

Identifizierung und Charakterisierung von Proteasen der Photosynthesemembran

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

Vorgelegt von
Martin Lensch
aus Traunreut

Juli 2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. G. Herrmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer
Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2002

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	7
1. EINLEITUNG	9
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1. Material	29
2.1.1. Chemikalien	29
2.1.2. Pflanzenmaterial	29
2.1.3. Verwendete Bakterien- und Cyanobakterienstämme	30
2.1.4. Verwendete rekombinante Plasmide und Phagemide	30
2.1.5. Molekulargewichts- und DNS/RNS-Größenstandards	30
2.1.6. Enzyme	31
2.1.7. Synthetische Oligonukleotide	31
2.1.8. Antiseren	32
2.1.9. Allgemeine Puffer und Medien	33
2.1.9.1. Puffer	33
2.1.9.2. Anzuchtsmedien für die Kultur von Bakterien und Phagen ..	35
2.1.9.3. Anzuchtsmedium für Cyanobakterien (BG-11)	37
2.1.9.4. Medien für die Anzucht und Selektion von Pflanzen	37
2.2. Methoden	38
2.2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden	38
2.2.2. Isolierung von DNS aus Bakteriophagen	39
2.2.3. Sichten von cDNS-Bibliotheken mittels Kolonie-Hybridisierung	40
2.2.4. Isolierung von Nukleinsäuren aus pflanzlichen Geweben	41
2.2.4.1. Isolierung von DNS nach der CTAB-Methode	41
2.2.4.2. DNS-Minipräparation aus <i>Arabidopsis</i>	41
2.2.4.3. Isolierung von Gesamt-RNS nach der <i>Trizol</i> [®] -Methode	42
2.2.4.4. Isolierung von poly(A) ⁺ -RNS mittels Oligo(dT)-Cellulose ..	42
2.2.5. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	43
2.2.5.1. Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten mittels Klenow-Polymerase.....	43
2.2.5.2. Radioaktive Markierung von RNS-Fragmenten	44
2.2.6. Hybridisieren von radioaktiv markierten Sonden an immobilisierte Nukleinsäuren	45
2.2.6.1. Standardmethode	45

2.2.6.2. Hybridisierung an BAC-Filter zur physikalischen Kartierung	45
2.2.7. <i>in vitro</i> -Transkription von klonierten DNS-Fragmenten	46
2.2.7.1. Methode A	46
2.2.7.2. Methode B	46
2.2.8. <i>in vitro</i> -Translation	47
2.2.8.1. Translation unter Verwendung von Kaninchen-Retikulocytenlysat	47
2.2.8.2. Translation unter Verwendung von Weizenkeimextrakt	48
2.2.9. Transformation von Pflanzen mit rekombinanter DNS	48
2.2.9.1. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	48
2.2.9.2. Infiltration von Pflanzen mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
2.2.9.3. Selektion transformierter Pflanzen	50
2.2.10. Allgemeine biochemische Methoden	51
2.2.11. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinpräparationen	51
2.2.11.1. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.2.11.2. Schwach denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sdPAGE)	52
2.2.11.3. Zweidimensionale Elektrophorese	52
2.2.11.4. Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue	54
2.2.11.5. Silberfärbung von Proteingelen	54
2.2.12. Isolierung von intakten Chloroplasten aus pflanzlichem Gewebe	55
2.2.12.1. Isolierung und Subfraktionierung von Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen	55
2.2.12.2. Isolierung von Chloroplasten aus Spinat	56
2.2.12.3. Isolierung und Subfraktionierung intakter Plastiden aus verschiedenen pflanzlichen Geweben	58
2.2.13. Import von <i>in vitro</i> -synthetisierten Proteinen in intakte Chloroplasten	59
2.2.14. Isolierung von Grana- und Stromathylakoiden durch differentielle Zentrifugation	61
2.2.15. Methoden zur Subfraktionierung von Lumenpräparationen	62
2.2.15.1. Fraktionierung durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat	62
2.2.15.2. Gelfiltration	62
2.2.15.3. Anionenaustauschchromatographie	63
2.2.15.4. Hydrophobe Chromatographie	63
2.2.15.5. Affinitätschromatographie an Thiol-Sepharose	63

2.2.16. Heterologe Expression rekombinanter DNS in <i>E. coli</i> und Aufreinigung der Expressionsprodukte	64
2.2.16.1. Expression	64
2.2.16.2. Trennung der bakteriellen Proteine in lösliche und unlösliche Fraktion	65
2.2.16.3. Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose	66
2.2.17. Herstellung polyklonaler Antiseren gegen ausgewählte Proteine	67
2.2.18. Immunologische Detektion spezifischer Proteine („Western- Hybridisierung“) nach dem Chemilumineszenzverfahren (ECL)	68
2.2.19. Anzucht von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	70
2.2.20. Streßbehandlung von <i>Synechocystis</i> -Kulturen	70
2.2.20.1. Lichtstreß	70
2.2.20.2. Hitzestreß	70
2.2.20.3. UV-B-Bestrahlung	71
2.2.21. Isolierung von Gesamtmembranen aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ..	71
2.2.22. Methoden zur Detektion proteolytischer Aktivität	72
2.2.22.1. Nachweis von Proteasen durch Elektrophorese auf substrathaltigen Polyacrylamidgelen	72
2.2.22.2. Quantitative Bestimmung proteolytischer Aktivität mittels Azocoll	73
2.2.22.3. Nachweis proteolytischer Aktivität in Präparationen von heterologen Überexpressionsprodukten aus <i>E. coli</i>	73
2.2.23. Detektion der Topologie von Membranproteinen	74
2.2.23.1. Waschen mit verschiedenen Salzlösungen	74
2.2.23.2. Verdau mit Proteasen	75
2.2.24. Streßbehandlung von Pflanzenmaterial	75
2.2.24.1. Lichtstreß	75
2.2.24.2. Hitzestreß und -schock	76
2.3. Rechnergestützte Methoden zur Datenverarbeitung	77
3. ERGEBNISSE	78
3.1. Isolierung lichtstreßinduzierter Proteasen aus dem Thylakoidlumen von <i>Pisum sativum</i> L.	78
3.1.1. Gewinnung von Lumenextrakten und Nachweis proteolytischer Aktivitäten	78
3.1.2. Versuche zur weitergehenden Aufreinigung und Charakterisierung	80
3.2. Klonierung von Genen neuer plastidärer Proteasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und Charakterisierung der kodierten Genprodukte	85
3.2.1. HtrA (DegP)	86

3.2.2. HhoA (DegQ/DegP5)	88
3.2.3. SppA	104
4. DISKUSSION	125
4.1. Isolierung und Aufreinigung lichtstreßinduzierter Proteasen aus dem Thylakoidlumen von <i>Pisum sativum</i> L.	125
4.2. Klonierung von Genen neuer plastidärer Proteasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> und Charakterisierung der kodierten Genprodukte	130
4.2.1. HtrA (DegP)	130
4.2.2. HhoA (DegQ/DegP5)	132
4.2.3. SppA	140
4.3. Ausblick	147
5. ZUSAMMENFASSUNG	149
6. ANHÄNGE	151
7. LITERATURVERZEICHNIS	156
8. PUBLIKATION	168
DANKSAGUNG	169
LEBENS LAUF	170

ABKÜRZUNGEN

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	künstliches Bakterienchromosom (engl. „bacterial artificial chromosome“)
BAP	6-Benzylaminopurin
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCI	3,4-Dichlorisocumarin
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DFP	di-Isopropylfluorophosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Einstein
E _{xxx}	Extinktion bei xxx nm Wellenlänge
E-64	L-trans-Epoxysuccinyl-Leucylamid-(4-guanidino)-Butan
ECL	Chemiluminiszenzverfahren zur Detektion immunologischer Signale (engl. „enhanced chemiluminescence“)
EDTA	Ethylendinitrioloacetat
ELIP	early light inducible protein
EST	expressed sequence tag
g	Erdbeschleunigung (9,81 ms ⁻²)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-[Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IAA	Jodoacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LHC	Lichtsammelkomplex
mA	Milliampere
MOPS	3-[N-Morpholino)-propansulfonsäure
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNS	Ribonukleinsäure
rNTP	Ribonukleotid-5'-triphosphat
sdPAGE	schwach denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS	Natriumdodecylsulfat
SPP	stromale prozessierende Protease
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPP	thylakoidäre prozessierende Peptidase
Tricin	N-Tris[Hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris[Hydroxymethyl]aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

1. EINLEITUNG

Lebende Zellen, egal ob prokaryotischen oder eukaryotischen Ursprungs, sind offene Systeme und können als solche ihr Überleben nur mittels eines ständigen kontrollierten Stoff- und Energieaustauschs mit ihrer Umwelt bewerkstelligen. Selbst unter optimalen Lebensbedingungen befinden sich daher alle strukturell oder funktionell am Aufbau einer Zelle beteiligten Komponenten nie in einem starren Zustand sondern immer in einem fließenden Gleichgewicht zwischen Neusynthese und Assemblierung einerseits und Degradation andererseits.

Proteolytische Prozesse, das heißt, alle enzymatischen und nichtenzymatischen Vorgänge, welche die Spaltung von Peptidbindungen involvieren, haben an den unter dem Überbegriff „Degradation“ zusammengefaßten Stoffwechselreaktionen einen gewichtigen Anteil. Jedoch lassen sich bei weitem nicht alle Funktionen der Proteolyse einfach mit „Degradation“ umschreiben, genauso wie eine simple Kategorisierung der Stoffwechselforgänge innerhalb einer Zelle in Anabolismus und Katabolismus der Komplexität dieser Prozesse bei weitem nicht gerecht würde. So spielen proteolytische Vorgänge neben den lange bekannten Aufgaben bei der Mobilisierung von Aminosäuren und Stickstoff aus Speicherproteinen und aus dem allgemeinen Abbau von Proteinen während Seneszenz und Zelltod ebenso eine entscheidende Rolle bei der Entfernung von beschädigten, fehlerhaften oder unvollständigen Proteinen bzw. Bestandteilen von Proteinkomplexen, bei der posttranslationellen Modifikation von Proteinen, bei der Adaptation verschiedenster Zellkomponenten an umweltbedingte Streßsituationen, bei Transportvorgängen von Proteinen durch verschiedene Membransysteme der Zelle und, über die Modulation verschiedener Schlüsselkomponenten, sogar bei der Regulation von Genexpression (Callis, 1995; Adam, 2000). Proteasen präsentieren sich mit zunehmender Einsicht in ihre grundlegende Struktur und Funktion als multifunktionelle Enzyme, die neben der Spaltung von Peptidbindungen beispielsweise auch als Chaperone fungieren und somit für die korrekte Faltung von Proteinen sorgen können (Wang und Tsou, 1998; Spiess *et al.*, 1999). Hinsichtlich des Ausmaßes ihrer Beteiligung an den verschiedensten Regulationsvorgängen in einer Zelle wird die Proteolyse mittlerweile mit Modifikationsmechanismen wie der Phosphorylierung verglichen (Hershko und Ciechanover, 1998).

Pflanzliche Zellen stellen sich hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Stoffwechselforgänge besonders komplex dar. Der Hauptgrund hierfür liegt darin, daß sie mit Mitochondrien und Plastiden gleich zwei verschiedene Organellen endosymbiontischen Ursprungs besitzen, deren Erbgut im Laufe der Evolution größtenteils, aber nicht vollständig, in den Zellkern transferiert wurde. Die Tatsache, daß sich sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten einen Teil ihrer

Genome ebenso wie eine komplette prokaryotische Transkriptions- und Translationsmaschinerie erhalten haben, daß ein Teil ihrer funktionellen Komponenten im Cytoplasma synthetisiert und nach der Synthese importiert werden muß, gleichzeitig aber auch Komponenten, welche im eigenen Organellengenom kodiert und synthetisiert werden, existieren, und es darüber hinaus Komplexe gibt, die sich aus Untereinheiten beiderlei Ursprungs zusammensetzen, erfordert zwangsläufig ein enormes Maß an Koordination und Regulation bei Aufbau, Adaptation und Degradation der Strukturen und Stoffwechselkomponenten in Pflanzenzellen. Proteolytische Prozesse haben bei diesen Vorgängen eine der Schlüsselrollen inne.

Die Erforschung der Proteolyse und der mit ihr verbundenen Enzyme und Substrate in der Pflanzenzelle wurde lange Zeit von der pflanzenphysiologischen Forschung als Aufgabe kaum wahrgenommen. Die meisten Pflanzenzellen besitzen als mit Abstand dominierendes Kompartiment eine Zentralvakuole, welche eine Fülle von Aufgaben erfüllt, beispielsweise als Speicherkompartiment und bei der Aufrechterhaltung des Turgordrucks der Zelle. Schon früh wurde erkannt, daß Vakuolen auch als Sammelbehälter für Abfallstoffe dienen, für die auch verschiedene aktive und passive Importmechanismen nachgewiesen wurden, und man ging davon aus, daß die Zelle auch mit der Hauptmenge ihrer zu degradierenden Proteinkomponenten so verfährt. Untersuchungen, die in pflanzlichen Vakuolen ein Spektrum an Proteasen und anderen hydrolytischen Enzymen nachwiesen, das im Großen und Ganzen dem der Lysosomen tierischer Zellen entspricht, bestärkten diese Vermutung und etablierten die Vakuole als lytisches Kompartiment, gewissermaßen das Äquivalent zum Lysosom in der Pflanzenzelle (Liu und Jagendorf, 1984; Wink, 1993; Vierstra, 1993). Im Cytoplasma wurde zudem auch in Pflanzenzellen das bereits aus tierischen Zellen und Hefe bekannte proteolytische System aus Ubiquitin und Proteasomen nachgewiesen, das in tierischen Zellen eine dominierende Rolle bei der Degradation von Proteinen spielt, die nicht in Lysosomen abgebaut werden (Vierstra, 1993; Hershko und Ciechanover, 1998). Es wurde folglich für lange Zeit davon ausgegangen, daß proteolytische Prozesse in pflanzlichen sich prinzipiell nicht wesentlich von denen in tierischen Zellen unterscheiden. Da frühe Experimente in Rohextrakten aus Chloroplasten eine gegenüber der von Gesamtzellextrakten verschwindend geringe proteolytische Gesamtaktivität von nur max. 3% detektierten, wurde trotz der bereits früh experimentell nachgewiesenen Existenz eines ATP-stimulierten plastidären Proteolysesystems (Malek *et al.*, 1984) für die Degradation von Proteinen aus dem Chloroplasten ein Exportmechanismus, verbunden mit einem anschließenden Import in die Vakuole, als Hauptverfahrensweise angenommen (Dalling und Nettleton, 1986). Erst mit größer werdender Einsicht in den komplexen Aufbau des Chloroplasten, besonders der Struktur der photosynthetischen Komplexe in der

Thylakoidmembran, und der Erkenntnis der verschiedenen Anforderungen, die neben der eventuellen Degradation auch im Zuge des Aufbaus und der Adaptation dieser Strukturen an verschiedenste Umweltbedingungen an proteolytische Mechanismen gestellt werden müssen, wurde deutlich, daß höchstens ein Bruchteil davon mittels des postulierten Exportsystems zu realisieren wäre.

Chloroplasten höherer Pflanzen lassen sich strukturell in sechs verschiedene Subkompartimente gliedern, drei davon membranös und drei davon flüssig: Äußere und innere Hüllmembran, der von beiden eingeschlossene Zwischenmembranraum, Stroma, Thylakoidmembran und das von dieser umhüllte Thylakoidlumen (Adam, 1996). Stroma, Thylakoidmembran und Lumen sind für die pflanzenphysiologische Forschung seit langer Zeit besonders interessante Forschungsobjekte, da sich hier der vermutlich wichtigste Stoffwechselprozeß auf der Erde abspielt, bei dem alleine aus Wasser und Kohlendioxid unter Nutzung der Energie des Sonnenlichts Biomasse erzeugt wird und der mit der Freisetzung von Sauerstoff als „Abfallprodukt“ nebenbei auch dafür sorgt, daß diese Lebensgrundlage für alle von oxidativer Atmung abhängigen Organismen überhaupt in der Atmosphäre des Planeten vorhanden ist: die Photosynthese. Die an der Photosynthese beteiligten Enzyme sind sämtlich in mehreren großen Komplexen in und an der Thylakoidmembran lokalisiert. Ein Großteil pflanzenphysiologischer Forschung fokussierte während der letzten Jahrzehnte daher zwangsläufig auf die genaue Erforschung der Struktur dieser Komplexe und der Mechanismen ihrer Synthese. Dabei wurden große Fortschritte erzielt, die dazu führten, daß über die meisten Aspekte bezüglich des Aufbaus und der Funktion des Photosynthesapparates heute sehr detaillierte und genaue Kenntnisse bestehen. Gleichzeitig wurde jedoch auch immer offensichtlicher, daß die Kenntnisse über diese Mechanismen bei weitem nicht für das Gesamtverständnis ausreichen, sondern daß vielmehr ein Verständnis der an der Degradation der Komplexe, ihrem ständigen Umbau und der Adaptation an die verschiedenen Umweltbedingungen beteiligten Vorgänge mindestens in gleichem Ausmaß wichtig ist.

Es gibt verschiedene Ansätze, proteolytische Prozesse in Kategorien zu unterteilen. Ein etwas älteres Konzept unterscheidet zum Beispiel zwischen *Prozessierung* von Proteinen, z. B. bei der Entfernung von Transitpeptiden nach dem Transport durch Membranen auf der einen und *Degradation* auf der anderen Seite (Musgrove *et al.*, 1989). Nach neueren Erkenntnissen läßt sich jedoch eine noch grundlegendere Unterscheidung treffen, die sich nach der Art des Substrats richtet: a) sogenannte haushaltende (engl. „*housekeeping*“) Prozesse, also solche, die zum Ziel haben, die optimale Ordnung innerhalb des zellulären Systems aufrecht zu erhalten,

richten sich grundsätzlich gegen nicht funktionelle Proteine, während b) bei *regulatorischen* Prozessen normal funktionierende Proteine hydrolysiert werden (Maurizi, 1992).

Kategorie a) umfaßt praktisch alle grundlegenden proteolytischen Prozesse einer Zelle:

- Mobilisierung von Speicherproteinen z. B. bei der Samenkeimung (Callis, 1995);
- Gewinnung von Aminosäuren, z. B. für die Synthese von Speicherproteinen, durch den Abbau vegetativer Proteine, bei annualen Pflanzen beispielsweise eine Begleiterscheinung bei der Blattseneszenz, zur Kompensation von Nährstoffmangel; allgemein bei der Umverteilung von organisch gebundenem Stickstoff in der Zelle (Maurizi, 1992; Callis, 1995); in Stresssituationen fallen diese Prozesse zum Teil auch in die Kategorie b) (Dannehl *et al.* 1995);
- selektive Degradation abnormer Proteine; dazu gehören: Proteine, die aufgrund von fehlerhafter Genexpression oder Mutationen unvollständig sind oder eine falsche Sequenz aufweisen, aus verschiedenen Gründen falsch gefaltete Proteine (Gottesman und Maurizi, 1992; Vierstra, 1993), falsch oder überhaupt nicht assemblierte Proteine oder Proteinuntereinheiten inklusive derer, die aufgrund fehlender Kofaktoren, prosthetischer Gruppen oder Pigmente inaktiv sind (Adam, 1996; Lindahl *et al.*, 1996), durch Streßeinwirkung, Krankheit oder einfach Abnutzung denaturierte Proteine (Callis, 1995; Vierstra, 1993), im falschen Kompartiment oder Subkompartiment lokalisierte Proteine (Gottesman und Maurizi, 1992; Adam, 1996) und Fremdproteine; zusammenfassend: Proteine, die gegenüber ihrem nativen Zustand eine Veränderung der zum umgebenden löslichen Medium hin exponierten Oberfläche aufweisen und zur Verhinderung nachteiliger Effekte entfernt werden müssen (Gottesman und Maurizi, 1992);
- Prozessierung von Vorläuferproteinen, also im Gegensatz zur Degradation spezifische, meist auf eine bestimmte Schnittstelle limitierte Proteolyse, insbesondere nach oder während Transportvorgängen, wodurch erst das eigentliche aktive Protein entsteht (Musgrove, 1989; Bassham, 1994; Adam, 2000);

Kategorie b) umfaßt hingegen sehr wichtige spezialisierte Funktionen der Proteolyse:

- Abbau von noch funktionellen Proteinen zur Kompensation und Adaptation bei akutem Nährstoffmangel (Dannehl *et al.*, 1995);
- schnelle Degradation *konstitutiv* instabiler Proteine, beispielsweise regulatorischer Signalproteine, die kurzfristig starke Effekte auslösen und dann schnell wieder inaktiviert wer-

den müssen (Gottesman und Maurizi, 1992; Callis, 1995). Proteolyse stellt das wichtigste Mittel zur Kontrolle solcher Effektoren dar (Maurizi, 1992).

- Zusätzlich spielt auch Degradation *konditionell* instabiler Proteine eine wichtige Rolle, oft in Verbindung mit adaptativen Vorgängen (Maurizi, 1992).

Zu jedem der genannten Punkte gibt es dokumentierte Beispiele in Pflanzenzellen. Einige der Vorgänge sind dabei aufgrund der speziellen Organisation pflanzlicher Zellen und ihrer Stoffwechsellleistungen, namentlich der Photosynthese, für die Forschung von besonderem Interesse:

Prozessierung von Vorläuferproteinen: Wie bereits erwähnt, sind Chloroplasten und Mitochondrien Zellorganellen prokaryotischen Ursprungs, deren genetische Information, obwohl ein Teil davon auf dem nach prokaryotischem Muster ringförmigen Organellengenom erhalten blieb, im Laufe der Evolution zum großen Teil in den Zellkern transferiert wurde. Ob es sich bei den auf dem Plastom bzw. Chondriom verbliebenen Genen quasi um ein Minimalgenom handelt, das für den Fortbestand der Organellen unbedingt an Ort und Stelle verfügbar bleiben muß, oder ob dieser Zustand nur eine Zwischenstufe bei der noch nicht abgeschlossenen vollständigen Verlagerung der ursprünglichen prokaryotischen Erbinformation in den Zellkern handelt, ist ein stark diskutiertes Problem biologischer Forschung im allgemeinen (Herrmann, 1997; Race *et al.*, 1999; Herrmann und Westhoff, 2001). In der pflanzenphysiologischen Forschung erhofft man sich Aufschlüsse unter anderem durch die Untersuchung von Transportvorgängen am Chloroplasten. Da ein Großteil der im Chloroplasten notwendigen Proteine im Zellkern kodiert und somit von der cytoplasmatischen Synthesemaschinerie exprimiert wird, bedeutet das natürlich einen um ein Erhebliches gestiegenen Aufwand bei Kontrolle und Koordination der Genexpression einerseits, und eine Vielzahl an Proteinen, die aufwendig in den Chloroplasten importiert werden müssen, andererseits. Proteine, deren Bestimmung letztendlich das Thylakoidlumen ist, müssen sogar durch drei verschiedene Membranen transportiert werden. Aus Erkenntnissen über die Funktion der verschiedenen Transportmechanismen und die Art und Weise wie die Zelle den durch sie verursachten energetischen Mehraufwand zu minimieren versucht, erhofft man sich Aufschlüsse über die Vorteile, die für die Zelle trotz dieses Mehraufwands durch die Umverteilung der genetischen Information entstehen.

Proteine, die in den Chloroplasten importiert werden, werden im allgemeinen als Vorläufer exprimiert, die N-terminal vor der funktionellen Sequenz eine zusätzliche Folge von Aminosäuren tragen, das sogenannte Signal- oder Transitpeptid. Diese Abschnitte, die ebenfalls

vom jeweiligen Gen kodiert werden, können zwischen verschiedenen Proteinen in ihrer Länge stark variieren; auch bezüglich ihrer Aminosäuresequenz wurden kaum gemeinsame Eigenschaften gefunden, die verallgemeinernd zu der Formulierung eines „Konsensus-Transitpeptids“ hätten führen können. Dennoch werden alle diese verschiedenen Signalpeptide nach dem Import im Stroma des Chloroplasten von einer einzigen, generellen prozessierenden Protease, genannt SPP (für „stromal processing protease“), durch einen spezifischen endoproteolytischen Schnitt vom Vorläuferprotein abgespalten (Robinson und Ellis, 1984; Oblong und Lamppa, 1992; Richter und Lamppa, 1998). Diese Protease stellt folglich eine Schlüsselkomponente der gesamten Importmaschinerie des Chloroplasten dar. Da die reinen Aminosäuresequenzen kaum oder keine Ähnlichkeiten aufweisen, wird die Spezifität der Prozessierung vermutlich durch die Erkennung einer speziellen Konformation des Transitpeptids vermittelt. Zudem wurde nachgewiesen, daß die Erkennungsstelle, zumindest bei experimentell eingesetzten Vorläuferproteinen, nicht im Bereich der Schnittstelle liegen kann (Bassham *et al.*, 1994). Proteine, die in das Thylakoidlumen oder die Thylakoidmembran importiert werden, tragen generell ein zweiteiliges Transitpeptid (Hageman *et al.*, 1986; Kieselbach *et al.*, 1998). Davon wird im Stroma durch die SPP-Protease nur ein Teil abgespalten; der Rest wird als Signal für die Importmaschinerie der Thylakoidmembran benötigt und anschließend hier durch eine membranassoziierte Protease entfernt (Chaal *et al.*, 1998). Dieses Enzym scheint für den Import in die Thylakoide eine ähnlich wichtige Rolle zu spielen wie SPP für den Import in den Chloroplasten; bezüglich Arbeitsweise und Spezifität der Schnittstelle ließ es sich als Protease vom bakteriellen „Typ I Leader Peptidase“ charakterisieren. Auch die Sequenzanalyse des Gens für TPP („thylakoid processing peptidase“) zeigte starke Homologie zu dem aus *E. coli* bekannten Enzym, was die Annahme bestärkte, daß die Transportmaschinerie an der Thylakoidmembran zumindest teilweise, wenn nicht vollständig, bakteriellen Ursprungs ist (Barbrook *et al.*, 1996; Chaal *et al.*, 1998). Diese Schlußfolgerung ist sinnvoll, da stammesgeschichtlich die Thylakoidmembran mit der bakteriellen äußeren Membran und somit der Import von Proteinen in das Thylakoidlumen und der Export von Proteinen bei *E. coli* nicht nur funktionell, sondern auch in großen Teilen der aufbauenden Komponenten seiner Maschinerie identisch sind.

Ein weiteres wichtiges Beispiel für die proteolytische Prozessierung betrifft das D1-Protein aus dem Reaktionszentrum von Photosystem II. Diese für die Photosynthese höchst essentielle Untereinheit stellt das Protein mit der geringsten Lebensdauer und der höchsten Umsatzrate aller Proteine in der Thylakoidmembran dar. Trotzdem enthält das ursprünglich aus der Translation des auf dem Chloroplastengenom lokalisierten *psbA*-Gens resultierende Vorläu-

ferprotein neben einem Transitpeptid für den Import in die Thylakoidmembran zusätzlich ein zwischen 8 und 16 Aminosäuren langes C-terminales Anhängsel, welches erst abgespalten werden muß. Geschieht dies nicht, wird D1 zwar korrekt in das Reaktionszentrum von PSII eingebaut, eine Assemblierung des für die Photosynthese notwendigen wasserspaltenden Komplexes kann jedoch nicht erfolgen, da das C-terminale Anhängsel die Bindestelle für den Mangankomplex (Mn_4) blockiert (van Wijk *et al.*, 1997). Der nötige proteolytische Schnitt, der für die Zelle wahrscheinlich einen weiteren Mechanismus zur Regulation bei Synthese und Assemblierung von D1 darstellt, wird durch ein Homolog zu der bakteriellen Protease Tsp (für „tail-specific protease“), auch unter der Bezeichnung Prc bekannt, die lumenale Protease CtpA, durchgeführt (Shestakov *et al.*, 1994; Anbudurai *et al.*, 1994). Diese stellt damit eines der ersten charakterisierten Beispiele eines kernkodierten regulatorischen Enzyms im Chloroplasten dar (Oelmüller *et al.*, 1996; Karnauchov *et al.*, 1997a).

Degradation funktioneller, aber instabiler Proteine: Ein bekanntes Beispiel für die proteolytische Degradation eines funktionellen Proteins zum Zweck der Regulation außerhalb des Chloroplasten betrifft das Phytochromsystem der Pflanzenzelle. Phytochrom, ein für die lichtabhängige Initiierung vieler verschiedener metabolischer Prozesse in Pflanzen, beispielsweise bei Samenreifung, Plastidenentwicklung und Blütenbildung, verantwortlicher Photorezeptor, wird durch die Absorption eines Rotlichtimpulses von seiner inaktiven Form P_r in die aktive, P_{fr} , überführt. P_{fr} kann seinerseits durch dunkelrotes Licht wieder zu P_r revertieren, besitzt aber außerdem eine gegenüber P_r um das einhundertfache reduzierte Halbwertszeit (Gottesman und Maurizi, 1992). Dies veranschaulicht ein wichtiges Prinzip der Regulation von metabolischen Prozessen durch Proteolyse: die Modulierung von Signaltransduktion durch Degradation des initiierenden Rezeptors nach der Signalerkennung, was zu einer Desensibilisierung führt (Callis, 1995). Über spezifische Degradation kann die Zelle die Aktivität von Proteinen, die kurzfristig eine starke Reaktion bewirken sollen, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren oder Hitzeschockproteine, aber anschließend ebenso schnell wieder inaktiviert werden müssen, sehr präzise steuern (Callis, 1995; Hershko und Ciechanover, 1998). Eine große Rolle bei dieser proteolytischen Kontrolle kurzlebiger Proteine spielt im Cytoplasma das Ubiquitin-System der Zelle (Hershko und Ciechanover, 1998), das auch für die bevorzugte Degradation von P_{fr} zuständig ist (Gottesman und Maurizi, 1992; Vierstra, 1993). Auch im Chloroplasten, wo das Ubiquitin-System nicht vorhanden ist, existieren ähnliche Regulationsprozesse, deren proteolytische Maschinerien jedoch zum Großteil noch unerforscht sind. Ein prominentes Beispiel stellt die Degradation von ELIPs (engl. für „early light inducible protein“) dar, die von der Pflanze als Streßantwort auf erhöhte Lichtintensitäten

produziert werden und bei Rückkehr zu Normallicht schnell durch ein noch unbekanntes proteolytisches System wieder entfernt werden (Adamska *et al.*, 1993; Adamska *et al.*, 1996).

Degradation abnormer Proteine und Polypeptide: Unter diesem Überbegriff läßt sich das vermutlich größte und in vielerlei Hinsicht wichtigste Aufgabenfeld proteolytischer Prozesse abstecken. Eine grobe Übersicht über die Vielzahl potentieller Substrate wurde bereits gegeben; daher folgen zur Veranschaulichung nur einige Beispiele aus der Pflanzenzelle:

Eine wichtige Sorte von Peptiden, die unter die Bezeichnung „abnorm“ fallen, entsteht erst als unmittelbares Produkt spezifischer proteolytischer Aktivität, beispielsweise bei der bereits angesprochenen Prozessierung von Proteinen. Für diese Intermediate wurde bislang keine Aufgabe beschrieben; sollten sie tatsächlich ohne Funktion sein, stellen sie damit nach der Definition selbst abnorme Komponenten dar und die Zelle somit vor ein Entsorgungsproblem, da solche Produkte schnell Konzentrationen erreichen können, in denen sie durch die potentielle Beeinträchtigung einer Reihe von Protein-Protein-Interaktionen möglicherweise toxisch wirken (Vierstra, 1993). Im Falle abgespaltener Signalpeptide würde dies durch die Akkumulation einer großen Zahl von membranaktiven Peptiden bewirkt (van 't Hof, 1995); ihre fortgesetzte schnelle Entfernung stellt damit eine lebenswichtige Aufgabe in der Biogenese von Chloroplasten dar (Richter und Lamppa, 1999). Experimente haben mittlerweile bewiesen, daß im Falle der Prozessierung durch die stromale prozessierende Protease SPP das Transitpeptid nach der Abtrennung vom importierten Vorläuferprotein zunächst an SPP gebunden bleibt und von diesem noch einmal durch einen spezifischen endoproteolytischen Schnitt weiter prozessiert wird. Erst anschließend verlieren die so entstandenen Fragmente die Affinität zu SPP und diffundieren aus dem Komplex. Die weitere Degradation erfolgt offenbar selektiv durch ein bislang nicht näher charakterisiertes proteolytisches System, an dem wahrscheinlich mehrere Exo- und Endopeptidasen beteiligt sind (Richter und Lamppa, 1999). Die spezifische und endoproteolytische Ausführung des ersten Schnittes bei einer Degradationsreaktion, gefolgt von einem vollständigen Abbau der Produkte durch ein akzessorisches System oft, aber nicht unbedingt immer, unspezifischer Peptidasen, bis hin zu den einzelnen Aminosäuren, scheint eine generelle Strategie darzustellen (Callis, 1995). Gerade bei den unspezifischeren dieser akzessorischen Systeme könnten Überschneidungen auftreten, sozusagen Generalproteasen, die für die Degradation einer Vielzahl von Substraten zuständig sind. Chloroplasten besitzen, gerade in Zusammenhang mit der Photosynthesemaschinerie, eine Vielzahl von Komponenten, die sich komplex aus mehreren Untereinheiten zusammensetzen, von denen oft nur noch einige wenige im Chloroplasten selbst, der Rest im Cytoplasma synthetisiert und dann importiert werden. Gerade in Chloroplasten ist daher eine effiziente Entfernung

von falsch lokalisierten und falsch oder nicht assemblierten Exemplaren solcher Untereinheiten essentiell. Aktuell erforschte Beispiele sind der Abbau von aufgrund suboptimaler Koordination zwischen Kern- und Plastidengenom überschüssigen Exemplaren der Untereinheiten der Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase (Bushnell *et al.*, 1993; Otto und Feierabend, 1994), die Degradation von freien Untereinheiten des Cytochrom *b₆-f*-Komplexes, die anders als der Abbau des voll assemblierten Komplexes offenbar nicht durch das Clp-System durchgeführt wird (Majeran *et al.*, 2000), die Degradation von Plastocyanin bei Fehlen von Cu^{2+} als stabilisierender prosthetischer Gruppe (Li und Merchant, 1995), sowie des unvollständig assemblierten ATP-Synthasekomplexes bei Fehlen einer Untereinheit, bedingt beispielsweise durch Mutation (Majeran *et al.*, 2001).

Lichtstreß als Auslöser adaptativer proteolytischer Prozesse

Ein Hauptziel pflanzenphysiologischer Forschung ist die Aufklärung funktioneller und struktureller Grundlagen der Energietransduktionsprozesse in den photosynthetischen Komplexen der Thylakoidmembran. Nach großen Fortschritten ist die Wissenschaft mittlerweile in der Lage, ein genaues, hochauflösendes Bild dieser Komplexe zu zeichnen. Im Gegensatz dazu ist über die vielfältigen Vorgänge, die zur Aufrechterhaltung dieser Systeme beitragen, die Regulations-, Akklimatisierungs- und Schutzmechanismen, vergleichsweise wenig bekannt, trotz der bereits früh gefundenen Nachweise für ihre Notwendigkeit und Existenz. Dabei genügt alleine die Tatsache, daß die Thylakoidmembran grob geschätzt mindestens doppelt so viele Proteine wie die Zahl der mit den photosynthetischen Komplexen assoziierten enthält (Andersson *et al.*, 1996), um eine Vorstellung von der Vielzahl der sogenannten akzessorischen Komponenten zu erhalten. Von größtem Interesse und deshalb noch am intensivsten erforscht sind die Prozesse, die zur Akklimatisierung des Photosynthesesystems an Veränderungen des Lichtangebots dienen. Dazu gehören vor allem Veränderungen in der Lichtintensität, aber auch der Lichtqualität (Anderson, 1986). Die Adaptationsmechanismen umfassen Kinase-/Phosphatasesysteme für reversible Phosphorylierungen, Desaturasen zur Kontrolle der Lipidzusammensetzung und Dynamik der Thylakoidmembran, streßinduzierte Proteine wie ELIPs (Adamska und Kloppstech, 1991) und verschiedene Formen regulierender Proteolyse (Yang *et al.*, 1998). Allgemein lassen sich Kurzzeit- und Langzeit-Adaptationsmechanismen unterscheiden (Anderson, 1986).

