

Die Bedeutung von Alb4 in der Biogenese der Chloroplasten

vorgelegt von

Lars Gerdes

Dissertation der Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

München

2007

Dissertation eingereicht am 22.08.2007

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2007

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll

Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Nickelsen

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Erklärung

Diese Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt. Ich habe nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 22.08.2007

Lars Gerdes

Inhalt

1	Einleitung	4
2	Material	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Enzyme	12
2.3	Kits	12
2.4	Saatgut	12
2.5	Bakterienstämme	13
2.6	Vektoren	13
2.7	Oligonukleotide	13
2.8	Antiseren	14
2.9	Molekulargewichtsstandards und Größenmarker	15
2.10	Membranen	15
2.11	Säulenmaterial	15
3	Methoden	16
3.1	Anzuchtbedingungen	16
3.1.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.1.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
3.1.3	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
3.2	Molekularbiologische Methoden	17
3.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
3.2.2	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA	17
3.2.4	Restriktionsverdau und Ligation von DNA	17
3.2.5	Homologe Rekombination	17
3.2.6	DNA-Gelelektrophorese	17
3.2.7	Nukleinsäure-Mengenabschätzung	18
3.2.8	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	18
3.2.9	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
3.2.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
3.2.11	Sequenzierung von DNA	19
3.2.12	RNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
3.2.13	Reverse Transkription	19
3.2.14	RACE	19
3.2.15	Quantitative Echtzeit-PCR	19
3.2.16	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.3	Proteinbiochemische Methoden	20
3.3.1	Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
3.3.2	Protein-Acrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	20
3.3.3	Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen	20
3.3.4	Protein-Mengenabschätzung	21
3.3.5	Western-Transfer und Immundekoration von Proteinen mit Antikörpern	21
3.3.6	Heterologe Überexpression von Proteinen	21
3.4	Zellbiologische Methoden	22
3.4.1	Fraktionierung von Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
3.4.2	Transiente Transformation von Protoplasten und Fluoreszenzmikroskopie	22
3.4.3	Elektronenmikroskopie	23
3.5	EDV	24
3.5.1	Freeware	24
3.5.2	Algorithmen im Internet	24

4 Ergebnisse	25
4.1 Identifizierung und Charakterisierung von <i>Alb4</i>	25
4.1.1 Identifizierung des <i>Alb4</i> -Leserahmens	25
4.1.2 Charakterisierung von <i>Alb4</i>	32
4.2 Komplementation einer Hefe- <i>Δoxa1</i> -Mutante	35
4.3 Lokalisation von <i>Alb4</i> in der Zelle	37
4.3.1 GFP-Fusion.....	37
4.3.2 Immunologischer Nachweis	39
4.4 Vergleich der Expression von <i>Alb4</i> und <i>Alb3</i>	40
4.5 <i>Alb4</i> -Mutanten.....	42
4.5.1 Die T-DNA-Insertionslinie Salk_136199.....	42
4.5.2 Die T-DNA-Insertionslinie SAIL-1233D09.....	47
4.5.3 <i>Alb4</i> -RNAi-Linie.....	47
4.5.4 TILLING-Linien für <i>Alb4</i>	52
4.6 Identifizierung und Charakterisierung der <i>RWK1</i> -Transkripte	54
4.6.1 Identifizierung des <i>RWK1</i> -Leserahmens	54
4.6.2 Charakterisierung von <i>RWK1</i>	61
4.7 Lokalisierung von <i>RWK1</i>	63
5 Diskussion.....	66
6 Zusammenfassung.....	72
7 Literatur	73
8 Anhang	82
8.1 Abkürzungen.....	82
8.2 Lebenslauf.....	85
8.3 Veröffentlichungen.....	85
8.4 Danksagung.....	86

Abbildungen

Abb. 1	Proteintransport in und über die Thylakoidmembran.....	5
Abb. 2	5'-RACE für <i>F21J9.16</i>	26
Abb. 3	Kontrolle des 5'-Endes des Leserahmens durch RT-PCR.....	27
Abb. 4	Amplifikation des gesamten <i>At1g24500</i> mit 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen.....	28
Abb. 5	Das <i>Alb4</i> -Transkript.....	30
Abb. 6	<i>Alb4</i> als Protein.....	32
Abb. 7	<i>Alb4</i> und die Oxa -Proteinfamilie.....	33
Abb. 8	Strukturmodell für <i>Alb4</i>	34
Abb. 9	Funktionelle Komplementation von Δ <i>oxa1</i> durch <i>Alb4</i>	36
Abb. 10	<i>Alb4</i> ist ein thylakoidäres Protein.....	38
Abb. 11	Immunolokalisierung von <i>Alb4</i>	39
Abb. 12	Vergleich der Genexpression von <i>Alb4</i> und <i>Alb3</i>	41
Abb. 13	Die T-DNA in der <i>Alb4</i> -Insertions-Linie Salk_136199 sitzt anders als annotiert.....	42
Abb. 14	Die T-DNA-Linie Salk_136199 transkribiert zwei Versionen <i>Alb4</i> -mRNA.....	43
Abb. 15	Die T-DNA-Linie Salk_136199 enthält nur eine Version des <i>Alb4</i> -Proteins.....	44
Abb. 16	Transkript-Analyse von <i>Alb4</i> mittels Echtzeit-RT-PCR.....	45
Abb. 17	Ultrastruktur der Chloroplasten aus der <i>Alb4</i> -T-DNA-Linie Salk_136199.....	46
Abb. 18	T-DNA-Insertionslinien für <i>Alb4</i>	47
Abb. 19	RNAi-Konstrukt für <i>Alb4</i>	48
Abb. 20	Analyse des Transkript- und Protein-Gehaltes in der <i>Alb4</i> RNAi-Linie.....	50
Abb. 21	Ultrastruktur der Chloroplasten aus der <i>Alb4</i> RNAi-Linie.....	51
Abb. 22	TILLING-Linien für <i>Alb4</i>	53
Abb. 23	Vergleich der Genmodelle <i>F21J9.13</i> , <i>F21J9.15</i> und <i>F21J9.16</i>	54
Abb. 24	Identifizierung von <i>F21J9.15</i> als eigenständiges Transkript.....	55
Abb. 25	<i>F21J9.15</i> besitzt keinen polyA-Schwanz.....	56
Abb. 26	Identifizierung des 5'-Ende des <i>RWK1</i> -Transkriptes.....	57
Abb. 27	Die Genmodelle für <i>RWK1.1</i> und <i>RWK1.2</i>	59
Abb. 28	Details der Annotation von <i>RWK1</i>	60
Abb. 29	<i>RWK1</i> ist homolog zu Rezeptor-Domänen von LRRPKs.....	63
Abb. 30	<i>RWK1</i> ist kein plastidäres Protein.....	64
Tab. 1	Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer.....	13
Tab. 2	Liste der verwendeten Freeware.....	24
Tab. 3	Liste der verwendeten Algorithmen.....	24
Tab. 4	Liste der untersuchten TILLING-Mutanten.....	53

1 Einleitung

Die charakteristische Eigenschaft von Pflanzen besteht darin, dass sie die Energie des Sonnenlichts dazu nutzen können, aus anorganischen Stoffen organische Moleküle mit energiereichen Bindungen aufzubauen. Auf dieser autotrophen Leistung der Pflanzen beruht letztendlich nahezu das gesamte Leben, wie wir es heute auf der Erde vorfinden. Die Photosynthese, die Umwandlung der Strahlungsenergie in chemische Energie, findet in den bemerkenswertesten Organellen der grünen Pflanzen, den Chloroplasten statt. Die linsenförmigen Chloroplasten der höheren Pflanzen werden von zwei Hüllmembranen begrenzt (Staehlin und Newcomb, 2000). Die Thylakoide liegen als weitere Membran im Stroma, wo sie ein dreidimensionales Netzwerk bilden, das einen einzigen Binnenraum, das Lumen, umgibt (Staehlin und Newcomb, 2000; Mustardy und Garab, 2003). Neben der Photosynthese sind in den Chloroplasten der höheren Pflanzen auch noch viele andere Stoffwechselwege ganz oder teilweise lokalisiert, wie z.B. die Biosynthese der Chlorophylle, Carotinoide, Purine, Pyrimidine und Fettsäuren (Staehlin und Newcomb, 2000).

Die Theorie vom Ursprung der Chloroplasten und Mitochondrien aus ehemals freilebenden Endosymbionten wurde Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals formuliert (Mereschkowsky, 1905), aber erst etliche Jahrzehnte später wieder aufgegriffen (Margulis, 1970). In neuerer Zeit konnte sie durch Sequenzvergleiche bioinformatisch untermauert werden (Gray und Doolittle, 1982). Heute wird als gesichert angesehen, dass die Mitochondrien aus freilebenden Vorläufern heutiger α -Proteobakterien entstanden sind und die Chloroplasten cyanobakterielle Vorfahren besitzen (Gray et al., 1999; Dyall et al., 2004). Sowohl Plastiden als auch Mitochondrien besitzen eigene genetische Information. Im Laufe der Evolution sind jedoch die meisten Gene aus den Organellen in den Zellkern verlagert worden (Martin und Herrmann, 1998). Das Plastom kodiert nur noch für 20 bis 200, das Chondriom für 3 bis 67 Proteine (Timmis et al., 2004). Die meisten der schätzungsweise mehreren tausend Proteine (Martin et al., 2002; Heazlewood et al., 2004), die in den verschiedenen Subkompartimenten dieser Organellen benötigt werden, müssen daher nach ihrer Translation an cytosolischen Ribosomen zu ihrem eigentlichen Bestimmungsort gesteuert werden. Für die Zielsteuerung in das korrekte Organell hinein sorgen dabei N-terminal gelegene Signalsequenzen (von Heijne et al., 1989; Schatz und Dobberstein, 1996).

Die Thylakoidmembranen der Chloroplasten sind sehr proteinreich, sie enthalten über 150 verschiedene periphere und integrale Proteine (Friso et al., 2004), darunter maßgeblich die Proteinkomplexe der Photosynthese, Photosystem I und II, Cytochrom b_6f und ATP-Synthase,

die mosaikartig sowohl aus kern- als auch aus plastidenkodierten Untereinheiten bestehen (Malkin und Niyogi, 2000). Kernkodierte Proteine der Thylakoidmembran werden zunächst posttranslational durch den TOC- und TIC-Komplex über die beiden Hüllmembranen der Chloroplasten geschleust (Soll und Schleiff, 2004). Vom Stroma aus gibt es für sie dann mindestens drei verschiedene Wege, um an ihren Bestimmungsort zu gelangen (Yi und Dalbey, 2005; Gutensohn et al., 2005): den SRP-, den Sec- und den TAT-Weg. Für einen weiteren Weg wurden (noch?) keine proteinösen Komponenten nachgewiesen, so dass man hier von der sogenannten „spontanen“ Insertion spricht (Abb. 1).

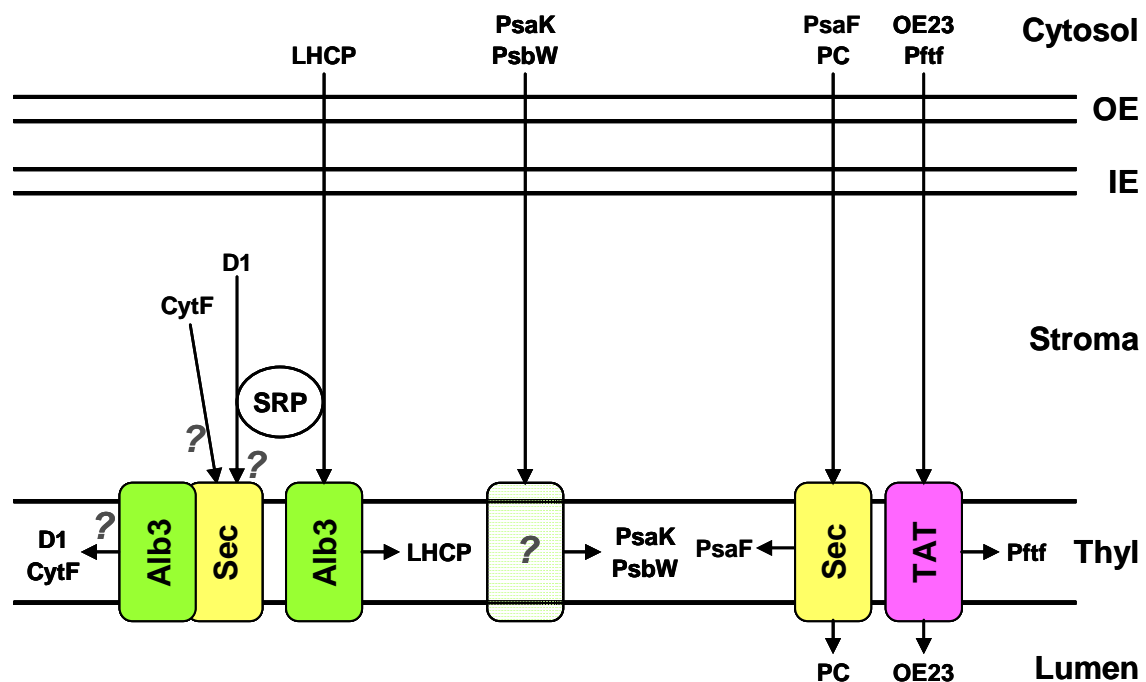


Abb. 1 Proteintransport in und über die Thylakoidmembran

Schematische Darstellung der gefundenen und postulierten Wege in und über die Thylakoidmembran. Für jeden Weg ist mindestens ein Beispielprotein angegeben, das entsprechend transportiert wird. Erläuterungen und Referenzen im Text. TIC- und TOC-Komplex sind der Übersicht halber nicht eingezeichnet. Thyl: Thylakoidmembran.

Mitglieder der LHC-Proteinfamilie, unter ihnen Lhcb1, das wahrscheinlich mengenmäßig häufigste Membranprotein in der Natur (Jansson, 1999), werden über einen plastidären SRP-Weg integriert, welcher von dem kürzlich entdeckten Protein Alb3 abhängig ist (Moore et al., 2000; Woolhead et al., 2001). Es gibt erste Hinweise dafür, dass der chloroplastidäre Sec-Apparat nicht nur bei der „Sekretion“ von Proteinen wie z.B. Plastocyanin in das Thylakoidlumen eine Rolle spielt (Yuan et al., 1994), sondern auch bei der Integration von

kernkodierten Proteinen wie z.B. PsaF in die Thylakoidmembran (Karnauchov et al., 1994). Ebenso vermag auch das chloroplastidäre TAT-System einige wenige kernkodierte Proteine wie z.B. Pftf in diese Membran zu integrieren (Summer et al., 2000). Etliche andere integrale Thylakoidproteine wie PsaK oder PsbW scheinen hingegen spontan, ohne nachweisbare fremde Hilfe effektiv in die Membran inserieren zu können (Woolhead et al., 2001; Mant et al., 2001; Tissier et al., 2002). Es erscheint plausibel, dass die im Plastiden kodierten thylakoidären Proteine vom Stroma aus prinzipiell über die gleichen vier Wege wie die importierten kernkodierten Proteine integriert werden können. Experimentelle Nachweise dafür sind allerdings rar und bislang auf den Sec- und SRP-Weg beschränkt (Nilsson et al., 1999; Zhang et al., 2001; Röhl und van Wijk, 2001).

Integrale Membranproteine müssen generell in der korrekten Orientierung in die richtige Membran integriert werden, damit sie ihre Funktion ausüben können. Auch wenn einige Proteine scheinbar spontan in die Membran inserieren, bedarf die korrekte Insertion, Faltung und der Zusammenbau von integralen Membranproteinen zu übergeordneten Strukturen oft der Mitwirkung zahlreicher assistierender Faktoren (Kuhn et al., 2003). Die Thylakoidmembran der Chloroplasten und die innere Membran der Mitochondrien ähneln der inneren Membran von *Escherichia coli* hinsichtlich ihrer Funktion in der Zwischenspeicherung von Energie durch den Aufbau eines Protonengradienten über die jeweilige Membran. Desweiteren gibt es auch Ähnlichkeiten in den grundlegenden Mechanismen zur Integration von Proteinen in diesen Membranen (Dalbey und Kuhn, 2000). In der Cytoplasmamembran von Bakterien, der inneren Mitochondrienmembran und der chloroplastidären Thylakoidmembran wurden einander homologe Proteine beschrieben, die den Ein- und Zusammenbau von Membranproteinen unterstützen (Kuhn et al., 2003). Nach ihrem zuerst entdeckten mitochondriellen Vertreter werden sie im folgenden als Oxa-Proteine bezeichnet. Alle bisher beschriebenen Mitglieder der Oxa-Proteinfamilie sind polytope integrale Membranproteine mit fünf Transmembranhelices, die im evolutionär konservierten Bereich der Proteine liegen (Yen et al., 2001).

Oxa-Proteine finden sich ubiquitär in allen Reichen der Organismen. So sind in allen daraufhin untersuchten Eubakterien Oxa-Homologe gefunden worden (Luirink et al., 2001; Yen et al., 2001). Während die meisten Eubakterien nur ein einziges Oxa-Homolog enthalten, besitzen Vertreter der Gattungen *Bacillus*, *Listeria* und *Streptomyces* zwei (Luirink et al., 2001). Das Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodiert mit dem *slr1471*-Gen nur für ein einziges Oxa-Homolog (Yen et al., 2001). Ob Archaeobakterien auch Oxa-Proteine enthalten, ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Über BLAST wurden zwar Proteinsequenzen mit schwachen Homologien zu Mitgliedern der Oxa-Familie gefunden, der experimentelle

Nachweis über eine verwandte Funktion dieser Kandidaten steht jedoch noch aus (Luirink et al., 2001; Pohlschröder et al., 2005). Mitochondrien enthalten in ihrer inneren Membran zwei verschiedene Vertreter der Oxa-Proteinfamilie: Oxa1 und Oxa2 (Cox18 in Hefe; Funes et al., 2004b). In den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* wurde das integrale Thylakoidmembranprotein Alb3 als weiteres Mitglied der Oxa-Proteinfamilie identifiziert (Sundberg et al., 1997). Als das funktionelle Alb3-Homolog in der Thylakoidmembran von Erbsen wurde das Protein PPF-1 nachgewiesen (Moore et al., 2000). Die Chloroplasten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* enthalten zwei Oxa-Homologe in ihren Thylakoiden: Alb3.1 und Alb3.2 (Bellafiore et al., 2002; Göhre et al., 2006). Dass *Arabidopsis*-Chloroplasten mit dem Protein Artemis ein Oxa-Homolog auch in der inneren Hüllmembran enthalten (Fulgosi et al., 2002), konnte nach neuen Ergebnissen nicht bestätigt werden (vorliegende Arbeit und Gerdes et al., 2006). In Eukaryoten wurden Oxa-Homologe bisher nur in den durch Endosymbiose entstandenen Mitochondrien und Chloroplasten nachgewiesen, in der Plasmamembran und den Membranen von endoplasmatischem Retikulum oder Golgi-Apparat fehlen sie (Yen et al., 2001; Pohlschröder et al., 2005).

Den bisher untersuchten Mitgliedern der Oxa-Familie kommen wichtige Rollen bei der Integration und Assemblierung von integralen Membranproteinen zu. Das Fehlen der Oxa-Homologe führt daher meist zu drastischen Phänotypen in den entsprechenden Mutanten (Yi und Dalbey, 2005). Oxa1 wurde ursprünglich bei der Untersuchung von Hefemutanten entdeckt, die Probleme bei der Assemblierung des mitochondrialen Cytochrom c-Oxidase-Komplexes (Komplex IV der Atmungskette) aufweisen und somit auf nicht-vergärbaren Substraten (wie z.B. Glycerin) nicht wachsen können (Bauer et al., 1994; Bonnefoy et al., 1994). Der Name Oxa wurde entsprechend aus „cytochrome oxidase assembly“ abgeleitet. Der Einbau von Cox2 (Komplex IV) in die Atmungskette (He und Fox, 1997; Hell et al., 1997) war die zuerst gefundene Funktion von Oxa1, mit der auch der beobachtete Phänotyp der Δ oxa1-Mutanten erklärt werden konnte. Aus Untersuchungen u.a. an *Neurospora crassa* ist inzwischen bekannt, dass Oxa1 für den Einbau weiterer sowohl mitochondrial- als auch kernkodierter Proteine der inneren Mitochondrienmembran benötigt wird, wie z.B. der Komponenten der Atmungskette Cox1, Cox3 (beide ebenfalls Komplex IV), Cytochrom b (Komplex III) und Atp9 (Komplex V), aber auch Oxa1 selbst (Hell et al., 1998; Hell et al., 2001). Das zweite Homolog in der inneren Membran von Mitochondrien, Oxa2, spielt ebenfalls bei der Biogenese des Cytochrom-Oxidase-Komplexes eine Rolle. Ohne funktionelles Oxa2 besitzen die entsprechenden Hefemutanten keine Cytochrom-Oxidase-Aktivität und können wie Δ oxa1-

Mutanten nicht auf nicht-vergärbaren Medien wachsen (Souza et al., 2000). Oxa2 wird –wie auch Oxa1– beim Einbau von Cox2 benötigt (Souza et al., 2000; Saracco und Fox, 2002).

Das Ausschalten des bakteriellen Homologs YidC führt zum Verlust der Lebensfähigkeit von *E. coli* (Samuelson et al., 2000), was seine essentielle Bedeutung bei der Proteininsertion unterstreicht. Zu den für die gram-negative Bakterienzelle lebenswichtigen Substraten von YidC zählen Untereinheiten der ATP-Synthase und der Sec-Translokase (Yi et al., 2003; van Bloois et al., 2004). Auch scheint YidC an der Insertion von weiteren YidC-Proteinen beteiligt zu sein (Urbanus et al., 2002; Koch et al., 2002), eine Rolle, die der von Oxa1 bei seinem eigenen Einbau entspräche. Für die beiden Oxa-Homologen aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis*, SpoIIIJ und YqjG, wird eine Rolle bei der Sekretion von Proteinen postuliert und das Vorhandensein mindestens eines der beiden Oxa-Orthologe ist für das Zellwachstum erforderlich (Tjalsma et al., 2003). Das Ausschalten von *SpoIIIJ* führt in den Mutanten weiterhin zu einem Stopp der Endosporenentwicklung in Phase III nach dem Umschließen der Vorspore durch die Cytoplasmamembran der Mutterzelle (Errington et al., 1992), das Fehlen von SpoIIIJ kann also nicht vollständig durch das Paralog YqjG kompensiert werden. YqjG hingegen wird für die erfolgreiche Sporenentwicklung nicht benötigt (Tjalsma et al., 2003). Für das einzige cyanobakterielle Homolog, slr1471, wurde eine Rolle bei der Zellteilung in *Synechocystis* vorgeschlagen (Fulgosi et al., 2002), in Anlehnung an die Mitwirkung des Homologs SpoIIIJ bei der Endosporenbildung in *B. subtilis*. Neuere Arbeiten konnten diese Funktion von slr1471 bei der Zellteilung von *Synechocystis* nicht bestätigen, sie beschreiben die Beteiligung von slr1471 an der Thylakoid-Biogenese durch eine Rolle bei der korrekten Assemblierung des D1-Vorstufenproteins in das Reaktionszentrum von Photosystem II (Spence et al., 2004; Ossenbühl et al., 2006). Die Lokalisierung von slr1471 in der Zelle ist nicht endgültig geklärt, während Fulgosi et al. (2002) das Protein nur in der Plasmamembran nachweisen konnten, macht die vorgeschlagene Funktion bei der Thylakoid-Biogenese eine Lokalisierung in der Thylakoidmembran notwendig. Da es nur ein Oxa-Homolog in *Synechocystis* gibt, übernimmt dieses vielleicht eine Integrase-Funktion sowohl in der Plasma- als auch in der Thylakoidmembran (Spence et al., 2004). Weder Spence et al. (2004) noch Ossenbühl et al. (2006) ist die komplette Ausschaltung von *slr1471* gelungen, ein Umstand, der auf die Wichtigkeit des Genprodukts für die Lebensfähigkeit von *Synechocystis* hinweist.

Das chloroplastidäre Homolog in der Thylakoidmembran, Alb3, ist ebenfalls essentiell für die Lebensfähigkeit von *Arabidopsis*. *Alb3*-Nullmutanten zeigen einen stark albinotischen Phänotyp (daher der Name Albino) mit Pigment-Defizienzen und abgebrochener Chloroplasten-Entwicklung (Sundberg et al., 1997). Der Effekt durch das Fehlen von Alb3 ist

so drastisch, dass die Pflanzen auf Erde nicht über das Keimblattstadium hinauskommen und absterben. Heterotrophes Wachstum auf Medium mit einer Kohlenstoffquelle ist nur begrenzt möglich; wenn die Pflanzen überhaupt bis zum Blühen kommen, so sind sie infertil (Sundberg et al., 1997). Alb3 ist essentiell für den Einbau und die Assemblierung von wichtigen Komponenten des Photosynthese-Apparates in die Thylakoidmembran. Zu den Substraten von Alb3 werden folgende Proteine gerechnet: Lhcb1 (Lichtsammelkomplex II; Moore et al., 2000), Lhcb4.1 (CP29), Lhcb5 (CP26) und CP43 (Antennen von Photosystem II; Woolhead et al., 2001; Pasch et al., 2005), D1 und D2 (Reaktionszentrum II; Pasch et al., 2005), PsaA (Reaktionszentrum I; Pasch et al., 2005) und CF_oIII (ATP-Synthase; Pasch et al., 2005). Ähnlich wie schon für Oxa1 und YidC beschrieben, könnte Alb3 auch am Einbau weiterer Alb3-Proteine beteiligt sein (Pasch et al., 2005). In der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist die Situation durch das Vorhandensein von zwei Alb3-Proteinen in der Thylakoidmembran noch komplexer. *Chlamydomonas*-Mutanten ohne Alb3.1 sind vor allem durch die mengenmäßige Reduktion von Komponenten der Lichtsammel-Komplexe gekennzeichnet. Die Mutanten sind immer noch zu photoautotrophem Wachstum befähigt, so dass die Funktion dieses Homologs zumindest teilweise von Alb3.2 kompensiert werden kann (Bellafiore et al., 2002). Im Gegensatz dazu führt das Fehlen von Alb3.2 sogar dann zum Verlust der Lebensfähigkeit, wenn die Notwendigkeit zur Photosynthese durch Zugabe von Acetat zum Kulturmedium unterdrückt wird (Göhre et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Alb3.2 mit einer ganzen Reihe von essentiellen Komponenten der Photosynthese wie Lhcbm3, Lhcbm4, Lhcbm5, D1, D2 und PsbC interagiert (Göhre et al., 2006).

Die Mechanismen, wie die Integration bzw. Assemblierung von Membranproteinen durch die Mitglieder der Oxa-Proteine erfolgt, sind bei den relativ leicht zugänglichen Vertretern von *E. coli* und den Mitochondrien aus Hefe und *Neurospora* am besten untersucht. In *E. coli* werden die meisten Proteine, die für die Plasmamembran bestimmt sind, mithilfe des SRP-Weges an die Plasmamembran gesteuert. Der anschließende cotranslationale Einbau erfolgt dann über die Translokase SecY unter Beteiligung von YidC (Dalbey und Chen, 2004). Ein Teil des vorhandenen YidC liegt dafür in enger Nachbarschaft zum Sec-Translokon vor (Nouwen und Driessen, 2002). Alle bekannten Substrate von YidC –wie auch von Oxa1 oder Alb3– sind Membranproteine, die Sekretion von Proteinen ins Periplasma erfolgt unabhängig von YidC, welches folglich als Integrase und nicht als Translokase fungiert (Herrmann und Neupert, 2003). Obwohl der genaue Funktionsmechanismus noch nicht aufgeklärt worden ist, gibt es Hinweise darauf, dass YidC bei der Integration von einzelnen Transmembran-Domänen in die Lipidschicht assistiert (Beck et al., 2001; Nagamori et al., 2004; Houben et al., 2004).

Zusätzlich zu dieser Funktion zusammen mit dem Sec-Translokon kann YidC auch als eigenständige Integrase einige Proteine in die Cytoplasmamembran integrieren (Samuelson et al., 2000; Chen et al., 2002; Serek et al., 2004). Die Phagenhüllproteine M13-procoat und Pf3-coat, die lange als die Musterkandidaten für eine spontane Insertion in *E. coli* galten, benötigen *in vivo* YidC für die effektive Membraninsertion (Samuelson et al., 2000; Samuelson et al., 2001). Die Existenz der „spontanen Insertion“ in Bakterien ist somit zweifelhaft oder wenn überhaupt nur von untergeordneter Bedeutung.

Da in Mitochondrien höherer Eukaryoten weder ein SRP-Weg noch Sec-Komponenten gefunden wurden (Glick und von Heijne, 1996), können Oxa1 und Oxa2 hier nur unabhängig von SecY arbeiten. Oxa1 kann kernkodierte Substratproteine wie Oxa1 selbst oder Atp9 nach ihrem Import aus dem Cytosol posttranslational in die innere Hüllmembran inserieren (Hell et al., 1998). Oxa1 unterscheidet sich von Oxa2 durch den Besitz einer C-terminalen Erweiterung, für die eine Superhelix-Struktur vorhergesagt wird und die bei der cotranslationalen Insertion mitochondrialer Translationsprodukte als Ribosomen-Bindungsdomäne fungiert (Herrmann und Neupert, 2003). Da Oxa2 eine solche Superhelix-Domäne fehlt, spielt es nur beim posttranslationalen Einbau von Membranproteinen eine Rolle (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003; Preuss et al., 2005). Oxa1 scheint die Transmembranhelices der Substratproteine paarweise in die Membran zu entlassen (Hell et al., 1998) und auch an der lateralen Insertion von weniger hydrophoben Transmembransegmenten beteiligt zu sein (Saint-Georges et al., 2001).

Mit *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass Alb3 für die Membraninsertion von bestimmten LHC-Proteinen benötigt wird, die als kernkodierte Proteine zuerst in den Chloroplasten importiert werden und anschließend über den plastidären SRP-Weg inseriert werden (Moore et al., 2000; Woolhead et al., 2001). Alb3 in höheren Pflanzen scheint auch an der cotranslationalen Integration von plastidenkodierten Proteinen beteiligt zu sein (Pasch et al., 2005) und dafür teilweise und zumindest vorübergehend mit dem chloroplastidären SecY assoziiert in einem Komplex vorzuliegen (Klostermann et al., 2002). Es wurde vorgeschlagen, dass Alb3 LHCPs vom cpSec-Translokon übernimmt und lateral in die Membran entlässt (Klostermann et al., 2002), ähnlich der vermuteten Funktion von YidC in *E. coli* (Scotti et al., 2000).

Mit der Komplettierung des *Arabidopsis*-Genomprojektes (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) wurde die Suche nach weiteren möglichen Mitgliedern der Oxa-Proteinfamilie in dieser wichtigen Modellpflanze wesentlich erleichtert. BLAST-Analysen basierend auf den schon bekannten Familienmitgliedern haben gezeigt, dass das Genom mindestens sieben putative Oxa-Proteine kodiert (Funes et al., 2004a; Monique Karl und Lars Gerdes, unveröffentlichte Daten). Wegen der spärlich vorhandenen experimentellen Daten beruht die Zuordnung zur Oxa-Familie bis jetzt weitgehend auf computergestützten Suchen nach möglichen offenen Leserahmen und ihrer Annotierung *in silico*.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein weiteres Kandidaten-Gen experimentell zu annotieren und die Zugehörigkeit des Genproduktes zur Oxa-Familie zu untersuchen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in höchstmöglicher Qualität von folgenden Herstellern bezogen: Amersham Pharmacia/GE Healthcare (Uppsala, Schweden), Applichem (Darmstadt, BRD), BD (Sparks, USA), Biomol (Hamburg, BRD), Calbiochem (La Jolla, USA), Difco (Detroit, USA), Fluka/Sigma-Aldrich (Steinheim, BRD), GibcoBRL (Paisley, UK), J.T.Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt, BRD), Riedel-de Haën (Seelze, BRD), Roth (Karlsruhe, BRD), Serva (Heidelberg, BRD).

2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme, Ligasen und weitere Enzyme zur Manipulation von DNA wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, BRD) New England Biolabs (Frankfurt a.M., BRD) und Roche (Mannheim, BRD), thermostabile DNA-Polymerasen von Qiagen (Hilden, BRD), Eppendorf (Hamburg, BRD), Roche, TaKaRa (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), Clontech (Palo Alto, USA) und Genecraft (Lüdinghausen, BRD), Reverse Transkriptasen von Invitrogen (Karlsruhe, BRD), Roche und Clontech bezogen.

Enzyme zum Abbau pflanzlicher Zellwände stammten von Yakult (Tokyo, Japan) und Serva.

2.3 Kits

RNA aus Pflanzen wurde mit Hilfe des Plant RNeasy-Kits von Qiagen isoliert, polyA⁺-RNA mit dem PolyATtract System 1000 von Promega (Madison, USA) aufgereinigt. cDNA für RACE wurde mit dem SMART RACE cDNA Amplification-Kit von Clontech revers-transkribiert.

Für die Reinigung von PCR-Produkten kam das NucleoSpin Extract II-Kit von Macherey-Nagel (Düren, BRD) zum Einsatz.

Zur Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien wurden das FastPlasmid Mini-Kit von Eppendorf und die Plasmid-Midi- und Maxi-Kits von Macherey-Nagel verwendet.

2.4 Saatgut

Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Col-0 wurden bei Lehle Seeds (Round Rock, USA) erworben. T-DNA- und TILLING-Linien wurden über NASC (Scholl et al., 2000) oder Syngenta (San Diego, USA) bezogen.

2.5 Bakterienstämme

Es wurden die *Escherichia coli*-Stämme DH5 α (Hanahan, 1983) von GibcoBRL und BL21(DE3) (Studier et al., 1990) von Invitrogen bezogen. Für die stabile *Arabidopsis*-Transformation wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986) [von Dr. Jörg Meurer (LMU) erhalten] eingesetzt.

2.6 Vektoren

Folgende Plasmid-Vektoren kamen zum Einsatz: pET21d (Novagen, Madison, USA), pCRII, pCR2.1 und pDONR-201 (Invitrogen), pOL-GFP (Peeters et al., 2000) [von Dr. Jörg Meurer erhalten], pH7GWIWG2(I) (Karimi et al., 2005) [<http://www.psb.rug.ac.be/gateway/>], pRS426-scOxa1p (Funes et al., 2004a) [von Dr. Soledad Funes (LMU) erhalten].

