinanten Polypeptids von der an die Säule gebundenen GST-Domäne erfolgte über Nacht bei 4°C (9 und 10). Das Säulenmaterial wurde nach der Elution der GST-Domäne und der "PreScission"-Protease (11) regeneriert, und die Polypeptidzusammensetzung der Proteinfractionen wurde nach ihrer Auftrennung in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Färbung mit Coomassie R-250 analysiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Da das aufgereinigte, rekombinante Protein in mehreren parallelen Ansätzen keine Rotamaseaktivität besaß (S. Eshaghi, persönliche Mitteilung), konnte nicht geklärt werden, welchen Einfluß die eingeführte Punktmutation auf die Sensitivität von TLP40 gegenüber CsA hat. Möglicherweise ist das rekombinante Polypeptid (a) in *E. coli* nicht rotamaseaktiv gefaltet worden oder (b) seine Aktivität ist im Verlauf der Aufreinigung verloren gegangen bzw. erfordert (c) die Anwesenheit spezifischer Effektormoleküle, die nur im Thylakoidlumen vorkommen.

3.3.5 Herstellung von T-DNS-Konstruktionen für die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts für TLP40 in *A. thaliana* L.

Für die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts in *A. thaliana* L. wurden die 5'-terminalen 393 bp der kodierenden Sequenz des *Arabidopsis*-Homologs (AC009325.6) durch PCR in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide aus der pGAD-cDNS-Bibliothek von *A. thaliana* L. amplifiziert (siehe Abschnitt 2.2.4.1). Die cDNS-Sequenz wurden mit *SacI* und *XbaI* verdaut und in Antisens- bzw. Sens-Orientierung in die entsprechenden Schnittstellen des binären Vektors pGPTV-bar 35S-nos kloniert. Die Transformation kompetenter Agrobakterien, die Infiltration von *A. thaliana* L., Ökotyp Columbia (Col-0), und die Selektion herbizidresistenter Pflanzen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.9 beschrieben. Pro T-DNS-Konstruktion wurden 12 *Arabidopsis*-Pflanzen infiltriert. Daraus resultierten insgesamt 10 transgene Antisens- und 7 Sens-Pflanzen der T1-Generation. Von jeder resistenten T1-Pflanze wurden 100 bis 200 Samen auf Selektionsmedium ausgelegt. Der Anteil an "BASTA"-unempfindlichen Keimlingen der T2-Generation betrug, unabhängig von der Orientierung der T-DNS-Konstruktionen, 20 bis 60%. Unter moderaten Wachstumsbedingungen zeigten weder transgene Pflanzen der T1- noch der T2-Generation einen auffälligen Phänotyp.

Für die "Southern-Analyse" wurde gesamtgenomische DNS wie bereits unter Abschnitt 3.2.10 beschrieben aus den Blättern herbizidresistenter T2-Pflanzen isoliert, und die T-DNS-Insertionen wurden zunächst durch PCR in Gegenwart der Vektor-spezifischen Oligonukleotide 35S und nos (siehe Abschnitt 2.1.7) nachgewiesen. Die genomische DNS von 6 verschiedenen T2-Pflanzen eines Infiltrationsereignisses wurde vereinigt, mit *EcoRI* geschnitten, und die Restriktionsfragmente wurden nach ihrer Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel auf Nylonmembran immobilisiert. Zum Nachweis der T-DNS-Insertionen im Genom der transgenen T2-Pflanzen wurden die entsprechenden cDNS-Sequenzen durch PCR mit den genannten Vektor-spezifischen Oligonukleotiden aus den Plasmiden TLP40S+X/pGPTV (Antisens-Orientierung) bzw. TLP40X+S/pGPTV (Sens-Orientierung) amplifiziert, wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben radioaktiv markiert und auf die Nylonmembran hybridisiert (Abb. 59). Der Nachweis eines hochmolekularen DNS-Fragments in Wildtyp-Pflanzen deutete auf ein einziges Gen für TLP40 im Genom von *A. thaliana* L. hin (Abb. 59 A, Spur 1). Die T-DNS-Konstruktionen waren sowohl im Genom der drei in Abbildung 59 A dargestellten Antisens- (Abb. 59 A, Spuren 2 bis 4) als auch der beiden Sens-Pflanzen der T2-Generation (Abb. 59 A, Spuren 5 und 6) an unterschiedlichen Stellen integriert worden. Da für die "Southern"-Analyse die genomische DNS aus den Blättern verschiedener T2-Pflanzen eines Infiltrationsexperimentes verwendet wurde, kann keine Aussage über eine mögliche Mehrfachintegration der T-DNS-Konstruktionen in das Genom einzelner T2-Pflanzen gemacht werden.

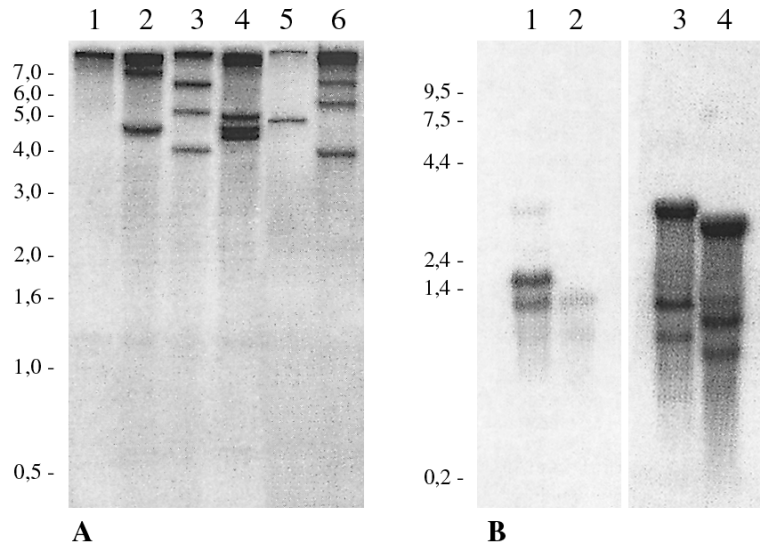


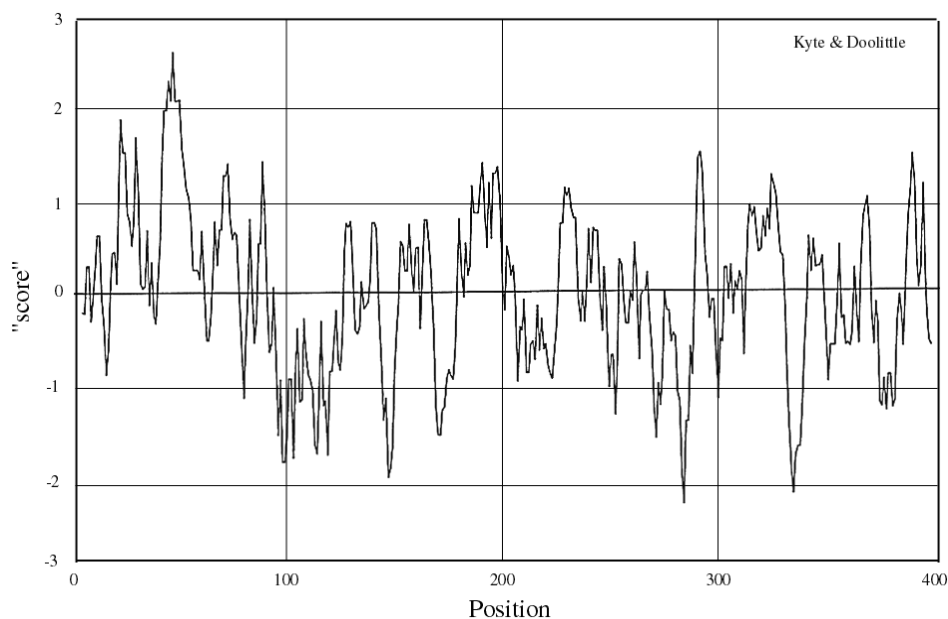
Abb. 59: Nachweis der T-DNS-Konstruktionen im Genom transgener *Arabidopsis*-Pflanzen und Auswirkung ihrer Expression auf den Gehalt an endogener TLP40-mRNS. (A) "Southern"-Analyse gesamtgenomischer DNS transgener Pflanzen der T2-Generation. Pro Spur wurden 2 μ g *Eco*RI-geschnittene, gesamtgenomische DNS aus Wildtyp (1) und transgenen Antisens- (2 bis 4) bzw. Sens-Pflanzen (5 und 6) mit der 32 P-markierten Antisens- (1 bis 4) bzw. Sens-cDNS-Sequenz hybridisiert (5 und 6). Autoradiogramm der unter stringenten Bedingungen gewaschenen Nylonmembran. Links: DNS-Längenstandard in Kilobasenpaaren. (B) "Northern"-Analyse von Gesamt-RNS aus transgenen T2-Pflanzen. Pro Spur wurden 7,5 μ g Gesamt-RNS aus Wildtyp- (1 und 3) und je einer Antisens- (2) bzw. Sens-Pflanze (4) unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und nach der Immobilisierung auf Nylonmembran mit der 32 P-markierten Sens- (1 und 2) bzw. Antisens-RNS-Sonde (3 und 4) hybridisiert. Autoradiogramm der unter stringenten Bedingungen gewaschenen Nylonmembran. Links: RNS-Längenstandard in Kilobasenpaaren

Die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts für TLP40 wurde mit der "Northern"-Analyse untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNS aus jeweils 20 Blättern verschiedener, herbizidresistenter T2-Pflanzen eines Infiltrationsereignisses isoliert, unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf Nylonmembran transferiert. Der Nachweis des Sens-Transkripts erfolgte mit der radioaktiv markierten Antisens-RNS. Die Repression der endogenen TLP40-mRNS durch das Antisens-Transkript wurde mit der radioaktiv markierten Sens-Sonde nachgewiesen. Zur Herstellung der RNS-Sonden wurden die entsprechenden cDNS-Sequenzen durch PCR in Gegenwart der sequenzspezifischen Oligonukleotidkombinationen M13.fwd und TLP40XbaI.rev (Antisens-Sonde) bzw. M13.rev und TLP40SacI.fwd (Sens-Sonde) aus dem Plasmid TLP40S+X/pBluescript II SK⁻ amplifiziert. Unter der Kontrolle des T7- bzw. T3-Promotors wurde anschließend der komplementäre RNS-Strang in Gegenwart von [α - 32 P]UTP synthetisiert (siehe Abschnitt 2.2.2.5). Ähnlich wie bei der "Northern"-Analyse transgener TTP30-Pflanzen (siehe Abschnitt 3.2.10) resultierte trotz stringenter Bedingungen ein komplexes Hybridisierungsmuster (Abb. 59 B). Die Wanderungsgeschwindigkeiten der in äquivalenten Konzentrationen aufgetragenen RNS-Proben in dem denaturierenden Agarosegel waren auch in diesem Fall unterschiedlich und führten zu einer Verschiebung der Spuren 2 und 4 in Abbildung 59 B. Eine Aussage über die Reduktion des

endogenen TLP40-mRNS-Spiegels durch das Antisens-Transkript ist nur unter Vorbehalt möglich (Abb. 59 B, Spur 2). Im Hinblick auf die Expression des Sens-Transkripts für TLP40 (Abb. 59 B, Spur 4) konnte kein deutlicher quantitativer Unterschied zum Wildtyp (Abb. 59 B, Spur 3) festgestellt werden.

3.3.6 Biochemische Charakterisierung der Rotamase mutante *Δsll0408* in *Synechocystis* sp. PCC6803

Die Aminosäuresequenz von TLP40 besitzt 40% Homologie zu der potentiellen Rotamase sll0408 aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Die Hydropathieanalyse der sll0408-Aminosäuresequenz weist auf ein überwiegend hydrophiles Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 44 kDa hin (Abb. 60). Im Gegensatz zu TLP40 enthält die cyanobakterielle Rotamase kein N-terminales Leucin-"zipper"-Motiv und nur eine potentielle Phosphatasebindestelle. Zur Aufklärung der funktionellen Rolle von TLP40 in Spinatchloroplasten wurde das *sll0408*-Gen durch Insertion einer Gentamycinkassette im Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 zerstört (siehe Abschnitt 2.1.12).



```

MGALKWENFAVAPYAGEQTTIIMMQIIKTPLGIITRRGLQLSLLSLLLTMLSLSLTWAMPGWSLPLNQPMLL    70
GALAQGNAITDPNAILRYALPIDNPEVRRQLQDSLEDISNHIRAKRWPAIKKDVRAANLTITLKEDKILAG    140
VPADRQPEAETLLGSIKTDLTALTEAVEAKDKEQVISFRKSALTAIGDLEALMVTDFPFAPPEEFANLPQ    210
LKGRATVEMTTNKGPLTIVVDGYSAPINAGNFVDLVORKFYDGLPFIRSEDFVFTOAGDPPGPEAGFIDP    280
OTKEYRAIPLEILVKGEGPIYGMTLEDAGMYLPELALPFNAYGAIALARPETEPNGGSSQFFFFKFDTE    350
LTPPGFNLMDGRYSVFGYVVDGKETLEQLSEGDKIVSAKVISGADNLVNGNS . . 402

```

Abb. 60: Hydropathieanalyse (nach Kyte und Doolittle, 1982) der Aminosäuresequenz der cyanobakteriellen Rotamase sll0408. Die potentielle Phosphatasebindestelle ist fettgedruckt. Die potentielle Rotamasedomäne ist unterstrichen. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

3.3.6.1 Phänotypische Merkmale von $\Delta sll0408$ unter Niedriglichtbedingungen

Die gentamycinresistente Mutante $\Delta sll0408$ zeigte bereits unter Standardbedingungen ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$, $24,5^\circ\text{C}$) einen auffälligen Phänotyp. Während die Wildtypkulturen schon nach etwa 7 Tagen alters- und nährstoffbedingt ausbleichen, zeichneten sich $\Delta sll0408$ -Kulturen durch eine blaugrüne Farbe aus, deren Intensität mit der Zeit weiter zunahm (Abb. 61).

Der Unterschied auf phänotypischer Ebene spiegelte sich in den Spektraleigenschaften der absorbierenden Pigmente wider. Das Extinktionsmaximum der Phycobiliproteine Phycocyanin und Allophycocyanin der Mutante lag von Beginn der Messung an höher als das des Chlorophyll *a* (Abb. 62 A) und nahm im Gegensatz zum Wildtyp mit dem Alter deutlich zu (Abb. 62 B, Pfeil). Die intensiv blaugrüne Farbe der Mutante und die Spektraleigenschaften ihrer Pigmente waren Hinweise auf einen möglichen Einfluß der Zerstörung des *sll0408*-Gens auf die Dynamik der Phycobilisomen. Diese Annahme wurde mit den folgenden biochemischen Untersuchungen überprüft.



Abb. 61: Phänotyp der Rotamasemutante $\Delta sll0408$. *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (WT) und $\Delta sll0408$ -Kulturen wurden 10 Tage bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ und einer Temperatur von $24,5^\circ\text{C}$ angezogen.

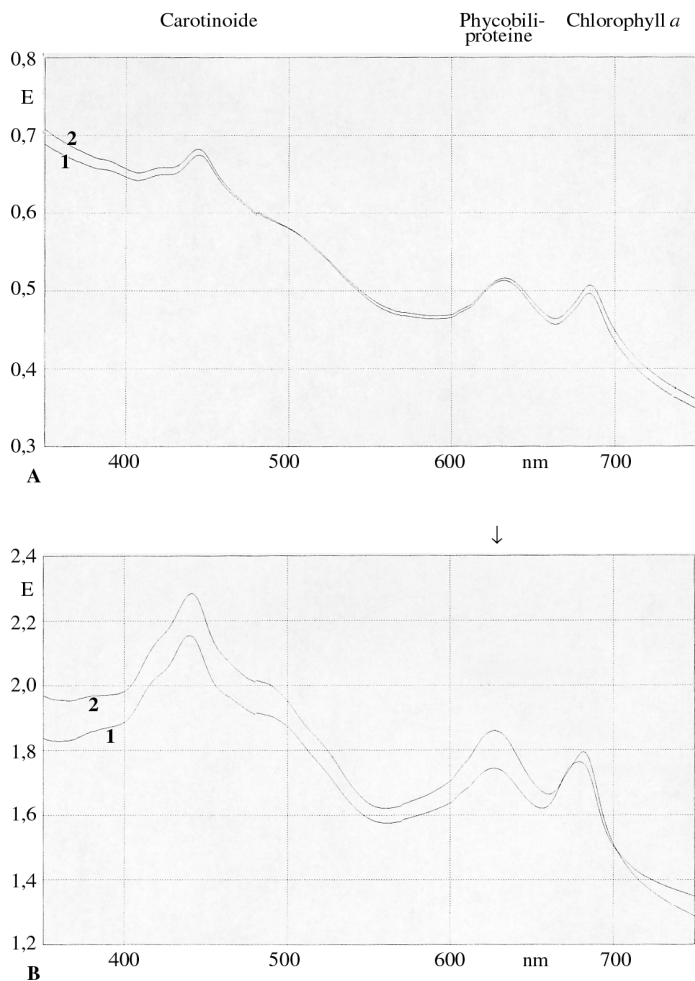


Abb. 62: Spektraleigenschaften der Pigmente aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1) und Δ slI0408-Kulturen (2) nach 4 (A) und 10 Tagen (B) bei einer Lichtintensität von $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$. Die Zelldichte der Kulturen wurde durch Messung der Extinktion bei 800 nm äquilibriert. Die Extinktionsmessung im Wellenlängenbereich von 350 bis 750 nm erfolgte anschließend in 2 nm-Schritten. Die Extinktionsmaxima der Carotinoide, der Phycobiliproteine und des Chlorophyll *a* sind markiert. Der Pfeil hebt die Unterschiede zwischen Wildtyp und Δ slI0408 im Hinblick auf die Extinktionsmaxima der Phycobiliproteine hervor.

3.3.6.2 Untersuchung der Degradation der Phycobilisomen unter Stickstoffmangelbedingungen

Die anhaltend blaugrüne Farbe während der Kultivierung der Rotamasemutante Δ slI0408 ließ eine Störung der Degradation der Phycobilisomen vermuten. Aus diesem Grund wurden Wildtyp- und Δ slI0408-Kulturen zunächst unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogen, sedimentiert und anschließend in stickstofffreiem Medium resuspendiert. Unabhängig von der gewählten Lichtintensität (50 bzw. $300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$) blichen beide Kulturen gleich stark aus (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Degradation der Phycobilisomen, die Cyanobakterien unter Mangelbedingungen als Stickstoffquelle dienen können, ging sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante mit dem "Verschwinden" des Extinktionsmaximums der Phycobiliproteine einher.

3.3.6.3 Analyse der Transkription der Phycobiliproteine Allophycocyanin und Phycocyanin

Eine Störung der Degradation der Phycobilisomen war nicht für den Phänotyp der Mutante verantwortlich (siehe vorangegangenen Abschnitt). Daher wurde untersucht, ob die Zerstörung des *sll0408*-Gens die Transkription der Phycobiliproteine Phycocyanin und Allophycocyanin beeinflusst. Wildtyp- und Δ *sll0408*-Kulturen wurden unter niedrigen ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$) bzw. hohen Lichtintensitäten ($300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$) angezogen und nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase sedimentiert. Aus den sedimentierten Zellen wurde Gesamt-RNS isoliert und daraus durch reverse Transkription in Gegenwart eines Hexanukleotidgemisches cDNS hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.3.5). Die cDNS diente in der nachfolgenden PCR als Matrize für die Amplifikation der Phycobiliproteine. Die α - bzw. β -Untereinheit des Phycocyanins wurde durch PCR in Gegenwart der sequenzspezifischen Oligonukleotide *cpcA.fwd* und *cpcA.rev* bzw. *cpcB.fwd* und *cpcB.rev* durch PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 2.1.7). Für die entsprechenden Untereinheiten des Allophycocyanins wurden die sequenzspezifischen Oligonukleotide *apcA.fwd* und *apcA.rev* bzw. *apcB.fwd* und *apcB.rev* verwendet. Wie Abbildung 63 exemplarisch zeigt, lag keine Störung der Transkription der Gene für die Untereinheiten der Phycobiliproteine vor. Sowohl unter niedrigen als auch hohen Lichtintensitäten konnten keine quantitativen Unterschiede zwischen Wildtyp- (Abb. 63, Spur 1, 2 und 5) und Δ *sll0408*-Kulturen (Abb. 63, Spur 2, 4 und 6) in Bezug auf die α -Untereinheit des Allophycocyanins festgestellt werden.