In der Thylakoidmembran als Ort der photosynthetischen Elektronentransportkette entstehen durch das Licht angetrieben ständig extrem hohe Redoxpotentiale, deren Energie in für den Chloroplasten nutzbare Redoxäquivalente umgesetzt wird. Bereits bei normal starker Be-

leuchtung kann im Falle von Photosystem II die Spannung innerhalb der Membran dabei 1 Volt übersteigen (Barber und Andersson, 1992). Dies sind Dimensionen, die für das Organell und somit auch die Zelle selbst bei optimaler Funktion aller beteiligter Komponenten extrem gefährlich sind (Race *et al.*, 1999). Gleichzeitig bewirken sie einen hohen Verschleiß eben dieser Komponenten. Das bekannteste und am längsten erforschte Beispiel für ein Protein von PSII, das aufgrund des Elektronentransports ständig geschädigt wird und gegen ein neusynthetisiertes Exemplar ausgetauscht werden muß, ist das D1-Protein des Reaktionszentrums von PSII (Mattoo *et al.*, 1984). D1, das 32 kDa große Produkt des *psbA*-Gens, bildet zusammen mit D2 den Kern des Reaktionszentrums von PSII. Es ist mittels fünf hydrophober Domänen in die Thylakoidmembran integriert und mit den Komponenten assoziiert, über die bei der Wasserspaltung entstehende Elektronen lichtabhängig von der Lumen- zur Stromaseite der Membran transportiert werden. D1 ist daher besonders anfällig für Schädigungen aufgrund des herrschenden hohen Redoxpotentials. Da solche Schädigungen bereits unter normalen Lichtintensitäten auftreten, existiert ein hocheffizientes Reparatursystem für das Reaktionszentrum von PSII. Das geschädigte D1-Protein wird dabei phosphoryliert, verbleibt jedoch zunächst funktionell assembliert. Der gesamte Komplex des Reaktionszentrums migriert nach Dissoziation der Antenne lateral aus der Membran der Granastapel in die stromaexponierten Thylakoidbereiche. D1 wird hier dephosphoryliert und anschließend prozessiert. Die Phosphorylierung hat dabei wahrscheinlich die Funktion, eine Degradation des Proteins zu verhindern, bis der Komplex die Stromathylakoide erreicht hat (Dannehl *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996). Erst wenn der Reparaturmechanismus überlastet wird, d. h., wenn die Geschwindigkeit, mit der photooxidativ geschädigtes D1 anfällt, die Neusyntheserate des Proteins übersteigt, kommt es zu funktioneller Beeinträchtigung von PSII, zur Photoinhibition (Anderson, 1986), auch aufgrund einer allgemeinen Destabilisierung des gesamten PSII-Komplexes infolge der Entfernung von D1, was den Abbau weiterer Komponenten zur Folge hat (Hagman *et al.*, 1997). Die im Chloroplasten anfallenden reaktiven Sauerstoffmoleküle könnten, durch Veränderungen in den Eigenschaften der Thylakoidmembran ebenfalls zu einer allgemeinen Stimulation der proteolytischen Aktivität führen (Casano *et al.*, 1990). Der genaue Ablauf der Degradation von D1 war lange Zeit strittig; zunächst wurde mit einiger Sicherheit festgestellt, daß der die Degradation einleitende erste Schnitt in der Schleife zwischen den Transmembranhelices IV und V des Proteins stattfindet, mit dem Ergebnis eines ca. 23 kDa großen N-terminalen und eines ca. 9 – 10 kDa großen C-terminalen Degradationsprodukts (Shipton und Barber, 1991; Lindahl *et al.*, 2000). Die funktionelle Ursache dieser Prozessierung wurde besonders kontrovers diskutiert - während bereits Anderson (1986)

eine dafür verantwortliche, hochspezifische intrinsische Membranprotease postulierte, gab es Untersuchungen, die offenbar eine durch reaktiven Sauerstoff initiierte chemische (Miyao, 1994) oder autoproteolytische Reaktion (Misra *et al.*, 1991; Shipton und Barber, 1991) nachweisen konnten. Andere Untersuchungen wiederum schienen die Existenz einer proteolytischen Aktivität innerhalb einer weiteren Untereinheit von PSII, CP43, und ihre Zuständigkeit für die Prozessierung von D1 zu belegen (Salter *et al.*, 1992). Während weitere Untersuchungen die Existenz eines distinkten proteolytischen Abbauwegs für D1 bald relativ sicher nachweisen konnten (Aro *et al.*, 1993; Bracht und Trebst, 1994) und später auch die Abhängigkeit des ersten proteolytischen Schnittes von der Hydrolyse von GTP entdeckt wurde (Spetea *et al.*, 1999; Spetea *et al.*, 2000), blieb die Identität der beteiligten Protease oder Proteasen jedoch zunächst weiterhin im Unklaren. Erst nachdem die 1996 (Lindahl *et al.*) erstmals charakterisierte integral in der Membran von Stromathylakoiden lokalisierte Protease FtsH, ein Homolog zu der gleichnamigen Protease von *E. coli*, als diejenige identifiziert wurde, die nach der Erstprozessierung von D1 das noch im Reaktionszentrum assemblierte 23 kDa Abbauprodukt Zink- und ATP-abhängig weiter degradiert (Lindahl *et al.*, 2000), wurde vermutlich auch das Schlüsselenzym ermittelt, das diesen GTP-abhängigen ersten Schnitt vollführt (Haußühl *et al.*, 2001). Es handelt sich hierbei wohl um ein an der stromalen Seite mit der Oberfläche der Thylakoidmembran assoziiertes Homolog zu der lumenalen Protease DegP (Itzhaki *et al.*, 1998), designiert als DegP2.

Die durch zu hohe Lichtintensitäten photooxidativ hervorgerufenen Schädigungen am D1 sind nicht alle Ursachen, die einen schnellen Abbau und Austausch dieses zentralen Proteins der Photosynthese notwendig machen. Erhöhte Temperaturen führten im Experiment zu ähnlichen Schädigungen wie unter Lichtstreß. Der Degradationsmechanismus für hitzegeschädigtes D1 scheint jedoch dem zuvor beschriebenen lichtstreßinduzierten Vorgang zu entsprechen (Singh und Singhal, 1999). Auch Licht im UV-Bereich, insbesondere UV-B, kann, obwohl photosynthetisch nicht nutzbar, absorbiert werden und zu Schädigungen führen; spezifisches Ziel ist auch hier D1 (Barbato *et al.*, 1995). Im Zuge des momentanen Schwundes der Ozonschicht der Erdatmosphäre ist es daher vorstellbar, daß die Belastung mit UV-B für die Pflanzenwelt in näherer Zukunft problematische Ausmaße annimmt. Forschungen, die sich speziell mit der UV-induzierten Degradation von D1 befassen, wurden neben höheren Pflanzen vor allem auch an Cyanobakterien, besonders *Synechocystis* sp. PCC 6803, durchgeführt. Diese Prokaryoten können in vielerlei Hinsicht als Modellorganismen für die Organisation von Chloroplasten vor der endosymbiontischen Aufnahme in eukaryotische Zellen und der damit verbundenen Reduktion der genetischen Information, betrachtet werden. Im Falle von Chlo-

roplasten höherer Pflanzen wurde festgestellt, daß die durch UV-B induzierte Degradation von D1 offenbar durch eine andere proteolytische Maschinerie durchgeführt wird, als diejenige, die bei photooxidativer Schädigung des Proteins durch sichtbares Licht in Gang gesetzt wird: im Falle von UV-B-induzierter Schädigung findet der erste proteolytische Schnitt offenbar im Transmembransegment II des Proteins statt, mit dem Resultat eines 13 kDa großen N-terminalen und eines 20 kDa großen C-terminalen Fragments (Barbato *et al.*, 1995). Der Unterschied zum „normalen“, lichtinduzierten Abbauweg läßt sich bereits bei Cyanobakterien feststellen (Giacometti *et al.*, 1996); diese besitzen im Unterschied zu höheren Pflanzen aber zudem noch einen besonders effektiven Schutzmechanismus, der im Besitz mehrerer, je nach Art auch verschiedener, *psbA*-Gene besteht, welche in unterschiedlichem Maß durch UV-B induzierbar sind (Máté *et al.*, 1998). Anders als nach Untersuchungen an *Synechococcus* (wo sich die *psbA*-Gene voneinander unterscheiden) ursprünglich vermutet (Campbell *et al.*, 1998), besteht der Vorteil für die Organismen dabei nicht in einer leicht veränderten und damit UV-B-resistenten Variante von D1, sondern einfach in der durch UV-B induzierten Erhöhung der Neusyntheserate und damit des schnell für den Austausch verfügbaren D1-Proteins, da zumindest bei *Synechocystis* die beiden vorhandenen *psbA*-Gene abgesehen von der Expressionsrate identisch sind (Vass *et al.*, 2000). Dieses spezielle Genarrangement scheint bei Cyanobakterien über 1 - 2 Mrd. Jahre konserviert geblieben zu sein (Máté *et al.*, 1998) – ursprünglich entstanden in der Frühzeit der Evolution, als die UV-Belastung auf der Erdoberfläche noch wesentlich höher war. Dennoch nahm die Strahlungsrate bis heute offenbar nie stark genug ab, daß der Verlust dieser Fähigkeit für die Cyanobakterien ohne negative Folgen geblieben wäre (Máté *et al.*, 1998). Chloroplasten höherer Pflanzen besitzen nur noch ein *psbA*-Gen und müssen demnach andere Strategien zum Schutz vor Schädigung von PSII durch UV-B einsetzen. Offenbar bestehen diese jedoch nicht in einem effizienteren Degradations- und Reparatursystem – die bislang gefundenen Resultate deuten an, daß die Degradation wie bei *Synechocystis* abläuft (Giacometti *et al.*, 1996). Einzelne Proteasen aus der speziell bei der Degradation UV-B-geschädigten D1-Proteins zum Einsatz kommenden Maschinerie konnten bislang weder bei Cyanobakterien noch in Chloroplasten höherer Pflanzen identifiziert werden. Interessanterweise scheinen auch hier die bereits erwähnten ELIPs eine Rolle zu spielen (Adamska *et al.*, 1992b).

Eine mindestens ebenso wichtige Rolle wie die Beseitigung und Reparatur durch zu hohe Lichtabsorption photooxidativ geschädigter Reaktionszentren spielt für die Pflanzenzelle die Adaptation an erhöhte Lichtintensitäten, um das Ausmaß photooxidativer Schädigung von vornherein so gering wie möglich zu halten. Auch hierzu existieren im Chloroplasten ver-

schiedene Strategien, die sich in Kurzzeit- und Langzeitadaptation unterteilen lassen. Hauptangriffspunkt aller dieser Strategien ist die Lichtsammelantenne von PSII, LHCII. Dieser Proteinkomplex mit der Aufgabe, die Energie absorbiertes Lichtquanten zum Reaktionszentrum von PSII weiterzuleiten, stellt mit etwa 33% des Gesamtproteingehalts die häufigste Komponente in der Thylakoidmembran dar; er enthält zwischen 50 - 60% aller gebundener Chlorophyllmoleküle in der Zelle (Anastassiou und Argyroudi-Akoyunoglou, 1995; Lindahl *et al.*, 1995).

Zum Zweck der Kurzzeitadaptation findet die Phosphorylierung von LHCII durch eine spezielle Redoxkinase statt, anschließend dissoziiert der Komplex vom Reaktionszentrum, das damit temporär vom Energiefluß abgekoppelt wird. Für eine langfristige Adaptation ist dieser Mechanismus jedoch nicht geeignet; hierzu muß eine dauerhafte Reduktion der Antennengröße stattfinden. Bereits früh wurde erkannt, daß im Chloroplasten zu diesem Zweck ein spezifisches proteolytisches System existieren muß (Liu und Jagendorf, 1984; Anderson, 1986). Weiterführende Studien konnten den Prozeß sehr detailliert charakterisieren: wie bei der Kurzzeitadaptation wird LHCII zunächst phosphoryliert, daraufhin dissoziiert die vollständig von der 25 kDa-Untereinheit gebildete Peripherie der Antenne, die sogenannte „mobile Subpopulation“, vom Reaktionszentrum. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang, daß sich der Einfluß des Lichtes auf den Phosphorylierungszustand von LHCII neueren Erkenntnissen zufolge nicht nur auf die Aktivierung der zuständigen Proteinkinase über eine Signaltransduktionskette von Redoxreaktionen beschränkt – vielmehr führt die Lichteinstrahlung zu einer Konformationsänderung im Substrat selbst, die dessen N-Terminus erst für die Phosphorylierung zugänglich macht (Zer *et al.*, 1999). Ähnlich wie im Falle von D1 wandert der in funktioneller Assemblierung größtenteils in den Granabereichen lokalisierte Komplex anschließend in die Stromathylakoide, wo die LHC-Untereinheiten spezifisch durch eine peripher mit der Stromaseite der Thylakoidmembran assoziierten Protease vom Serin- oder Cysteintyp strikt ATP-abhängig degradiert werden, wobei die Degradation nach ihrer lichtabhängigen Induktion auch im Dunkeln vonstatten gehen kann. Zusätzlich zu der Induktion auf Substratebene findet jedoch auch eine Induktion auf der Ebene der Protease(n) statt, die eine vergleichsweise lange Latenzphase von 24 - 48 h besitzt (Lindahl *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996). Diese Verzögerung der Induktion auf Enzymebene ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die verantwortliche Protease erst lichtabhängig exprimiert oder posttranslational aktiviert werden muß (Yang *et al.*, 1998). Die Regulation auf Substratebene basiert wohl wie bei D1 darauf, daß die LHC-Untereinheiten einerseits erst phosphoryliert werden müssen, um in die Bereiche der Thylakoidmembran migrieren zu können, in denen die Protease lokalisiert

ist, andererseits ihre Degradation im phosphorylierten Zustand nicht möglich ist (Yang *et al.*, 1998).

Die bei der LHC-Degradation freiwerdenden Chlorophyllmoleküle, welche in größeren Mengen toxische Effekte auf die Zelle haben könnten, werden nachweislich durch die sogenannten ELIPs gebunden und damit höchstwahrscheinlich unschädlich gemacht (Adamska *et al.*, 1992a; Adamska *et al.*, 1999). Diese zur Klasse der Chlorophyll *a/b*-bindenden Proteine gehörenden Polypeptide bilden selbst einen interessanten Adaptationsmechanismus des Chloroplasten für Lichtstreß: sie werden selektiv bei hohen Lichtintensitäten vermehrt gebildet und sind unter diesen Bedingungen auch stabil (Adamska *et al.*, 1992a; Heddad und Adamska, 2000). Nach Rückgang der Lichteinstrahlung auf normales Niveau werden sie spezifisch durch eine offenbar erst unter diesen Lichtbedingungen aktivierte Protease wieder abgebaut (Adamska *et al.*, 1993; Adamska *et al.*, 1996). Diese Protease zeigt abgesehen vom „umgekehrten“ Aktivitätsprofil in Abhängigkeit von der Lichtintensität sehr ähnliche Eigenschaften wie die für den Abbau von LHCII zur Reduktion der Antenne zuständige, arbeitet jedoch unabhängig von ATP, weshalb es sich vermutlich um zwei verschiedene Enzyme handelt (Yang *et al.*, 1998). Neue Studien haben gezeigt, daß die Untereinheiten von LHCII sowohl als Apo- als auch als Holoprotein von der lichtstreßinduzierten Protease degradiert werden, letztere jedoch nur als Monomere, nicht als voll assemblierte Trimere (Yang *et al.*, 2000). Dies wird als deutlicher Hinweis darauf gewertet, daß der N-Terminus des Proteins, welcher zur Trimerisierung nötig und nach derselben nicht mehr angreifbar ist, in den Prozeß der Substraterkennung durch die Protease involviert ist. Eventuell lassen sich daraus neue Rückschlüsse auf die Art der Protease ziehen, da für Substrate, die nach der sogenannten „N-end“-Regel erkannt werden, ganz bestimmte, gut charakterisierte proteolytische Systeme zuständig sind (Gottesman und Maurizi, 1992). Da das Ubiquitin-System, welches im Cytoplasma eukaryotischer Zellen im Normalfall für die Degradation von Proteinen, die der „N-end“-Regel gehorchende Abbausignale besitzen, zuständig ist, in Chloroplasten nicht existiert, wäre das Clp-System, das in Prokaryoten und vermutlich auch in Plastiden eine ähnliche Aufgabe erfüllt (Gottesman und Maurizi, 1992; Yang *et al.*, 2000), der nächste Kandidat. Dies ist jedoch aufgrund der aufgeführten Eigenschaften der LHC-Protease, die sich deutlich von denen des Clp-Systems unterscheiden, ebenfalls unwahrscheinlich (Yang *et al.*, 2000). Eine weitere spezifische lichtabhängige proteolytische Aktivität gegen LHCII, die offenbar dessen Akkumulierung bei der Ergrünung von Pflanzen abhängig vom Entwicklungszustand der Zellen (gemessen am Chlorophyllgehalt) und unter Kontrolle durch das Phytochromsystem quantitativ reguliert (Anastassiou und Argyroudi-Akoyunoglou, 1995; Tziveleka und Argyroudi-Akoyunoglou, 1998),

und die auch gewisse funktionelle Ähnlichkeiten zu der lichtstreßinduzierten LHC-Protease aufweist, dürfte vermutlich ebenfalls nicht mit dieser identisch sein. Eine eindeutige Identifizierung dieses wichtigen Schlüsselenzyms steht daher weiterhin aus.

Charakterisierte Komponenten des plastidären proteolytischen Systems

Dem Spektrum an bekannten und zum Teil bis ins Detail sehr genau charakterisierten proteolytischen Prozessen, bei denen jedoch der letzte entscheidende Schritt, die Identifizierung der verantwortlichen Protease, noch nicht gelungen ist, steht eine stetig wachsende Liste an bislang sicher charakterisierten proteolytischen Enzymen des Chloroplasten gegenüber; meist jedoch liegen bei diesen wiederum die Prozesse, an denen sie partizipieren, noch größtenteils, wenn nicht vollständig, im Dunkeln.

Die drei wichtigsten prozessierenden Proteasen des Chloroplasten, SPP (oder auch CPE, für „chloroplast processing enzyme“) im Stroma, TPP an der lumenalen Peripherie der Thylakoidmembran und die lösliche C-terminale Peptidase CtpA im Lumen, wurden bereits an anderer Stelle ausführlich erwähnt. Unter den bislang charakterisierten plastidären Endopeptidasen nehmen besonders drei, das Clp-System, FtsH und DegP, eine ihrer Bedeutung wegen herausragende Stellung ein.

Clp: Die Protease Clp, ein Homolog zu der gleichnamigen Protease in *E. coli*, ist in Chloroplasten löslich im Stroma lokalisiert und besteht wie ihr bakterielles Pendant aus zwei Untereinheiten: einer proteolytischen (ClpP) und einer ATP hydrolysierenden (ClpC bzw. ClpX). Für jede dieser Untereinheiten existieren in der Pflanzenzelle mehrere alternative Gene, wobei *clpP1* besonders erwähnenswert scheint, da es im Gegensatz zu allen anderen bislang gefundenen *clp*-Genen nicht im Zellkern sondern immer noch auf dem Plastidengenom lokalisiert ist (Sokolenko *et al.*, 1998; Adam *et al.*, 2001). ClpP gehört zur Familie der Serinproteasen und besitzt die für diese typische katalytische Triade. Die Expression von *clpP1* in Pflanzenzellen erfolgt unabhängig vom Licht und vom Entwicklungszustand der Plastiden, jedoch abhängig vom Gewebetyp; so findet sich das Produkt nicht in Wurzelzellen, wohl aber in Blattzellen etiolierter wie grüner Blätter (Ostersetzer und Adam, 1996; Ostersetzer *et al.*, 1996). Zur Ausübung der proteolytischen Funktion ist die Assoziation mit einer ATPase-Untereinheit, meistens ClpC, notwendig, wobei die Hydrolyse von ATP, wie bei allen nukleotidabhängigen Proteasen, nicht der Bereitstellung von Energie für die proteolytische Reaktion dient (Gottesman und Maurizi, 1992). Im Falle von Clp übt die ATPase-Untereinheit vermutlich ATP-abhängig eine chaperonartige Funktion aus, die gleichzeitig für die Substraterkennung wie für die Überführung des Substrats in eine für die proteolytische Untereinheit

zugängliche Konformation sorgt, ein Funktionsprinzip, das für viele ATP-abhängige Proteasen angenommen wird (Wang und Tsou, 1998). Über die Aufgaben von Clp im Chloroplasten ist noch relativ wenig bekannt; seine Regulierung durch viele verschiedene Faktoren sowie die Variabilität durch die alternativen Untereinheiten lassen eine eventuelle Funktion als generelle stromale Protease vermuten (Lindahl *et al.*, 1996). Die Funktion von Clp in *E. coli* als proteolytischer Komplex, der einem Proteasom sowohl in dreidimensionaler Struktur als auch Aufgabenbereich und Mechanismus der Substraterkennung („N-end“-Regel) ähnelt (Gottesman und Maurizi, 1992; Vierstra, 1993), unterstützt diese Vermutung. Auch der experimentelle Befund, daß Clp am Proteinabbau in Chloroplasten während der Blattseneszenz partizipiert (Nakabayashi *et al.*, 1999) weist in diese Richtung. Als distinkter proteolytischer Prozeß des Chloroplasten, an dem eine Beteiligung von Clp nachgewiesen werden konnte, ist die Degradation des Cytochrom *b₆f*-Komplexes der photosynthetischen Membran zu nennen, dessen Stabilität mit der Menge verfügbaren Clp's im Chloroplasten korreliert (Majeran *et al.*, 2000; Yamamoto, 2001), sowie der Abbau unvollständig assemblierter ATP-Synthasekomplexe (Majeran *et al.*, 2001). Außerdem scheint eine Beteiligung von Clp an der Beseitigung von aufgrund von Fehlern im Transportsystem falsch lokalisierter Proteine im Chloroplasten festzustehen (Adam, 2000).

FtsH: Auch die Protease FtsH, die in pflanzlichen Zellen in neun Isoenzymen vorhanden ist, von denen mindestens zwei, wahrscheinlich aber bis zu sechs im Chloroplasten lokalisiert sind (Adam *et al.*, 2001), gehört wie Clp zu einer weitverbreiteten Proteinfamilie prokaryotischen Ursprungs. Die plastidäre FtsH ist wie das Homolog in *E. coli* eine ATP-abhängige, membrangebundene Zink-Metalloprotease; im Chloroplasten ist sie an die Thylakoidmembran gebunden, wobei der hydrophile Abschnitt zum Stroma hin exponiert ist (Lindahl *et al.*, 1996; Lindahl *et al.*, 2000). Wie Clp besitzt auch FtsH proteolytische und ATPase-Aktivität, wobei die beiden Domänen hier zwar ebenfalls räumlich getrennt sind, jedoch auf dem gleichen Molekül liegen. Auch bei dem pflanzlichen Enzym übt die ATP-hydrolysierende Domäne vermutlich eine chaperonähnliche Funktion aus, mit dem Zweck, das Substrat in eine für die proteolytische Domäne prozessierbare Konformation zu überführen (Wang und Tsou, 1998). FtsH spielt in *E. coli* eine bedeutende Rolle: es ist dort die einzige essentielle ATP-abhängige Protease (Adam *et al.*, 2001). Neben einer Beteiligung an der Hitzeschockreaktion des Bakteriums ist das Enzym auch für die Degradation nicht assemblierter Proteine zuständig (Kihara *et al.*, 1995); in Hefezellen zudem für den Abbau unvollständiger Proteine und Polypeptide (Lindahl *et al.*, 1996). Auch im Chloroplasten kommt ihm daher wahrscheinlich eine große Bedeutung als generelle Protease zu; zudem sind aber bereits auch einige wichtige, un-

ter Beteiligung von FtsH ablaufende, spezifische Prozesse charakterisiert worden: Zum einen ist FtsH wahrscheinlich zuständig für die selektive Entfernung membranassoziierter und löslicher Formen von überflüssigem, nicht funktionell assembliertem oder oxidativ geschädigtem Rieske FeS Protein (Ostersetzer und Adam, 1997; Lindahl *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001); zum anderen vollführt es definitiv die ATP-abhängige weiterführende Degradation des N-terminalen 23 kDa großen Fragments von D1, das im Zuge des lichtabhängigen Abbaus dieser Schlüsselkomponente von Photosystem II nach der GTP-abhängigen Erstprozessierung entsteht (Lindahl *et al.*, 2000). In *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde darüber hinaus im Zuge von Mutagenesestudien entdeckt, daß eines der vier FtsH-Homologe des Cyanobakteriums offenbar eine essentielle Rolle bei der funktionellen Assemblierung von Photosystem I spielt (Mann *et al.*, 2000); hieraus läßt sich eine weitere hypothetische Rolle für das Enzym oder eines seiner Homologe im Chloroplasten höherer Pflanzen ableiten.

DegP: Diese Protease ist ein Mitglied der ubiquitären HtrA-Familie, deren besterforschtes Beispiel HtrA, auch DegP genannt, in *E. coli* ein für das Überleben der Bakterien bei Hitzeschockbedingungen und oxidativem Streß essentielles Enzym ist (Lipinska *et al.*, 1988; Lipinska *et al.*, 1989; Strauch *et al.*, 1989; Lipinska *et al.*, 1990; Pallen und Wren, 1997; Skórko-Glonek *et al.*, 1999). Das als erstes charakterisierte pflanzliche Homolog DegP1 ist im Chloroplasten peripher an die Thylakoidmembran gebunden und zur lumenalen Seite hin exponiert (Itzhaki *et al.*, 1998). Mittlerweile wurden jedoch die Gene für nicht weniger als dreizehn weitere verschiedene Homologe im *Arabidopsis*-Genom identifiziert, deren Produkte (designiert als DegP2 – DegP14) ihren Bestimmungsort nach Analyse der hypothetischen Proteinsequenz – neben drei weiteren plastidären Lokalisationen – in Mitochondrien, im Cytoplasma und sogar im endoplasmatischen Reticulum bzw. im Zellkern haben (Adam *et al.*, 2001 und pers. Mitteilung von Dr. A. Sokolenko). Alle Mitglieder der HtrA-Familie sind Serinproteasen vom Trypsintyp mit einer charakteristischen katalytischen Triade aus Histidin, Asparaginsäure und Serin. Die meisten Vertreter, inklusive der drei in *E. coli* charakterisierten HtrA (bzw. DegP), HhoA (bzw. DegQ) und HhoB (bzw. DegS) sowie der Mehrzahl der Homologe in *Arabidopsis*, inklusive der beiden wichtigsten, DegP1 und DegP2, zeichnen sich durch den Besitz von sogenannten PDZ-Domänen aus – HtrA und HhoA von *E. coli* besitzen sogar deren zwei (Ponting, 1997; Pallen und Wren, 1997). PDZ-Domänen sind in vielen Enzymen gefunden worden; sie sind offenbar für die Vermittlung einer Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen notwendig (Ponting *et al.*, 1997). Im Falle von HtrA von *E. coli* wird angenommen, daß eine der beiden PDZ-Domänen des Enzyms für die funktionelle Assemblierung von sechs HtrA-Molekülen zu einem Hexamer verantwortlich ist, während die

zweite eine essentielle Rolle bei der Substraterkennung spielen könnte (Sassoon *et al.*, 1999; Spiess *et al.*, 1999). Auch hier, wie bei FtsH, scheint ein Zusammenspiel einer proteolytischen mit einer chaperonartigen Domäne auf ein und demselben Molekül gegeben zu sein, wobei HtrA im Gegensatz zu FtsH und Clp von der Hydrolyse von ATP unabhängig ist (Pallen und Wren, 1997). Eine weitere interessante Eigenschaft des bakteriellen Enzyms ist dessen offene Fähigkeit, je nach Umgebungstemperatur zwischen beiden Funktionen umschalten zu können - bei niedrigen Temperaturen werden abnormale Proteine bevorzugt über die Chaperondomäne umgefaltet, bei höheren bevorzugt proteolytisch degradiert (Spiess *et al.*, 1999). Über die Funktion des pflanzlichen Homologs DegP1 im Chloroplasten ist noch relativ wenig bekannt; die Tatsache, daß das Enzym konstitutiv exprimiert wird, die Expressionsrate bei Hitzestress jedoch ansteigt, läßt vermuten, daß DegP1 auch im Chloroplasten eine Rolle innerhalb der Schutzmechanismen gegen erhöhte Umgebungstemperaturen spielt (Adam, 2000). Die konstitutive Anwesenheit und seine Lokalisation machen das Enzym jedoch auch zu einem guten Kandidaten für generelle Aufgaben bei der Degradation sowohl von membrangebundenen als auch löslichen Lumenproteinen. Ferner wird eine mögliche Beteiligung an der lichtabhängigen Degradation von D1, genauer, an dessen Prozessierung in den beiden luminalen Schleifen des Transmembranproteins nach einer photooxidativen Schädigung an der Donorseite, diskutiert (Itzhaki *et al.*, 1998; Haußühl *et al.*, 2001).

DegP2, das zweite charakterisierte Mitglied der HtrA-Familie im Chloroplasten, ist wie DegP1 peripher an die Thylakoidmembran gebunden, der hydrophile Abschnitt jedoch zum Stroma hin exponiert. Auch dieses Protein ist ein typisches Mitglied der HtrA-Familie; es besitzt die typische katalytische Triade und eine PDZ-Domäne. Es ist ebenfalls konstitutiv im Chloroplasten vorhanden und bei Salz-, Trocken- und Lichtstress, trotz verringerter oder konstanter Transkriptmenge des Gens, auf Proteinebene verstärkt nachweisbar (Haußühl *et al.*, 2001). Die Bedeutung dieses Enzyms als ausführende Protease bei der GTP-abhängigen Erstprozessierung von D1 im Zuge von dessen lichtbedingtem Abbau wurde bereits erwähnt.

Alle angeführten plastidären Proteasen sind Mitglieder großer Proteinfamilien ursprünglich bakteriellen Ursprungs, deren Homologe sich quer durch das gesamte Reich der Organismen finden lassen. Neben diesen bestcharakterisierten Beispielen wurden noch eine Reihe weiterer Proteasen bzw. proteolytischer Aktivitäten im Chloroplasten beschrieben und zum Teil auch isoliert und aufgereinigt (z. B. Musgrove *et al.*, 1989; Ostersetzer *et al.*, 1996; Sokolenko *et al.*, 1997); bezüglich Identität, Struktur und Funktion im proteolytischen System des Chloroplasten ist über diese jedoch meist noch weniger bekannt als über Clp, FtsH, DegP1 und DegP2.

Aus den vorangestellten Ausführungen wird ein großes Problem der Forschung an Proteasen und proteolytischen Prozessen des Chloroplasten deutlich: auf der einen Seite existieren eine Reihe sehr genau und detailliert erforschter Stoffwechselfvorgänge, an denen Proteasen beteiligt sind, auf der anderen eine stetig wachsende Liste an charakterisierten Proteasen und Peptidasen. Was in den allermeisten Fällen jedoch weiterhin fehlt, um das Gesamtbild zu vervollständigen, sind die Querverbindungen zwischen den beiden Bereichen. Für die wenigsten der beschriebenen proteolytischen Prozesse sind die beteiligten proteolytischen Enzyme bekannt; umgekehrt ist auch im Falle der meisten charakterisierten Proteasen unklar, an welchen Prozessen sie im Stoffwechsel des Chloroplasten partizipieren. Hauptverantwortlich für diese Diskrepanz ist sicherlich die hohe Komplexität der Prozesse – außer im Fall spezifischer Prozessierungen scheinen an allen Vorgängen mehrere proteolytische Systeme beteiligt zu sein (Stadtman, 1990), die darüber hinaus untereinander vernetzt sind und von Enzymen gebildet werden, die zwar einerseits hochspezifische Reaktionen durchführen, sich andererseits aber zum Teil gegenseitig alternativ ersetzen können, falls dazu die Notwendigkeit besteht. Dies macht es außerordentlich schwierig, die Vorgänge *in vitro* nachzuvollziehen und zu interpretieren – als Beispiel seien nur die widersprüchlichen Ergebnisse und Schlußfolgerungen, die bei der Erforschung des lichtbedingten D1-Abbaus erzielt wurden, genannt. Weitere intensive Forschung, sowohl auf Ebene der proteolytischen Prozesse als auch auf Ebene der Proteasen selbst, ist die einzige Möglichkeit, ausreichend Daten zu erlangen, um eines Tages beide Hälften des Bildes nahtlos zusammenfügen zu können. Die Isolierung und Charakterisierung neuer proteolytischer Enzyme des Chloroplasten und der zugehörigen Gene stellt dabei sicherlich den schnelleren, erfolgversprechenderen Weg dar.

Zur Durchführung dieser Aufgabe gibt es zwei gegensätzliche methodische Ansätze, die jedoch langfristig zum gleichen Ziel führen:

- a) den biochemischen Ansatz; dabei werden biochemische Methoden der Proteinisolierung und -aufreinigung angewendet, um zuvor unbekannte proteolytische Aktivitäten zu lokalisieren und die verantwortlichen Proteasen in aktiver, aber möglichst verunreinigungsfreier Form zu gewinnen;
- b) den molekularbiologischen Ansatz; hier macht man sich die im Zuge verschiedener Sequenzierungsprojekte stetig ansteigende Menge verfügbarer pflanzlicher DNS-Sequenzdaten einerseits und die Tatsache, daß die meisten plastidären Proteasen durch den prokaryotischen Ursprung dieses Organells Homologe zu bereits bekannten, gut charakterisierten bakteriellen Enzymen darstellen, zunutze, um die Gene für neue Proteasen

zu ermitteln und ausgehend von diesen mehr über das codierte Protein in Erfahrung zu bringen.

Beide Ansätze münden nach der eventuellen Entdeckung eines neuen Enzyms in den Prozeß der Charakterisierung seiner Eigenschaften.