Als Kontrollen für die Fluoreszenz-Lokalisierungen wurden ER.r-GFP (Signalpeptid von *Arabidopsis*-Chitinase mit HDEL-Retentionssignal in pMG) [von Dr. Barbara Pickard, Washington University, St. Louis, USA], ST-GFP (*Rattus*-Sialyl-Transferase-Transmembran-Domäne in pVKH18En6) [von Dr. Chris Hawes, Bookes University, Oxford, UK], OEP7 (*Arabidopsis*-OEP7 in pK7FWG2) [von Dr. Rowena Thomson (LMU)] und VDAC (*Pisum*-VDAC in pOL-GFP) [von Dr. Iryna Ilkavets (LMU)] eingesetzt.

2.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg, BRD), Qiagen/Operon (Köln, BRD) oder Invitrogen synthetisiert.

Tab. 1 Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer

#	Sequenz	bindet an	Verwendung	sonstiges
2	GGGGTACCCTGCGAGGACTGCATAATT	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Genotypisierung Salk_136199	<u><i>KpnI</i></u>
4	CGGGGCCCAATGAAAGGGAACAGCCATG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	<u><i>ApaI</i></u>
12	ACATAAGCATCGACTGTGG	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
14	CGATTACCAGTTTGCTTTATA	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
15	CAAATGCTAGTTGGTTGTTC	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
16	GTTCCCATATGATCCTTATG	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
23	AACAAGCACGAGCGGTGG	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
24	GTGCCACTCAAACAGAATAT	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
26	ACATGCGGATCCATCATCA	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
28	CTAGGCGCCACCCGGAATCA	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
31	GTAAATCAGGAGAGGAGAAA	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
46	AGAACATCTGATTCCGGGT	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
49	TTACCTCTTCTCTGTTTCATG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
50	TACATGCGGATCCATCATCACTCATCACCT CCAATATATG	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Genotypisierung SAIL-1233D09	<u><i>BamHI</i></u>
53	AATGCGGCCGCGGTACATGTTCCCTTATTCCT ATG	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Genotypisierung Salk_136199; Klonierung für Hefekomplementation	<u><i>NotI</i></u>
55	CGGAATTGGAGGACTTTGC	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
84	CTTGAGAATAGTTTCCATGTAA	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
95	CATATATTGGAGGGTGATGAG	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	

#	Sequenz	bindet an	Verwendung	sonstiges
97	GCCTGCAAGGGGATTATTCCAGCA	<i>Alb4</i> (rückwärts)	5'-RACE	
99	GACGACGACGGTGTGTGGCTGAAACG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	5'-RACE	
104	ATGGAAGAATCAAGCATGGCTCAAG	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
105	ATGGCTCAAGCTTCTTATTGGCC	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	
106	TGTAAGTCGTCGTCATTGCCAGCA	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
107	TTCAGAGGACGAAACGGCGGCATC	<i>Alb4</i> (rückwärts)	5'-RACE; Genotypisierung SAIL-1233D09	
110	CCGGCGACAGATTCAAAGGTTTCAGAGG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	5'-RACE	
112	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Left-Border pROK	Genotypisierung Salk_136199	
113	GCGTGGACCGCTTGTCTGCAACT	Left-Border pROK	Sequenzierung T-DNA-Insertion	
114	GCCTTTTCAGAAATGGATAAAATAGCCTTGCTTCC	Left-Border pDAP101	Genotypisierung SAIL-1233D09	
116	TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC	Left-Border pDAP101	Sequenzierung T-DNA-Insertion	
122	AAGCCATGTCCTTCTGCGACC	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
124	GCAGCCTAAACCTTTCACCAGG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	
128	GGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGCCAGCATCGGTTTTTGGC	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Test auf Transkript	<u>attB1</u>
129	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTTGAGTCACTGCCCGG	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Test auf Transkript	<u>attB2</u>
130	GGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGACTGTGCTTGTAAAGGCTGC	<i>Alb4</i> (vorwärts)	RNAi-Konstrukt	<u>attB1</u>
131	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAACACAGACTTCTGAACTAGT	<i>Alb4</i> (rückwärts)	RNAi-Konstrukt	<u>attB2</u>
177	GGACTAGTATGGAAGAATCAAGCATGGC	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Klonierung in pOL-GFP	<u>Spe1</u>
178	ACGCGTCGACAACATTCTGATTCGGGGTG	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Klonierung in pOL-GFP	<u>Sall</u>
210	ACGCGTCGACTAACTAAGACTTTCCACC	<i>RWK1</i> (rückwärts)	Klonierung in pOL-GFP	<u>Sall</u>
211	GGACTAGTATGTCTTCAACAATATCCC	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Klonierung in pOL-GFP	<u>Spe1</u>
212	ACGCGTCGACCGACAGATTCAAAGGTTTC	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Klonierung in pOL-GFP	<u>Sall</u>
216	CCATGAAGTACCATTCTTTACAATCTC	<i>Sec14</i> (rückwärts)	Kontrolle cDNA-Qualität	
217	ATTCGCAATACCATTGTTTTGAGGG	<i>Sec14</i> (vorwärts)	Kontrolle cDNA-Qualität	
228	TCGGTCTCGCACACTGAGAC	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Klonierung 5'-UTR	
283	GGACTAGTATGGCTCAAGCTTCTCTTA	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Klonierung in pOL-GFP	<u>Spe1</u>
333	CTAAACTATTATCGTATTAGTGTAAC	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Klonierung 3'-UTR	
334	ACGAGGACAAAAGTAATTGTTTG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Klonierung 3'-UTR	
335	GAAATATGAAACCAAGCTTCG	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Klonierung 3'-UTR	
336	GTACCAAGATTCTCCTCGTC	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Klonierung 3'-UTR	
339	TCACTCGTTAACAACATAAACC	<i>RWK1</i> (rückwärts)	GSP für RT	
362	ATAATGTTTTCCGTAATGTAGGGC	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Klonierung 5'-UTR	
363	TGAAAGTGTATGGTGTTC	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Klonierung 5'-UTR	
364	ATGTTTCTTTCTAAGAGAGGATG	<i>RWK1</i> (vorwärts)	Klonierung 5'-UTR	
398	TCCAACGACTGTTGCT	<i>Alb4</i> (vorwärts)	Transkript-Charakterisierung	
399	CAGGTTTGGGGCATTC	<i>Alb4</i> (rückwärts)	Transkript-Charakterisierung	
400	ACCAAGAGAGAAGGTG	<i>Alb4</i> (vorwärts)	quantitative Echtzeit-PCR	
401	GCCAATGCCGAATGTC	<i>Alb4</i> (rückwärts)	quantitative Echtzeit-PCR	
402	GGTGATGGTGTGCT	<i>Aktin 2/8</i> (vorwärts)	quantitative Echtzeit-PCR	
403	ACTGAGCACAATGTTAC	<i>Aktin 2/8</i> (rückwärts)	quantitative Echtzeit-PCR	

2.8 Antiseren

α LHCP, α GAP A/B und α Tic32 stammten aus Beständen der AG von Prof. Soll.

Antikörper gegen *Alb4* wurden von Pineda (Berlin, BRD) in Kaninchen erzeugt. Als Antigen für α *Alb4*-1 diente heterolog in *E. coli* überexprimiertes Protein (Aminosäuren 369-499 von *Alb4*), für α *Alb4*-2 und α *Alb4*-3 ein Gemisch aus chemisch synthetisierten Peptiden (Aminosäuren 418-437 und 485-499 von *Alb4*; Pineda, Berlin, BRD).

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

2.9 Molekulargewichtsstandards und Größenmarker

Für SDS-PAGE wurden MW-SDS-70L und MW-SDS-200 von Sigma-Aldrich eingesetzt.

Für Agarose-Gelelektrophorese wurde mit *EcoRI*+*HindIII* oder *PstI* geschnittene DNA des Phagen λ (MBI Fermentas) als Standard verwendet, bei der Auftrennung von DNA über PAGE wurde die 25 bp Ladder von GibcoBRL eingesetzt.

2.10 Membranen

Nitrozellulose-Membranen (Protran BA83, 0,2 μm) und Sterilfilter (FP 30/0,2 CA-S und FP 30/0,45 CA-S) wurden von Whatman/Schleicher & Schuell (Dassel, BRD) bezogen, Zentrifugenfilter (Microcon YM-3 3'000 MWCO und Amicon Ultra-4 10'000 MWCO) von Millipore (Bedford, USA).

2.11 Säulenmaterial

Rekombinantes Protein mit Hexa-Histidin wurden über Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose von Qiagen aufgereinigt.

3 Methoden

3.1 Anzuchtbedingungen

3.1.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Quellende Samen wurden mind. 12 h bei 4°C stratifiziert. Die Keimung erfolgte entweder auf feuchtem Filterpapier, Erde (ca. 5 Teile Torf, 1 Teil Sand) oder MS-Medium (1% Saccharose, 0,5% MES, 0,237% MS, 0,3% Gelrite; pH 5,8 mit KOH). Für die Anzucht auf MS-Medium wurden die Samen mit 5% Hypochlorit oberflächensterilisiert. Zur Selektion von Transformanten wurde dem Medium entsprechendes Antibiotikum zugesetzt (Hygromycin 35-50 µg/ml, Kanamycin 50-100 µg/ml). Pflanzen wurden unter fluoreszierendem Licht bei 100-120 µE oder LED-Beleuchtung bei 80 µE angezogen, die Tageslänge betrug 12-16 h, die Temperatur betrug tags 21°C, nachts 16°C.

3.1.2 Anzucht von *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*

E. coli wurde bei 37°C in Flüssigkultur oder auf Agar-Platten angezogen. Standardmedium war LB (1% Trypton oder Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl; bei Bedarf 1,5% Agar), für Überexpression wurde M9ZB (0,1% NH₄Cl, 0,3% KH₂PO₄, 0,6% Na₂HPO₄, 0,5% NaCl, 1% Trypton, ~0,4% Glucose, ~1mM MgSO₄) verwendet. Je nach Resistenzgen wurde den Medien Antibiotikum zugesetzt (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Streptomycin 50 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml). Erfolgreiche Klonierung in pCR2.1 oder pCRII wurde durch Blau/Weiß-Selektion auf LB-Platten mit 60 µg/ml X-Gal überprüft (Sambrook und Russell, 2001).

Agrobakterien wurden bei 28-30°C in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar-Platten angezogen, den Medien wurden folgende Antibiotika zugesetzt: Kanamycin 100 µg/ml, Spectinomycin 200 µg/ml und Rifampicin 100 µg/ml.

3.1.3 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefen wurden von Dr. Soledad Funes (AG Johannes Herrmann, LMU) im Zuge einer Kooperation angezogen (Funes et al., 2004a).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Bakterien wurden mit CaCl₂ chemisch kompetent gemacht und durch Hitzeschock zur Aufnahme von Plasmid-DNA veranlasst (Sambrook und Russell, 2001). Agrobakterien wurden vor dem Hitzeschock (5 min bei 37°C) kurz in flüssigem N₂ schockgefroren.

3.2.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefen wurden von Dr. Soledad Funes (AG Johannes Herrmann, LMU) im Zuge einer Kooperation transformiert (Funes et al., 2004a).

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmiden erfolgte durch alkalische Lyse mit SDS (Sambrook und Russell, 2001). Für hochreine Plasmid-DNA wurden Kits mit Silica-Säulen nach den Angaben der Hersteller verwendet.

3.2.4 Restriktionsverdau und Ligation von DNA

Restriktionen und Ligationen erfolgten nach den Empfehlungen der Enzym-Hersteller und nach Sambrook und Russell (2001).

3.2.5 Homologe Rekombination

Homologe Rekombination zur (Um-)Klonierung von DNA-Fragmenten in verschiedene Vektoren wurde mit dem GATEWAY-System von Invitrogen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. *attB*-Sequenzen wurden mit den PCR-Primern angefügt.

3.2.6 DNA-Gelelektrophorese

DNA wurde mit 6x Lade-Puffer (0,125% Bromphenolblau, 0,125% Xylencyanol FF, 0,175% Orange G, 30% Glycerin) gemischt und in Agarose-Gelen (0,8-3% NEEO Ultra Agarose, 0,5 µg/ml Etidiumbromid, 0,5x TBE) in 0,5x TBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) elektrophoretisch aufgetrennt.

Kleine Fragmente wurden durch DNA-PAGE (5% Acrylamid) in 0,5x TBE aufgetrennt und nachträglich mit Etidiumbromid angefärbt.

3.2.7 Nukleinsäure-Mengenabschätzung

DNA-Mengen wurden entweder nach Auftrennung im Gel mit den bekannten Mengen von Fragmenten des λ -Standards verglichen und/oder photometrisch bei 260 nm bestimmt. RNA-Mengen wurden ausschließlich photometrisch gemessen (Sambrook und Russell, 2001).

3.2.8 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Banden wurden aus dem Gel geschnitten und die DNA entweder mit der Phenol-Methode (Sambrook und Russell, 2001) oder mit Hilfe eines Kits nach den Angaben des Herstellers aus der Agarose extrahiert.

3.2.9 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Ein Blatt (ca. 0,5-0,75 cm²) wurde in 200 μ l Extraktionspuffer (200 mM Tris pH 7-8, 250 mM NaCl, 0,5% SDS) mit einem Motorpistill oder einer Kugelmühle zerkleinert, 3-5 min bei 23°C inkubiert, 5-10 min mit 13'000 xg zentrifugiert, 150 μ l Überstand mit 150 μ l Isopropanol (-20°C) gefällt, 15 min mit 13'000 xg zentrifugiert und das Pellet in 100 μ l H₂O aufgenommen. Als Vorlage für PCR wurden von dieser DNA 0,5-2 μ l eingesetzt.

3.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR erfolgte nach den Empfehlungen der Enzym-Hersteller und nach Sambrook und Russell (2001). Ein Standard-Ansatz für die Genotypisierung von Pflanzen enthielt folgendes

DNA-Vorlage	0,5-2 μ l
20 μ M Vorwärts-Primer	0,5 μ l
20 μ M Rückwärts-Primer	0,5 μ l
20 mM dNTPs	0,5 μ l
10x PCR-Puffer mit Mg ²⁺	5 μ l
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1 U
H ₂ O	ad 50 μ l

und wurde in einem automatischen Thermocycler wie folgt temperiert

	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Häufigkeit</u>
<i>Denaturierung</i>	96°C	3 min	1x
<i>Denaturierung</i>	94°C	15 s	
<i>Anbindung</i>	52°C	45 s	40x
<i>Polymerisation</i>	72°C	~1 min/1 kb	
<i>Polymerisation</i>	72°C	3 min	1x

Die Bedingungen wurden empirisch für verschiedene Zwecke angepasst.

3.2.11 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte entweder über einen Sequenzierservice der LMU oder durch SeqLab (Göttingen, BRD).

3.2.12 RNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

RNA wurde mit dem Plant RNeasy-Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert, DNA wurde mit dem RNase-free DNase Set von Qiagen abgebaut. Für RACE wurde die RNA zu polyA⁺-mRNA mit dem PolyATtract System 1000 von Promega nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Richtlinien zum Schutz der RNA vor RNasen (Sambrook und Russell, 2001) wurden so weit wie möglich umgesetzt.

3.2.13 Reverse Transkription

RNA wurde mit verschiedenen Reversen Transkriptasen nach den Angaben der Enzym-Hersteller in cDNA umgeschrieben. Für SuperScript II und III von Invitrogen wurden sowohl Oligo(dT)- als auch genspezifische Primer für die Reverse Transkription eingesetzt, mit der *C. therm.*-Polymerase von Roche nur genspezifische. Es wurden 5 µg (SuperScript II & III) oder 1 µg RNA pro Reaktion eingesetzt. Die Polymerisations-Temperatur wurde bis zur als höchstmöglich angegebenen (50°C bzw. 65°C) variiert, zusätzlich wurde das Volumen der Ansätze (SuperScript II & III) erhöht und Mastermixe vortemperiert.

3.2.14 RACE

Das SMART RACE cDNA Amplification-Kit von Clontech wurde mit 1 µg polyA⁺-mRNA nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Genspezifische Primer wurden nach den Empfehlungen des Kit-Herstellers erstellt. Für die Touchdown-PCR wurden sowohl der empfohlenene Advantage2 Polymerase-Mix von Clontech, als auch die HotMaster DNA-Polymerase von Eppendorf eingesetzt.

3.2.15 Quantitative Echtzeit-PCR

Quantitative Echtzeit-PCR wurde in einem LightCycler (Roche) mit dem LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I-Kit (Roche) durchgeführt. Um Amplifikation aus Resten von genomischer DNA auszuschließen, wurden die Primer für *Alb4* (#400 und #401) um Intron 9 herumgelegt, die Produkte der quantitativen PCR in einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf die korrekte Größe für die gespleißte Version untersucht. Transkript-Mengen wurden mit der

LIGHTCYCLER 3.1-Software (Roche) berechnet, normalisiert auf Aktin 2/8 (amplifiziert mit den Primern #402 und #403).

3.2.16 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana Col-0 Wildtyp-Pflanzen (T₀-Generation) wurden durch die Floral-Dip-Methode (Clough und Bent, 1998) mit T-DNA stabil transformiert. Nachkommen wurden auf MS-Platten mit entsprechendem Antibiotikum selektiert und anschließend auf Erde umgesetzt.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Pflanzenmaterial wurde in Extraktionspuffer (50 mM Tris pH 6,8, 50 mM EDTA, 1% SDS, 0,1% β-Mercaptoethanol) fein zerkleinert und 5 min auf 95°C erhitzt. Unlösliche Bestandteile wurden 2 min bei 13'000 xg und 5 min bei 100'000 xg abgetrennt.

Sollten nur Membranproteine verwendet werden, wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem N₂ zermahlen, das Pulver in Puffer (50 mM Tris pH 6,8, 50 mM EDTA, 0,1% β-Mercaptoethanol, 300 μM PMSF, 0,1% Proteinase Inhibitor Cocktail for use with plant cell extracts (Sigma)) aufgenommen und die Membranen 10 min bei 256'000 xg pelletiert. Das Pellet wurde in Extraktionspuffer (mit 1% SDS) aufgenommen und die Membranproteine 5 min bei 95°C extrahiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile 5 min bei 100'000 xg abgetrennt.

3.3.2 Protein-Acrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteine wurden elektrophoretisch in denaturierenden Gelen mit Acrylamid-Konzentrationen (Verhältnis Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid 30:0,8) von 10-15% im Trenngel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Vor dem Auftragen wurden die Proben 2-5 min bei 95°C in Solubilisierungs-Puffer (125 mM Tris pH 6,8, 10% β-Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 4% SDS, 0,01% Bromphenolblau) denaturiert.

3.3.3 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden im Gel 15-20 min mit Coomassie-Färbelösung (40% MeOH, 7% HAc, 0,18% Coomassie Brilliant Blue R250) gefärbt. Der Hintergrund wurde anschließend mit Entfärbe-Lösung (40% MeOH, 7% HAc, 3% Glycerin) entfärbt. Danach wurden die Gele mehrfach in Wasser gespült und bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

3.3.4 Protein-Mengenabschätzung

Protein-Mengen wurden entweder nach Auftrennung in der PAGE mit den bekannten Mengen von Protein des Molekulargewichts-Standards verglichen und/oder photometrisch nach Lowry (modifiziert nach Hartree, 1972) oder Bradford (1976) bestimmt.

3.3.5 Western-Transfer und Immundekoration von Proteinen mit Antikörpern

Über PAGE aufgetrennte Proteine wurden mit einer Trans-Blot Cell von BioRad (Hercules, USA) in Blot-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% MeOH) elektrophoretisch mit 400 mA für 1 h auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Ponceau-Lösung (0,5% Ponceau S, 1% techn. HAc (60%)) angefärbt und die Proteine des Größenstandards angezeichnet.

Die Membran wurde in Casein- (0,3% Casein, 0,03% BSA, 1x TBS (100 mM Tris, 160 mM NaCl, pH 7,4)) oder Magermilch-Puffer (1% Magermilch, 1x PBS (75 mM NaCl, 3 mM KCl, 4,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4)) gewaschen und anschließend in Casein- oder Magermilch-Puffer mit Antiserum (1:250 bis 1:1'000) bei 4°C für mind. 12 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Casein- oder Magermilch-Puffer entfernt. Die Membran wurde dann mit sekundären, an Alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpern bei 23°C für 1 h inkubiert. Ungebundene sekundäre Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit 1x TBS oder 1x PBS entfernt. Nach zweimaligem Waschen der Membran in Western-Entwickler (105,7 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5 mit HCl) wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 66 µl/10 ml BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, 25 mg/ml in 100% Dimethylformamid) und 66 µl/10 ml NBT (4-Nitrotetrazoliumchloridblau, 50 mg/ml in 70% Dimethylformamid) gestartet. Die Reaktion wurde durch Waschen in 5 mM EDTA abgestoppt.

3.3.6 Heterologe Überexpression von Proteinen

Die heterologe Überexpression in *E. coli* BL21(DE3) mit dem pET-System (Novagen) erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für die Induktion wurde 0,7 mM IPTG verwendet, die Überexpression erfolgte 3 h bei 37°C. Das überexprimierte Protein aggregierte in Proteineinschlusskörperchen („inclusion bodies“) und konnte in diesen in Anlehnung an Paulsen et al. (1990) aufgereinigt werden. Die Bakterien wurden mit einer French-Press in Lysis-Puffer (50 mM Tris; 25% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei 1'200 PSI aufgeschlossen, die DNA durch Ultraschall zerkleinert. Die Protein-Einschlusskörperchen wurden durch Zentrifugation mit 30'000 xg für 30 min bei 4°C pelletiert, zweimal in Detergenz-Puffer (20 mM Tris, 1%

Nonidet P40, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5), zweimal in Triton-Puffer (20 mM Tris, 0,5% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5) und zweimal in Tris-Puffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, pH 8,0) gewaschen.

Die Aufreinigung der mit einem Hexa-Histidin-Rest überexprimierten Proteine erfolgte chromatographisch an Ni-NTA-Agarose (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Banden mit überexprimiertem Protein wurden nach kurzer Coomassie-Färbung aus präparativen Acrylamid-Gelen ausgeschnitten, das Protein nach der Methode von Scheer und Ryan (2001) eluiert und mit Zentrifugenfiltern aufkonzentriert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Fraktionierung von Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von *Arabidopsis*-Chloroplasten basierte auf der Methode von Kunst (1998). Dazu wurden ca. 150 g Blätter von fünf bis sechs Wochen alten, nicht blühenden Pflanzen in 900 ml Puffer A (450 mM Sorbit, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 20 mM Tricine, pH 8,4 mit KOH) in einem Waring-Blender homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch zwei Lagen Gaze filtriert und mit 1'400 xg für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden vorsichtig in 20 ml Puffer B (300 mM Sorbit, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 20 mM Tricine, pH 7,6 mit KOH) resuspendiert und auf vorgefertigte lineare Percoll-Gradienten (50% Percoll in Puffer B) geladen. Nach Zentrifugation mit 12'000 xg für 6 min im Ausschwingrotor wurde die untere grüne Bande entnommen und die intakten Chloroplasten einmal mit Puffer B gewaschen. Anschließend wurden die Chloroplasten osmotisch in TE (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,0 mit HCl) lysiert und in Anlehnung an Li et al. (1991) fraktioniert. Die Suspension mit den lysierten Chloroplasten wurde mit TE auf 1-2 mg Chlorophyll pro ml eingestellt und auf Saccharose-Stufengradienten (1,2 M, 1,0 M und 0,46 M Saccharose in TE) geschichtet. Nach Zentrifugation mit 18'000 rpm für 2 h bei 4°C im TST41.14 wurden drei Fraktionen abgenommen: Stroma über der 0,46 M Saccharose-Schicht, gemischte Hüllmembranen an der Grenzschicht von 1,0 und 0,46 M Saccharose und Thylakoide als Pellet. Die Hüllmembranen und Thylakoide wurden anschließend in TE gewaschen.

3.4.2 Transiente Transformation von Protoplasten und Fluoreszenzmikroskopie

Mesophyll-Protoplasten wurden aus Blättern von 3-4 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert und transient transformiert nach dem Protokoll von Jen Sheen (http://opus.mgh.harvard.edu/sheen_lab/). Zusätzlich wurde ein Schritt eingefügt, in dem

aufgebrochene Protoplasten über einen Stufen-Gradienten abgetrennt wurden. Dazu wurden die Protoplasten nach dem Auswaschen der Enzym-Lösung in 10 ml W5 resuspendiert und je 5 ml über 5 ml Lösung S (5 mM CaCl_2 , 12,5 mM MES, pH 5,8 mit KOH, 550 mOsm mit Saccharose) geschichtet. Nach der Zentrifugation mit 70 xg für 10 min im Ausschwingrotor wurden die intakten Protoplasten an der Grenzschicht zwischen den Zuckerlösungen vorsichtig abgenommen und in W5 gewaschen.

Fluoreszenz-Bilder wurden mit Konfokalen Laserscanning-Mikroskopen (TCS-SP1 und -SP5, Leica, Wetzlar, BRD) aufgenommen.

3.4.3 Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden für mind. 12 h bei 4°C fixiert (4% Glutaraldehyd, 50 mM NaCacodylat, pH 7,0). Anschließend wurden die Proben gewaschen (50 mM NaCacodylat, pH 7,0) und für 12 h nachfixiert (1% OsO_4 , 50 mM, 50 mM NaCacodylat, pH 7,0). Danach wurden die Proben in reinem Wasser gewaschen, über eine Aceton-Reihe (10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 2x 100%) entwässert und in Spurr-Medium eingebettet. Die weiteren Schritte (Ultradünnschnitte, Kontrastierung, Elektronenmikroskopie) wurden von Dr. Mark Hünken (LMU) durchgeführt (beschrieben in Gerdes et al., 2006).

3.5 EDV

3.5.1 Freeware

Tab. 2 Liste der verwendeten Freeware

Programm	Version	Autor	erhältlich unter
pDRAW32	1.0 Rev. 1.1.93	Kjeld Olesen	http://www.acaclone.com
BioEdit	5.0.9	Tom Hall	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
ImageJ	1.34s	Wayne Rasband	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Chromas	LITE 2.0	Conor McCarthy	http://www.technelysium.com.au
GeneDoc	2.6.002	Karl Nicholas	http://www.psc.edu/biomed/genedoc
ActiveNote	4.01	Pascal Bihler	http://www.ActiveNote.de
XNview	1.80.3 de	Pierre E. Gougelet	http://www.xnview.com
Desktop Search	1.70 Build 974	Copernic Technologies	http://www.copernic.com

Vielen Dank an die Autoren, die diese Programme kostenlos zur Verfügung stellen!

3.5.2 Algorithmen im Internet

Tab. 3 Liste der verwendeten Algorithmen

Name	Referenz	zu finden unter
BLAST	Altschul et al. (1990; 1997), Gish und States (1993), Madden et al. (1996), Zhang und Madden (1997), Tatusova und Madden (1999), Zhang et al. (2000)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
TargetP	Nielsen et al. (1997), Emanuelsson et al. (1999; 2000), Emanuelsson und von Heijne (2001)	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
ClustalW	Higgins und Sharp (1988; 1989), Higgins et al. (1992; 1996), Thompson et al. (1994; 1997), Jeanmougin (1998)	http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html
NetStart	Pedersen und Nielsen (1997)	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/
TMHMM	Sonnhammer et al. (1998)	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
COILS	Lupas et al. (1991; 1997)	http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von *Alb4*

Mitglieder der evolutiv-konservierten Oxa-Proteinfamilie katalysieren in verschiedenen biologischen Systemen die Insertion von Membranproteinen und wurden entsprechend in der Plasmamembran von Bakterien, der inneren Hüllmembran der Mitochondrien und der Thylakoidmembran der Chloroplasten nachgewiesen (Kuhn et al., 2003). Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert für mindestens sieben Gene, deren Produkte Ähnlichkeit zur Oxa-Proteinfamilie aufweisen (Funes et al., 2004a; Monique Karl und Lars Gerdes, unveröffentlichte Daten). Von diesen sieben Genen wurden bisher lediglich *atOxa1* (*At5g62050*, Hamel et al., 1997) und *Alb3* (*At2g28800*, Sundberg et al., 1997) basierend auf experimentellen Daten annotiert.

Darüber hinaus gibt es ein weiteres mögliches Ortholog, kodiert in *At1g24500*. Dessen Existenz und Zugehörigkeit zur Oxa-Proteinfamilie ist jedoch nicht eindeutig geklärt, da in GenBank zwei Versionen des Proteins annotiert sind. Diese repräsentieren zwei deutlich unterschiedlich große Proteine (F21J9.13 und F21J9.16) mit unterschiedlich ausgeprägter Homologie zu anderen Oxa-Proteinen. Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Zugehörigkeit von *At1g24500* zur Oxa-Proteinfamilie zu klären, das Gen korrekt zu annotieren und durch weiterführende Experimente seine Lokalisierung und Funktion zu analysieren.

4.1.1 Identifizierung des *Alb4*-Leserahmens

Um Informationen über die Transkription von *At1g24500* zu erhalten, wurden RT-PCR und 5'-RACE eingesetzt. Die Primer wurden dabei ausgehend vom kürzeren Genmodell *F21J9.16* ausgewählt. Auf diese Weise sollten der Beginn und das Ende des längsten offenen Leserahmens gefunden und die sich daraus ableitende Aminosäure-Sequenz bestimmt werden. Die mit genspezifischen Primern (Abb. 2 A) erhaltenen 5'-RACE-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 2 B). PCR-Produkte, die ungefähr den erwarteten Größen für *F21J9.16* mit anschließendem 5'-untranslatierten Bereich entsprachen (in Abb. 2 B mit Pfeilköpfen markiert), wurden aus dem Gel eluiert, in TA-Vektoren subkloniert und sequenziert. Abb. 2 C fasst die Sequenzierungsergebnisse zusammen. Ein Abgleich mit dem entsprechenden Abschnitt auf genomischer Ebene zeigt das Fehlen großer Bereiche in der Sequenz der RACE-Produkte (Daten nicht abgebildet). Desweiteren stimmen die ermittelten Intron-Exon-Übergänge mit dem Spleiß-Konsensus für *Arabidopsis* (Goodall und Filipowicz, 1991) überein (Daten nicht abgebildet). Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem

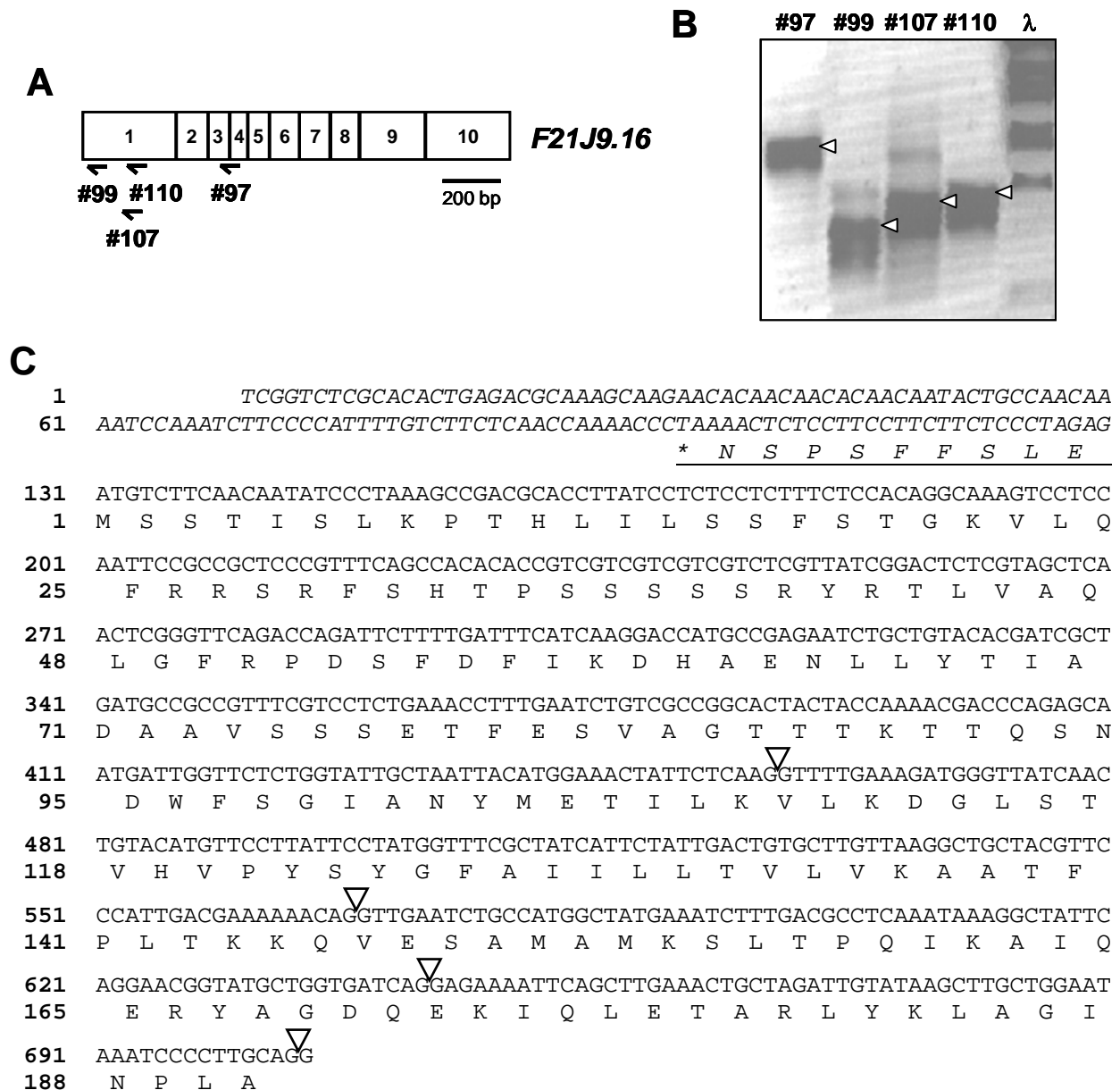


Abb. 2 5'-RACE für *F21J9.16*

(A) Schematische Darstellung der potentiellen kodierenden Exons des Genmodells *F21J9.16*. Die Positionen der für den 5'-RACE verwendeten Primer sind als Halbpfleile eingezeichnet.