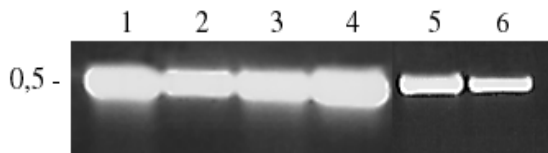


Abb. 63: Untersuchung der Transkription des *apcA*-Gens für die α -Untereinheit von Allophycocyanin in *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- und Δ *sll0408*-Kulturen. Gesamt-RNS wurde aus den unter verschiedenen Lichtintensitäten angezogenen Kulturen isoliert und durch reverse Transkription in Gegenwart eines Hexanukleotidgemisches in cDNS umgeschrieben. Die cDNS diente in der hier abgebildeten PCR als Matrize für die Amplifikation der α -Untereinheit des Allophycocyanins in Gegenwart sequenzspezifischer Oligonukleotide. Analysiert wurden Wildtyp- (1, 3, bzw. 5) bzw. Δ *sll0408*-Kulturen (2, 4, bzw. 6) nach 9 Tagen bei $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ (1 bzw. 2) und nach 2 (3 bzw. 4) und 5 Tagen (5 bzw. 6) bei $300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$. Links: DNS-Längenstandard in Kilobasenpaaren

3.3.6.4 Untersuchung des *in vivo*-Translationsmusters unter Niedriglichtbedingungen

Die Zerstörung des *sll0408*-Gens beeinflusste weder die Degradation der Phycobilisomen noch die Transkription der sie kodierenden Gene (siehe Abschnitte 3.3.6.2 und 3.3.6.3). Zur Überprüfung einer möglichen Störung auf translationaler Ebene wurden die *in vivo*-Translationsprodukte aus Wildtyp- und Δ *sll0408*-Zellen durch das "pulse/chase"-Verfahren

radioaktiv markiert (siehe Abschnitt 2.2.3.6). Dazu wurden die entsprechenden Kulturen bei gleicher Zelldichte unter Niedriglichtbedingungen ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$) in Gegenwart von ^{35}S -Methionin inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 2 ml Kultur entnommen, und die Translation wurde durch Zugabe von Chloramphenicol gestoppt. Die radioaktiv markierten Translationsprodukte wurden nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE mittels Autoradiographie analysiert (Abb. 64). Die Mutante $\Delta\text{sll0408}$ zeichnete sich zwar durch eine insgesamt etwas stärkere Translationsrate aus, im Hinblick auf die Polypeptiduntereinheiten der Phycobilisomen konnten aber keine auffälligen Unterschiede im Molekulargewichtsbereich von 14 bis 24 kDa festgestellt werden (Abb. 64 A, Spuren 1 bis 5 (WT), bzw. Abb. 64 A, Spuren 6 bis 10 ($\Delta\text{sll0408}$)). Das relativ stark markierte Polypeptid von 60 kDa (Abb. 64 A, Spuren 8 bis 10, Pfeilkopf) steht nicht mit dem Defekt des *sll0408*-Gens im Zusammenhang, da es auch in der Histidinkinase-Mutante $\Delta\text{slr0311}$ nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.3.3).

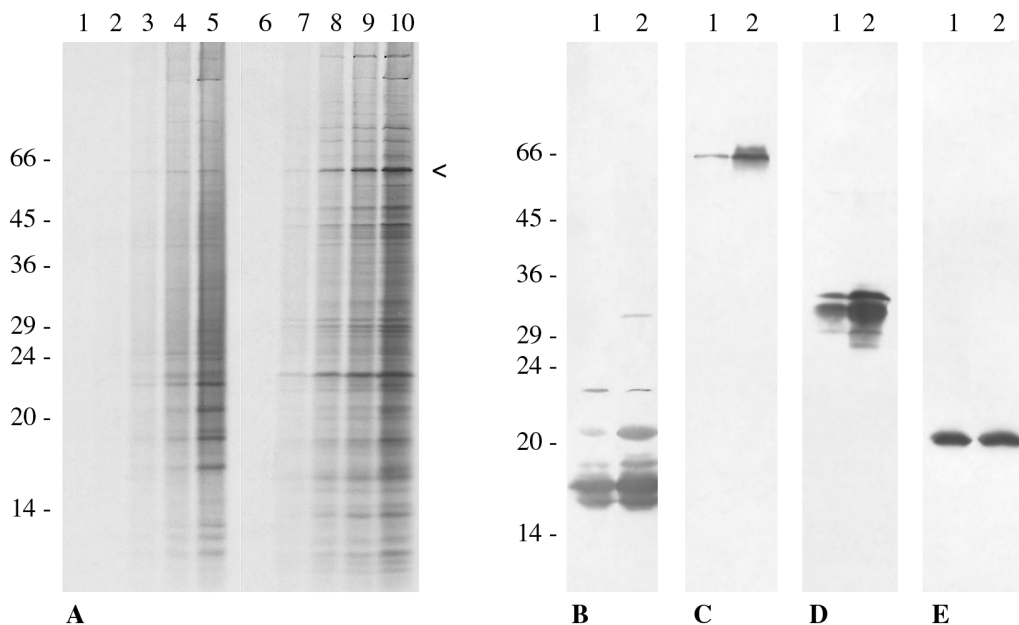


Abb. 64: (A) Autoradiogramm der *in vivo*-Translationsprodukte von *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1 bis 5) und $\Delta\text{sll0408}$ -Kulturen (6 bis 10). Die Kulturen wurden 3 Tage bei $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ angezogen und dann bei gleicher Zelldichte mit ^{35}S -Methionin inkubiert. Nach 0, 5, 15, 30 und 60 Minuten (1 bis 5 bzw. 6 bis 10) wurden jeweils 2 ml Kultur entnommen. Die *in vivo*-Translationsprodukte wurden nach dem Abstoppen der Translation mit Chloramphenicol in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Pfeilkopf hebt ein besonders stark markiertes Polypeptid von ~ 60 kDa hervor. (B bis E) "Western"-Analyse von Zellextrakten- (B) und Gesamtmembranen (C bis E) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1) und $\Delta\text{sll0408}$ -Kulturen (2) nach 5 Tagen bei $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$. Die Polypeptiduntereinheiten der Phycobilisomen wurden mit dem *Synechocystis*-spezifischen Antikörper Phyc5A (1 : 5000) nachgewiesen (B). Das Reaktionszentrum des PSI (C), das D1-Polypeptid des PSII (D) und das Rieske-Protein des Cytochrom *b/f*-Komplexes (E) wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen die homologen Proteine aus *S. oleracea* L. nachgewiesen (jeweils 1 : 1000). Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die Polypeptiduntereinheiten der Phycobilisomen waren in beiden Kulturen nahezu gleich stark exprimiert (Abb. 64 B, Spuren 1 (WT) bzw. 2 (Δ sll0408)). Das traf auch auf die Polypeptide des PSI-Reaktionszentrums (Abb. 64 C), das D1-Polypeptid des PSII (Abb. 64 D) sowie das Rieske-Protein des Cytochrom *b/f*-Komplexes (Abb. 64 E) zu.

3.3.6.5 Einfluß von Lichtstreß und niedrigen Umgebungstemperaturen auf den Phänotyp von Δ sll0408

Hohe Lichtintensitäten führten auch bei Δ sll0408 zum Ausbleichen, allerdings deutlich langsamer als beim Wildtyp. Wurde der Lichtstreß dagegen mit einer Erniedrigung der Umgebungstemperatur von 24,5°C auf 17°C kombiniert, blich die Mutante innerhalb von 12 Stunden vollständig aus (Abb. 65). Der Wildtyp wurde dagegen kaum in seinem Wachstum beeinflusst. Eine Temperaturerniedrigung unter Niedriglichtbedingungen hatte keinen Effekt auf den Phänotyp der Mutante.



Abb. 65: Einfluß von Licht- und Kältestreß auf den Phänotyp von *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (WT) und Δ sll0408-Kulturen (Δ sll0408). Die Kulturen wurden 4 Tage bei $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ und 24,5°C (NL) oder 2 Tage bei $300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ und 17°C (HL) angezogen.

Die Auswirkung von Licht- und Kältestreß auf das Wachstum der Mutante spiegelte sich besonders in dem Polypeptidmuster von Gesamtmembranen und Phycobilisomenfraktionen wider. Während das Polypeptidmuster von Wildtyp- (Abb. 66, Spuren 1 und 2) und Δ sll0408-Kulturen (Abb. 66, Spuren 5 und 6) unter moderaten Anzuchtbedingungen ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$, 24,5°C) nahezu identisch war, führten Licht- und Kältestreß in der Mutante zur vollständigen Degradation der Polypeptide (Abb. 66, Spuren 7 und 8). Das Polypeptidmuster der Wildtypkulturen blieb unter den genannten Streßbedingungen dagegen nahezu unverändert (Abb. 66, Spuren 3 und 4).

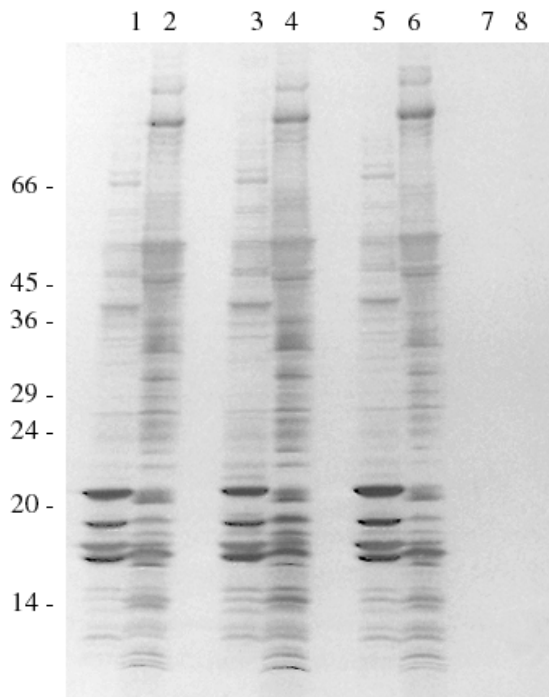


Abb. 66: Einfluß von Licht- und Kältestreß auf das Polypeptidmuster von Phycobilisomenfraktionen (1, 3, 5, bzw. 7) und Gesamtmembranen (2, 4, 6, bzw. 8) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 Wildtyp- (1 bis 4) und Δ sll0408-Kulturen (5 bis 8). Die Kulturen wurden 4 Tage bei $50 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ (NL) und $24,5^\circ\text{C}$ (1 und 2 bzw. 5 und 6) oder 2 Tage bei $300 \mu\text{E}/\text{m}^2 \times \text{Sekunde}^{-1}$ (HL) und 17°C (3 und 4 bzw. 7 und 8) angezogen. Die Polypeptidzusammensetzung der Phycobilisomenfraktionen und Gesamtmembranen (entsprechend $35 \mu\text{g}$ Protein) wurde in einem 9 - 15%igen SDS-Polyacrylamidgel durch Silberfärbung analysiert. Links: Molekulargewichtsstandard in Kilodalton

Die Zerstörung des *sll0408*-Gens scheint mit der erhöhten Sensitivität der Mutante gegenüber hohen Lichtintensitäten und Kältestreß direkt oder indirekt in Verbindung zu stehen. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, welche molekularen Ursachen diesem Effekt zugrundeliegen.

4. Diskussion

Die Thylakoidmembranen höherer Pflanzen stellen hochdynamische Strukturen dar, die eine Reihe von Anpassungsmechanismen zur Aufrechterhaltung der photosynthetischen Effizienz unter Streßbedingungen entwickelt haben (Weis und Berry, 1988; Schöffel et al., 1998). In diesem Zusammenhang kommt der reversiblen Phosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen eine zentrale Bedeutung zu. Die posttranslationale Modifikation der Zielproteine, insbesondere der Polypeptide des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes, an Threoninresten scheint nicht nur für die balanzierte Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen verantwortlich zu sein (Allen, 1992), sondern auch ihre Stabilität und ihren Umsatz zu koordinieren (Andersson und Aro, 1997; Barber et al., 1997; Kruse et al., 1997; Baena-Gonzalez et al., 1999). Obwohl der Mechanismus, der zur Aktivierung der membranintegralen LHCII-Kinase führt, inzwischen gut untersucht ist (Vener et al., 1995, 1997; Zito et al., 1999), sind die molekularen Einzelheiten der Dynamik der Thylakoidmembranen höherer Pflanzen bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Trotz intensiver Forschungsarbeiten entziehen sich vor allem die Komponenten des thylakoidalen Proteinkinase/-phosphatase-Systems ihrer Isolierung. Wesentliche Gründe hierfür sind die sehr geringe Konzentration der Komponenten und eine gewisse Instabilität der intrinsischen Polypeptide, sobald sie aus der Thylakoidmembran freigesetzt werden. Die große Vielfalt der bislang identifizierten Komponenten läßt vermuten, daß die thylakoidale Signaltransduktion und ihre Regulation wesentlich komplexer sind, als bisher angenommen wurde.

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Identifizierung und subplastidäre Lokalisation kinaseaktiver Polypeptide und ihrer Zielproteine, Einblick in thylakoidale Signaltransduktionsprozesse zu erhalten. Die Aufklärung der funktionellen Rolle kernkodierter Komponenten des plastidären Kompartiments sollte zum Verständnis der regulatorischen Interaktion zwischen Kern und Organell beitragen. Der Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung von vier minoren Komponenten der Thylakoidmembran aus Spinatchloroplasten. Dabei handelte es sich um die 64 kDa-Komponente AMS6, die bislang als Kandidat für die redoxkontrollierte LHCII-Kinase angesehen wurde (Weber et al., 1998; Fulgosi, 1999), die potentielle Proteinkinase AMS9 (58 kDa) sowie die kernkodierten Polypeptide TTP30 und TLP40. Die zuletzt genannten auxiliären Proteine sind im Zusammenhang mit der Isolierung und Aufreinigung von Bestandteilen des membranintegralen Proteinkinase/-phosphatase-Systems identifiziert worden (Fulgosi, 1999). Die Ergebnisse werden für die einzelnen Komponenten zunächst getrennt diskutiert, und anschließend wird ihre mögliche Interaktion im Hinblick auf die thylakoidale Signaltransduktion überprüft.

4.1 Multiple Kinaseaktivitäten in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten

Die differentielle Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes unter gegebenen Lichtintensitäten und Redoxbedingungen deutet auf die Existenz multipler Proteinkinasen in der photosynthetischen Membran hin (Rintamäki et al., 1997; Carlberg et al., 1999). Der Nachweis von mindestens 6 kinaseaktiven Polypeptiden im Molekulargewichtsbereich von 30 bis 66 kDa in der Cytochrom *b/f*-Komplex angereicherten AMS-Fraktion im Rahmen dieser Arbeit unterstützt das Modell multipler Kinaseaktivitäten in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten. Die Stabilität der in Abwesenheit unspezifischer Kinasesubstrate renaturierten Aktivitäten in Gegenwart von Säuren spricht für ihre Autophosphorylierung an Serin- oder Threoninresten. Die Aufreinigung und Isolierung der kinaseaktiven Polypeptide wurde, wie bereits erwähnt, dadurch erschwert, daß es sich um minore Komponenten der Thylakoidmembran handelt und ihr Nachweis auf der erfolgreichen Renaturierung der Kinaseaktivität beruht. Die erforderliche Anreicherung der AMS-Polypeptide in aufeinanderfolgenden, präparativen SDS-Polyacrylamidgelen führte zum Verlust ihrer Kinaseaktivität und damit des entscheidenden Auswahlkriteriums für die Mikrosequenzierung in der Gasphase. Die Aktivität von Proteinkinasen kann zudem durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren, wie z.B. die Bindung divalenter Kationen oder die Interaktion mit Effektormolekülen, moduliert werden. Der Nachweis kinaseaktiver Polypeptide erfordert daher ein verlässliches Testsystem, mit dem selbst kleinste Proteinmengen auf ihre biochemische Natur und Substratspezifität hin untersucht werden können. Erfolgversprechend scheint in diesem Zusammenhang die Kombination der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese von Thylakoidmembranproteinen oder AMS-Fraktionen und der MALDI-TOF-Technologie ("matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight") zu sein. Beide Verfahren stehen seit kurzem in unserem Institut zur Verfügung und sind auf die Analyse geringster Proteinmengen ausgerichtet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie zwingend erforderlich detailliertere Informationen auf Nukleinsäureebene für eine PCR-gestützte Isolierung der kodierenden Sequenzen kinaseaktiver AMS-Polypeptide sind.

Zwei der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen thylakoidalen Kinaseaktivitäten sind aus früheren Untersuchungen bekannt (Fulgosi, 1999). Dabei handelt es sich um die Polypeptide AMS6 (64 kDa) und AMS9 (58 kDa). Im Hinblick auf die Isolierung der redoxkontrollierten LHCII-Kinase, der ein Molekulargewicht von 64 kDa zugeschrieben wird (Coughlan et al., 1988; Frid et al., 1992), war die Identität von AMS6 von besonderem Interesse. Die Homologie der internen Aminosäuresequenz der 58 kDa-Komponente zu einer cyanobakteriellen Histidinkinase erklärt das Interesse an der Aufklärung der funktionellen Rolle dieses AMS-Polypeptids. In diesem Zusammenhang ist der Nachweis einer bislang nicht identifizierten, kinaseaktiven Komponente von 58 kDa aus Spinat von Bedeutung, die mit dem PSII-Reaktionszentrum assoziiert sein soll (Race und Hind, 1996). Dieses Protein soll Polypeptide des PSII und des LHCII-Komplexes *in vitro* phosphorylieren. Eine thylakoidale Proteinkinase von 55 kDa, die mit

dem Cytochrom *b/f*-Komplex assoziiert sein und LHCII-Polypeptide *in vitro* phosphorylieren soll, wurde kürzlich aus *A. thaliana* L. isoliert (thylakoid-associated protein kinase, TAK; Synders und Kohorn, 1999). Diese Befunde weisen darauf hin, daß entweder mehr als eine membranintegrale Proteinkinase existiert, die LHCII-Polypeptide als Substrat nutzen kann, oder das bislang für die redoxkontrollierte Aktivität postulierte Molekulargewicht von 64 kDa revidiert werden muß.

4.1.1 AMS6 als integraler Bestandteil der Granalamellen

Die kodierende Nukleinsäuresequenz von AMS6 konnte bislang weder mit molekularbiologischen noch immunologischen Methoden aus Spinat cDNS-Bibliotheken isoliert werden. Eine Ursache hierfür ist der hohe Degenerationsgrad der Oligonukleotide AMS6-1 (5'-YTNACNTAYGARGARGC-3') bzw. AMS6-2 (5'-NGCRTCRAAYTCNGCNCC-3'), die aus der N-terminalen Aminosäuresequenz der 64 kDa-Komponente abgeleitet wurden (Fulgosi, 1999; N = Adenosin, Cytosin, Guanosen und Thymin, Y = Cytosin und Thymin, R = Adenosin und Guanosen). Weiterhin kann der Anteil an Vollängenklonen innerhalb einer cDNS-Bibliothek stark variieren und ist im Wesentlichen von der Stabilität des 5'-Endes der Poly(A)⁺-RNS *in vivo* abhängig. Das immunologische Sichten von λ gt11-cDNS-Bibliotheken aus Spinat mit dem polyklonalen Antikörper gegen den N-Terminus von AMS6 hängt somit entscheidend von der Vollständigkeit der 5'-terminalen Sequenz der cDNS-Insertionen und ihrer korrekten Fusion mit dem *LacZ*-Teil des Vektors ab. Der Versuch, durch reverse Transkription von Gesamt-RNS aus Spinat und nachfolgende PCR in Gegenwart der beiden degenerierten Oligonukleotide die 5'-terminale kodierende Sequenz von AMS6 zu amplifizieren, war erfolglos. Damit wird deutlich, daß die PCR-gestützte Isolierung der AMS6-cDNS weitaus detailliertere Sequenzinformationen erfordert. Zur Ableitung von Oligonukleotiden mit geringerem Degenerationsgrad kann beispielsweise die Homologie des N-terminalen Peptids zu "expressed sequence tags" (ESTs) aus *Lycopersicon esculentum* L. (Be353817, Be353563, Ai781816) und *Medicago trunculata* L. (Bf005623, Bf005295) herangezogen werden. Zusätzlich kann die Aufreinigung von AMS6 mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und die nachfolgende Sequenzierung des Polypeptids mittels MALDI-TOF-Technologie (siehe oben) zu internen Aminosäuresequenzen führen, aus denen Oligonukleotide für die Amplifikation der kodierenden Sequenz in 5'- bzw. 3'-Richtung abgeleitet werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde AMS6 als integraler Bestandteil der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten identifiziert. Das Protein scheint über einen hydrophoben, C-proximalen Abschnitt stabil in der photosynthetischen Membran inseriert zu sein und eine hydrophile Domäne Protease-sensitiv ins Stroma zu exponieren. Der fehlende serologische Nachweis proteolytischer Fragmente deutet darauf hin, daß das antigene Epitop im N-terminalen Abschnitt des Proteins der proteolytischen Aktivität im Stroma zugänglich ist und dadurch zerstört wird.