Vor diesem Hintergrund ist es Anliegen der vorliegenden Arbeit, durch die Identifizierung und Charakterisierung neuer plastidärer Proteasen Erkenntnisse im Gesamtbild proteolytischer Prozesse des Chloroplasten zu liefern. Dazu sollte in einem rein biochemischen Ansatz durch den Einsatz einer Nachweisttechnik mittels Elektrophorese auf substrathaltigen Polyacrylamidgelen eine Übersicht speziell über das Spektrum lichtstreibinduzierbarer proteolytischer Aktivitäten des Thylakoidlumens von Erbsenchloroplasten erstellt und anschließend mittels verschiedener biochemischer Aufreinigungstechniken eine Isolierung der beobachteten Proteasen unternommen werden. Unabhängig vom Erfolg dieses Ansatzes sollten gleichzeitig über Datenbankrecherchen EST-Sequenzen („expressed sequence tag“) von *Arabidopsis* ermittelt werden, die Homologien zu bekannten Proteasen aus *E. coli* und darüber hinaus auch zu Proteasegenen aus dem voll sequenzierten Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 aufweisen, bei denen also eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, daß die Produkte der vollständigen Gene im Chloroplasten lokalisierte Proteasen sind. Das Augenmerk lag bei diesem Ansatz besonders auf Genen, für deren Produkte aufgrund der bekannten Eigenschaften der bakteriellen Homologe eine Lokalisation in der Thylakoidmembran bzw. im Thylakoidlumen zu erwarten ist. Ausgehend von den EST-Sequenzen sollte der Versuch unternommen werden, die zugehörigen vollständigen Gene zu isolieren und die von diesen kodierten Proteine so vollständig wie möglich zu charakterisieren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit verwendete Laborchemikalien wurden in *p.a.*-Qualität von folgenden Herstellern bzw. Vertriebsfirmen bezogen: AppliChem, Darmstadt; Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim; Difco Laboratories, Detroit/USA; ICN Biomedicals GmbH, Eschwege; Merck KGaA, Darmstadt; Riedel-de Haën AG, Seelze; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Serva Feinbiochemica, Heidelberg; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

Radioaktiv markierte Isotope wurden von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, bezogen. Die Bezugsquellen für spezielle Chemikalien sind bei den jeweiligen Methoden angeführt.

2.1.2. Pflanzenmaterial

Keimlinge von *Arabidopsis thaliana* L. (Ökotyp Columbia) wurden im Gewächshaus bei einer konstanten Temperatur von 25°C unter mäßig starker Belichtung von durchschnittlich ca. 50 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkel) bzw. im Falle der für die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* bestimmten Pflanzen unter Kurztagbedingungen (12/12 Stunden) für 3 - 4 Wochen angezogen.

Keimlinge von Erbsen (*Pisum sativum* L. var. Rosa Krone) wurden im Gewächshaus bei einer konstanten Temperatur von 25°C unter mäßig starker Belichtung von durchschnittlich ca. 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkel) für ca. 4 - 5 Wochen angezogen. Pflanzenmaterial von Spinat (*Spinacia Oleracea* L.) wurde, soweit nicht anders angegeben, von einem örtlichen Obst- und Gemüsehandel bezogen.

Für einige Untersuchungen wurden durch Ultrazentrifugation auf Saccharosegradienten subfraktionierte Gesamt-Thylakoidpräparationen aus Tabak (*Nicotiana tabacum* L., var. Petit Havana) freundlicherweise von Frau Magdalena Swiatek zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Verwendete Bakterien- und Cyanobakterienstämme

<i>E. coli</i> DH 5 α	Life Technologies GmbH, Karlsruhe; Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> Y1090	Young und Davis (1983)
<i>E. coli</i> M15	Qiagen GmbH, Hilden
<i>E. coli</i> SG13009	Qiagen GmbH, Hilden
<i>E. coli</i> BL21	Invitrogen BV (Groningen, Holland)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	Hoekema <i>et al.</i> (1983)
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Rippka <i>et al.</i> (1979)

2.1.4. Verwendete rekombinante Plasmide und Phagemide

pBluescript II KS (-)	Stratagene Cloning Systems (LaJolla, USA)
pMOSblue	Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
pCR II	Invitrogen BV (Groningen, Holland)
pZL1	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
pGAD424	BD Clontech, Heidelberg
pQE-30, -31, 32	Qiagen GmbH, Hilden
pRSET5a, 5b	Invitrogen BV (Groningen, Holland); Schoepfer (1992)
pGPTV-BAR 35S/nos	Becker <i>et al.</i> (1992)

2.1.5. Molekulargewichts- und DNS/RNS-Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandards für die Protein-Gelelektrophorese wurden die Marker SDS7 (Größen 66, 45, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa) von Sigma-Aldrich, Steinheim, sowie Mark12 (Größen 200, 116, 97, 66, 55, 36, 31, 21, 14, 6, 3 und 2 kDa) von Novex Electrophoresis GmbH, Frankfurt a. M., verwendet.

In der DNS-Elektrophorese diente die „1 kB ladder“ der Life Technologies GmbH, Karlsruhe (Größen ca. 300/ 350/ 400/ 500/ 1000/ 1600 und 2000 – 12000 Bp im Abstand 1000 Bp) als Vergleichsstandard; in der RNS-Elektrophorese die „0,24 – 9,5 kB ladder“, ebenfalls von Life Technologies (Größen 0,24/ 1,35/ 2,37/ 4,4/ 7,46 und 9,49 kB).

2.1.6. Enzyme

DNS-Polymerase I, Klenow-Fragment	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNase I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
RNase A	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	New England Biolabs GmbH bzw. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T3, T7 RNS Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bzw. Stratagene Cloning Systems (LaJolla, USA)
T4 DNS Ligase	New England Biolabs GmbH bzw. MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)
Anorganische Pyrophosphatase (Hefe)	Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim)

Die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*O109I, *Hind*III, *Hae*I, *Kpn*I, *Mlu*I, *Nco*I, *Nde*I, *Not*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I und *Xho*I wurden von MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), New England Biolabs GmbH (Schwalbach/Taunus) sowie von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim) bezogen.

2.1.7. Synthetische Oligonukleotide

Genspezifische Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungsreaktionen („primer“) wurden von MWG Biotech GmbH (Ebersberg) bzw. Metabion GmbH (Martinsried) bezogen; speziell markierte allgemeine Oligonukleotide (T3, T7, M13 *forward/reverse*, pQE-IV) für die automatische Sequenzierung von MWG Biotech.

Sequenzspezifische Oligonukleotide für *hhoA*

hhoAPCR_5'ext	5'-cac ctt aca acg ttg taa tcc-3'
hhoAPCR_3'ext	5'-gga tta caa cgt tgt aag gtg-3'
psEST2pre(+)	5'-cgg gat cca tga cca tgg c-3'

psEST2mat(+)	5'-cgg gat cca ttg gag caa ttc aaa gaa aaa g-3'
psEST2(+) <i>rev</i>	5'-cgc tgc agt tta cat tta gag aga caa gtc tg-3'
psEST2a	5'-cat tgg agg tac cga gaa caa-3'
psEST2_AS_fw	5'-3 x (gag ctc)-atg acc atg gct ctt gc-3'
psEST2_AS_rv	5'-3 x (tct aga)-ttt aca ttt aga gag aca-3'
psEST2_S_fw	5'-3 x (tct aga)-tga cca tgg ctc ttg c-3'
psEST2_S_rv	5'-3 x (gag ctc)-att tac att tag aga gac-3'
psEST2_AS_Sq5'	5'-gac gac gtg aga gcc aaa c-3'
psEST2_AS_Sq3'	5'-agg gag tgg tat gtc ttc tgg-3'
psEST2mat_veri	5'-gaa ggc gaa gtt ttc tgg aag-3'

Sequenzspezifische Oligonukleotide für *sppA*

psEST7a	5'-caa ttg acg caa tga cgg gtt-3'
psEST7ext	5'-tcc agc agc tgt tcc tgt ttc-3'
psEST7(+) <i>fwd_x</i>	5'-cgg gat cca atg gcg aag cta ctt c-3'
psEST7(+) <i>rev_x</i>	5'-3 x (ctg cag)-aat cat ctg aga gag ctg ag-3'
psEST7x_3'	5'-3 x (ctg cag)-cac ttg ctg cca cat ctg-3'
psEST7y_5'	5'-cgc ggg atc cgg cta cta cat ggc aat gg-3'
psEST7_AS_fw(II)	5'-cat gtc gag ctc aat ggc gaa gct act tc-3'
psEST7_AS_rv	5'-3 x (tct aga)-gtt gca tgc aca tcc aag-3'
psEST7_AS_Sq3'	5'-gag ttg tgg gtg ggg aaa gg-3'
<i>sppA_vseq1</i>	5'-gtg ctg gag atc agc ttt ctc-3'

Vektorspezifische Oligonukleotide für pGPTV-BAR 35S/nos

NOS_Prom	5'-tac atg ctt aac gta att caa cag-3'
35S_Prom	5'-atc ctt cgc aag acc ctt cc-3'

2.1.8. Antiseren

Soweit nicht anders angegeben, wurden Immunhybridisierungsexperimente („Western“) nach der *Enhanced Chemiluminescence* Methode (ECL; Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH) durchgeführt. Dafür wurden folgende kommerzielle Antikörperpräparationen eingesetzt:

Primäre Antikörper:

QIAexpress Anti-RGS/His Antikörper

Qiagen GmbH, Hilden

Sekundäre Antikörper:

Polyklonales Anti-Kaninchen-IgG von Ziegen; Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase für ECL bzw. alkalischer Phosphatase	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg i. Br.)
Polyklonales Anti-Maus-IgG von Ziegen; Kon- jugat mit Meerrettich-Peroxidase für ECL	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg i. Br.)

2.1.9. Allgemeine Puffer und Medien

2.1.9.1. Puffer

TNE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat, pH 7,0
100 x Denhards Lösung	2% PVP 10 2% BSA 2% Ficoll 400
20 x SSPE	3,6 M NaCl 200 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4 20 mM EDTA
Prähybridisierungslösung für Membranen	für DNS-/RNS- 5 x Denhard's 5 x SSPE 0,2% SDS 200 µg/ml Heringssperma, zerkleinert
10 x TBE-Puffer	1,34 M Tris 440 mM Borsäure 25 mM EDTA
50 x TAE-Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA 1 M Essigsäure
10 x PCR-Reaktionspuffer („Goldstar“)	800 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 M Tris/HCl pH 9 0,4% Tween 20
10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS pH, 7,0 (NaOH) 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
Plastiden-Lysepuffer	10 mM Tricin/NaOH, pH 8,0

TMK-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 6,8 10 mM MgCl ₂ 20 mM KCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,2-8,0 1 mM EDTA
Lösungen für Plasmid-Minipräparation (nach Birnboim & Doly, 1979):	
Lösung I	25 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 50 mM Glucose 4 mg/ml Lysozym
Lösung II	200 mM NaOH 1% SDS
Lösung III	3 M K-Acetat 1,8 M Ameisensäure
Puffer für nichtdenaturierende Lyse von <i>E. coli</i>	
	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 1 mg/ml Lysozym
Denaturierungspuffer für DNS-Gele	500 mM NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer für DNS-Gele	500 mM Tris/HCl, pH 7,0 3 M NaCl
10 x PBS-Puffer	40 g NaCl 5,75 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 1 g KCl 1 g KH ₂ PO ₄ ad 500 ml H ₂ O
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-Tween/Triton Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 0,05% Tween 20 0,2% Triton X-100
TBS-Blockierungspuffer	1% Casein (alkali-löslich) in TBS
10 x Laufpuffer für Acrylamidgele (nach Laemmli, 1970)	0,2 M Tris 1,5 M Glycin

4 x Laemmli-Probenpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 8% SDS 40% Glycerin 20% β -Mercaptoethanol 0,016% Bromphenolblau
--------------------------	--

Puffer für den „SemiDry“-Transfer von Proteingelen:

Anodenpuffer I	300 mM Tris 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20% Methanol
Kathodenpuffer	40 mM ϵ -Aminocapronsäure

Konservierungslösung für gefärbte Proteingele

2% Methanol
3% Glycerin

Na-Phosphatpuffer
Stocklösung: 0,5 M Na_2HPO_4 , durch Zugabe von 0,5 M NaH_2PO_4 auf den gewünschten pH eingestellt

λ -Diluent-Puffer
10 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

2.1.9.2. Anzuchtmedien für die Kultur von Bakterien und Phagen

Alle Angaben beziehen sich auf 1000 ml Medium. Für feste Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, 15 g Agar pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt. Alle Medien wurden vor der Verwendung bei 121°C und einem Druck von 1 bar autoklaviert. Nicht autoklavierbare Zusätze wie z. B. Glucose wurden nach dem Autoklavieren der Medien als entsprechende Mengen sterilfiltrierter konzentrierter Stammlösungen zugegeben.

LB-Medium	10 g Bacto-Pepton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt pH 7,0 mit NaOH
LBG-Medium	wie LB, zusätzlich 4% Glucose
LBM-Medium	wie LB, zusätzlich 4% Maltose
SM-Medium	6 g Tris/HCl, pH 7,5 5,8 g NaCl 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

NZCYM-Medium	10 g NZ Amin (enzymat. Caseinhydrolysat) 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 1 g Casamino Acids (säurehydrolysiertes, vitaminreduziertes Casein) 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O pH 7,0 mit NaOH
BBL-Medium	10 g Bacto-Pepton 2,5 g NaCl 12 g Agar pH 7,2 mit NaOH
Top-Agarose	10 g Bacto-Pepton 2,5 g NaCl 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 6,5 g Agarose pH 7,2 mit NaOH
SOC-Medium	20 g Bacto-Pepton 5 g Hefeextrakt 500 mg NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl 20 mM Glucose pH 7,0 mit NaOH
λ-Diluent	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O
2 x YT-Medium	16 g Bacto-Pepton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,0 mit NaOH
MinA-Medium	10,5 g K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 4,5 g KH ₂ PO ₄ 1 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 g Na-Citrat 0,02 % MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,2 % Glucose
YEB-Medium	5 g Fleischextrakt 1 g Bacto-Pepton 5 g Saccharose 1 g Hefeextrakt 2 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O pH 7,4 mit KOH

Zusätze für die Selektion:

	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	25 µg/ml
Rifampicin	50 mg/ml in DMSO	50 µg/ml
IPTG	48 mg/ml in H ₂ O	60 µg/ml
X-Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid	60 µg/ml

2.1.9.3. Anzuchtmedium für Cyanobakterien (BG-11; nach Rippka et al., 1979)

Stammlösung 1 (10 x Makroelemente)	18 mM NaNO ₃ 300 µM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 240 µM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 230 µM K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 190 µM NaCO ₃ 30 µM Zitronensäure 20 µM Eisenammoniumcitrat 2,8 µM Na ₂ Mg EDTA
Stammlösung 2 (1000 x Spurenelemente)	46 µM H ₃ BO ₄ 9,1 µM MnCl ₂ x 4 H ₂ O 7,7 µM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 1,6 µM Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 320 nM CuSO ₄ x 5 H ₂ O 170 nM Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O

Zusätze für die Selektion:

	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O	12,5 µg/ml
Gentamycin	10 mg/ml in H ₂ O	200 ng/ml

2.1.9.4. Medien für die Anzucht und Selektion von Pflanzen

B5-Vitamine (100 x Stammlösung)	10 g/l Inosit 100 mg/l Pyridoxin-HCl 1 g/l Thiamin-HCl 100 mg/l Nikotinsäure
MS-Salze (nach Murashige & Skoog, 1962)	
MS-Makro (10 x Stammlösung)	16,5 g/l NH ₄ NO ₃ 19 g/l KNO ₃ 4,4 g/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O 3,7 g/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1,7 g/l KH ₂ PO ₄ 0,4 g/l EDTA Fe(III) Na-Salz

MS-Mikro (1000 x Stammlösung)	0,83 g/l KJ 6,2 g/l H ₃ BO ₄ 22,3 g/l MnSO ₄ x H ₂ O 8,6 g/l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 0,25 g/l Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 25 mg/l CuSO ₄ x 5 H ₂ O 25 mg/l CoCl ₂ x 6 H ₂ O
Selektionsmedium	0,5 x MS-Salze 1 x B5-Vitamine 1,5% Saccharose 200 µg/ml Cefotaxim (Fa. Merck Eurolab GmbH, Darmstadt) 30 µg/ml DL-Phosphinotricin (Fa. Riedel-de Haën AG, Seelze) 0,8% Agar pH 5,8 mit KOH
Infiltrationsmedium	0,5 x MS-Salze 1 x B5-Vitamine 5% Saccharose 0,044 µM BAP pH 5,8 mit KOH

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit kamen folgende Standardmethoden zum Einsatz; sofern nicht gesondert aufgeführt, wurden diese unverändert nach Sambrook *et al.* (1989) bzw. Ausubel *et al.* (1993) angewandt:

- Anlage von Bakterien-Stammkulturen
- Herstellung kompetenter *E. coli* und deren Transformation mit rekombinanter DNS
- Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien (nach Birnboim & Doly, 1979)
- Reinigung von DNS mittels Ultrazentrifugation auf CsCl-Gradienten
- Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren
- Elution von Nukleinsäuren mittels *low melting*-Agarose
- Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS
- Restriktion von Nukleinsäuren
- Dephosphorylierung von DNS-Enden mittels alkalischer Phosphatase
- *in vitro*-Ligation von DNS-Enden

- Sequenzierung von DNS nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977)
- Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosemembranen

Für die Arbeit mit Bakterien und Phagen sowie mit Nukleinsäurepräparationen wurden ausschließlich sterile Arbeitsgeräte und Medien bzw. Lösungen verwendet. Diese wurden, soweit materialbedingt möglich, durch Autoklavieren bei 121°C unter 1 bar Druck sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Spritzenvorsatzfilter (Millipore/0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert. Bakterien- und Cyanobakterienkulturen wurden grundsätzlich an durch UV-Bestrahlung keimfrei gehaltenen, mit Abzügen versehenen Arbeitsbänken angeimpft.

2.2.2. Isolierung von DNS aus Bakteriophagen

Phagen-Präzipitationslösung	20% PEG 8000 2 M NaCl in λ-Diluent
-----------------------------	--

Phagen wurden durch Ausstechen gut abgegrenzter lysierter Bereiche („Plaques“) im Bakterienrasen vereinzelt und in 1 ml SM-Medium mit einem Tropfen Chloroform aufgenommen. Nach mindestens 4 h Inkubation bei 4°C wurden 40 – 100 µl des Überstandes zusammen mit 10 µl einer 10-fach konzentrierten Übernachtskultur von *E. coli* Y1090 in LBM-Medium für 20 Min. bei 37°C (Thermoblock, Fa. Barnstead Thermolyne; Dubuque, USA) inkubiert. Anschließend wurden 1,8 ml ca. 48°C warme Top-Agarose hinzugefügt und die Mischung wurde sofort auf einer frischen, abgetrockneten Bakterienplatte (Durchmesser 9 cm) mit NZCYM-Medium durch Schwenken ausgebreitet. Pro vereinzelt Phagen wurden 5 Bakterienplatten nach diesem Schema angesetzt.

Das Bakterienwachstum erfolgte in einem Brutschrank (Fa. Heraeus) bei 37°C über Nacht, bis zur deutlich sichtbaren totalen Lyse der Bakterien. Danach wurden auf jede Platte 3,5 ml λ-Diluent pipettiert und die Platten zur Ablösung der Phagen mindestens 2 h gleichmäßig auf einem Taumelschüttler inkubiert. Die phagenhaltige Lösung wurde in sterile Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C und 18000 x g 10 Min. in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Überstände (= Phagenlysate) von je 5 zusammengehörigen Reaktionsgefäßen wurden in je einem sterilen 30 ml Corex – Zentrifugenröhrchen vereinigt und nach Zugabe von 5 µl RNAse A sowie 2,5 µl DNase I zur Entfernung von den Phagenhüllen anhaftenden, kontaminierenden Nukleinsäuren für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 1 Vol. Phagen-Präzipitationslösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und das Gemisch ca. 1 h auf Eis stehen gelassen, danach 10 Min. bei 4°C und 9000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, das Präzipitat bei Raumtemperatur luftgetrocknet, danach in

0,5 – 1 ml TE-Puffer rückgelöst und zurück in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde $\frac{1}{100}$ Vol. 10% SDS zugegeben und 5 Min. bei 68°C erhitzt (Thermoblock). Daraufhin wurden $\frac{1}{50}$ Vol. 5 M NaCl hinzugefügt und eine Extraktion zunächst mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1), anschließend mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Die Phagen-DNS wurde durch Zugabe von 1 Vol. eiskaltem Isopropanol und Inkubation bei –20°C für 1 h präzipitiert, mit ca. 200 µl 70% Ethanol (je nach Menge des Präzipitats) gewaschen und nach Lufttrocknung in 50 – 100 µl TE-Puffer rückgelöst.

2.2.3. Sichten von cDNS-Bibliotheken mittels Koloniehybridisierung

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

Von einer cDNS-Bibliothek mit bekanntem Phagen-Titer wurden ca. 20000 Phagen zusammen mit 900 µl einer 10-fach konzentrierten Übernachtkultur von *E. coli* Y1090 wie unter Abschnitt 2.2.2. beschrieben inkubiert, mit 30 ml Top-Agarose auf großen NZCYM-Platten (ca. 100 cm²) gleichmäßig verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank heranwachsen gelassen. War die Dichte der entstandenen Lysehöfe auf dem Bakterienrasen zufriedenstellend, wurden Abdrücke angefertigt. Dazu wurden auf die richtige Größe zugeschnittene Nitrozellulosefilter (je zwei pro Platte) jeweils für eine Minute auf die Platte aufgelegt und ihre Position durch Einstechen mit einer tintengefüllten Injektionskanüle markiert. Anschließend wurden die Filter nacheinander 1 - 5 Min. in Denaturierungslösung und 5 Min. in Neutralisierungslösung inkubiert, kurz in 2 x SSC getaucht und schließlich bei 80°C in einem Trockenschrank gebacken. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten genspezifischen DNS-Sonden erfolgte wie unter Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Positive Signale liefernde Bereiche wurden aus der bei 4°C aufbewahrten Phagenplatte durch Vergleich mit dem Hybridisierungsmuster eingegrenzt und ausgestochen und nach Inkubation in SM-Medium/Chloroform (vgl. Abschnitt 2.2.2.) für eine weitere Koloniehybridisierung verwendet. Positive Signale dieser Hybridisierung konnten zumeist distinkten Lysehöfen zugeordnet werden; diese wurden abermals isoliert und die Vereinzelnung des Phagen mittels einer neuerlichen Koloniehybridisierung dokumentiert.

2.2.4. Isolierung von Nukleinsäuren aus pflanzlichen Geweben

2.2.4.1. Isolierung von DNS nach der CTAB-Methode (Doyle & Doyle, 1990)

Extraktionspuffer	2 % CTAB
	1,4 M NaCl
	20 mM EDTA
	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM β -Mercaptoethanol

1 - 5 g Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gründlich zermörsert und in 2 ml Isolierungspuffer aufgenommen. Die Mischung wurde nach ihrem Auftauen zu gleichen Teilen in zwei 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und 30 Min. bei 60°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden pro Reaktionsgefäß zwei Extraktionen mit jeweils 600 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 24:1) durchgeführt. Dazu wurde das Gemisch gründlich geschüttelt und bei Raumtemperatur 10 Min. bei ca. 10000 x g zentrifugiert. Die DNS wurde anschließend aus dem von Zelltrümmern, Proteinen und Pigmenten befreiten Überstand durch Zugabe des 0,6-fachen Volumens an Isopropanol und 10 Min. Inkubation bei -20°C ausgefällt und für 20 Min. bei 4°C und 11000 x g abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit 70%igem Ethanol. Das aus der anschließenden Zentrifugation resultierende Sediment wurde bei 50°C in einem Heizblock getrocknet und in je 100 ml H₂O resuspendiert. Die Rücklösung der DNS erfolgte über Nacht bei 4°C; die DNS-Konzentration wurde spektrophotometrisch und elektrophoretisch durch Vergleich mit einem DNS-Mengenstandard bestimmt.

2.2.4.2. DNS-Minipräparation aus Arabidopsis

Lysepuffer	7 M Harnstoff
	300 mM NaCl
	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	20 mM EDTA
	1 % N-Lauryl-Sarcosinat

Zwei bis drei kleine, in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene, *Arabidopsis*-Blätter wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 μ l Lysepuffer versetzt und die sofortige Homogenisation mittels eines motorgetriebenen Mini-Homogenisators (Fa. Janke und Kunkel) gestartet; unmittelbar danach wurden weitere 400 μ l Lysepuffer zugegeben. Nach vollständiger Homogenisation wurde das Reaktionsgefäß verschlossen für exakt 5 Min. bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend bis zur Fortsetzung der Isolierung auf Eis aufbewahrt. Es folgte eine Extraktion durch Zugabe von 500 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsver-

hältnis 25:24:1), gründliches Mischen und 3 Min. Zentrifugation bei ca. 18000 x g. 550 µl des Überstandes wurden anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zusatz von 550 µl Isopropanol 5 Min. bei Raumtemperatur präzipitiert. Die DNS wurde durch 3 Min. Zentrifugation bei ca. 6000 x g sedimentiert, zweifach mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Rücklösung erfolgte in 15 µl TE-Puffer bei 4°C über Nacht.

2.2.4.3. Isolierung von Gesamt-RNS nach der Trizol[®]-Methode

Gesamt-RNS wurde durch Extraktion von in flüssigem Stickstoff zermörsertem Blattmaterial mittels des *Trizol*[®]-Reagens der Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, gewonnen. Nach der Vermischung des Homogenats mit dem Extraktionsreagens wurde das vom Hersteller zur Verfügung gestellte Protokoll zur Isolierung von Gesamt-RNS aus tierischem Gewebe befolgt.

2.2.4.4. Isolierung von Poly(A)⁺-RNS mittels Oligo(dT)-Zellulose

Aufschlußpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 9,0 100 mM NaCl 2% SDS 2 mg/ml Proteinase K
Bindepuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 400 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,1% SDS
Säulenpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 0,2% SDS
Elutionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
Ethanol-Natriumacetat-Lösung	200 mM Natriumacetat 70% Ethanol

Etwa 5 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert, zusammen mit 50 ml Aufschlußpuffer in zwei 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) überführt und 30 Min. bei Raumtemperatur in einem Überkopf-Schüttler geschüttelt. Nach Transfer in 30 ml Borosilikatglas-Zentrifugenröhrchen („Corex“) und Zentrifugation für 20 Min. bei 16°C und 12000 x g wurde der Überstand in frische 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen dekantiert und $\frac{1}{10}$ Vol. 4 M NaCl zugegeben. Ausfallendes SDS wurde durch kurzes Erwärmen auf 50 °C in einem Wasserbad gelöst. Anschließend wurden pro Röhrchen ca. 100 mg Oligo(dT)-Zellulose zugesetzt und die Mischung erneut für 30 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Die

Zellulose wurde durch kurzes Anzentrifugieren auf 1500 x g sedimentiert und dreimal mit Bindepuffer gewaschen. Es folgten mehrere Waschschrte mit Säulenpuffer, bis Überstand und Sediment vollständig farblos waren. Die an die Oligo(dT)-Zellulose gebundene RNS wurde anschließend durch Resuspendieren des Sediments in wenig Elutionspuffer und 5 Min. Schwenken bei Raumtemperatur eluiert. Nach Zentrifugation wurde das Eluat in vorgewogene 15 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen überführt und die enthaltene RNS durch Zugabe von $\frac{1}{20}$ Volumen (bezogen auf das Gewicht) 4 M NaCl und 2,5 Vol. 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Überführung in geeignete Zentrifugenröhrchen und 30 Min. Zentrifugation bei 40000 x g und 4°C wurde das Präzipitat anderntags in je 1 ml Ethanol-Acetatlösung resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Darauf erfolgte eine neuerliche Zentrifugation bei 30000 x g und 4°C . Die sedimentierte RNS wurde abschließend in 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 μl sterilem H_2O rückgelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch; die Aufbewahrung der RNS nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C .

Gebrauchte Oligo(dT)-Zellulose wurde für späteren Gebrauch regeneriert; dafür wurden die Sedimente der Elutionsreaktionen vereinigt und in 0,1 M NaOH resuspendiert. Nach 10 Min. Inkubation unter gelegentlichem Mischen wurde die Zellulose abzentrifugiert und mit Bindepuffer bis zur pH-Neutralität, mindestens jedoch drei mal, gewaschen. Die regenerierte Cellulose wurde in Bindepuffer bei 4°C aufbewahrt.

2.2.5. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

2.2.5.1. Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten mittels Klenow-Polymerase

Nachfolgend angeführte Reaktionszusätze sowie die Klenow-Polymerase stammten aus dem „HexaLabel™ DNA Labelling Kit“ der MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot.

Oligonukleotid-Mischung („random primer“) in 5 x Reaktionspuffer

250 mM Tris/HCl, pH 8,0
25 mM MgCl_2
5 mM DTT
keine Herstellerangaben zur Nukleotidkonzentration

Mischung C je 330 mM dATP, dGTP und dTTP

dNTP-Mischung je 250 mM dATP, dGTP, dTTP und dCTP

50 – 100 ng der zu markierenden DNS wurden zusammen mit 5 µl Oligonukleotid-Mischung in Reaktionspuffer und H₂O ad 20 µl 5 Min. bei 100°C in einem Wasserbad gekocht. Nach kurzem Anzentrifugieren des Ansatzes wurden 1,5 µl Mischung C, 3 µl ³²P-dCTP (10 µCi/µl) sowie 0,5 µl Klenow-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde 20 Min. bei 37°C in einem Wasserbad (Fa. Julabo) inkubiert, 2 µl dNTP-Mischung wurden hinzupipettiert und die Inkubation wurde bei 37°C für weitere 15 Min. fortgesetzt. Nicht inkorporierte Radioaktivität wurde durch Gelfiltration über Sephadex G50 (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) entfernt. Unmittelbar vor der Verwendung in einer Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde 5 Min. bei 100°C in einem Wasserbad denaturiert.

2.2.5.2. Radioaktive Markierung von RNS-Fragmenten

Die gewählte DNS-Sequenz wurde zusammen mit dem gewünschten Promotor (T3/T7) mittels PCR amplifiziert und eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Anschließend wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

100 ng	PCR-Produkt
4 µl	5 x Reaktionspuffer für T3/T7-RNS-Polymerase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
2 µl	100 mM DTT
0,5 µl	RNAsin RNase-Inhibitor (Fa. Promega Corp., Mannheim)
4 µl	rNTP Mischung ohne UTP (2,5 mM ATP, GTP und CTP)
2,4 µl	100 µM UTP
5 µl	[α- ³² P]-UTP (10 µCi/µl)
1 µl	T3/T7-Polymerase (10 Enzymeinheiten/µl; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
ad 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C auf einem Wasserbad inkubiert; nach Zugabe von 1 µl DNAse I (10 Enzymeinheiten /µl, Fa. Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurde die Inkubation weitere 15 Min. bei 37°C fortgesetzt. Anschließend wurden 80 µl H₂O zugegeben und zunächst mit 100 µl Phenol/Chloroform, danach mit 100 µl Chloroform extrahiert. Die radioaktiv markierte RNS wurde durch Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl 100% Ethanol mindestens 30 Min. bei Raumtemperatur präzipitiert, nach Zentrifugation mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl sterilem H₂O rückgelöst. Unmittelbar vor der Verwendung in einer Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde 5 Min. bei 100°C in einem Wasserbad denaturiert.

2.2.6. Hybridisieren von radioaktiv markierten Sonden an immobilisierte Nucleinsäuren

2.2.6.1. Standardmethode

Vor Beginn der Hybridisierung erfolgte allgemein eine mehrstündige Prähybridisierung der Membranen mit der immobilisierten DNS oder RNS in Prähybridisierungslösung bei der späteren Hybridisierungstemperatur, um die Nitrozellulose mit unspezifischer DNS (Heringsperma) abzusättigen. Die radioaktiv markierte genspezifische Sonde wurde in wenig (10 – 25 ml) Prähybridisierungslösung verdünnt, 5 Min. bei 100°C denaturiert und anschließend auf die prähybridisierte Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte üblicherweise über Nacht in speziellen Glasbehältern in einem Rollinkubator (Fa. Bachofer, Reutlingen). Nach Beendigung wurde die Membran in verschiedenen Waschlösungen mit sinkender SSC-Konzentration und steigender SDS-Konzentration zunächst bei Raumtemperatur, später falls nötig bei Hybridisierungstemperatur, gewaschen, bis die Gesamtradioaktivität ausreichend zurückgegangen war. Das Hybridisierungsmuster wurde durch Belegen der Membran mit Röntgenfilm (Fa. Amersham Pharmacia Biotech bzw. Fa. Kodak) oder einer „Phosphoimager“-Platte (Fa. Fuji) detektiert. Die Auswertung der „Phosphoimager“-Platten wurde mittels des Fuji BAS-1500 „Phosphoimager“ sowie am Computer mit dem Programm *BasReader* (Fa. Raytest, Straubenhardt) durchgeführt, die primäre Bildbearbeitung mit *TINA* ver. 2.09g (Fa. Raytest).

2.2.6.2. Hybridisierung an BAC-Filter zur physikalischen Kartierung

Zusätzlich zur Standardmethode wurde die Lokalisation der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals klonierten Gene (*hhoA* und *sppA*) auf dem *Arabidopsis*-Genom durch Hybridisierung von genspezifischen Sonden an eine BAC-Bibliothek von *A. thaliana* kartiert. Die beiden verwendeten BAC-Filter, die vom Ressourcen-Zentrum im Deutschen Humangenomprojekt (RZPD) am Max Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin stammten, enthielten die genomische Gesamt-DNS aus *A. thaliana*-Wurzelkallus-Suspensionen, mittels *EcoRI* geschnitten und in pBeloBAC-Kan kloniert. Jeder Filter enthielt 18432 Klone mit einer durchschnittlichen Insertionsgröße von 100 kB, die auf 9216 der insgesamt 10752 ursprünglichen BAC Klone zurückgehen. Diese waren auf dem Filter in 48 x 48 Blöcken zu je 8 Klonen punktförmig aufgebracht (Mozo *et al.*, 1998a; Mozo *et al.*, 1999). Die Hybridisierung und Auswertung der Filter erfolgte nach Mozo *et al.* (1998b).

2.2.7. *in vitro*-Transkription von klonierten DNS-Fragmenten

2.2.7.1. Methode A

5 x Transkriptionspuffer („RiboMax“)	400 mM HEPES/KOH, pH 7,5 60 mM MgCl ₂ 10 mM Spermidin 200 mM DTT je 15 mM ATP, GTP, UTP, CTP 25 Enzymeinheiten/ml Anorganische Pyrophosphatase (Hefe)
--------------------------------------	---

Die über CsCl-Gradienten gereinigte Plasmid-DNS wurde durch Restriktion mittels eines hinter dem 3'-Ende des zu transkribierenden Inserts schneidenden Restriktionsenzym linearisiert und nochmals mit Phenol/Chloroform ausgeschüttelt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde folgender Transkriptionsansatz pipettiert:

linearisierte Plasmid-DNS	2,5 µg
5 x Transkriptionspuffer	5,0 µl
RNAsin RNase-Inhibitor	1,0 µl
T3/T7 RNS-Polymerase (je nach Promotor / 50 Enzymeinheiten/µl)	0,9 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Nach 2 h Inkubation in einem Wasserbad wurden dem Ansatz weitere 0,9 µl frische RNS-Polymerase hinzugefügt und die Inkubation um zusätzliche 2 h verlängert. Die Qualität der erhaltenen RNS wurde anschließend durch Elektrophorese eines Aliquots auf einem Agarosegel (1,3% Agarose in 1 x MOPS-Puffer) analysiert; war diese zufriedenstellend, wurde die RNS durch Zugabe von 2,5 x Vol. 100% Ethanol/3 M Natriumacetat (20:1) präzipitiert und in diesem Zustand bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.7.2. Methode B

Transkriptionspuffer	vom Hersteller des verwendeten Enzyms, 5 x oder 10 x
5 x NTP mit reduziertem GTP-Anteil	je 2,5 mM ATP, CTP, UTP 0,25 mM GTP
25 x GTP	11,25 mM GTP
„capping“-Nukleotid	5 mM m ⁷ G(5')ppp(5')G

Pipettierschema:

linearisierte Plasmid-DNS	2 µg
Transkriptionspuffer	$\frac{1}{5}$ bzw. $\frac{1}{10}$ Vol. (je nach Stamm- lösung)
5 x NTP mit reduziertem GTP-Anteil	5 µl
„capping“-Nukleotid	2,5 µl
1 M DTT	0,5 µl
RNAsin RNase-Inhibitor	0,5 µl
T3/T7 RNS-Polymerase (je nach Promotor / 50 Enzym- einheiten/µl)	0,5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Nach 30 Min. Inkubation bei 37°C auf dem Wasserbad wurde dem Ansatz 1 µl 25 x GTP hinzugefügt und die Inkubation für weitere 30 Min. fortgesetzt. Die Analyse der erhaltenen RNS wurde entsprechend Methode A durchgeführt.