(B) Über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte 5'-RACE-Produkte. Die Spuren sind nach den verwendeten genspezifischen Primern benannt. Die mit einem Pfeilkopf markierten Produkte wurden aus dem Gel eluiert, in einen TA-Vektor kloniert und sequenziert.

λ : Größenstandard.

(C) Die aus den sequenzierten RACE-Produkten abgeleitete Sequenzinformation für das 5'-Ende von *At1g24500*. Angegeben sind die Sequenz auf cDNA-Ebene und darunter die korrespondierenden Aminosäuren. Der Leserahmen ist stromaufwärts in den untranslatierten Bereich verlängert worden (unterstrichen), um das Stopp-Codon (TAA, *) zu zeigen, das einen längeren Leserahmen in 5'-Richtung ausschließt. Die Numerierung beginnt beim ersten transkribierten Nukleotid bzw. der ersten translatierten Aminosäure. Die Positionen der experimentell gefundenen Introns sind durch Dreiecke markiert. Der 5'-untranslatierte Bereich ist kursiv gehalten.

sequenzierten Produkt tatsächlich um ein Transkript von *At1g24500* handelte und die fehlenden Bereiche entsprechen somit den herausgespleißten Introns (weiße Dreiecke in Abb. 2 C). Das ermittelte Transkript enthält einen offenen Leserahmen, dessen 3'-Ende im RACE-Produkt nicht enthalten ist. Die proteinkodierende Sequenz beginnt mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Methionin, das in Abb. 2 C als Aminosäure 1 eingezeichnet ist, da das dazugehörige Start-Codon das erste des offenen Leserahmens ist. Das Stopp-Codon, das bei Nukleotid 101 kodiert würde (*), schließt eine Verlängerung stromaufwärts aus, so dass davon auszugehen ist, dass der tatsächliche Start des offenen Leserahmens für *At1g24500* gefunden wurde. *At1g24500* scheint einen mindestens 130 Nukleotide umfassenden 5'-untranslatierten Bereich zu haben. Da der Beginn des offenen Leserahmens für die korrekte Annotation von *At1g24500* entscheidend ist, wurden die durch den 5'-RACE erhaltenen Ergebnisse mittels RT-PCR abgesichert. Der verwendete Vorwärts-Primer band an das äußerste 5'-Ende des gefundenen untranslatierten Bereiches, der Rückwärts-Primer am Ende des längsten RACE-Produkts (vgl. Abb. 3 A). Mit sieben unterschiedlichen *Arabidopsis* cDNAs (mit Oligo(dT)-Primern revers-transkribiert) wurden Produkte der entsprechenden Größe von 705 bp erhalten; mit genomischer DNA ein Kontroll-Produkt von 1113 bp (Abb. 3 B). Fünf der sieben Produkte mit cDNA als Vorlage wurden sequenziert und alle bestätigten die im RACE gefundene Transkript-Sequenz und somit den Beginn des Leserahmens.

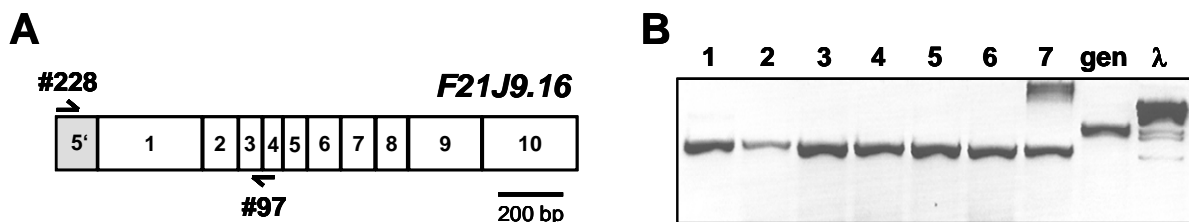


Abb. 3 Kontrolle des 5'-Endes des Leserahmens durch RT-PCR

(A) Schematische Darstellung der zusammengespleißten kodierenden Exons des Genmodells *F21J9.16* mit der über RACE gefundenen 5'-UTR. Die Positionen der für die Kontroll-PCR verwendeten Primer sind als Halbpfleile eingezeichnet.

(B) Die PCR wurde an sieben unterschiedlichen cDNAs (1-7) sowie an genomischer DNA (gen) durchgeführt und die Produkte über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Fünf der erhaltenen Produkte wurden anschließend sequenziert. λ: Größenstandard.

Um das 3'-Ende des offenen Leserahmens zu bestimmen, wurde auf die Sequenzinformation des cDNA-Klons BP792846 zurückgegriffen. Die im Internet verfügbare Sequenz von 389 bp umfasst einen Teil des letzten *in silico* annotierten kodierenden Exons und den daran stromabwärts anschließenden Bereich (vgl. Abb. 4 B). Um die gesamte Sequenz von

At1g24500 verifizieren zu können, wurde anschließend ein möglichst langes Transkript amplifiziert, das sowohl den 5'- als auch den 3'-untranslatierten Bereich einschließen sollte. Für die RT-PCR wurde als Vorwärts-Primer der Primer verwendet, der am äußersten Ende des zuvor ermittelten 5'-untranslatierten Bereiches bindet. Als Rückwärts-Primer wurden vier Oligonukleotide getestet, die an verschiedenen Stellen der Sequenz von BP792846 ansetzen (Abb. 4 A). Mit allen vier Primerkombinationen konnten aus *Arabidopsis* cDNA RT-PCR-Produkte der erwarteten Größe amplifiziert werden (Abb. 4 B).

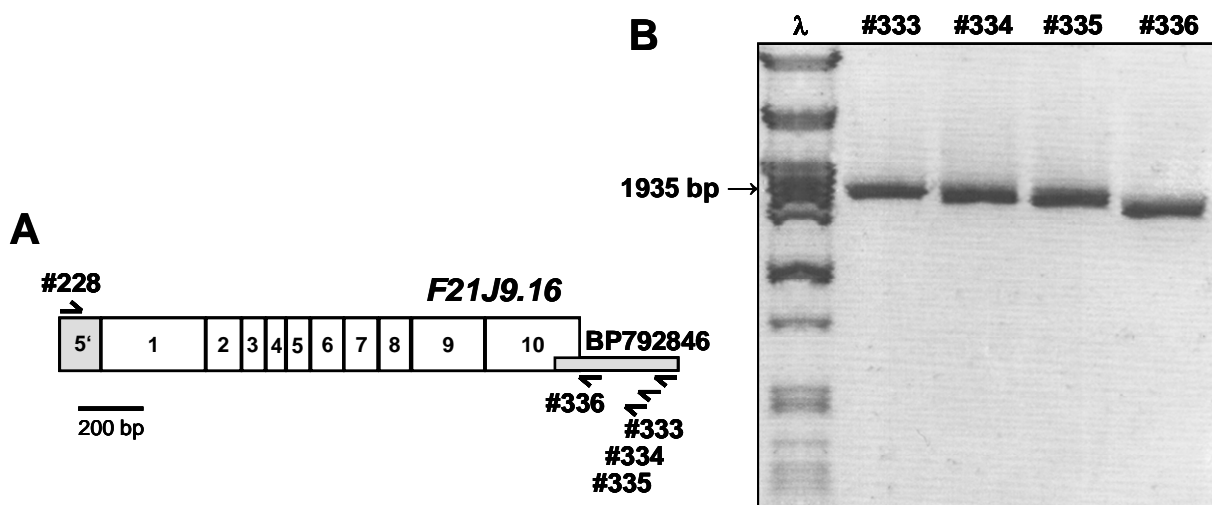


Abb. 4 Amplifikation des gesamten *At1g24500* mit 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen
 (A) Schematische Darstellung der zusammengespleißten kodierenden Exons des Genmodells *F21J9.16* mit dem über RACE gefundenen 5'-UTR. Der cDNA-Klon BP792846 ist als grauer Balken dargestellt; seine Sequenz diente als Basis für die Rückwärts-Primer. Die Positionen der für die RT-PCR verwendeten Primer sind als Halbpfleile eingezeichnet.
 (B) Gelelektrophoretische Identifizierung der erhaltenen RT-PCR-Produkte. Die Spuren sind nach den verwendeten Rückwärts-Primern benannt; für alle Reaktionen wurde der Primer #228 als Vorwärts-Primer verwendet. Das Produkt in Spur #333 wurde extrahiert und sequenziert.
 λ: Größenstandard.

Das längste der vier Produkte wurde in einen TA-Vektor kloniert und sequenziert (Abb. 5 A). Aufgrund dieser experimentellen Daten kann *At1g24500* nun wie folgt annotiert werden: Das Transkript enthält einen durchgehenden Leserahmen von 1500 Nukleotiden, die entsprechend für 499 Aminosäuren kodieren. Dazu kommen 130 Nukleotide 5'- und 305 Nukleotide 3'-untranslatierten Bereiches (Abb. 5 A). Die experimentell gefundene Intron-Exon-Struktur für *At1g24500* weicht dabei teilweise von dem *in silico* vorhergesagten Genmodell *F21J9.16* (Abb. 5 B) ab und wurde bei GenBank unter dem Namen *Alb4* eingetragen (AM177312).

A

1 TCGGTCTCGC AACTGAGAC GCAAAGCAAG AACACAACAA CACAACAATA CTGCCAACAA
 61 AATCCAAATC TTCCCATT TGTCTTCTCA ACCAAAACCC TAAAACCTCTC CTTCTTCTT CTCCCTAGAG
 t
 131 ATGTCTTCAA CAATATCCCT AAAGCCGACG CACCTTATCC TCTCCTCTTT CTCCACAGGC AAAGTCCTCC
 1 M S S T I S L K P T H L I L S S F S T G K V L Q
 201 AATTCGCGCG CTCCCGTTTC AGCCACACAC CGTCGTCGTC GTCGTCGTC TATCGGACTC TCGTAGCTCA
 25 F R R S R F S H T P S S S S S R Y R T L V A Q
 271 ACTCGGGTTC AGACCAGATT CTTTTGATTT CATCAAGGAC CATGCCGAGA ATCTGCTGTA CACGATCGCT
 48 L G F R P D S F D F I K D H A E N L L Y T I A
 341 GATGCCGCCG TTTCGTCTCTC TGAAACCTTT GAATCTGTCTG CCGGCACTAC TACCAAAACG ACCCAGAGCA
 71 D A A V S S S E T F E S V A G T T T K T T Q S N
 411 ATGATTGGTT CTCTGGTATT GCTAATTACA TGAAACTAT TCTCAAGGTT TTGAAAGATG GGTATCAAC
 95 D W F S G I A N Y M E T I L K V L K D G L S T
 481 TGTACATGTT CCTTATTCCT ATGGTTTCGC TATCATTCTA TTGACTGTGC TTGTTAAGGC TGCTACGTTT
 118 V H V P Y S Y G F A I I L L T V L V K A A T F
 551 CCATTGACGA AAAAACAGGT TGAATCTGCC ATGGCTATGA AATCTTTGAC GCCTCAAATA AAGGCTATTC
 141 P L T K K Q V E S A M A M K S L T P Q I K A I Q
 621 AGGAACGGTA TGCTGGTGAT CAGGAGAAAA TTCAGCTTGA AACTGCTAGA TTGTATAAGC TTGCTGGAAT
 165 E R Y A G D Q E K I Q L E T A R L Y K L A G I
 691 AAATCCCCTT GCAGGCTGCC TCCCACACT AGCCACGATA CCTGTCTGGA TTGGGCTATA TAGAGCCCTC
 188 N P L A C L P T L A T I P V W I G L Y A R A L
 761 TCAAATGTTG CAGATGAGGG GCTCTTAACG GAAGGTTTT TCTGGATACC TTCTCTTGCT GGTCCAACGA
 211 S N V A D E G L L T E G F F W I P S L A G P T T
 831 CTGTTGCTGC AAGACAGAAT GGCAGTGAA TCTCATGGCT GTTCCCTTTC ATTGAGGGAC ACCCACCTCT
 235 V A A R Q N G S G I S W L F P F I E G H P P L
 901 CGGATGGCCA GACACATTAG CATATCTTGT CTTACCTCTA TTGCTCGTCT TCTCTCAATA CCTCTCCATT
 258 G W P D T L A Y L V L P L L L V F S Q Y L S I
 971 CAAATTATGC AGTCCTCGCA GAGTAATGAT CCAGCCATGA AGAGCTCACA AGCAGTGACT AAGCTTCTTC
 281 Q I M Q S S Q S N D P A M K S S Q A V T K L L P
 1041 CACTGATGAT TGGCTATTTT GCATTATCAG TTCCTTCTGG TTTAAGTCTT TATTGGCTGA CCAACAACAT
 305 L M I G Y F A L S V P S G L S L Y W L T N N I
 1111 TTTGAGCACG GCACAGCAAG TATGGCTTCA AAAATATGGT GGTGCTAAGA ATCCAGTGGA GAAATTCAT
 328 L S T A Q Q V W L Q K Y G G A K N P V E K F T
 t
 1181 AATTTGGTCA CTAAGGAAGA TAAAACACAA CAAATGAGA AGTCTTTTTC AGAACCTA GTTCAGAAGT
 351 N L V T K E D K T Q Q I E K S F S E P L V Q K S
 n
 1251 CTGTTTCAGA ACTGAAAATA CCAAGAGAGA AGGGTGGTGA AAAGGTGACC CCAGAATGCC CCAAACCTGG
 375 V S E L K I P R E K G G E K V T P E C P K P G
 1321 TGAAAGGTTT AGGCTGCTGA AAGAGCAAGA AGCAAAGAGA CGTCGAGAAA AAGAAGAGAG GCAGAAAGCT
 398 E R F R L L K E Q E A K R R R E K E E R Q K A
 1391 GAAGCAGCTC TATCTAATCA AAATACAGAC AAAGCACATG AACAAGATGA AAAATCTGAT ACAGCCATTG
 421 E A A L S N Q N T D K A H E Q D E K S D T A I V
 1461 TCGCTGAAGA TGATAAAAAA ACAGAACTTT CTGCTGTGGA TGAAACATCC GATGGCACAG TAGCTGTGAA
 445 A E D D K K T E L S A V D E T S D G T V A V N
 1531 TGGGAAGCCA TCCATCAAAA AGGACGAGAC TACGAATGGG ACATTGCGCA TTGGCCATGA TACAGAACAA
 468 G K P S I Q K D E T T N G T F G I G H D T E Q
 1601 CAGCATTCTC ATGAAACAGA GAAGAGGTAA AGACTCATGT TTTTATGTCT TAAGGCGAAG CCAAACAAC
 491 Q H S H E T E K R *
 1671 AAAGAGGAAT TGAGATTTGA ATAAGACGAG GAGAAATCTT GGTACTCAGG CCTTGTAGTC CCTCTGCAAC
 1741 AGATTTGAA GTTTATAGAT CTTAAGAGTG GGAACATTA GTCTTCAGG TTTAGATTTT GTGTACAAAG
 1811 ACCATAGCAG ATGGGTATTT GAAGCCTTCG AAGCTTGGTT TCATATTTCT TATGTTCTTA TGTACAAGCA
 1881 AACAATTACT TTTGTCTCG TTCACTGGTG TTACTAAT ACGATAATAG TTTAG

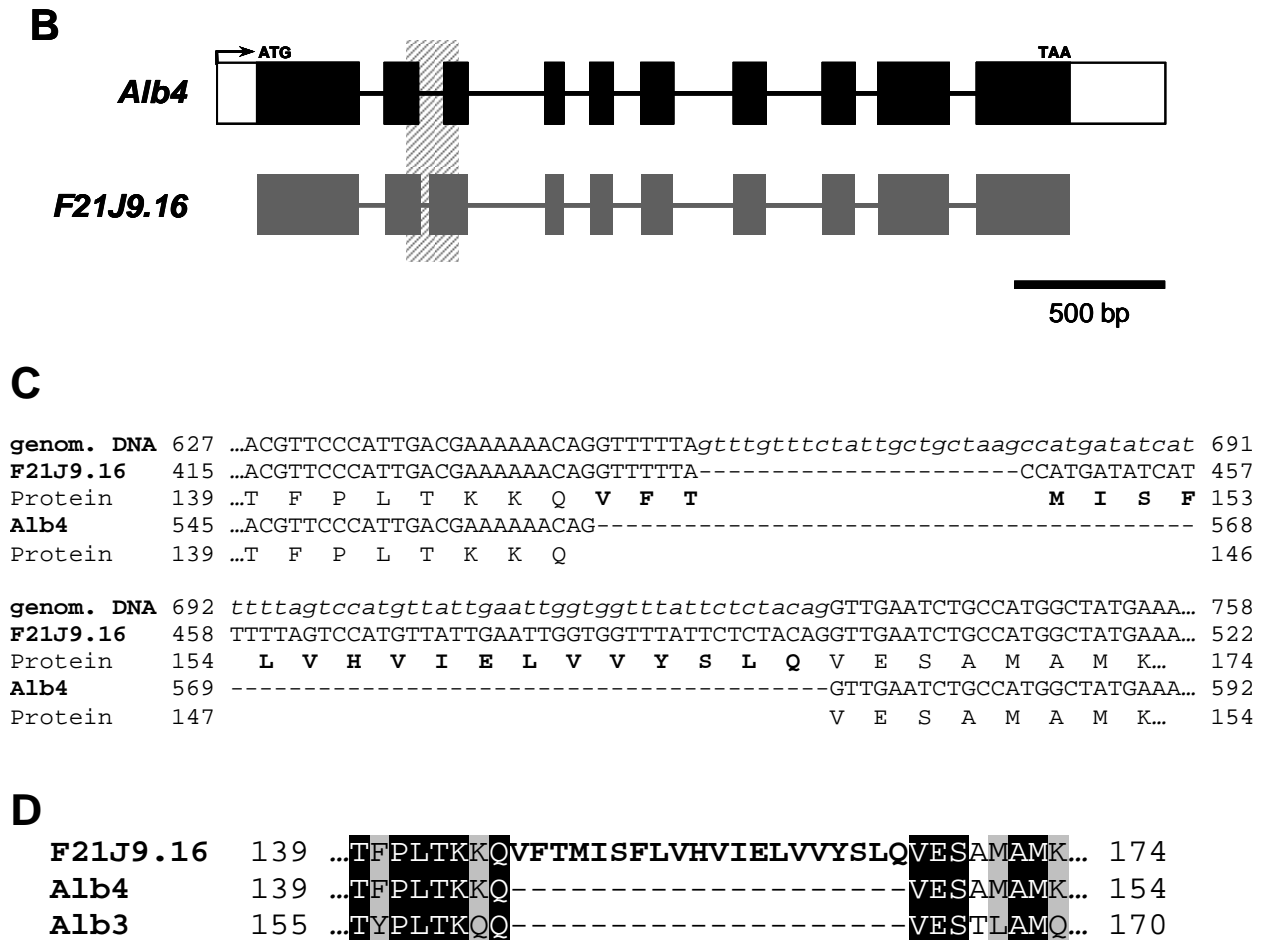


Abb. 5 Das Alb4-Transkript

(A) Experimentell ermittelte Transkript-Sequenz für *Alb4*. Angegeben sind die Sequenz auf cDNA-Ebene und darunter die korrespondierenden Aminosäuren. Die Numerierung beginnt beim ersten transkribierten Nukleotid bzw. der ersten translatierten Aminosäure. Die Positionen der Introns sind durch Dreiecke markiert. Der 5'- und der 3'- untranslatierte Bereich sind kursiv gehalten. Nukleotide, die gegenüber der genomischen Sequenz in zwei unabhängigen cDNA-Klonen anders waren, sind fett gedruckt, die auf genomischer Ebene falsch sequenzierten Nukleotide bzw. Aminosäuren sind in Kleinbuchstaben darüber bzw. darunter angegeben; eine durch die Änderung entfallende *EcoRI*-Schnittstelle ist eingerahmt.

(B) Vergleich der experimentell gefundenen Intron-Exon-Struktur für *Alb4* mit der *in silico* annotierten des Genmodells *F21J9.16*. Experimentell gefundene Exons sind als schwarze, vorhergesagte als graue Rechtecke, Introns als Linien und untranslatierte Bereiche als weiße Rechtecke dargestellt. Start- und Stopp-Codon (ATG, TAA) des gefundenen offenen Leserahmens sind eingezeichnet, ebenso der vermutliche Transkriptionsstart (Pfeil).

(C) Details des Übergangs vom zweiten zum dritten Exon. Im Schema B ist der dargestellte Bereich schraffiert hinterlegt. Sequenzen in Introns sind kursiv kleingeschrieben, die in der experimentell gefundenen Version nicht kodierten Aminosäuren sind fettgedruckt.

(D) Vergleich der *in silico* annotierten Version von *F21J9.16* und der experimentell ermittelten Sequenz von *Alb4* mit *Alb3* auf Aminosäureebene.

Alb4 unterscheidet sich am Übergang vom zweiten zum dritten Exon vom Genmodell *F21J9.16* (Abb. 5 C), so dass an dieser Stelle 60 Nukleotide wegfallen und *Alb4* daher 20 Aminosäuren kürzer als vorhergesagt ist. Beim Vergleich mit der Aminosäure-Sequenz von *Alb3* fällt auf, dass die beiden Proteine an dieser Stelle ohne die fälschlich vorhergesagten Aminosäuren viel ähnlicher sind (Abb. 5 D). In einem eigentlich konservierten Bereich waren hier *in silico* zusätzliche nicht-homologe Aminosäuren eingefügt worden. Darüber hinaus waren zwei weitere Nukleotide im *Alb4*-Transkript anders als auf genomischer Ebene sequenziert (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Die erste Änderung betrifft das dritte Nukleotid des für Serin 15 kodierenden Triplets und hat keinen Aminosäure-Austausch zur Folge, wohingegen die zweite Änderung zu Lysin 364 statt eines für *F21J9.16* annotierten Leucins führt (Abb. 5 A); dies bedeutet den Austausch einer unpolaren durch eine positiv geladene Aminosäure in einem zwischen *Alb4* und *Alb3* nicht konservierten Bereich (vgl. Abb. 6). Erwähnenswert ist außerdem, dass die zweite Änderung auf DNA- und cDNA-Ebene zum Wegfall einer internen *EcoRI*-Schnittstelle führt (eingerahmt in Abb. 5 A). Es handelt sich bei diesen Unterschieden entweder um Fehler bei der Sequenzierung der genomischen DNA oder um genetische Variationen zwischen den sequenzierten *Arabidopsis*-Linien.

4.1.2 Charakterisierung von Alb4

Anhand des experimentell gefundenen Leserahmens lässt sich die Aminosäure-Sequenz für Alb4 mit großer Sicherheit ableiten. Der direkte Vergleich mit Alb3 zeigt, dass beide Proteine über weite Bereiche identisch sind (Abb. 6). Innerhalb dieses sehr homologen Abschnitts liegt die in den Mitgliedern der Oxa-Proteinfamilie konservierte sogenannte Oxa-Domäne (60KD_IMP, pfam02096.12 (Marchler-Bauer et al., 2005)). Der N-terminale deutlich weniger homologe Teil liegt im Bereich der Transitsequenz von Alb3. Auch für Alb4 wird von TargetP ein chloroplastidäres Transitpeptid vorhergesagt. Damit wäre Alb4 das zweite chloroplastidär-lokalisierte Mitglied der Oxa-Proteinfamilie in *Arabidopsis*.

Mithilfe der Aminosäuresequenz kann Alb4 außerdem strukturell mit anderen Proteinen der Oxa-Familie verglichen werden (Abb. 7). So lassen sich die bisher untersuchten mitochondrialen Mitglieder in zwei Gruppen einteilen: Die Proteine der Oxa1-Gruppe besitzen eine ausgeprägte C-terminale Domäne, für die als Struktur eine α -helikale Superhelix („coiled-coil“) vorhergesagt wird (Nargang et al., 2002); den Proteinen der Oxa2-Gruppe fehlt diese Superhelix-Domäne weitgehend (Funes et al., 2004b). Für Alb3, das einzige bisher identifizierte plastidäre Mitglied der Oxa-Proteinfamilie, wird ebenfalls eine ausgeprägte C-

Alb4	-----MSSTIISLKPTHLILSSSFSTGKVLQFRRSRFSHTPSSSSSRYR-TLVAQL-GFR	51
Alb3	MARVLVSSPSSFFGSPLIKPSSSLR--HSGVGGGGTAQFLPYRSNNNKLFSTTVRFSLNEIPPFHGLD	68
Alb4	-PDSFDFIKDHAENLLYTIADAADVSSSETFESVAGTTTKTTQSNDFWFSGLIANYMETILKVLKDGLSTVHV	120
Alb3	SSVDIGALFTRAESLLYTIADAAVGADS--VVTDDSSAVQKSGGWFGFISDAMELVLKILKDGLSAVHV	136
Alb4	PYSYGFAIILLTVLVKAATFPLTKKQVESAMAMKSLTPQIKAIQERYAGDQEKIQLETARLYKLAGINPL	190
Alb3	PYAYGFAIILLTIIVKAATYPLTKQVESTLAMONLQPKIKAIQORYAGNQERIQLETSRLYKQAGVNPL	206
Alb4	AGCLPTLATIPVWIGLYRALSNADEGLLTFEGFFWIPSLAGPTTVAARQNGSGISWLFPFIEGHPPLGWP	260
Alb3	AGCLPTLATIPVWIGLYQALSNADEGLLTFEGFFWIPSLGGPTSIAARQSGSGISWLFPFVDGHPPLGWY	276
Alb4	DTLAYLVLPILLVFSQYLSIQIMQSSQSNDPAMKSSQAVTKLLPLMIGYFALSVPSGLSLYWLTNNILST	330
Alb3	DTVAYLVLPVLLIASQYVSMEIMKPPQTDPAQKNTLLVFKFLPLMIGYFALSVPSGLSIYWLTNNVLST	346
Alb4	AQQVWLOKYGGAKNPVEKFTNLVTKEDKTQQIEKSFSEPLVQKSVSELKIPREKGGKVTPECPKGERF	400
Alb3	AQQVYLRKLGGA-----K-PNMD----ENAS-KIISAGRAKRSI-AQ---P--DDAGERF	389
Alb4	RLLKEQE--AKRRRE--KEERQKAEAAALSNQNTDKAHEQDEKSDTAIVAEDDKKTEL SAVDETS DGTVAV	466
Alb3	RQLKEQEKRSKKNKAVAKDTVELVEESQSESEEGSDDEEEEAREGALASSTTSKP-LPEVQG--RR--SKRS	456
Alb4	NGKPSIQKDETTNGTFGIGHDTEQQHSHETEKR	499
Alb3	KRKRTV-----	462

Abb. 6 Alb4 als Protein

Protein-Alignment von Alb4 und Alb3. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt.

terminale Superhelix vorhergesagt (Funes et al., 2004b). Wird der COILS-Algorithmus zur Vorhersage von Superhelix-Strukturen auf das hier identifizierte Alb4 angewendet, erhält man als Ergebnis einen Bereich mit sehr wahrscheinlicher Superhelix-Struktur. Dies bedeutet, dass Alb4, wie auch Alb3, der Oxa1-Gruppe zugeordnet werden kann.

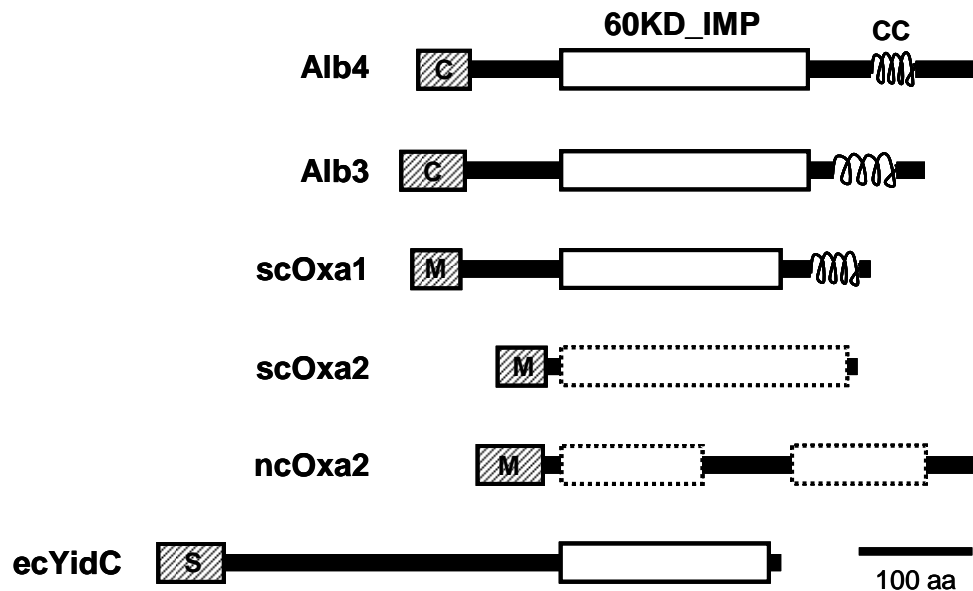


Abb. 7 Alb4 und die Oxa -Proteinfamilie

Schematische Darstellung der Domänen-Strukturen von Alb4, Alb3, Oxa1 (*S. cerevisiae*), Oxa2 (*Neurospora crassa*) und YidC (*E. coli*). Mit Ausnahme von Oxa2 besitzen alle Mitglieder die zentrale 60KD_IMP-Domäne (pfam02096.12); die entsprechenden Bereiche sind hier als unterbrochene Rechtecke eingetragen (verglichen mit Oxa1). C: chloroplastidäres Transitpeptid, M: mitochondrielle Präsequenz, S: bakterielle Export-Signalsequenz, CC: Superhelix-Domäne („coiled-coil“).

Alle bisher beschriebenen Mitglieder der Oxa-Proteinfamilie sind integrale Membranproteine mit fünf konservierten, zentral gelegenen Transmembranhelices (Funes et al., 2004a). Vergleicht man die Hydrophobizitäts-Plots (Kyte und Doolittle, 1982) von Alb4, Alb3 und scOxa1, so zeigen alle drei einen sehr ähnlichen Verlauf in diesem zentralen Bereich (Abb. 8 A). Zieht man darüber hinaus noch die Nettoladungsverteilung in Betracht und positioniert die positiv geladenen hydrophilen Bereiche auf der Innenseite der Membran ("positive-inside rule", Gavel et al., 1991; Wallin und von Heijne, 1998), so ergibt sich daraus für Alb4 ein Modell, dass ebenso wie bei Alb3 (Moore et al., 2000) und scOxa1 (Herrmann et al., 1997) fünf Transmembranhelices mit einer $N_{\text{außen}}-C_{\text{innen}}$ -Orientierung vorsieht (Abb. 8 B).

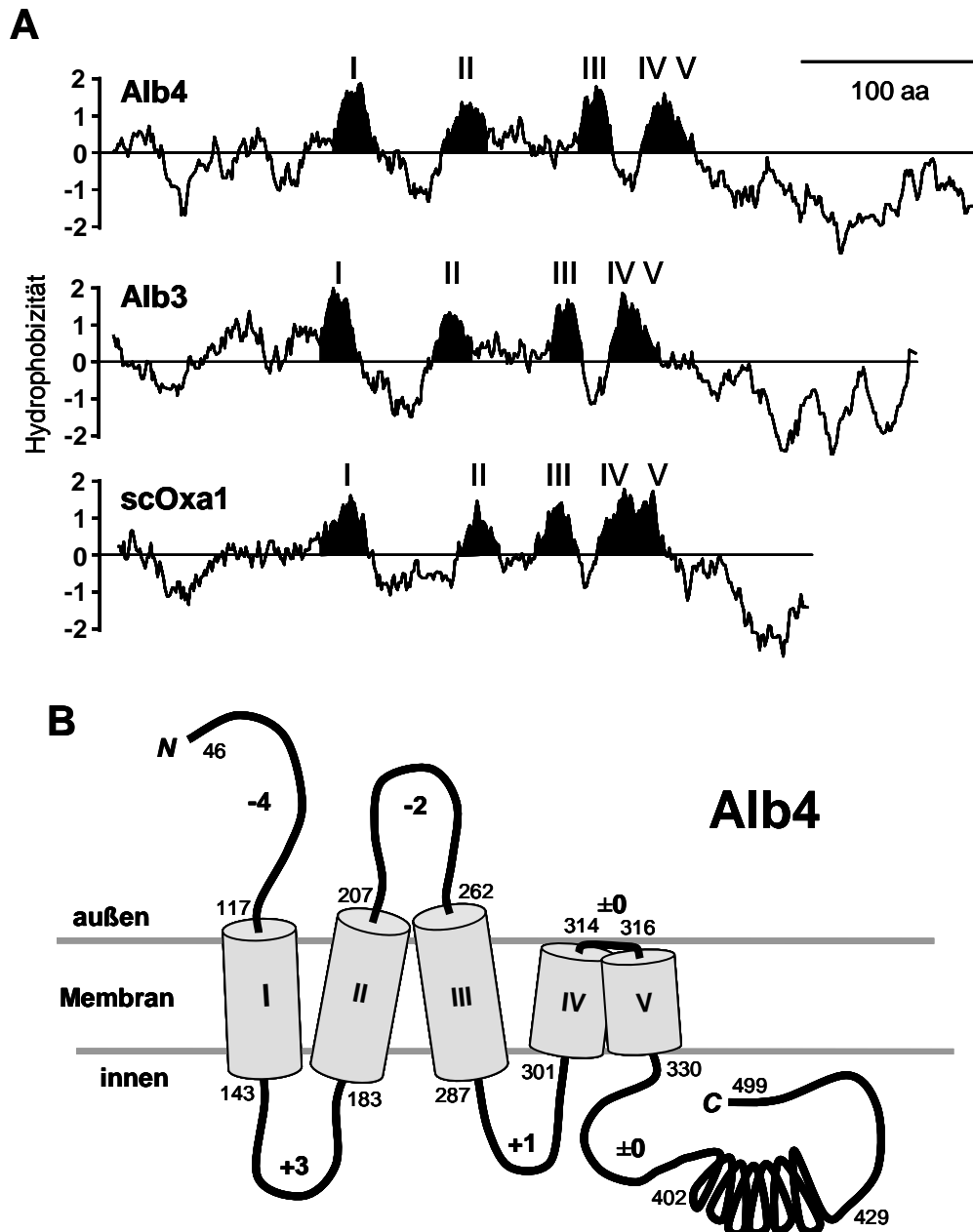


Abb. 8 Strukturmodell für Alb4

(A) Hydrophobizitäts-Plots nach Kyte-Doolittle (Fenstergröße = 19). Die Bereiche der fünf vorhergesagten Transmembranhelices sind schwarz ausgefüllt.