Die funktionelle Rolle des thylakoidalen 64 kDa-Polypeptids ist unklar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß AMS6 weder mit der redoxkontrollierten LHCII-Kinase noch der lumenalen Polyphenoloxidase identisch ist. Die Aufreinigung von AMS6 mit der thylakoidalen Kinaseaktivität, seine lateral heterogene Verteilung in der photosynthetischen Membran und die mögliche räumliche Nähe zu den trimeren LHCII-Komplexen lassen eine regulatorische Rolle in der Modulation des Absorptionsquerschnittes am PSII vermuten. Das vorwiegend in den Granastapeln lokalisierte Protein kann in PSII-LHCII-Superkomplexen nicht nachgewiesen werden. Das ist ein Hinweis darauf, daß AMS6 kein fester Bestandteil des trimeren LHCII-Komplexes ist und selbst nicht an der phosphorylierungsabhängigen Assoziation/Dissoziation der peripheren Lichtsammelantenne mit dem PSII beteiligt ist. Einblick in seine physiologische Funktion in der photosynthetischen Membran kann die Analyse von Mutanten geben, denen ein funktioneller LHCII-Komplex fehlt. Die biochemische Untersuchung der Gerstenmutante *chlorina-f2* in dieser Arbeit zeigt aber, daß die Variabilität des aminoterminalen Abschnitts von Proteinen ihre Identifikation in verschiedenen Pflanzenspezies erschweren kann. Aus diesem Grund ist der monospezifische Antikörper gegen das N-terminale Peptid der 64 kDa-Komponente aus Spinat für eine serologische Analyse im heterologen System ungeeignet. Die Isolierung der AMS6-cDNS und die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen das reife pflanzliche Protein sind daher für die Aufklärung der funktionellen Rolle dieser thylakoidalen Komponente von zentraler Bedeutung.

4.1.2 AMS9 als periphere Komponente von Stromathylakoidmembranen

Die serologischen Analysen dieser Arbeit identifizieren die 58 kDa-Komponente AMS9 als periphere Komponente der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten. Das Protein ist über elektrostatische und schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit der Stromaseite der photosynthetischen Membran assoziiert. Das antigene Epitop des pflanzlichen Proteins wird durch proteolytische Spaltung offenbar zerstört, so daß mit dem gut reagierenden, heterologen Antikörper gegen die cyanobakterielle Histidinkinase slr0311 keine Abbauprodukte in der Stromafraktion nachgewiesen werden können.

Die 58 kDa-Komponente AMS9 ist lateral heterogen in der photosynthetischen Membran verteilt. Das Protein ist vorwiegend in den ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran und den Randbereichen der Granastapel lokalisiert. Die Assoziation der potentiellen Proteinkinase AMS9 mit dem PSI in den Stromathylakoiden kann strukturelle und/oder funktionelle Ursachen haben. Eine Phosphorylierung von Polypeptiden des PSI oder damit assoziierter Polypeptide konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, was möglicherweise auf die räumliche Trennung von Proteinkinase(n) und Substrat(en) unter den gewählten Phosphorylierungsbedingungen zurückzuführen ist. Die Stromalamellen sind aber der Ort der dephosphorylierungsabhängigen Proteindegradation und der Translokation/Insertion neusynthetisierter Polypeptide (Wettern, 1986; Mattoo und Edelman, 1987; Cohen et al., 1995).

Die Dynamik der Polypeptidunterheiten des PSII-Reaktionszentrums und des LHCII-Komplexes wird durch ihren Phosphorylierungszustand moduliert (Koivuniemi et al., 1995; Lindahl et al., 1995). Die Dephosphorylierung der PSII-Phosphoproteine soll durch eine membranintegrale Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A (PP2A) katalysiert werden (Vener et al., 1999). Die Aktivität von Proteinphosphatasen dieser Gruppe kann unter anderem durch die reversible Phosphorylierung an Threonin- und/oder Tyrosinresten innerhalb der katalytischen Domäne moduliert werden (Guo und Damuni, 1993; Chen et al., 1994b). Die Identität und die subthylakoidale Lokalisation der pflanzlichen PP2A sowie der LHCII-Phosphatase(n) sind bislang unbekannt. Inwieweit ihre Aktivität durch posttranslationale Modifikation reguliert werden kann und die mutmaßliche Proteinkinase AMS9 daran beteiligt ist, ist derzeit unklar.

Die Zerstörung des Gens für das potentielle, cyanobakterielle Homologe von AMS9 sollte zum Verständnis der physiologischen Bedeutung einer potentiellen Proteinkinase am PSI in Spinachchloroplasten beitragen. Die strukturellen Eigenschaften der Histidinkinase slr0311 sprechen dafür, daß dieses Protein in *Synechocystis* sp. PCC6803 als Sensor kinase Bestandteil eines Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystems ist. Die Hydropathieanalyse der Aminosäuresequenz von slr0311 weist auf ein überwiegend hydrophiles Protein mit einem kurzen, hydrophoben Abschnitt hin (Abb. 67).

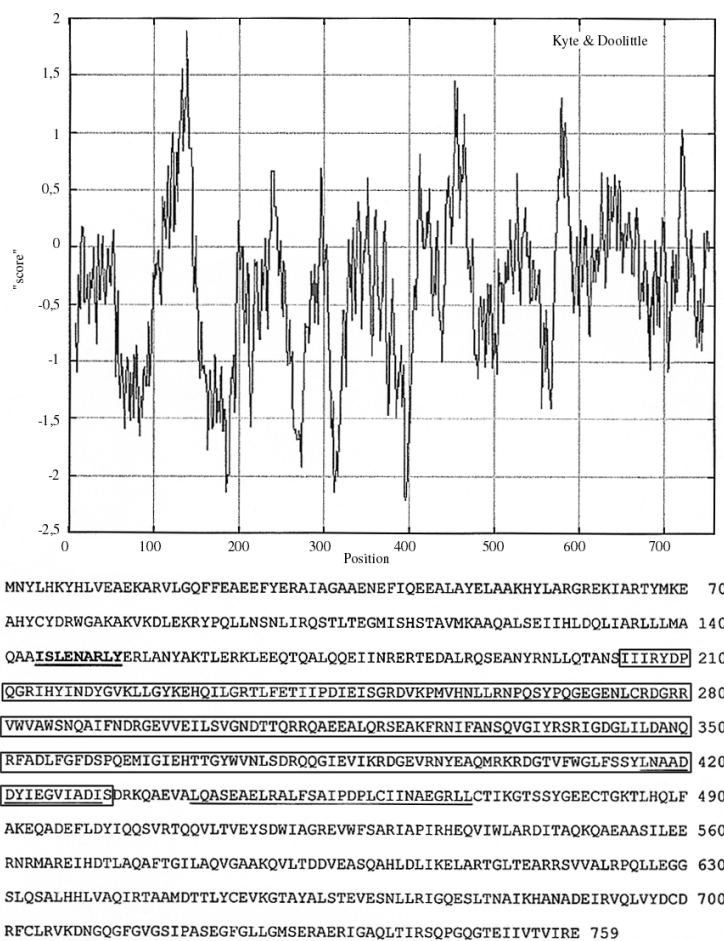


Abb. 67: Hydropathieanalyse (nach Kyte und Doolittle, 1982) der Aminosäuresequenz der cyanobakteriellen Histidinkinase slr0311 (modifiziert nach Fulgosi, 1999). Die PAS-Domäne (eingerahmt) liegt nahe dem hydrophoben Abschnitt (D130 - S145) und reicht in das Leucin-“zipper“-Modul (unterstrichen). Das Nonapeptid mit Homologie zu der internen Aminosäuresequenz aus AMS9 ist fettgedruckt und unterstrichen.

Sensorkinasen setzen sich aus einem N-terminalen "input"-Modul (PAS-Domäne) und einem C-terminalen "transmitter"-Modul zusammen (Parkinson und Kofoid, 1992). Über die PAS-Domäne werden Veränderungen der Lichtintensität und des zellulären Sauerstoff- oder Redoxpotentials wahrgenommen (Zhulin et al., 1997). Die Bezeichnung dieses Moduls geht auf die zuerst identifizierten Proteine mit einem solchen Motiv zurück: das "periodic clock protein" (PER) aus *Drosophila*, den "aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator" (ARNT) aus Vertebraten und das "single-minded protein" (SIM) aus *Drosophila* (siehe Übersichtsartikel von Taylor und Zhulin, 1999). PAS-Domänen finden sich vornehmlich in Proteinen, die direkt oder indirekt an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind (Zhulin et al., 1997). In der cyanobakteriellen Histidinkinase slr0311 erstreckt sich die PAS-Domäne von I204 bis S431 und reicht damit in das zentrale Leucin-"zipper"-Motiv (L416 bis L468) (Abb. 68). Über die Leucin-"zipper"-Domäne könnte die Aktivität des Enzyms durch Homodimerisierung reguliert werden (Huang et al., 1993). In Übereinstimmung mit den Angaben von Taylor und Zhulin (1999) ist die PAS-Domäne in slr0311 nahe dem potentiell transmembranen oder membranassozierten hydrophoben Abschnitt (D130 bis S145) gelegen. Es ist daher auch denkbar, daß das Protein durch Heterodimerisierung seiner PAS-Domäne mit anderen membranassozierten Proteinen interagieren kann.

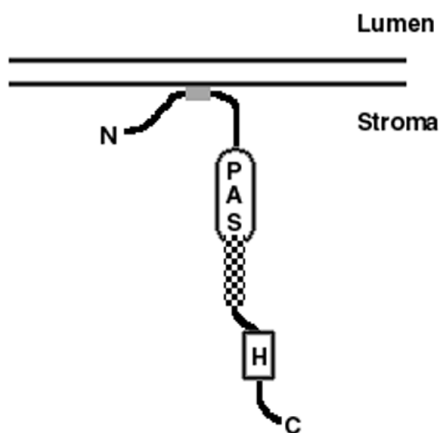


Abb. 68: Hypothetisches Modell der cyanobakteriellen Histidinkinase slr0311. Der kurze hydrophobe Abschnitt (hellgrau) kann die Assoziation der Sensorkinase mit der Stromaseite der Thylakoidmembran ermöglichen. Die PAS-Domäne reicht in das Leucin-"zipper"-Modul (kariert). Der Histidinrest H569 (H), an dem nach der Homodimerisierung des Proteins die Autophosphorylierung erfolgen könnte, liegt innerhalb der Kinasedomäne (quadratisch).

Die C-terminale "transmitter"-Domäne von Sensorkinasen enthält den konservierten Histidinrest (H), an dem nach der Dimerisierung des Enzyms seine Autophosphorylierung erfolgt (Parkinson und Kofoid, 1992). Die Phosphorylgruppe kann anschließend vom Histidinrest der Sensorkinase auf den Asparaginsäurerest des zugehörigen Regulator-Proteins übertragen werden. Die Kinasedomäne enthält zahlreiche hochkonservierte Sequenzmotive, die als H-, N-, D-, F-, bzw. G-Box bezeichnet werden (Parkinson und Kofoid, 1992; Swanson et al., 1994). Die Phosphorylierungsstelle liegt innerhalb der H-Box, N-proximal von der N-Box. Im Hinblick auf slr0311 kommt der Histidinrest H569 als mögliche Phosphorylierungsstelle in Betracht. Bislang konnte keine Kinaseaktivität der rekombinanten Histidinkinase slr0311 nachgewiesen werden.

Eine mögliche Ursache hierfür ist die Prozessierung des cyanobakteriellen Proteins in *E. coli*, die vermutlich C-terminal erfolgt und dadurch die Kinasedomäne zerstört.

Das Gen für die potentielle Histidinkinase ist mit dem *slr0312*-Gen in einem Operon organisiert. *slr0312* kodiert ein Nitrat/Nitrit Regulator-Protein mit Homologie zum NarL-Transkriptionsfaktor aus *E. coli* (Mizuno et al., 1996). Das Zwei-Komponenten-System *slr0311/slr0312* könnte daher die Expression an der Stickstoff-Fixierung beteiligter Gene in Reaktion auf Veränderungen des zellulären Sauerstoff- oder Redoxpotentials regulieren. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Zerstörung des Gens für die potentielle Histidinkinase den Phänotyp der Mutante Δ *slr0311* unter den untersuchten Bedingungen nicht beeinflusst. Es ist bekannt, daß die Mutation einer Sensorkinase oftmals keine Auswirkung auf den Phänotyp der Mutante hat, da der Phosphorylierungszustand des zugehörigen "response regulators" durch alternative Phosphodonoren reguliert werden kann (siehe Übersichtsartikel von Hakenbeck und Stock, 1996). Auf diese Weise kann ein Wildtyp-ähnliches Aussehen resultieren. Die gegenüber dem Wildtyp deutlich geringere maximale Quantenausbeute (F_v/F_{max}) der Mutante ist derzeit der einzige Hinweis darauf, daß die Zerstörung des *slr0311*-Gens einen direkten oder indirekten Einfluß auf den Energietransfer von den Phycobilisomen zu und/oder zwischen den beiden Photosystemen II und I hat. Eine Störung der "state I/state II-transition" konnte nicht nachgewiesen werden.

Die beschriebene Gendisruptionsstrategie konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Aufklärung der funktionellen Rolle von AMS9 in Spinatchloroplasten beitragen. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang aber die Identifizierung der PAS-Domäne in der cyanobakteriellen Histidinkinase *slr0311*. PAS-Domänen sind wichtige Module von Photorezeptoren, wie den pflanzlichen Phytochromen, und von "clock"-Proteinen (Kay, 1997; Schibler, 1998). Pflanzliche Phytochrome gehören zu einer Familie löslicher Photorezeptoren, die Veränderungen der Lichtintensität wahrnehmen und in Signale umwandeln, welche die Genexpression von der Samenkeimung bis hin zur Blüteninduktion regulieren (Smith, 1995b; Quail, 1997). Die homodimeren Biliproteine bestehen aus zwei Untereinheiten, die sich aus einer Photorezeptordomäne mit einem kovalent gebundenen Tetrapyrrol-Chromophor und zwei damit verbundenden PAS-Domänen zusammensetzen (Quail et al., 1995). C-terminal von den PAS-Domänen befindet sich eine Histidinkinase-ähnliche Domäne. Pflanzliche Phytochrome besitzen keine Histidinkinaseaktivität, sondern stellen lichtregulierte Serin-/Threoninkinasen dar, die sich vermutlich von cyanobakteriellen Histidinkinasen ableiten (Yeh und Lagarias, 1998). Als Prototyp pflanzlicher Phytochrome wird die cyanobakterielle Sensorkinase *slr0473* diskutiert (Mizuno et al., 1996). Die Homologie der internen Aminosäuresequenz von AMS9 zu der cyanobakteriellen Histidinkinase *slr0311* und der Nachweis eines säurestabil phosphorylierten AMS-Polypeptids von 58 kDa lassen vermuten, daß es sich bei der peripheren Thylakoidmembrankomponente AMS9 ebenfalls um ein Protein mit Serin-/Threoninkinaseaktivität handeln könnte. Dieser Aspekt erscheint im Hinblick auf die mögliche

Modulation der Aktivität der thylakoidalen Proteinphosphatase vom Typ 2A durch Phosphorylierung eines C-terminalen Threoninrestes in einer zum Stroma orientierten, katalytischen Untereinheit interessant (siehe oben).

Die Isolierung der kodierenden Sequenz von AMS9 wird zeigen, ob das pflanzliche Protein (a) als periphere Serin-/Threoninkinase an der Koordination der Stabilität, der Degradation und des Umsatzes von PSII-Polypeptiden durch posttranslationale Modifikation der verantwortlichen Proteinphosphatase mitwirkt, (b) als Sensor kinase Bestandteil einer Signaltransduktionskette ist, über die die plastidäre Genexpression in Reaktion auf extra- und/oder intrazelluläre Reize reguliert wird, oder (c) als Histidinphosphotransfer (Htp)-Protein ohne katalytische Aktivität am "multistep phosphorelay" beteiligt ist. In Mais und *A. thaliana* L. wird der "multistep phosphorelay" im Zusammenhang mit der Cytokinin-vermittelten Signaltransduktion diskutiert, die die Expression photosynthetischer Gene, wie z.B. *nia* (Nitratreduktase) oder *rbcS* (kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase), in Abhängigkeit von der Stickstoffverfügbarkeit reguliert (Lerbs et al., 1984; Taniguchi et al., 1998; Yu et al., 1998; Sakakibara et al., 1999).

4.2 Bedeutung der kernkodierten Polypeptide TTP30 und TLP40 für die Modulation der thylakoidalen Dynamik

Die Analyse der Aminosäuresequenzen von TTP30 und TLP40 hat zur Identifizierung zweier plastidärer Komponenten mit bislang einzigartiger molekularer Struktur geführt (Fulgosi, 1999). Beide Proteine setzen sich aus mehreren funktionellen Domänen zusammen, die unter anderem Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können. Dazu zählen das zentrale TPR-Motiv in TTP30 und die N-terminale Leucin-"zipper"-Domäne in TLP40. Diese α -helikalen Strukturelemente könnten nicht nur die Aktivität der beiden plastidären Komponenten durch Homodimerisierung regulieren, sondern auch durch die Ausbildung von Heterodimeren an der Verknüpfung unterschiedlicher Signaltransduktionswege mitwirken. Die subplastidäre Lokalisation und die funktionelle Analyse der komplexen, kernkodierten Polypeptide TTP30 und TLP40 sollte einen detaillierteren Einblick in ihre regulatorische Rolle in der thylakoidalen Signaltransduktion geben.

4.2.1 Analyse der funktionellen Rolle von TTP30 im plastidären Kompartiment

Die Aminosäuresequenz des kernkodierten Polypeptids TTP30 enthält drei wesentliche Strukturmerkmale: ein zentrales TPR-Motiv und eine N-terminale "response regulator"-ähnliche Domäne, die ein potentiell "helix-loop-helix"-Motiv einschließt. Die Kombination dieser strukturellen Module in einem einzigen Molekül ist bislang für keine plastidäre Komponente beschrieben. Proteine, die eines oder mehrere der genannten Motive enthalten, sind als hochregulative Moleküle verschiedener Signaltransduktionsprozesse bekannt. Dazu zählen

beispielsweise die im Kern lokalisierten Proteine $nuc2^+$ aus *Schizosaccharomyces pombe* sowie ARR1 und ARR2 aus *A. thaliana* L. (Hirano et al., 1990; Sakai et al., 1998, 2000). In dem Hefeprotein $nuc2^+$ ist eine zentrale TPR-Domäne mit einem Serin-reichen, DNS-bindenden Motiv kombiniert. Die beiden mutmaßlichen Transkriptionsfaktoren ARR1 und ARR2 bestehen dagegen aus einer N-terminalen Regulator-ähnlichen Domäne, die direkt mit einem DNS-bindenden Motiv gekoppelt ist.

Die komplexe Struktur von TTP30 ließ eine koordinative Rolle in der thylakoidalen Signaltransduktion und ihrer Regulation vermuten. Für ihre Aufklärung war zunächst die subplastidäre Lokalisation dieses komplexen Polypeptids eine wichtige Voraussetzung.