2.2.8. *in vitro*-Translation

Mit der nach Abschnitt 2.2.7. gewonnenen RNS wurden in zwei verschiedenen Systemen *in vitro* Translationsexperimente durchgeführt:

2.2.8.1. Translation unter Verwendung von Kaninchen-Retikulocytenlysat

Pipettierschema:

Retikulocytenlysat (Fa. Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braun- schweig)	1,5 µl
Aminosäure-Mischung ohne Methionin (vom Hersteller)	0,5 µl
³⁵ S-Methionin (15 µCi/µl)	0,35 µl
0,7 M KCl	0 – 0,56 µl
1 mM Magnesiumacetat	0 oder 1 µl
H ₂ O	ad 6,25 µl

Es wurden mehrere verschiedene Ansätze mit unterschiedlicher KCl-Konzentration und jeweils mit oder ohne Magnesiumacetat pipettiert, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Pro Ansatz wurden 10 µl der präzipitierten RNS (bzw. bis zu 100 µl von nach Methode B gewonnener RNS) abzentrifugiert. Das Sediment wurde kurz luftgetrocknet und in der jeweiligen Menge H₂O rückgelöst. Die Translation erfolgte durch 30-minütige Inkubation bei 30°C

in einem Wasserbad; anschließend wurden die Ansätze per Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.8.2. Translation unter Verwendung von Weizenkeimextrakt

Pipettierschema:

Weizenkeimextrakt (Fa. Promega Corp., Mannheim)	5 μ l
Aminosäure-Mischung ohne Methionin (vom Hersteller)	0,8 μ l
³⁵ S-Methionin (15 μ Ci/ μ l)	0,5 μ l
1 M Kaliumacetat	0 – 1,4 μ l
RNAsin RNase-Inhibitor	0,2 μ l
H ₂ O	ad 10 μ l

Es wurden in der Regel, den Empfehlungen des Herstellers folgend, drei verschiedene Ansätze mit steigender Kaliumacetat-Konzentration pipettiert, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Pro Ansatz wurden 10 μ l der präzipitierten RNS (bzw. bis zu 100 μ l von nach Methode B gewonnener RNS) abzentrifugiert. Das Sediment wurde kurz luftgetrocknet und in der jeweiligen Menge H₂O rückgelöst. Die Translation erfolgte während ein- bis zweistündiger Inkubation bei 25°C in einem Wasserbad. Anschließend wurden die Proben einer Analyse durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen.

2.2.9. Transformation von Pflanzen mit rekombinanter DNS

2.2.9.1. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Methode I: Konjugativer Transfer von *E. coli* nach *A. tumefaciens* („triparental mating“)

Eine Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 wurde durch Impfen einer einzelnen Kolonie in 5 ml MinA-Medium mit 100 μ g/ml Rifampicin und zweitägige Inkubation bei 30°C herangezogen. Ebenso wurden zwei verschiedene Kulturen von *E. coli* DH5 α , eine den rekombinanten Vektor enthaltend, die andere pRK2013, das sogenannte Helferplasmid, durch Impfen einer Kolonie in 5 ml 2YT-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin und Inkubation über Nacht bei 37°C angesetzt. Alle drei Kulturen wurden abzentrifugiert, die beiden *E. coli*-Stämme anschließend in je 5 ml, die Agrobakterien in 1 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert. Für die Konjugation wurden auf einer Anzuchtsplatte mit 2YT-Agar ohne Antibiotika 50 μ l von jeder der drei Bakteriensuspensionen vereinigt ausplattiert. Zu Kontrollzwecken wurden Platten angefertigt, bei denen wechselweise je einer der beiden *E. coli*-Stämme weggelassen wurde. Nach Inkubation über Nacht bei 30°C wurde der herangewachsene Bakteri-

enrasen abgeschabt, in 1 ml 2YT-Medium resuspendiert und ein Aliquot in 2YT-Medium 1:100 verdünnt. Von der verdünnten Suspension wurden anschließend 50 – 300 µl auf Selektionsmedium (MinA-Agar mit Rifampicin und Kanamycin) ausplattiert. Die Bakterienplatten wurden bei 30°C bis zum Auftreten sichtbarer Kolonien inkubiert, üblicherweise ca. 3 Tage. Kolonien wurden in MinA-Medium mit Rifampicin und Kanamycin überimpft und nach Heranwachsen der Kulturen auf korrekte Transformation untersucht. Dazu wurde die DNS nach dem üblichen Protokoll von Birnboim & Doly (1979), unter Verlängerung der Behandlung mit der lysozymhaltigen Lösung I, extrahiert und durch Restriktion und Agarosegelelektrophorese analysiert. Aus positiven Transformanten wurden nach der gleichen Methode wie bei *E. coli* Stammkulturen angelegt und bei –70°C gelagert.

Methode II: Direkte Transformation von *A. tumefaciens* nach Holsters *et al.* (1978), modifiziert nach An *et al.* (1988) und Walkerpeach *et al.* (1994)

Zwei ml einer frischen Agrobakterien-Kultur in YEB-Medium mit Rifampicin wurden in 50 ml des gleichen Wachstumsmediums verdünnt. Diese wurde bei 28°C unter Schwenken inkubiert bis die Extinktion der Suspension bei 600 nm Wellenlänge den Wert 1,0 erreichte (ca. 7-8 h). Die Kultur wurde abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem 10 mM CaCl₂ resuspendiert. Die kompetenten *Agrobacterium*-Zellen wurden in Reaktionsgefäße aliquotiert (100 µl), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70°C aufbewahrt.

Zur Transformation der Agrobakterien wurden 1-2 µg rekombinanter DNS direkt zu den gefrorenen kompetenten Zellen pipettiert und für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 1 ml YEB-Medium zugegeben und die Suspension für 4 h bei 28°C geschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation und Resuspendierung der Bakterien in 100 µl YEB. Diese wurden komplett auf einer Bakterienplatte mit Selektionsmedium (YEB-Agar mit Rifampicin und Kanamycin) ausplattiert und bis zum Auftreten deutlicher Kolonien bei 28°C inkubiert. Die Untersuchung auf korrekte Transformation erfolgte wie bei Methode I.

2.2.9.2. Infiltration von Pflanzen mit Agrobacterium tumefaciens nach Bechthold et al. (1993)

Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* var. Columbia wurden in Pflanztöpfen (Ø ca. 8 cm) bis zur Entwicklung der ersten Blütensprosse angezogen und diese abgeschnitten, um die Ausbildung einer größeren Zahl zu fördern. Nach Entwicklung der sekundären Blütensprosse und dem Erreichen der Blütenreife wurden die Pflanzen infiltriert.

Von den überprüften *Agrobacterium*-Transformanten wurden 500 ml-Kulturen angesetzt und bis zur stationären Phase angezogen (ca. 2 Tage). Die Bakterien wurden durch 10 Min. Zen-

trifugation bei 4500 x g (Beckman-Zentrifuge J6-B) und Raumtemperatur sedimentiert, mit 100 ml Infiltrationsmedium gewaschen und in 330 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Die Infiltrationssuspension wurde in eine sterile Magenta-Box überführt und diese in einen an eine Vakuumpumpe (Diaphragma Vakuumpumpe MD4C, Fa. Vacuubrand GmbH & Co.) angeschlossenen Exsikkator gestellt. Nachdem ein Anzuchtstopf mit *Arabidopsis*-Pflanzen kopfüber so auf die Magenta-Box plaziert wurde, daß die Pflanzen zur Gänze in die Suspension eintauchten, wurde der Exsikkator luftdicht verschlossen und ein Vakuum angelegt, bis einzelne Bläschen das Austreten von Luft aus dem Pflanzengewebe anzeigten. Jeder Anzuchtstopf wurde auf diese Weise für 20 Min. infiltriert, die gleiche Infiltrationssuspension für 3 - 4 Töpfe wiederverwendet und dann verworfen. Die infiltrierten Töpfe wurden über Nacht unter einer Haube auf die Seite gelegt, anschließend wieder aufgerichtet und zurück in das Gewächshaus gebracht. Nach zwei Wochen Regenerationszeit wurde die Infiltration mit allen Pflanzen wiederholt.

Nach Abreifen der infiltrierten Pflanzen wurden die Samen (= F1-Generation) geerntet und auf erfolgreiche Transformanten untersucht.

2.2.9.3. Selektion transformierter Pflanzen

Je etwa 10 mg (ca. 500 Stück) Samen der F1-Generation wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße eingewogen und durch Waschen mit 70%igem Ethanol und anschließende Inkubation in einer 5%igen Lösung von Dimanin (Chlorbleiche) in Wasser für 5 Min. sterilisiert. Anschließend wurden sie dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, mit 1 ml 0,1% Agarose auf eine Platte mit Selektionsmedium aufgebracht und verteilt. Die Platten wurden 48 h bei 4°C in einer Kühlkammer vernalisiert und zum Keimen in eine Anzuchtskammer (24,5°C; konstante Beleuchtung mit ca. 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 16 Stunden pro Tag) überführt.

Keimlinge, die ca. 8 Tage nach Ausbringen der Samen ein gut entwickeltes Wurzelsystem besaßen und zur Ausbildung von Sekundärblättern fähig waren, wurden einzeln auf frische Platten mit Selektionsmedium transferiert und für weitere ca. 8 Tage in der Anzuchtskammer herangezogen, danach in separate Anzuchtstöpfe auf Erde überführt und in das Gewächshaus gebracht. Die Selektion wurde durch mindestens zweimaliges Besprühen der Pflänzchen mit 0,1%iger BASTA-Lösung (Fa. Agrevo) während der ersten zwei Wochen auf Erde aufrechterhalten, alle überlebenden Pflanzen bis zur Samenreife herangezogen und abgeerntet (= F2-Generation).

Die Samen der F2-Generation wurden nach der gleichen Methode ausgesät und selektioniert. Die Blätter der daraus entsprungenen und nach der Selektion überlebenden Pflanzen wurden

für die Präparation der Gesamt-DNS herangezogen (siehe Abschnitt 2.2.4.2.). Diese wurde mittels PCR auf erfolgreiche Transformation der Pflanzen untersucht.

2.2.10. Allgemeine biochemische Methoden

Folgende Standardmethoden kamen in der vorliegenden Arbeit ohne Modifikation zum Einsatz:

- Konzentrationsbestimmung proteinhaltiger Lösungen (nach Bradford, 1976; bzw. Lowry et al., 1951)
- Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen im kontinuierlichen („Tank Blot“) bzw. diskontinuierlichen („semi-dry-blot“) Puffersystem (nach Westermeier, 1989)
- Bestimmung des Chlorophyllgehalts in Präparationen aus pflanzlichem Gewebe (nach Arnon, 1949)

2.2.11. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinpräparationen

2.2.11.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)

Acrylamid-Stammlösung	30% Acrylamid 0,8% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid
-----------------------	---

Gelaufbau:

Trenngel:	zw. 10 – 12% Acrylamid aus Acrylamid-Stammlösung 375 mM Tris/HCl, pH 8,8 0,1% SDS
-----------	---

Sammelgel:	25 ml Acrylamid-Stammlösung 38 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 78 ml H ₂ O 0,1% SDS
------------	---

Sowohl Trenn- als auch Sammelgel wurden durch Zugabe von $\frac{1}{100}$ Vol. 10%iger APS-Lösung und $\frac{1}{1000}$ Vol. TEMED zur Polymerisierung gebracht. Üblicherweise wurden Gele mit einem Durchmesser von 1 oder 1,5 mm verwendet.

Soweit nicht anders angegeben, wurden Proteinpräparationen über den zuvor bestimmten Proteingehalt standardisiert, chlorophyllhaltige Präparationen über den Chlorophyllgehalt. Um bei Gelläufen mit Proben beiderlei Art möglichst gleiche Proteinkonzentrationen zu er-

reichen, wurde von einem geschätzten Verhältnis 1 mg Chlorophyll = 5 mg Protein ausgegangen und die Lademenge bei Bedarf angepaßt.

Die Proteinpräparationen wurden nach Denaturierung durch 5 Min. Kochen in 4 x Laemmli-Probenpuffer aufgetragen; der Lauf erfolgte in 1 x Laemmli-Laufpuffer mit 0,1% SDS, bis die Lauffront, gekennzeichnet durch das Bromphenolblau im Probenpuffer, annähernd aus dem Gel austrat.

2.2.11.2. Schwach denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sdPAGE)

Hier handelt es sich um eine geringfügige Abwandlung des in Abschnitt 2.2.11.1. beschriebenen Verfahrens, bei der in den Gellösungen kein SDS eingesetzt wurde. Zudem wurde ein abweichender Probenpuffer verwendet und die Proben wurden vor dem Auftrag nicht hitzedenaturiert:

Probenpuffer, nicht denaturierend	400 mM Tris/HCl, pH 8,0 50% Glycerin 0,01% Bromphenolblau
-----------------------------------	---

Laufpuffer: identisch zu dem in Abschnitt 2.2.11.1 beschrieben.

2.2.11.3. Zweidimensionale Elektrophorese nach O'Farrell (1975) und Rickwood (1990)

Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Acrylamid-Stammlösung	28,38% Acrylamid 1,62% Bis-Acrylamid
Gelmischung	0,665 ml Acrylamid-Stammlösung 2% Nonidet-P 40 250 µl „BioLyte Broad Range“-Ampholytmischung (Fa. BioRad) 25 µl 10% APS 5 µl TEMED ad 5 ml H ₂ O
Probenpuffer	2% Nonidet-P 40 1% DTT 100 µl „BioLyte Broad Range“-Ampholytmischung ad 5 ml H ₂ O
Überschichtpuffer	1% „BioLyte Broad Range“-Ampholytmischung in H ₂ O
Anodenpuffer	20 mM NaOH
Kathodenpuffer	10 mM H ₃ PO ₄

Die Gelmischung wurde angesetzt und in mit Parafilm am unteren Ende versiegelten Glasröhrchen (Länge 7,5 cm; Innendurchmesser 2 mm), welche in einer IEF-Apparatur befestigt waren, zur Polymerisation gebracht, wobei am oberen Ende ca. 1 – 1,5 cm frei blieben. Dieser Freiraum wurde mit Überschlüchtlösung gefüllt, welche nach erfolgter Polymerisation durch Probenpuffer ersetzt wurde. Nach etwa 1 h Inkubation wurde die untere Kammer der Apparatur mit Kathodenpuffer bis zu Eintauchen der Glasröhrchen gefüllt und die Parafilmsiegel entfernt. Ein Herausrutschen der Gele wurde durch den Einsatz von quer über die untere Öffnung der Glasröhrchen gespannten und mittels Haushaltsgummis befestigten einzelnen Gaze-fasern verhindert. Nach dem Entfernen aller Luftblasen vom eintauchenden Ende der Röhrchen wurde die obere Kammer mit Anodenpuffer gefüllt und die Präfokussierung zur Voreinstellung des pH-Gradienten gestartet. Dazu wurde bei 4°C eine Stromstärke von 2 mA bei einer Leistungsbegrenzung auf maximal 2 W eingestellt und so lange aufrecht erhalten, bis die erforderliche Spannung 1000 V erreicht hatte. Anschließend wurde der Anodenpuffer abgesaugt, der Probenpuffer aus den Röhrchen entfernt, die zu untersuchende Präparation (in Probenpuffer) aufgetragen und mit Probenpuffer bis zur vollständigen Füllung der Röhrchen überschichtet. Die obere Kammer wurde erneut mit Anodenpuffer gefüllt. Die Fokussierung erfolgte durch Anlegen einer konstanten Spannung von 300 V bei 4°C über Nacht, danach wurde die Spannung zur schärferen Fokussierung der Proteine noch für 1 h auf 1000 V erhöht.

Zweite Dimension: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Inkubationspuffer	125 mM Tris/HCl, pH 6,8 2,5% SDS 5 mM DTT 10% Glycerin 0,05% Bromphenolblau
-------------------	---

Die Fokussierungs-Gelröllchen wurden aus den Glasröhrchen durch Ausblasen befreit und zur Entfernung der Ampholyte sowie zur Äquilibration für 30 Min. in Inkubationspuffer bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurden sie in das Sammelgel eines normalen Elektrophoresegels (siehe Abschnitt 2.2.11.2.) einpolymerisiert. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte durch schwach denaturierende Elektrophorese entsprechend Abschnitt 2.2.11.2., wobei diese aufgrund der begrenzten Länge der für die erste Dimension eingesetzten Glasröhrchen und damit der Gelrollen auf ca. 6,5 cm auf den Einsatz von Miniaturgelen (9 x 7 cm) beschränkt werden mußte.

2.2.11.4. Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue

Coomassie-Färbelösung	0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 50% Methanol 10% Essigsäure
Entfärbelösung	40% Methanol 10% Essigsäure
Entfärbelösung schwach	10% Methanol 7% Essigsäure

Gele wurden zunächst durch ca. 1 h Inkubation in Entfärbelösung leicht geschrumpft, dann für 2 - 4 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation in Entfärber und falls nötig in schwachem Entfärber für mehrere Stunden, bis die Proteinbanden optimal angefärbt erschienen. Die Gele wurden bis zur Trocknung in Gelkonservierungslösung, vorzugsweise bei 4°C, aufbewahrt.

2.2.11.5. Silberfärbung von Proteingelen

Fixierlösung	50% Ethanol 12% Essigsäure 0,05% Formaldehyd
Imprägnierlösung	0,2% AgNO ₃ 0,075% Formaldehyd
Entwickler	6% Na ₂ CO ₃ 0,05% Formaldehyd 0,0004% Na ₂ S ₂ O ₃
Stopplösung	50% Ethanol 12% Essigsäure

Die zu färbenden Gele wurden nach der Elektrophorese für mindestens 1 h in Fixierlösung eingelegt, anschließend dreimal für 30 Min. in 50% Ethanol gewaschen. Es folgten eine Inkubation für 90 Sek. in 0,02%iger Na₂S₂O₃-Lösung und drei Waschschrte von je 30 Sek. in H₂O. Anschließend wurden die Gele im Dunkeln für 30 Min. in Imprägnierlösung inkubiert, zweifach mit H₂O gewaschen und in Entwickler gegeben. Die Entwicklung wurde bis zur zufriedenstellenden Anfärbung aller Proteinbanden durchgeführt und nach Abgießen des Entwicklers durch unmittelbare Zugabe von Stopplösung beendet. Über kurzfristige Zeiträume verblieben die Gele in 7%iger Essigsäure; war eine längere Aufbewahrung erforderlich, wurden sie nach Waschen in H₂O in Gelkonservierungslösung überführt und bei 4°C gelagert.

2.2.12. Isolierung von intakten Chloroplasten aus pflanzlichem Gewebe

2.2.12.1. Isolierung und Subfraktionierung von Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen

Isolationsmedium	50 mM HEPES/KOH, pH 8,0 330 mM Sorbit 5 mM MgCl ₂
Aufbrechpuffer	50 mM HEPES/KOH, pH 8,0 5 mM MgCl ₂
Percoll-Stammlösung	330 mM Sorbit in Percoll, pH 7,9 (eingestellt mittels HCl)

Mittels eines Gradientenmischers wurden je 15 ml Percoll-Stammlösung und Isolationsmedium pro Gradient zu linearen Percollgradienten vermischt und in geeignete Zentrifugenbecher gefüllt. Die Gradienten wurden bis zur Verwendung bei 4°C kühlgestellt. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden in einem Kühlraum bei 4°C und/oder auf Eis durchgeführt.

Ca. 80 g frisch geerntete Sekundärblätter von Erbsenkeimlingen (*Pisum sativum* var. Rosa Krone) wurden in 200 ml eiskaltem Isolationsmedium unter Verwendung eines Küchenmixers (Waring Blender) in kurzen, schonenden Stößen homogenisiert und das Homogenat durch zwei Lagen Nylongaze direkt in Zentrifugenbecher filtriert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1500 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment schonend in 5 – 10 ml Isolationsmedium resuspendiert und anschließend unter Verwendung einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf die linearen Percollgradienten geschichtet. Die Gradienten wurden 25 Min. bei 4°C und 10000 x g in einem Ausschwingrotor (JA 13.1, Fa. Beckman) zentrifugiert. Erfolgreiche Separationen zeigten zwei deutliche Banden im Gradienten, von denen die obere von degradierten, die untere aus intakten Chloroplasten bestand. Der obere Bereich der Gradienten wurde einschließlich der oberen Chloroplastenbande abgesaugt und verworfen, die Bande intakter Chloroplasten mittels einer abgeschnittenen Pipettenspitze in frische Zentrifugenröhrchen überführt und mit mindestens 2 Vol. Isolationsmedium versetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2000 x g, anschließend wurden die Chloroplasten mit Isolationsmedium gewaschen und abermals bei 4°C und 2000 x g abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde in 2 – 3 ml Isolationspuffer resuspendiert und der Chlorophyllgehalt der Suspension ermittelt.

Die intakten Chloroplasten wurden durch Zentrifugation sedimentiert und osmotisch durch Resuspendierung in Aufbrechpuffer sowie mechanisch durch Homogenisierung in einem Glashomogenisator (Fa. Schott) lysiert. Anschließend wurde 8 Min. bei 4°C und 10000 x g

zentrifugiert und das Sediment (intakte Thylakoide) zweifach durch Homogenisierung in Aufbrechpuffer und erneute Zentrifugation gewaschen. An dieser Stelle war es möglich, die gewonnenen Thylakoide in wenig Isolationsmedium zu resuspendieren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C einzufrieren.

Für die Lyse der Thylakoide wurden diese in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, resuspendiert und in einem Ultraschallgerät (Sonifier B-12; Fa. Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut) mehrfach für je ca. 10 Sek. auf Stufe 7 beschallt; dabei wurden, um zu starke Erwärmung der Suspension zu vermeiden, Kühlpausen auf Eis eingelegt. Das Homogenat wurde in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen (Fa. Beckman) umgefüllt und für 1 h bei 4°C und $300000 \times g$ in einer Ultrazentrifuge (L8-55M, Fa. Beckman) zentrifugiert. Der die Komponenten des Thylakoidlumens enthaltende Überstand wurde einer Proteingehaltsbestimmung nach Bradford unterzogen, mit Sorbit versetzt und bei -20°C bis zu späterer Verwendung eingefroren. Das Sediment (= Thylakoidmembranen) wurde in wenig Isoliermedium resuspendiert und nach Bestimmung des Chlorophyllgehalts ebenfalls eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

Für die spätere Analyse proteolytischer Aktivität im Thylakoidlumen wurde dieses zunächst unter Zuhilfenahme einer Ultrafiltrationszelle (Fa. Amicon GmbH, Witten), bestückt mit einer Membran der Ausschlußgröße 10 kDa, unter N_2 -Druck bei 4°C auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingengt. Eventuell erforderliche stärkere Aufkonzentrierung erfolgte durch Zentrifugation in speziellen Konzentratoren (Centricon, Fa. Amicon).

2.2.12.2. Isolierung von Chloroplasten aus Spinat

Homogenisierungsmedium	50 mM HEPES/KOH, pH 7,6 330 mM Sorbit 1 mM MgCl_2 1 mM MnCl_2 2 mM Na-EDTA 5 mM Na-Ascorbat
------------------------	--

PBF-Percoll Gebrauchslösungen	45%ig	85%ig
	27 ml PBF-Percoll Stammlsg.	42,5 ml PBF-Percoll Stammlsg.
	3 ml 1 M HEPES/KOH, pH 7,6	2,5 ml 1 M HEPES/KOH, pH 7,6
	3,6 g Sorbit	3 g Sorbit
	240 μl 0,5 M Na-EDTA	200 μl 0,5 M Na-EDTA
	60 μl 1 M MgCl_2	50 μl 1 M MgCl_2
	ad 60 ml H_2O	ad 50 ml H_2O

PBF-Percoll Stammlösung	2,4 g PEG 6000 0,8 g BSA 0,8 g Ficoll 400 ad 80 ml mit Percoll
Resuspensionsmedium	50 mM HEPES/KOH, pH 7,6 330 mM Sorbit

Zur Herstellung von Percoll-Stufengradienten wurden in 30 ml Borosilikatglas-Zentrifugenröhrchen (Corex) 10 ml der 85%igen mit 12 ml der 45%igen PBF-Percoll Gebrauchslösung vorsichtig überschichtet.

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden in einem Kühlraum bei 4°C und/oder auf Eis durchgeführt.

Ca. 60 g frische, gewaschene und trockengeschleuderte Spinatblätter wurden mit 180 ml Homogenisierungsmedium im Waring Blender in kurzen, schonenden Stößen homogenisiert und das Homogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth (Fa. Calbiochem, Bad Soden) in Zentrifugenbecher filtriert. Die Zentrifugenbecher wurden in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge auf 4000 x g beschleunigt und der Rotor ohne Bremse auslaufen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig in 3 ml Homogenisierungsmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension unter Zuhilfenahme einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf die Percoll-Stufengradienten aufgebracht und 10 Min. bei 15000 x g in einem Ausschwingrotor (JA 13.1, Fa. Beckman) zentrifugiert. Wie in Abschnitt 2.2.11.1. beschrieben wurde die Bande intakter Chloroplasten abgesaugt und in ein frisches Corex-Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte ein Waschschrift durch Auffüllen des Röhrchens mit Homogenisierungsmedium und kurzes Anzentrifugieren auf 4000 x g (keine Bremse); nach Resuspension in Homogenisierungsmedium wurden alle Chloroplasten in einem Röhrchen vereinigt und die Waschung wiederholt. Schließlich wurden die Chloroplasten in wenig Resuspendierungsmedium aufgenommen und der Chlorophyllgehalt bestimmt.

Die auf die beschriebene Art und Weise gewonnenen intakten Spinatchloroplasten dienten als Ausgangsmaterial für eine Reihe verschiedener Versuche, so für die Subfraktionierung in Stroma, Gesamtthylakoide, Thylakoidmembranen und Thylakoidlumen (siehe Abschnitt 2.2.12.1.) und weitergehende Experimente, vor allem an den Membranfraktionen, oder auch für den *in organello*-Import von *in vitro*-synthetisierten Proteinen. Sofern der beabsichtigte Verwendungszweck dies zuließ, konnten die Chloroplasten im Resuspendierungsmedium bei -20°C eingefroren und aufbewahrt werden.

2.2.12.3. *Isolierung und Subfraktionierung intakter Plastiden aus verschiedenen pflanzlichen Geweben (basierend auf Eichacker et al., 1996)*

Homogenisierungsmedium	50 mM 50 mM HEPES/KOH, pH 8,0 400 mM Sorbit 2 mM EDTA
Waschmedium	50 mM 50 mM HEPES/KOH, pH 8,0 400 mM Sorbit
1 x T(m)K-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 6,8 1 mM MgCl ₂ 20 mM KCl
Percollgradienten-Gebrauchslösungen	45% und 85%, wie in Abschnitt 2.2.12.2.; mit reinem Percoll statt PBF-Percoll

Dieses Protokoll wurde sowohl für die Gewinnung intakter Etioplasten aus Spinat als auch für die Präparation von Chloroplasten neben Spinat auch aus *Arabidopsis thaliana* herangezogen.

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden in einem Kühlraum bei 4°C und/oder auf Eis durchgeführt. Für die Isolierung von Etioplasten wurde dieser zusätzlich abgedunkelt und nur durch eine Grünlichtlampe schwach erhellt.

Etwa 60 g gesäubertes Pflanzenmaterial wurde in ca. 200 ml Homogenisierungsmedium im Waring Blender in kurzen, schonenden Stößen homogenisiert und das Homogenat wurde durch zwei Lagen Nylongaze direkt in die Zentrifugenbecher filtriert. Die Zentrifugation erfolgte wie in Abschnitt 2.2.12.2. beschrieben. Das Sediment wurde in Homogenisierungsmedium resuspendiert und über Percoll-Stufengradienten, wie in Abschnitt 2.2.12.2. beschrieben, in intakte und aufgebrochene Plastiden separiert. Die intakten Plastiden wurden zweifach in isotonischem Waschmedium gewaschen und vereinigt. Für Chloroplasten folgte eine Chlorophyllkonzentrationsbestimmung.

Zur Gewinnung der Gesamtthylakoide aus den Chloroplasten wurden diese in einem Überschuß T(m)K Puffer resuspendiert und mittels mechanischer Druckerzeugung in einem Glas-homogenisator (Fa. Schott) lysiert. Nach Zentrifugation für 5 Min. bei 3000 x g und 4°C wurde der Überstand (= Stroma) abgetrennt und das Sediment (= Thylakoide) in T(m)K-Puffer resuspendiert. Für die Aufbewahrung als Gesamtthylakoide wurde die Suspension, mit etwas Sorbit versehen, bei -20°C eingefroren; ansonsten erfolgte eine Separation in Thylakoidmembranen und Lumen durch Ultraschall-Lyse und Ultrazentrifugation wie in Abschnitt 2.2.12.1. beschrieben. Stroma und gegebenenfalls Lumen wurden je nach Anwendungszweck

durch Ultrafiltration bis zur erstrebten Proteinkonzentration eingengt (vgl. Abschnitt 2.2.12.1.).

2.2.13. Import von *in vitro* synthetisierten Proteinen in intakte Chloroplasten

Resuspendierungspuffer I	50 mM HEPES/KOH, pH 7,6 330 mM Sorbit
Resuspendierungspuffer II	50 mM HEPES/KOH, pH 8,0 330 mM Sorbit
Lysepuffer	10 mM Tricin/NaOH, pH8,0
Resuspendierungspuffer III	10 mM Tricin/NaOH, pH8,0 330 mM Sorbit
Thermolysin-Stammlösung	2 mg/ml in 0,1 M CaCl ₂

Intakte Spinatchloroplasten wurden, wie unter Abschnitt 2.2.12.2. beschrieben, gewonnen und mit Resuspendierungspuffer I auf eine Chlorophyllkonzentration von ca. 4 mg/ml eingestellt.

In vitro-Translationsprodukte wurden nach Abschnitt 2.2.9. gewonnen und entweder sofort in der Importreaktion eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren maximal über Nacht bei -70°C aufbewahrt und unmittelbar vor dem Import auf Eis aufgetaut.

Der Importansatz wurde nach folgendem Pipettierschema in 2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt:

1 M HEPES/KOH, pH 8,0	12 μl
250 μM Methionin	12 μl
100 μM Magnesium-ATP	2,4 μl
<i>In vitro</i> -Translationsprodukt	30 μl
Chloroplasten	ad 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Endkonzentration an Chlorophyll
2 M Sorbit	ad 330 mM Endkonzentration (unter Berücksichtigung der bereits in der Chloroplastensuspension enthaltenen Menge)
H ₂ O	ad 240 μl

Der Importansatz wurde für 30 (bei Verwendung von Retikulocytenlysat als Translationsmedium) bzw. 45 (bei Weizenkeimextrakt) Min. bei 25°C in einem beleuchteten Wasserbad inkubiert. Dabei wurden die Reaktionsgefäße von Zeit zu Zeit bewegt, um eine gute Durch-

mischung des Inhalts aufrecht zu erhalten. Anschließend wurden 500 µl Resuspendierungspuffer II hinzugefügt, 1 Min. bei 4°C und 2500 x g zentrifugiert und das Sediment wurde nach Abtrennung des Überstandes in 500 µl Resuspendierungspuffer II wieder aufgenommen. Um eventuell an der Außenhülle der Chloroplasten anhängende, aber nicht importierte, Translationsprodukte abzuverdauen wurden 25 µl der Thermolysin-Stammlösung hinzugefügt und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) gestoppt und die Suspension unter Zuhilfenahme einer abgeschnittenen Pipettenspitze in einem weiteren 2 ml Reaktionsgefäß auf 1 ml 45% PBF-Percoll geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation von 7 Min. bei 4°C und 5000 x g, anschließend wurde der (die bei den vorhergehenden Prozeduren zerstörten Chloroplasten enthaltende) Überstand verworfen und das Sediment (= intakte Chloroplasten) in 1 ml Resuspendierungspuffer II und 5 µl 0,5 M EDTA resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für 1 Min. wurden die Chloroplasten durch Resuspension in 400 µl Lysepuffer und Inkubation auf Eis für 10 Min. aufgebrochen. Danach wurden 32 µl 4 M NaCl zugesetzt und die Inkubation um 5 Min. verlängert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 17000 x g für 4 Min.. 200 µl des Überstandes (= Stroma) wurden für die spätere Analyse aufgehoben und durch Zugabe von 1 ml 80%igem Aceton präzipitiert, der Rest verworfen. Das Sediment (= Thylakoide) wurde durch Resuspendierung in 1 ml Resuspendierungspuffer III und erneute Zentrifugation bei 17000 x g für 4 Min. gewaschen und danach in 200 µl Resuspendierungspuffer III aufgenommen. Die Suspension wurde in zwei 100 µl-Aliquote aufgeteilt; zu einem wurden 7,2 µl Resuspendierungspuffer III zugegeben, zu dem anderen 7,2 µl Thermolysin-Stammlösung. Nach Inkubation von 30 Min. auf Eis wurden zu beiden Aliquoten 7,5 µl 0,5 M EDTA hinzugefügt und diese wurden erneut bei 17000 x g 4 Min. lang abzentrifugiert.

In einigen Fällen wurde parallel zur Inkubation der Thylakoide mit Thermolysin zusätzlich auch eine Verdauung mit Trypsin durchgeführt; in diesem Fall wurden 7,2 µl einer 1 mg/ml Stammlösung von Trypsin zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von 7,5 µl einer 1 mg/ml Stammlösung aus Trypsin-Inhibitor von Sojabohnen gestoppt.

Außerdem wurden in einigen Fällen die Thylakoide in Thylakoidmembranen und Thylakoidlumen separiert; hierzu wurden sie, wie unter Abschnitt 2.2.12.1. beschrieben, mit Ultraschall lysiert und durch Ultrazentrifugation getrennt. Die Lumenpräparation wurde wie auch das Stroma durch Zugabe von 5 x Vol. Aceton präzipitiert.

Die Importprodukte wurden durch direktes Aufnehmen der Membransedimente (bzw. der Präzipitate von Stroma und Lumen) in 2 x Laemmli-Probenpuffer und Polyacrylamid-

Gelelektrophorese analysiert. Die Gele wurden nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue auf Whatman-Papier aufgezogen und bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Nach Markierung der Größenstandards mit radioaktiver Tinte erfolgte die Auswertung durch Belegen mit PhosphorImager-Platten in einer Expositionskassette.