(B) Modell für die Insertion von Alb4 in der Membran. Die fünf Transmembranhelices sind als graue Zylinder dargestellt, die Superhelix-Domäne als Spirale. Die an die TM-Helices bzw. die Superhelix angrenzenden Aminosäuren sind numeriert; das vorhergesagte Transitpeptid ist weggelassen, so dass Alb4 bei Aminosäure 46 beginnt. Die Nettoladungen der hydrophilen Bereiche sind angegeben (fettgedruckt). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

4.2 Komplementation einer Hefe-*Δoxa1*-Mutante

Die Aminosäure-Sequenz und die daraus abgeleiteten Sekundärstrukturen legen nahe, dass es sich bei Alb4 um ein *bona fides* Mitglied der Oxa-Proteinfamilie in *Arabidopsis* handelt. Weitere Studien sollten nun zeigen, ob Alb4 auch die Funktion dieser Proteinfamilie bei der Membraninsertion von Proteinen übernehmen kann. Dazu wurde getestet, ob Alb4 aus *Arabidopsis* das Oxa1-Protein aus Hefe funktionell ersetzen kann.

Das mitochondrielle Protein Oxa1 wird für den Einbau von Komponenten der Atmungskette in die innere Membran benötigt (Bauer et al., 1994; Bonnefoy et al., 1994). *Δoxa1*-Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), denen ein funktionelles Oxa1 fehlt, können nur auf Medien wachsen, die ATP-Produktion über Gärung erlauben (z.B. Glucose). Auf Glycerin können sie nicht wachsen, da der Abbau von Glycerin ohne funktionierende Atmungskette nicht genügend Elektronen-Akzeptoren liefert, um das in der Glykolyse gebildete NADH wieder zu oxidieren (zwei NADH+H⁺ aber nur ein Pyruvat pro abgebautem Glycerin).

Zusammen mit der Arbeitsgruppe von Johannes Herrmann wurde überprüft, ob Alb4 das Oxa1-Protein aus Hefe als Integrase beim Aufbau der Atmungskette ersetzen kann. Dazu wurde der Bereich von Aminosäure 118 bis 499 von Alb4 aus *Arabidopsis* mit dem N-Terminus von scOxa1 (Aminosäuren 1-122) fusioniert und das Fusionsprotein (Abb. 9 A) in einer *Δoxa1*-Hefemutante (Hell et al., 1998) exprimiert. Der aus Alb4 ausgewählte Bereich umfasst sowohl die Oxa- als auch die potentielle Superhelix-Domäne. Das Fusionsprotein war in ähnlichen Mengen in den Mitochondrien der transformierten Mutanten nachweisbar, wie Oxa1 im Hefe-Wildtyp (Daten nicht abgebildet). Dies zeigt, dass das Fusionsprotein in Hefe stabil war und wie beabsichtigt in die Mitochondrien importiert wurde. Die Hefen wurden bis zur Log-Phase angezogen und in unterschiedlicher Verdünnung auf YP-Agar ausgebracht und weiterinkubiert. Die Agar-Platten enthielten entweder Glucose oder das nicht vergärbare Glycerin. Auf Glycerin-Medium kann die Oxa1-lose Mutante (*Δoxa1*) nicht wachsen. Wenn das mitochondrielle Alb4-Fusionskonstrukt in dieser Mutante exprimiert wurde (*Δoxa1* (Alb4)), war das Wachstum auf Glycerin wieder möglich, wenn auch in verringerter Geschwindigkeit (Abb. 9 B).

Diese Versuche zeigen, dass Alb4 aus *Arabidopsis* das Oxa1-Protein aus Hefe prinzipiell in seiner Funktion ersetzen kann. Die im Vergleich zum Wildtyp wesentlich geringere Dichte der Hefekolonien in der durch Alb4 komplementierten Mutante zeigt aber auch, dass die Komplementation nur partiell war und nicht alle Oxa1-Funktionen von Alb4 vollständig übernommen werden konnten.

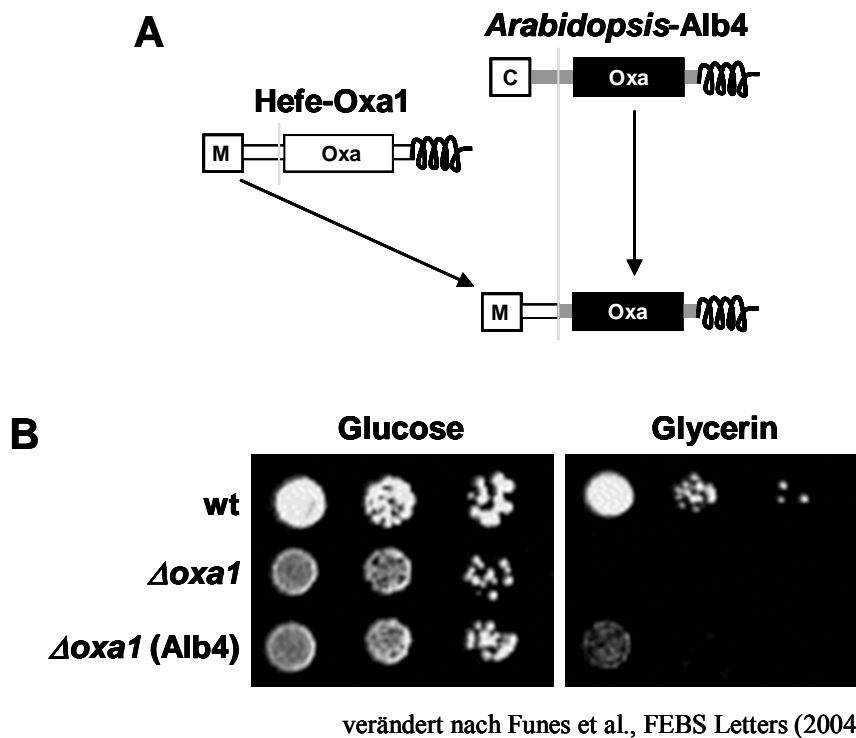


Abb. 9 Funktionelle Komplementation von $\Delta oxa1$ durch Alb4

(A) Schema des verwendeten Konstruktes. Der C-terminale Teil von Alb4 mit der Oxa- und der Superhelix-Domäne wurde mit dem N-Terminus von Oxa1 aus Hefe fusioniert. Das Fusionsprotein ließ sich in Hefe exprimieren und wurde dort in die Mitochondrien importiert. M: mitochondrielle Präsequenz, C: chloroplastidäres Transitpeptid.

(B) Hefen wurden bis zur Log-Phase angezogen, anschließend in unterschiedlicher Verdünnung auf YP-Agar ausgebracht und weiterinkubiert. Die Agar-Platten enthielten entweder Glucose oder das nicht vergärbare Glycerin. Auf Glycerin-Medium konnte eine Oxa1-lose Mutante ($\Delta oxa1$) nicht wachsen. Wenn das mitochondrielle Alb4-Fusionskonstrukt in dieser Mutante exprimiert wurde ($\Delta oxa1$ (Alb4)), war das Wachstum auf Glycerin partiell wieder möglich. Der Wildtyp (wt) diente als Kontrolle.

[Die Experimente wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe von Johannes Herrmann durchgeführt und veröffentlicht (Funes et al., 2004a).]

4.3 Lokalisation von Alb4 in der Zelle

Das einzige Mitglied der Oxa-Proteinfamilie, das bisher in Chloroplasten nachgewiesen wurde, ist Alb3 (Sundberg et al., 1997), ein integrales Protein der Thylakoidmembranen (Moore et al., 2000). Alb3 ist im Zellkern kodiert und wird als Vorstufen-Protein mittels einer abspaltbaren Transitsequenz in die Chloroplasten importiert (Sundberg et al., 1997). Die pilzlichen Oxa1- (Herrmann et al., 1997; Kermorgant et al., 1997) und Oxa2-Proteine (Souza et al., 2000; Funes et al., 2004b) und das pflanzliche Oxa1 (Sakamoto et al., 2000) sind hingegen in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert.

TargetP sagt für die experimentell bestimmte Alb4-Sequenz ein plastidäres Transitpeptid von 45 Aminosäuren voraus (mit mittlerer Verlässlichkeit, $RC = 3$; $cTP = 0,871$). Eine Alternative nach TargetP wäre eine Lokalisation in den Mitochondrien ($mTP = 0,298$). Mit verschiedenen experimentellen Ansätzen sollte daher die genaue Lokalisierung von Alb4 untersucht werden.

4.3.1 GFP-Fusion

Die erste Strategie zur experimentellen Lokalisation von Alb4 war die Herstellung von GFP-Fusionsproteinen, die transient in Mesophyll-Protoplasten exprimiert wurden. Die Fluoreszenz der transformierten Protoplasten wurde dabei mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop analysiert.

Das erste Konstrukt bestand aus den Aminosäuren 1-83 von Alb4 N-terminal an GFP fusioniert (TP-Alb4 in Abb. 10). In den Fluoreszenzaufnahmen ist deutlich die rote Autofluoreszenz des Chlorophylls in den Thylakoidmembranen und hier vor allem in den Grana-Bereichen zu sehen. Das GFP-Signal ist ebenfalls eindeutig in den Chloroplasten lokalisiert. In der Überlagerung ist jedoch zu erkennen, dass die Signale sich nicht decken, so dass davon auszugehen ist, dass das Fusionsprotein außerhalb der Thylakoide, wahrscheinlich im Stroma, lokalisiert ist. Die ersten 83 Aminosäuren von Alb4 reichen folglich aus, um das GFP-Fusionsprotein aus dem Cytosol ins Stroma der Chloroplasten zu importieren. Da für diese GFP-Fusion nur der N-Terminus von Alb4 mit dem Transitpeptid verwendet wurde, kann anhand dieser Daten noch keine Aussage über die Lokalisierung von Alb4 innerhalb des Chloroplasten getroffen werden. Erst mit dem N-terminal an GFP fusionierten Vollängen-Alb4 ist eine solche Aussage möglich (Alb4 in Abb. 10). Das GFP-Signal dieses Fusionsproteins deckt sich recht gut mit der Autofluoreszenz des Chlorophylls. Vergleicht man die Fluoreszenz darüber hinaus mit der des Alb3-GFP, so kann man ein sehr ähnliches Muster des GFP-Signals erkennen (Alb3 in Abb. 10). Dies legt nahe, dass es sich bei Alb4 um ein thylakoidäres Protein mit einer ähnliche Verteilung wie Alb3 handelt. Eine Lokalisation von Alb4 in einer der Hüllmembranen lässt sich aus den

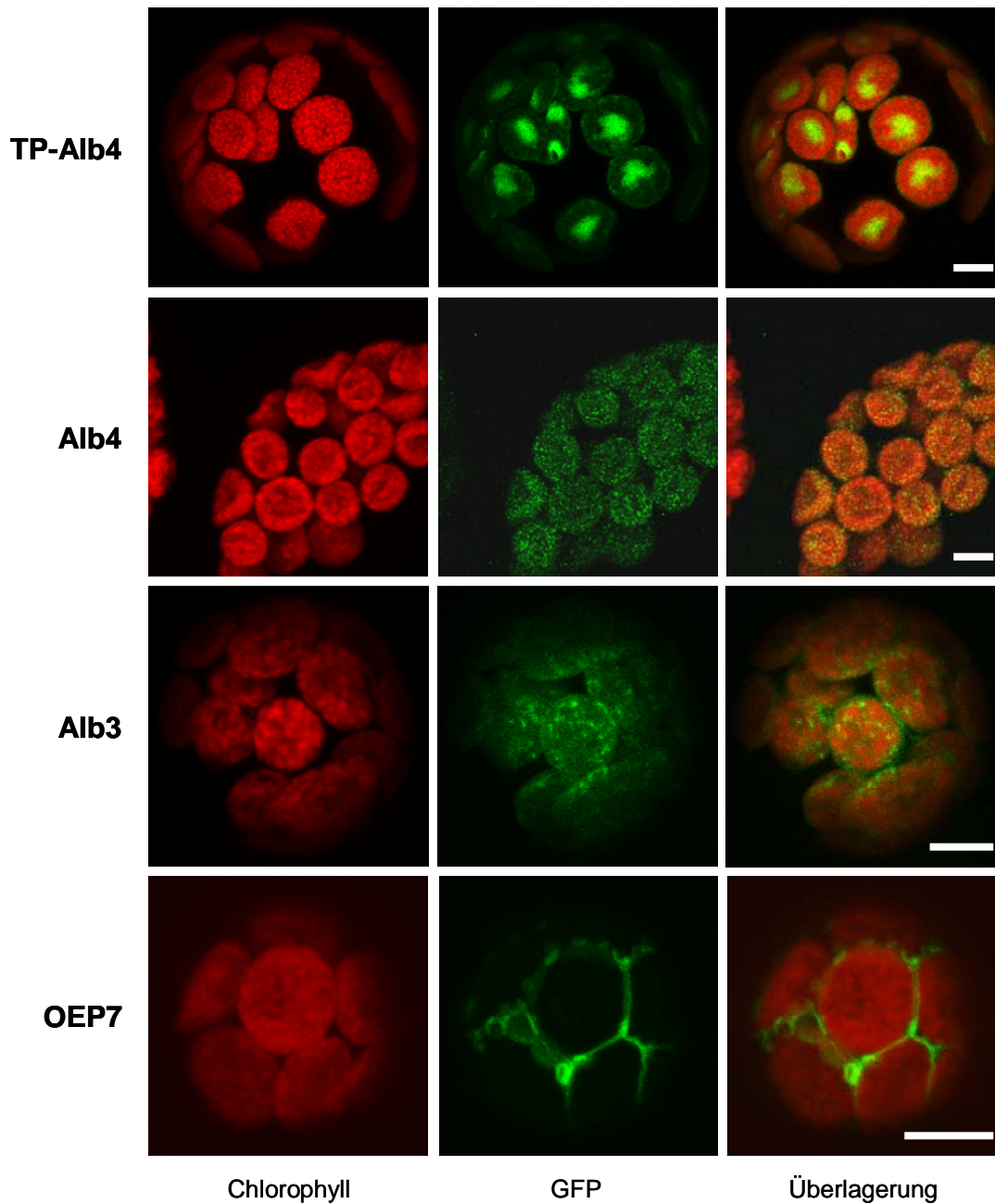


Abb. 10 Alb4 ist ein thylakoidäres Protein

GFP-Fusionsproteine wurden transient in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten exprimiert. Konfokale Bilder der Chlorophyll-Autofluoreszenz, des GFP-Signals und eine Überlagerung von beiden Signalen sind als Projektion der maximalen Intensität abgebildet. Das putative Transitpeptid von Alb4 (TP-Alb4) sorgt für den Transport des Fusionsproteins ins Stroma der Chloroplasten, das Konstrukt mit Volllänge-Alb4 (Alb4) wird in die Thylakoide eingebaut. Das thylakoidäre Protein Alb3 und das Protein der äußeren Hüllmembran OEP7 dienen als Kontrollen für die Lokalisierung. Der Balken entspricht 5 μm .

Fluoreszenz-Daten nicht ableiten, da OEP7 (Salomon et al., 1990; Lee et al., 2001) als Kontrolle ein grundverschiedenes GFP-Muster zeigt (OEP7 in Abb. 10). Eine Verteilung wie für das mitochondrielle Kontroll-Protein VDAC (Clausen et al., 2004; Daten nicht abgebildet) wurde mit beiden Alb4-Konstrukten nicht beobachtet, so dass auch eine Lokalisierung in den Mitochondrien nicht gefolgert werden kann.

4.3.2 Immunologischer Nachweis

Um die subzelluläre Lokalisierung weiter zu untersuchen, wurden mehrere Antiseren gegen Alb4 hergestellt. Um möglichst spezifische Antikörper zu erhalten, wurden drei verschiedene Antigene zur Immunisierung verwendet. α Alb4-1 richtet sich gegen die Aminosäuren 369-499 von Alb4, welche kaum Homologien zu dem entsprechenden Bereich von Alb3 aufweisen (vgl. Abb. 6). α Alb4-2 und α Alb4-3 wurden gegen ein Gemisch synthetischer Peptide (Aminosäuren 418-437 und 485-499) erzeugt. Alle drei Antiseren erkennen spezifisch heterolog überexprimiertes Alb4-Protein (Daten nicht abgebildet).

Mit den so generierten Antikörpern wurden dann verschiedene Chloroplasten-Fractionen aus *Arabidopsis* immundekoriert. Dazu wurden zunächst aus den Rosettenblättern von fünf bis sechs Wochen alten, nicht blühenden Pflanzen intakte Chloroplasten isoliert. Die Chloroplasten wurden anschließend osmotisch aufgebrochen, über einen Percoll-Gradienten in gemischte

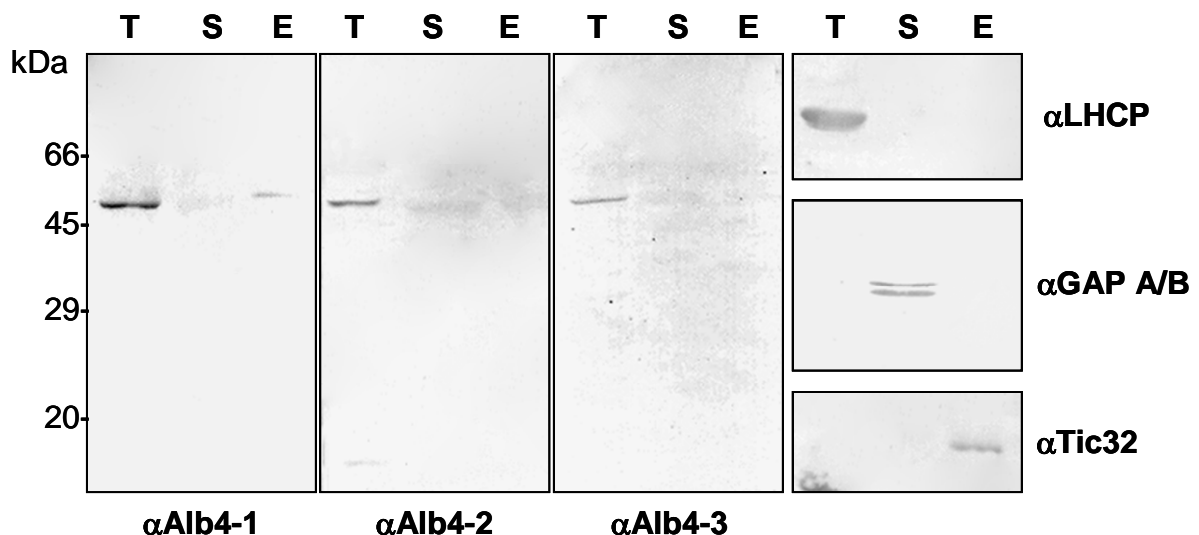


Abb. 11 Immunolokalisierung von Alb4

Arabidopsis-Chloroplasten wurden in Thylakoidmembranen (T), Stroma (S) und gemischte äußere und innere Hüllmembranen (E) fraktioniert. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und mit drei verschiedenen Antikörpern gegen Alb4 immundekoriert. Antiseren gegen LHCPs, Tic32 und GAP A/B dienen als Kontrollen für die Reinheit der aufgetragenen Fraktionen.

äußere und innere Hüllmembranen, Stroma und Thylakoidmembranen aufgetrennt. Die Proteine aus diesen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Membranen übertragen und mit verschiedenen Antikörpern immundekoriert. Die Reinheit der Fraktionen wurde mit Antikörpern gegen LHC-Proteine (α LHCP), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Untereinheiten (α GAP A/B) und Tic32 (α Tic32) überprüft; dies zeigt, dass keine wesentliche Kontamination der Fraktionen vorliegt. Alle drei Alb4-Antikörper erkennen jeweils nur ein einziges Protein von ca. 52 kDa. Diese apparente Größe stimmt dabei gut mit der berechneten Größe von 50,13 kDa (ohne die ersten 45 Aminosäuren) überein. Das Signal konnte dabei ausschließlich in der Thylakoidmembran-Fraktion detektiert werden (Abb. 11).

Diese immunologische Analyse der Chloroplasten-Fraktionen bestätigt die Lokalisierung von Alb4 in der Thylakoidmembran.

4.4 Vergleich der Expression von *Alb4* und *Alb3*

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass es mit Alb3 und Alb4 zwei funktionelle Mitglieder der Oxa-Proteinfamilie in der Thylakoidmembran gibt. Es ist jedoch aus diesen Untersuchungen nicht abzuleiten, ob diese Proteine dort zeitgleich vorkommen und eine redundante Funktion innehaben. Analysen haben gezeigt, dass Alb3 hauptsächlich in Pflanzenteilen exprimiert wird, die grüne Gewebe enthalten, wie Blätter, Blütenknospen und Sprossachsen (Sundberg et al., 1997), was gut zu einer Rolle beim Einbau von photosynthetisch wichtigen LHC-Proteinen zusammenpaßt. Weiterhin wird Alb3 aber auch in nicht-grünen Teilen wie Wurzeln und abreifenden Schoten exprimiert, wenn auch in wesentlich geringerem Maße (Sundberg et al., 1997).

Gemäß der im Internet verfügbaren Microarray-Daten (<https://genevestigator-1.ethz.ch>) für *Arabidopsis thaliana* rangiert der absolute Gehalt an *Alb3*-Transkript in allen untersuchten Teilen deutlich über dem an *Alb4* (Abb. 12 A). Setzt man *Alb4* zu *Alb3* ins Verhältnis, so zeigt sich, dass der *Alb3*-Transkriptgehalt in den verschiedenen Pflanzenteilen ca. zwei- bis 15-mal höher ist (Abb. 12 B). Der *Alb4*-Gehalt liegt besonders in seneszenten Blättern und in Samen recht hoch, sowohl im Vergleich der verschiedenen Gewebe als auch relativ zu *Alb3*. In den meisten Teilen mit grünen Geweben, wie Sprossachsen, Cotyledonen und Rosetten, dominiert *Alb3* über *Alb4* mit über zehnfach höheren Transkriptgehalten.

Aus dem Vergleich von *Alb4* und *Alb3* auf Transkriptebene lässt sich aber nur eingeschränkt eine Aussage über die Verhältnisse auf Proteinebene treffen, da der Proteingehalt bei Eukaryoten posttranskriptional noch stark reguliert werden kann.

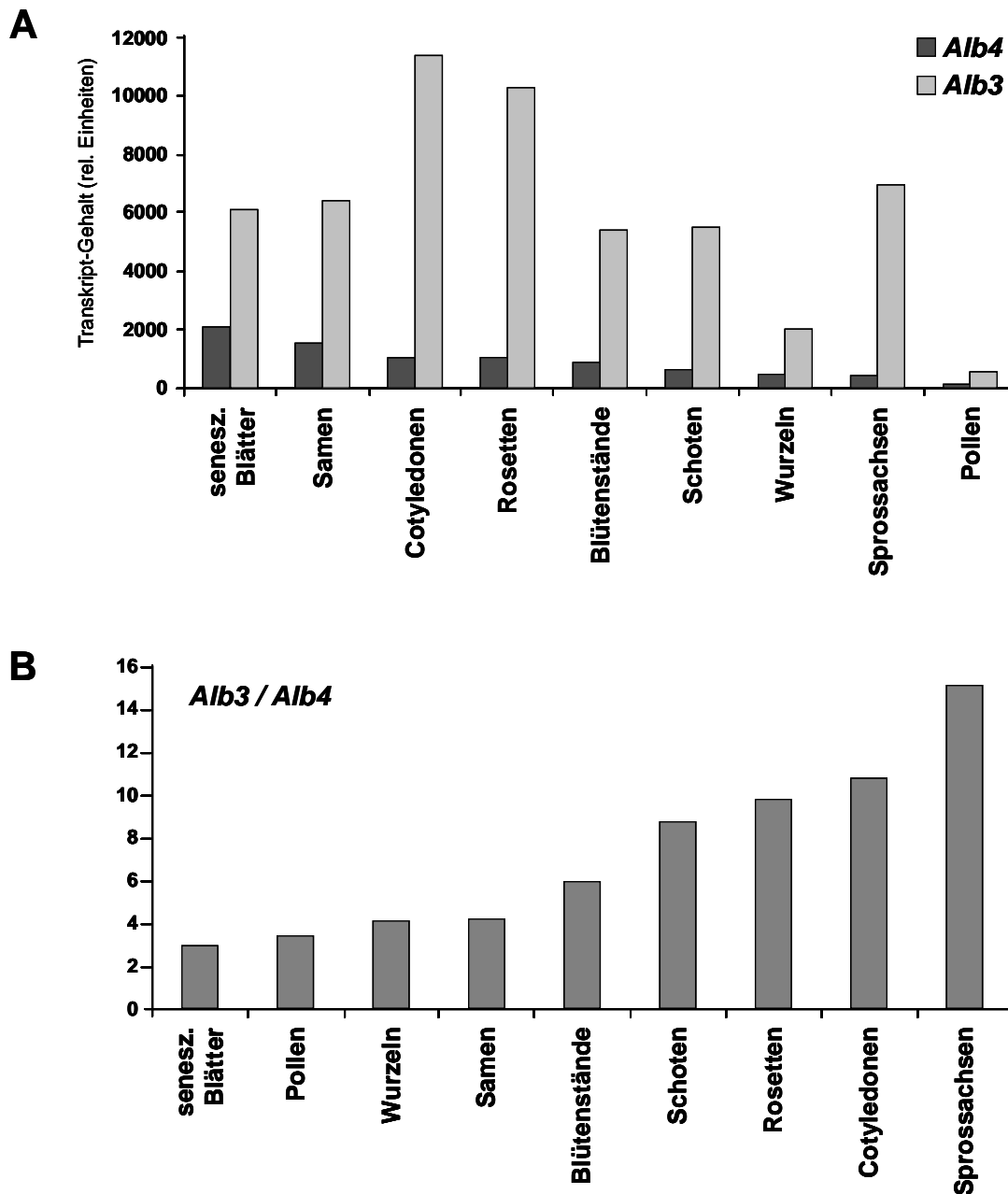


Abb. 12 Vergleich der Genexpression von *Alb4* und *Alb3*

(A) Vergleich der Transkriptgehalte in verschiedenen Pflanzenteilen. Die Daten sind absteigend nach dem Gehalt an *Alb4*-Transkript geordnet.

[Quelle: Genevestigator, <https://genevestigator-1.ethz.ch>; *Alb4* (265011_at), *Alb3* (266224_at)]

(B) Transkript-Verhältnis von *Alb3* zu *Alb4* in verschiedenen Pflanzenteilen. Die Daten sind absteigend nach dem Anteil von *Alb4* geordnet.

4.5 *Alb4*-Mutanten

Alle bisher untersuchten Mitglieder der Oxa-Proteinfamilie üben –zumindest unter bestimmten Wachstumsbedingungen– unverzichtbare Funktionen für die Zelle aus. *YidC* ist essentiell für die Lebensfähigkeit von *E. coli* (Samuelson et al., 2000), ohne *Oxa1* oder *Oxa2* ist der Aufbau einer funktionierenden Atmungskette in den Mitochondrien gestört (Bauer et al., 1994; Bonnefoy et al., 1994; Souza et al., 2000; Funes et al., 2004b), ohne *Alb3* sind die Pflanzen weder autotroph noch fertil (Sundberg et al., 1997). Die Analyse von Mutanten mit fehlendem oder zumindest deutlich reduziertem Gehalt an *Alb4* sollte zeigen, ob ähnlich drastische Auswirkungen auf die Chloroplastenbiogenese und das autotrophe Wachstum der Pflanzen zu beobachten sind wie beim Fehlen von *Alb3*.

4.5.1 Die T-DNA-Insertionslinie Salk_136199

Für die *Arabidopsis*-Linie Salk_136199 war eine inserierte T-DNA im fünften Intron des *Alb4*-Gens annotiert (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Pflanzen dieser Linie wurden per PCR auf die Insertion in *Alb4* genotypisiert. Die Untersuchung ergab, dass die Angehörigen der ersten angezogenen Generation nach Mendel aufspalteten, woraus auf einen heterozygoten Elter geschlossen werden kann. Alle Pflanzen waren auf Erde lebensfähig und zeigten unter Standard-Anzuchtbedingungen keinen Wachstumsphänotyp (Daten nicht abgebildet). Bei der Genotypisierung stellte sich außerdem heraus, dass die T-DNA im sechsten Intron inseriert ist, statt wie fälschlich annotiert im fünften (Abb. 13). Die gefundenen homozygoten Pflanzen wurden geselbstet und die Nachkommen für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Da auch die homozygoten Pflanzen keinen sichtbaren Phänotyp aufwiesen, sollte geklärt werden, ob und wie die Insertion in einem Intron die Expression von *Alb4* beeinflusst. Dazu wurde RNA aus den Blättern von sieben Tage alten Pflanzen isoliert und revers-transkribiert.

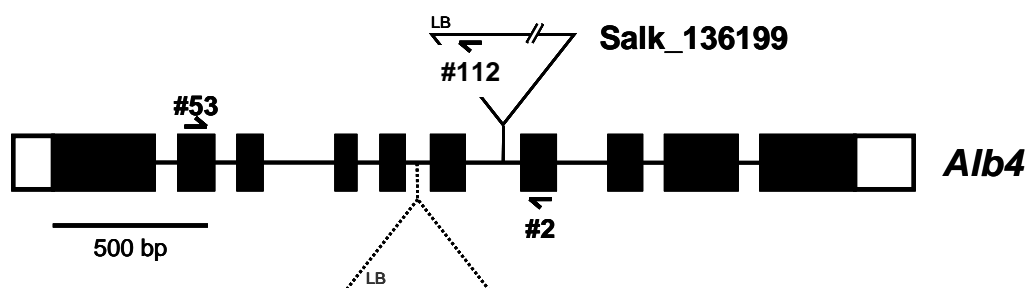


Abb. 13 Die T-DNA in der *Alb4*-Insertions-Linie Salk_136199 sitzt anders als annotiert
 Schema des *Alb4*-Gens. Die experimentell gefundene Position der T-DNA in Intron 6 ist in oben eingetragen, die fälschlich annotierte im fünften Intron gestrichelt. Die Halbpfeile stellen die für die Genotypisierung verwendeten Primer dar. Die Richtung des Left-Border (LB) ist eingezeichnet.

Mit einem Primerpaar, welches das sechste Intron mit der T-DNA-Insertion umschließt (Abb. 14 A), wurden aus den homozygoten Pflanzen zwei unterschiedlich große RT-PCR-Produkte amplifiziert; die Wildtyp-Kontrollen hingegen enthielten nur das größere Produkt (Abb. 14 B). Die Sequenzierung der beiden Produkte ergab, dass die größere Bande dem normal gespleißten Wildtyp-Transkript entspricht, in der kürzeren Version wurde Exon 7 zusammen mit Intron 7 herausgespleißt (Abb. 14 C). Dadurch wird zusätzlich die T-DNA aus dem Transkript entfernt. Da bei dieser Deletion der Leserahmen durch den Wegfall von 36 Codons erhalten bleibt, wird ein verkürztes Protein kodiert, dem die vierte vorhergesagte Transmembranhelix fehlt, ansonsten aber Alb4 entspricht.

In vier Wochen alten Pflanzen der Linie Salk_136199 konnten ebenfalls beide Transkript-Versionen in ungefähr gleichen Anteilen amplifiziert werden (Daten nicht abgebildet). Die

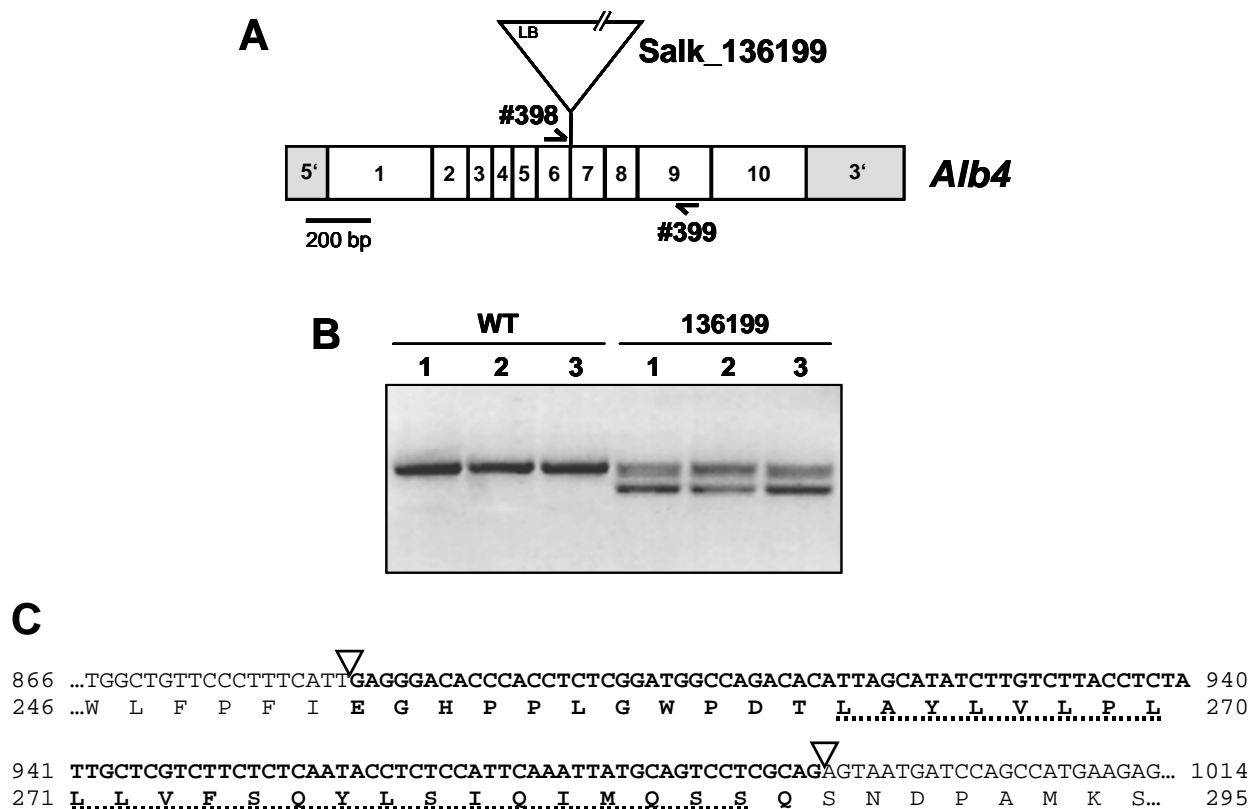


Abb. 14 Die T-DNA-Linie Salk_136199 transkribiert zwei Versionen Alb4-mRNA

(A) Schema des *Alb4*-Transkripts mit der Position der T-DNA. Die Positionen der für die Transkript-Analyse verwendeten Primer sind als Halb Pfeile eingezeichnet. LB: Left-Border.