Subplastidäre Lokalisation von TTP30

Die Ergebnisse des *in organello*-Imports sprechen für eine Lokalisation von TTP30 in der Thylakoidmembran von Spinatchloroplasten. Das Protein scheint über seinen hydrophoben C-terminalen Bereich (I319 bis R339) stabil in der photosynthetischen Membran inseriert zu sein (siehe Abschnitt 3.2). Der *in vitro*-translatierte TTP30-Vorläufer kann nach seiner Prozessierung und Insertion in die Thylakoidmembran weder durch chaotrope noch alkalische Lösungen aus dieser extrahiert werden. Entgegen den Befunden von Fulgosi (1999) ist das *in vitro* importierte Protein gegenüber Thermolysin oder Trypsin sensitiv. Die proteolytische Behandlung der Thylakoidmembranen führt zu Abbauprodukten in der Membranfraktion, die hinsichtlich ihres Molekulargewichtes nicht der Größe des C-terminalen Membranankers entsprechen. Für die Orientierung des hydrophilen Bereichs von TTP30, der das zentrale TPR-Motiv und die N-terminale Regulator-ähnliche Domäne einschließt, ergeben sich damit zwei topographische Möglichkeiten: (1) die Erkennungssequenzen im hydrophilen Abschnitt sind konformationsbedingt nicht für die proteolytische Aktivität im Stroma zugänglich oder (2) die hydrophile Domäne ist in das Lumen der Thylakoidmembranen exponiert und dadurch geschützt.

Aufschluß über eine konformationsbedingte Protektion der Schnittstellen kann die Behandlung des rekombinanten Vorläufers mit Proteasen unterschiedlicher Spezifität geben. Die partielle Verdauung von Proteinen, die TPR-Motive enthalten, mit Subtilisin oder Proteinase K, führt zu einer Leiter proteolytischer Fragmente in Intervallen von 3 bis 4 kDa (Hirano et al., 1990). Dies wird als Hinweis auf die selektive Spaltung an den Prolin-induzierten "Knicken", die die TPR-Helices verbinden, gedeutet. Wie die Untersuchungen von Moir et al. (2000) zeigen, ist die Zugänglichkeit dieser Spaltstellen von der strukturellen Organisation der TPR-Einheiten abhängig. Die Untereinheit $\tau 131$ des Transkriptionsfaktors TFIIC aus *Saccharomyces cerevisiae* enthält beispielsweise achtzehn TPR-Motive und ist gegenüber Trypsin und Chymotrypsin relativ stabil (siehe unten). Dies wird auf die dichte räumliche Packung benachbarter TPR-Einheiten zurückgeführt. Die TPR-Domäne von TTP30 besteht aus sechs amphipatischen α -Helices. Inwieweit die Spaltstellen in den Prolin-induzierten "Knicken" nach der Insertion des reifen

Proteins in die Thylakoidmembran zugänglich sind, ist unklar. Möglicherweise spielt auch die Bindung divalenter Kationen an das mutmaßliche "helix-loop-helix"-Motiv in der N-terminalen, Regulator-ähnlichen Domäne eine wichtige Rolle. Dadurch könnte es zu Konformationsänderungen kommen, durch die die Erkennungssequenzen der proteolytischen Aktivität im Stroma erst zugänglich werden (siehe dazu auch Abb. 69).

Nach der Beschallung der Thylakoidmembranen in Gegenwart von Trypsin konnten weder in der Membranfraktion noch im Thylakoidlumen radioaktiv markierte Abbauprodukte nachgewiesen werden. Dieser Befund spricht wiederum für eine lumenale Orientierung der hydrophilen Domäne von TTP30 und ihre vollständige Degradation nach der Zerstörung des Thylakoidsystems. Der fehlende Nachweis des hydrophoben, C-terminalen Ankers (2,2 kDa) in der Membranfraktion ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß dieser Abschnitt kein Methionin enthält und daher bei Verwendung von L-³⁵S-Methionin in der *in vitro*-Translation unmarkiert bleibt. Die radioaktive Markierung der Leucinreste in diesem Bereich ist aufgrund der geringen Reichweite des β -Strahlers Tritium und der geringen Importeffizienz des ³H-markierten *in vitro*-Translationsproduktes für den Nachweis proteolytischer Fragmente ungeeignet. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß nur ein spezifischer Antikörper gegen das reife, pflanzliche Protein Aufschluß über die Topographie von TTP30 *in vivo* geben kann.

Die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen TTP30 erwies sich aufgrund seiner komplexen Struktur als problematisch. Das Protein konnte in unterschiedlichen Expressionssystemen in Form des Vorläufers und als trunkate TPR-Domäne, nicht aber als reifes Protein oder trunkate Regulator-Domäne effizient exprimiert werden. Die strukturelle Vielfalt des rekombinanten Vorläufers ist vermutlich für die fehlende Spezifität des in dieser Arbeit hergestellten Antikörpers verantwortlich. Insbesondere die strukturelle Ähnlichkeit der TPR-Domäne zu 14-3-3-Proteinen (siehe unten) könnte eine spezifische Immunantwort des injizierten Kaninchens verhindert und zu einer unspezifischen Kreuzreaktion mit nicht verwandten Proteinen geführt haben.

Die Spezifität des Antikörpers gegen das pflanzliche TTP30-Protein wird möglicherweise auch durch das potentielle "helix-loop-helix"-Motiv im N-terminalen Abschnitt beeinflusst. Proteine, die ein solches Motiv enthalten, wie z.B. Calmodulin, können durch die Bindung zweiwertiger Kationen Konformationsänderungen erfahren, die von einer geschlossenen zu einer offenen Form führen (Finn et al., 1995; Zhang et al., 1995; Zhang et al., 1995; Ikura, 1996). Die damit verbundene Exposition zuvor unzugänglicher hydrophober Bereiche kann ihrerseits Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Abb. 69).

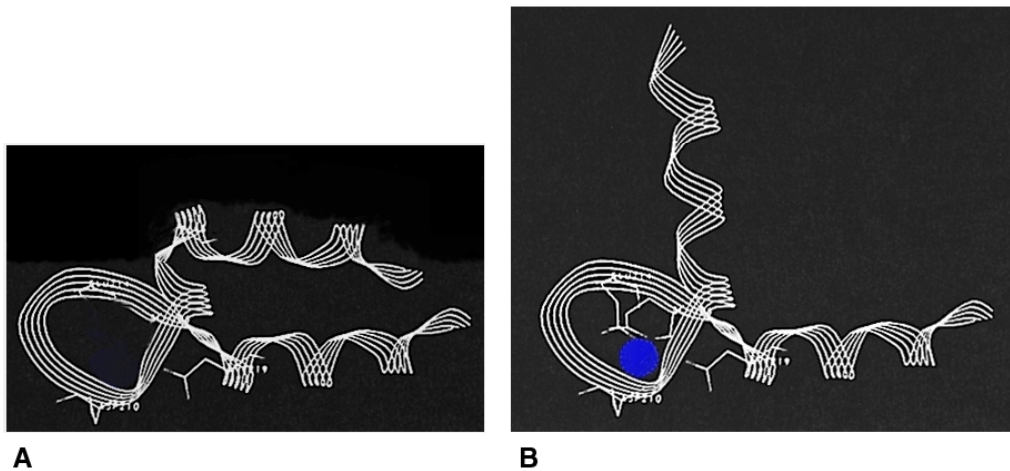


Abb. 69: Dreidimensionale, graphische Darstellung der Konformation eines EF-Hand-Moduls vor (A) und nach (B) Bindung eines Calciumions (blau; modifiziert nach Lu et al., 1993). Durch die Bindung von Calciumionen an die auch als "helix-loop-helix"-Motiv bezeichnete Domäne wird eine Konformationsänderung induziert, die von einer geschlossenen zu einer offenen, für Protein-Protein-Interaktionen besser zugänglichen Form führt.

Hayek et al. (1998) haben eine drastisch verminderte Bindung von Immunglobulin G aus Kaninchen an die Calcium-freie Form des Pollenallergens Alng4 nachgewiesen. Es ist daher denkbar, daß der Antikörper gegen den denaturierten, rekombinanten TTP30-Vorläufer das pflanzliche Protein in seiner Kationen-gebundenen Form nicht erkennt. Der rekombinante Vorläufer konnte Calciumionen *in vitro* nicht binden, was durch sein unverändertes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel nach Inkubation mit CaCl_2 gezeigt wurde. Die Affinität von TTP30 zu Calciumionen oder anderen zweiwertigen Kationen könnte allerdings über seinen Phosphorylierungszustand reguliert werden, analog zum GF ω 14-Protein (siehe unten) aus *A. thaliana* L. (Lu et al., 1993).

Ein weiterer Versuch zur Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen TTP30 führte zum Nachweis einer 34 kDa-Komponente im Stroma von Spinatchloroplasten, nicht aber, wie im Importexperiment ermittelt, in der Thylakoidmembran. Damit ist unklar, ob das reife Protein *in vivo* tatsächlich im Stroma lokalisiert ist oder seine Assoziation mit der Thylakoidmembran während der Subfraktionierung der Chloroplasten beeinflusst wird. Denkbar ist auch ein Modell, in dem das potentiell DNS-bindende Protein TTP30 (siehe unten) *in vivo* Bestandteil eines multimeren Proteinkomplexes im Stroma ist. In diesem Zusammenhang ist die strukturelle Organisation der Plastidenchromosomen in DNS-Proteinkomplexe (Nukleoide) von Bedeutung. Veränderungen in der Zusammensetzung dieser Komplexe sind eine Funktion des Entwicklungszustandes des Organells (Herrmann und Possingham, 1980; Hansmann et al., 1985; Reiss und Link, 1985; Nemoto et al., 1988). In den letzten Jahren sind eine Reihe von kernkodierten, DNS-bindenden Proteinen in plastidären Nukleoiden identifiziert worden. Dazu

zählt beispielsweise das Protein CND41 aus Tabak (Nakano et al., 1997). Dieser negative, transkriptionale Regulator enthält, ähnlich wie TTP30, ein N-terminales "helix-turn-helix"-Motiv. Die Interaktion von TTP30 mit einem hochmolekularen Proteinkomplex könnte über die zentrale TPR-Domäne vermittelt und zugleich seine DNS-Bindeaffinität über die Bindung zweiwertiger Kationen an das N-terminale "helix-loop-helix"-Modul reguliert werden. Das setzt allerdings voraus, daß das singuläre "helix-loop-helix"-Motiv Plastiden-DNS und divalente Kationen kooperativ binden kann. Unter den Bedingungen des *in organello*-Imports war der Nachweis einer solchen Interaktion nicht möglich, da (a) das *in vitro* translatierte Protein seine funktionelle Konformation nicht einnehmen konnte oder (b) seine Bindestelle bereits durch das endogene TTP30-Protein besetzt war.

Funktionelle Charakterisierung von TTP30

Für die Aufklärung einer möglichen Beteiligung von TTP30 an thylakoidalen Signaltransduktionsprozessen und ihrer Regulation ist die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von TPR-Motiven zu 14-3-3-Domänen von Bedeutung (Das et al., 1998). Die ubiquitären, löslichen 14-3-3-Proteine (~30 kDa) sind an Signaltransduktionsprozessen durch direkte Interaktion mit Proteinen beteiligt, die an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert sind (Muslin et al., 1996). Die Homo- und/oder Heterodimerisierung der 14-3-3-Domänen ermöglichen es zudem, eine Vielzahl zellulärer Signaltransduktionsprozesse auf phosphoserin- oder -threoninregulierte Weise miteinander zu verbinden (Muslin et al., 1996). Proteine, die (multiple) TPR-Motive enthalten, können ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen und die Assemblierung von Multienzymkomplexen, wie der Hsp90-Maschinerie, vermitteln (Goebel und Yanagida, 1991; Sikorski et al., 1991; Lamb et al., 1995). An einer Interaktion mit Phosphoserin- oder -threoninproteinen sind sie im Gegensatz zu 14-3-3-Proteinen offenbar nicht beteiligt. Die TPR- und 14-3-3-Domänen binden ihre Substrate nach dem gleichen architektonischen Prinzip, die Erkennung phosphorylierter Serin- oder Threoninreste obliegt aber allein den 14-3-3-Domänen (Yaffe et al., 1997; Scheufler et al., 2000). Eine direkte TPR-vermittelte, regulatorische Interaktion von TTP30 mit thylakoidalen Phosphoserin- oder Phosphothreoninproteinen ist daher nicht sehr wahrscheinlich.

Der Nachweis eines kinaseaktiven AMS-Polypeptids von 34 kDa und die *in vitro*-Phosphorylierung des rekombinanten Vorläuferproteins in der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, daß TTP30 selbst das Ziel reversibler Phosphorylierung ist. Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit eines unspezifischen Kinasesubstrats konnte die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom ATP auf den rekombinanten TTP30-Vorläufer nachgewiesen werden. Eine Differenzierung zwischen autophosphorylierender Proteinkinase und ATP-bindendem Protein war dabei nicht möglich. Die Stabilität des Renaturierungssignals in Gegenwart von Säuren spricht allerdings gegen die von Fulgosi (1999) diskutierte Autophosphorylierung des Proteins an den Histidinresten H217 bzw. H231. Die Säurestabilität ist ein Merkmal von

Phosphoserin- oder Threoninresten, wogegen Phosphohistidinreste unter diesen Bedingungen rasch hydrolysieren (Fujitaki und Smith, 1984; Martensen, 1984).

Interessanterweise kann die Affinität von 14-3-3-Isoformen zu ihren Zielproteinen nicht nur durch die Phosphorylierung des Substrats, sondern auch der 14-3-3-Domäne selbst reguliert werden (Toker et al., 1992; Aitken et al., 1995). Das zur 14-3-3-Familie gehörende GF ω 14-Protein aus *A. thaliana* L. kann *in vitro* an einem Serinrest phosphoryliert werden (Lu et al., 1993). Dieses kernkodierte Protein ist Bestandteil eines hochmolekularen Proteinkomplexes, der an das G-Box-*cis*-Element (CACGTG) in der Promotorregion induzierbarer, eukaryotischer Gene bindet (Lu et al., 1992). Analog zu TTP30 enthält das *Arabidopsis*-Protein ein "helix-loop-helix"-Motiv in seinem C-terminalen Abschnitt. Die Phosphorylierung der 14-3-3-Domäne von GF14 ω reguliert die Bindung von Calciumionen an das C-terminale EF-Hand-Motiv und moduliert so die Affinität des hochmolekularen Proteinkomplexes zu DNS.

Die säurestabile Phosphorylierung des rekombinanten TTP30-Vorläufers und seine strukturelle Ähnlichkeit zu dem 14-3-3-Protein GF ω 14 aus *A. thaliana* L. sprechen für eine regulatorische Funktion von TTP30 in der plastidären Genexpression. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Identifizierung des mutmaßlichen "helix-loop-helix"-Motivs in seiner N-terminalen Domäne. Dieses Motiv besteht aus zwei α -Helices, die über einen Arm aus elf negativ geladenen Aminosäureresten mit β -Faltblattstruktur verbunden sind. Die Länge dieses Arms unterscheidet das "helix-loop-helix" (HLH)-Modul von dem strukturell eng verwandten "helix-turn-helix" (HTH)-Motiv, dem die DNS-bindenden Eigenschaften vieler Transkriptionsfaktoren zugeschrieben wird (Gasic, 1994; Kohn et al., 1997). Die Unterscheidung von DNS-bindendem HTH- und Kationen-bindendem HLH-Motiv ist allerdings nicht sehr strikt. Wie bei TTP30 besteht die "spacer"-Region des DNS-bindenden Regulator-Proteins OmpR aus *E. coli* aus elf negativ geladenen Aminosäureresten und ist *per definitionem* als HLH-Motiv zu bezeichnen (Itou und Tanaka, 2001). Die Aktivität eukaryotischer Transkriptionsfaktoren kann vielfach durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. reversible Phosphorylierung oder Acetylierung, durch Homodimerisierung oder Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen moduliert werden (siehe Übersichtsartikel von Hunter, 1998). Beispielsweise wird die DNS-Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors c-Myb durch seine stabile Interaktion mit dem komplexen Cyclophilin CyP40 negativ reguliert (Levenson und Ness, 1998). CyP40 interagiert über sein C-terminales TPR-Modul mit der DNS-Bindedomäne von c-Myb.

Der Nachweis der DNS-bindenden Eigenschaften von TTP30 sollte Aufschluß über seine mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor in der plastidären Genexpression geben. Die Identifizierung der N-terminalen Regulator-Domäne legte zudem eine Regulation seiner DNS-Bindeaffinität im Sinne eines Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystems nahe.

Einfluß von TTP30 auf die Regulation der plastidären Genexpression

Das kompartimentierte, integrierte genetische System der Pflanzenzelle erfordert eine quantitativ, zeitlich und räumlich koordinierte Expression kernkodierter und plastidärer Gene (Gray, 1996; Herrmann, 1997). Pro Zelle stehen eine bis wenige Kopien kernkodierter Gene mehreren hundert bis tausend plastidären Kopien gegenüber. Die Regulation der plastidären Genexpression wird in vielen Fällen durch kernkodierte Faktoren vermittelt, die auf transkriptionaler, posttranskriptionaler oder translationaler Ebene wirken (Rochaix, 1992, 1996; Mayfield et al., 1995; Sugita und Sugiura, 1996; Goldschmidt-Clermont, 1998; Leon et al., 1998). In diesem Zusammenhang scheinen sowohl Protein-Protein- bzw. Protein-DNS-Interaktionen als auch reversible Proteinphosphorylierungen eine zentrale Bedeutung zu haben.

Die Ergebnisse der "South-Western"-Analyse zeigen, daß TTP30 *in vitro* an bislang nicht identifizierte Bereiche des Plastidenchromosoms von Spinat binden kann. Die strukturelle Ähnlichkeit von TTP30 zur Untereinheit $\tau 131$ des Transkriptionsfaktors TFIIC aus *Saccharomyces cerevisiae* spricht für eine Beteiligung des N-terminalen "helix-loop-helix"-Motivs und der daran anschließenden TPR-Domäne an dieser Interaktion. Der promotorgebundene Proteinkomplex TFIIC ist für den ersten Schritt der tRNS- und 5S rRNS-Genaktivierung in Hefe verantwortlich (Marck et al., 1993). Die TPR-vermittelte Interaktion von $\tau 131$ mit dem RNS-Polymerase III (Pol III)-Initiationsfaktor TFIIB70 ist für die Assemblierung des Pol III-Transkriptionskomplexes essentiell (Moir et al., 2000). TFIIB70 alleine kann nicht an DNS binden. Ob TTP30 selbst Bestandteil eines hochmolekularen Proteinkomplexes ist, der an die Promotorregion bestimmter plastidärer Gene bindet, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Kernkodierte Proteine, die TPR-Motive enthalten, sind im Zusammenhang mit der Regulation der Stabilität plastidärer Transkripte in *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben worden (Boudreau et al., 2000). Das stromal lokalisierte Nac2-Protein enthält neun TPR-Motive und soll als Bestandteil eines hochmolekularen Proteinkomplexes an der Prozessierung, Stabilität und/oder Translation der *psbD*-mRNS beteiligt sein. Ein analoges Protein, Mbb1, besitzt zehn TPR-Motive und ist ebenfalls mit einem multimeren Proteinkomplex assoziiert, der mit dem 5'-untranslatierten Bereich der *psbB*-mRNS interagieren soll (Vaistij et al., 2000). Eine TPR-vermittelte Interaktion des kernkodierten Polypeptids TTP30 mit plastidären Transkripten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse der "South-Western"-Analyse zeigen, daß der rekombinante TTP30-Vorläufer zwischen Plastiden-DNS und -RNS eindeutig unterscheiden kann.

Für die koordinierte Expression nukleärer und plastidärer Gene spielen der Redoxzustand des Organells und der Phosphorylierungszustand regulatorischer Faktoren wichtige Rollen (Escoubas et al., 1995; Maxwell et al., 1995). Inwieweit die potentielle DNS-Bindeaktivität der plastidären Komponente TTP30 durch den Redoxzustand der photosynthetischen Elektronentransportkette

beeinflusst wird, ist offen. Die Homologie seiner N-terminalen Regulator-ähnlichen Domäne zu der des RegA-Proteins aus *Rhodobacter capsulatus* läßt eine redoxkontrollierte Modulation seiner Aktivität möglich erscheinen. Das Zwei-Komponenten-System RegB/RegA ist für die Ausbildung des Photosyntheseapparates unter anaeroben Bedingungen verantwortlich (Cohen-Bazire et al., 1957; Sganga und Bauer, 1992; Bauer, 1995; Bauer und Bird, 1996). Die membranintegrale Sensorkinase RegB überträgt nach ihrer Autophosphorylierung unter anaeroben Bedingungen eine Phosphorylgruppe auf den Asparaginsäurerest in der "receiver"-Domäne von RegA. Der Phosphorylierungszustand des Regulator-Proteins RegA kontrolliert die Transkription des *puf/puc*-Operons, das die Polypeptide des Reaktionszentrums sowie Pigment-bindende Proteine (LHI und LHII) kodiert (Sganga und Bauer, 1992; Mosley et al., 1994). Im Hinblick auf die Regulation der DNS-Bindeaffinität von TTP30 ist eine mögliche Interaktion mit der potentiellen Sensorkinase AMS9 denkbar (siehe unten).