2.2.14. Isolierung von Grana- und Stromathylakoiden durch differentielle Zentrifugation (nach Kyle et al., 1984)

Ansatzmedium	10 mM Na-Phosphat, pH 7,4 100 mM Saccharose 5 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
--------------	---

Intakte Thylakoide aus Spinat wurden nach der in Abschnitt 2.2.12.2. beschriebenen Methode gewonnen, kurz abzentrifugiert und mit Ansatzmedium auf eine Chlorophyllkonzentration von ca. 0,5 mg/ml resuspendiert. 2,5 ml dieser Suspension wurden in einem 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit 2,5 ml 0,4% Digitonin (wäßrige Lösung) vermischt und 2 Min. verdunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Solubilisierung wurde durch Zugabe von 20 ml eiskaltem Ansatzmedium gestoppt, anschließend wurde 3 Min. bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Nur der Überstand (solubilierte Thylakoide) wurde für die Fraktionierung weiterverwendet. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Min. bei 10000 x g und 4°C; das Sediment (= Granathylakoide) wurde aufbewahrt, der Überstand weiter 30 Min. bei 40000 x g und 4°C, zentrifugiert. Das Sediment dieses Zentrifugationsschritts (= Thylakoide aus der Übergangszone zwischen Grana- und Stromathylakoiden, „grana margins“) wurde ebenfalls aufbewahrt. Der verbleibende Überstand wurde abschließend für 70 Min. bei 50000 x g und 4°C zentrifugiert, um die Stromathylakoide zu sedimentieren. Diese, sowie die gewonnene Fraktion der „grana margins“, wurden in je 50 µl 50 mM HEPES/KOH, pH 7,4, resuspendiert und einer Chlorophyllkonzentrationsbestimmung unterzogen. Die Granathylakoide wurden zur weiteren Aufreinigung in 160 µl eiskaltem Ansatzmedium resuspendiert, mit 25 µl 10%iger wäßriger Lösung von Triton X-100 versetzt und verdunkelt für genau 1 Min. auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Ansatzmedium beendet, anschließend wurde 3 Min. bei 1000 x g zentrifugiert und das Sediment verworfen. Der Überstand wurde einer weiteren Zentrifugation von 20 Min. bei 12000 x g und 4°C unterzogen, das Sediment (= gereinigte Granathylakoide) in 50 µl 50 mM HEPES/KOH, pH 7,4, resuspendiert und ebenfalls einer Chlorophyllkonzentrationsbestimmung unterzogen.

Alle Thylakoidpräparationen wurden bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren aufbewahrt.

2.2.15. Methoden zur Subfraktionierung von Lumenpräparationen

2.2.15.1. Fraktionierung durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat

Die Lumenpräparation wurde, falls zuvor unter Sorbitzugabe eingefroren, nach dem Auftauen für 1 h bei 4°C gegen 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, dialysiert. Anschließend wurde das genaue Volumen der Lösung bestimmt und diese unter ständigem Rühren bei 4°C durch langsame Zugabe von festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf die erwünschte primäre Endkonzentration gebracht. Das Rühren der Lösung wurde für 30 Min. fortgesetzt, danach folgte eine Zentrifugation für 30 Min. bei 200000 x g und 4°C. Das Sediment wurde in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0, resuspendiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren. Das Volumen des Überstandes wurde erneut bestimmt und die oben beschriebene Fällungsprozedur bis zum Erreichen der sekundären Endkonzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wiederholt. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Das Aussalzen wurde fortgesetzt, bis die Lumenpräparation in die gewünschte Zahl an Fraktionen aufgetrennt war.

Übliche Vorgehensweise war die Auftrennung in folgende Fraktionen: 0 – 40%, 40 – 60%, 60 – 80% und >80%.

2.2.15.2. Gelfiltration

Säulenmaterial	Superdex 200 HR 30 (Pharmacia), Säulenlänge 100 cm, Durchmesser 1,5 cm
Säulenpuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl

Eingesetzte Lumenpräparationen wurden vor Beginn des Versuchs durch Gelfiltration auf PD-10-Säulen (Sephadex G 50, Pharmacia) auf den Säulenpuffer umgepuffert. Die Säule wurde mit Hilfe einer Laborpumpe bei 4°C mit Säulenpuffer äquilibriert, anschließend wurde die aufzutrennende Präparation aufgetragen. Der konstante Säulendurchfluß wurde aufrecht erhalten und nach ca. 10 Min. unter Zuhilfenahme eines automatischen Fraktionensammlers mit dem Auffangen von 400 µl-Fraktionen begonnen. Insgesamt wurden 50 Fraktionen gesammelt. Das Elutionsprofil wurde durch Bestimmung der Proteinkonzentration der Fraktionen über die Methode nach Bradford bestimmt und graphisch ausgewertet. Die weitere Analyse der Fraktionen erfolgte durch Gelelektrophorese und Proteasetests.

Anmerkung: Alle im Folgenden beschriebenen Chromatographiemethoden wurden im Mikromaßstab in Säulchen von 4 cm Länge und 0,75 cm Innendurchmesser durchgeführt.

2.2.15.3. Anionenaustauschchromatographie

Säulenpuffer 100 mM Tris/HCl, pH 8,0

Die Methode wurde mit zwei verschiedenen Säulenmaterialien durchgeführt, Q-Sepharose und DEAE-Sepharose (beide von Pharmacia). Die Säulen wurden jeweils mit Säulenpuffer äquilibriert und anschließend mit der Lumenpräparation beschickt. Die Elution erfolgte durch Waschen der Säulen mit jeweils 3 ml Puffer mit verschiedenen KCl-Konzentrationen und Auffangen des Durchflusses. Es wurden folgende Fraktionen gewonnen: Vorlauf (Waschen mit Säulenpuffer), Eluat 1 (Waschen mit 0,1 M KCl in Säulenpuffer), Eluat 2 (0,5 M KCl in Säulenpuffer) und Eluat 3 (1 M KCl in Säulenpuffer). Die weitere Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese und Proteasetests.

2.2.15.4. Hydrophobe Chromatographie

Säulenmaterial Phenyl-Sepharose „Fast Flow (High Sub)“, vorverpackt in „HiTrap“-Gebrauchssäulchen (Pharmacia)

Säulenpuffer 100 mM Tris/HCl, pH 8,0
3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Die Säule wurde mit Säulenpuffer bei 4°C äquilibriert und mit der aufzutrennenden Lumenpräparation, umgepuffert auf Säulenpuffer, beladen. Die Elution erfolgte durch Waschen der Säule mit jeweils 4 ml Puffer mit verschiedenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen und Auffangen des Durchflusses. Es wurden folgende Fraktionen gewonnen: Vorlauf (Waschen mit Säulenpuffer), Eluat 1 (Waschen mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 100 mM Tris/HCl, pH 7,6), Eluat 2 (1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 100 mM Tris/HCl, pH 7,6) und Eluat 3 (100 mM Tris/HCl, pH 7,6 ohne Ammoniumsulfat). Die weitere Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese und Proteasetests.

2.2.15.5. Affinitätschromatographie an Thiol-Sepharose

Säulenmaterial „Activated Thiol Sepharose“ 4B (Pharmacia)

Säulenpuffer 100 mM Tris/HCl, pH 8,0

Aktivierung der Ladefraktion: 500 μl einer frischen Lumenpräparation wurden mit 42 μl 1%igem β -Mercaptoethanol (= 10 mM) versetzt und für ca. 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Gelfiltration über eine PD-10-Säule; anschließend wurden 400 μl einer 1,5 mM Lösung von Dipirydyldisulfid in Säulenpuffer zugegeben.

Chromatographie: Die Säule wurde bei 4°C mit Säulenpuffer äquilibriert und mit 1,2 ml der Ladefraktion beschickt. Es wurden nur zwei verschiedene Eluate gewonnen: der Vorlauf durch Waschen mit 6 ml Säulenpuffer und das Affinitäts-Eluat durch anschließendes Waschen mit 25 mM DTT in Säulenpuffer. Die weitere Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese und Proteasetests. Die Säule wurde durch zweifaches Spülen mit 1,5 mM Dipyridyldisulfid in Säulenpuffer reaktiviert, erneut mit Säulenpuffer äquilibriert und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.16. Heterologe Expression rekombinanter DNS in *E. coli* und Aufreinigung der Expressionsprodukte

2.2.16.1. Expression

Für die Expression ausgewählte DNS-Fragmente wurden unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters in folgende Expressionsvektoren kloniert

- pQE-30, -31 oder 32 (QIAexpressionist Typ IV Vektoren, Fa. Qiagen, Hilden) für die Expression als N-terminales Fusionsprodukt mit einem RGS- 6 x His- Marker
- pRSET 5a, 5b oder 5c für die Expression ohne heterologe Anhänge

Die Expression der pQE-Konstrukte erfolgte in *E. coli* der Stämme M15 bzw. SG13009 (Fa. Qiagen, Hilden), die der pRSET-Konstrukte in *E. coli* BL-21 (Fa. Invitrogen, Groningen). Kompetente M15- bzw. SG13009-Zellen wurden entsprechend der vom Hersteller mitgelieferten Anleitung mittels RbCl hergestellt und nach der gleichen Anleitung mit den Expressionskonstrukten transformiert. Die Herstellung kompetenter BL-21 Zellen mittels CaCl₂ und ihre Transformation erfolgte nach dem Standardprotokoll für *E. coli* nach Sambrook et al. (1989). M15- und SG13009-Kulturen wurden in LB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin und Ampicillin herangezogen, Kulturen von BL-21 in LBG-Medium mit Kanamycin.

Für die Expression wurden mit dem jeweiligen Anzuchtmedium (üblicherweise 30 ml) beschickte Kulturkolben mit je $\frac{1}{10}$ Vol. einer frischen Übernachtskultur des entsprechenden transformierten Bakterienstamms angeimpft und bei 37°C in einem Brutschrank unter Schütteln inkubiert bis die Bakterienkulturen eine Extinktion von etwa 0,6 bei 623 nm Wellenlänge erreicht hatten. Nun wurde von jeder Kultur ein Aliquot (üblicherweise 1 ml) als nichtinduzierte Kontrolle abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Im Rest der Kultur wurde die Expression durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Inkubation bei 37°C wurde 4 – 5 h fortgesetzt, dabei wurden zur Dokumentation des Expressionsverlaufs alle 1 bzw. 2 h 1 ml Aliquote abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Nach

Beendigung des Versuchs wurden alle Kontrollaliquote sowie die restliche Expressionskultur bei 4°C abzentrifugiert und die Sedimente bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren. In Fällen, in denen eine Sekretion exprimierten Proteins in das Medium nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde auch der jeweilige Zentrifugationsüberstand aufbewahrt, durch Zugabe von 10% TCA präzipitiert und mit 80%igem Aceton gewaschen. Eine erste Analyse der Expression erfolgte durch direktes Resuspendieren der Sedimente in 4 x Laemmli-Probenpuffer und Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

2.2.16.2. Trennung der bakteriellen Proteine in lösliche und unlösliche Fraktionen

Methode A (nativ)

Lysepuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 0,1% Triton X-100 1 mg/ml Lysozym
------------	--

Das Sediment einer 30 ml Expressionskultur wurde in 15 – 20 ml Lysepuffer resuspendiert und für 30 – 60 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde eine Homogenisierung durch mehrfaches Beschallen mit 5 Sek. langen Ultraschallstößen durchgeführt. Die Proteinsuspension wurde bei 4°C und 10000 x g für 30 Min. abzentrifugiert, der Überstand als lösliche Fraktion abgetrennt und das Sediment (unlösliche Fraktion) in 5 ml Lysepuffer ohne Lysozym resuspendiert. Falls für eine zufriedenstellende Homogenisierung notwendig, wurde hierzu nochmals Ultraschall angewandt. Die Analyse erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wobei unter normalen Umständen keine Präzipitation der löslichen Fraktion nötig war.

Methode B (denaturierend)

Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 mM NaH ₂ PO ₄ 8 M Harnstoff 0,1% Triton X-100
------------	---

Das Sediment einer 30 ml Expressionskultur wurde in 15 – 20 ml Lysepuffer resuspendiert und für 60 Min. unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Vorgehensweise zur Separation von löslicher und unlöslicher Fraktion entsprach derjenigen von Methode A, einschließlich der Homogenisierung durch Ultraschall. Vor Analyse auf einem Polyacrylamidgel wurde der stark harnstoffhaltige Überstand (lösliche Fraktion) über Nacht bei 4°C gegen Lysepuffer ohne Harnstoff und Triton dialysiert.

2.2.16.3. Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose

Die nach Abschnitt 2.2.16.2. erhaltenen Lysate von Expressionskulturen wurden einer Affinitätschromatographie unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen, je nach Ausgangspräparation, unterzogen:

Aufreinigung unter nativen Bedingungen

Lysepuffer	siehe Abschnitt 2.2.16.2., Methode A
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Eluierungspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 300 mM NaCl 250 mM Imidazol

250 µl 50% Ni-NTA Sepharosesuspension wurden zu 1 ml Lysat gegeben und in einem 2 ml Reaktionsgefäß gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 4°C unter ständigem Mischen auf einem Rotationsschüttler. Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert, zweifach durch Resuspendieren in je 1 ml Waschpuffer gewaschen und schließlich durch Resuspendieren in 125 µl Eluierungspuffer, Inkubation auf Eis für 5 Min. und Zentrifugation eluiert. Der Elutionsschritt wurde vierfach durchgeführt. Alle Überstände wurden getrennt gesammelt, durch Behandlung mit TCA präzipitiert, mit 80%igem Aceton gewaschen und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Lysepuffer	siehe Abschnitt 2.2.16.2., Methode B
Waschpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 6,3 100 mM NaH ₂ PO ₄ 8 M Harnstoff
Eluierungspuffer D	10 mM Tris/HCl, pH 5,9 100 mM NaH ₂ PO ₄ 8 M Harnstoff
Eluierungspuffer E	10 mM Tris/HCl, pH 4,5 100 mM NaH ₂ PO ₄ 8 M Harnstoff

250 µl 50% Ni-NTA Sepharosesuspension wurden zu 1 ml Lysat gegeben und in einem 2 ml Reaktionsgefäß gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter

ständigem Mischen auf einem Rotationsschüttler. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert und anschließend zweifach mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte eine Elution durch viermaliges Waschen mit je 125 µl Eluierungspuffer D, gefolgt von einer Elution durch viermaliges Waschen mit je 125 µl Eluierungspuffer E. Alle Überstände wurden getrennt gesammelt, durch Behandlung mit TCA präzipitiert, mit 80%igem Aceton gewaschen und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.17. Herstellung polyklonaler Antiseren gegen ausgewählte Proteine

Die nach Abschnitt 2.2.16. präparierten heterologen Expressionsprodukte wurden, ihre Eignung vorausgesetzt, zur Herstellung polyklonaler Antiseren durch Immunisierung von Kaninchen nach Harlow und Lane (1988) eingesetzt. Für diese Immunisierung wurden vom Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Goethestraße 33, 80336 München, zur Verfügung gestellte weibliche Kaninchen eingesetzt.

Immunisierung:

Nach Verifizierung einer erfolgreichen Überexpression ausgewählter Gene bzw. Genabschnitte in *E. coli* und ausreichender Aufreinigung wurden diese einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese in präparativem Maßstab unterzogen und anschließend auf Nitrozellulose transferiert (Western-Transfer). Die gewünschte Proteinbande wurde durch Färbung der Membran mit Ponceau S lokalisiert und ausgeschnitten. Im Folgenden wurde der Membranausschnitt in gleichgroße Stücke zerteilt, welche für die Immunisierung vorbereitet wurden. Je nach Konzentration des überexprimierten Proteins wurde pro Ansatz durchschnittlich ein ca. 0,5 cm² großes Membranstück in 200 µl DMSO vollständig gelöst, mit 200 µl TiterMax (Komplettadjuvans; Fa. Pierce Chemical Company, Rockford/ USA) gründlich vermischt und für die subkutane Injektion in ein Kaninchen, dessen Präimmunserum zuvor ausgetestet worden war, verwendet. Etwa 10 – 12 Tage nach der Erstimmunisierung erfolgte eine weitere Immunisierung mit der gleichen Menge an Protein, jedoch mit „Freund’s Incomplete“ Adjuvans (Fa. Pierce Chemical Company, Rockford/ USA) anstelle von TiterMax. Etwa 8 – 10 Tage nach dieser Immunisierung wurden etwa 30 – 40 ml Blut entnommen und für den Einsatz in immunologischen Tests präpariert (siehe unten). Weitere Immunisierungen (ab diesem Zeitpunkt immer mit „Freund’s Incomplete Adjuvans“) erfolgten stets mindestens einen Monat nach Blutentnahme; weitere Blutentnahmen stets 8 – 10 Tage nach der neuerlichen Immunisierung. Die Immunisierungen wurden fortgesetzt, bis der Titer an Antikörpern

im Serum das gewünschte Maß erreicht hatte oder das Experiment aufgrund der Unbrauchbarkeit des Antiserums abgebrochen wurde.

Anmerkung: Die nach der beschriebenen Methode gewonnenen Antiseren neigten generell dazu, nach vier, spätestens fünf, Immunisierungen eine starke unspezifische Reaktion zu entwickeln, die sich auf den verwendeten Röntgenfilmen als zunehmend dunkelgrauer bis schwarzer Hintergrund bemerkbar machte. Dadurch waren Seren, die nach späteren Injektionen gewonnen wurden, meist unbrauchbar. Deswegen wurde die Methode in späteren Versuchen abgewandelt und für die Immunisierung der Kaninchen statt den auf Nitrozellulose transferierten Expressionsprodukten die direkt aus Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gelen ausgeschnittenen und ausreichend homogenisierten Proteinbanden, resuspendiert in 1 x Laemmli Puffer, verwendet. Die erwähnte unspezifische Hintergrundreaktion konnte dadurch auch bei längerer Immunisierung vollständig vermieden werden.

Präparierung der Antiseren:

Das frisch gewonnene Kaninchenblut wurde, um die vollständige Koagulation zu fördern, für 30 – 60 Min. bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Es folgte eine Zentrifugation von 15 Min. bei 3000 x g und 4°C, zur Abtrennung der größten Festbestandteile. Der Überstand wurde in 30 ml Borosilikatglas-Zentrifugenröhrchen überführt und einer weiteren Zentrifugation für 30 Min. bei 12000 x g und 4°C unterzogen. Das erhaltene Serum wurde zur Konservierung mit NaN₃ bis zu einer Endkonzentration von 0,02% versetzt und für den Gebrauch aliquotiert. Die Seren wurden eingefroren bei -20°C aufbewahrt.

2.2.18. Immunologische Detektion spezifischer Proteine (Western-Analyse) nach dem Chemilumineszenzverfahren (ECL)

Blockpuffer	1 x PBS 1% Tween 20 5% Magermilchpulver
Waschpuffer	1 x PBS 1% Tween 20
Luminiszenzlösung I	5 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 500 µl Luminol-Stammlösung (44 mg/ml in DMSO) 220 µl β-Cumarinsäure-Stammlösung (15 mg/ml in DMSO) ad 50 ml H ₂ O

Luminiszenzlösung II	5 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 30,5 μ l H ₂ O ₂ (33%ige Lösung) ad 50 ml H ₂ O
„Strip“ - Lösung	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,7 - 6,8 2% SDS 100 mM β -Mercaptoethanol

Die Nitrozellulosemembran mit den immobilisierten Proteinpräparationen wurde zunächst für mindestens 1 h bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler in Blockpuffer inkubiert. Nach Abgießen des Blockpuffers wurde die Membran in Antiserum überführt. Bei Erstversuchen wurde dabei eine Antikörperverdünnung von 1:1000 in Blockpuffer eingesetzt und später gegebenenfalls variiert bis eine optimale Intensität des Immunsignals erzielt wurde. Die Immunhybridisierung erfolgte je nach Affinität der Antikörper 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C, beides auf dem Taumelschüttler. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgegossen, bei -20°C eingefroren aufbewahrt und bis zu sechsmal wiederverwendet. Die Membran wurde nach der Hybridisierung viermal für je 10 Min. in Blockpuffer gewaschen, danach in die sekundäre Antikörperverdünnung (kommerziell erhältliches Anti-Kaninchen-IgG, Konjugat mit Meerettichperoxidase, 1:20000) überführt. Die zweite Hybridisierung erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler. Anschließend wurde die Membran viermal für je 10 Min. in Waschpuffer gewaschen. Für die Entwicklung der Chemiluminiszenz wurden je 50 ml Luminiszenzlösung I und II frisch angesetzt und unmittelbar vor der Verwendung in einer Schale vereinigt. Die folgenden Arbeiten wurden in einem abgedunkelten Photolabor durchgeführt. Zur Entwicklung der Luminiszenz wurde die gewaschene Membran für genau 1 Min. in die Entwicklungslösung getaucht, danach kurz auf Whatman-Papier getrocknet und zum Schutz in eine transparente Folie gehüllt. Zur Detektion der Luminiszenzsignale wurde ein zurechtgeschnittener Röntgenfilm (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) aufgelegt und die Position auf der Membran mit Folienschreiber markiert. Die Exposition in einer Expositionskassette betrug, je nach Bedarf, zwischen wenigen Sekunden und maximal 30 Min. (Verblässen der Luminiszenzsignale).

Verwendete Membranen wurden in der Folie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt. Waren die Signale nicht zu intensiv, konnten Membranen, z. B. für die Hybridisierung mit anderen Antiseren, wiederverwendet werden. Dazu wurden sie unter Schütteln für mindestens 30 Min. bei 50°C in „Strip“ Lösung inkubiert und anschließend für zweimal 10 Min. in Waschpuffer gewaschen.

2.2.19. Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803

Der Cyanobakterienstamm *Synechocystis* PCC 6803 wurde in BG-11 Medium (siehe Abschnitt 2.1.9.3.) mit den entsprechenden Antibiotika, sowohl in Flüssigkultur als auch auf Agarplatten, bei 24 h Dauerlicht von $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und konstanter Temperatur von $24,5^\circ\text{C}$ angezogen. Das Wachstum der Flüssigkulturen wurde durch tägliche spektrometrische Bestimmung der Extinktion bei 800 nm Wellenlänge, des Absorptionsspektrums zwischen 350 und 750 nm Wellenlänge und der absoluten und relativen Konzentration an Chlorophyll a dokumentiert. Für die Bestimmung der absoluten Chlorophyllkonzentration wurden $500 \mu\text{l}$ *Synechocystis*-Kultur abzentrifugiert und das Sediment wurde in $30 \mu\text{l H}_2\text{O}$ resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml Methanol zugegeben und für ca. 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in eine Plastikkuvette überführt und die Extinktion bei 666 nm Wellenlänge gegen reines Methanol gemessen. Die absolute Konzentration an Chlorophyll a wurde nach folgender Formel errechnet:

$$13,42 \times E_{666} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Chlorophyllkonzentration } (\mu\text{g/ml})$$

Die relative Konzentration ergab sich durch Dividieren der absoluten Konzentration durch die Extinktion bei 800 nm.

2.2.20. Streßbehandlung von *Synechocystis*-Kulturen

2.2.20.1. Lichtstreß

Die Kulturen wurden zunächst bei den unter Abschnitt 2.2.19. beschriebenen normalen Bedingungen sechs Tage lang angezogen. Die Extinktion bei 800 nm Wellenlänge lag im Normalfall zu diesem Zeitpunkt bei etwas mehr als 0,6. Die Cyanobakterien jeder Kultur wurden nun jeweils in gleicher Menge auf zwei Kulturkolben verteilt; einer verblieb unter den Normalbedingungen, der zweite wurde zur weiteren Kultur auf einen Taumelschüttler in einer mit Hochlichtlampen bestückten Anzuchtskammer verbracht und dort unter einer 24stündigen Dauerbestrahlung mit einer Lichtintensität von ca. $150 - 200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert, wobei die Temperatur konstant bei 25°C gehalten wurde. Die Entwicklung der Kulturen wurde weiter wie unter Abschnitt 2.2.19. beschrieben dokumentiert.

2.2.20.2. Hitzestreß

Die Vorkultur erfolgte wie in Abschnitt 2.2.20.1 beschrieben. Auch für die Versuche mit Hitzestreß wurden die Kulturen jeweils gleichmäßig auf zwei Kulturkolben verteilt, deren einer unter Normalbedingungen in der bisherigen Anzuchtskammer verblieb. Der zweite Kolben

einer jeden Kultur wurde in einen Inkubationsschrank (Fa. Infors AG, Bottmingen/Schweiz) überführt und dort unter konstant auf den bisherigen Werten gehaltenen Lichtintensität, aber bei einer Temperatur von 40°C weiter inkubiert. Die Entwicklung der Kulturen wurde weiter wie in Abschnitt 2.2.19. beschrieben dokumentiert.

2.2.20.3. UV-B – Bestrahlung

Die Vorkultur erfolgte wie in Abschnitt 2.2.20.1 beschrieben. Die Extinktion der Kulturen bei 800 nm Wellenlänge wurde genau bestimmt und bei Einsatz mehrerer verschiedener Kulturen jeweils durch Zugabe von BG-11-Medium auf den Wert der Kultur mit der geringsten Extinktion angeglichen. Jede Kultur wurde zu gleichen Teilen auf zwei 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen verteilt; ein Teil verblieb während des folgenden Versuchs auf Eis. Der Inhalt des zweiten Röhrchens wurde vollständig in eine mit einer dünnen Polyethylenfolie als Schutz gegen Austrocknung überzogene Petrischale überführt (Durchmesser 9 cm), anschließend wurden die Schalen in einer abgedunkelten Kammer auf einem Taumelschüttler für 30 Min. bis 2 h mittels zweier UV-Handlampen (Vilber-Lourmat, Fa. Bachofer) mit UV-Licht der Wellenlänge 320 nm bestrahlt. Der Abstand der Lampen zu den Schalen wurde dabei bei etwa 3 cm gehalten. Nach Ende der Bestrahlung wurden die Cyanobakterien wieder in die Zentrifugenröhrchen überführt und alle Röhrchen für 10 Min. bei 3000 x g zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.21. Isolierung von Gesamtmembranen aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Homogenisierungspuffer	50 mM HEPES/NaOH, pH 7,0 500 mM Saccharose 15 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ Proteaseinhibitoren
Resuspendierungspuffer	10 mM Tricin, pH 7,5 6% Saccharose 30 mM DTT Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitoren wurden entweder als fertige Mischung (Proteinase Inhibitor Cocktail, Fa. Sigma) oder einzeln in folgenden Endkonzentrationen (Beynon und Salvesen, 1989) zugegeben:

Bestatin	10 µM
DFP	100 µM

EDTA	10 mM
IAA	100 μ M
Leupeptin	100 μ M
Pepstatin	1 μ M
Phenanthrolin	10 mM
PMSF	1 mM

Eine 50 ml Kultur von *Synechocystis* wurde durch 5 Min. Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert und der Überstand entfernt. Das Zellsediment wurde in 300 μ l Homogenisierungspuffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein gleiches Volumen in Homogenisierungspuffer angefeuchteter Glasperlen (\varnothing 0,2 mm) wurde zugegeben und die Zellen wurden durch dreimaliges Mixen von je 2 Min. auf einem Labormixer mit eingeschobenen Pausen von je 1 Min. auf Eis homogenisiert. Nach Absetzen der Feststoffe wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wurde mit weiteren 200 μ l Homogenisierungspuffer gewaschen, erneut absetzen gelassen, der Überstand wurde mit dem der Homogenisierung vereinigt. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis der Überstand fast farblos war. Mitgeführte Glasperlen einschließlich der größten Zelltrümmer wurden anschließend durch 10 Min. Zentrifugation der vereinigten Überstände bei 1600 x g sedimentiert. Ein Aliquot dieses Überstands wurde als Gesamtzellextrakt aufbewahrt, der Rest in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 40000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Sediment (= Gesamtmembranen, hauptsächlich Thylakoidmembranen) wurde in 100 μ l Resuspendierungspuffer aufgenommen; der mehr oder weniger deutlich blau gefärbte Überstand (= „Stroma“) mit etwas Saccharose versetzt und alle Fraktionen wurden bei -20°C eingefroren aufbewahrt.

2.2.22. Methoden zur Detektion proteolytischer Aktivität

2.2.22.1. Nachweis von Proteasen durch Elektrophorese auf substrathaltigen Polyacrylamidgelen

Inkubationspuffer (speziell für lumenale Proteasen)	100 mM Na-Citrat, pH 5,5 5 mM CaCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ 0,5 mM DTT 1% Triton X-100
---	---

Die zu untersuchenden Proteinpräparationen wurden durch eine schwach denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.11.2.) auf einem Gel, das zusätzlich zu

der beschriebenen Zusammensetzung 0,25% Gelatine (durch Zugabe von $\frac{1}{25}$ Vol. einer durch Erhitzen in der Mikrowelle verflüssigten 10%igen wäßrigen Lösung unmittelbar vor dem Start der Polymerisation) enthielt, bei 4°C aufgetrennt. Das fertige Gel wurde nach dem Lauf für 30 Min. bei Raumtemperatur in Inkubationspuffer geschwenkt, zweifach mit Wasser gewaschen und anschließend für 24 - 48 h in Inkubationspuffer ohne Triton X-100 bei 37°C (Brutschrank) inkubiert. Es folgte eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Bereiche mit Proteaseaktivität zeichneten sich durch Abbau der Gelatine als farblose Banden vor dem ansonsten blauen Hintergrund des Gels ab (Sokolenko *et al.*, 1997).

2.2.22.2. *Quantitative Bestimmung proteolytischer Aktivität mittels Azocoll*

Inkubationspuffer: wie in Abschnitt 2.2.22.1. beschrieben.

Für jede zu untersuchende Präparation wurden 5 mg Azocoll abgewogen, mit je 1 ml Inkubationspuffer pro Probe versetzt und 90 Min. bei 37°C im Wasserbad präinkubiert. Anschließend wurde die Suspension über einen Faltenfilter abfiltriert, das feuchte Azocoll gesammelt und erneut in Inkubationspuffer (1 ml pro Ansatz) resuspendiert. Die Suspension wurde gleichmäßig in 1 ml-Aliquote aufgeteilt und in mit Schraubdeckeln verschließbare Glasröhrchen überführt. In jedes Röhrchen wurden 20 – 40 µl der zu untersuchenden Proteasenpräparation zugegeben (Proteinextrakt oder Gelstückchen aus einem Polyacrylamidgel nach Elektrophorese), die Röhrchen verschlossen und unter kräftigem Schütteln in einem Über-Kopf-Schüttler bei 37°C (Brutschrank) für 3 h bis über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Röhrcheninhalt in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 5 Min. bei 20000 x g zentrifugiert und der jeweilige Überstand in Küvetten transferiert. Der proteolytische Abbau des Azocolls wurde spektrophotometrisch bei 520 nm Wellenlänge gegen eine Leerprobe (Azocoll, nur in Puffer inkubiert) gemessen.

2.2.22.3. *Nachweis proteolytischer Aktivität in Präparationen von heterologen Überexpressionsprodukten aus E. coli*

Inkubationspuffer A	50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,4
Inkubationspuffer B	100 mM Na-Citrat, pH 5,5 5 mM CaCl ₂ 1 mM ZnCl ₂ 0,5 mM DTT 0,1% Triton X-100

Die Präparationen mit dem renaturierten, potentiell aktiven Expressionsprodukt wurden über PD-10-Säulen (Fa. Pharmacia) auf den jeweiligen Inkubationspuffer umgepuffert. Für den

Degradationstest wurde die Lösung zu gleichen Teilen mit dem jeweiligen Substrat gemischt. Dies war entweder eine mutierte Form von Plastocyanin aus *Arabidopsis*, ebenfalls durch Überexpression gewonnen und anschließend solubilisiert und umgepuffert, oder eine Lösung von 10 µg/ml β-Casein im jeweiligen Inkubationspuffer. Die Inkubation erfolgte für 90 Min. bei 37°C im Brutschrank; gleichzeitig wurden verschiedene Kontrollen angesetzt: Substrat ohne Expressionsprodukt, Reaktionsmischung auf Eis statt bei 37°C und Reaktionsmischung unter Zugabe verschiedener Proteaseinhibitoren. Die Analyse der Reaktionen erfolgte durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.

2.2.23. Detektion der Topologie von Membranproteinen (Karnauchov *et al.*, 1997b)

HM-Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 8,0 5 mM MgCl ₂
HS-Puffer	10 mM HEPES/KOH, pH 8,0 100 mM Saccharose

2.2.23.1. Waschen mit verschiedenen Salzlösungen

Aliquote von Präparationen intakter Thylakoide bzw. vom Lumen abgetrennter Thylakoidmembranen wurden abzentrifugiert und die Sedimente in einer Endkonzentration von 0,5 mg Chlorophyll/ml in den folgenden Versuchslösungen resuspendiert:

- a) HM/HS-Puffer
- b) 2 M NaBr in HM/HS-Puffer
- c) 2 M NaSCN in HM/HS-Puffer
- d) 0,1 M Na₂CO₃ in HM/HS-Puffer
- e) 0,1 M NaOH in HM/HS-Puffer

Die die Ansätze enthaltenden Reaktionsgefäße wurden für ca. 30 Min. auf Eis inkubiert, anschließend wurden je 2 Vol. HM/HS Puffer zugegeben und 10 Min. bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Zugabe von 5 Vol. Aceton präzipitiert, die Sedimente direkt in 4 x Laemmli-Probenpuffer gelöst. Die Analyse erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese, anschließenden elektrophoretischen Transfer der Proteine auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit spezifischen Antikörpern.

2.2.23.2. Verdauung mit Proteasen

Die Vorbereitung der Thylakoidpräparationen erfolgte identisch zu der in Abschnitt 2.2.23.1. beschriebenen. Die Aliquote wurden in einer Endkonzentration von 0,5 mg Chlorophyll/ml in den folgenden Versuchslösungen resuspendiert:

- a) HM/HS-Puffer
- b) 100 µg/ml Thermolysin in HM/HS-Puffer
- c) 10 µg/ml Trypsin in HM/HS-Puffer
- d) 15 µg/ml Proteinase K in HM/HS-Puffer

Auch hier erfolgte die Inkubation der Ansätze für 30 Min. auf Eis. Anschließend wurde die Proteolyse durch Zugabe der entsprechenden Proteaseinhibitoren unterbunden:

- b) EDTA ad 20 mM
- c) Trypsin-Inhibitor (Sojabohne) ad 50 µg/ml
- d) PMSF ad 2 mM

Die Membranen wurden durch 10 Min. Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C sedimentiert, einmal in HM/HS Puffer gewaschen und für die Elektrophorese direkt in 4 x Laemmli-Probenpuffer gelöst. Die Überstände der ersten Zentrifugation wurden durch Zugabe von 5 Vol. Aceton präzipitiert. Die Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.23.1. beschrieben.