(B) RT-PCR-Produkte, erhalten mit den Primern #398 und #399 an cDNA aus drei verschiedenen Mutanten- (136199) und drei verschiedenen Wildtyp-Pflanzen (WT), wurden im Agarose-Gel aufgetrennt.

(C) Die DNA der zwei RT-PCR-Banden wurde aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Ein Transkript ist identisch zum Wildtyp, im zweiten Transkript ist Exon 7 (fettgedruckt) zusammen mit Intron 7 herausgespleißt worden. Die Aminosäuren der putativen vierten Transmembran-Domäne sind unterpunktet.

Spleißvarianten segregierten also nicht und entstehen gleichermaßen in verschiedenen Altersstadien der Pflanzen.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob es zu den zwei Transkript-Versionen von *Alb4* auch zwei korrespondierende Protein-Versionen gibt. Dazu wurden Chloroplasten isoliert und in Membranen und Stroma fraktioniert. Immundekoration mit α Alb4-1 ergab in den Mutanten nur ein Protein von derselben Größe wie im Wildtyp, ein um 36 Aminosäuren (4 kDa) verkürztes Protein war weder in den Membranen noch löslich im Stroma nachweisbar (Abb. 15). Die Version ohne die vierte Transmembranhelix scheint also entweder sehr instabil zu sein oder gar nicht erst translatiert zu werden.

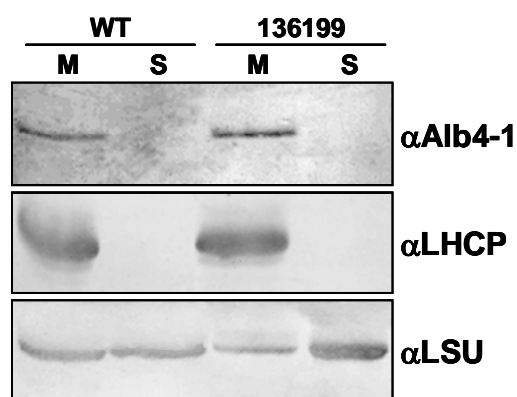


Abb. 15 Die T-DNA-Linie Salk_136199 enthält nur eine Version des Alb4-Proteins

Chloroplasten aus Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen wurden in Membranen (M) und Stroma (S) fraktioniert. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und Immunoblots mit Antikörpern gegen Alb4 immundekoriert. Es ist jeweils das native Protein von 52 kDa, aber kein um 36 Aminosäuren verkürztes Protein in der Mutante nachweisbar. α LHCP und α LSU dienten als Kontrollen für die Fraktionen.

Durch Messung des *Alb4*-Transkriptgehaltes sollten die zu erwartenden Auswirkungen der Insertion quantifiziert werden. Dazu wurde mit quantitativer Echtzeit-PCR der *Alb4*-Gehalt in Blättern von sieben Tage alten Pflanzen gemessen. Mit dem verwendeten Primerpaar (Abb. 16 A) wurde sowohl die Wildtyp-Version als auch die verkürzte Version des *Alb4*-Transkripts in den Mutanten gleichermaßen erfasst. Der Analyse nach beträgt der *Alb4*-Transkriptgehalt in der Linie Salk_136199 nur ca. 45% des Gehaltes in den identisch angezogenen Wildtyp-Pflanzen (Abb. 16 B). Diese signifikante Reduktion scheint sich aber nicht in einem makroskopisch beobachtbaren Phänotyp niederzuschlagen.

Das Ausschalten von Alb3 führt zu einem albinotischen Phänotyp mit morphologisch abnormal organisierten Chloroplasten, die nur wenige Thylakoidmembranen und kaum Grana-Stapel aufweisen (Sundberg et al., 1997). Da Alb4 allen bisherigen Ergebnissen nach ein in der

Thylakoidmembran lokalisiertes Paralog von Alb3 ist und die beiden eine zu 46% identische und zu 67% ähnliche Aminosäure-Sequenz aufweisen, sollte die Ultrastruktur der Chloroplasten aus der T-DNA-Linie näher charakterisiert werden. Dazu wurden Keimblätter von sieben Tage alten Pflanzen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Chloroplasten im Mesophyll der Mutantenlinie waren ca. 20% größer als die Chloroplasten in der Wildtyp-Kontrolle. Auch hatten sie ihre typisch linsenförmige Gestalt verloren und waren weitestgehend sphärisch (Pfeile in Abb. 17). Zusätzlich zeigten viele Chloroplasten eine Auflockerung in den Thylakoidstrukturen mit größeren Stromabereichen (Pfeilköpfe in Abb. 17).

Die Reduktion des Alb4-Gehaltes führt also zu einem schwachen, nicht-albinotischen Phänotyp mit veränderter Chloroplasten-Ultrastruktur, die autotrophe Lebensfähigkeit der Pflanzen wird dadurch nicht eingeschränkt.

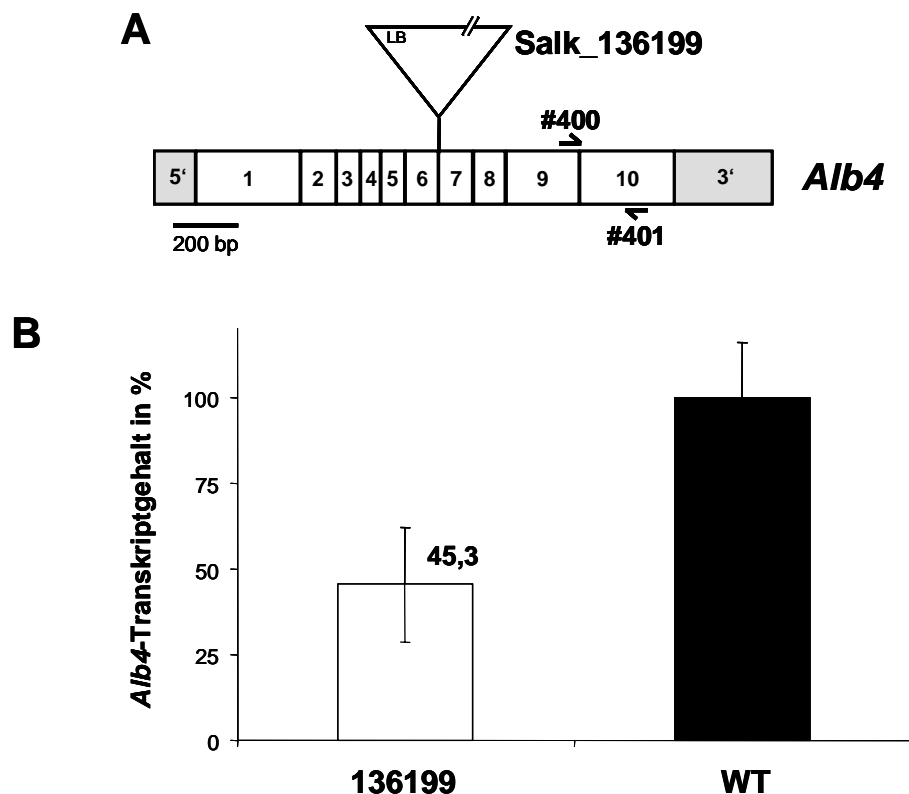


Abb. 16 Transkript-Analyse von *Alb4* mittels Echtzeit-RT-PCR

(A) Schema des *Alb4*-Transkripts mit der Position der T-DNA. Die Halbpfeile stellen die für die quantitative Echtzeit-PCR verwendeten Primer dar. . LB: Left-Border.

(B) Quantifizierung von *Alb4*-Transkript aus sieben Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen. Verglichen wurden Pflanzen der für die Insertion in *Alb4* homozygoten T-DNA-Linie Salk_136199 mit dem Wildtyp (jeweils n = 3; der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an). Der mRNA-Gehalt an *Alb4* wurde anhand des Verhältnisses zu Aktin-Transkripten berechnet und auf den Wildtyp-Gehalt (100%) normalisiert.

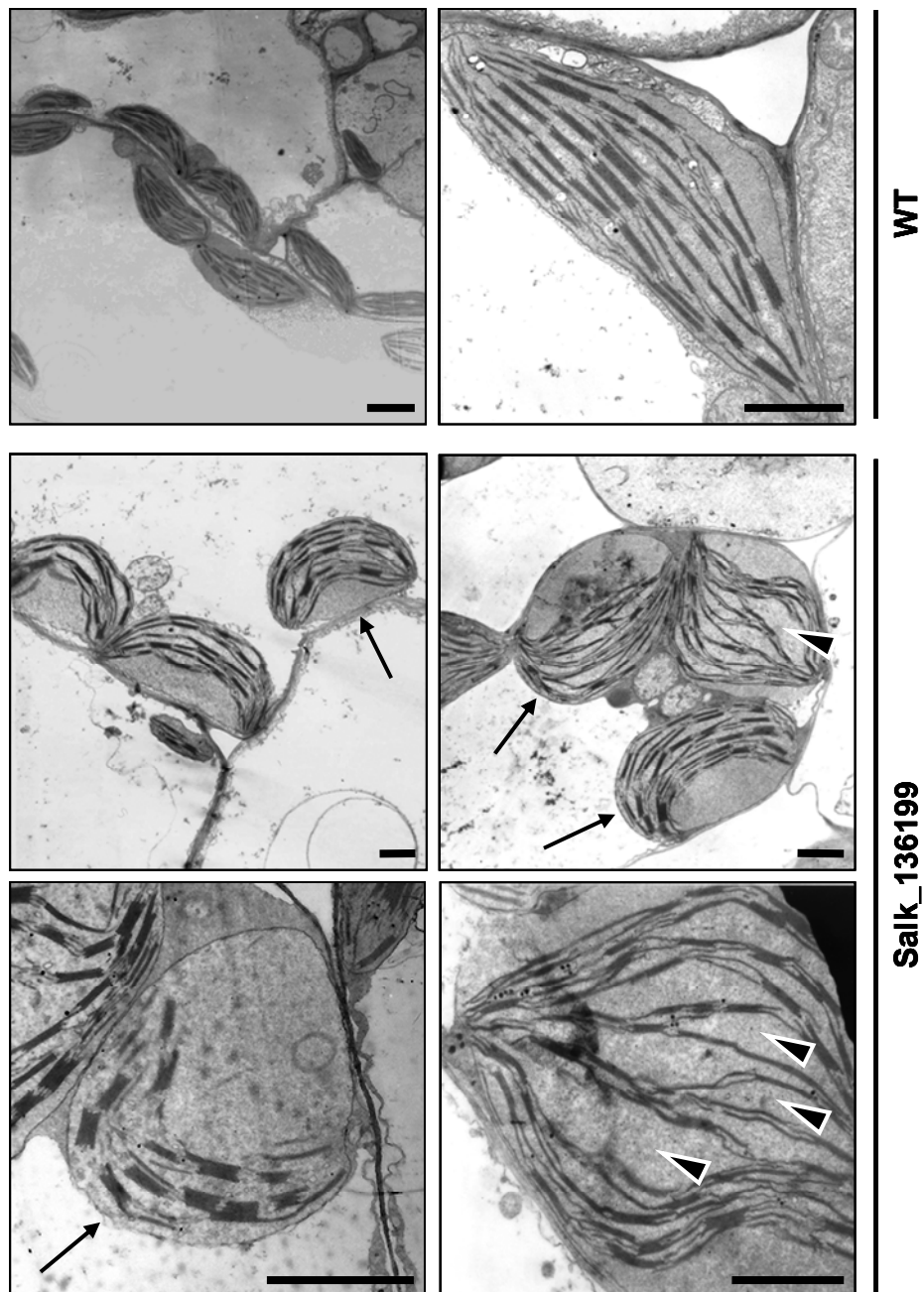


Abb. 17 Ultrastruktur der Chloroplasten aus der Alb4-T-DNA-Linie Salk_136199
 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mesophyllzellen aus sieben Tage alten Keimlingen. Die Pfeile verweisen auf die abgekugelteren Chloroplasten, die Pfeilköpfe auf die aufgelockerteren Thylakoidbereiche. Der Balken entspricht 2 μm .

4.5.2 Die T-DNA-Insertionslinie SAIL-1233D09

Um zu klären, ob der nur schwach ausgeprägte Phänotyp der Linie Salk_136199 dadurch bedingt war, dass weder das *Alb4*-Transkript noch das Alb4-Protein vollständig ausgeschaltet worden waren, wurde eine weitere Linie untersucht. Die T-DNA-Insertion der Linie SAIL-1233D09 war für den 5'-untranslatierten Bereich von *Alb4* annotiert (Abb. 18).

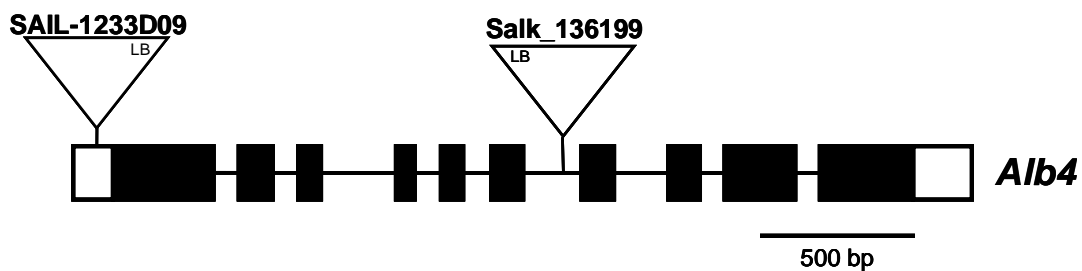


Abb. 18 T-DNA-Insertionslinien für *Alb4*

Position und Orientierung der beiden untersuchten T-DNA Insertionslinien. Angegeben ist die Richtung des Left-Border (LB).

Wiederum wurde mittels PCR-Analyse zuerst die Insertionsposition der T-DNA in *Alb4* verifiziert und anschließend homozygote Pflanzen identifiziert. Alle Pflanzen waren voll lebensfähig auf Erde und zeigten keinen Wachstumsphänotyp (Daten nicht abgebildet).

Mit quantitativer Echtzeit-PCR wurde dann der *Alb4*-Gehalt in Blättern von vier Wochen alten Pflanzen gemessen. Der *Alb4*-Transkriptgehalt in der Linie SAIL-1233D09 betrug ca. 200% des Gehaltes in den identisch angezogenen Wildtyp-Pflanzen (Daten nicht abgebildet). Diese Steigerung der Transkriptmenge könnte auf dem Wegfall der Bindestelle eines möglichen Silencers beruhen oder durch die Auswirkungen der Nähe eines starken Promoters innerhalb der T-DNA bedingt sein.

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Expression von *Alb4* Auswirkungen auf ultrastruktureller Ebene hat, wurden wiederum die Chloroplasten elektronenmikroskopisch analysiert. Weder in sieben Tage noch in zwei Wochen alten Pflanzen konnten Auffälligkeiten in den Mesophyllzellen festgestellt werden, die Chloroplasten glichen denen des Wildtyps (Daten nicht abgebildet).

4.5.3 *Alb4*-RNAi-Linie

Der niedrigste *Alb4*-Gehalt in den verfügbaren Insertionslinien war mit fast 50% immer noch recht hoch. Um dennoch *Arabidopsis*-Pflanzen untersuchen zu können, in denen Alb4 signifikant reduziert ist, wurden RNAi-Linien hergestellt. In Pflanzen löst doppelsträngige

RNA einen als „Post-Transcriptional-Gene-Silencing“ (PTGS) bezeichneten Mechanismus aus, der das natürlich vorkommende Transkript zum spezifischen Ziel von Nukleasen macht (Vaucheret et al., 2001). Mit Konstrukten, die zueinander komplementäre RNAs (Haarnadel-Strukturen) exprimieren, konnten pflanzliche Ziel-mRNAs um durchschnittlich 90% reduziert werden. Haarnadel-Arme von 400-800 nt Länge erwiesen sich dabei als stabil und effektiv (Wesley et al., 2001). In *Drosophila* wird RNAi von 21 nt dsRNA-Oligomeren vermittelt, die aus der induzierenden dsRNA entstehen (Zamore et al., 2000; Elbashir et al., 2001). Beim PTGS in Pflanzen wurden ähnliche 21-25 nt RNAs gefunden (Hamilton und Baulcombe, 1999; Waterhouse et al., 2001). Daraus lässt sich folgern, dass mindestens Homologie über einen Bereich von 21-25 nt zwischen der Ziel-mRNA und einem effektiven Haarnadel-Konstrukt notwendig sind (Wesley et al., 2001).

Da mit dem Ansatz nur *Alb4* effektiv und spezifisch ausgeschaltet werden sollte, wurde für das RNAi-Konstrukt ein 735 nt langes Stück verwendet, dessen Homologie zu allen bei GenBank hinterlegten *Arabidopsis*-Transkripten maximal 19 direkt aufeinander folgende Nukleotide betrug (Abb. 19 A). *Alb4* und *Alb3* sind nicht nur auf Protein-Ebene in Teilen fast identisch (Abb. 6), sie zeigen auch sehr ähnliche Intron-Exon-Strukturen mit jeweils zehn Exons (Abb. 19 B). Die Homologie ist zwar auch auf Transkriptebene noch deutlich zu erkennen (Abb. 19 C), bildet jedoch für ein spezifische RNAi-Konstrukt kein Hindernis, da maximal zwölf aufeinander folgende Nukleotide identisch sind.

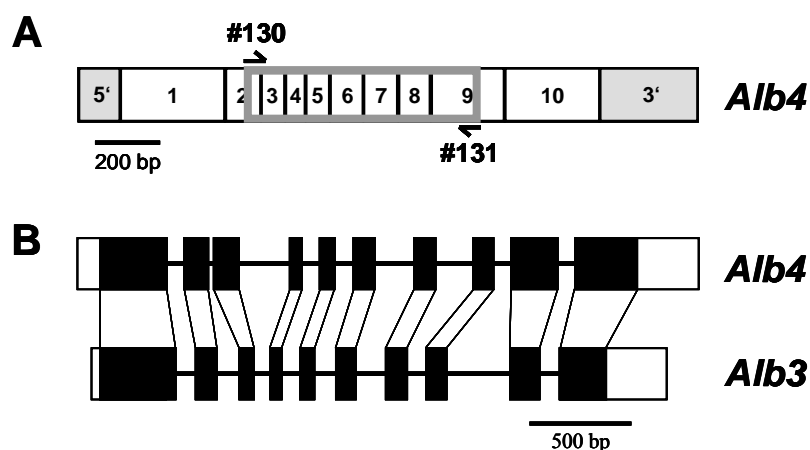


Abb. 19 RNAi-Konstrukt für *Alb4*

(A) Schematische Darstellung der zusammengespleißten Exons von *Alb4* mit den 5'- und 3'-UTRs. Der Bereich von *Alb4*, der für das RNAi-Konstrukt verwendet wurde, ist grau umrahmt und von den Klonierungsprimern (Halbpfeile) umgeben.

(B) Vergleich der Intron-Exon-Strukturen zwischen *Alb3* und *Alb4*.

(C) Alignment der gespleißten Protein-kodierenden Bereiche von *Alb4* und *Alb3*. Identische Nukleotide sind schwarz hinterlegt. Die durchgestrichenen Nukleotide in *Alb4* markieren das RNAi-Konstrukt. Die Numerierung beginnt jeweils beim Translations-Start.

C

Alb4	-----ATGTCTTCAACAATATCCCTAAAGCCGACGCACC-IT-A---TCCTCTCCTCT-	48
Alb3	ATGGCGAGAGTTCTAGTCTCGTCTCCATCTTCACTTTCGGTTACCGTTGATTAACCCGTCCTCATCTCTC	72
Alb4	-TTCTCC-----AC-AGGCA-AAAGTCTCCAATTCGCGCTCCGTTTCAGCCACACACCGTCGTC	107
Alb3	CGTCACAGTGGAGTAGGAGGAGGAGGAACCGCTCAATTTCTCCATACCGAGTAATAATAACAACCTCTC	144
Alb4	-GTCGTCGTCCTGTTATCGGACTC-TCGT-AGCTCAA---CTCGGGTTCA--GACCAG-AT--TCTTTTG--	166
Alb3	ACTACTTCAACCACCGTACGATTACGCTTAAACGAGATTCTCTCTTTCCATGCTTGGATTTCATCTGTAGAC	216
Alb4	ATTTTCATC--AAG--ACCA-TGCCGAGAATCTGCTGTACACGATCGCTGATGCCGCCGTTTCGTCCTCTGAA	234
Alb3	ATCGGAGCGATTTTCCACCAGAGCTGAATCTTCTCTATACAATAGCTGACGCCGCCGTTGTTGGTGCTGAT	288
Alb4	ACCTTTCAATCTGTCCCGCCTACTACTACAAAACGACCCAGAGCAATGATTGGTTCTCTGGTATGCTAAT	306
Alb3	TCCGTCGTAACCT--ACTGATTCATCCGCGGTGCAGA--AGAGTGGTGGTTGGTTGGTTTATCTCCGAT	354
Alb4	TACATGAAACTATTCTCAAGGTTTTGAAAGATGGGTTATCAACTGTACATGTTCCTTATCTCTATGGTTTC	378
Alb3	GCTATGGAATTGGTTCTTAAGATTTTGAAGGATGGATTATCAGCGGTTCACTGACCTTATCTCTATGGATT	426
Alb4	GCTATCATCTTATTGACTGTCCTTCTTAAGCTTCTTACTTCCATTGAGCAAAAAACAGCTTCAATCTGCT	450
Alb3	GCGATTATCTTGTCTACGATTATCTGTCAAAGCAGCGACGATCTCTTGGACTAAGCAACAGGTTGAATCAACA	498
Alb4	ATCGCTATGAAATCTTTGACCCCTCAAAATTAAGCCTATTCAACAACGCTATCTCTGCTGATCAGGACAAAAT	522
Alb3	CTAGCGATGCAAAAATCTTCAACCGAAAATCAAAGCGATTCAACAACGTTACGACGAAATCAGGAGAGGATA	570
Alb4	CACCTTCAAACTGCTAGATTGTATAAAGCTTCTGCGAATAAATCCCTTCCAGGCTGCGCTCCGACACTAGCC	594
Alb3	CAACTAGACATCGCGATTGTATAAACAGCTGGTGTAAATCCGTTGGCAGGTTGCTTACCAACTTTAGCA	642
Alb4	ACCATACCTCTCTGGATTGGCTTATAAAGCCTCTCAATCTTGGAGTGGAGGGCTCTTAAACGAAAGCT	666
Alb3	ACCATACCAGTTTGGATTGGTTTATAACAGCTCTCTCTAACGTTGGCCACGAGGGATTGTTTACAGAAGGT	714
Alb4	TTTTTCTGGATACTTCTCTTCTGCTTCAACGACTCTTCTCTCAACACAGATGGCACTTCAATCTCTATGG	738
Alb3	TTCTTTTGGATTCCATCTCTGGGTGGACCAACATCTATAGCTGCTCGGCAGACTGGATCCGGCATTTCGTGG	786
Alb4	CTCTTCTCTTCAATTCAGCAGACCCACTCTCTGGATGGCAACACAGATTAGCATATCTTCTCTTACCTCTA	810
Alb3	CTTTTTCGTTTGTGGACGGGCATCCACCATTGGGATGGTATGACACTGTAGCTTATCTTGTCTACCTGT	858
Alb4	TTCTCTCTCTTCTCTCAATCTCTCTCAATCAAAATTAATGCACTCTCTCAAGTAATGATCCAGCATGAAG	882
Alb3	CTACTTATGCTCCAGTATGTGTCAATGGAAATTATGAAGCCTCTCAAACTGATGATCCTCCACAGAAG	930
Alb4	ACCTCAAAAGCACTACTAAGCTTCTTCCACTCATGATTCGGTATTTTGCATTATCACTTCTCTCTCTTTA	954
Alb3	AATACGCTTCTTGTTTCAAGTTTCTTCCACTCATGATCGGTTACTTTGCATTGTCTGTCCATCAGGACTA	1002
Alb4	AGTCTTTTATFGGCTTACCAACAAATTTGAGCACCGCAGCAAGTATGGCTTCAAAAATATGGTGGTGC	1026
Alb3	TCTATTTACTGGCTCACAAATAATGTACTTAGTACCGCCCAACAAGTATATCTCGTAAACTAGGTGGTGC-	1073
Alb4	AAGAATCCAGTGCAGAAATTCACTAATTTGGTCACTAAGCAAGATAAAAACACAACAATTGAGAATCTTTT	1098
Alb3	-----AAAG--CC-A--AATA-TG--GAT-----GAA-----	1092
Alb4	TCAGAACCACTAGTTTCAAGCTTCTGTTTCAAGACTGAAAATACCAAGAGCAAGGGTGGTGAAAGGGTGACC	1170
Alb3	--A-ACGCA--AG--CA-AAATAA--TAG--TGCGG-GAC--GAGCAAAGAGA--TCTA--T-TG--C	1139
Alb4	CCAGAAATGCCCAAACCTGGTGAAAGGTTTAGCTGTCTGAAAGAGCAAGAAACAAAGAGACGTCGAGAAAAA	1242
Alb3	TCAGCCTGACGATG--CTGCCGAAAGATTAGAC-----AATTAAAAGA-GCAA-GA-----	1187
Alb4	GAAGAGAGCCAGAAAGCTGAAGCAGCTCTATCTAATCAAAATACAGACAAAGCACATGAACAAGATGAAAAA	1314
Alb3	GAAG--CGCAGCAAGAGAA-CAAGGC--GT--TGC-GA-A-AGATA-CAG--TTGAATTGGTAGAAGAA	1245
Alb4	TCTGATACAGCCATTGTGCTGAAGATGATAAAAAACAGAACTTTCTGTCTGTGGATGAAACATCCGATGGC	1386
Alb3	TCT-----CA-----G-TC-----TG--AATCAGA-AGAAGGGTCTG--AT-GATGAGG-A----A--GA	1286
Alb4	ACAGTAGCTGTGAATGGCAAGCCATCCATTC-AAAAGGACGAGACTACGAATGGGACATTCGGCATTGGCCA	1457
Alb3	AGAGGCTC-CTGAA--CGAGCGTTAGCTTCGAGCACACAAGCAAGCCGCT--TCCT-GAGG-TTGGCCA	1349
Alb4	TGATACAGAACAAACAGCATTCTCATGAAACAGAGAAGAGGTAA	1500
Alb3	--ACGAGAAGCAAAAGATCGAAGCGGAACGCACTGTA-TAG	1389

Das RNAi-Konstrukt wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation stabil ins Genom von *Arabidopsis thaliana* integriert (T₀-Generation). Die weiteren Experimente wurden mit individuellen Pflanzen der T₂-Generation durchgeführt.

Um den tatsächlichen PTGS-Effekt zu ermitteln, wurde der *Alb4*-Gehalt von Rosettenblättern mit quantitativer Echtzeit-PCR gemessen. Er betrug in der RNAi-Linie nur ca. 12% des Gehaltes der identisch angezogenen Wildtyp-Pflanzen (Abb. 20 A). Um zu untersuchen, ob sich der wesentlich geringere Transkriptgehalt auch auf Protein-Ebene entsprechend auswirkt, wurden gleiche Mengen Gesamt-Membranproteine aus Blättern derselben Pflanzen

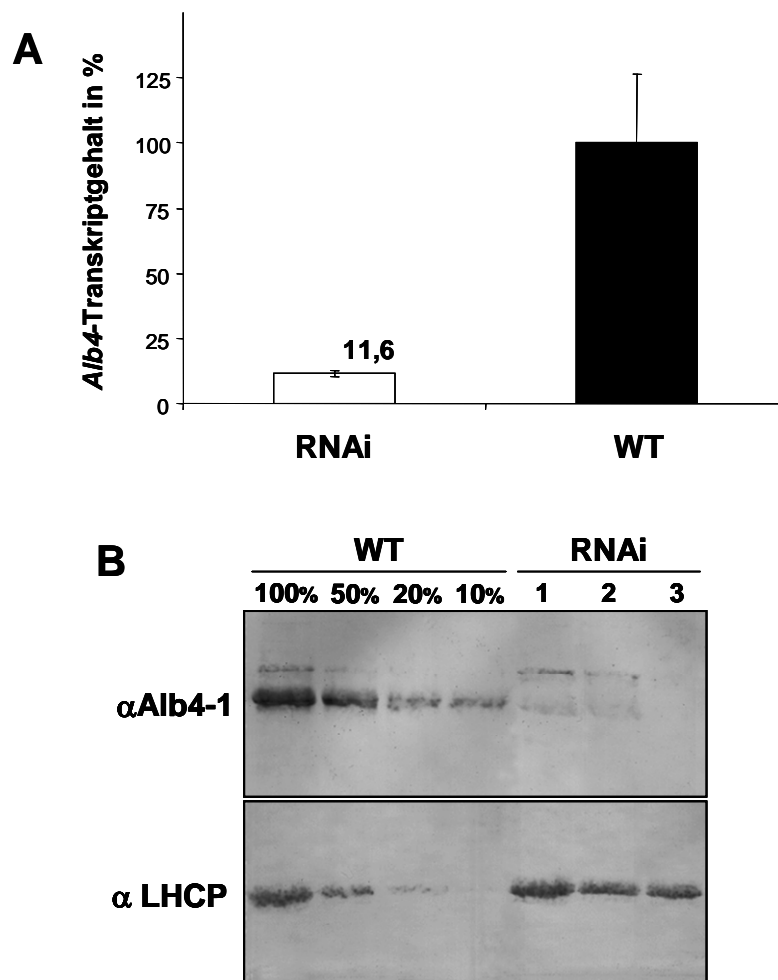


Abb. 20 Analyse des Transkript- und Protein-Gehaltes in der *Alb4* RNAi-Linie

(A) Quantifizierung von *Alb4*-Transkript aus Rosettenblättern von *Arabidopsis*-Pflanzen, die ein RNAi-Konstrukt gegen *Alb4* im Genom tragen. Verglichen wurde die T₂-Generation der RNAi-Linie mit dem Wildtyp (RNAi n=4; WT n=3; der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an). Der mRNA-Gehalt an *Alb4* wurde anhand des Verhältnisses zu Aktin-Transkripten berechnet und auf den Wildtyp-Gehalt (100%) normalisiert.

(B) Gesamt-Membranproteine aus denselben drei T₂-Einzelpflanzen und verschiedene Mengen der entsprechenden Proteine aus einer Wildtyppflanze wurden im SDS-Gel aufgetrennt und Immunoblots mit Antikörpern gegen Alb4 dekoriert. Der Blot mit α LHCP dient als Ladekontrolle.

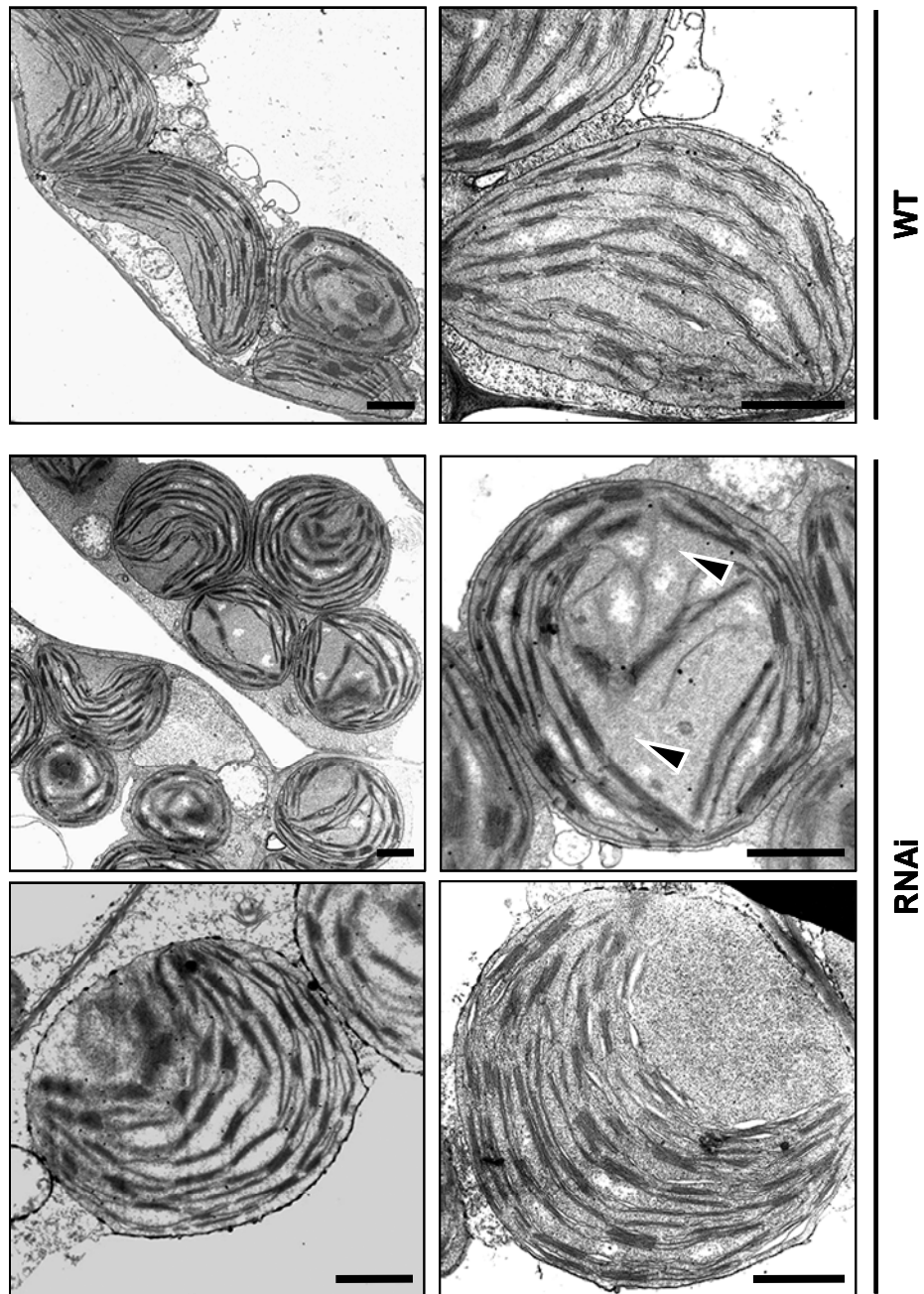


Abb. 21 Ultrastruktur der Chloroplasten aus der *Alb4* RNAi-Linie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mesophyllzellen aus denselben T₂-Pflanzen. Die Pfeilköpfe verweisen auf die aufgelockerteren Thylakoidbereiche. Der Balken entspricht 2 µm.

immundekoriert. Der Alb4-Gehalt in den RNAi-Pflanzen ist drastisch reduziert, sie enthalten deutlich weniger als 10% Alb4-Protein im Vergleich zum identisch angezogenen Wildtyp (Abb. 20 B).