TTP30 als möglicher Interaktionspartner von AMS9

Für die Existenz eines plastidären Zwei-Komponenten-Systems unter Beteiligung von TTP30 als potentiell Transkriptionsfaktor spricht die Isolierung seiner cDNS mit dem Antikörper gegen die Histidinkinase slr0311 aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Die Bispezifität des Antikörpers gegen das cyanobakterielle Homologe von AMS9 beruht offenbar nicht auf der strukturellen Ähnlichkeit der α -helikalen Strukturelemente TPR-Motiv aus TTP30 und Leucin-"zipper"-Modul aus slr0311. Einblick in eine mögliche funktionelle Beziehung beider plastidärer Komponenten im Sinne eines klassischen Zwei-Komponenten-Systems sollte daher der Nachweis der "response regulator"-Eigenschaften von TTP30 und der Autophosphorylierung des cyanobakteriellen Homologs von AMS9 geben.

Regulator-Proteine von Zwei-Komponenten-Systemen können durch die Übertragung einer Phosphorylgruppe vom Histidinrest der zugehörigen Sensorkinase auf den Asparaginsäurerest in ihrer "receiver"-Domäne identifiziert werden. Die spezifische Sensorkinase eines pflanzlichen Zwei-Komponenten-Systems kann dabei oftmals durch eine prokaryotische Histidinkinase ersetzt werden (Imamura et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde eine N-terminal trunckate Form der Sensorkinase EnvZ aus *E. coli* als Phosphodonor verwendet. Die potentiellen "response regulator"-Eigenschaften des rekombinanten TTP30-Vorläufers bestätigten sich im Rahmen des Phosphotransferexperimentes jedoch nicht. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten:

- a. die trunckate Sensorkinase EnvZ aus *E. coli* erkennt die potentielle Phosphorylierungsstelle (D95) des rekombinanten TTP30-Vorläufers nicht als Substrat;
- b. die potentielle Phosphorylierungsstelle des rekombinanten Vorläufers ist konformationsbedingt nicht zugänglich;

- c. Phosphoasparaginsäure hydrolysiert unter milden Bedingungen im Gegensatz zu Phosphoserin, -threonin oder -tyrosin rasch (Fujitaki und Smith, 1984; Martensen, 1984); Dauer und Temperatur der SDS-PAGE beeinflussen daher die Stabilität phosphorylierter Reste.

Sowohl Sensorkinasen als auch Regulator-Proteine besitzen zudem eine (Auto-) Phosphataseaktivität (Egger et al., 1997; Forst und Roberts, 1994; Pratt und Silhavy, 1995; Zhu et al., 2000). Darüber wird *in vivo* die phosphorylierungsabhängige Aktivität des Regulator-Proteins moduliert (Perego und Hoch, 1996). Das Ausmaß der Autophosphataseaktivität eines "response regulators" ist wiederum von der Natur der Aminosäurereste in der Nähe der konservierten Phosphorylierungsstelle abhängig (Hess et al., 1988; Zapf et al., 1998). Ineffiziente Autophosphatasen ($t_{1/2} > 60$ Min), wie OmpR, zeichnen sich durch Aminosäurereste mit langen Seitenketten nahe der Phosphorylierungsstelle aus (Igo et al., 1989). Effiziente Autophosphatasen ($t_{1/2} < 1$ Min), wie CheY, besitzen dagegen Carboxyamid- oder Carboxylatseitenketten (Hess et al., 1988). In direkter Nachbarschaft der potentiellen Phosphorylierungsstelle von TTP30 (D95) befinden sich stark hydrophobe Aminosäurereste mit aromatischen Seitenketten (F94 und W96). TTP30 sollte somit zur Gruppe von Regulator-Proteinen mit ineffizienter Autophosphataseaktivität gehören. Die Autodephosphorylierung des rekombinanten Vorläuferproteins während des Phosphotransferexperimentes wäre dann auszuschließen. Die fehlende Autophosphorylierung der rekombinanten Sensorkinase slr0311 ist vermutlich auf die Prozessierung des rekombinanten Proteins im prokaryotischen Expressionssystem zurückzuführen. Die Verkürzung erfolgt wahrscheinlich C-terminal und zerstört dadurch die Kinasedomäne. Aus diesem Grund konnte keine Phosphorylgruppenübertragung zwischen der cyanobakteriellen Histidinkinase und dem rekombinanten TTP30-Vorläufer nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse lassen letztlich keine Aussage über eine funktionelle Beziehung zwischen TTP30 und AMS9 *in vivo* zu. Die Isolierung der AMS9-cDNS und die subplastidäre Lokalisation von TTP30 sind wichtige Voraussetzungen für ihre eindeutige Identifizierung als Bestandteile eines plastidären Signaltransduktionssystems.

Die Analyse transgener *Arabidopsis*-Pflanzen, in denen der Gehalt an endogener TTP30-mRNS entweder reprimiert oder erhöht werden sollte, konnte keinen Einblick in die funktionelle Rolle von TTP30 *in vivo* geben. Obwohl die "Southern"-Analysen die Integration der T-DNS-Konstruktionen für die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts für TTP30 in das Genom der transgenen Pflanzen belegen, konnte unter den untersuchten Wachstumsbedingungen kein Einfluß auf den Phänotyp herbizidresistenter Pflanzen der T1- oder T2-Generation festgestellt werden. Das bedeutet, daß die Repression der endogenen TTP30-mRNS durch das partiell exprimierte Antisens-Transkript entweder (a) keinen Einfluß auf vitale Funktionen in der Pflanzenzelle hat, (b) sich erst unter Streßbedingungen, wie z.B. Hitze, auf das Wachstum der Pflanzen auswirkt, oder (c) gar nicht oder nur unvollständig erfolgt ist. In der Literatur gehen die Angaben über die Natur und Länge der cDNS-Sequenzen, deren Transkription zu einer optimalen

Repression der endogenen mRNA führt, weit auseinander (siehe Übersichtsartikel von Bourque, 1995). Aufgrund der limitierten Anzahl an geeigneten Schnittstellen im binären Vektor pGPTV-bar 35S-nos konnte nur der 5'-terminale Abschnitt (540 bp) der cDNS-Sequenz von TTP30 aus *A. thaliana* L. in Antisens- bzw. Sens-Orientierung kloniert werden. Unklar bleibt, ob das partiell exprimierte Antisens-Transkript ausreicht, um die endogene TTP30-mRNA weitgehend zu reprimieren. Aus den "Northern"-Analysen geht nicht eindeutig hervor, inwieweit sich seine Expression auf den Gehalt an endogener TTP30-mRNA auswirkt. Da es sich um ein kernkodiertes Protein handelt, muß selbst in Wildtyp-Pflanzen mit einer vergleichsweise geringen Transkriptmenge gerechnet werden. Suboptimale RNS-Konzentrationen könnten daher eine mögliche Ursache für das Auftreten unspezifischer Signale in der "Northern-Analyse" trotz stringenter Hybridisierungsbedingungen sein. Durch die Vorinkubation der "Northern"-Membranen mit 16S rRNA konnte das Ausmaß einer unspezifischen Hybridisierung der TTP30-RNS-Sonden mit ribosomaler RNS reduziert werden. Das partiell exprimierte Sens-Transkript war dagegen vermutlich instabil und wurde in den transgenen Pflanzen rasch abgebaut.

4.2.2 Regulatorische Funktion des komplexen Immunophilins TLP40 in der thylakoidalen Signaltransduktion

Mit TLP40 ist ein weiteres kernkodiertes Polypeptid mit komplexer Struktur im plastidären Kompartiment identifiziert worden (Fulgosi et al., 1998). Die Kombination der C-terminalen, Immunophilin-ähnlichen Domäne mit einem N-terminalen Protein-Protein-Interaktionsmodul, bestehend aus Leucin-"zipper"-Motiv und drei damit teilweise überlappenden, mutmaßlichen Phosphatasebindestellen, ist von keiner der bislang im Thylakoidlumen höherer Pflanzen identifizierten Komponenten bekannt. Einfache Immunophiline mit Molekulargewichten zwischen 10 und 20 kDa sind bereits aus den Chloroplasten von *Vicia faba* L. (pCyP B, Luan et al., 1994) und *A. thaliana* L. (ROC4, Lippuner et al., 1994; FKBP13, Gupta et al., 2000) isoliert worden.

Viele der bisher in Pflanzenzellen identifizierten Immunophiline werden von einer Genfamilie kodiert, wie z.B. die ROC-Cyclophiline aus *A. thaliana* L. (Lippuner et al., 1994; Chou und Gasser, 1997; Jackson und Söll, 1999). In den Genomen von Spinat und *A. thaliana* L. scheint dagegen nur ein einziges Gen für das komplexe Immunophilin TLP40 zu existieren. Die genomische Sequenz des *Arabidopsis*-Homologs (AC009325.6) enthält 6 Intronsequenzen, die für plastidäre Cyclophiline charakteristisch sind (Chou und Gasser, 1997). Intronsequenzen finden sich auch in den Cyclophilin-Genen der Pilze *Neurospora crassa* und *Tolyocladium niveum* sowie in *ninaA* von *Drosophila* und dem menschlichen Cyclophilin A (Tropschug, 1990; Schneuwly et al., 1989). Die fehlende Kolinearität der Intronpositionen in den Cyclophilin-Genen verschiedener Organismenreiche deutet auf einen phylogenetisch unabhängigen Ursprung hin (Chou und Gasser, 1997).

TLP40 wird aufgrund der strukturellen Eigenschaften seiner C-terminalen Domäne zur Familie der Cyclophiline (CyPs) gerechnet, deren Rotamaseaktivität (Peptidyl-prolyl *cis-trans*-Isomerase- oder PPIase-Aktivität) durch Ausbildung stöchiometrischer Komplexe mit dem Immunsuppressor Cyclosporin A (CsA) inhibiert wird (Schreiber, 1991; Schreiber et al., 1992). CYP/CsA-Komplexe beeinflussen ihrerseits Calcium-vermittelte Signaltransduktionsprozesse durch ihre Interaktion mit der Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängigen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2B (Calcineurin; Walsh et al., 1992). Die geringe Sensitivität von TLP40 gegenüber nanomolaren CsA-Konzentrationen ist ein charakteristisches Merkmal prokaryotischer Rotamasen. Diese Eigenschaft wird auf das Fehlen eines Tryptophanrestes zurückgeführt, der in den meisten eukaryotischen PPIasen konserviert ist und für die Erkennung des Immunsuppressors essentiell sein soll (Liu et al., 1991b). Die fehlende Beziehung zwischen plastidären und eubakteriellen CYP-Genen läßt vermuten, daß plastidäre Cyclophiline eukaryotischen Ursprungs sind und nicht vom Endosymbionten abstammen (Chou und Gasser, 1997). Bislang ist unklar, ob der äquivalente Leucinrest an Position 394 in der C-terminalen Rotamasedomäne von TLP40 auf eine Punktmutation zurückzuführen ist und die Ausbildung eines TLP40/Effektorkomplexes verhindert. Möglicherweise ist (a) die Ausbildung eines solchen Komplexes keine Voraussetzung für die potentielle regulatorische Interaktion von TLP40 mit der von Vener et al. (1999) identifizierten, membranintegralen Proteinphosphatase vom Typ 2A oder (b) es existiert ein bislang nicht identifiziertes Effektormolekül. Für ersteren Fall spricht die Tatsache, daß die Immunophiline Cyclophilin A und FKBP12 auch in Abwesenheit ihrer spezifischen Immunsuppressiva (CsA bzw. FK506) mit Calcineurin interagieren können (Cardenas et al., 1994).

Subplastidäre Lokalisation von TLP40

Der Nachweis des komplexen Immunophilins TLP40 im Lumen von Stromathylakoiden aus Spinatchloroplasten ließ die Frage nach der physiologischen Bedeutung eines Faltungskatalysators in diesem plastidären Kompartiment aufkommen, das in seiner Bedeutung lange Zeit unterschätzt worden ist. In den letzten Jahren sind mehr als 25 verschiedene Polypeptide im Thylakoidlumen identifiziert worden (Kieselbach et al., 1998; Peltier et al., 2000), darunter auch ein einfaches Immunophilin der FKBP-Familie in *A. thaliana* L. (FKBP13, Gupta et al., 2000). Auf welche Weise TLP40 in das Lumen von Thylakoidmembranen importiert wird, ist bislang unklar. Die Translokation des *in vitro* translatierten TLP40-Vorläufers über die photosynthetische Membran wurde sowohl durch Effektoren des ΔpH - als auch des Sec-abhängigen Weges beeinflusst. Für die Sec-abhängige Importroute spricht das Fehlen eines Zwillings-Arginin-Motivs vor der hydrophoben H-Domäne und die überwiegend neutralen Aminosäurereste in der polaren C-Domäne des Transitpeptids von TLP40. Das Zwillings-Arginin-Motiv ist für Polypeptide charakteristisch, deren Translokation über die photosynthetische Membran einen transthylakoidalen Protonengradienten erfordert (Robinson et al., 1998), obwohl Ausnahmen davon bekannt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

zeigen, daß die bipartite Transitsequenz allein nicht für eine effiziente Translokation von TLP40 in das Thylakoidlumen ausreicht. Die Fusion seiner C-terminalen Rotamasedomäne mit dem Transitpeptid von Plastocyanin, das ebenfalls im Thylakoidlumen lokalisiert ist, führte zur Akkumulation des chimären Proteins im Stroma. Das deutet auf weitere strukturelle Merkmale in der N-terminalen Domäne von TLP40 hin, die für die Translokation über die photosynthetische Membran essentiell sind.

Regulatorische Funktion von TLP40

Für die Koordination der Stabilität, der Degradation und des Umsatzes des PSII-Reaktionszentrums hat die Aufreinigung von TLP40 mit der Aktivität einer membranintegralen Proteinphosphatase vom Typ 2A und die Identifizierung von drei potentiellen Phosphatasebindestellen innerhalb seiner N-terminalen Domäne weitreichende Konsequenzen (Vener et al., 1999). In seiner membrangebundenen Form ist TLP40 mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex in den ungestapelten Regionen der Thylakoidmembranen assoziiert. Der Cytochrom *b/f*-Komplex ist der einzige Proteinkomplex, der in der photosynthetischen Membran nahezu homogen verteilt ist (Andersson und Anderson, 1980). Die Diskriminierung der Komplexe in den Granastapeln steht daher möglicherweise mit einer lateral heterogenen Verteilung der membranintegralen Proteinphosphatase im Zusammenhang. Dieselben Faktoren, die die Rotamaseaktivität von TLP40 und seine Interaktion mit der Innenseite der Thylakoidmembran modulieren, wirken sich unmittelbar auf die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine aus. Die Korrelation zwischen reversibler Membranassoziation, Rotamaseaktivität und Dephosphorylierungsrate legt eine regulatorische Interaktion von TLP40 und einer Thylakoid-integralen Proteinphosphatase in den ungestapelten Stromalamellen nahe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von TLP40 an die Innenseite der Thylakoidmembran mit Hilfe des Zwei-Phasen-Polymersystems unter Verwendung von "inside-out"-Vesikeln nachgewiesen. Bei dieser Vesikelpopulation ist die Innenseite der Thylakoidmembran nach außen gekehrt, und potentielle Bindestellen sind zugänglich. Zur Identifizierung essentieller Interaktionsbereiche von TLP40 wurde die N-terminale Leucin-"zipper"-Domäne mit den mutmaßlichen Phosphatasebindestellen deletiert bzw. durch Punktmutationen zerstört. Für die Durchführung von *in vitro*-Bindestudien im wässrigen Zwei-Phasen-Polymersystem stehen damit fünf verschiedene, rekombinante Deletions- und vier Punktmutanten zur Verfügung. Ihre Aufreinigung unter nativen Bedingungen wird allerdings dadurch erschwert, daß die rekombinanten Polypeptide im prokaryotischen Expressionssystem größtenteils in der unlöslichen Proteinfraction abgelagert werden. Das kann sich vor allem auf die Ausbeute der rekombinanten Polypeptide, die in Fusion mit der Glutathionsulfotransferase (GST) exprimiert werden, negativ auswirken. Von der Verwendung denaturierender Agentien, wie z.B. Harnstoff, ist abzusehen, da diese die Bindung der GST-Domäne an die Sepharose-Matrix stören und zum Verlust der Rotamaseaktivität führen können. Die fehlende Aktivität der rekombinanten

Deletions- bzw. Punktmutanten in dieser Arbeit ist entweder (a) auf die Deletion für die Rotamaseaktivität wichtiger Domänen bzw. Aminosäurereste, (b) auf das Fehlen eines essentiellen Effektormoleküls (siehe oben) oder (c) auf ihre unzureichende Faltung in *E. coli* zurückzuführen. Die Ergebnisse von Gasser et al. (1990) zeigen, daß rekombinante, pflanzliche Immunophiline im prokaryotischen Expressionssystem prinzipiell rotamaseaktiv gefaltet werden können. Entscheidend ist, welcher Anteil des rekombinanten Proteins aktiv in der löslichen Fraktion vorliegt. Möglicherweise erfordert die Rotamaseaktivität von TLP40 zudem eine Leucin-"zipper"-vermittelte Homodimerisierung des Proteins.

Ob die Rotamaseaktivität von TLP40 eine Voraussetzung für seine Interaktion mit der Thylakoidmembran und die Modulation der Phosphataseaktivität ist, ist derzeit unklar. Die *cis-trans*-Isomerisierung einer Xaa-Pro-Bindung in einer lumenal exponierten Domäne der thylakoidalen Phosphatase könnte Konformationsänderungen induzieren, durch die die katalytische Aktivität des Enzyms auf der stromalen Seite der photosynthetischen Membran inhibiert wird. Einen ähnlichen Effekt könnte die Assoziation von TLP40 mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex oder der Lipidphase in der Nähe der membranintegralen Proteinphosphatase haben. Die Funktion des Cytochrom *b/f*-Komplexes in diesem transmembranen Signaltransduktionsmechanismus, der einer redoxkontrollierten Aktivierung der membranintegralen Proteinkinase ähnelt (Vener et al., 1997), ist offen. Die Auswirkung eines Cytochrom *b/f*-Defektes auf die subthylakoidale Verteilung und die regulatorische Interaktion des TLP40/Phosphatase-Systems konnte durch die serologische Analyse der Cytochrom-Mutanten $\Delta petA$ bzw. $\Delta petD$ aus *Nicotiana tabacum* L. im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Der Antikörper gegen TLP40 aus Spinat erkannte kein homologes Protein in Tabak, und das heterologe Antiserum gegen die katalytische Untereinheit der menschlichen Proteinphosphatase vom Typ 2A war für den Nachweis der minoren pflanzlichen Komponente ungeeignet.

Das Konzept einer regulatorischen Interaktion zwischen Cyclophilinen und Proteinphosphatasen wird durch das kürzlich in *A. thaliana* L. identifizierte Cyclophilin ROC7 unterstützt (Jackson und Söll, 1999). Seine Interaktion mit der katalytischen Untereinheit einer cytoplasmatischen Proteinphosphatase vom Typ 2A soll auxinabhängige Wachstumsprozesse beeinflussen. Die Expression des ROC7-Antisens-Transkripts führt zu verstärktem Wurzelwachstum, beeinflusst aber den Auxintransport innerhalb der Pflanze nicht. Die Insertion der T-DNS-Konstruktionen für die Expression des Antisens- bzw. Sens-Transkripts für TLP40 in das Genom von *A. thaliana* L. hatte dagegen unter moderaten Wachstumsbedingungen keinen Einfluß auf den Phänotyp der Pflanzen. Immunophiline sind für das Überleben einer Pflanzenzelle unter moderaten Bedingungen im allgemeinen nicht essentiell, spielen aber vermutlich für Faltungs- und Assemblierungsprozesse in Streßsituationen eine entscheidende Rolle (Dolinski et al., 1997). Möglicherweise wirkt sich die Repression bzw. die Erhöhung des endogenen TLP40-mRNS-Spiegels durch das Antisens- bzw. Sens-Transkript erst unter Streßbedingungen, wie z.B. Hitze oder anhaltend hohe Lichtintensitäten, auf das Wachstum der Pflanzen aus.