2.2.24. Streßbehandlung von Pflanzenmaterial

2.2.24.1. Lichtstreß

a) Behandlung ganzer Pflanzen

Ein oder mehrere Anzuchtsschalen mit ca. 2 – 3 Wochen alten, unter Langtagbedingungen bei ca. 50 µE m⁻² s⁻¹ angewachsenen *Arabidopsis*-Keimlingen wurden direkt unter Starklichtlampen plaziert und dort bei ca. 700 µE m⁻² s⁻¹ Dauerlicht bis zu 52 Stunden belassen. Dem erhöhten Wasserverlust durch Verdunstung wurde durch regelmäßiges Wässern Rechnung getragen. Die Erhitzung der Luft an der Oberfläche des Pflanzenrasens wurde durch Einsatz eines Ventilators reduziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden in etwa gleiche Pflanzenmengen (etwa 5 g) geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzenmaterial verblieb bis zur weiteren Analyse bei –70°C.

b) Behandlung isolierter Chloroplasten

Frisch isolierte Erbsenchloroplasten (siehe Abschnitt 2.2.12.1.) wurden nach Bestimmung des Chlorophyllgehalts mit Isolationsmedium auf einen Wert von 0,5 µg Chlorophyll/ml verdünnt

und die Suspension wurde anschließend in einem Becherglas unter Rühren für 30 – 60 Min. vor eine starke Lichtquelle (Diaprojektor) platziert. Unter Verwendung eines hinter dem Becherglas aufgestellten Spiegels wurde der Hochlichteinfluß erhöht. Um ein übermäßiges Erhitzen der Suspension in der durch die Lampe aufgeheizten Luft zu vermeiden, wurde ein Ventilator vor das Glas platziert. Nach der Lichtstreßbehandlung erfolgte die Lyse und weitere Subfraktionierung der Chloroplasten nach 2.2.12.1.

2.2.24.2. Hitzestreß und -chock

Für die Behandlung von Pflanzenmaterial mit Hitzestreß wurden zwei verschiedene Strategien angewandt: die direkte Exponierung der Pflanzen unter erhöhten Temperaturen (wie z. B. bei Osteryoung *et al.*, 1993 und Suzuki *et al.*, 1998, beschrieben) einerseits sowie von zuvor abgeerntetem Pflanzenmaterial in einer Suspension (wie z. B. bei Lee *et al.*, 1995; Prändl *et al.*, 1995 und Reindl und Schöffl, 1998, verwendet).

a) direkte Behandlung von Pflanzen

Eine Anzuchtsschale 2 – 3 Wochen alter, unter Langtagbedingungen bei ca. $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogener *Arabidopsis*-Keimlinge wurde unter identischer Lichtintensität in einen heizbaren Anzuchtsschrank gestellt. Die Ausgangstemperatur wurde schrittweise stündlich ausgehend von 24°C um 2°C erhöht, bis eine Temperatur von 42°C erreicht war. Die Pflanzen verblieben für weitere 2 Stunden bei dieser Temperatur, ehe sie im Lauf weiterer 12 Stunden wieder auf den Anfangswert reduziert wurde. Zu jedem Intervall und zusätzlich nach Abschluß der Regenerationsphase wurden in etwa gleiche Pflanzenmengen (etwa 5 g) geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Behandlung mit Hitzeschock wurde eine weitere Anzuchtsschale unmittelbar in den auf 42°C aufgeheizten Brutschrank gestellt, dort für 2 Stunden belassen und dann wieder entnommen. Hier wurde nach 30 Sek., 1 Min., 2 Min., 10 Min., 30 Min. und 2 h sowie nach weiteren 2 h Regenerationsphase bei 24°C Pflanzenmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Sämtliches Pflanzenmaterial verblieb bis zur weiteren Analyse bei -70°C .

b) Behandlung von Pflanzenmaterial in Suspension

Das Pflanzenmaterial einer unter Langtagbedingungen bei ca. $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogenen Anzuchtsschale mit *Arabidopsis*-Keimlingen wurde geerntet und, nach Einfrieren eines Teils als unbehandelte Kontrolle in eine mit auf 42°C temperiertem Wasser gefüllte Schale überführt. Diese wurde für insgesamt 2 Stunden auf einem Schüttelwasserbad weiter bei 42°C inkubiert. Nach 1 Min., 10 Min., 30 Min., 1 h, 2 h und 4 h wurden jeweils etwa gleich große Portionen

des Pflanzenmaterials entnommen, kurz auf Küchenpapier getrocknet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pflanzenmaterial verblieb bis zur weiteren Analyse bei -70°C .

2.3. Rechnergestützte Methoden zur Datenverarbeitung

Erstanalyse und Edierung von über das LICOR-Sequenziersystem (MWG Biotech GmbH, Ebersberg) erhaltenen DNS-Sequenzen erfolgte mittels des vom Hersteller zur Verfügung gestellten Programms *BaseImagIR v4.0*.

Weitergehende Analyse und Manipulation der DNS-Daten, Bestimmung und Analyse der potentiellen Aminosäuresequenzen und Erstellung von Sequenzvergleichen erfolgte durch die GCG-Programme (Genetics Computer Group Inc. Sequence Analysis Software Package; Devereux *et al.*, 1984), verfügbar unter HUSAR (Unix Sequence Analysis Resources, Heidelberg).

Homologierecherchen basierend auf vorhandenen Sequenzdaten erfolgten über das Programm NCBI-BLAST (unter <http://www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi?Jform=0>; Altschul *et al.*, 1990; Gish und States, 1993) sowie über die mit dem entsprechenden Algorithmus arbeitenden Werkzeuge der „TIGR *Arabidopsis thaliana* Database“ und des Sequenzierungsprojekts für *Synechocystis* sp. PCC6803, „CyanoBase“ (unter <http://www.tigr.org/tdb/at/at.html> bzw. <http://www.kazusa.or.jp/cyano/>).

Die Vorhersage der subzellulären Lokalisation von Proteinen anhand ihrer Aminosäuresequenz erfolgte mittels der Programme PSORT (unter <http://psort.nibb.ac.jp/>) und ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999; unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>).

Für die PCR entworfene Oligonukleotide wurden mittels des Algorithmus „Primer Calculator“ (unter <http://www.williamstone.com/primers/calculator>) bezüglich Schmelztemperatur, Kompatibilität und eventuellen Autohybridisierungsrisiken überprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung lichtstreibinduzierter Proteasen aus dem Thylakoidlumen von *Pisum sativum* L.

3.1.1. Gewinnung von Lumenextrakten und Nachweis proteolytischer Aktivitäten

Intakte Chloroplasten aus den Primär- und Sekundärblättern etwa 3 Wochen alter Erbsenkeimlinge wurden nach der in Abschnitt 2.2.12.1. im experimentellen Teil beschriebenen Vorgehensweise gewonnen, entsprechend Abschnitt 2.2.24.1. (Methode b) mit Hochlicht bestrahlt und weiter nach Abschnitt 2.2.12.1. fraktioniert. Die Lumenpräparationen wurden durch Ultrafiltration stark aufkonzentriert – je nach Präparation auf Proteinkonzentrationen von ca. 1 – 3 mg/ml. Die primäre Analyse erfolgte durch schwach denaturierende Elektrophorese nach Abschnitt 2.2.11.2. und der Aktivitätstest auf gelatinehaltigen Gelen nach Abschnitt 2.2.22.1. Dabei konnten in Abhängigkeit von der jeweiligen Präparation und der eingesetzten Proteinmenge mehrere verschiedene proteolytische Aktivitäten nachgewiesen werden.

Die in dem gezeigten Beispiel (Abb. 3-1) hervorzuhebenden prominentesten Aktivitäten lagen in den Bereichen um ca. 190 kDa, zwischen 50 und 55 kDa, etwas schwächer bei ca. 35 kDa, sowie bei etwa 25 kDa, wobei die genaue Größenbestimmung der letztgenannten Proteasensbande nicht exakt möglich ist, da das Gel bei der gewählten Färbetechnik mittels Coomassie Brilliant Blue nicht stark genug entfärbt werden konnte, um die niedermolekularen Banden des verwendeten Größenstandards visualisieren zu können. Dies hätte zu einem zu hohen Kontrastverlust im Bereich der proteolytischen Signale geführt. Im Vergleich unterschiedlich hoher Proteinmengen zeigte sich, daß die Aktivität um 190 kDa bereits bei der niedrigsten eingesetzten Menge von 15 µg Gesamtprotein pro Spur deutlich auftrat und bei Erhöhen der Menge nicht mehr stärker, eher etwas schwächer wurde. Im Gegensatz dazu wurden alle anderen genannten Aktivitäten mit Erhöhen der eingesetzten Gesamtproteinmenge auch deutlicher bzw. überhaupt erst erkennbar. Keine der aufgezählten Aktivitäten wurde beobachtet, wenn die Hochlichtbehandlung der Chloroplasten vor deren Aufbruch unterblieb (Daten nicht gezeigt).

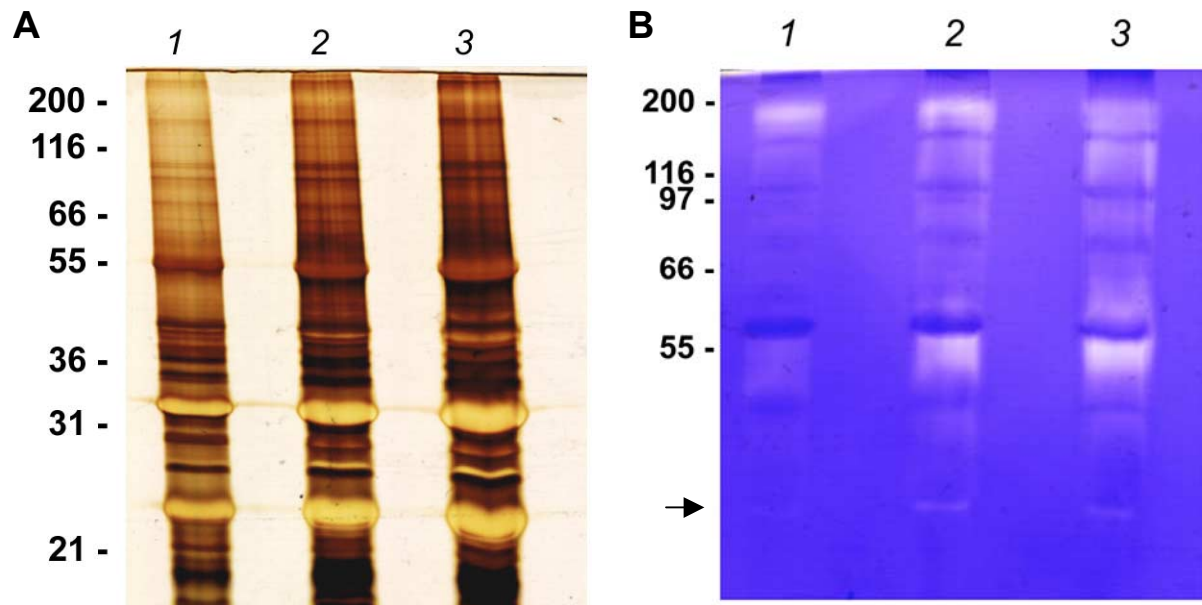


Abb. 3-1. Elektrophoretische Auftrennung einer Lumenpräparation aus *Pisum sativum* mittels sdPAGE und Nachweis proteolytischer Aktivitäten.

A: Silbergefärbtes Gel zur Veranschaulichung der unter **B** eingesetzten Proteinmengen. Spur **1**: 5 μ g; **2**: 10 μ g; **3**: 15 μ g. **B:** Aktivitätsnachweis. Verschieden hohe Gesamtkonzentrationen an Protein wurden auf einem 0,25% Gelatine enthaltenden Polyacrylamidgel durch schwach denaturierende Elektrophorese aufgetrennt und die aktiven Proteasen durch Inkubation bei pH 5,5 zum Abbau der Gelatine angeregt. Färbung: Coomassie Brilliant Blue. Der Pfeil kennzeichnet die Aktivität bei ca. 25 kDa. Aufgetragene Proteinmengen: Spur **1**: ca. 15 μ g; **2**: ca. 30 μ g; **3**: ca. 60 μ g. Jeweils links: Molekulargewichtsmarker in kDa

Reproduzierbarkeit der Resultate

Die oben genannten Ergebnisse ließen sich in der Regel nicht zuverlässig reproduzieren. Weitergehende Reinigungs- und Charakterisierungsversuche wurden bereits dadurch erheblich erschwert, daß bei verschiedenen Lumenpräparationen meist auch unterschiedliche Verhältnisse bei den detektierbaren proteolytischen Aktivitäten auftraten. So fehlte bei fast allen Präparationen im Vergleich zu Abb. 3-1 die eine oder andere Aktivität, insbesondere jene bei 25 kDa konnte im Folgenden fast nie mehr nachgewiesen werden. Bei mehreren anderen Präparationen wurden Aktivitäten prominent, die bei der Abb. 3-1 zugrunde liegenden nicht sichtbar waren, so z. B. in einigen Fällen eine deutliche Aktivität im Bereich um 80 kDa. Während des Sommers konnte über einen Zeitraum von mehreren Monaten praktisch keine lichtinduzierbare Proteaseaktivität in den Präparationen aus dem während dieser Zeit angezogenen Pflanzenmaterial nachgewiesen werden, was sich auch durch Abdunkeln der Anzuchtstandorte der verwendeten Erbsenpflanzen oder vollständige Dunkeladaptation unmittelbar vor der Isolierung der Chloroplasten nicht signifikant ändern ließ. Weitere Probleme entstan-

den durch die benötigte sehr hohe Proteinkonzentration in den Ladefractionen (vgl. Abb. 3-1A und B), welche in der Regel stark verzerrte Gelläufe zu Folge hatte, durch die aufgrund inhomogener Verteilung der einpolymerisierten Gelatine oftmals heterogene Färbbarkeit der substrathaltigen Gele sowie durch das bereits erwähnte Fehlen niedermolekularer Proteinbanden in der Referenz aufgrund der mangelhaften Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue vor dem Gelhintergrund.

3.1.2. Versuche zur weitergehenden Aufreinigung und Charakterisierung

Aufreinigung

Ausgehend von der Präparation der gesamten Lumenfraktion wurden verschiedene Standardmethoden zur weitergehenden Subfraktionierung angewandt und deren Auswirkung hinsichtlich der Aufreinigung der enthaltenen lichtstreibinduzierbaren Proteasen untersucht:

Präzipitation mit Ammoniumsulfat

Die Fällungsreaktionen wurden wie in Abschnitt 2.2.15.1. beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen nach Entsalzung den üblichen Tests unterzogen. Dabei wurde festgestellt, daß die Auftrennung der Lumenpräparationen in unterschiedliche Subfraktionen erwartungsgemäß funktionierte; mit einem Schwerpunkt der Proteinmenge in den Fraktionen 20-40% und 40-60%. Anschließende Untersuchungen auf gelatinehaltigen Gelen zeigten, daß die proteolytischen Aktivitäten erhalten geblieben waren (die eingesetzte Ladefraktion enthielt keine unterhalb von 55 kDa), und daß vor allem im Fall der Proteasen mittleren Molekulargewichts eine sichtbare Anreicherung stattgefunden hatte (Abb. 3-2). Die Methode wurde daher als Basis für weitergehende Aufreinigungsansätze verwendet.

Anionenaustauschchromatographie

Die Versuche zu dieser Reinigungsmethode wurden mit zwei verschiedenen Säulenmaterialien durchgeführt: Q-Sepharose und DEAE-Sepharose (Abschnitt 2.2.15.3.). Q-Sepharose als stärkerer Ladungsträger erwies sich dabei als wenig geeignet, da im Versuch praktisch alle in der eingesetzten Lumenpräparation enthaltenen Proteine an das Material banden und ihr weitest größter Anteil erst mit der höchsten eingesetzten KCl-Konzentration im Elutionspuffer wieder abgelöst werden konnte, eine Fraktionierung also kaum stattfand. Entsprechend wurde nach dem Versuch auch nur in der letzten Fraktion proteolytische Restaktivität wiedergefunden (Daten nicht gezeigt).

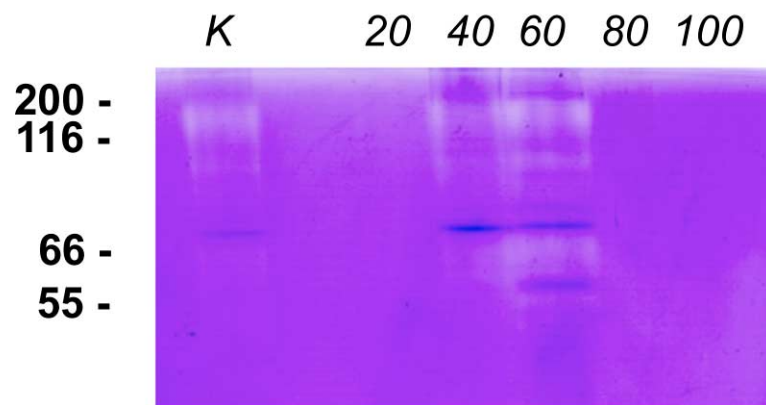


Abb. 3-2. Fraktionierung einer proteolytische Aktivitäten aufweisenden Lumenpräparation mittels stufenweiser Fällung durch Zugabe von Ammoniumsulfat. Entsalzen der Fraktionen über PD-10 Säulen (Fa. Pharmacia). Nachweis proteolytischer Aktivität auf 0,25% Gelatine als Substrat enthaltendem Polyacrylamidgel. Färbung: Coomassie Brilliant Blue. **K:** Kontrolle (nicht fraktionierte Lumenpräparation); **20:** Präzipitat nach Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration von 0 auf 20%; **40:** Präzipitat nach Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration von 20 auf 40%; **60:** Präzipitat nach Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration von 40 auf 60%; **80:** Präzipitat nach Erhöhung der Ammoniumsulfatkonzentration von 60 auf 80%; **100:** Überstand der Fällung mit 80% Ammoniumsulfat. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Die Verwendung von DEAE-Sepharose führte zu einer im Vergleich deutlich besseren Separation der Proteine; die meisten in der Kontrolle enthaltenen proteolytischen Aktivitäten konnten in den gewonnenen Fraktionen wiedergefunden werden, zum Teil durch die Fraktionierung voneinander getrennt (Abb. 3-3). Vor allem eine Aufreinigung der mit der im Gelatinegel um 200 kDa auftretenden Aktivität assoziierten Protease, die im Versuch nicht an die Säule band, erschien aussichtsreich, da, wie die Silberfärbung zeigt, sonst nur Proteine mit weitaus geringerem Molekulargewicht ungebunden wieder von der Säule eluierten. Weitere Versuche mit diesem Ziel scheiterten jedoch an der mangelhaften Reproduzierbarkeit auch dieser proteolytischen Aktivität bereits im Stadium der Lumenpräparationen.

Hydrophobe Chromatographie und Affinitätschromatographie an Thiol-Sepharose

Beide Materialien wurden einmalig auf ihre Tauglichkeit zur Fraktionierung der Lumenpräparationen getestet (Abschnitte 2.2.15.4. bzw. 2.2.15.5.), nach negativen Ergebnissen jedoch nicht weiterverwendet. Die hydrophobe Chromatographie führte noch zu einer relativ guten Separierung der Lumenpräparation in verschiedene Fraktionen, aber auch hier konnte in den gewonnenen Fraktionen kaum noch proteolytische Aktivität gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

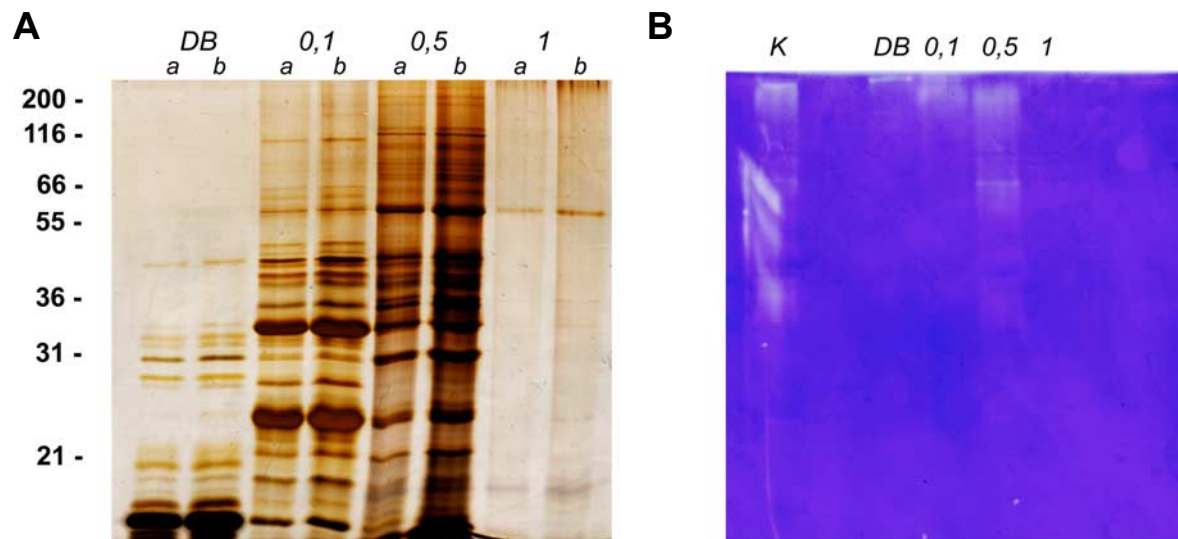


Abb. 3-3. Anionenaustauschchromatographie einer Lumenpräparation an DEAE-Sepharose. Auftrennung der Fraktionen mittels sdPAGE. **K**: Ladefraktion (durch Präzipitierung einer Lumenpräparation mit 40 – 60% Ammoniumsulfat gewonnen); **DB**: Vorlauf nichtgebundener Proteine; **0,1**: mit 0,1 M KCl von der Säule eluierte Proteine; **0,5**: mit 0,5 M KCl von der Säule eluierte Proteine; **1**: mit 1 M KCl von der Säule eluierte Proteine; **b**: doppelte Menge wie **a**. **A**: Veranschaulichung der Fraktionierung durch Silberfärbung. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa). **B**: Nachweis proteolytischer Aktivitäten in den Eluaten auf gelatinehaltigem Gel; Färbung: Coomassie Brilliant Blue. Die Proteinbanden des Molekulargewichtsmarkers ließen sich in diesem Versuch nicht sichtbar anfärben. Die eingesetzte Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen entspricht dem 40-fachen der in **A** (Spuren **b**) verwendeten Mengen.

Bei der Affinitätschromatographie an Thiol-Sepharose bestand im durchgeführten Vortest zur Bindekapazität des Materials der einzige Unterschied zwischen der eingesetzten Ladefraktion und dem Durchbruch nichtgebundener Proteine in einem Verdünnungseffekt; die einzigen drei Proteine, die in geringem Maße auch noch im Eluat zu finden waren, entsprachen den drei prominentesten Banden in der eingesetzten Lumenpräparation (Abb. 3-4). Proteolytische Aktivität fand sich in diesem Eluat nicht (Daten nicht gezeigt).

Gelfiltration

Mit dieser Methode (Abschnitt 2.2.15.2.) gelang es, die eingesetzte Lumenpräparation über einen weiten Bereich in verschiedene Fraktionen aufzufächern. Gleichzeitig führte die Methode jedoch zu einer sehr starken Verdünnung im Vergleich zur Ladefraktion, weshalb in keiner der erhaltenen Fraktionen noch eine proteolytische Aktivität gefunden werden konnte (Daten nicht gezeigt). An diesem Befund änderte auch der Versuch, die Fraktionen über Ultrafiltration wieder ausreichend aufzukonzentrieren, nichts.

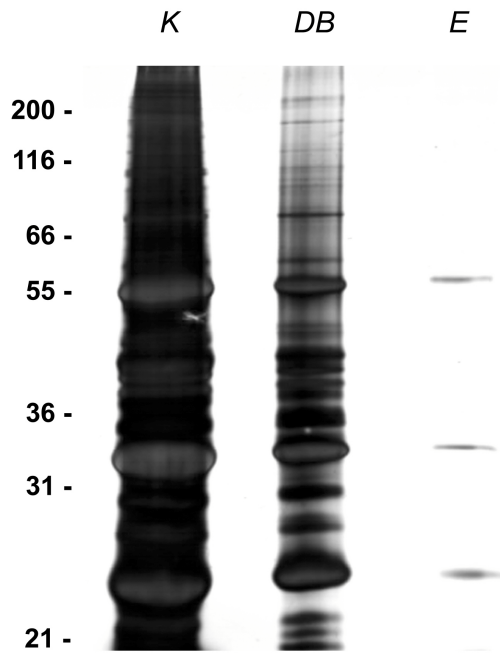


Abb. 3-4. Versuch der Aufreinigung einer Lumenpräparation durch Affinitätschromatographie an Thiol-Sepharose. Darstellung der Fraktionen durch sd-PAGE und Silberfärbung. **K**: Ladefraktion (nicht fraktionierte Lumenpräparation); **DB**: Vorlauf nichtgebundener Proteine; **E**: Eluat mit 25 mM DTT. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Zweidimensionale Elektrophorese

Bei dieser Methode (Abschnitt 2.2.11.3.) wurden die in der Lumenpräparation enthaltenen Proteine zunächst mittels isoelektrischer Fokussierung gemäß ihrem *pI* aufgetrennt und anschließend in der zweiten Dimension einer normalen schwach denaturierenden Elektrophorese unterzogen. Wie die Silberfärbung zeigt, konnten dadurch vor allem prominentere Proteine auf sehr kleinem Raum deutlich voneinander getrennt werden (Abb. 3-5). Distinkte proteolytische Aktivitäten konnten bei Verwendung von substrathaltigen Gelen in der zweiten Dimension jedoch nicht ermittelt werden; die wenigen gefundenen Aktivitäten waren nicht zuverlässig reproduzierbar (Daten nicht gezeigt). Ein wesentlicher Grund dafür lag bereits in der für die Vorbereitung der Ladefraktionen vor der IEF erforderlichen Anreicherung mit Ampholyten und Nonidet P-40 sowie der gleichfalls notwendigen Entfernung aller Puffersubstanzen über Gelfiltration. Im Test zeigten die so behandelten Präparationen bereits ohne Weiterbehandlung ein gegenüber der unbehandelten Kontrolle stark verändertes und reduziertes Muster proteolytischer Aktivitäten (Daten nicht gezeigt).



Abb. 3-5. Auftrennung einer Lumenpräparation durch zweidimensionale Elektrophorese. Der Pfeil zeigt die Auftrennungsrichtung der ersten Dimension an. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung; zweite Dimension: sd-PAGE; Silberfärbung

Charakterisierung

Um Genaueres über den Typ der in den Lumenpräparationen gefundenen lichtinduzierten Proteasen herauszufinden, wurde ein Test durchgeführt, bei dem eine Präparation wie üblich auf Gelatinegelen per schwach denaturierender Elektrophorese aufgetrennt und anschließend über Nacht in Inkubationspuffer bei 37°C inkubiert wurde (Abschnitt 2.2.22.1.). Diesem Inkubationspuffer wurden verschiedene Proteaseinhibitoren zugesetzt, eine Standardmethode für die erste grobe Klassifizierung proteolytischer Enzyme (Dunn, 1989). Wie Abb. 3-6 zeigt, enthielt bereits die eingesetzte Lumenpräparation nur drei deutlich abgrenzbare Zonen proteolytischer Aktivität – eine hochmolekulare um 190 kDa, eine bei ca. 80 kDa, sowie mindestens eine zwischen 50 und 55 kDa, bei der durch den unregelmäßigen Gelatineabbau nicht eindeutig festgestellt werden kann, wieviele Banden beteiligt sind. Von den angesprochenen Aktivitäten wurden diejenigen bei 190 bzw. 80 kDa offenbar durch keinen der Inhibitoren negativ beeinflusst, außer durch Phenanthrolin. Die Aktivität zwischen 50 und 55 kDa wird durch Pepstatin und EDTA offenbar ebenfalls nicht beeinträchtigt, verschwindet jedoch in dem Ansatz mit E-64 völlig, was darauf hindeutet, daß es sich hier um eine oder mehrere Aktivitäten vom Cystein-Typ handelt. Allerdings zeigt sich auch ein etwas schwächerer Effekt mit DCI, einem Inhibitor von Serinproteasen.

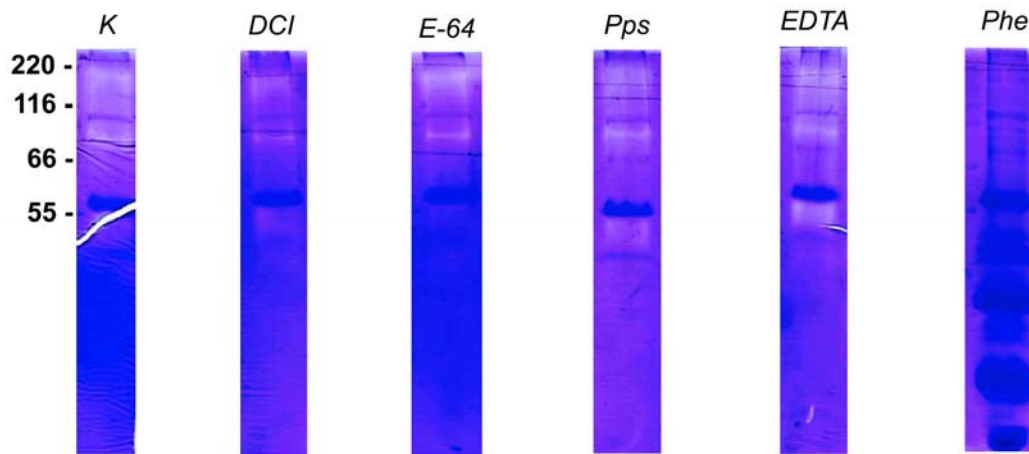


Abb. 3-6. Auswirkung von Proteaseinhibitoren auf die proteolytischen Aktivitäten in Lumenpräparationen aus lichtstreibbehandelten Chloroplasten. Nachweis der Aktivitäten auf 0,25% Gelatine als Substrat enthaltendem Polyacrylamidgel. Färbung: Coomassie Brilliant Blue. Eingesetzte Proteaseinhibitoren: **K**: Kontrolle, nicht inhibiert; **DCI**: 10 µg/ml 3,4-Dichloroisocumarin; **E-64**: 1 µg/ml E-64; **Pps**: 1 µg/ml Pepstatin; **EDTA**: 0,5 mg/ml EDTA; **Phe**: 0,5 mg/ml Phenanthrolin. Die effektiven Inhibitorkonzentrationen liegen innerhalb der von Beynon und Salvesen (1989) empfohlenen Richtwerte. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

3.2. Klonierung von Genen neuer plastidärer Proteasen aus *Arabidopsis thaliana* und Charakterisierung der kodierten Gene

Aus der Auflistung aller in *Synechocystis* sp. PCC6803, dessen vollständige Genomsequenzierung zu Beginn der vorliegenden Arbeit gerade abgeschlossen worden war (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/>), als potentielle Proteasen oder Peptidasen gekennzeichnete Proteine wurden jene ausgewählt, zu denen noch keine beschriebenen Homologe in höheren Pflanzen existierten. Davon wurden wiederum die Proteine, deren eubakterielle Homologe aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb von *E. coli* es als wahrscheinlich erscheinen ließen, daß potentielle Homologe in höheren Pflanzen im Thylakoidlumen lokalisiert oder mit der Thylakoidmembran assoziiert sein könnten, gewählt und mit ihren Sequenzen eine Homologiesuche innerhalb der Sequenzdaten der *Arabidopsis thaliana* Database (unter der Internetadresse <http://www.tigr.org/tdb/at/at.html>; vgl. auch Delseny *et al.*, 1997) durchgeführt. Insgesamt neun verschiedene EST-Klone („expressed sequence tag“) wurden gefunden, die signifikante Homologien zu einem der *Synechocystis*-Gene aufwiesen. Drei dieser EST-Klone wurden vom *Arabidopsis* Biological Resource Center der Ohio State University bezogen und ausgehend von diesen Sequenzen, die die 3'-Enden exprimierter Gene darstellen, der Versuch un-

ternommen, die korrespondierenden vollständigen Gene für die vermutlich plastidären Homologe der bakteriellen Proteasen HtrA (DegP), HhoA (DegQ) und SppA aus verschiedenen cDNS-Bibliotheken von *Arabidopsis* und Spinat zu klonieren, sowie, bei Erfolg, die kodierten Proteine hinsichtlich ihrer Lokalisation, Funktion und Regulation zu untersuchen.

3.2.1. HtrA (DegP)

Versuch zur Klonierung des vollständigen Gens

Die Sequenzierung des als Ausgangsbasis dienenden EST-Klons (Arbeitsbezeichnung „EST1“) erbrachte für diesen eine Gesamtlänge von 751 Bp. Davon zeigten die ersten 560 Bp eine Homologie von etwa 30% zu *htrA* von *E. coli*, gefolgt von einem charakteristischen Poly(A)⁺-Schwanz. Das gesamte Fragment ließ sich mittels der Restriktionsenzyme *SalI* und *NotI* aus dem Trägervektor (pZL-1) ausschneiden und wurde nach radioaktiver Markierung mit ³²P-dCTP als Sonde für die Sichtung zweier Phagen-Bibliotheken von *Arabidopsis*- bzw. Spinat-cDNS verwendet. Dieser Ansatz lieferte jedoch auch nach mehrmaliger Wiederholung kein positives Hybridisierungssignal und wurde letztendlich nach der Veröffentlichung der kompletten *htrA*-Sequenz durch Itzhaki *et al.* (1998) eingestellt.

Herstellung polyklonaler Antikörper gegen HtrA

Als Ausgangsschritt wurde eine heterologe Expression des durch das EST-Fragment kodierten C-terminalen Teils des Gesamtproteins in *E. coli* angestrebt. Dazu wurde das Fragment mittels der Restriktionsendonukleasen *SalI* und *HindIII* aus dem Vektor ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pQE-31 (Fa. Qiagen) kloniert. Die Testexpression nach dem Standardverfahren (Abschnitt 2.2.16.) im *E. coli*-Stamm M15 erwies sich als erfolgreich (s. Abb. 3-7): das Produkt lag mit ca. 29 kDa im aus den Sequenzdaten errechneten Größenbereich, befand sich auch bei schonender, nichtdenaturierender Solubilisierung der Bakterienproteine überwiegend in der löslichen Fraktion und wurde in einer Quantität produziert, die es ermöglichte, das Produkt direkt nach elektrophoretischer Auftrennung durch Transfer auf Nitrozellulosemembran und Ausschneiden der prominenten Proteinbande in präparativem Maßstab zu gewinnen.