Trotz der sehr geringen nachweisbaren Mengen an Alb4 waren alle Pflanzen auf Erde lebensfähig und zeigten keinen makroskopisch auffälligen Wachstumsphänotyp (Daten nicht abgebildet). Die anschließende ultrastrukturelle Analyse ergab jedoch einen sehr ähnlichen Phänotyp wie in der T-DNA-Linie Salk_136199. Im Vergleich waren allerdings noch mehr nicht-linsenförmige Chloroplasten zu beobachten, die fast Kugelform einnahmen und entsprechend größer waren. Aufgelockertere Thylakoidstrukturen traten ebenfalls wieder auf (Pfeilköpfe in Abb. 21).

Diese Untersuchungen zeigen, dass selbst die Reduktion des Alb4-Proteins auf weniger als 10% des Wildtypgehaltes nur zu einem recht schwach ausgeprägten Phänotyp mit veränderter Chloroplasten-Ultrastruktur aber keinerlei Einschränkungen für die autotrophe Lebensfähigkeit der Pflanzen führt.

4.5.4 TILLING-Linien für *Alb4*

Von größtem Interesse für die weitere Charakterisierung von Alb4 wären Pflanzen, die nicht nur wenig, sondern überhaupt kein Alb4-Protein mehr enthalten. Untersuchungen solcher Pflanzen könnten klären, ob und unter welchen Bedingungen Alb4 für die normale Entwicklung der Pflanze im allgemeinen und der Chloroplasten im speziellen nötig ist.

Eine weitere Alternative stellt ein Screening von durch EMS erzeugten Punktmutationen in *Alb4* dar. Ein solcher TILLING-Ansatz (Till et al., 2003) findet u.a. Allele, in denen durch Punktmutation Aminosäureaustausche entstanden sind. Im Falle von Alb4 interessieren aber insbesondere die weitaus seltener vorkommenden Punktmutationen, die zu einem verkürzten oder instabilen und somit funktionslosen Protein führen. Dazu wurden Linien gesucht, in denen die EMS-Mutagenese entweder zu einem vorzeitigen Stopp-Codon oder zur Zerstörung des Spleiß-Konsensus an einer Exon-Intron-Grenze führte.

Vier Linien konnten identifiziert werden, in denen funktionslose Formen von Alb4 zu erwarten waren (Abb. 22 und Tab. 4).

Zwei der Linien, CS92437 und CS92186, haben ein vorgezogenes Stopp-Codon, während die beiden anderen Linien einen zerstörten Spleiß-Übergang besitzen. Für jede der Linien konnten Pflanzen identifiziert werden, welche der PCR- und Restriktions-Analyse nach homozygot für die beschriebene Punktmutation waren; der endgültige Nachweis dazu muss allerdings noch durch Genotypisierung der Nachkommen erbracht werden. In den putativ homozygoten

Pflanzen konnte über Immundekoration von aufgetrennten Gesamt-Membranproteinen kein Alb4 mehr nachgewiesen werden (Monique Karl und Lars Gerdes, vorläufige Daten). Trotzdem waren alle Pflanzen auf Erde lebensfähig und zeigten keinen erkennbaren Wachstumsphänotyp (Daten nicht abgebildet).

Arabidopsis scheint also auch ohne nachweisbare Mengen an Alb4 autotroph wachsen zu können. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen noch an den Pflanzen der nächsten Generation bestätigt werden.

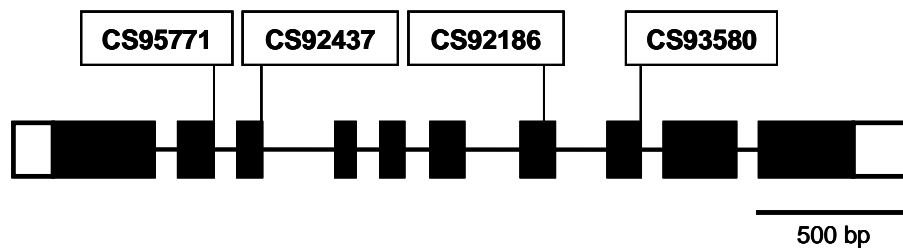


Abb. 22 TILLING-Linien für *Alb4*

Positionen der Punktmutationen in vier TILLING-Linien. Eingezeichnet sind nur die Linien, in denen die Mutationen voraussichtlich zu einem verkürzten Alb4-Protein führen.

Tab. 4 Liste der untersuchten TILLING-Mutanten

Linie	Mutation	Status	Phänotyp
CS95771	Spleiß-Konsensus zerstört	homozygot für diese Punktmutation	kein Wachstums-Phänotyp
CS92437	neues Stopp-Codon	homozygot für diese Punktmutation	kein Wachstums-Phänotyp
CS92186	neues Stopp-Codon	wahrscheinlich homozygot für diese Punktmutation	kein Wachstums-Phänotyp
CS93580	Spleiß-Konsensus zerstört	wahrscheinlich homozygot für diese Punktmutation	kein Wachstums-Phänotyp

4.6 Identifizierung und Charakterisierung der *RWKI*-Transkripte

Im ursprünglich unter *F21J9.13* vorhergesagten Genmodell bildete *Alb4* den C-terminalen Teil eines deutlich längeren Leserahmens (*Artemis* in Abb. 23). *Alb4* konnte nun jedoch in den oben beschriebenen Experimenten als ein eigenständig transkribiertes und translatiertes *bona fides* Mitglied der Oxa-Proteinfamilie identifiziert werden. Desweiteren sollte daher der Bereich vor *Alb4* liegende Teil von *F21J9.15* experimentell untersucht und charakterisiert werden.

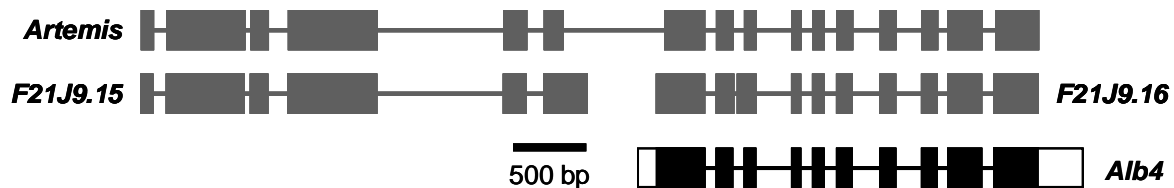


Abb. 23 Vergleich der Genmodelle *F21J9.13*, *F21J9.15* und *F21J9.16*

Schematische Darstellung der *in silico* vorhergesagten Genmodelle. Das Modell *F21J9.13* besteht aus einem einzigen offenen Leserahmen (als *Artemis* beschrieben (Fulgosi et al., 2002)); dessen C-Terminus den größten Teil von *Alb4* einschließt. Die alternativen Genmodelle *F21J9.15* und *F21J9.16* sehen zwei getrennte Leserahmen vor. Ganz unten dargestellt ist die in dieser Arbeit ermittelte, von beiden Genmodellen abweichende Genstruktur von *Alb4*. Vorhergesagte Exons sind als graue, experimentell im Transkript bestätigte als schwarze Rechtecke dargestellt. Introns werden durch Linien und untranslatierte Bereiche durch weiße Rechtecke repräsentiert.

4.6.1 Identifizierung des *RWKI*-Leserahmens

Zunächst sollte versucht werden, durch RT-PCRs zu klären, ob neben dem nur *Alb4* umfassenden Transkript vielleicht auch eine *Artemis* entsprechende Version *in vivo* transkribiert wird. Um Raum für mögliche Abweichungen von der annotierten Genstruktur zu lassen, wurde eine Reihe unterschiedlich positionierter Primer verwendet (Abb. 24 A). Dabei konnte in keinem der Versuche ein Transkript amplifiziert werden, wenn die Primer den Übergang zwischen *F21J9.15* und *F21J9.16* umspannten. Im Gegensatz dazu konnte in Kontrollversuchen mit der gleichen cDNA problemlos ein Transkript für *Alb4* amplifiziert werden (Daten nicht abgebildet). Um zu verhindern, dass eine stabile mRNA-Sekundärstruktur die reverse Transkription von *Artemis* verhindert, wurde zusätzlich eine thermostabile Reverse Transkriptase mit genspezifischen Primern bei 65°C verwendet. Es konnte jedoch wiederum nur ein Transkript für *Alb4* amplifiziert werden. Da es in keinem der Versuche gelang, eine Verbindung von *Alb4* mit den für *Artemis* vorhergesagten Exons 1-6 herzustellen, liegt nahe, dass ein dem Genmodell *F21J9.13* entsprechendes Transkript nicht existiert.

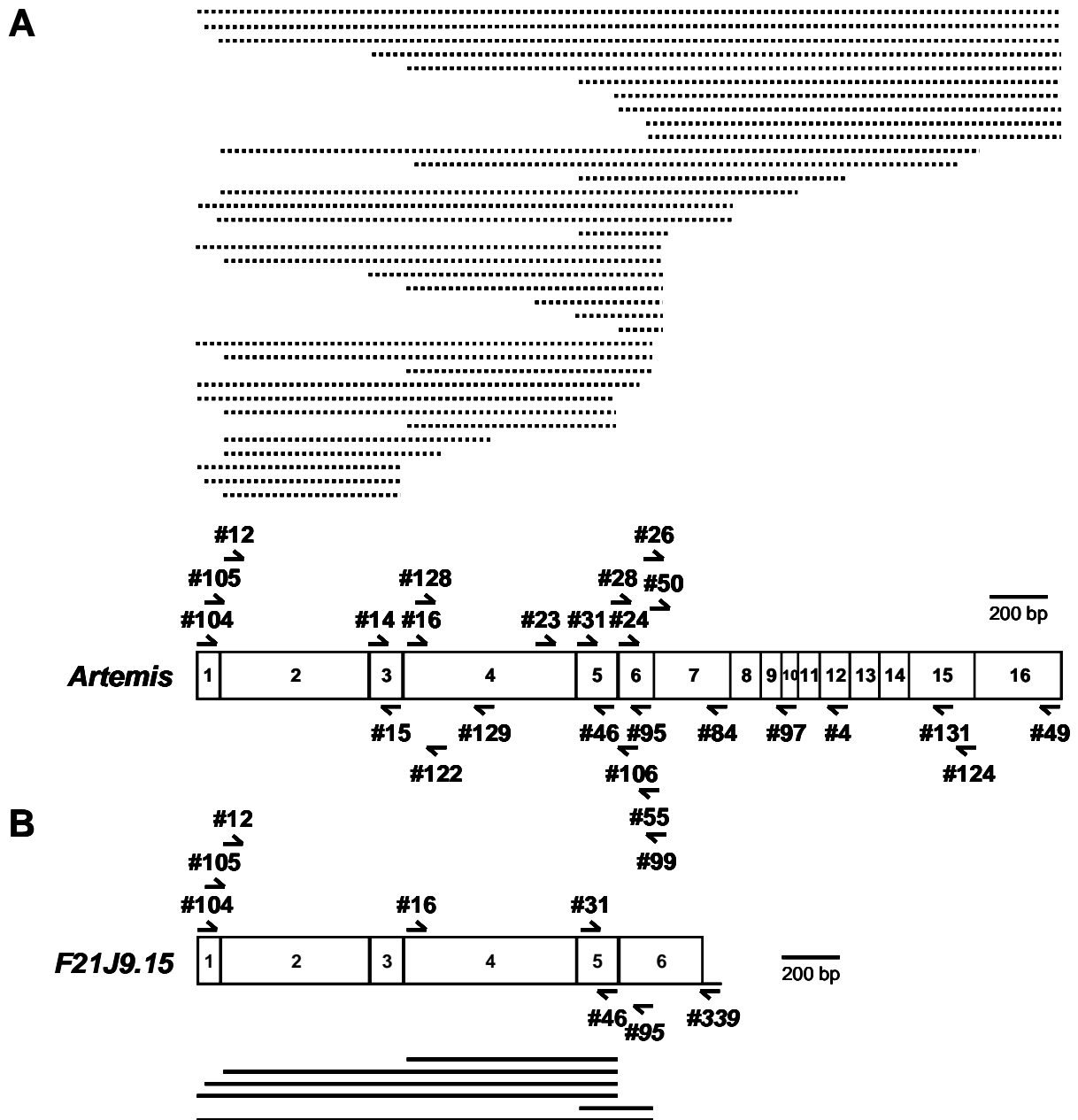


Abb. 24 Identifizierung von *F21J9.15* als eigenständigem Transkript

(A) Schematische Darstellung der zusammengespleißten *in silico* vorhergesagten Exons von *Artemis*. Mit den eingezeichneten Primern (Halbpfeile) wurden RT-PCRs an mit Oligo(dT)-Primern revers-transkribierter cDNA durchgeführt. Keine der Reaktionen führte zu einem für *Artemis* spezifischen Produkt. Die versuchten Reaktionen sind als gestrichelte Linien über dem *Artemis*-Schema angegeben.

(B) Schematische Darstellung der zusammengespleißten *in silico* vorhergesagten Exons von *F21J9.15*. Mit den eingezeichneten Primern wurden RT-PCRs an mit genspezifischen Primern (#95 und #339, kursiv) revers-transkribierter cDNA durchgeführt. Die erhaltenen spezifischen Reaktionsprodukte sind als Linien unter dem *F21J9.15*-Schema angegeben.

Daher wurde in einem nächsten Ansatz überprüft, ob der Bereich vor *Alb4* als eigenständiges Transkript existiert, wie *in silico* als Genmodell *F21J9.15* vorhergesagt wurde (vgl. Abb. 23). Alle Versuche, diesen Bereich (ungefähr Exons 1-6 von *Artemis*, Abb. 24 A) aus mit Oligo(dT)-Primern revers-transkribierter cDNA zu amplifizieren, führten zu keinem PCR-Produkt, obwohl Kontrollreaktionen mit *Alb4*- und *Sec14*-Primern erfolgreich waren (Abb. 25). Wurden für die Herstellung der cDNA jedoch genspezifische Primer verwendet, die nahe des 3'-Endes in Exon 6 oder Intron 6 binden (Abb. 24 B), ließ sich ein Transkript amplifizieren, dessen Größe dem Genmodell *F21J9.15* entspricht (Abb. 25).

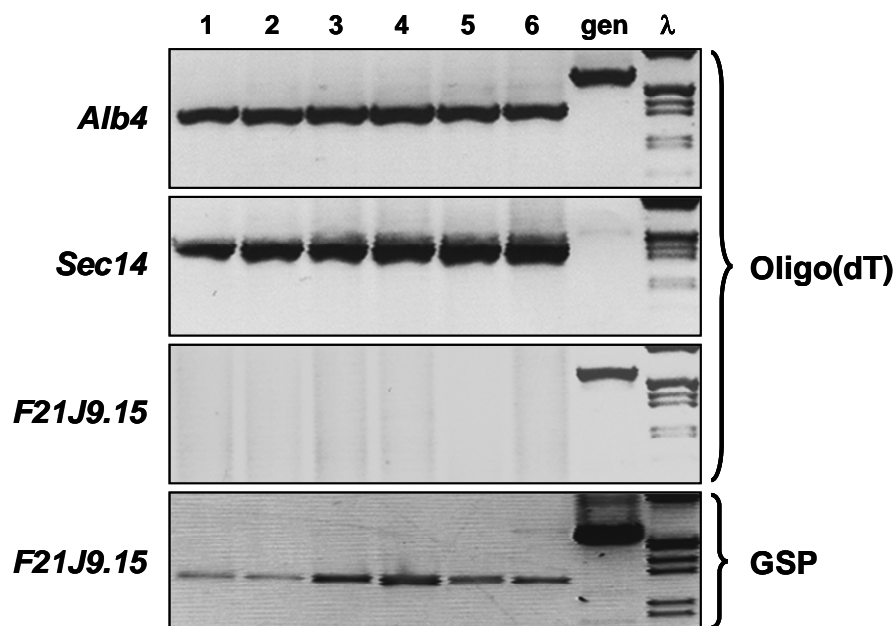


Abb. 25 *F21J9.15* besitzt keinen polyA-Schwanz

Qualitative RT-PCR wurde an cDNAs, revers-transkribiert an gesamt-RNA aus verschiedenen *Arabidopsis*-Pflanzen, durchgeführt. Genomische DNA aus WT Col-0 diente als Kontrolle für die Größe der ungespleißten PCR-Produkte. *Alb4*-Transkript konnte in allen Linien nachgewiesen werden, *RWK1* (mit #12 & #46) nur, wenn statt des Oligo(dT)-Primers für die reverse Transkription ein genspezifischer Primer (GSP, #95) verwendet wurde. *Sec14* (At4g39170) diente als zusätzliche Kontrolle für die Qualität der cDNA; die für *Sec14* verwendeten Primer (#217 & #216) überspannen Exon-Exon-Grenzen und ergeben daher mit genomischer DNA nur eine sehr schwache Bande.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der vor *Alb4* liegende Bereich entsprechend dem Genmodell *F21J9.15* ein eigenständiges Gen darstellt, welches unabhängig von *Alb4* transkribiert wird. Dieses Gen direkt stromaufwärts von *Alb4* wird im weiteren als *RWK1* (Receptor Without Kinase, vgl. Abb. 29 B) benannt. Es gibt allerdings starke Indizien dafür, dass die dazugehörige mRNA nicht polyadenyliert wird. Die große Mehrheit der eukaryotischen mRNAs besitzt an

ihrem 3'-Ende einen polyA-Schwanz, der sowohl die Translation als auch die Stabilität des Transkripts fördert (Zhao et al., 1999). Welchen Einfluss das Fehlen eines solchen polyA-Schwanzes auf die Translation des durch *RWK1* kodierten Proteins hat, müssen weitere Analysen zeigen.

Als nächstes sollten Beginn und Ende des Leserahmens für *RWK1* experimentell bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Vorwärts-Primer für RT-PCRs eingesetzt, die stromaufwärts vom vorhergesagten Translations-Start des Genmodells *F21J9.15* binden (Abb. 26 A). Mit allen Primern wurden nur Produkte von ca. 2900 bp erhalten (Abb. 26 B). Diese entsprechen der Amplifikation von genomischer DNA, welche anscheinend als Kontamination in der cDNA vorlag. Mit einem Vorwärts-Primer, der direkt am vorhergesagten Translations-Start aufsetzt, wurde hingegen ein Produkt von ca. 1500 bp amplifiziert. Diese Größe entsprach der berechneten Größe für ein Transkript von *RWK1*.

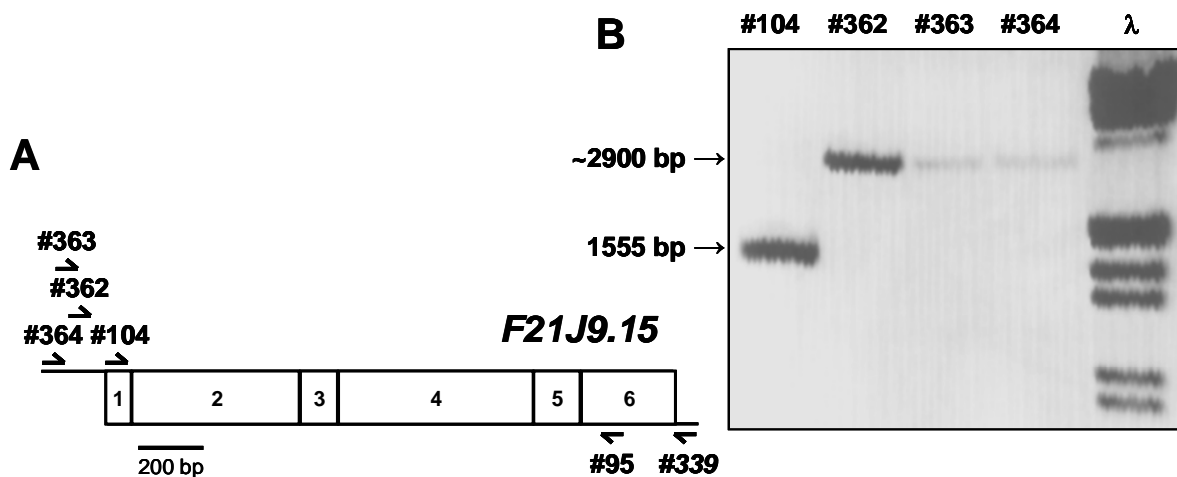


Abb. 26 Identifizierung des 5'-Ende des *RWK1*-Transkriptes

(A) Schema der zusammengespleißten Exons des Genmodells *F21J9.15*. Primer sind als Halbpfleile eingezeichnet.

(B) Agarose-Gel der RT-PCR-Produkte von *F21J9.15*. Die Spuren sind nach den verwendeten Vorwärts-Primern benannt; für alle Reaktionen wurde der Primer #95 als Rückwärts-Primer verwendet. Mit dem Primer #339 wurde revers-transkribiert. Das Produkt in Spur #104 wurde geluliert, subkloniert und sequenziert. λ: Größenstandard.

Die anschließende Analyse des Produktes zeigte, dass die Bande nicht nur ein, sondern zwei Amplifikate von leicht unterschiedlicher Größe enthielt. Der Vergleich mit der entsprechenden genomischen DNA bestätigte, dass es sich dabei um zwei unterschiedlich gespleißte Transkripte von *RWK1* handelte (*RWK1.1* und *RWK1.2*, Daten nicht abgebildet). Anhand der gefundenen beiden Transkripte (Abb. 27 A) ließ sich *RWK1* nun annotieren. Ein offener Leserahmen beginnt beim ersten im Transkript gefundenen Nukleotid, die Translation kann

A

1 ATGGAAGAAT CAAGCATGGC TCAAGCTTCT CTTATTTGCC TCCTCCTAAG TTTTTCATC ATAATGCTTT
 1 M E E S S M A Q A S L I C L L L S F S I I M L S
 71 CTAACGCAGC [▽]CGACATAAGC ATCGACTGTG GATCATCAAG TTCGCACATT GACGCGGACA ACAGAGCATG
 25 N A A D I S I D C G S S S S H I D A D N R A W
 141 GGTGGGAGAC ACAGACTTTG TTGCCACCGG TTTGACTTCT AAATTTGTAC CGTTTAGCAA ATTCCCTGCT
 48 V G D T D F V A T G L T S K F V P F S K F P A
 211 GAACTAACCA CACTCCGTA TTTTCCTACG GGAGAGACCA ACTGTTACAC CAACATTCCG GTGGAAAAAG
 71 E L T T L R Y F P T G E T N C Y T N I P V E K G
 281 GTGGGAAAGT CTTAGTTAGG ACGAGATTCC TCTATGGTGA TTATGATGAA GAATCCACGT ATCCGACATT
 95 G K V L V R T R F L Y G D Y D E E S T Y P T F
 351 CGATGTAGTG TATGATGGTA AACATCGATA TTCGGTCGTC ACAACGACAT TTGAAACCCT TACTGAATCG
 118 D V V Y D G K H R Y S V V T T T F E T V T E S
 421 GAAGCGATAT TTATTCCTGA AAACGGGAAT ATCAGTGTTC GCTTTTCCG TACGCTTTCT AGCAAAACCC
 141 E A I F I P E N G N I S V C F F R T L S S K T P
 491 CTTTTGTGTC TACCATTGAA GTACGAAGGT TGGACGACTC TATGTACACC GATCTTGGCC CTAAGGAAGG
 165 F V S T I E V R R L D D S M Y T D L G P K E G
 561 TTTTCATCTC CAGCAAAGGA TCGCCTACGG TGCGCAGGAA TTAGTAA[▽]GT TCCCATATGA TCCTTATGAT
 188 F I L Q Q R I A Y G A Q E L V R F P Y D P Y D
 631 AGAATATGGA TGCCAGCATC GGTTTTTGCC TCACATCTAA CAAGTTCTGC CACTTCTATC GACACAACAG
 211 R I W M P A S V F A S H L T S S A T S I D T T G
 701 GAGCTGACAA TCGACCACCA GAGATTATCC TTCGGACTTC TTGGTCGCAG AAGGACATGG CTTTCTATGA
 235 A D N R P P E I I L R T S W S Q K D M A F Y D
 771 TATAAAGCTA CCTTTTTCTG GAGTGACATT TTACATTGTC ATTTATTTCT CCGAACCCT AAGCCTTGGT
 258 I K L P F S G V T F Y I V I Y F S E P L S L G

 841 TCTGACCAAA AGCGGTCTTT CAATGTTTAC TATGAGGACA AGCAAGTGGG TTCAGATCTA ATTGTGCCAC
 281 S D Q K R S F N V Y Y E D K Q V G S D L I V P P
 911 CTTTCGGGGC AGTGACTCAA GCTTCTTTGA GGGATGTGGT GAAGACTGAG CTTGCCTATC TGACTTTTGA
 305 F G A V T Q A S L R D V V K T E L A Y L T F E
 981 AGCTACACCA GACTCGACTT TGGACCCACT CATCAACGCT CTCGAGCTCT ATGTCATTAG TAATAGTGGT
 328 A T P D S T L D P L I N A L E L Y V I S N S G
 1051 GGAAGTGGAA ACGGGACGAA TTCAACAAGC ACGAGCGGTG GTGGCAGCCC TAGTCCTGGT GGTGGTAGTG
 351 G S G N G T N S T S T S G G G S P S P G G G S G
 1121 GCAGCCCCC TAGCACTGGC GGTGGTAGTG GCAGCCCCC TAGCACAGGC GGTGGTGGTG GCAGCCCAAG
 375 S P P S T G G G S G S P P S T G G G G G S P S
 1191 CAAGGCGGT GGTGGAGGCA AATCCG[▽]GAGG AAGCAATAAT GGAGATGGAG GAACCAACAA AGCTAGTGG[▽]A
 398 K G G G G G K S G G S N N G D G G T N K A S G
 1261 GATGAAAAAT CTGCAG[▽]ATTC TTCAGGTAAA TCAGGAGAGG AGAAAAGCAG CAGCAACTTA GCTTTACCTC
 421 D E K S A D S S G K S G E E K S S S N L A L P L
 1331 TTGGAATTC ATTACCGACT TTGTTAAGTC TTGGAGCTGG TGGTTGGGGC GTCTGGAAAT ATTTATCAA
 445 G I S L P T L L S L G A G G W G V W K Y F I K
 1401 ACCTAGGCGC CACCCGGAAT CAGAAT[▽]TGCC ACTCAAACAG AATATAAGTT TACAAGTGAA TATGGGAAAC
 468 P R R H P E S E L P L K Q N I S L Q V N M G N
 1471 GCAACAGTAG TGAATGCTGG GCAATGACGA *CGACTTACAT* *CTACTACATG* *CGGATCCATC* *ATCACTCATC*
 491 A T V V N A G Q *
 1541 ACCCTCCAAT ATATG

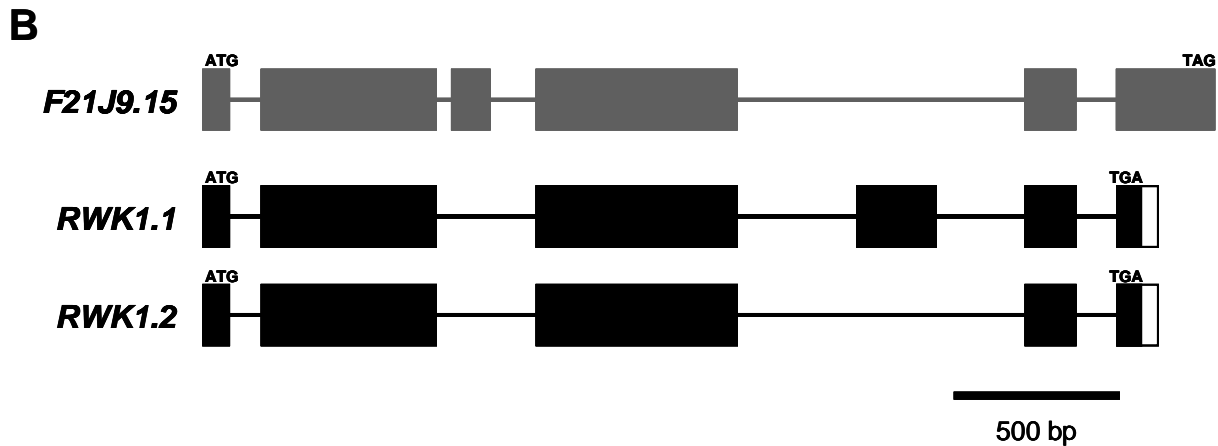


Abb. 27 Die Genmodelle für *RWK1.1* und *RWK1.2*

(A) Experimentell bestätigte Transkript-Sequenz für *RWK1.1*. Angegeben sind die Sequenz auf cDNA-Ebene und darunter die korrespondierenden Aminosäuren. Die Nukleotide, die nur in *RWK1.1* und nicht in *RWK1.2* vorkommen, sind eingerahmt, die entsprechenden Aminosäuren fett gedruckt. Die Numerierung beginnt beim ersten translatierten Nukleotid bzw. der ersten translatierten Aminosäure. Die Positionen der Introns sind durch Dreiecke markiert. Der 3'-untranslatierte Bereich ist kursiv gehalten.

(B) Schema der experimentell gefundenen Intron-Exon-Verteilung für beide Spleißvarianten. *RWK1* ist in keiner der beiden Versionen identisch mit der Annotation für *F21J9.15*. In der Abbildung sind vorhergesagte Exons als graue, experimentell im Transkript bestätigte Exons als schwarze Rechtecke dargestellt. Introns werden durch Linien und untranslatierte Bereiche durch weiße Rechtecke repräsentiert.

beim hier kodierten Methionin (Aminosäure 1) oder beim folgenden Methionin (Aminosäure 6) beginnen. Der NetStart-Algorithmus zur Vorhersage von Translationsstarts in *Arabidopsis thaliana* favorisiert dabei das zweite Methionin. Ein stromaufwärts längerer Leserahmen kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der Datenlage unwahrscheinlich. Der offene Leserahmen endet innerhalb der gefundenen Transkripte, gefolgt von einem kurzen 3'-untranslatierten Bereich. Die beiden experimentell ermittelten Transkripte *RWK1.1* und *RWK1.2* wurden bei GenBank eingetragen (AM746461 und AM746462).

In weiten Teilen entspricht die experimentell ermittelte Genstruktur von *RWK1* der *in silico*-Vorhersage für *F21J9.15* (vgl. Abb. 27 B). Es wurden jedoch, wie auch im Fall von *Alb4*, deutliche Unterschiede gefunden. So konnte das vorhergesagte dritte Exon nicht bestätigt werden, es fehlt sowohl in *RWK1.1* als auch in *RWK1.2* (Abb. 28 A). In *RWK1.1* wird ein zusätzliches Exon kodiert, das in *RWK1.2* nicht vorkommt (Abb. 28 B). Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um ein alternatives Spleißprodukt und nicht um eine prä-mRNA, da beide Transkripte ansonsten identisch waren.

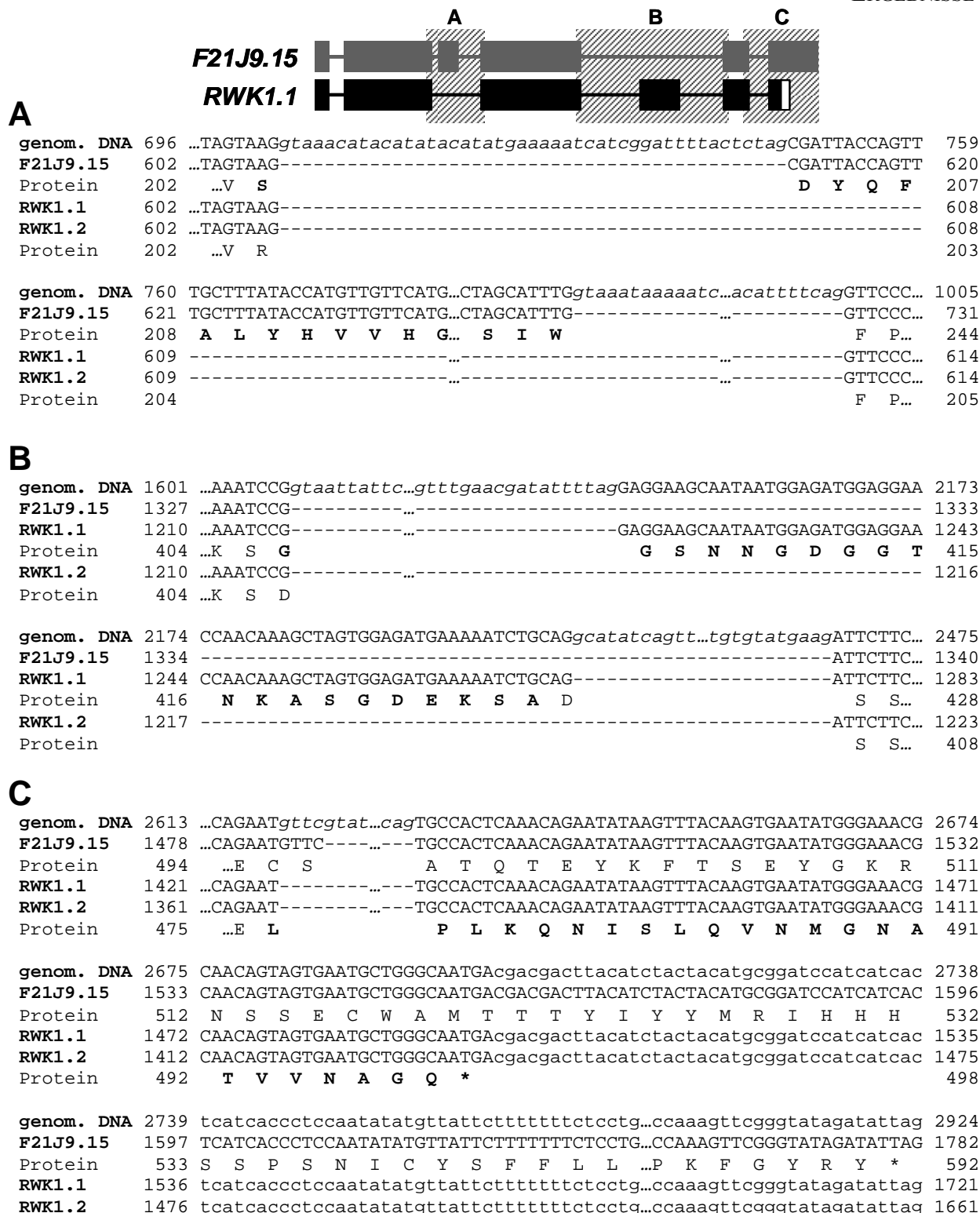


Abb. 28 Details der Annotation von RWK1

In den Schemata von *F21J9.15* und *RWK1.1* sind die als Sequenzen angegebenen Bereiche schraffiert hinterlegt. Introns sind kursiv kleingeschrieben, Auslassungen durch Punkte gekennzeichnet.