Im Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 existiert ein homologes Gen für TLP40 aus Spinat, das ein überwiegend hydrophiles Protein von ca. 44 kDa kodiert. Die Zerstörung des Gens für das cyanobakterielle Homologe *sll0408* in *Synechocystis* sp. PCC6803 sollte daher zum Verständnis der funktionellen Rolle von TLP40 im Lumen von Spinatchloroplasten beitragen. Im Gegensatz zu TLP40 besitzt die cyanobakterielle Rotamase keinen N-terminalen Leucin-"zipper" und enthält nur eine potentielle Phosphatasebindestelle. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, daß die Zerstörung des *sll0408*-Gens die Sensitivität der Rotamase mutante gegenüber hohen Lichtintensitäten erhöht. Dieser Effekt, dessen molekulare Einzelheiten bislang noch offen sind, kann durch die gleichzeitige Einwirkung niedriger Umgebungstemperaturen verstärkt werden. Tiefe Temperaturen vermindern die photosynthetische Elektronentransportrate. Es kann zur Überreduktion des Plastochinon-"pools" und schließlich zur Photoinhibition kommen. Cyanobakterien weisen keine strukturelle Organisation der Thylakoidmembran in gestapelte und ungestapelte Regionen auf. Eine Phosphorylierung von PSII-Polypeptiden wurde bisher nicht nachgewiesen (Allen, 1992; Mann, 1994). Auf welche Weise die Stabilität, die Degradation und der Umsatz des D1-Polypeptids in diesen Organismen koordiniert werden, ist nicht vollständig aufgeklärt. Komenda et al. (1999, 2000) konnten kürzlich zeigen, daß sich die Synthese des D1-Polypeptids stimulierend auf seine Degradation auswirkt. Indem die Verfügbarkeit einer neusynthetisierten Untereinheit den Abbau eines geschädigten D1-Polypeptids zu regulieren scheint, wird eine vollständige Degradation des PSII-Holo Komplexes verhindert. Die Stabilität der *psbA*-mRNS wird zudem durch den Redoxzustand der photosynthetischen Elektronentransportkette reguliert (Alfonso et al., 2000).

Die genannten strukturellen Unterschiede zwischen der cyanobakteriellen Rotamase und ihrem potentiellen, pflanzlichen Homolog und die fehlende Phosphorylierung von Polypeptiden des PSII-Reaktionszentrums in Blaualgen lassen vermuten, daß *sll0408* und TLP40 an unterschiedlichen Regulationsmechanismen mitwirken. Der Verlust der cyanobakteriellen Rotamase kann vermutlich nicht zur Aufklärung der funktionellen Rolle von TLP40 im Thylakoidlumen von Spinatchloroplasten beitragen, wohl aber Einblick in den phylogenetischen Ursprung dieses komplexen Immunophilins geben.

4.3 Ausblick

Um zu verstehen, auf welche Weise die Dynamik der photosynthetischen Membran durch die Phosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen moduliert wird, müssen (a) die Identität der Zielproteine und ihrer Phosphorylierungsstellen, (b) die Effekte ihrer posttranslationalen Modifikation, (c) die Natur und subplastidäre Lokalisation der verantwortlichen Proteinkinasen und -phosphatasen sowie (d) die Regulationsmechanismen, die ihre Aktivität modulieren, aufgeklärt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auf, wie komplex thylakoidale Signaltransduktionsprozesse und ihre Regulation sind. Neben reversiblen Proteinphosphorylierungen spielen Protein-Protein-Interaktionen in dem zellulären Signaltransduktions-

Netzwerk eine zentrale Rolle. Nach den derzeitigen Erkenntnissen nehmen Proteine mit mehr als einer funktionellen Domäne dabei eine Schlüsselposition ein, insbesondere in der Koordination verschiedener zellulärer Signaltransduktionswege.

Mit den kernkodierten Polypeptiden TTP30 und TLP40 sind zwei plastidäre Komponenten mit bemerkenswert komplexer Struktur identifiziert worden. Ihre α -helikalen Protein-Protein-Interaktionsmodule, TPR-Motiv bzw. Leucin-"zipper"-Domäne, könnten nicht nur die Aktivität einzelner Zielproteine modulieren, sondern auch die Assemblierung/Disassemblierung makromolekularer Proteinkomplexe vermitteln. Die komplexe Struktur der beiden Polypeptide scheint für Spinatchloroplasten charakteristisch zu sein. Im Genom anderer höherer Pflanzen, wie z.B. *A. thaliana* L., findet sich weder für TTP30 noch für TLP40 ein homologes Protein mit exakt der gleichen Domänenstruktur. Für die Aufklärung der funktionellen Rolle von TTP30 und TLP40 in Spinatchloroplasten ist die Isolierung ihrer genomischen DNS-Sequenzen eine wichtige Voraussetzung. Die Analyse der Promotorregionen der für sie kodierenden Gene kann Aufschluß darüber geben, auf welche Weise ihre Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Licht-, Temperatur- und Nährstoffbedingungen zeitlich und räumlich reguliert wird.

Die Identifizierung potentieller Interaktionspartner von TTP30 und TLP40 gestaltet sich aufgrund ihrer komplexen Struktur schwierig. Um physiologisch nicht relevante Protein-Protein-Interaktionen auszuschließen, müssen trunkate Formen von TTP30 und TLP40 mit deletierten Interaktionsmodulen als Negativkontrollen sowie verlässliche Positivkontrollen für die Funktionsfähigkeit des zu entwickelnden Testsystems hergestellt werden. Interagierende Moleküle könnten beispielsweise über (a) das Zwei-Phasen-Polymersystem, (b) die BIACORE-Technologie oder (c) das Hefe "two-hybrid"-System identifiziert werden. Punktmutationen zur Identifizierung für die Interaktion essentieller Reste sollten in die genomische Sequenz von TLP40 (Einzelkopiegen) eingeführt werden, um ihren Effekt *in vivo* untersuchen zu können. Voraussetzung hierfür ist die Etablierung eines geeigneten Transformationssystems für *S. oleracea* L. Für TTP30 existieren vermutlich mehrere Kopien im Genom von Spinat, so daß die Gendisruptionsstrategie wenig sinnvoll erscheint.

Neben Expressions- und Interaktionsstudien muß ein weiterer Schwerpunkt auf der Untersuchung der Mechanismen liegen, welche die Aktivität von TTP30 und TLP40 im plastidären Kompartiment kontrollieren. Ihre Aktivität kann vermutlich nicht nur durch Homodimerisierung, vermittelt über TPR- bzw. Leucin-"zipper"-Domäne, oder ihre Interaktion mit anderen (regulatorischen) Proteinen oder Effektormolekülen moduliert werden, sondern auch durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. reversible Phosphorylierung.

5. Zusammenfassung

Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensweise an die Bedingungen ihres Standortes gebunden. Zur Aufrechterhaltung ihrer photosynthetischen Effizienz, insbesondere unter transienten Veränderungen des Lichtregimes, haben höhere Pflanzen eine Reihe molekularer Anpassungsmechanismen entwickelt, die sowohl kurz- als auch längerfristige Adaptationen des Photosyntheseapparates ermöglichen. Für die einzigartige Dynamik der photosynthetischen Membran höherer Pflanzen spielen die reversible Phosphorylierung von Thylakoidmembranproteinen und komplexe Protein-Protein-Interaktionen unter Beteiligung multifunktionaler, regulatorischer Proteine herausragende Rollen. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Identifikation und die funktionelle Charakterisierung minorer Komponenten des plastidären Kompartiments, vor allem der Thylakoidmembran, weitere Erkenntnisse zur Aufklärung der Signaltransduktionsmechanismen beizutragen, die die Lichtenergie mit physiologischen Reaktionen verknüpfen. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Die Existenz multipler, membranintegraler Proteinkinasen in den Thylakoidmembranen aus Spinatchloroplasten wurde durch den Nachweis von sechs minoren, kinaseaktiven Polypeptiden in Cytochrom *b/f*-Komplex-angereicherten, subthylakoidalen Fraktionen bekräftigt. Die Instabilität der in Abwesenheit des Kinasesubstrats HistonIII-S renaturierten Aktivitäten im basischen Milieu spricht für eine Autophosphorylierung der potentiellen Proteinkinasen an Serin- oder Threoninresten.
2. Die 64 kDa-Komponente AMS6 wurde mit dem monospezifischen Antikörper gegen den N-Terminus seiner Aminosäuresequenz als membranintegrale Komponente gestapelter Regionen der Thylakoidmembran identifiziert. AMS6 ist weder mit der phosphorylierbaren Polyphenoloxidase noch der redoxkontrollierten LHCII-Kinase identisch, was mit Hilfe hochauflösender Gelsysteme bzw. durch Perfusionschromatographie subthylakoidaler Thylakoidmembranfraktionen gezeigt wurde. Die funktionelle Rolle von AMS6, dessen Assoziation mit dem trimeren LHCII-Komplex, nicht aber mit PSII-LHCII-Superkomplexen nachgewiesen werden konnte, ist unklar. Eine mögliche regulatorische Rolle der 64 kDa-Komponente in der Modulation des Absorptionsquerschnittes am PSII wird diskutiert.
3. Die potentielle Sensorkinase AMS9 (58 kDa) wurde mit dem heterologen Antikörper gegen das mutmaßliche cyanobakterielle Homologe slr0311 als periphere Komponente der Thylakoidmembran identifiziert. Die Interaktion mit der Stromaseite der photosynthetischen Membran erfolgte über schwache hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen. Die Akkumulation von AMS9 in den ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran war konsistent mit seiner Assoziation mit dem PSI. Die mögliche Funktion von AMS9 als Sensorkinase eines thylakoidalen Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystems unter Beteiligung des komplexen Polypeptids TTP30 wurde am Beispiel des rekombinanten

cyanobakteriellen Homologen untersucht. Die Zerstörung des *slr0311*-Gens im Genom von *Synechocystis* sp. PCC6803 eignete sich unter den Versuchsbedingungen jedoch nicht zur Aufklärung der physiologischen Rolle von AMS9 in Spinatchloroplasten.

4. Das komplexe Polypeptid TTP30, für das in den Genomen von *Spinacia oleracea* L. und *Arabidopsis thaliana* L. mehr als ein Gen existiert, wurde durch den *in organello*-Import des *in vitro*-translatierten Vorläufers als plastidäre Komponente identifiziert. Das importierte Protein konnte über einen kurzen hydrophoben Abschnitt am C-Terminus mit der Thylakoidmembran interagieren. Die Deletion des potentiellen Membranankers führte zur Akkumulation des C-terminal verkürzten Proteins im Stroma. Die proteolytischen Erkennungssequenzen seiner größeren hydrophilen Domäne waren der Protease-Aktivität im Stroma durch die räumliche Anordnung des charakteristischen, zentralen Tetratricopeptid-"repeat"-Moduls vermutlich nur bedingt zugänglich.
5. Der polyklonale Antikörper gegen den rekombinanten TTP30-Vorläufer identifizierte ein 34 kDa-Polypeptid im Stroma von Spinatchloroplasten, ein Ergebnis, das der thylakoidalen Lokalisation des *in vitro* importierten Proteins widersprach. Als möglicher Faktor, welcher die Spezifität des Antikörpers neben der komplexen Struktur des Vorläuferproteins beeinflussen könnte, wurde die Bindung von Calciumionen an das mutmaßliche "helix-loop-helix"-Motiv in der N-terminalen Domäne von TTP30 untersucht.
6. Die DNS-Bindeaktivität des mutmaßlichen "helix-loop-helix"-Motivs von TTP30 wurde durch die "South-Western"-Analyse nachgewiesen. Der rekombinante TTP30-Vorläufer konnte Plastiden-DNS aus Spinatchloroplasten *in vitro* spezifisch binden. Seine säurestabile *in vitro*-Phosphorylierung sprach für die Regulation der potentiellen DNS-Bindeaktivität durch die posttranslationale Modifikation eines Serin- oder Threoninrestes. Eine mögliche Modulation seiner Aktivität im Sinne eines klassischen Zwei-Komponenten-Systems bestätigte sich nicht. Der Asparaginsäurerest D95 in der N-terminalen, "response regulator"-ähnlichen Domäne des rekombinanten Vorläufers übernahm *in vitro* keine Phosphorylgruppe von der prokaryotischen Sensor kinase EnvZ.
7. Mit dem kernkodierten Immunophilin TLP40 ist eine weitere plastidäre Komponente mit komplexer, molekularer Struktur untersucht worden. Das Protein war in seiner temporär membrangebundenen Form mit dem Cytochrom *b/f*-Komplex in den ungestapelten Regionen der Thylakoidmembran assoziiert. Seine lateral heterogene Verteilung und die Diskriminierung der Komplexe in den Granastapeln wurden im Zusammenhang mit der regulatorischen Interaktion von TLP40 und einer thylakoidalen Serin-/Threoninphosphatase vom Typ 2A untersucht.

8. Die reversible Interaktion von TLP40 im Thylakoidlumen mit der Innenseite der photosynthetischen Membran aus Spinatchloroplasten wurde in einem Zwei-Phasen-Polymersystem unter Verwendung von "inside-out"-Membranvesikeln nachgewiesen. Zur Identifikation essentieller Interaktionsbereiche wurden verschiedene rekombinante Deletions- und Punktmutanten von TLP40 hergestellt, die entweder keinen funktionellen Leucin-"zipper" besaßen und/oder denen die mutmaßlichen Phosphatasebindestellen im N-terminalen Abschnitt fehlten.
9. Das Gleichgewicht zwischen "freiem" TLP40 und seiner membranassoziierten Form konnte *in vitro* durch submillimolare Cyclosporin A-Konzentrationen zugunsten des "freien" Anteils verschoben werden. Die reversible Interaktion von TLP40 mit der Innenseite der Thylakoidmembran beeinflusste die Dephosphorylierungsrate thylakoidaler Phosphoproteine und war ein weiterer Hinweis auf eine regulatorische Interaktion des komplexen Immunophilins im Thylakoidlumen mit einer membranintegralen Proteinphosphatase vom Typ 2A.
10. Das Modell der transmembranen Signaltransduktion, die über die katalytische Aktivität der membranintegralen Proteinphosphatase auf der Stromaseite die Stabilität, die Degradation und den Umsatz der Polypeptiduntereinheiten des PSII-Holokomplexes koordinieren soll, wurde anhand zweier molekularbiologischer Ansätze untersucht. Weder die Expression der Antisens- bzw. Sens-RNS für TLP40 in *A. thaliana* L. noch die Inaktivierung des Gens für das potentielle cyanobakterielle Homologe *sll0408* konnten jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen einen detaillierteren Einblick in die physiologische Bedeutung des komplexen Immunophilins TLP40 im Thylakoidlumen von Spinatchloroplasten geben.

6. Literaturverzeichnis

- Adam, Z. 1996:** Protein stability and degradation in chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 32: 773 - 783
- Adam, Z. 2000:** Chloroplast proteases: possible regulators of gene expression? *Biochim.* 82: 647 - 654
- Aiba, H., Mizuno, T., Mizushima, S. 1989:** Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 8563 - 8567
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Patel, Y. 1995:** 14-3-3 α and δ are the phosphorylated forms of Raf-activating 14-3-3 β and ζ . *J. Biol. Chem.* 270: 5706 - 5709
- Alfonso, M., Perewoska, I., Kirilovsky, D. 2000:** Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Involvement of the cytochrome *b₆f* complex. *Plant Physiol.* 122: 505 - 515
- Allen, J.F. 1992:** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275 - 335
- Allen, M.M. 1968:** Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *J. Phycol.* 4: 1 - 4
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990:** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997:** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389 - 3402
- Andersson, B. 1986:** Characterization of the thylakoid membrane by subfractionation analyses. *Meth. Enzymol.* 118: 325 -338
- Andersson, B., Anderson, J.M. 1980:** Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 593: 427 - 440
- Andersson, B., Aro, E.-M. 1997:** Proteolytic activities and proteases of plant chloroplasts. *Physiol. Plant* 100: 780 - 793
- Andersson, B., Barber, J. 1996:** Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. In: *Advances in Photosynthesis V.* Baker, N. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 101 - 121
- Anderson, J.M., Park, Y.I., Soon, W.S. 1998:** Unifying model for the photoinactivation of photosystem II *in vivo* under steady-state photosynthesis. *Photosynth. Res.* 56: 1 - 13
- Appelby, J.L., Parkinson, J.S., Bourret, R.B. 1996:** Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86: 845 - 848
- Arellano, J.B., Schröder, W., Sandmann, G., Chueca, A., Barón, M. 1994:** Removal of nuclear contaminants and of non-specifically photosystem II-bound copper from photosystem II preparations. *Physiol. Plantarum* 91: 369 - 374
- Arnon, D.I. 1949:** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1 - 15

- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B. 1993:** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113 – 134
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D, Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1993:** *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York
- Bachmann, M., Huber, J.L., Liao, P.-C., Gage, D.A., Huber, S.C. 1996:** The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves is a 14-3-3 protein. *FEBS Lett.* 387: 127- 131
- Baena-Gonzalez, E., Barbato, R., Aro, E.-M. 1999:** Role of phosphorylation in repair cycle and oligomeric structure of photosystem two. *Planta* 208: 196 - 204
- Baginski, S., Tiller, K., Link, G. 1997:** Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol. Biol.* 34: 181 - 189
- Baginski, S., Tiller, K., Pfannschmidt, T., Link, G. 1999:** PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid *in vitro* transcription. *Plant Mol. Biol.* 39: 1013 - 1023
- Barber, J., Nield, J., Morris, E.P., Zheleva, D., Hankammer, B. 1997:** The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiol. Plant.* 100: 817 - 827
- Barford, D. 1996:** Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci.* 21: 407 - 412
- Bauer, C.E. 1995:** Regulation of photosynthesis and gene expression. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. Blankenship, R.E., Madigan, M., Bauer, C.E. (eds.), Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands: 1221 - 1234
- Bauer, C.E., Bird, T.H. 1996:** Regulatory circuits controlling photosynthesis gene expression. *Cell* 85: 5 - 8
- Bechthold, N., Ellis, J., Pelletier, G. 1993:** *In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comt. Rend. Acad. Life Sci.* 316: 1194 - 1199
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R. 1992:** New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20: 1195 - 1197
- Becraft, P.W. 1998:** Receptor kinases in plant development. *Trends Plant Sci.* 3: 384 - 388
- Bennett, J. 1979:** Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependend. *FEBS Lett.* 103: 342 - 344
- Bennett, J. 1980:** Chloroplast phosphoproteins: Evidence for a thylakoid-bound phospho-protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.* 104: 85 - 89
- Bennett, J. 1991:** Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 281 - 311
- Bergantino, E., Dainese, P., Cerovic, Z., Sechi, S., Bassi, R. 1995:** A post-translational modification of the photosystem II subunit CP29 protects maize from cold stress. *J. Biol. Chem.* 270: 8474 - 8481
- Berghöfer, J. 1999:** Charakterisierung von Komponenten der plastidären Importmaschine-rie, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München