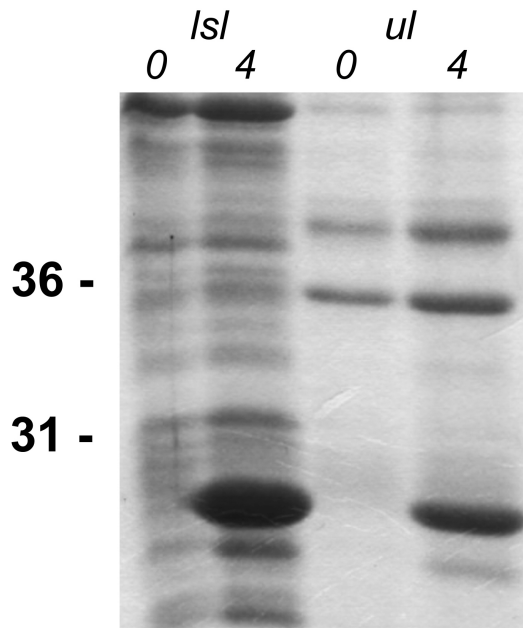


Abb. 3-7. Heterologe Expression des in EST1 klonierten C-terminalen Teils des *htrA*-Gens von *A. thaliana*, umkloniert in pQE-31, in *E. coli* M15 und Bestimmung der Solubilität des Expressionsprodukts. Auftrennung: SDS-PAGE; Färbung: Coomassie Brilliant Blue; *lsl*: lösliche Fraktion; *ul*: unlösliche Fraktion; *0*, *4*: Zeit in Stunden nach Expressionsinduktion mit IPTG (*0* = nichtinduzierte Kontrolle). Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Die nach der beschriebenen Methode erhaltene Präparation des Expressionsprodukts auf Nitrozellulose wurde für die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen diesen Teil von HtrA durch Immunisierung eines Kaninchens verwendet (Abschnitt 2.2.17.). Die gewonnenen Antiseren wurden anschließend in Hybridisierungsexperimenten gegen elektrophoretisch aufgetrennte und auf Nitrozellulosemembranen transferierte Plastidenfraktionen von *Arabidopsis* und Spinat getestet. Bei dem nach der dritten Immunisierung gewonnenen Serum wurde dabei eine starke Reaktion bei etwa 37 kDa gefunden, die im zugehörigen Präimmunserum nicht auftrat (Abb. 3-8). Diese Reaktion fand sich in den Präparationen mit den gesamten Chloroplastenproteinen ebenso wie in der Thylakoidfraktion, fehlte im Stroma jedoch völlig. Die weitaus stärkste Reaktion zeigte sich in der Lumenpräparation, im Gegensatz zu den Voraussetzungen von Itzhaki *et al.* (1998), die das Protein als fest mit der lumenalen Peripherie der Thylakoidmembran assoziiert charakterisiert haben (siehe auch Diskussion). Spätere Präparationen des gleichen Antiserums reproduzierten die gleiche Reaktion in gesteigerter Intensität, jedoch mit zunehmender Anzahl unspezifischer Nebenreaktionen und sehr starkem Hintergrund (vgl. Anmerkung zur Methode im experimentellen Teil, Abschnitt 2.2.17.).

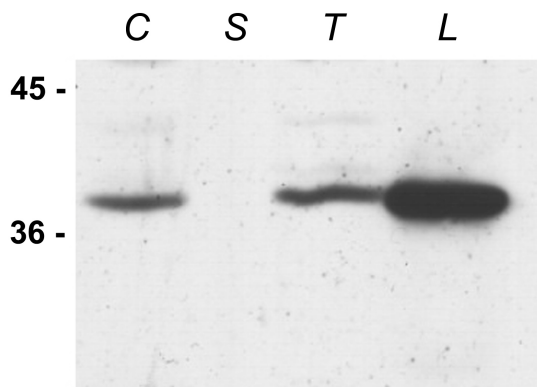


Abb. 3-8. Reaktion einer polyklonalen Antikörperpräparation gegen den C-terminalen Abschnitt von HtrA (DegP) von *Arabidopsis thaliana* L. (Präparation „AS138 (II)“) auf elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nitrozellulose immobilisierten Chloroplastenfractionen aus Spinat.

Fractionen: **C**: Chloroplasten gesamt; **S**: Stroma; **T**: Thylakoide gesamt; **L**: Lumen. Links: Molekulargewichtsmarker in kDa

3.2.2. HhoA (DegQ / DegP5)

Klonierung des vollständigen Gens

Der als Ausgangsbasis eingesetzte EST-Klon (T22208; ursprüngliche Arbeitsbezeichnung „EST2“; deshalb tragen die meisten der im weiteren Verlauf der Arbeit an diesem Gen verwendeten Konstrukte und Oligonukleotide die Ziffer 2 im Namen) wurde sequenziert und zeigte eine Länge von 739 Bp. Davon wiesen die ersten ca. 600 Bp nach dem 5'-Ende bezüglich Identität bzw. Ähnlichkeit Werte zwischen 35% und 60% zu den *hhoA/B*-Genen von *E. coli* bzw. *Synechocystis* auf, gefolgt von einem charakteristischen Poly(A⁺)-Schwanz. Wie bei *htrA* ließ sich das komplette EST-Fragment durch Schneiden mit *SalI* und *NotI* direkt an den Klonierungsstellen aus dem Vektor (pZL-1) ausschneiden und nach radioaktiver Markierung mit ³²P-dCTP (Abschnitt 2.2.5.1.) als Sonde für die Sichtung verschiedener cDNS-Bibliotheken verwenden. Dabei wurden zunächst in einer der *Arabidopsis*-Bibliotheken mehrere schwache Signale gefunden, die sich jedoch nach ihrer Vereinzelung als falsch positiv herausstellten.

Parallel zu den Experimenten mit radioaktiver Hybridisierung wurde in einem weiteren Ansatz der Versuch unternommen, den fehlenden 5'-Bereich des *hhoA*-Gens durch PCR mit einem genspezifischen, an das 5'-Ende des EST-Klons (im Bereich um Position 220, mit einer Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease *KpnI*) angepaßten (psEST2a; siehe Abschnitt 2.1.7.) und einem vektorspezifischen Oligonukleotid (pGAD424_fwd bzw. -_rev) aus einer kommerziell erworbenen cDNS-Bibliothek (Fa. BD Clontech, Heidelberg) zu amplifizieren. In dem Ansatz mit pGAD424_rev fand sich dabei ein PCR-Produkt von ca. 700 Bp Länge (Abb. 3-9), das zur weiteren Analyse isoliert und in pMOSblue kloniert wurde. Eine Sequenzanalyse des PCR-Produkts zeigte, daß es sich bei diesem aufgrund der Homologie zu *hhoA/B* von *E. coli* bzw. *Synechocystis* mit hoher Wahrscheinlichkeit um den fehlenden 5'-

Bereich des entsprechenden *Arabidopsis*-Gens handelte, der darüber hinaus auch den Genanfang einschließlich des Startkodons enthielt.

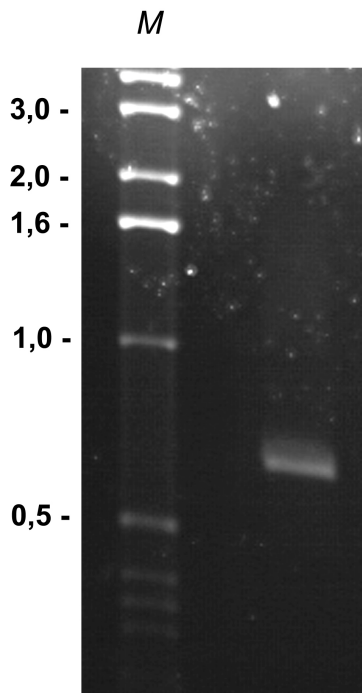


Abb. 3-9. Amplifikation eines DNS-Fragments aus einer *Arabidopsis*-Gesamt-cDNS-Bibliothek mittels der Oligonukleotide psEST2a und pGAD424_rev.

30 Amplifikationszyklen; Hybridisierungstemperatur 60 °C; *M*: DNS-Größenstandard (kB)

Da die Versuche mit radioaktiver Hybridisierung letztendlich erfolglos blieben, wurde, um das vollständige *hhoA*-Gen zu erhalten, versucht, das neu gewonnene PCR-Fragment mit dem EST-Fragment zu vereinen. Dies wurde mit Hilfe der *KpnI*-Schnittstelle bei ca. 220 Bp im EST-Klon bewerkstelligt, die sich durch die Wahl des genspezifischen Oligonukleotids für die PCR auch im PCR-Produkt befand, hier an dessen 3'-Ende. Dazu wurde als zweite Schnittstelle *PstI* ausgewählt, die sich in beiden Klonierungsvektoren (pMOSblue und pZL-1) im 5'-Bereich vor dem jeweiligen DNS-Fragment befand. Beide Konstrukte wurden jeweils mit dieser Kombination geschnitten, anschließend wurden das PCR-Fragment und der linearisierte und am 5'-Ende um ca. 200 bp verkürzte EST-Klon gereinigt und zusammen religiert (Abb. 3-10). Daraus resultierte, bestätigt durch Testrestriktionen und Sequenzierung, das vollständige *Arabidopsis*-Gen, kloniert in pZL-1.

Eigenschaften des *hhoA*-Gens

Die DNS-Sequenz (siehe Anhang A-1) besteht aus insgesamt 1156 Bp, davon sind 14 Bp untranslatierter Bereich am 5'-Ende; nach dem Stoppkodon liegen 176 Bp, die den Poly(A)⁺-Schwanz enthalten. Die kodierende Region hat eine Länge von 981 Bp, woraus sich ein primäres Genprodukt von 327 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa errechnet.

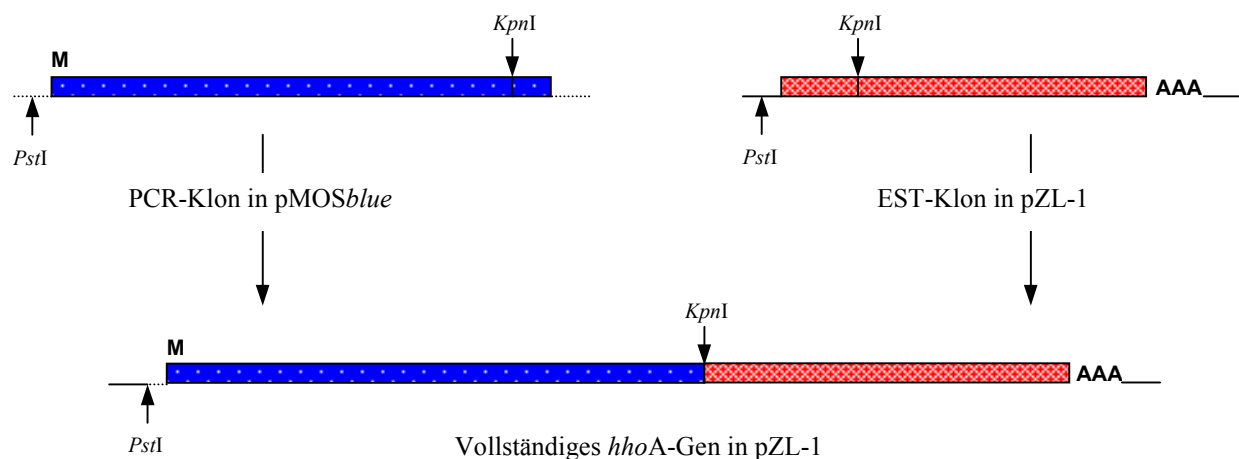


Abb. 3-10. Strategie zur Klonierung des vollständigen *hhoA*-Gens aus den EST- und PCR-Klonen.

Die Aminosäuresequenz zeigt 50% Ähnlichkeit bzw. 35 % Identität zu HhoA von *E. coli*. Die Homologien zu HhoB bzw. HtrA (DegP) von *E. coli* liegen nur wenig unter diesen Werten, was die Zugehörigkeit zu der sogenannten „HtrA-Familie“ von Proteasen (Pallen und Wren, 1997) anzeigt. Die Region mit der höchsten Homologie zu allen diesen Proteasen, auch von *Synechocystis*, liegt in der C-terminalen Hälfte des Proteins, im Bereich der innerhalb der HtrA-Familie hochkonservierten, aus den Aminosäuren ¹⁴⁷His, ¹⁸⁸Asp und ²⁶⁶Ser gebildeten katalytischen Triade. Anders als die bakteriellen Vertreter der HtrA-Familie besitzt das durch das vorliegende Gen kodierte Protein von *Arabidopsis* offenbar keine der sogenannten PDZ-Domänen, die sich bei den meisten anderen Mitgliedern dieser Gruppe unmittelbar an die katalytische Triade anschließen. Das hydropathische Profil des Genprodukts (s. Anhang A-2) weist keine längeren überwiegend hydrophoben Regionen aus; damit läßt sich vorhersagen, daß es sich nicht um ein Transmembranprotein handelt, sondern um ein lösliches, vergleichbar HhoA aus *E. coli* und *Synechocystis*. Der N-terminale Bereich des Primärprodukts weist die geringsten Homologien auf, zeigt aber typische Eigenschaften eines Transitpeptids; in Übereinstimmung damit findet sich nach 70 Aminosäuren die Sequenz *Ala-Ile-Ala*, welche eine typische Schnittstelle für das Entfernen eines lumenalen Transitpeptids nach dem Transport durch die Thylakoidmembran darstellt. Demnach handelt es sich bei dem Genprodukt von *hhoA/degP5* mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Komponente des Thylakoidlumens.

Molekularbiologische Charakterisierung

Um die Abundanz von *hhoA* im *Arabidopsis*-Genom festzustellen, wurde zunächst eine Hybridisierung des mit ³²P radioaktiv markierten Gens gegen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaute und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierte Gesamt-DNS aus

Arabidopsis durchgeführt. Gleichzeitig wurde auch gegen auf der selben Membran immobilisierte Gesamt-DNS anderer Pflanzenarten, welche identisch behandelt worden waren, hybridisiert. Die Auswertung über PhosphorImager zeigte nur ein deutliches Hybridisierungssignal; in der mit *Hind*III verdauten *Arabidopsis*-Gesamt-DNS (Abb. 3-11). Die Homologie auf DNS-Ebene zu den *hhoA*-Genen anderer Pflanzenarten ist offenbar nicht hoch genug, um eine spezifische Hybridisierung zu ermöglichen.

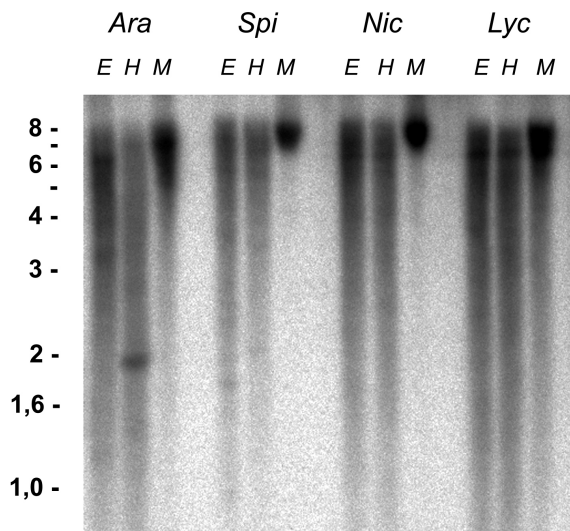


Abb. 3-11. Hybridisierung von mit ^{32}P radioaktiv markiertem *hhoA* aus dem cDNS-Klon gegen Gesamt-DNS aus *Arabidopsis thaliana* (*Ara*), *Spinacia oleracea* (*Spi*), *Nicotiana tabacum* (*Nic*) und *Lycopersicon esculentum* (*Lyc*), restriktionsverdaut mit *Eco*RI (*E*), *Hind*III (*H*) und *Mlu*I (*M*). (Die Restriktion mit *Mlu*I war offensichtlich nicht erfolgreich). DNS-Lademenge pro Spur: ca. 12 μg ; links: DNS-Größenstandard (kB)

Um die Annahme zu beweisen, es handle sich bei *hhoA* um ein in singulärer Kopienzahl vorliegendes Gen, wurde der Versuch unternommen, das Gen durch Hybridisierung an einen BAC-Filter (BAC = „bacterial artificial chromosome“), auf dem nahezu das gesamte *Arabidopsis*-Genom, aufgeteilt in 9216 BAC-Klone, immobilisiert ist, näher zu lokalisieren (siehe Abschnitt 2.2.6.2.). Beide mit dieser Hybridisierung erhaltenen Signalpaare ließen sich durch Auswertung benachbarter Markergene (Daten auf der Internetseite des Instituts für Genbiologische Forschung Berlin, IGF, http://www.mpimp-golm.mpg.de/101/igf_bac_cont.html) übereinstimmend auf einen distinkten, auf Chromosom IV gelegenen, Bereich zurückführen (sogenanntes „contig“). Später veröffentlichte Daten des internationalen Sequenzierungsprojekts für das *Arabidopsis*-Genom (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) bestätigten die Lokalisierung von *hhoA* auf Chromosom IV.

Expressionsanalyse

Da es sich bei der für die HtrA-Familie namengebenden Protease HtrA (DegP) von *E. coli* um ein hitzestressinduzierbares Enzym handelt (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch *et al.*, 1989), wurde der Versuch unternommen, die Transkription des *hhoA*-Gens bei *Arabidopsis*-Material, welches unterschiedlich starkem Hitzestress (Abschnitt 2.2.24.2., Methode b) unterzogen worden

war, quantitativ zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde eine Hybridisierung einer mit ^{32}P radioaktiv markierten RNS-Sonde an mittels Oligo(dT)-Zellulose aus dem Pflanzenmaterial gewonnener Poly(A)⁺-RNS (Abschnitt 2.2.4.4.), welche punktförmig auf Nitrozellulose aufgebracht und immobilisiert wurde (sog. „dot blot“), durchgeführt. Nach Auswertung konnte kein Ansteigen der Intensität des Hybridisierungssignals festgestellt werden (Abb. 3-12). Das Experiment wurde daraufhin mit elektrophoretisch aufgetrennter und auf Nitrozellulose immobilisierter Gesamt-RNS aus Hitzestress bzw. Hitzeschock unterzogenem *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial (Abschnitt 2.2.24.2., Methode a) wiederholt (RNS-Gehalt ca. 7 µg pro Spur). Hier ließ sich nach Auswertung in keiner der Spuren ein spezifisch *hhoA* zuzuordnendes Hybridisierungssignal feststellen. Das Transkript von *hhoA* kommt in der Pflanze unter Normalbedingungen offenbar nicht in detektierbarer Quantität vor; es wurden auch keine Hinweise auf ein Ansteigen der Transkription nach Behandeln der Pflanzen mit erhöhter Temperatur gefunden.

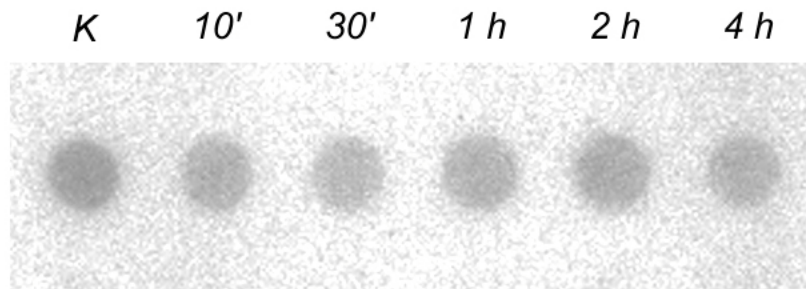


Abb. 3-12. Hybridisierung mit ^{32}P radioaktiv markierter *hhoA*-DNS gegen aus unterschiedlich lange mit Hitzestress behandeltem Pflanzenmaterial gewonnene Poly-(A⁺)-RNS. Auswertung: „Phosphorimager“. **K:** Kontrolle, unbehandelt; **10' - 4 h:** Dauer der Stressbehandlung; eingesetzte Menge an RNS: 400 ng pro Punkt

In einem weiteren Versuch wurden die oben geschilderten Experimente mit Poly(A)⁺-RNS bzw. Gesamt-RNS aus mit Lichtstress behandeltem Pflanzenmaterial wiederholt. Auch hier wurden keine spezifischen Hybridisierungssignale erzielt, so daß über eine Induzierbarkeit des Gens durch Lichtstress ebenfalls nichts ausgesagt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

in vitro-Transkription und -Translation

Um die aus der DNS-Sequenz abgeleiteten Vorhersagen über das primäre Genprodukt zu überprüfen, wurde der *hhoA*-Klon in einem *in vitro* Ansatz komplett in mRNA transkribiert und mit dieser eine *in vitro*-Translation unter Verwendung von Kaninchen-Reticulocytenslysat durchgeführt. Die durch den Einsatz von ^{35}S -Methionin radioaktiv markierten Translationsprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels PhosphorImager ausgewertet. Als

Translationsprodukte mit den größten Molekulargewichten wurde eine Doppelbande bei ca. 45 kDa sowie ein etwas intensiveres Signal bei ca. 40 kDa detektiert (Abb. 3-13). Demnach ist das tatsächliche Molekulargewicht des primären Genprodukts etwas höher als das aus den Sequenzdaten errechnete (36 kDa).

Import *in organello*

Nach erfolgreicher *in vitro* Transkription und Translation wurde der Versuch unternommen, das radioaktiv markierte Translationsprodukt in frisch isolierte Spinatchloroplasten zu importieren, um die Annahmen bezüglich Größe und Lokalisation des prozessierten Genprodukts innerhalb des Organells zu überprüfen. Nach Auswertung der PhosphorImager-Platte fand sich in der Stromafraktion ein Signal von etwa 35 kDa Molekulargewicht – offenbar ein intermediäres Prozessierungsprodukt, da das Genprodukt eindeutig weiter in die Thylakoide importiert wurde und in dieser Fraktion ein endgültiges Molekulargewicht von ca. 33 kDa zeigte (Abb. 3-13). Darüber hinaus erwies es sich in dieser Fraktion als unempfindlich gegenüber die Abverdauung durch Thermolysin und Trypsin, was auf eine Lokalisation an der Innenseite der Thylakoidmembran oder im Thylakoidlumen hindeutet. In einem weiteren Importversuch wurde daher die Thylakoidfraktion durch Ultraschall weiter in Membran- und Lumenfraktion aufgetrennt. Hier fand sich das HhoA zugerechnete Signal eindeutig im Lumen; in der Membranfraktion verblieben nur Reste der Aktivität. Abb. 3-13 faßt die Ergebnisse von Translation und Import zusammen.

Heterologe Expression des *hhoA*-Klons in *E. coli*

Das vollständige Gen wurde aus dem pZL-1-Klon mit Hilfe der Oligonukleotide psEST2pre(+) und psEST2(+)*rev* über PCR amplifiziert, der für den gereiften Teil des Proteins kodierende Bereich mit Hilfe der Oligonukleotide psEST2mat(+) und psEST2(+)*rev*. Beide Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Pst*I in die Expressionsvektoren pQE-30 (für das vollständige Gen) bzw. pQE-31 (für den gereiften Teil) kloniert. Nach Verifizierung des korrekten Leserasters durch Sequenzanalyse wurden Expressionstests in *E. coli* M15 durchgeführt. Die Auswertung der zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion geernteten und präparierten bakteriellen Proteine durch Elektrophorese und Coomassie-Färbung des Gels zeigte bei keinem der beiden Expressionskonstrukte eine sichtbare Zunahme einer spezifischen Proteinbande im Vergleich zur nichtinduzierten Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt).

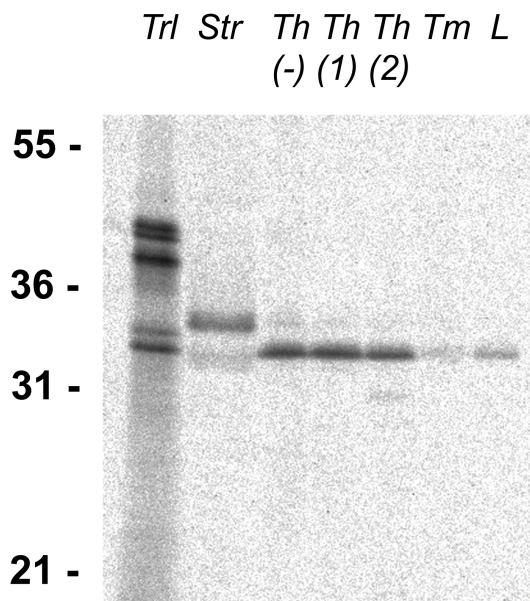


Abb. 3-13. *In vitro*-Translation von *hhoA* und *in organello* Import des Translationsprodukts in Spinatchloroplasten. **Trl**: Translationsprodukte; **Str**: Stroma; **Th**: Thylakoide gesamt, (-): unbehandelt; (1): behandelt mit Thermolysin; (2): behandelt mit Trypsin. **Tm**: Thylakoidmembranen nach Beschallung; **L**: Lumen nach Beschallung. Markierung: ^{35}S -Methionin; links: Molekulargewichtsmarker in kDa

Eine weitere Analyse durch Transfer der Proteine auf Nitrozellulose und Hybridisierung mit Anti-RGS/His-Serum ergab in dem Ansatz mit dem kompletten *hhoA*-Gen ein Signal bei ca. 40 kDa in den beiden Fraktionen nach Induktion, welches in der nichtinduzierten Kontrolle fehlte. Ein vergleichbares, ebenfalls nur nach Induktion auftretendes Signal fand sich bei ca. 32 kDa in dem Expressionsansatz mit dem für den gereiften Teil des Proteins kodierenden Abschnitt des Gens (Abb. 3-14). In beiden Ansätzen hatte demnach eine Expression stattgefunden, jedoch nicht in ausreichender Menge für eine Visualisierung durch einfaches Färben des Elektrophoresegels. Dieses Experiment wurde für beide Konstrukte mit dem *E. coli*-Stamm SG 13009 wiederholt; dabei wurde jedoch keine gegenüber M15 höhere Expressionsrate festgestellt.

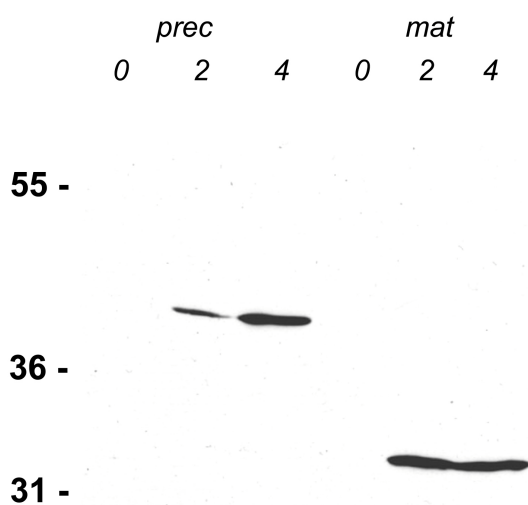


Abb. 3-14. Heterologe Expression des gesamten *hhoA*-Gens sowie des für den prozessierten Abschnitt des Proteins kodierenden Teils in *E. coli* M15. Immunologischer Nachweis der Expressionsprodukte nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulose durch Hybridisierung mit RGS/His-Antiserum. **prec**: vollständiges Gen; **mat**: für den gereiften Teil kodierender Genabschnitt; 0 – 4: Zeit in Stunden nach Expressionsinduktion durch Zugabe von IPTG (0 = nichtinduzierte Kontrolle). Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Bei dem Versuch, die Expressionsprodukte nach denaturierender Solubilisierung der Bakterienproteine durch eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose aufzureinigen konnte keine für eine präparative Gewinnung ausreichende Aufkonzentrierung erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

In einem neuen Versuchsansatz wurden daher die gleichen Fragmente von *hhoA* wie in den pQE-Konstrukten, ebenfalls unter Zuhilfenahme von *Bam*HI und *Pst*I, in die Expressionsvektoren pRSET5a bzw. pRSET5b kloniert. Dieses Vektorsystem hat in bestimmten Fällen den Vorteil höherer Expressionsausbeuten, verbunden mit dem Nachteil, daß die Expressionsprodukte hier nicht als Fusionsproteine angelegt und daher im Falle schwacher Expression nicht über Hybridisierung mit Antikörpern nachweisbar sind. Die Auswertung der bakteriellen Proteine nach der Induktion durch Elektrophorese und Coomassie-Färbung des Gels ergab im Fall des kompletten *hhoA*-Gens erneut keinerlei sichtbare Zunahme einer spezifischen Proteinbande im Vergleich zur nichtinduzierten Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Im Ansatz mit dem funktionellen Teil des Gens zeigte sich jedoch in den 2 bzw. 4 Stunden nach Induktion gewonnenen Präparationen bei 33 kDa eine gegenüber der Kontrolle quantitativ deutlich hervortretende Proteinbande. Nach einer schonenden, nichtdenaturierenden Solubilisierung der Präparationen fand sich diese Bande vollständig in der unlöslichen Fraktion (Abb. 3-15). Die Menge an überexprimiertem Protein erwies sich als ausreichend, um dieses nach Transfer auf Nitrozellulose direkt durch Ausschneiden des Zentralbereichs der Ponceaugefärbten Bande sauber und präparativ für die Herstellung von Antiseren zu gewinnen.

Immunologischer Nachweis von HhoA in Plastidenfraktionen

Mehrere Kaninchen wurden mit dem durch heterologe Überexpression präparativ erhaltenen Produkt des funktionellen Teils des *hhoA*-Gens immunisiert. Die zunächst gewonnenen Antiseren zeigten in Hybridisierungsexperimenten im Vergleich mit dem jeweiligen Präimmuneserum zwar eine deutliche spezifische Reaktion gegen das eingesetzte Expressionsprodukt, konnten bei Hybridisierung auf verschiedenen Subfraktionen aus Spinat- bzw. *Arabidopsis*-Chloroplasten jedoch kein eindeutig als zu HhoA zugehörig erkennbares Signal liefern. Spätestens nach der fünften Immunisierung wurde das jeweilige Serum durch zu starke Hintergrundreaktionen unbrauchbar (siehe Diskussion).

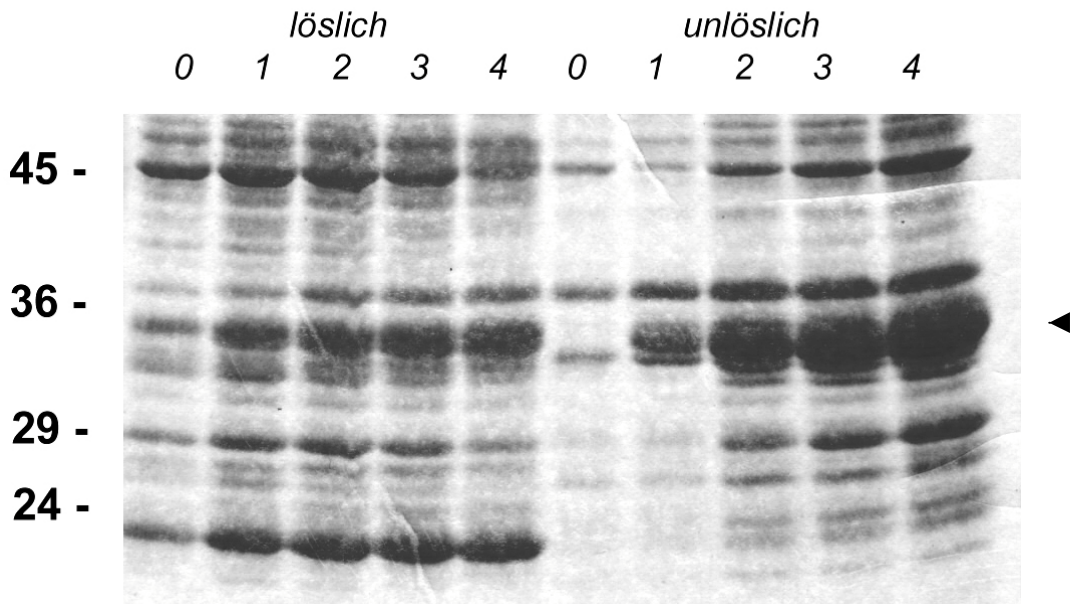


Abb. 3-15. Heterologe Expression des für den gereiften Teil des Proteins kodierenden Abschnitts von *hhoA*, kloniert in pRSET5b, in *E. coli* BL-21. Trennung in lösliche und unlösliche Fraktionen durch schonende nichtdenaturierende Solubilisierung mit Lysozym. Färbung: Coomassie Brilliant Blue. 0 – 4: Stunden nach Expressionsinduktion mit IPTG (0 = nichtinduzierte Kontrolle); Pfeil: Lokalisation des Expressionsprodukts; links: Molekulargewichtsmarker in kDa

In einem weiteren Versuch wurde für die Immunisierung die direkt aus dem Elektrophoresegegel ausgeschnittene Proteinbande des Überexpressionsprodukts verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.17.). Die hierbei gewonnenen Antiseren waren ab der fünften Präparation in der Lage, in Plastidenfraktionen von *Arabidopsis* eine immunologische Reaktion hervorzurufen, die mit den aus dem *in organello*-Import des Translationsprodukts von *hhoA* getroffenen Vorhersagen für die Lokalisierung des Proteins im Chloroplasten übereinstimmte: Das Signal fand sich bei ca. 34 kDa, in Gesamtchloroplasten und Thylakoidlumen, in Stroma und Thylakoidmembranen hingegen nicht (Abb. 3-16A). In einem weiteren Ansatz mit diesem Antiserum konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden, daß HhoA bei Behandlung der Pflanzen mit erhöhten Lichtintensitäten nicht stärker akkumuliert, sondern unter Hochlicht offenbar sogar leicht abgebaut wird (Abb. 3-16B).

Funktionelle Tests mit dem gereiften *hhoA*-Expressionsprodukt

Wie erwähnt, wurde das Expressionsprodukt in *E. coli* BL-21 problemlos in hohen, für die präparative Gewinnung geeigneten Mengen produziert, fand sich bei nativer Solubilisierung der Bakterienextrakte jedoch vollständig in der unlöslichen Fraktion und lag damit in einer Form vor, die Tests zur proteolytischen Aktivität unmöglich machten.

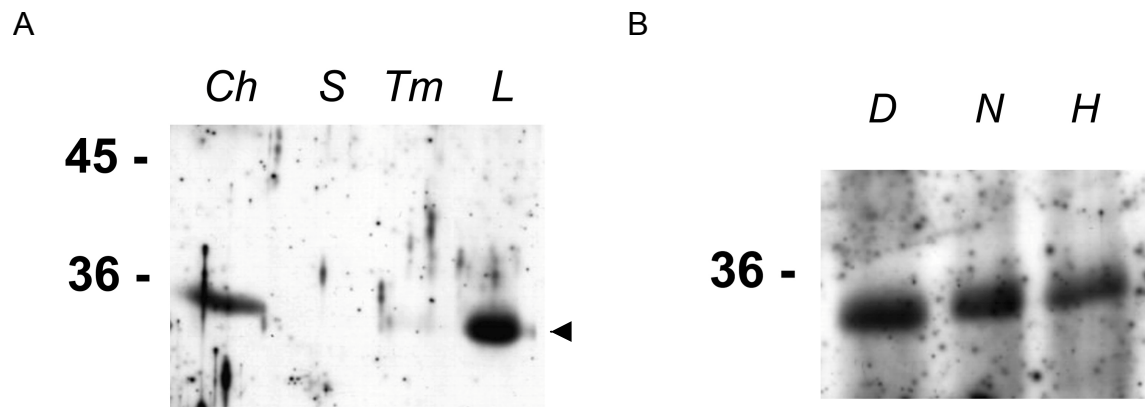


Abb. 3-16. Immunologischer Nachweis von HhoA (Pfeil) in Chloroplastenfraktionen aus *Arabidopsis*. Hybridisierung mit Antiserum gegen den heterolog in *E. coli* überexprimierten prozessierten Abschnitt des Proteins (Antiserum „AS244 (V)“, Verdünnung 1:1000). **A:** Nachweis der Lokalisation von HhoA im Thylakoidlumen. **Ch:** Chloroplasten gesamt; **S:** Stroma; **Tm:** Thylakoidmembranen; **L:** Thylakoidlumen. **B:** Quantitative Verteilung von HhoA in Lumenpräparationen aus unter unterschiedlichen Lichtbedingungen angezogenem *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial (eingesetzte Proteinmenge: je 15 μg). **D:** 2 Tage dunkeladaptiert; **N:** Normallicht (ca. 50 – 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **H:** 2 Tage unter Lichtstreß (ca. 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

In mehreren Tests mit denaturierender Solubilisierung unter Verwendung von 8 M Harnstoff konnte gezeigt werden, daß sich das Expressionsprodukt vollständig in die lösliche Fraktion überführen ließ, wenn der Lysepuffer zusätzlich 0,1% Triton-X100 enthielt (Abb. 3-17). Die denaturierenden Reagenzien wurden anschließend über Dialyse wieder entfernt, was das Expressionsprodukt in einer renaturierten, für Aktivitätstests potentiell geeigneten Form zur Verfügung stellte.