(A) Der Bereich mit dem für *F21J9.15 in silico* zusätzlich vorhergesagten Exon. Die nicht in *RWK1.1* oder *RWK1.2* kodierten Aminosäuren sind fettgedruckt.

(B) Der Bereich mit den nur in *RWK1.1* zusätzlich kodierten 20 Aminosäuren (fettgedruckt).

(C) Die in *RWK1.1* und *RWK1.2* durch den geänderten Leserahmen kodierten Aminosäuren und der frühere Stopp (*) sind fettgedruckt. Die Numerierung der Proteinsequenz folgt der für *RWK1.1*.

Der Übergang vom vorletzten zum letzten Exon gestaltet sich in *RWK1* anders als für *F21J9.15* vorhergesagt, gespleißt wird 4 nt früher (Abb. 28 C). Daraus resultiert ein anderer Leserahmen mit 23 neuen Aminosäuren und einem früheren Translationsstopp, Teile des in *F21J9.15* Protein-kodierenden sechsten Exons stellen *in vivo* einen 3'-untranslatierten Bereich dar (vgl. Abb. 27 B).

Insgesamt gesehen zeigen diese Versuche, dass es sich bei *RWK1* um ein von *Alb4* unabhängiges Transkript mit zwei alternativem Spleißversionen handelt, die wahrscheinlich nicht polyadenyliert werden.

4.6.2 Charakterisierung von *RWK1*

Unter der Annahme, dass die für *RWK1* ermittelten beiden Leserahmen mit dem ersten Methionin beginnen, kodieren sie für Proteine mit 498 bzw. 478 Aminosäuren. Mit BLASTP wurden in *Arabidopsis* Sequenzen von zu *RWK1* homologen Proteinen identifiziert, welche zur Klasse der Rezeptor-Kinasen gehören. RLKs („receptor-like kinases“) besitzen ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg und der TargetP-Algorithmus findet ein mögliches Signalpeptid für den sekretorischen Weg auch für *RWK1*. Pflanzliche RLKs bestehen typischerweise aus drei Domänen: einem extrazellulären N-terminalen Rezeptor, einer einzigen zentralen Transmembranhelix und einer hochkonservierten C-terminalen Serin/Threonin-Kinase, welche ins Cytosol orientiert ist (Walker, 1994). Sie stellen in *Arabidopsis* eine große Proteinfamilie mit über 600 vorhergesagten Mitgliedern dar (Shiu und Bleecker, 2001). Innerhalb dieser Familie stellen die RLKs, die in der Rezeptor-Domäne LRR-Motive („leucine-rich repeats“) enthalten, mit über 200 vorhergesagten Mitgliedern in *Arabidopsis* die größte Untergruppe dar (Shiu und Bleecker, 2001).

RWK1 ist lediglich zu den Rezeptor-Domänen von LRR-RLKs homolog, die Transmembranhelix und die komplette Kinase-Domäne fehlen hingegen (Abb. 29 A und B). Etlichen vorhergesagten RLKs fehlen zwar extrazelluläre Rezeptor-Domänen (Shiu und Bleecker, 2001), das Fehlen von Kinase-Domäne und Transmembranhelix ist jedoch ungewöhnlich. LRR-Proteine wie *CLV2* (Jeong et al., 1999) und *Cf9* (Thomas et al., 1997) besitzen zwar ebenfalls keine intrazelluläre Kinase-Domäne, dafür aber eine Transmembranhelix für die Verankerung in der Plasmamembran. Ohne Kinase- und Transmembran-Domäne sind den RLKs homologe LRR-Proteine nur als natürlich vorkommende Mutationen beschrieben, wie etwa *Xa21D* aus Reis (Wang et al., 1998).

Darüber hinaus fehlen *RWK1* einige der im Rezeptorteil der LRR-RLKs teilweise konservierten Aminosäuren (Herzen in Abb. 29 A). Dafür besitzt *RWK1* eine Domäne, die von

A

	SP	
LRRPK	-----MTRLRLLSWLSITS-CVCL---VFAQDQSGFISIDCGIPDDSSYTDEKTNMKYVSDLGFVESGTS	61
SIRK	-----MAMLKSLSSLFTSFAL-LFFLVHAQDQSGFISIDCGIPDDSSYNDETTGIKYVSDSAFVDSGTT	64
putProt	-----MEALL-Y--VITLF-SLSA---LTVTLGES-ISIDCG--STGSYVDSNNVT-WVGDKGFVITNGEP	54
RWK1.1	MEESSMAQAS-L--ICLLL-SFSI---IMLSNAAD-ISIDCG--SSSHIDADNRA-WVGDITDFVATGLT	59
LRRPK	HSIVSDLQTTSLERQFQNVRSFPEGKRNCDIRPQQGKGFYLIRTRFMYGNYDGFSKTPEFDLYIGANL	131
SIRK	KRITAAQFQSSGFDRHLNLRVSFPQSKRSCYDVPTPRGKGFYLIRTRFMYGNYDDLGRVPEFDLYLGVNF	134
putProt	MKIPD---VVKKP--INTLRYFPTGQTCYTNIPVT-KGQKTLVTRTKFYENYDAKFSPPSFDVIYDGKH	118
RWK1.1	SKFVP---FSKFPABLITLRYFPTGQTCYTNIPVE-KGKVLVTRTRFLYGDYDEESTYPTFDVVYDGKH	125
LRRPK	WES-VVLIN--E--TAIMTKEIYTPPSDHIHVCLVDK-NRGTFFLSVLEIRFLKND--TY-D-TPYEAL	191
SIRK	WDS-VKLLD--A--TTILNKEIITPLLDNVQVCVVDK-NAGTPFFLSVLEIRLLN--TTY-E-TPYDAL	194
putProt	RDSIVITITESLLNDEETFYFSEVIYVPEKNKISVCLLRTSPSDNPFSSIEVYSLDTG--MYDDLGPNECL	186
RWK1.1	RYSVVTTT--F--ETVTESEAFIPENGNISVCFRTLSSKTPFVSTIEVRRLLDSS--MYTDLGPKGCF	188
LRRPK	MLGRRWDFGTATNLQIRYKDDFYDRIW--M-PYKSPYQ-KTLNLSLTIIDETNHNGFRPASIVMRSATAPG	257
SIRK	TLLRRLDYSKTGKLPTRYKDDIYDRIW--T-PRIVSSEYKILNLSLTVDFLNNGYQPASTVMSTAETAR	261
putProt	ILHRIAYG-AKEL-ISYPLDPYGRVWLALGS-QDSTL-TDLTTSAPSIDITGASNKPEIVMSKALSGV	252
RWK1.1	ILQORAYG-AQEL-VRFYDPYDRIW--M-P-ASVFA-SHLTSSATSIDTTGADNRPEIILRTSWGOK	251
LRRPK	NES-NPLKFNWAPDDPRSKFYIYMHFAEVR--LORNETREFDIYINDVILAENF--RPFYLFDTDRSTV	322
SIRK	NES-LYLTLSEFRPDPNNAKFYVYMHFAEIE--VLKSNQTRFESIWLNEVDVISPSF--KLRVLLTDTFVTP	326
putProt	GLVLSDDTLPL-T--G-VPVYLVIYFSEPOS--LGRTORRSFNVFLDNTQVGSRPVVFEGKATQF-ILR	315
RWK1.1	DMAFYDIKLPF-S--G-VTFYIVYFSEPLS--LGSQKRSFNVYEDKQVGSLLIVPFPFQAVTQA-SLR	314
LRRPK	DPVGRKMNEIVLQRTGVST-LPPIINALEIYQINEFLQLPTDQDQVDAMTKIKFYRVKKNWQDPCVPV	391
SIRK	DPVSGITINFSLQPPGEFVLPIINALEVYQVNEFLQIPHTPQDQVDAMRKIKATYRVKKNWQDPCVPV	396
putProt	DVVATSASQIVFQSTDDSV-LPPLINCLELYSIS---N-TSPDSGGGGDQGGGSTDDESEG-----	371
RWK1.1	DVVKTELAYLTFEATPDST-LDPLINALELYVIS---N-SGGSGNCTNSTSTSCGGSPFSGGGSGSPST	379
LRRPK	DNSWEGLECLHSDNNTSPRSIALNLSGSLTGO--IDPAFANLTSINKLDSLNNSLTGKVPDF-LA-SLP	457
SIRK	DYSWEGIDCIQSDNTNPRVVSLSNLSFSELRGO--IDPAFNSLTSIRKLDLSGNLITGEPAF-LA-NLP	462
putProt	-----	371
RWK1.1	GGGSGSPSTGGGGGSPKGGGGGKSGGSNNGDGGTNKASGDEKSAOSSGKSGEEKSSSNLALPLGISLP	449
LRRPK	NLTELNL-E-G--NK-L-TGSIPAKLLEKSKDGSLSLRFGGNPDLCSQSPSCQTTTKKKI--GYIVPVV	518
SIRK	NLTELNV-E-G--NK-L-TGIVPQRLHERSKNGSLSLRFGRNPDLCLSDSC--SNTKKKNKNGYIIPLV	524
putProt	-----	371
RWK1.1	TLLSLGAGGWGVWKYFKPRRHPESELPLKQNISLQVNMGNATVVNAGQ-----	498
LRRPK	SLAGLLIVLTALALZWHFKKRSRRGTI--SNKPLGVNTGPLDTAKRYFYSEVVNITNNFERVLGKGGFG	586
SIRK	VGLIVVLLTALALRRRFFKKKQQRGTLGERNGPL--KTAKRYFK-----YSEVVNITNNFERVIGKGGFG	586
putProt	-----	371
RWK1.1	-----	498
LRRPK	KVYHGFVINGDQVAVKLLSEESTQGYKEFRAEVELLMRVHHTNLTSLVGYCNEDNHMALYIYEMANGNLGD	656
SIRK	KVYHGVINGEQVAVKLLSEESAQGYKEFRAEVDLLMRVHHTNLTSLVGYCNEINHMVLIYEMANENLGD	656
putProt	-----	371
RWK1.1	-----	498
LRRPK	YLSGKSSLLSWEERLQISLDAAQGLEYLHYGCKPPIVHRDVKPANILLNENLQAKLADFGLSRSFVEG	726
SIRK	YLAGKRSFILSWEERLKISLDAAQGLEYLHNGCKPPIVHRDVKPTNILLNEKLQAKMADFGLSRSFVEG	726
putProt	-----	371
RWK1.1	-----	498
LRRPK	SSQVSTVVAGTIGYLDPEYYATRQMNEKSDVYSFGVVLLLEVITGKPAIWHSRTESVHLSDQVGSMLANGD	796
SIRK	SGQLSTVVAGSIGYLDPEYYSTRQMNEKSDVYSLGVVLLLEVITGQPAIASSKTEKVIHSDHVSILANGD	796
putProt	-----	371
RWK1.1	-----	498
LRRPK	IRGIVDQRLGDRFEVG-SAWKITEALACASESSEQRPTMSQVVMELKQSIIFGRVNNRSDHKDPVRMVTM	865
SIRK	IRGIVDQRLRERYDVG-SAWKMSIALACTEHTSAQRPTMSQVVMELKQIVYGIIVTDQENYDDSTKMLTV	865
putProt	-----	371
RWK1.1	-----	498
LRRPK	NLDTEMVPRAR 876	
SIRK	NLDTEMVPRAR 876	
putProt	----- 371	
RWK1.1	----- 498	

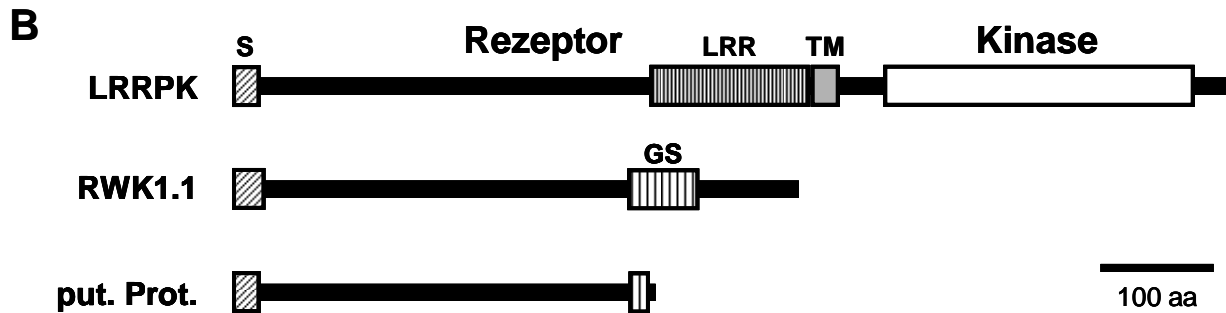


Abb. 29 RWK1 ist homolog zu Rezeptor-Domänen von LRRPKs

(A) Protein-Alignment von RWK1.1, zwei LRR-RLKs (LRRPK (CAA66376), SIRK (O64483)) und einem putativen Protein (CAB90955). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Herzen markieren das LRR-Motiv von CAA66376 (Deeken und Kaldenhoff, 1997). Die GS-reiche Domäne (fettgedruckt und unterstrichen) von RWK1.1 enthält über 70% Glycin- und Serin-Reste. Die Transmembranhelices sind schraffiert hinterlegt, die hochkonservierte Kinase-Domäne kursiv gehalten.

(B) Schema der Domänen-Strukturen von LRRPK, RWK1.1 und CAB90955 (put. Prot.). SP: Signalpeptid, LRR: Leucin-rich-repeats, TM: Transmembranhelix, GS: Glycin-Serin-reiche Domäne.

Glycin- und Serin-Resten dominiert wird. Eine kurze, nur 21 Aminosäuren umfassende GS-reiche Domäne ist auch am C-terminalen Ende des putativen Proteins CAB90955 zu erkennen. Die vorhergesagte Aminosäure-Sequenz von CAB90955 ist in großen Teilen identisch mit der von RWK1. Eine BLASTP-Analyse zeigte, dass Glycin-reiche Abschnitte in unterschiedlichen Proteinen vorkommen (Daten nicht abgebildet); eine Funktion kann einer solchen Domäne nicht zugeordnet werden.

Die beiden Leserahmen von *RWK1* kodieren für Proteine, die über weite Bereiche erkennbare Homologien zu Rezeptor-Domänen von LRR-RLKs aufweisen. Die funktionell wichtigen LRR-Motive sind jedoch in RWK1 nicht konserviert. Ebenso fehlen die für RLKs typische Transmembranhelix und die Kinase-Domäne.

4.7 Lokalisierung von RWK1

TargetP sagt für die gefundene RWK1-Sequenz ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg voraus (mit sehr hoher Verlässlichkeit, RC = 1; SP = 0,991). Für die Alternative mit dem Start beim zweiten Methionin gilt die gleiche Vorhersage (RC = 1; SP = 0,992). RWK1 besitzt allerdings keine Transmembranhelix, mit der es wie die homologen RLKs die pflanzliche Plasmamembran durchspannen könnte.

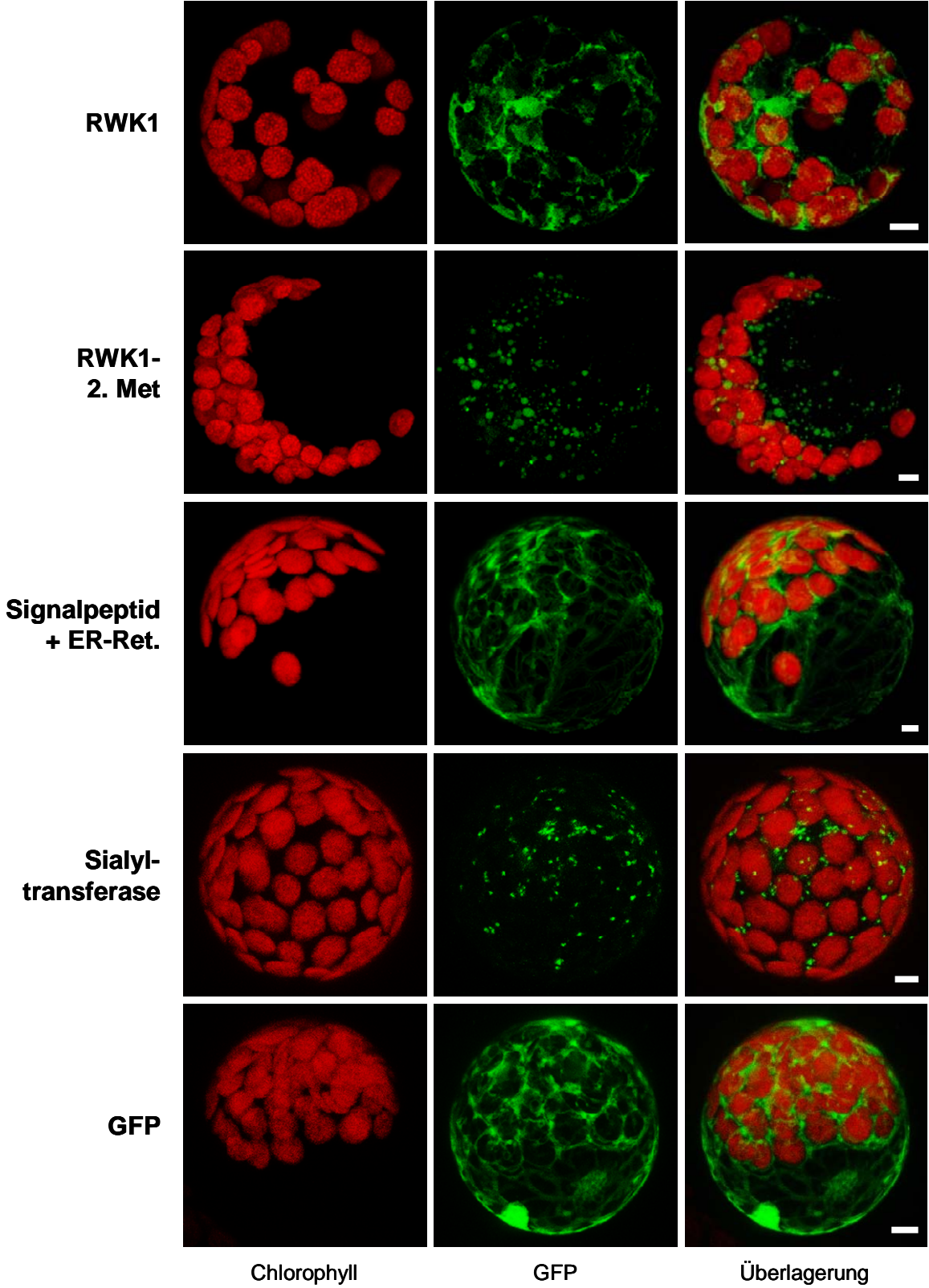
Um die Lokalisation von RWK1 zu untersuchen, wurde der kodierende Bereich von RWK1.1 N-terminal mit GFP fusioniert und transient in Protoplasten exprimiert. In der anschließenden Analyse konnte das GFP-Signal in netzartigen Strukturen beobachtet werden, die sich durch die gesamte Zelle erstreckten (RWK1 in Abb. 30). Ähnliche Signale wurden mit GFP erhalten, das mit einem Signalpeptid und einem ER-Retentionssignal versehen worden waren (Signalpeptid + ER-Ret. in Abb. 30), allerdings auch mit unfusioniertem GFP (GFP in Abb. 30). Sehr wahrscheinlich geht RWK1.1, wie von TargetP vorhergesagt, über den sekretorischen Weg. Ob es hier im ER verbleibt, den Golgi-Apparat erreicht oder in andere Kompartimente des Endomembransystems sortiert wird, lässt sich anhand der Analyse der GFP-Fusionen nicht abschließend klären. Auch eine cytosolische Lokalisation kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Desweiteren wurde ein Konstrukt verwendet, welches auf die Aminosäuren 6-99 beschränkt ist (RWK1-2. Met in Abb. 30). In diesem Falle war das GFP-Signal des Fusionsproteins vor allem in vesikelförmigen Ansammlungen zu beobachten. Ein vergleichbares Muster wurde mit Sialyltransferase, einem Marker für den Golgi-Komplex (Lee et al., 2002), erhalten (Sialyltransferase in Abb. 30). Da diesem Konstrukt aber wesentliche Teile des Proteins fehlen, ist auch nicht auszuschließen, dass es in die lytischen Vakuolen sekretiert wurde.

Mit ziemlicher Sicherheit ist aber RWK1 aber kein plastidäres Protein, da weder das GFP-Signal der Version ab dem 1. Methionin noch das der Version ab dem alternativen 2. Methionin mit der chloroplastidären Autofluoreszenz übereinstimmt.

Abb. 30 RWK1 ist kein plastidäres Protein

GFP-Fusionsproteine wurden transient in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten exprimiert. Konfokale Bilder der Chlorophyll-Autofluoreszenz, des GFP-Signals und eine Überlagerung von beiden Signalen sind als Projektion der maximalen Intensität abgebildet. Weder das Fusionsprotein mit Volllänge-RWK1.1 (RWK1) noch die um die fünf N-terminalen Aminosäuren verkürzte Version (RWK1-2. Met) werden in Chloroplasten importiert. Als Kontrolle für das ER diente GFP mit Signalpeptid und ER-Retentionssignal, für den Golgi-Apparat Sialyltransferase, für Cytosol & Zellkern unfusioniertes GFP. Der Balken entspricht 5 µm.



5 Diskussion

Die Analyse des komplett sequenzierten Genoms von *Arabidopsis thaliana* hat zur Identifizierung von sieben Genen geführt, die für mögliche Mitglieder der Oxa-Proteinfamilie in höheren Pflanzen kodieren (Funes et al., 2004a; Monique Karl und Lars Gerdes, unveröffentlichte Daten). Nur für einen kleinen Teil dieser putativen Oxa-Proteine ist ihre Lokalisierung und mögliche Funktion bisher beschrieben worden. Bei dem durch *At1g24500* kodierten Homolog ergab sich die zusätzliche Schwierigkeit, dass die genaue Annotierung lange Zeit umstritten war (Abb. 23). Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit kann die Annotierung für dieses Gen jetzt als eindeutig geklärt gelten. Mit diesen Ergebnissen konnte das Genprodukt von *At1g24500* als Alb4 eindeutig der Oxa-Familie zugeordnet werden (Abb. 7). Alb4 wurde als integrales Protein von etwa 52 kDa in den chloroplastidären Thylakoidmembranen lokalisiert (Abb. 10 und Abb. 11). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Experimenten überein, welche von Monique Karl zum Import von radioaktiv markiertem Alb4 in isolierte Erbsen-Chloroplasten durchgeführt wurden. Sie zeigten, dass Alb4 in Chloroplasten importiert wird, wo nach Abspaltung des Transitpeptides ein entsprechend kleineres matures Alb4 in der Membranfraktion nachweisbar ist (Monique Karl, zusammen veröffentlicht in Gerdes et al., 2006). Die apparente Größe von immundekoriertem Alb4 (Abb. 11) ist dabei in Einklang mit der des maturen Proteins aus den Import-Experimenten und der berechneten Größe von 50,13 kDa (ohne das vorhergesagte N-terminale Transitpeptid von 45 Aminosäuren).

Anhand von Hydrophobizitäts-Plots (Abb. 8 A) und unter Anwendung der „positive-inside rule“ (Gavel et al., 1991; Wallin und von Heijne, 1998) kann für Alb4 eine N_{außen}-C_{innen}-Orientierung mit fünf Transmembranhelices in der Thylakoidmembran postuliert werden (Abb. 8 B), vergleichbar der von Alb3 (Moore et al., 2000) und scOxa1 (Herrmann et al., 1997). Alb4 besitzt darüber hinaus die typische 60KD_IMP-Domäne der Oxa-Proteinfamilie (Abb. 7). Mit 72% Ähnlichkeit und immerhin 55% Identität zeigen die abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von Alb4 und Alb3 eine hohe Konservierung zwischen diesen beiden Paralogen (Abb. 6). Darüber hinaus werden beide Proteine besonders stark in grünem Gewebe exprimiert (Abb. 12) und sie sind beide im selben Kompartiment, in der Thylakoidmembran, lokalisiert. Diese Expression und Lokalisierung legen darüber hinaus für Alb4 ebenfalls eine mögliche Funktion in der Insertion von Thylakoidproteinen nahe. Die sich daraus logisch ergebende Frage ist, ob

die beiden sehr ähnlichen paralogen Proteine vielleicht gleiche oder überlappende Funktionen ausüben.

Gram-negative Bakterien und Cyanobakterien besitzen nur ein einziges Oxa-Homolog, dessen Fehlen zum Verlust der Lebensfähigkeit führt (Samuelson et al., 2000; Spence et al., 2004). In den Fällen, in denen zwei Oxa-Homologe in derselben Membran lokalisiert sind, scheint eines der Paraloge essentiell für die Erhaltung der Funktionalität der Membran zu sein. Im Gegensatz dazu kommt dem zweiten Paralog nur eine eingeschränkte Rolle bei der Integration von bestimmten Proteinen zu. Beispiele dafür sind Oxa1/Oxa2 (Nargang et al., 2002; Funes et al., 2004b) in der inneren Mitochondrienmembran, Alb3.1/Alb3.2 (Bellafiore et al., 2002; Göhre et al., 2006) in der Thylakoidmembran von *Chlamydomonas* und mit Einschränkungen auch SpoIII/YqjG (Errington et al., 1992; Tjalsma et al., 2003) in der Plasmamembran gram-positiver Bakterien. Die Thylakoidmembranen von *Arabidopsis* enthalten mit Alb3 und Alb4 nun ebenfalls zwei Oxa-Homologe in derselben Membran. Das Fehlen von Alb3 führt dabei zum Verlust sowohl der photoautotrophen als auch der heterotrophen Lebensfähigkeit (Sundberg et al., 1997). Wie die vorliegende Arbeit gezeigt hat, bleibt die weitgehende Ausschaltung von Alb4 hingegen ohne offensichtliche Konsequenzen für das Überleben der Pflanze. Der drastische Phänotyp der *Alb3*-Mutanten zeigt deutlich, dass Alb4 den Verlust von Alb3 nicht effektiv ausgleichen kann. Dies könnte einerseits an einer speziellen Funktion von Alb4 liegen. Es ist aber andererseits auch nicht auszuschließen, dass die vorhandene Menge an Alb4 nicht ausreichend ist, um die Aufgabe(n) von Alb3 vollständig zu übernehmen. Im Vergleich dazu sind *Arabidopsis*-Mutanten mit einer starken Reduktion (~90%, Abb. 20) des Alb4-Gehalts lebensfähig, ohne einen makroskopisch auffälligen Phänotyp unter Standardwachstumsbedingungen zu zeigen. Allerdings konnte ultrastrukturell ein Effekt auf Chloroplasten und die Struktur der Thylakoidmembranen festgestellt werden (Abb. 17 und Abb. 21). Die Thylakoide sind insgesamt weniger zusammengedrückt als im Wildtyp, was an den vergrößerten Chloroplasten in den Mutanten liegen könnte. Im Längsschnitt erscheinen die Chloroplasten in den Mutanten-Linien fast kreisrund. Dies ist besonders ausgeprägt in der RNAi-Linie, wo viele sphärische und nicht-linsenförmige Chloroplasten zu beobachten waren (Abb. 21). Diese Befunde lassen sich dahingehend interpretieren, dass Alb4 für die Entwicklung der Chloroplasten nicht so absolut essentiell wie Alb3 ist, aber dennoch für die Ausbildung der richtigen Ultrastruktur benötigt wird. Allerdings kann auch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die restlichen 10% Alb4-Protein in den Mutanten ausreichen, die Biogenese von photosynthetisch aktiven Chloroplasten zu ermöglichen. Diese Möglichkeit lässt sich nur mit Mutanten beantworten, in denen dieses Gen völlig ausgeschaltet und kein Alb4-

Protein mehr nachweisbar ist. Erste Analysen der TILLING-Linien legen nahe, dass auch solche Pflanzen ganz ohne Alb4 keinen makroskopisch auffälligen Phänotyp unter Standardbedingungen zeigen und autotroph lebensfähig sind. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen noch an den Pflanzen der nächsten Generation bestätigt werden. Auch sind bislang keine Untersuchungen auf ultrastruktureller Ebene an den TILLING-Linien erfolgt. Der insgesamt doch recht milde Phänotyp der *Alb4*-Mutanten könnte allerdings auch dadurch bedingt sein, dass Alb4 größtenteils durch Alb3 funktionell ersetzt werden kann.

In den Thylakoidmembranen von *Chlamydomonas* wurden ebenfalls zwei Oxa-Homologe identifiziert, Alb3.1 und Alb3.2 (Bellafiore et al., 2002), welche beide eng mit Alb3 und Alb4 verwandt sind. *Chlamydomonas*-Mutanten ohne Alb3.1 sind hauptsächlich durch eine drastische Reduktion der Lichtsammel-Komplexe gekennzeichnet. Zusätzlich hat die *Alb3.1*-Mutante Probleme, das D1-Protein in Photosystem II einzubauen und besitzt daher generell weniger Photosystem II-Komplexe als der Wildtyp (Bellafiore et al., 2002; Ossenbühl et al., 2004). Trotz dieser Einschränkungen kann die Mutante photoautotroph wachsen und zeigt somit einen wesentlich schwächeren Phänotyp als die *Alb3*-Mutante in *Arabidopsis*. In *Alb3.2*-Mutanten ist vor allem der Gehalt an Untereinheiten von Photosystem II und I reduziert (Göhre et al., 2006), was auf unterschiedliche Funktionen für die beiden Paraloge hindeutet. Im Gegensatz zu Alb3.1 ist Alb3.2 für die photoautotrophe Lebensweise von *Chlamydomonas* jedoch zwingend erforderlich (Göhre et al., 2006). Alb3.2 kann also nicht nur für Assemblierung der Photosysteme benötigt werden, sondern muss bei mindestens einem weiteren Prozess, der auch für das heterotrophe Überleben essentiell ist, eine Rolle spielen. Die *Chlamydomonas-Alb3.2*-Mutante ähnelt in ihrem Phänotyp also viel mehr der *Arabidopsis-Alb3*-Mutante (Sundberg et al., 1997). Anhand der phänotypischen Ausprägung kann allerdings nicht auf eine Zuordnung von Alb3 als direktes Homolog zu Alb3.2 bzw. Alb4 als direktes Homolog zu Alb3.1 geschlossen werden. Eine solche Zuordnung wird auch nicht von einem Vergleich identischer und ähnlicher Aminosäuren zwischen den einzelnen Proteinen getragen; hier sind sowohl Alb3.2 als auch Alb3.1 insgesamt homologer zu Alb3 als zu Alb4 (Daten nicht abgebildet).

Das Cyanobakterium *Synechocystis* enthält mit slr1471 nur ein einziges Oxa-Homolog, dessen genaue zelluläre Lokalisierung allerdings noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte (Fulgosi et al., 2002; Spence et al., 2004; Ossenbühl et al., 2006). In Cyanobakterien gibt es keine LHCPs, das Hauptsubstrat von slr1471 kann daher nicht wie bei Alb3 in höheren Pflanzen aus LHC-Proteinen bestehen (Spence et al., 2004). Wie Alb3.1 in *Chlamydomonas* scheint slr1471 an der Integration und Assemblierung von D1 in Photosystem II beteiligt zu

sein (Ossenbühl et al., 2006). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass slr1471 essentiell für das Überleben von *Synechocystis* ist und dass das weitgehende Fehlen des Proteins zu Ausfällen bei der Biogenese der Thylakoidmembran führt (Spence et al., 2004). Es ist nicht eindeutig zu entscheiden, ob slr1471 eher als Vorläufer zu Alb3 oder Alb4 anzusehen ist; es gibt zu beiden etwa gleich viele identische oder ähnliche Aminosäuren (Daten nicht abgebildet). Phänotypisch scheint slr1471 eher Alb3 als Alb4 nahe zu stehen, da auch slr1471 – ähnlich wie Alb3 in *Arabidopsis* oder Alb3.2 in *Chlamydomonas* – eine über die Assemblierung von Photosynthese-Komplexen hinausgehende (überlebens)wichtige Rolle für die cyanobakterielle Zelle zu spielen scheint (Spence et al., 2004).