- Berry, J., Björkman, O. 1980:** Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 491 - 543
- Berthold, D.A., Babcock, G., Yocum, F. 1981:** A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* 134: 231 - 234
- Birnboim, H.C, Doly, J. 1979:** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513 - 1524
- Boudreau, E., Nickelsen, J., Lemaire, S., Ossenbühl, F., Rochaix, J.-D. 2000:** The *Nac2* gene of *Chlamydomonas* encodes a chloroplast TPR-like protein involved in *psbD* mRNA stability. *EMBO J.* 19: 3366 - 3376
- Bourque, J.E. 1995:** Antisense strategies for genetic manipulations in plants. *Plant Sci.* 105: 125 - 149
- Bourret, R., Borkovich, K.A., Simon, M.I. 1991:** Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *J. Bacteriol.* 175: 2097 - 2101
- Bradford, M.M 1976:** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 -254
- Breiman, A., Fawcett, T.W., Ghirardi, M.L., Mattoo, A.K. 1992:** Plant organelles contain distinct peptidylprolyl *cis, trans*-isomerases. *J. Biol. Chem.* 267: 21293 - 21296
- Buchholz, W.G., Harris-Haller, L., DeRose, R.T., Hall, T.C. 1994:** Cyclophilins are encoded by a small gene family in rice. *Plant Mol. Biol.* 25: 837 - 843
- Buchner, J. 1999:** Hsp90 and Co.- a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.* 24: 136 - 141
- Burbulys, D., Trach, K.A., Hoch, J.A. 1991:** Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64: 545 - 552
- Carlberg, I., Rintamäki, E., Aro, E.-M., Andersson, B. 1999:** Thylakoid protein phosphorylation and the thiol redox state. *Biochem.* 38: 3197 - 3204
- Cardenas, E.M., Hemenway, C., Muri, R.S., Ye, R., Fiorentino, D., Heitman, J. 1994:** Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J.* 13: 5944 - 5957
- Celenza, J.L., Carlson, M. 1986:** Renaturation of protein kinase activity on protein blots. *Meth. Enzymol.* 200: 421 - 435
- Chang, H., Nathan, D.F., Lindquist, S. 1997:** *In vivo* analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol. Cell Biol.* 17: 318 - 325
- Chang, C., Stewart, R.C. 1998:** The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol.* 117: 723 - 731
- Chen, J., Parsons, S., Brautigan, D.L. 1994b:** Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and *v-src* transformation of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269: 7957 - 7962
- Chen, M.X., Cohen, P.T.W. 1997:** Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett.* 400: 136 - 140
- Chen, M.X., McPartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M., Cohen, P.T.W. 1994a:** A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J.* 13: 4278 - 4290

- Chen, S., Smith, D.F. 1998:** Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 273: 35194 – 35200
- Chou, I.T., Gasser, C.S. 1997:** Characterization of the cyclophilin gene family of *Arabidopsis thaliana* and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. *Plant Mol. Biol.* 35: 873 - 892
- Cohen, Y., Yalovsky, S., Neuchushtai, R. 1995:** Integration and assembly of photosynthetic protein complexes in chloroplast thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Act.* 1241: 1 - 30
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R., Stainer, R.Y. 1957:** Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.* 49: 25 - 68
- Coughlan, S.J., Hind, G. 1986:** Purification and characterization of a membrane-bound protein kinase from spinach thylakoids. *J. Biol. Chem.* 261: 11378 - 11385
- Coughlan, S.J., Kileczawa, J., Hind, G. 1988:** Further enzymatic characteristics of a thylakoid protein kinase. *J. Biol. Chem.* 263: 16631 - 16636
- Croce, R., Breton, J., Bassi, R. 1996:** Conformational changes induced by phosphorylation of the CP29 subunit of photosystem II. *Biochem.* 35: 11142 - 11148
- D'Agostino, I.B., Kieber, J.J. 1999:** Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators. *Trends Plant Sci.* 24: 452 - 456
- Danon, A., Mayfield, S.P. 1994:** Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* 266: 1717 - 1719
- Das, A.K., Cohen, P.T.W., Barford, D. 1998:** The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein-interactions. *EMBO J.* 17: 1192 - 1199
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III 1996:** Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species: *Planta* 198: 460 - 470
- Dolinski, K., Cardenas, M.E., Heitman, J. 1998:** CNS1 encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7344 - 7352
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M.E., Heitman, J. 1997:** All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 13093 - 13098
- Egger, L.A., Park, H., Inouye, M. 1997:** Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay. *Genes Cells* 2: 167 – 184
- Escoubas, J.-M., Lomas, M., LaRoche, J., Falkowski, P.G. 1995:** Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 10237 - 10241
- Eshaghi, S., Andersson, B., Barber, J. 1999:** Isolation of a highly active PSII-LHCII supercomplex from thylakoid membranes by a direct method. *FEBS Lett.* 446: 23 - 26
- Eskling, M., Arvidsson, P.-O., Åkerlund, H.-A. 1997:** The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant* 100: 806 - 816
- Fantl, W.J., Muslin, A.J., Kikuchi, A., Martin, J.A., MacNicol, A.M., Gross, R.W., Williams, L.T. 1994:** Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature* 371: 612 - 614

- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. 1983:** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 2 – 13
- Finn, B.E., Evenäs, J., Drakenberg, T., Waltho, J.P., Thulin, E., Forsen, S. 1995:** Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 2: 777 - 783
- Fischer, G., Wittmann-Liebold, B., Lang, K., Kiefhaber, T., Schmid, F.X. 1989:** Cyclophilin and the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* 337: 476 - 478
- Forst, S.A., Roberts, D.L. 1994:** Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Res. Microbiol.* 145: 363 - 373
- Frid, D., Gal, A., Oettmeier, W., Hauska, G., Berger, S., Ohad, I. 1992:** The redox-controlled light-harvesting chlorophyll *a/b* protein kinase. Deactivation by substituted quinones. *J. Biol. Chem.* 267: 25908 - 25915
- Frydman, J., Höhfeld, J. 1997:** Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem. Sci.* 22: 87 - 92
- Fujitakti, J.M., Smith, R.A. 1984:** Technique in the detection and characterization of phosphoramidate-containing proteins. *Methods. Enzymol.* 107: 23 - 36
- Fulgosi, H. 1999:** Molecular characterization of auxiliary thylakoid components involved in regulation of photosynthesis. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Fulgosi, H., Vener, A.V., Altschmied, L., Herrmann, R.G., Andersson, B. 1998:** A novel multi-functional chloroplast protein: identification of a 40 kDa immunophilin-like protein located in the thylakoid lumen. *EMBO J.* 17: 1577 - 1587
- Gal, A., Hauska, G., Herrmann, R.G., Ohad, I. 1990:** Interaction between light harvesting chlorophyll *a/b* protein (LHCII) kinase and cytochrome *b₆/f*-complex. *In vitro* control of kinase activity. *J. Biol. Chem.* 265: 19742 - 19749
- Gal, A., Herrmann, R.G., Lottspeich, F., Ohad, I. 1992:** Phosphorylation of cytochrome *b₆* by the LHCII-kinase associated with the cytochrome complex. *FEBS Lett.* 298: 33 - 35
- Gal, A., Zer, H., Ohad, I. 1997:** Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. *Physiol. Plant.* 100: 869 - 885
- Gasic, G.P. 1994:** Basic helix-loop-helix transcription factor and sterol sensor in a single membrane-bound molecule. *Cell* 77: 17 - 19
- Gasser, C.S., Gunning, D.A., Budelier, K.A., Brown, S.M. 1990:** Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 9519 - 9523
- Georgi, L.L., Albert, P.S., Riddle, D.L. 1990:** *daf-1*, a *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase. *Cell* 61: 635 - 645
- Gilmore, A.M. 1997:** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant* 99: 197 - 209
- Goebel, M., Yanagida, M. 1991:** The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem. Sci.* 16: 173 - 177
- Goldschmidt-Clermont, M. 1998:** Coordination of nuclear chloroplast expression in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 177: 115 - 180

- Gray, J.C. 1996:** Biogenesis of chloroplasts in higher plants. In: Membranes: Specialized Functions in Plants. Smallwood, M., Knox, J.P., Bowles, D.J. (eds.), Bios: 441 - 458
- Gray, M.W. 1992:** The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141: 233 – 357
- Guo, H., Damuni, Z. 1993:** Autophosphorylation-activated protein kinase phosphorylates and inactivates protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2500 - 2504
- Gupta, R., Mould, R.M., Luan, S. 2000:** An FKBP-type immunophilin targeted to the thylakoid lumen of chloroplasts by the Δ pH-dependent pathway. *Im Druck*
- Hakenbeck, R., Stock, J. B. 1996:** Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Meth. Enzymol.* 273: 281 - 300
- Hamel, P., Olive, J., Pierre, Y., Wollman, F.-A., de Vitry, C. 2000:** A new subunit of cytochrome *b₆f* complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J. Biol. Chem.* 275: 17072 - 17079
- Hammer, M.F., Markwell, J., Sarath, G. 1997:** Purification of a protein phosphatase from chloroplast stroma capable of dephosphorylating the light-harvesting complex-II. *Plant Physiol.* 113: 227 - 233
- Hammer, M.F., Sarath, G., Osterman, J.C., Markwell, J. 1995:** Assessing modulation of stromal and thylakoid light-harvesting complex-II phosphatase activities with phosphopeptide substrates. *Photosynth. Res.* 44: 107 - 115
- Hanahan, D. 1983:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557 - 580
- Hansmann, P., Falk, H., Ronai, K., Sitte, P. 1985:** Structure, combination and distribution of plastid nucleoids in *Narcissus pseudonarcissus*. *Planta* 164: 459 - 472
- Hardie, G. 1996:** In: Protein Phosphorylation in Plants. Shewry, P.R., Halford, N.G., Hooley, R. (eds.), Clarendon Press, Oxford: 3 - 15
- Havaux, M., Tardy, F. 1996:** Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem II *in vivo*: Possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta* 198: 324 – 333
- Hayek, B., Vangelista, L., Pastore, A., Sperr, W.R., Valent, P., Vrtala, S., Niederberger, V., Twardosz, A., Kraft, D., Valenta, R. 1998:** Molecular and immunologic characterization of a highly cross-reactive two EF-hand calcium-binding alder pollen allergen, *Aln g 4*: Structural basis for calcium-modulated IgE recognition. *J. Immunol.* 161: 7031 - 7039
- von Heijne, G., Steppuhn, J., Herrmann, R.G. 1989:** Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180: 535 - 545
- Herrmann, R.G. 1996:** Photosynthesis research: aspects and perspectives. In: *Frontiers in Molecular Biology, Molecular Genetics of Photosynthesis*. Andersson, B., Salter, A.H., Barber, J. (eds.), IRL/Oxford Univ. Press, Oxford: 1 - 44
- Herrmann, R.G. 1997:** Eukaryotism, towards a new interpretation. In: *Eukaryotism and Symbiosis*. Schenk, H.E.A, Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E.; Schwemmler, W. (eds.), Springer, Heidelberg, New York: 73 - 118
- Herrmann, R.G., Possingham, J.V. 1980:** Plastid DNA- the plastome. *Results Probl. Cell Differ.* 10: 45 - 96

- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N., Simon, M.I. 1988:** Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* 53: 79 - 87
- Heukeshoven, J., Dernick, R. 1985:** Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103 - 112
- Hind, G., Marshak, D.R., Coughlan, S.J. 1995:** Spinach thylakoid polyphenol oxidase: Cloning, characterization, and relation to a putative protein kinase. *Biochem. J.* 34: 8157 - 8164
- Hirano, T., Kinoshita, N., Morikawa, K., Yanagida, M. 1990:** Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein *nuc2⁺*. *Cell* 60: 319 - 328
- Hirt, H. 1999:** Transcriptional upregulation of signaling pathways: more complex than anticipated? *Trends Plant Sci.* 4: 7 - 8
- Hoch, J.A., Silhavy, T.J. 1995:** Two-component signal transduction. *Americ. Soc. Microbiol. Press, Washington, USA:* 1 - 473
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schillerport, R.A. 1983:** A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179 - 180
- Holsters, M., De Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., Schell, J. 1987:** Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 163: 181 - 187
- Hua, J., Meyerowitz, E.M. 1998:** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261 - 271
- Huang, Z.J., Edery, I., Rosbash, M. 1993:** PAS is a dimerization domain common to *Drosophila period* and several transcription factors. *Nature* 364: 259 - 262
- Hueros, G., Rahfeld, J., Salamini, F., Thompson, R. 1998:** A maize FK506-sensitive immunophilin, mZFkBP-66, is a peptidylproline *cis-trans*-isomerase that interacts with calmodulin and a 36-kDa cytoplasmic protein. *Planta* 205: 121 - 131
- Hunter, T. 1998:** Prolyl isomerases and nuclear function. *Cell* 92: 141 - 143
- Hutchcroft, J.E., Anostario, M., Harrison, M.L., Geahlen, R.L. 1991:** Renaturation and assay of protein kinases after electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Meth. Enzymol.* 200: 417 - 426
- Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B., Silhavy, T.J. 1989:** Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev.* 3: 1725 - 1734
- Igo, M.M., Slauch, J.M., Silhavy, T.J. 1990:** Signal transduction in bacteria: kinases that control gene expression. *New Biol.* 2: 5 - 9
- Ikura, M. 1996:** Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21: 14 - 17
- Imamura, A. 1999:** Compilation and characterization of *Arabidopsis* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 40: 733 - 742
- Imamura, A., Hanaki, N., Umeda, H., Nakamura, A., Suzuki, T., Ueguchi, C., Mizuno, T. 1998:** Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2691 - 2696
- Ishige, K., Nagosawa, S., Tokishita, S., Mizuno, T. 1994:** A novel device of bacterial signal transducers. *EMBO J.* 13: 5195 - 5202

- Itou, H., Tanaka, I. 2001:** The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. *J. Biochem.* 129: 343 - 350
- Jacobs, M.A., Connell, L., Cattolico, R.A. 1999:** A conserved His-Asp signal response regulator-like gene in *Heterosigma akashiwo* chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 41: 645 - 655
- Jackson, K., Söll, D. 1999:** Mutations in a new *Arabidopsis* cyclophilin disrupt its interaction with protein phosphatase 2A. *Mol. Gen. Genet.* 262: 830 - 838
- Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D., Toft, D.O. 1998:** Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 3679 - 3686
- Jones, C.J., Aizawa, S. 1991:** The bacterial flagellum and flagellar motor: structure, assembly and function. *Adv. Microbiol. Physiol.* 32: 109 - 172
- Kakimoto, T. 1996:** CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982 - 985
- Karukstis, K.K., Sauer, K. 1984:** Organization of the photosynthetic apparatus of the *chlorina-f2* mutant of barley using chlorophyll fluorescence decay kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 766: 148 - 155
- Kay, S.A. 1997:** PAS, present, and future: clues to the origin of circadian clocks. *Science* 276: 753 - 754
- Keren, N., Berg, A., van Kan, P.J.M., Levanon, H., Ohad, I. 1997:** Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 1579 - 1584
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., Ecker, J.R. 1993:** CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427 - 441
- Kieleczawa, J., Coughlan, S.J., Hind, G. 1992:** Isolation and characterization of an alkaline phosphatase from pea thylakoids. *Plant Physiol.* 99: 1029 - 1036
- Kieselbach, T., Hagman, Å., Andersson, B., Schröder, W.P. 1998:** The thylakoid lumen of chloroplasts: isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 273: 6710 - 6716
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P., Kirschner, M.W. 1995:** A 20S complex containing cdc27 and cdc16 catalyses the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* 81: 279 - 288
- Kirby, K.S. 1968:** Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Meth. Enzymol.* 12B: 87
- Kohn, W.D., Mant, C.T., Hodges, R.S. 1997:** α -helical protein assembly motifs. *J. Biol. Chem.* 272: 2583 - 2585
- Koivuniemi, A., Aro, E.-M., Andersson, B. 1995:** Degradation of the D1- and D2-proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochem.* 34: 16022 - 16029
- Koletsky, A.J., Harding, M.W., Handschumacher, R.E. 1986:** Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues. *J. Immunol.* 137: 1054 - 1059
- Komenda, J., Hassan, H.A.G., Diner, B.A., Debus, R.J., Barber, J., Nixon, P.J. 2000:** Degradation of the photosystem II D1 and D2 proteins in different strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 varying with respect to the type and level of *psbA* transcript. *Plant Mol. Biol.* 42: 635 - 645

- Komenda, J., Koblížek, M., Masojídek, J. 1999:** The regulatory role of photosystem II photoinactivation and *de novo* protein synthesis in the degradation and exchange of two forms of the D1 protein from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *J. Photochem. Photobiol.* 48: 114 - 119
- Kruse, O., Zheleva, D., Barber, J. 1997:** Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: implications for the regulation of the turnover of D1 protein. *FEBS Lett.* 408: 276 - 280
- Kurek, I., Herman, E., Erel, N., Aviezer, K., Breiman, A. 1999:** The wheat peptidyl prolyl *cis trans* isomerase, FKBP77, is heat induced and developmentally regulated. *Plant Physiol.* 119: 693 - 704
- Kuwabara, T., Katoh, Y. 1999:** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Phys.* 40: 1029 - 1035
- Kyte, J., Doolittle, R.F. 1982:** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105 - 132
- Laemmli, U. 1970:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 -685
- Lamb, J.R., Tugendreich, S., Hieter, P. 1995:** Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR ? *Trends Biochem. Sci.* 20: 257 - 259
- Lashbrook, C.C., Tieman, D.M., Klee, H.J. 1998:** Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J.* 15: 243 - 252
- Leon, P., Arroyo, A., Mackenzie, S. 1998:** Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 453 - 480
- Lerbs, S., Klyachko, N.L., Romanko, E.G., Kulaeva, O.N., Wollgiehn, R., Parthier, B. 1984:** Gene expression in cytokinin- and light-mediated plastogenesis of *Curcubita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Planta* 16: 289 - 298
- Leverson, J.D., Ness, D.A. 1998:** Point mutations in v-myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism. *Mol. Cell* 1: 203 - 211
- Levings, C.S. III, Siedow, J.N. 1995:** Regulation by redox poise in chloroplasts. *Science* 268: 695 - 696
- Lin, H.Y., Wang, X.-F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A., Lodish, H.F. 1992:** Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68: 775 - 785
- Lindahl, M., Yang, D.H., Andersson, B. 1995:** Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane associated enzymic system: *Eur. J. Biochem.* 231: 503 - 509
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z., Andersson, B. 2000:** The thylakoid FtsH protease plays a role in light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12: 419 - 431
- Lippuner, V., Chou, I.T., Varian, S.S., Ettinger, W.F., Theg, S.M., Gasser, C.S. 1994:** Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 269: 7863 - 7868

- Liu, J., Albers, M.W., Wandless, T.J., Luan, S., Alberg, D.G., Belshaw, P.J., Cohen, P., MacIntosh, C., Klee, C.B., Schreiber, S.L. 1992:** Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochem. J.* 31: 3896 - 3901
- Liu, J., Chen, C.-M., Walsh, C.T. 1991b:** Human and *Escherichia coli* cyclophilins: Sensitivity to inhibition by the immunosuppressant cyclosporin A correlates with a specific tryptophan residue. *Biochem. J.* 30: 2306 - 2310
- Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Freidman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. 1991a:** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66: 807 - 815
- Lohrmann, J., Buchholz, G., Keitel, C., Sweere, U., Kircher, S., Bäurle, I., Kudla, J., Schäfer, E., Harter, K. 1999:** Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 1: 495 - 505
- Lu, G., DeLisle, A.J., De Vetten, N.C., Ferl, R.J. 1992:** Brain proteins in plants: an *Arabidopsis* homolog to neurotransmitter activators is part of a DNA binding complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 11490 - 11494
- Lu, G., Sehne, P.C., Ferl, R.J. 1993:** Phosphorylation and calcium binding properties of an *Arabidopsis* GF14 brain protein homolog. *Plant Cell* 6: 501- 510
- Lu, P.-J., Zhou, X.Z., Shen, M., Lu, K. 1999:** Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding molecules. *Science* 283: 1325 - 1328
- Luan, S., Lane, W.S., Schreiber, S.L. 1994:** pCyp B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* 6: 885 - 892
- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., Stock, J.B. 1992:** Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 718 - 722
- Macnab, R.M. 1992:** Genetics and biogenesis of bacteria flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26: 131 - 158
- Mann, N.H. 1994:** Protein phosphorylation in cyanobacteria. *Microbiol.* 140: 3207 - 3215
- Marck, C., Lefebvre, O., Carles, C., Riva, M., Chaussivert, N., Ruet, A., Sentenac, A. 1993:** The TFIIB-assembling subunit of yeast transcription factor TFIIC has both tetratricopeptide repeats and basic helix-loop-helix motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 4027 - 4031
- Marsh, J.A., Kalton, H.M., Gaber, R.F. 1998:** Cns1 is an essential protein associated with the hsp90 chaperone complex in *Saccharomyces cerevisiae* that can restore cyclophilin 40-dependent functions in cpr7Delta cells. *Mol. Cell Biol.* 18: 7353 - 7359
- Martensen, T.M. 1984:** Chemical properties, isolation, and analysis of *O*-phosphates in proteins. *J. Biol. Chem.* 259: 3 - 23
- Mathews, L.S., Vale, W.W. 1991:** Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65: 973 - 982
- Mattoo, A.K., Edelman, M. 1987:** Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1497 - 1501
- Maxwell, D.P., Laudénbach, D.E., Huner, N.P.A. 1995:** Redox regulation of light-harvesting complex II and *cab* mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 109: 787 - 795

- Mayer, A.M. 1987:** Polyphenol oxidases in plants- recent progress. *Phytochem.* 26: 11 - 20
- Mayer, A.M., Harel, E. 1979:** Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem.* 18: 193 - 215
- Mayfield, S.P., Christopher, B.Y., Cohen, A., Danon, A. 1995:** Regulation of chloroplast gene expression. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 147 - 166
- Melis, A. 1996:** Excitation energy transfer: functional and dynamic aspects of Lhc (cab) proteins. In: *Advances of Photosynthesis IV*. Ort, D.R., Yocum, C.F. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 523 - 538
- Melis, A. 1999:** Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo* ? *Trends Biochem. Sci.* 4: 130 - 135
- Metcalf, S.M., Richards, F.M. 1990:** Cyclosporin, FK506, and rapamycin, some effects on early activation events in serum-free, mitogen-stimulated mouse spleen cells. *Transplantation* 49: 798 - 802
- Millward, T.A., Zolnierowicz, S., Hemmings, B.A. 1999:** Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* 24: 186 - 191
- Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S. 1996:** Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res.* 3: 407 - 414
- Mizuno, T., Mizushima, S. 1990:** Signal transduction and gene regulation through the phosphorylation of two regulatory components: the molecular basis for the osmotic regulation of the porin genes. *Mol. Microbiol.* 4: 1077 - 1082
- Moir, R.D., Puglia, K.V., Willis, I.M. 2000:** Interactions between the tetratricopeptide repeat-containing transcription factor TFIIIC131 and its ligand, TFIIH70. *J. Biol. Chem.* 275: 26591 - 26598
- Mosley, C.S., Suzuki, J.Y., Bauer, C.E. 1994:** Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J. Bacteriol.* 176: 7566 - 7573
- Mozo, T., Dewar, K., Dunn, P., Ecker, J.E., Fischer, S., Kloska, S., Lehrach, H., Marra, M., Martienssen, R., Meier-Ewert, S., Altmann, T. 1999:** A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics* 22: 271 - 275
- Mozo, T., Fischer, S., Meier-Ewert, S., Lehrach, H., Altmann, T. 1998b:** Use of IGF BAC library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J.* 16: 377 - 384
- Mozo, T., Fischer, S., Shizuya, H., Altmann, T. 1998a:** Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol. Gen. Genet.* 258: 562 - 570
- Müller, B., Eichacker, L.A. 1999:** Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll *a*-triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts. *Plant Cell* 11: 2365 - 2377
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., Shaw, A.S. 1996:** Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84: 889 - 897
- Nakano, T., Murakami, S., Shoji, T., Yoshida, S., Yamada, Y., Sato, F. 1997:** A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 9: 1673 - 1682

- Nemoto, Y., Kawano, S., Nakamura, S., Mita, T., Nagat, T., Kuroiwa, T. 1988:** Studies on plastid-nuclei (nucleoids) in *Nicotiana tabacum* L. I. Isolation of proplastid-nuclei from cultured cells and identification of proplastid-nuclear proteins. *Plant Cell Physiol.* 29: 167 - 177
- Ohad, I., Adir, N., Koike, H., Kyle, D.J., Inoue, Y. 1994:** Light-induced degradation of photosystem-II reaction center D1 protein *in vivo*: an integrative approach. In: *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field.* Baker, N., Bowyer, J.R. (eds.), BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK: 161 - 177
- Pallas, D.C., Fu, H., Haehnel, L.C., Weller, W., Collier, R.J., Roberts, T.M. 1994:** Association of polyomavirus middle tumor antigen with 14-3-3 proteins. *Science* 265: 535 - 537
- Palmiter, R.D. 1974:** Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes: Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochem.* 13: 3606
- Park, Y.-I., Chow, W.S., Anderson, J.M. 1997:** Antenna size dependency of photoinactivation of photosystem II in light-acclimated pea leaves. *Plant Physiol.* 115: 151 - 157
- Parkinson, J.S., Kofoid, E.C. 1992:** Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* 26: 71 - 112
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. 1988:** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444 - 2448
- Peltier, J.-B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., van Wijk, K.J. 2000:** Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12: 319 - 341
- Perego, M., Hoch, J.A. 1996:** Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems. *Trends Genet.* 12: 97 - 101
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H. 1996:** Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two component" osmosensor. *Cell* 86: 865 - 875
- Prasil, O., Adir, N., Ohad, I. 1992:** Dynamics of photosystem II: Mechanism of photoinhibition and recovery processes. In: *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology.* Barber, J. (ed.), Amsterdam, Elsevier: 295 - 348
- Pratt, L., Silhavy, T.J. 1995:** Porin regulon of *Escherichia coli*. In: *Two-component Signal Transduction.* Hoch, J.A., Silhavy, T.J. (eds.), Americ. Soc. for Microbiol. Press, Washington, USA: 105 - 127
- Pratt, W.B., Toft, D.O. 1997:** Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18: 306 - 360
- Pursiheimo, S., Rintamäki, E., Baena-Gonzalez, E., Aro, E.-M. 1998:** Thylakoid protein phosphorylation in evolutionally divergent species with oxygenic photosynthesis. *FEBS Lett.* 423: 178 - 182
- Quail, P.H. 1997:** The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight ? *Bioessays* 19: 571 - 579
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu., Y., Wagner, D. 1995:** Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675 - 680
- Race, H., Hind, G. 1996:** A protein kinase in the core of photosystem II. *Biochem.* 35: 13006 - 13010

- Reiss, T., Link, G. 1985:** Characterization of transcriptionally active DNA-protein complexes from chloroplasts and etioplasts of mustard (*Sinapis alba* L.). *Eur. J. Biochem.* 148: 207 - 212
- Reuther, G.W., Fu, H., Cripe, L.D., Collier, R.J., Pendergast, A.M. 1994:** Association of the protein kinases c-Brc and Brc-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 266: 129 - 133
- Rintamäki, E., Kettunen, R., Aro, E.-M. 1996:** Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centres. Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1. *J. Biol. Chem.* 271: 14870 – 14875
- Rintamäki, E., Martinsuo, P., Pursiheimo, S., Aro, E.-M. 2000:** Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 11644 - 11649
- Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U.-M., Carlberg, I., Andersson, B. 1997:** Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* 272 : 30476 – 30482
- Robinson, C., Hynds, P.J., Robinson, D., Mant, A. 1998:** Multiple pathways for the targeting of thylakoidal proteins in chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 38: 200 - 221
- Rochaix, J.D. 1992:** Post-transcriptional steps in the expression of chloroplast genes. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8: 1 - 28
- Rochaix, J.D. 1996:** Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 32: 327 - 342
- Rokka, A., Aro, E.-M., Herrmann, R.G., Andersson, B., Vener, A.V. 2000:** Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiol.* 123: 1525 - 1535
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Li, S., Dunn, J.J., Studier, F.W. 1987:** Vectors for selective expression of cloned cDNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56: 125 - 135
- Ryrie, I.J. 1983:** Immunological evidence for apoproteins of the light-harvesting chlorophyll-protein complex in a mutant of barley lacking chlorophyll *b*. *Eur. J. Biochem.* 131: 149 - 155
- Sakai, H., Aoyama, T., Bono, H., Oka, A. 1998:** Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. *Plant Cell Physiol.* 39: 1232 - 1239
- Sakai, H., Aoyama, T., Oka, A. 2000:** *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J.* 24: 703 - 711
- Sakakibara, H., Hayakawa, A., Deji, A., Gawronski, S.W., Sugiyama, T. 1999:** His-Asp phosphotransfer possibly involved in the nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize: molecular cloning of cDNAs for two-component regulatory factors and demonstration of phosphotransfer activity *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* 41: 563 - 573
- Sakakibara, H., Taniguchi, M., Sugiyama, T. 2000:** His-Asp phosphorelay signaling: a communication avenue between plants and their environment. *Plant Mol. Biol.* 42: 273 - 278
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989:** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schaller, G.E. 1997:** Ethylene and cytokinin signaling in plants: the role of two-component systems: *Essays Biochem.* 32: 101 - 111

- Schaller, G.E., Bleecker, A.B. 1993:** Receptor-like kinase activity in membranes of *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 333: 306 - 310
- Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., Moarefi, I. 2000:** Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. Cell 101: 199 - 210
- Schibler, U. 1998:** New cogwheels in the clockworks. Nature 393: 620- 621
- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N., Neupert, W. 1994:** Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. J. Biol. Chem. 269: 11893 - 11901
- Schmitz-Linneweber, C., Maier, R.M., Alcaraz, J.-P., Cottet, A., Herrmann, R.G., Mache, R. 2001:** The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. Plant Mol. Biol. 45: 307 - 315
- Schneuwly, S., Shortridge, R.D., Larrivee, R.C., Ono, T., Ozaki, M., Pak, W.L. 1989:** *Drosophila ninaA* gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporin A binding protein). Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 5390 - 5393
- Schöffel, F., Prandl, R., Reindl, A. 1998:** Regulation of heat-shock response. Plant Physiol. 117: 1135 - 1141
- Schreiber, S.L. 1991:** Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. Science 251: 283 - 287
- Schreiber, S.L., Liu, J., Albers, M.W., Rosen, M.K., Standaert, R.F., Wandless, T.J., Somers, P.K. 1992:** Molecular recognition of immunophilins and immunophilin-ligand complexes. Tetrahedron 48: 2545 - 2558
- Sganga, M.W., Bauer, C.E. 1992:** Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. Cell 68: 945 - 954
- Sikorski, R.S., Boguski, N.S., Goebel, M., Hieter, P. 1990:** A repeating amino acid motif in *CDC23* defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. Cell 60: 307 - 317
- Smith, H. 1995b:** Physiological and ecological function within the phytochrome family. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46: 289 - 315
- Smith, R.L., Redd, M.J., Johnson, A.D. 1995a:** The tetratricopeptide repeats of Ssn6 interact with the homeo domain of alpha-2. Genes Dev. 9: 2903 - 2910
- Snyders, S., Kohorn, B.D. 1999:** TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. J. Biol. Chem. 274: 9137 - 9140
- Sokolenko, A., Altschmied, L., Herrmann, R.G. 1997:** SDS-stable proteases in chloroplasts. Plant Physiol. 115: 827 - 832
- Sokolenko, A., Fulgosi, H., Gal, A., Altschmied, L., Ohad, I., Herrmann, R.G. 1995:** The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII-kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase. FEBS Lett. 371: 176 - 180
- Sonoike, K., Terashima, I., Iwaki, M., Itoh, S. 1995:** Destruction of photosystem I iron-sulfur centres in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. FEBS Lett. 362: 235 - 238

- Spetea, C., Hundal, T., Lohmann, F., Andersson, B. 1999:** GTP bound to the chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced multi-enzyme degradation of photosystem II D1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 6547 - 6552
- Stone, J.M., Walker, J.C. 1995:** Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108: 451 - 457
- Studier, F.W., Moffat, B.A. 1986:** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113 - 130
- Sugita, M., Sugiura, M. 1996:** Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 315 - 326
- Sun, G., Bailey, D., Jones, M.W., Markwell, J. 1989:** Chloroplast thylakoid protein phosphatase is a membrane surface-associated activity. *Plant Physiol.* 89: 238 - 243
- Swanson, R.V., Alex, L.A., Simon, M.I. 1994:** Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem. Sci.* 19: 485 - 490
- Takahashi, N., Hayano, T., Suzuki, M. 1989:** Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337: 473 - 475
- Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., Sugiyama, T. 1998:** Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Lett.* 429: 259 - 262
- Taylor, B.L., Zhulin, I.B. 1999:** PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 479 - 506
- 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. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673 - 4680
- Tieman, D., Klee, H. 1999:** Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.* 120: 165 - 172
- Toker, A., Sellers, L.A., Amess, B., Patel, Y., Harris, A., Aitken, A. 1992:** Multiple isoforms of a protein kinase C inhibitor (KCIP/14-3-3) from sheep brain: amino acid sequence of phosphorylated forms. *Eur. J. Biochem.* 206: 453 - 461
- Tolbert, N.E. 1973:** Activation of polyphenol oxidases of chloroplasts. *Plant Physiol.* 51: 234 - 244
- Tolstykh, T., Lee, J., Vafai, S., Stock, J.B. 2000:** Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling association of regulatory subunits. *EMBO J.* 19: 5682 - 5691
- Toroser, D., Athwal, G.S., Huber, S.C. 1998:** Site-specific regulatory interaction between spinach leaf sucrose-phosphate synthase and 14-3-3 proteins. *FEBS Lett.* 435: 110 - 114
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350 - 4354
- Tropschug, M. 1990:** Nucleotide sequence of the gene coding for cyclophilin/-peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase of *Neurospora crassa*. *Nucl. Acids Res.* 18: 190
- Tzamarias, D., Struhl, K. 1995:** Distinct TPR motifs of CYC8 are involved in recruiting the CYC8-TUP1 corepressor complex of differentially regulated promoters. *Genes Dev.* 9: 821 - 831

- Ullrich, A., Schlessinger, J. 1990:** Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203 - 212
- Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2000b:** Possible His-Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *FEBS Lett.* 478: 227 - 232
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., Shinozaki, K. 1999:** A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as osmosensor. *Plant Cell* 11: 1743 - 1754
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2000a:** Two-component systems in plant signal transduction. *Trends in Plant Sci.* 5: 67 - 74
- Vaistij, F.E., Boudreau, E., Lemaire, S.D., Goldschmidt-Clermont, M., Rochaix, J.-D. 2000:** Characterization of Mbb1, a nucleus-encoded tetratricopeptide-like repeat protein required for expression of the chloroplast *psbB/psbT/psbH* gene cluster in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 14813 - 14818
- Vener, A.V., Ohad, I., Andersson, B. 1998:** Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 217 - 223
- Vener, A.V., Rokka, A., Fulgosi, H., Andersson, B., Herrmann, R.G. 1999:** A cyclophilin-regulated PP2A-like protein phosphatase in thylakoid membranes of plant chloroplasts. *Biochem.* 38: 14955 - 14965
- Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Gal, A., Andersson, B., Ohad, I. 1995:** Activation/deactivation cycle of redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. Role of plastoquinol bound to the reduced cytochrome *bf* complex. *J. Biol. Chem.* 270: 25225 - 25232
- Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Rich, P.R., Ohad, I., Andersson, B. 1997:** Plastoquinol at the Q_o-site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 1585 - 1590
- Vink, M., Zer, H., Herrmann, R.G., Andersson, B., Ohad, I. 2000:** Regulation of photosystem II core protein phosphorylation at the substrate level: light induces exposure of the CP43 chlorophyll *a* protein complex to thylakoid protein kinase(s). *Photosynth. Res.* 64: 209 - 219
- Vink, M., Zer, H., Herrmann, R.G., Ohad, I., Andersson, B. 1998:** Purification and identification of thylakoid protein kinase(s) that phosphorylates isolated LHCII and CP43 of photosystem II. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Garab, G. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1887 - 1890
- Walker, J.C. 1994:** Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26: 1599 - 1609
- Walsh, C.T., Zydowsky, L.D., McKeon, F.D. 1992:** Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidyl prolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction. *J. Biol. Chem.* 267: 13115 - 13118
- Weber, P., Fulgosi, H., Sokolenko, A., Karanauchov, I., Andersson, B., Ohad, I., Herrmann, R.G. 1998:** Evidence for four thylakoid-located protein kinases. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Garab, G. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1883 - 1886
- Weis, E., Berry, J.A. 1988:** Plants and high temperature stress. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 42: 329 - 346

- Wettern, M. 1986:** Localization of 32.000 Dalton chloroplast protein pools in thylakoids: significance in atrazine binding. *Plant Sci.* 43: 173- 177
- Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Yen, H.-C., Giovannoni, J. 1995:** An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science* 270: 1807 - 1809
- Wu, J., Tolstykh, T., Lee, J., Boyd, K., Stock, J.N., Broach, J.R. 2000:** Carboxymethylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits *in vivo*. *EMBO J.* 19: 5672 - 5681
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., Cantley, L.C. 1997:** The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91: 961 - 971
- Yang, D.-H., Webster, J., Adam, Z., Lindahl, M., Andersson, B. 1998:** Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant Physiol.* 118: 827 - 834
- Yarden, Y., Ullrich, A. 1998:** Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 443 - 478
- Yeh, K.C., Lagarias, J.C. 1998:** Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13976 - 13981
- Yu, X., Sukumaran, S., Márton, L. 1998:** Differential expression of nitrate reductase activity is correlated with increased *Nia1* transcription and mRNA levels. *Plant Physiol.* 115: 1091 - 1096
- Zapf, J., Madhusudan, M., Grimshaw, C.E., Hoch, J.A., Varughese, K.I., Whiteley, J.M. 1998:** A source of response regulator autophosphatase activity: the critical role of a residue adjacent to the Spo0F autophosphorylation active site. *Biochem.* 37: 7725 - 7732
- Zer, H., Vink, M., Keren, N., Dilly-Hartwig, H.G., Paulsen, H., Herrmann, R.G., Andersson, B., Ohad, I. 1999:** Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of light-harvesting complex II. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8277 - 8282
- Zhang, M., Tanaka, T., Ikura, M. 1995:** Calcium-induced conformational transitional transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 2: 758 - 767
- Zhu, Y., Qin, L., Yoshida, T., Inouye, M. 2000:** Phosphatase activity of histidine kinase EnvZ without kinase catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7808 - 7813
- Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R. 1997:** PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem. Sci.* 22: 331 - 333
- Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., Wollman, F.-A. 1999:** The Q_o-site of cytochrome *b_f* complexes controls the activation of the LHCII-kinase. *EMBO J.* 18: 2961 - 2969

7. Publikationen

Fischer-Schliebs, E., Ratajczak, R., Weber, P., Tavakoli, C.I., Ullrich, C.I., Lüttge, U. 1998: Concordant time-dependent patterns of activities and enzyme protein amounts of V-PPase and V-ATPase in induced (flowering and CAM or tumour) and non-induced plant tissues. *Bot. Acta* 111: 130 – 136

Weber, P., Fulgosi, H., Sokolenko, A., Karanauchov, I., Andersson, B., Ohad, I., Herrmann, R.G. 1998: Evidence for four thylakoid-located protein kinases. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Garab, G. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1883 - 1886

Weber, P., Sokolenko, A., Eshaghi, S., Fulgosi, H., Vener, A.V., Andersson, B., Ohad, I., Herrmann, R.G. 2001: Elements of signal transduction involved in thylakoid membrane dynamics. In: *Signal Transduction in Plants: Current Advances*. Sopory, S.K., Oelmüller, R., Maeshwari, S.C. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 222 - 237

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann. Ihm gilt mein besonderer Dank für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und seine Diskussionsbereitschaft, die mich bei der Bearbeitung dieser komplexen Thematik entscheidend vorwärts gebracht haben. Für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die Freiheit, mit der ich meine tägliche Arbeit im Labor organisieren konnte, bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. H. Scheer danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Uwe Hohmann, Dr. Hrvoje Fulgosi und Said Eshaghi für ihre wissenschaftliche Unterstützung und ihre Freundschaft, die ich nicht missen möchte.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Andersson und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Linköping bedanke ich mich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die Gastfreundschaft, die ich während meines Aufenthaltes in Schweden genießen durfte. Ganz besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. I. Ohad, den ich als ausgezeichneten Wissenschaftler und freundschaftlichen Berater sehr schätzen gelernt habe. In diesem Zusammenhang möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann bedanken, daß er mir diese Zusammenarbeiten ermöglicht hat.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann und Herrn Prof. Dr. J. Ebel danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und wissenschaftliche Unterstützung. Besonderer Dank gilt Julia, Magda, Martina, Holger, Christian, Sabine, Fli, Andrea und Claudia.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Petra Weber
Wohnort: Königsbergerstr. 18, 85221 Dachau
Geburtsdatum: 03.05.1970
Geburtsort: Mainz-Mombach

Ausbildung

1976 - 1989 Integrierte Gesamtschule in Taunusstein, Abitur
1989 - 1994 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, Diplom
1994 - 1995 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. U. Lüttge am Botanischen Institut der Technischen Universität Darmstadt
1996 - 1997 Hospitanz am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann, Abteilung Pflanzliche Cytogenetik
seit 1997 Dissertation am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R.G. Herrmann