Über eine mögliche Funktion von Alb4 kann gegenwärtig nur spekuliert werden. Die Tatsache, dass die konservierte Region von Alb4 mit den fünf Transmembranhelices das Oxa1-Protein in Hefe zumindest teilweise funktionell komplementieren kann (Abb. 9), zeigt, dass es sich bei Alb4 um ein *bona fides* Mitglied der Oxa-Proteinfamilie handelt und legt nahe, dass Alb4 eventuell ebenfalls an der Insertion oder Assemblierung von integralen Membranproteinen beteiligt ist. In einem ähnlich angelegten Experiment konnte YidC aus *E. coli* Oxa1 in Hefe allerdings nur dann ersetzen, wenn eine Ribosomen-bindende Superhelix an den C-Terminus von YidC fusioniert wurde (Preuss et al., 2005). Die Tatsache, dass Alb4 einer solchen artifiziellen Extension für die Komplementation von scOxa1 nicht Bedarf, kann als Hinweis dafür gedeutet werden, dass Alb4 mit seiner C-terminalen Superhelix-Domäne bereits Ribosomen binden kann. Weitere Erkenntnisse könnte ein Komplementationsversuch der *Δcox18*-Mutante mit Alb4 liefern, evtl. hindert die putative Ribosomenbindungs-Domäne von Alb4 in diesem Fall die Komplementation ähnlich wie bei YidC, das mit artifizieller C-terminaler Superhelix Cox18 nicht mehr komplementieren kann (Preuss et al., 2005). Aufschlussreich wäre außerdem eine Komplementation von *Δoxa1* durch Alb3, um zu klären, inwiefern auch Alb3 eine funktionelle Ribosomenbindungs-Domäne aufweist. Dies würde wertvolle Erkenntnisse zur Substratspezifität von Alb3 und Alb4 liefern und klären, ob beide Oxa-Homologen an der cotranslationalen Insertion von Proteinen durch Bindung von translationsaktiven Ribosomen beteiligt sein können. In Hefemitochondrien ohne Oxa1 konnte Alb4 sowohl mitochondriell- als auch kernkodierte Proteine in die innere Membran integrieren (Funes et al., 2004a). Ob Alb4 dabei direkt mit mitochondriellen Ribosomen interagiert, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Thylakoidmembranen enthalten Proteine, deren Gene in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind (Malkin und Niyogi, 2000). Die plastidenkodierte Proteine werden an stromalen Ribosomen synthetisiert und höchstwahrscheinlich cotranslational unter Beteiligung

eines plastidären Sec-Systems in die Thylakoidmembran eingebaut (Zhang et al., 2001; Röhl und van Wijk, 2001). Kernkodierte Proteine werden posttranslational in die Chloroplasten importiert und anschließend in die Thylakoidmembran inseriert (Soll und Schleiff, 2004; Di Cola et al., 2005). Die kernkodierten Lhcb1, Lhcb4.1 und Lhcb5 nutzen den stromalen SRP zusammen mit Alb3 für ihre Insertion (Moore et al., 2000; Woolhead et al., 2001). Durch die Umwandlung eines cyanobakteriellen Endosymbionten zu einem eukaryotischen Organell, in dem sowohl co- als auch posttranslational Proteine in die Thylakoidmembran inseriert werden müssen, könnten zwei Mitglieder der Oxa-Proteinfamilie nötig geworden sein, um die Ausbildung und den Erhalt der korrekten Thylakoidstruktur zu gewährleisten. Für andere integrale Thylakoidproteine konnte der Insertionsweg bislang nicht gezeigt werden bzw. es wurden (noch?) keine proteinösen Komponenten identifiziert (Di Cola et al., 2005). In Bakterien ist die Existenz einer solchen „spontanen Insertion“ inzwischen äußerst zweifelhaft, seit gezeigt werden konnte, dass das Oxa-Homolog YidC zwingend für die effiziente Integration der „spontanen“ Kandidaten M13-procoat und Pf3-coat benötigt wird (Samuelson et al., 2000; Samuelson et al., 2001). Eventuell unterstützt Alb4 die Insertion einiger Proteine, die aber auch ohne Alb4 noch effizient „aus eigener Kraft“ inserieren können.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche spezielle Rolle Alb4 bei der Chloroplastenbiogenese spielt. Von besonderem Interesse wäre hier die Bestätigung der Pflanzen der TILLING-Linien als tatsächliche *Alb4*-Nullmutanten, sowie das Auffinden von möglichen Interaktionspartnern oder Substraten. Um die Rollenverteilung zwischen Alb4 und Alb3 besser zu verstehen, wäre es aufschlussreich zu klären, ob Alb4 wie auch Alb3 (Klostermann et al., 2002) teilweise mit dem cpSecY-Komplex assoziiert vorliegt.

Nachdem mit RT-PCR-Untersuchungen der C-terminale Teil des ehemaligen Genmodells *F21J9.13* als eigenständiges Gen identifiziert worden war, konnte auch gezeigt werden, dass der N-Terminus als eigenständiges Transkript exprimiert wird (Abb. 24 B). Das daraus abgeleitete Protein RWK1 ähnelt dem Rezeptor-Teil von RLKs („receptor-like kinases“), hat jedoch keine entsprechende Kinase-Domäne (Abb. 29 A).

Die größten Homologien besitzt RWK1 zur Unterfamilie der LRR-RLKs. Obwohl auch in RWK1 einige Leucine konserviert erscheinen, so fehlt doch ein durchgehendes LRR-Motiv (Deeken und Kaldenhoff, 1997), wie es für die nächsten Homologe typisch ist (Herzen in Abb. 29 A). Im Gegensatz zu anderen beschriebenen Kinase-losen LRR-Proteinen wie CLV2 (Jeong et al., 1999) oder Cf9 (Thomas et al., 1997) wird für RWK1 auch keine Transmembranhelix vorhergesagt, so dass RWK1 schwerlich an einer vergleichbaren Signalweiterleitung über die

(Plasma-)Membran beteiligt sein kann, wie sie für die LRR-RLKs BRI1 (Li und Chory, 1997) oder CLV1 (Clark et al., 1997) angenommen wird. Ob RWK1 tatsächlich auch ohne konserviertes LRR-Motiv als Rezeptor fungieren kann und inwiefern dabei stattdessen die Glycin- und Serin-reiche Domäne (GS in Abb. 29 B) eine Rolle spielt, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Obwohl ähnliche GS-reiche Abschnitte in verschiedenen anderen Proteinen zu finden sind (Daten nicht abgebildet), wurde für sie bisher keine besondere Funktion beschrieben.

Es konnten zwei Spleißvarianten von RWK1 auf Transkriptebene nachgewiesen werden (Abb. 27). Vielleicht besitzen die beiden durch alternatives Spleißen gebildeten Proteine RWK1.1 und RWK1.2 unterschiedliche Liganden und sind daher an der Perzeption von spezifischen Signalen beteiligt. Als putativer Rezeptor könnte RWK1 nur in sehr geringen Mengen vorliegen, was erklärt, warum es in immunologischen Nachweisen trotz spezifischer Antikörper bislang nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die vorläufige Lokalisierung über GFP-Fusionsproteine (Abb. 30) ergibt, dass RWK1 anscheinend kein plastidäres Protein ist.

Den Transkripten von *RWK1* fehlt der für die überwiegende Mehrheit der eukaryotischen mRNAs typische polyA-Schwanz (Abb. 25). Ob RWK1 ein entsprechendes poly-Adenylierungssignal fehlt, lässt sich *in silico* nicht eindeutig bestimmen, da in *Arabidopsis* keine zuverlässige Konsensussequenz existiert (Loke et al., 2005). Eventuell hat der fehlende polyA-Schwanz Auswirkungen auf die Stabilität der Transkripte und/oder die Translation (Zhao et al., 1999) und spielt dadurch bei der Kontrolle der in der Zelle verfügbaren Menge an RWK1 eine Rolle; dies muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

Die Untersuchung von stabilen Insertions-Mutanten für *RWK1* sollte wichtige Aufschlüsse über eine mögliche Funktion des Proteins liefern. Mit RWK1 könnte ein weiterer Mitspieler in der internen Kommunikation der Zelle vorliegen.

6 Zusammenfassung

Mitglieder der evolutionär konservierten Oxa-Proteinfamilie wirken an der korrekten Insertion von integralen Membranproteinen in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten mit. In den sehr proteinreichen Thylakoidmembranen der Chloroplasten höherer Pflanzen spielt das Oxa-Homolog Alb3 eine essentielle Rolle bei der Integration von LHC-Proteinen und weiteren Komponenten des Photosynthese-Apparates.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein weiteres Protein aus *Arabidopsis* identifiziert und als neues Mitglied der Oxa-Proteinfamilie beschrieben. Die experimentell gestützte Annotation zeigt, dass das Alb4-Protein eine zentrale 60KD_IMP-Domäne besitzt, welche für die Oxa-Proteine charakteristisch ist. Die Zugehörigkeit zur Oxa-Proteinfamilie konnte funktionell durch die Komplementation einer Hefe- Δ oxa1-Mutante bestätigt werden. Immunologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnten weiterhin zeigen, dass es sich bei Alb4 um ein chloroplastidäres Protein handelt, welches als integrales Membranprotein in den Thylakoiden lokalisiert ist. Durch die Analyse von T-DNA-Insertions- und RNAi-Linien konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des Alb4-Gehaltes zu vergrößerten und nicht länger linsenförmigen Chloroplasten führt, in denen die Thylakoidmembranen aufgelockerter erscheinen. Ein Verlust der Lebensfähigkeit konnte jedoch nicht beobachtet werden, selbst wenn der Alb4-Gehalt in den Chloroplasten der Pflanzen um mehr als 90% reduziert war. Im Vergleich zu Cyanobakterien besitzt die Thylakoidmembran von *Arabidopsis* mit Alb4 und Alb3 gleich zwei Oxa-Homologe. Möglicherweise ist nach der Umwandlung des cyanobakteriellen Endosymbionten zu einem eukaryotischen Organell diese Duplizierung nötig geworden, um sowohl die Ausbildung als auch den Erhalt der Thylakoidstruktur zu gewährleisten.

Zusätzlich zur Identifizierung von *Alb4* konnte durch Transkript-Analysen desweiteren gezeigt werden, dass auch der N-Terminale Teil des ehemaligen Genmodells *F21J9.13* (*Artemis*, nun *Alb4* und *RWK1*) für ein eigenständiges Gen kodiert. Das abgeleitete Protein aus dem N-terminalen Teil, *RWK1*, ähnelt dem Rezeptor-Teil von pflanzlichen Rezeptor-Kinasen, eine entsprechende Kinase-Domäne fehlt jedoch vollständig. *RWK1* kommt in zwei Spleißvarianten vor, der für die meisten eukaryotischen mRNAs typische polyA-Schwanz fehlt jedoch beiden Varianten. *RWK1* könnte als neuartiger Rezeptor ein weiteres Glied in der internen Kommunikationskette der Zelle bilden.

7 Literatur

- 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., Schaffer,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. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Bauer,M., Behrens,M., Esser,K., Michaelis,G. & Pratje,E.** (1994) *PET1402*, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 272-278.
- Beck,K., Eisner,G., Trescher,D., Dalbey,R.E., Brunner,J. & Muller,M.** (2001) YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* **2**, 709-714.
- Bellafiore,S., Ferris,P., Naver,H., Göhre,V. & Rochaix,J.D.** (2002) Loss of albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell* **14**, 2303-2314.
- Bonnefoy,N., Chalvet,F., Hamel,P., Slonimski,P.P. & Dujardin,G.** (1994) OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.* **239**, 201-212.
- Bradford,M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chen,M., Samuelson,J.C., Jiang,F., Muller,M., Kuhn,A. & Dalbey,R.E.** (2002) Direct interaction of YidC with the Sec-independent Pf3 coat protein during its membrane protein insertion. *J. Biol. Chem.* **277**, 7670-7675.
- Clark,S.E., Williams,R.W. & Meyerowitz,E.M.** (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- Clausen,C., Ilkavets,I., Thomson,R., Philippar,K., Vojta,A., Mohlmann,T., Neuhaus,E., Fulgosi,H. & Soll,J.** (2004) Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta* **220**, 30-37.
- Clough,S.J. & Bent,A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Dalbey,R.E. & Chen,M.** (2004) Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 37-53.
- Dalbey,R.E. & Kuhn,A.** (2000) Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu Rev Cell Dev. Biol* **16**, 51-87.
- Deeken,R. & Kaldenhoff,R.** (1997) Light-repressible receptor protein kinase: a novel photo-regulated gene from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **202**, 479-486.
- Di Cola,A., Klostermann,E. & Robinson,C.** (2005) The complexity of pathways for protein import into thylakoids: it's not easy being green. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1024-1027.
- Dyall,S.D., Brown,M.T. & Johnson,P.J.** (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**, 253-257.

- Elbashir,S.M., Lendeckel,W. & Tuschl,T.** (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
- Emanuelsson,O., Nielsen,H., Brunak,S. & von Heijne,G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005-1016.
- Emanuelsson,O., Nielsen,H. & von Heijne,G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**, 978-984.
- Emanuelsson,O. & von Heijne,G.** (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**, 114-119.
- Errington,J., Appleby,L., Daniel,R.A., Goodfellow,H., Partridge,S.R. & Yudkin,M.D.** (1992) Structure and function of the spoIIJ gene of *Bacillus subtilis*: a vegetatively expressed gene that is essential for sigma G activity at an intermediate stage of sporulation. *J. Gen. Microbiol.* **138 (Pt 12)**, 2609-2618.
- Friso,G., Giacomelli,L., Ytterberg,A.J., Peltier,J.B., Rudella,A., Sun,Q. & Wijk,K.J.** (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* **16**, 478-499.
- Fulgosi,H., Gerdes,L., Westphal,S., Glockmann,C. & Soll,J.** (2002) Cell and chloroplast division requires ARTEMIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 11501-11506.
- Funes,S., Gerdes,L., Inaba,M., Soll,J. & Herrmann,J.M.** (2004a) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast inner envelope protein ARTEMIS is a functional member of the Alb3/Oxa1/YidC family of proteins. *FEBS Lett.* **569**, 89-93.
- Funes,S., Nargang,F.E., Neupert,W. & Herrmann,J.M.** (2004b) The Oxa2 protein of *Neurospora crassa* plays a critical role in the biogenesis of cytochrome oxidase and defines a ubiquitous subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 protein family. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1853-1861.
- Gavel,Y., Steppuhn,J., Herrmann,R. & von Heijne,G.** (1991) The 'positive-inside rule' applies to thylakoid membrane proteins. *FEBS Lett.* **282**, 41-46.
- Gerdes,L., Bals,T., Klostermann,E., Karl,M., Philippar,K., Hünken,M., Soll,J. & Schünemann,D.** (2006) A second thylakoid membrane localized Alb3/Oxa1/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **281**, 16632-16642.
- Gish,W. & States,D.J.** (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3**, 266-272.
- Glick,B.S. & von Heijne,G.** (1996) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type sec machinery. *Protein Sci.* **5**, 2651-2652.
- Göhre,V., Ossenbühl,F., Crèvecoeur,M., Eichacker,L.A. & Rochaix,J.D.** (2006) One of two Alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **18**, 1454-1466.
- Goodall,G.J. & Filipowicz,W.** (1991) Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *EMBO J* **10**, 2635-2644.
- Gray,M.W., Burger,G. & Lang,B.F.** (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Gray,M.W. & Doolittle,W.F.** (1982) Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev* **46**, 1-42.

- Gutensohn,M., Fan,E., Frielingsdorf,S., Hanner,P., Hou,B., Hust,B. & Klösger,R.B.** (2005) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J. Plant Physiol* **163**, 333-347.
- Hamel,P., Sakamoto,W., Wintz,H. & Dujardin,G.** (1997) Functional complementation of an oxal1-yeast mutation identifies an *Arabidopsis thaliana* cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *Plant Journal* **12**, 1319-1327.
- Hamilton,A.J. & Baulcombe,D.C.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Hanahan,D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hartree,E.F.** (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427.
- He,S. & Fox,T.D.** (1997) Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1449-1460.
- Heazlewood,J.L., Tonti-Filippini,J.S., Gout,A.M., Day,D.A., Whelan,J. & Millar,A.H.** (2004) Experimental analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* **16**, 241-256.
- Hell,K., Herrmann,J.M., Pratje,E., Neupert,W. & Stuart,R.A.** (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* **418**, 367-370.
- Hell,K., Herrmann,J.M., Pratje,E., Neupert,W. & Stuart,R.A.** (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 2250-2255.
- Hell,K., Neupert,W. & Stuart,R.A.** (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* **20**, 1281-1288.
- Herrmann,J.M. & Neupert,W.** (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB. Life* **55**, 219-225.
- Herrmann,J.M., Neupert,W. & Stuart,R.A.** (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* **16**, 2217-2226.
- Higgins,D.G., Bleasby,A.J. & Fuchs,R.** (1992) CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci.* **8**, 189-191.
- Higgins,D.G. & Sharp,P.M.** (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237-244.
- Higgins,D.G. & Sharp,P.M.** (1989) Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**, 151-153.
- Higgins,D.G., Thompson,J.D. & Gibson,T.J.** (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* **266**, 383-402.

- Houben,E.N., Hagen-Jongman,C.M., Brunner,J., Oudega,B. & Luirink,J.** (2004) The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface. *EMBO Rep.* **5**, 970-975.
- Jansson,S.** (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* **4**, 236-240.
- Jeanmougin,F., Thompson,J.D., Gouy,M., Higgins,D.G. & Gibson,T.J.** (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 403-405.
- Jeong,S., Trotochaud,A.E. & Clark,S.E.** (1999) The *Arabidopsis* *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925-1934.
- Jia,L., Dienhart,M., Schramp,M., McCauley,M., Hell,K. & Stuart,R.A.** (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J* **22**, 6438-6447.
- Karimi,M., De Meyer,B. & Hilson,P.** (2005) Modular cloning in plant cells. *Trends Plant Sci.* **10**, 103-105.
- Karnauchov,I., Cai,D., Schmidt,I., Herrmann,R.G. & Klösigen,R.B.** (1994) The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem I, the *psaF* gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway. *J Biol Chem.* **269**, 32871-32878.
- Kermorgant,M., Bonnefoy,N. & Dujardin,G.** (1997) Oxa1p, which is required for cytochrome c oxidase and ATP synthase complex formation, is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Curr. Genet.* **31**, 302-307.
- Klostermann,E., Droste,G.H., I, Carde,J.P. & Schünemann,D.** (2002) The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **368**, 777-781.
- Koch,H.G., Moser,M., Schimz,K.L. & Muller,M.** (2002) The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. *J Biol Chem.* **277**, 5715-5718.
- Koncz,C. & Schell,J.** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.
- Kuhn,A., Stuart,R., Henry,R. & Dalbey,R.E.** (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* **13**, 510-516.
- Kunst,L.** (1998) Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* **82**, 43-48.
- 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.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee,M.H., Min,M.K., Lee,Y.J., Jin,J.B., Shin,D.H., Kim,D.H., Lee,K.H. & Hwang,I.** (2002) ADP-ribosylation factor 1 of *Arabidopsis* plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**, 1507-1520.

- Lee, Y.J., Kim, D.H., Kim, Y.W. & Hwang, I.** (2001) Identification of a signal that distinguishes between the chloroplast outer envelope membrane and the endomembrane system in vivo. *Plant Cell* **13**, 2175-2190.
- Li, H.M., Moore, T. & Keegstra, K.** (1991) Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts. *Plant Cell* **3**, 709-717.
- Li, J. & Chory, J.** (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
- Loke, J.C., Stahlberg, E.A., Strenski, D.G., Haas, B.J., Wood, P.C. & Li, Q.Q.** (2005) Compilation of mRNA polyadenylation signals in *Arabidopsis* revealed a new signal element and potential secondary structures. *Plant Physiology* **138**, 1457-1468.
- Luirink, J., Samuelsson, T. & de Gier, J.** (2001) YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* **501**, 1-5.
- Lupas, A.** (1997) Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol* **7**, 388-393.
- Lupas, A., Van Dyke, M. & Stock, J.** (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1164.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J.** (1996) Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* **266**, 131-141.
- Malkin, R. & Niyogi, K.** (2000) Photosynthesis. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Ed. by B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones), pp. 568-628. Rockville, ASPP.
- Mant, A., Woolhead, C.A., Moore, M., Henry, R. & Robinson, C.** (2001) Insertion of PsaK into the thylakoid membrane in a "Horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle, nucleoside triphosphates, or functional albino3. *J. Biol. Chem.* **276**, 36200-36206.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Cherukuri, P.F., DeWeese-Scott, C., Geer, L.Y., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Shoemaker, B.A., Simonyan, V., Song, J.S., Thiessen, P.A., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D. & Bryant, S.H.** (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**, D192-D196.
- Margulis, L.** (1970) *Origin of Eucaryotic Cells*. New Haven, Yale Univ. Press.
- Martin, W. & Herrmann, R.G.** (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiology* **118**, 9-17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. & Penny, D.** (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 12246-12251.
- Mereschkowsky, C.** (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* **25**, 593-604.
- Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C. & Henry, R.** (2000) Chloroplast Oxa1p homolog Albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *The Journal Of Biological Chemistry* **275**, 1529-1532.
- Mustardy, L. & Garab, G.** (2003) Granum revisited. A three-dimensional model--where things fall into place. *Trends Plant Sci.* **8**, 117-122.

- Nagamori,S., Smirnova,I.N. & Kaback,H.R.** (2004) Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J Cell Biol.* **165**, 53-62.
- Nargang,F.E., Preuss,M., Neupert,W. & Herrmann,J.M.** (2002) The Oxal protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J Biol. Chem.* **277**, 12846-12853.
- Nielsen,H., Engelbrecht,J., Brunak,S. & von Heijne,G.** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* **10**, 1-6.
- Nilsson,R., Brunner,J., Hoffman,N.E. & van Wijk,K.J.** (1999) Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast- encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *EMBO J.* **18**, 733-742.
- Nouwen,N. & Driessen,A.J.** (2002) SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol. Microbiol.* **44**, 1397-1405.
- Ossenbühl,F., Göhre,V., Meurer,J., Krieger-Liszky,A., Rochaix,J.D. & Eichacker,L.A.** (2004) Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of *Arabidopsis* ALBINO3. *Plant Cell* **16**, 1790-1800.
- Ossenbühl,F., Inaba-Sulpice,M., Meurer,J., Soll,J. & Eichacker,L.A.** (2006) The *Synechocystis* sp PCC 6803 Oxal1 homolog is essential for membrane integration of reaction center precursor protein pD1. *Plant Cell* **18**, 2236-2246.
- Pasch,J.C., Nickelsen,J. & Schünemann,D.** (2005) The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 440-447.
- Paulsen,H., Rümmler,U. & Rüdiger,W.** (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211.
- Pedersen,A.G. & Nielsen,H.** (1997) Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol Biol* **5**, 226-233.
- Peeters,N.M., Chapron,A., Giritch,A., Grandjean,O., Lancelin,D., Lhomme,T., Vivrel,A. & Small,I.** (2000) Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J Mol. Evol.* **50**, 413-423.
- Pohlschröder,M., Hartmann,E., Hand,N.J., Dilks,K. & Haddad,A.** (2005) Diversity and evolution of protein translocation. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 91-111.
- Preuss,M., Ott,M., Funes,S., Luirink,J. & Herrmann,J.M.** (2005) Evolution of mitochondrial oxa proteins from bacterial YidC: Inherited and acquired functions of a conserved protein insertion machinery. *J. Biol. Chem.* **280**, 13004-13011.
- Röhl,T. & van Wijk,K.J.** (2001) In vitro reconstitution of insertion and processing of cytochrome f in a homologous chloroplast translation system. *J Biol Chem.* **276**, 35465-35472.
- Saint-Georges,Y., Hamel,P., Lemaire,C. & Dujardin,G.** (2001) Role of positively charged transmembrane segments in the insertion and assembly of mitochondrial inner-membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13814-13819.
- Sakamoto,W., Spielwoy,N., Bonnard,G., Murata,M. & Wintz,H.** (2000) Mitochondrial localization of AtOXA1, an *Arabidopsis* homologue of yeast Oxal1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane. *Plant Cell Physiol* **41**, 1157-1163.

- Salomon,M., Fischer,K., Flüge,U.I. & Soll,J.** (1990) Sequence analysis and protein import studies of an outer chloroplast envelope polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 5778-5782.
- Sambrook,J. & Russell,D.W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samuelson,J.C., Chen,M., Jiang,F., Moller,I., Wiedmann,M., Kuhn,A., Phillips,G.J. & Dalbey,R.E.** (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**, 637-641.
- Samuelson,J.C., Jiang,F., Yi,L., Chen,M., de Gier,J.W., Kuhn,A. & Dalbey,R.E.** (2001) Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *E. coli*: Translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec- requirement. *J. Biol. Chem.* **276**, 34847-34852.
- Saracco,S.A. & Fox,T.D.** (2002) Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1122-1131.
- Schatz,G. & Dobberstein,B.** (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526.
- Scheer,J.M. & Ryan,C.A.** (2001) A method for the quantitative recovery of proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **298**, 130-132.
- Scholl,R.L., May,S.T. & Ware,D.H.** (2000) Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**, 1477-1480.
- Scotti,P.A., Urbanus,M.L., Brunner,J., de Gier,J.W., von Heijne,G., van der,D.C., Driessen,A.J., Oudega,B. & Luirink,J.** (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19**, 542-549.
- Serek,J., Bauer-Manz,G., Struhalla,G., van den,B.L., Kiefer,D., Dalbey,R. & Kuhn,A.** (2004) *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J* **23**, 294-301.
- Shiu,S. & Bleecker,A.B.** (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10763-10768.
- Soll,J. & Schleiff,E.** (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev Mol Cell Biol* **5**, 198-208.
- Sonnhammer,E.L., von Heijne,G. & Krogh,A.** (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol Biol* **6**, 175-182.
- Souza,R.L., Green-Willms,N.S., Fox,T.D., Tzagoloff,A. & Nobrega,F.G.** (2000) Cloning and characterization of *COX18*, a *Saccharomyces cerevisiae* *PET* gene required for the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol Chem.* **275**, 14898-14902.
- Spence,E., Bailey,S., Nenninger,A., Moller,S.G. & Robinson,C.** (2004) A homolog of Albino3/OxaI is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.* **279**, 55792-55800.
- Stahlin,L.A. & Newcomb,E.H.** (2000) Membrane structure and membranous organelles. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Ed. by B.B.Buchanan, W.Gruissem & R.L.Jones), pp. 2-50. Rockville, ASPP.
- Studier,F.W., Rosenberg,A.H., Dunn,J.J. & Dubendorff,J.W.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89.

- Summer,E.J., Mori,H., Settles,A.M. & Cline,K.** (2000) The thylakoid delta pH-dependent pathway machinery facilitates RR-independent N-tail protein integration. *J Biol Chem.* **275**, 23483-23490.
- Sundberg,E., Slagter,G.S., Fridborg,I., Cleary,S.P., Robinson,C. & Coupland,G.** (1997) Albino3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes yeast mitochondria. *The Plant Cell* **9**, 717-730.
- Szyrach,G., Ott,M., Bonnefoy,N., Neupert,W. & Herrmann,J.M.** (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J* **22**, 6448-6457.
- Tatusova,T.A. & Madden,T.L.** (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 247-250.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thomas,C.M., Jones,D.A., Parniske,M., Harrison,K., Balint-Kurti,P.J., Hatzixanthis,K. & Jones,J.D.** (1997) Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in Cf-4 and Cf-9. *Plant Cell* **9**, 2209-2224.
- Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F. & Higgins,D.G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Thompson,J.D., Higgins,D.G. & Gibson,T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Till,B.J., Reynolds,S.H., Greene,E.A., Codomo,C.A., Enns,L.C., Johnson,J.E., Burtner,C., Odden,A.R., Young,K., Taylor,N.E., Henikoff,J.G., Comai,L. & Henikoff,S.** (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.* **13**, 524-530.
- Timmis,J.N., Ayliffe,M.A., Huang,C.Y. & Martin,W.** (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat. Rev Genet.* **5**, 123-135.
- Tissier,C., Woolhead,C.A. & Robinson,C.** (2002) Unique structural determinants in the signal peptides of "spontaneously" inserting thylakoid membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3131-3141.
- Tjalsma,H., Bron,S. & Van Dijk,J.M.** (2003) Complementary impact of paralogous oxa1-like proteins of *Bacillus subtilis* on post-translocational stages in protein secretion. *J Biol. Chem.* **278**, 15622-15632.
- Urbanus,M.L., Froderberg,L., Drew,D., Bjork,P., de Gier,J.W., Brunner,J., Oudega,B. & Luirink,J.** (2002) Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J Biol. Chem.* **277**, 12718-12723.
- van Bloois,E., Jan,H.G., de Gier,J.W., Oudega,B. & Luirink,J.** (2004) F(1)F(0) ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane. *FEBS Lett.* **576**, 97-100.
- Vaucheret,H., Beclin,C. & Fagard,M.** (2001) Post-transcriptional gene silencing in plants. *J Cell Sci.* **114**, 3083-3091.
- von Heijne,G., Steppuhn,J. & Herrmann,R.G.** (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**, 535-545.
- Walker,J.C.** (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol* **26**, 1599-1609.

- Wallin,E. & von Heijne,G.** (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* **7**, 1029-1038.
- Wang,G.L., Ruan,D.L., Song,W.Y., Sideris,S., Chen,L., Pi,L.Y., Zhang,S., Zhang,Z., Fauquet,C., Gaut,B.S., Whalen,M.C. & Ronald,P.C.** (1998) *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**, 765-779.
- Waterhouse,P.M., Wang,M.B. & Lough,T.** (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- Wesley,S.V., Helliwell,C.A., Smith,N.A., Wang,M.B., Rouse,D.T., Liu,Q., Gooding,P.S., Singh,S.P., Abbott,D., Stoutjesdijk,P.A., Robinson,S.P., Gleave,A.P., Green,A.G. & Waterhouse,P.M.** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-590.
- Woolhead,C.A., Thompson,S.J., Moore,M., Tissier,C., Mant,A., Rodger,A., Henry,R. & Robinson,C.** (2001) Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J. Biol Chem.* **276**, 40841-40846.
- Yen,M.R., Harley,K.T., Tseng,Y.H. & Saier,M.H., Jr.** (2001) Phylogenetic and structural analyses of the oxa1 family of protein translocases. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 223-231.
- Yi,L. & Dalbey,R.E.** (2005) Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria. *Mol. Membr. Biol.* **22**, 101-111.
- Yi,L., Jiang,F., Chen,M., Cain,B., Bolhuis,A. & Dalbey,R.E.** (2003) YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F(1)F(0)ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase. *Biochemistry* **42**, 10537-10544.
- Yuan,J., Henry,R., McCaffery,M. & Cline,K.** (1994) SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science* **266**, 796-798.
- Zamore,P.D., Tuschl,T., Sharp,P.A. & Bartel,D.P.** (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
- Zhang,J. & Madden,T.L.** (1997) PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* **7**, 649-656.
- Zhang,L., Paakkarinen,V., Suorsa,M. & Aro,E.M.** (2001) A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 37809-37814.
- Zhang,Z., Schwartz,S., Wagner,L. & Miller,W.** (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput. Biol* **7**, 203-214.
- Zhao,J., Hyman,L. & Moore,C.** (1999) Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol Biol Rev* **63**, 405-445.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

α	anti
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Alb	Albino
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C (-terminal)	Carboxy-Ende
CC	Superhelix
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
Col	Columbia
cp	chloroplastidär
cTP	chloroplastidäres Transitpeptid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ec	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatische Retikulum
gen., genom.	genomisch
GFP	Grün-Fluorezierendes-Protein
GSP	genspezifischer Primer
HAc	Essigsäure
IgG	Immunglobulin G
IMP	inner membrane protein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LHC	light-harvesting complex

LRR	leucine-rich repeat
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
mTP	mitochondrielles Transitpeptid
N (-terminal)	Amino-Ende
NAD	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
nc	<i>Neurospora crassa</i>
nt	Nukleotid
NTA	Nitrolotriessigsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Psa	Untereinheit von Photosystem I
Psb	Untereinheit von Photosystem II
PTGS	Post-Transcriptional-Gene-Silencing
put.	putativ
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RC	reliability class
Ret.	Retentionssignal
RLK	receptor-like kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT(-PCR)	PCR an revers-transkribierter RNA
RWK	receptor without kinase
sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SP	Signalpeptid
SRP	signal recognition particle
ST	Sialyltransferase
Tab.	Tabelle
TAT	twin-arginine translocation
T-DNA	Transfer-DNA
techn.	technisch
TIC	Translokon an der inneren chloroplastidären Hüllmembran

TILLING	targeting-induced local lesions in genomes
TM	Transmembran(-Helix)
TOC	Translokon an der äußeren chloroplastidären Hüllmembran
Tricine	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	untranslatierter Bereich
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

8.2 Lebenslauf

Name	Lars Gerdes
Geburtsdatum	22.12.1975
Geburtsort	Rendsburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
August 1982 – Juni 1986	Schule Nobiskrug Rendsburg
August 1986 - Juni 1995	Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg, Abitur
Januar 1996 – Oktober 1996	Grundwehrdienst beim LTG 63 in Alt Duvenstedt
Oktober 1996 – Januar 2002	Studium der Biologie an der CAU Kiel Diplomarbeit am Lehrstuhl für Entwicklungsphysiologie der Pflanzen von Prof. Dr. J. Soll, Thema „Molekulare Charakterisierung eines neuen Proteins der chloroplastidären Hüllmembranen“
April 2002 – August 2007	Promotion am Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen von Prof. Dr. J. Soll, LMU München

8.3 Veröffentlichungen

Gerdes,L., Bals,T., Klostermann,E., Karl,M., Philippar,K., Hünken,M., Soll,J. & Schünemann,D. (2006) A second thylakoid membrane localized Alb3/Oxa1/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **281**, 16632-16642.

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

8.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Unterstützung unzähliger Kollegen und Freunde nicht in ihrer jetzigen Form zustande gekommen. Ihnen allen danke ich von ganzem Herzen, auch wenn sie nicht alle namentlich Erwähnung finden.

Zuerst möchte ich Prof. Soll danken, in dessen Arbeitsgruppe ich meine Promotion anfertigen durfte. Seine stete Diskussionsbereitschaft und die fortwährende Ermöglichung auch kostspieliger Experimente haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Er wird immer der „Chef“ bleiben.

Für das Vorankommen meiner Arbeit haben sich als Gruppenleiter besonders Masami und Mark hervorgetan. Für ihren persönlichen und wissenschaftlichen Einsatz danke ich ihnen herzlich.

Für die nette Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung im Kampf mit den kleinen und großen Tücken des Laboralltages danke ich den Kollegen, die in direkter Nachbarschaft zu mir pipettiert haben: Inge, Monique, Nevena, Marta, Maxi und Ulrike. Es hat Spaß gemacht!

Allen Postdocs der AG Soll verdanke ich anregende Diskussionen, sowie steten Rat und Tat. Besonderen Dank an Ute für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die zahlreichen Verbesserungsvorschläge, sowie an Enrico, der in schwerer Stunde sofort ein offenes Ohr für mich hatte.

Vielen Dank an Gika, Britta und Bianca, auf die ich mich immer verlassen konnte. Ohne eure Freundschaft wäre ich nie soweit gekommen!

Zuletzt in dieser Auflistung, aber ganz sicher nicht an letzter Stelle in meinem Herzen, gilt mein ganz spezieller Dank meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich bedingungslos unterstützt haben, egal welche Entscheidungen ich getroffen habe oder welchen Weg ich auch gegangen bin.