Die proteolytische Aktivität in dem mit gereiftem *hhoA*-Expressionsprodukt angereicherten löslichen Bakterienextrakt wurde zunächst gegen eine mutierte Form von Plastocyanin, eines potentiellen Substrats *in vivo*, ausgetestet. Dabei konnte jedoch in keinem der verschiedenen Ansätze ein Abbau des Substrats festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Als künstliches Substrat wurde daher in den folgenden Versuchen, den Veröffentlichungen zur Charakterisierung der bakteriellen Proteasen HhoA/B (Waller und Sauer, 1996) folgend, β -Casein gewählt. Es zeigte sich, daß dieses im mit gereiftem *hhoA*-Expressionsprodukt angereicherten löslichen Bakterienextrakt sehr gut abgebaut wurde; der Umstand, daß auch im Ansatz mit DFP als stärkstem Inhibitor von Serinproteasen die Degradation nicht beeinträchtigt wurde, stellte jedoch die Beteiligung des Expressionsprodukts an der beobachteten proteolytischen Aktivität in Frage (Abb. 3-18). In weiteren Versuchen wurde die Aktivität der solubilisierten *hhoA*-Expressionspräparation mit identisch behandeltem Extrakt aus nicht transformierten BL-21 verglichen, wobei in diesem eine identische Abbauaktivität gegenüber β -Casein festgestellt wurde (Abb. 3-19).

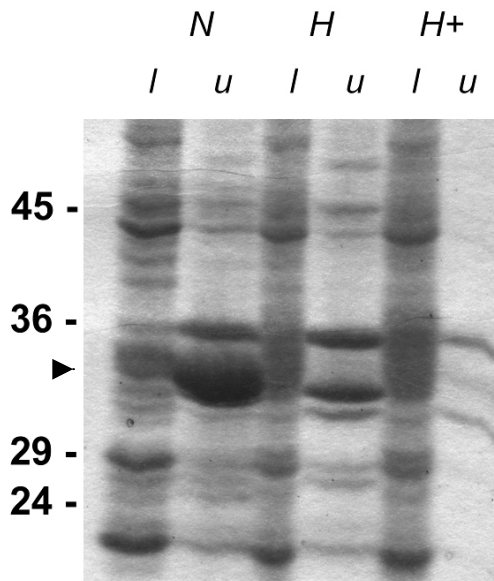


Abb. 3-17. Rückführung des heterologen Expressionsprodukts des *hhoA*-Gens von *A. thaliana* in *E. coli* aus der unlöslichen in die lösliche Fraktion mittels denaturierender Solubilisierung. *N*: Solubilisierung nichtdenaturierend (Abschnitt 2.2.16.2., Methode A); *H*: Solubilisierung denaturierend (Methode B ohne Triton); *H+*: Solubilisierung denaturierend (Methode B mit 0,1% Triton X-100); *l*: lösliche Fraktion; *u*: unlösliche Fraktion. Der Pfeil kennzeichnet die Position des Expressionsprodukts. Links: Molekulargewichtsmarker

Daraufhin unternommene Versuche zur Abtrennung weiterer bakterieller Proteine aus den Extrakten durch modifizierte Präparationsmethoden sowie Degradationstests bei pH 5,5, um die Gegebenheiten des Thylakoidlumens zu simulieren, konnten ebenfalls keine Unterschiede im Degradationsmuster von β -Casein zwischen den Extrakten mit und ohne *hhoA*-Expressionsprodukt aufdecken.

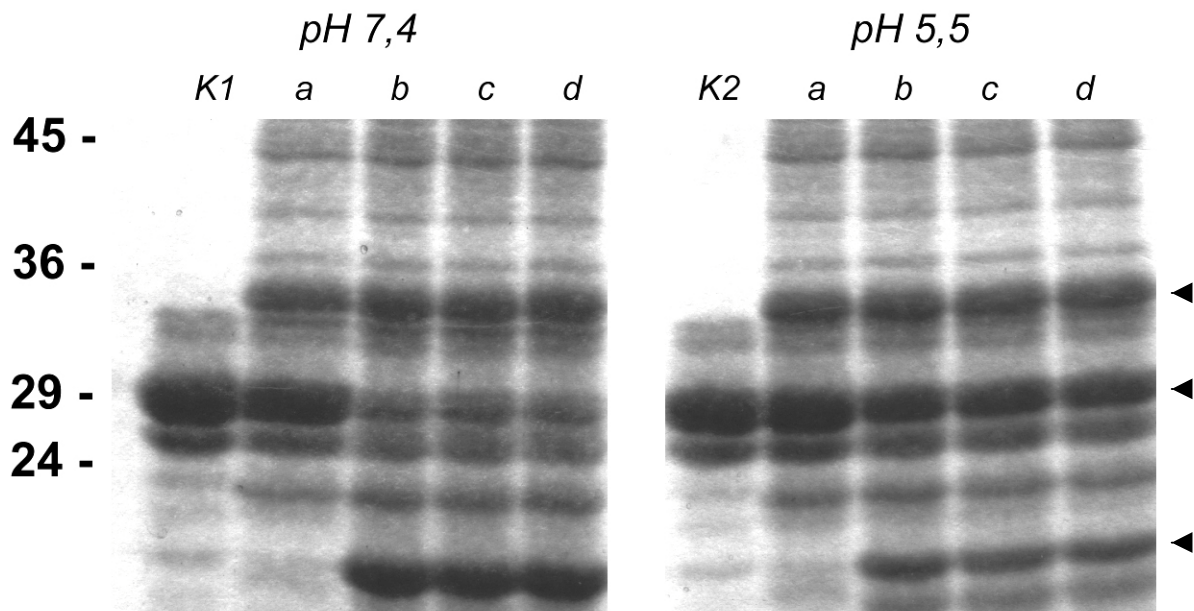


Abb. 3-18. Aktivitätstest mit resolubilisiertem und renaturiertem Überexpressionsprodukt von *hhoA* in *E. coli* gegen β -Casein unter verschiedenen pH-Bedingungen (vgl. Abschnitt 2.2.22.3.). Die Inkubationsdauer betrug pro Ansatz 4 Stunden bei 37 °C. *K*: Kontrolle – β -Casein im jeweiligen Reaktionspuffer ohne *hhoA*-Expressionsprodukt, inkubiert; *a*: Kontrolle – β -Casein im jeweiligen Reaktionspuffer mit *hhoA*-Expressionsprodukt, nicht inkubiert; *b*: wie *a*, jedoch inkubiert; *c*: wie *b*, Zusatz von 1 mM DFP im Inkubationspuffer; *d*: wie *b*, Zusatz von 100 μ M Leupeptin im Inkubationspuffer. Die Pfeile kennzeichnen von oben nach unten die Positionen des *hhoA*-Expressionsprodukts, von β -Casein, sowie des primären Degradationsprodukts. Links: Molekulargewichtsmarker

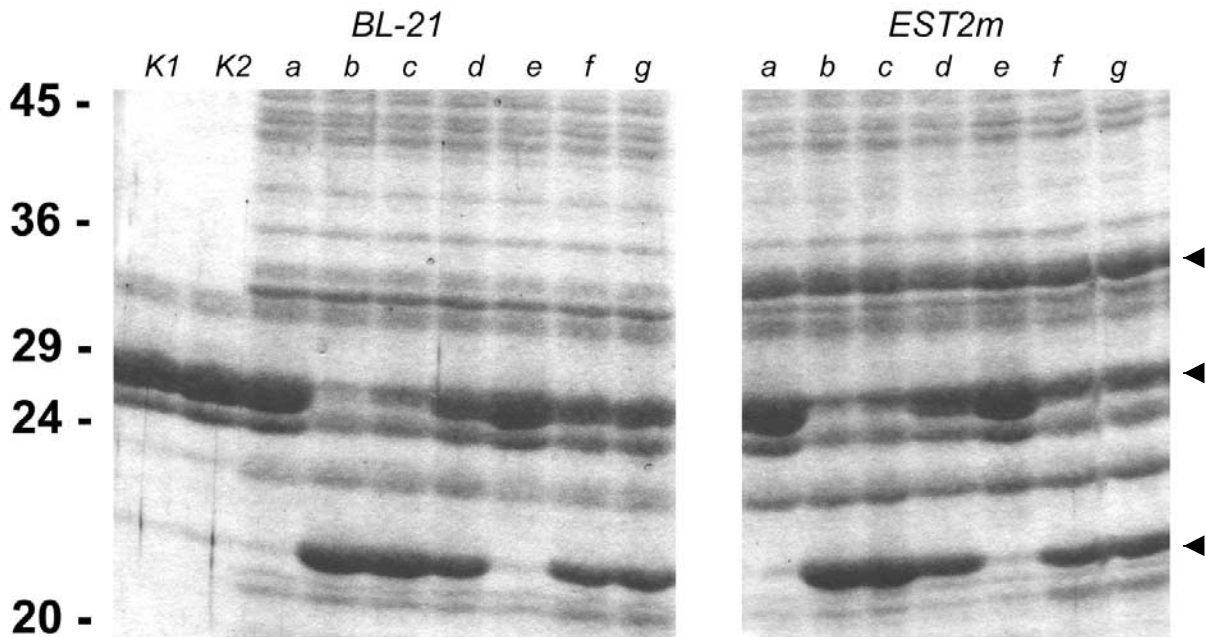


Abb. 3-19. Aktivitätstest von solubilisierten und renaturierten Extrakten von *E. coli* BL-21, mit („EST2m“) und ohne („BL-21“) *hhoA*-Expressionsprodukt, im Vergleich. Inkubationsdauer pro Ansatz: 3 Stunden bei 37 °C. *K1*: β -Casein in Inkubationspuffer pH 7,4 ohne Bakterienextrakt, inkubiert; *K2*: β -Casein in Inkubationspuffer pH 5,5 ohne Bakterienextrakt, inkubiert; *a*: β -Casein in Inkubationspuffer pH 7,4 mit Bakterienextrakt, nicht inkubiert; *b*: wie *a*, inkubiert; *c*: wie *b*; Zusatz von 100 μ M DTT; *d*: wie *b*; Zusatz von 5 mM DFP; *e* - *g*: entsprechend *a* - *c*, pH 5,5. Die Pfeile kennzeichnen von oben nach unten die Positionen des *hhoA*-Expressionsprodukts, von β -Casein, sowie des primären Degradationsprodukts. Links: Molekulargewichtsmarker

Charakterisierung von *hhoA/B*-defizienten *Synechocystis*-Mutanten

In *Synechocystis* PCC 6803 sind neben *htrA* (*slr1204*) zwei weitere Gene für Proteasen der HtrA-Familie bekannt: *sll1427* (*hhoB*) und *sll1679* (*hhoA*). Beide zeigen im Vergleich mit *hhoA* von *Arabidopsis* ähnlich hohe Homologien (51% Ähnlichkeit/37% Identität im Falle von *sll1427* bzw. 59%/43% im Falle von *sll1679* – vgl. auch Anhang A-1); aufgrund der unklaren Zuordnung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit grobe Charakterisierungsversuche beider *Synechocystis*-Gene unternommen. Von Prof. Shestakov vom Institut für Genetik der staatlichen Universität Moskau wurden zwei mutante *Synechocystis*-Stämme bezogen, bei denen je eines der Gene *sll1427* bzw. *sll1679* durch Insertion einer Resistenzkassette inaktiviert worden war (sog. „knock-out“-Mutanten), und hinsichtlich eventueller Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Beide Mutanten zeigten unter normalen Anzuchtbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.19.) keine verlässlich reproduzierbaren signifikanten Unterschiede gegenüber dem Wildtyp; Verlauf der Wachstumsrate, Pigmentspektrum und Proteinzusammensetzung wiesen keinerlei Auffälligkeiten auf. Die Mutante *sll1679* schien zwar in den meisten Fällen eine etwas flachere Wachstumskurve zu besitzen, jedoch konnte dies auf eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber bereits geringfügig zu hohen Konzentrationen des für die

Selektion dieser Mutante eingesetzten Antibiotikums Gentamycin zurückgeführt werden. Bestrahlung der Kulturen mit moderat erhöhten Lichtintensitäten ($150 \mu\text{E m}^{-2}$) beantworteten beide Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp nicht mit erhöhter Bildung von im Bereich zwischen 400 und 500 nm Wellenlänge absorbierenden Pigmenten; bei Lichtstreß ($450 \mu\text{E m}^{-2}$) blieben ebenfalls beide Mutanten hinsichtlich ihres gesamten Pigmentgehalts meist etwas schneller aus als der Wildtyp (Abb. 3-20).

Wurden Wildtyp und Mutanten erhöhten Temperaturen von 40°C ausgesetzt, resultierte dies ohne Ausnahme in einer sofortigen Stagnation der Zelldichte (gemessen an der Extinktion bei 800 nm Wellenlänge), gefolgt vom Absterben der Kulturen. Dieser Prozeß schien bei Mutante *sll1679* etwas langsamer vonstatten zu gehen als bei Mutante *sll1427* und dem Wildtyp, jedoch nicht verlässlich reproduzierbar und nur in den Fällen, in denen die Kultur bei Beginn der Temperaturerhöhung ohnehin eine durch langsameres Wachstum (siehe oben hinsichtlich der Anfälligkeit gegen Gentamycin) im Vergleich etwas geringere Zelldichte aufwies.

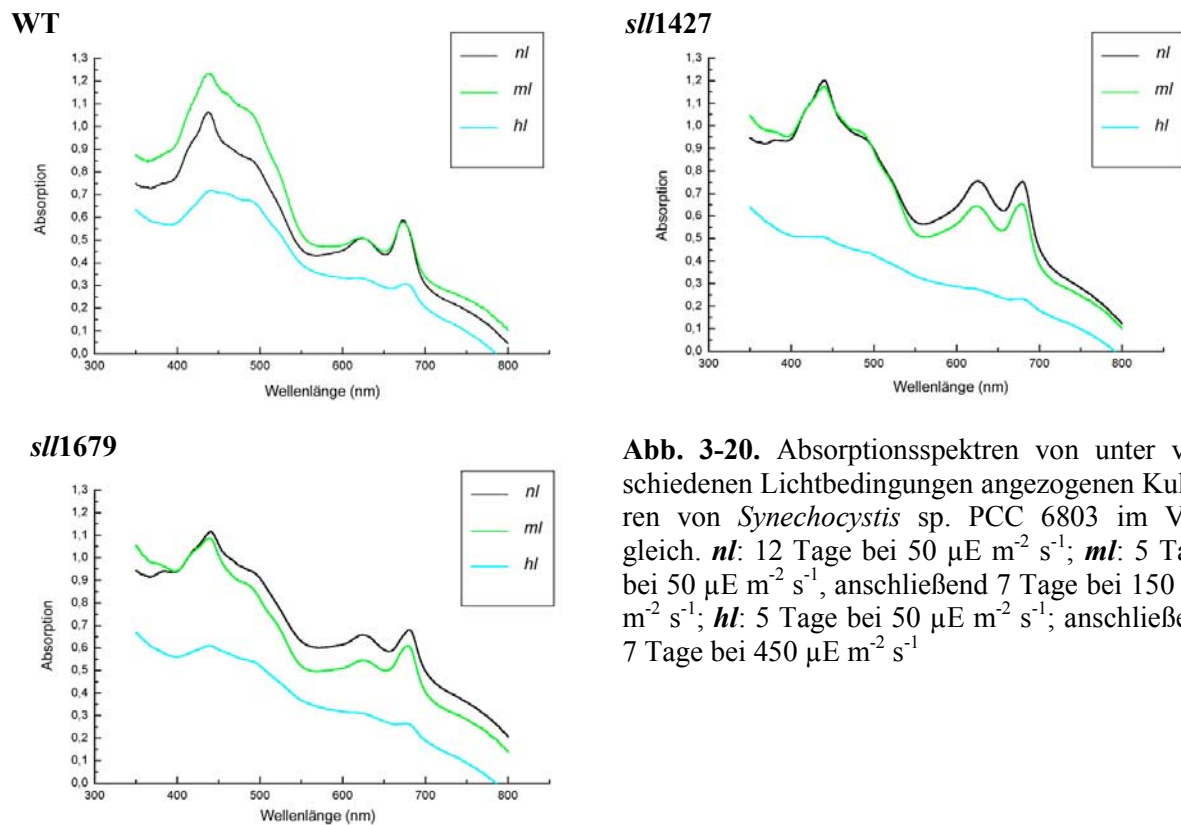


Abb. 3-20. Absorptionsspektren von unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogenen Kulturen von *Synechocystis* sp. PCC 6803 im Vergleich. *nl*: 12 Tage bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; *ml*: 5 Tage bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, anschließend 7 Tage bei $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; *hl*: 5 Tage bei $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, anschließend 7 Tage bei $450 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Eine elektrophoretische Auftrennung der Zellextrakte aus den mutierten Stämmen ergab keinerlei auffällige Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3-21), ebenso die Hybridisierung mit Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine (Ycf3, ClpC und HtrA) bei auf Nitrozellulose immobilisierten Zellextrakten (Daten nicht gezeigt)

Um Hinweise auf eine eventuelle Involvierung von HhoA in den UV-B-induzierten proteolytischen Abbau des D1-Proteins aus dem Reaktionszentrum von Photosystem II zu erhalten, wurde dieser bei den beiden Mutanten und dem Wildtyp nach Bestrahlung mit UV-B (Abschnitt 2.2.20.3.) durch immunologische Detektion von D1 und dessen Abbauprodukten in elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nitrozellulose immobilisierten Zellextrakten bestimmt. Dabei ergab sich außer dem offenbaren Fehlen eines mutmaßlichen D1-Abbauprodukts in der nicht UV-bestrahlten Kontrolle bei *sll1427* kein Hinweis auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mutanten und dem Wildtyp (Abb. 3-22; siehe auch Diskussion).

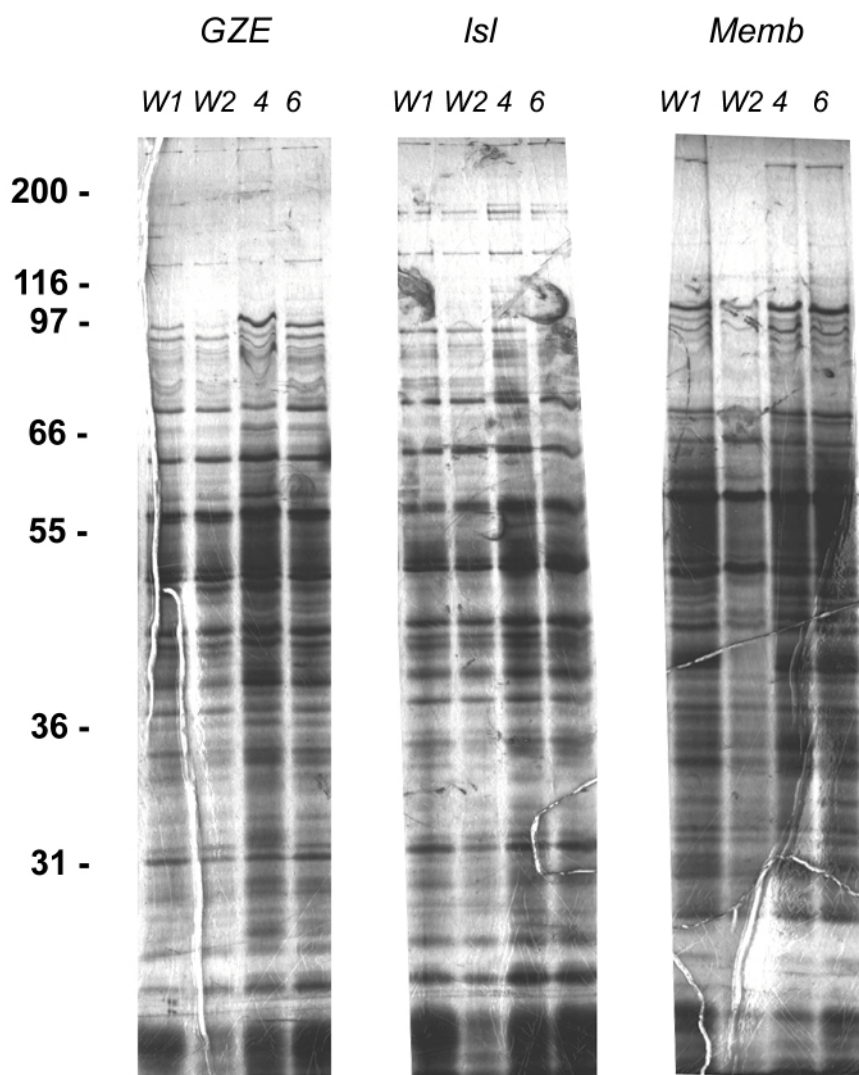


Abb. 3-21. Vergleich des Proteinspektrums verschiedener zwei Wochen alter Kulturen von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Fraktionierung nach Abschnitt 2.2.21., Auftrennung durch SDS-PAGE, Färbung: Silberfärbung. **GZE**: Gesamtzellextrakt; **Isl**: lösliche Fraktion; **Memb**: unlösliche Fraktion; **W1**: Wildtyp, angezogen unter Normalbedingungen; **W2**: Wildtyp, angezogen 6 Tage unter Normalbedingungen, anschließend 8 Tage unter erhöhter Lichtintensität (ca. $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$); **4**: Mutante *sll1427*, angezogen unter Normalbedingungen; **6**: Mutante *sll1679*, angezogen unter Normalbedingungen. Links: Molekulargewichtsmarker

Transformation von *Arabidopsis* mit Sinn- bzw. Gegensinnkonstrukten von *hhoA*

Um die Auswirkungen des Fehlens bzw. eines Überangebotes des *hhoA*-Genprodukts auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersuchen zu können, wurde der Versuch unternommen, *Arabidopsis*-Pflanzen mit *hhoA*-Konstrukten zu transformieren. Die hierzu hergestellten Konstrukte enthielten jeweils das komplette *hhoA*-Gen, kloniert über die per PCR mit den Oligonukleotiden psEST2_AS_fw, psEST2_AS_rv, psEST2_S_fw und psEST2_S_rv eingeführten Restriktionsschnittstellen *SacI* und *XbaI*, einmal in Sinn- und einmal in Gegensinnrichtung hinter dem starken 35S-Promotor, in dem Vektor pGPTV-BAR 35S/nos, welcher zusätzlich über den *nos*-Promotor gesteuert Resistenz gegen Phosphinotricin (auch unter der Bezeichnung Glufosinat gebräuchlicher Wirkstoff des Herbizids BASTA; Fa. Agrevo) vermittelt (vgl. Becker *et al.*, 1992).

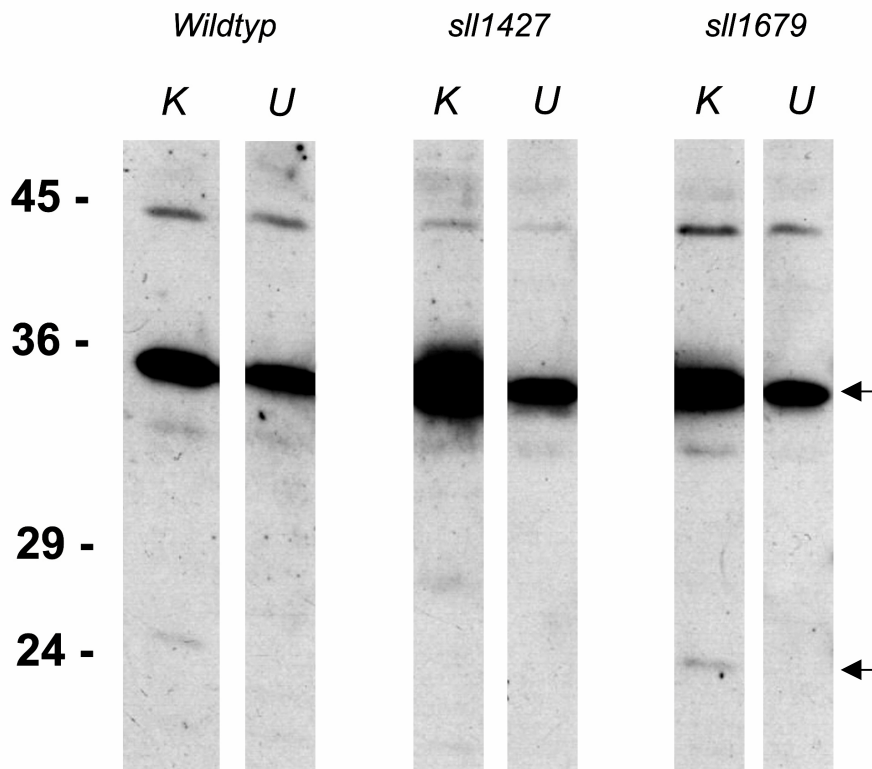


Abb. 3-22. Abbau von D1 (oberer Pfeil) nach Bestrahlung mit UV-B bei verschiedenen *Synechocystis*-Kulturen. Immunologische Detektion mittels Antiserum gegen den N-terminalen Abschnitt von D1 von Spinat (Antiserum Typ „MA“). Der untere Pfeil kennzeichnet die Position eines mutmaßlichen Abbauprodukts von D1, das bei Mutante *sll1427* fehlt. **K:** Kontrolle ohne Bestrahlung; **U:** nach 2 h Bestrahlung mit UV-B. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Ziel war es, Pflanzen zu erzeugen, in denen durch das Gegensinn-Konstrukt die Expressionsrate von *hhoA* möglichst gegen Null herabreguliert (engl. „antisense“-Strategie), bzw. durch das Sinn-Konstrukt hingegen zu einer Überexpression gesteigert ist (engl. „sense“-Strategie)

und aus eventuellen Auswirkungen auf den Phänotyp der Pflanzen Rückschlüsse auf die Aufgabe von HhoA *in vivo* zu ziehen.

Der erste Schritt nach der durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden psEST2_AS_Sq5' und psEST2_AS_Sq3' verifizierten Klonierung, die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mit den Konstrukten über konjugativen Transfer (Abschnitt 2.2.9.1., Methode I), scheiterte an einer irreversiblen Kontamination des einzigen zur Verfügung stehenden *E. coli*-Stammes mit dem Helferplasmid pRK2013, die bewirkte, daß auch Agrobakterien, welche als Negativkontrolle nur mit dem Helferstamm inkubiert worden waren und mit den pGPTV-BAR 35S/nos Konstrukten überhaupt nicht in Berührung gekommen waren, Kanamycinresistenz erlangten. Stattdessen wurde eine direkte, CaCl₂-basierte Transformation durchgeführt (Abschnitt 2.2.9.1., Methode II), die schließlich zum Erfolg führte. Im Anschluß wurden pro Konstrukt 10 Töpfe mit je 4 – 5 *Arabidopsis*-Pflanzen im geeigneten Entwicklungsstadium (unter Kurztagbedingungen angezogen, ca. 4 Wochen alt, mit mehreren blühenden Sprossen) im Abstand von zwei Wochen zweifach mit den transformierten Agrobakterien infiltriert (Abschnitt 2.2.9.2.). Nach Ernte der Samen wurden diese über mit Glufosinat versetzte Nährmedien selektiert. Dabei wurden nach mehreren Wiederholungen schließlich von vier verschiedenen Töpfen der mit dem Gegensinn-Konstrukt infiltrierten Pflanzenreihe (kurz „2_AS“) und von fünf der mit dem Sinn-Konstrukt infiltrierten (kurz „2_S“), jeweils ein oder mehrere Nachkommen in der F1-Generation gefunden, die sowohl die Selektion auf den Glufosinat-Nährböden als auch nach dem Ausbringen auf Erde das Besprühen mit BASTA überlebten (insgesamt 5 verschiedene F1-Pflanzen von „2_AS“ und 13 von „2_S“). Diese Nachkommen wiesen äußerlich zum größten Teil keinerlei offensichtliche Abweichungen vom Phänotyp des Wildtyps auf; in einigen Fällen wurde eine Neigung der Pflanzen zu überdurchschnittlicher Verzweigung der Triebe, verbunden mit Zwergwuchs und mehr oder weniger vollkommener Sterilität, beobachtet, was aber vermutlich nicht direkt mit den eingeführten Konstrukten (der Phänotyp wurde bei „Sinn“- und „Gegensinn“-Pflanzen unabhängig voneinander beobachtet) zusammenhing. Die Pflanzen wurden erneut bis zur Samenreife herangezogen und abgeerntet und die Samen (F2-Generation) der Selektion auf Phosphinotricinhaltigem Nährmedium unterzogen. Die dabei gefundenen Resistenzraten gegen das Herbizid lagen generell zwischen 80 - 90%, was auf erfolgreiche und stabile Transformation der Pflanzen hindeutete. Pro F1-Pflanze wurden daher etwa 30 - 40 erfolgreich selektierte F2-Nachkommen auf Erde unter BASTA-Selektionierung weiter herangezogen, um Blattmaterial für molekularbiologische Untersuchungen zu gewinnen. Aus diesem wurde nach der Ernte die Gesamt-DNS jeder Pflanze separat extrahiert (Abschnitt 2.2.4.2.) und zunächst ei-

nem PCR-Test unterzogen, bei dem versucht wurde, die Insertion im transformierten Konstrukt mittels der Starter-Oligonukleotide *NOS_Prom* und *35S_Prom* zu amplifizieren. Dabei stellte sich heraus, daß trotz der erfolgreichen Selektion aller Pflanzen auf Phosphinotricin-Resistenz nur etwa 60 – 70% aller DNS-Proben das korrekte Amplifikat (ca. 1,3 kB) lieferten (Abb. 3-23).

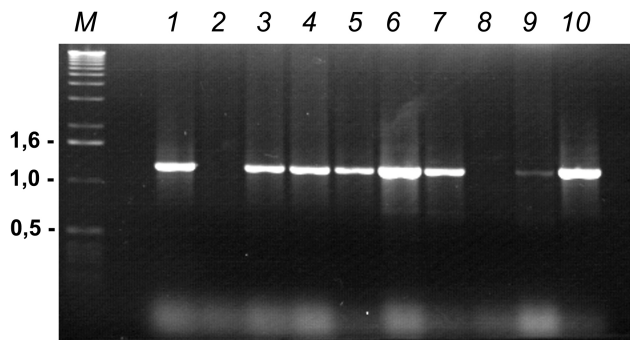


Abb. 3-23. Amplifikation der Sinn- bzw. Gegensinn-DNS von *hhoA* aus der Gesamt-DNS einzelner positiv auf BASTA selektionierter Nachkommen der F1-Pflanzen „S_VIII“ (Spuren 1 und 2), „S_IX“ (Spuren 3 – 5) und „AS_II“ (Spuren 6 – 10) mittels der vektorspezifischen Starteroligonukleotide *35S_Prom* und *NOS_Prom* über PCR. Hybridisierungstemperatur: 62 °C; Amplifikationszyklen: 30; *M*: DNS-Größenstandard (kB)

Der letzte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplante Schritt war, durch Hybridisierung einer radioaktiv markierten DNS-Sonde für *hhoA* auf die Gesamt-DNS der durch Selektion und PCR positiv getesteten F2-Pflanzen die Unabhängigkeit der Transformationsereignisse zu überprüfen. Hierzu wurden die im PCR-Test positiven Gesamt-DNS-Proben aller F2-Nachkommen einer parentalen F1-Pflanze vereinigt, mittels *EcoRI* endonukleolytisch verdaut und nach Elektrophorese auf Nitrozellulose immobilisiert. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierter *hhoA*-Sonde brachte jedoch keine auswertbaren Ergebnisse, was in jedem der Fälle auf eine starke, offenbar im Zuge der Restriktion erfolgte, Degradation der Gesamt-DNS zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. *SppA*

Klonierung des vollständigen Gens

Der als Ausgangsbasis dienende EST-Klon (E8A10T7, Genbank-Zugriffsnummer AA042706; ursprüngliche Arbeitsbezeichnung „*EST7*“, deshalb tragen die meisten der im weiteren Verlauf der Arbeit an diesem Gen verwendeten Konstrukte und Oligonukleotide die Ziffer 7 im Namen) offenbarte nach seiner vollständigen Sequenzierung eine Länge von 855 Bp. Die DNS-Sequenz wies Homologien von ca. 30% zum 3'-Ende von *sppA* (dem Gen für die Signalpeptid-prozessierende Protease, auch als Protease IV bezeichnet) aus *E. coli* sowie zu dessen beiden Homologen in *Synechocystis* sp. PCC6803, *sppA1* (*sll1703*) und

sppA2 (*slr0021*), auf, gefolgt von einem Poly(A⁺)-Schwanz. Das Fehlen eines charakteristischen Startkodons am 5'-Ende führte, verbunden mit der Tatsache, daß sowohl *sppA* aus *E. coli* als auch *sppA1* aus *Synechocystis* mit jeweils ca. 2 kB eine mehr als doppelt so lange Gensequenz aufweisen, zu der Annahme, daß der EST-Klon nur den 3'-terminalen Teil des *sppA*-Gens von *Arabidopsis* enthielt.

Mittels *EcoRI* wurde die gesamte EST-Insertion aus dem Vektor (pBluescript) ausgeschnitten und mit ³²P markiert als Sonde für die Sichtung von cDNS-Bibliotheken von *Arabidopsis* und Spinat verwendet. Dabei konnten vier verschiedene positive Signale aus der *Arabidopsis*-Bibliothek vereinzelt werden, die sich nach Wiederholen der radioaktiven Hybridisierung als positiv bestätigten. Die DNS der vier Phagen wurde isoliert und durch Restriktionsverdauung bzw. PCR (Abb. 3-24) und Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13fw und M13rv untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß alle vier offenbar die gleiche Insertion enthielten – ein knapp 2,2 kB langes DNS-Fragment, über *EcoRI* und *EcoO109I* in ein Phagemid auf Basis von pBluescript kloniert. Die Sequenzierung zeigte, daß der 3'-Bereich des Klons mit der Sequenz von EST7 identisch war. Aufgrund der Länge des Klons wurde zunächst angenommen, daß dieser das vollständige *sppA*-Gen enthielt; die bei genauerer Untersuchung der Sequenz festgestellte Tatsache, daß das erste als Startkodon geeignete ATG nach dem 5'-Ende des Fragments erst bei ca. 210 Bp lag, und daß auch die potentielle Aminosäuresequenz vor diesem Methionin bereits Homologien zu SppA von *E. coli* bzw. *Synechocystis* aufwies, stellte dies jedoch in Frage.

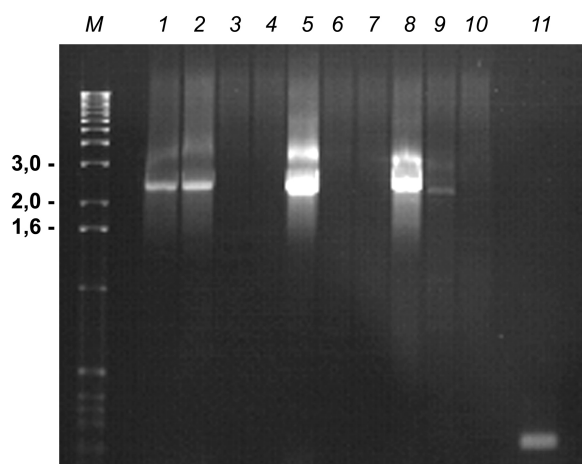


Abb. 3-24. Amplifizierung der cDNS aus vier mittels *sppA*-Sonde positiv getesteten Klonen aus einer *Arabidopsis* Phagen-cDNS-Bibliothek (Spuren 1, 2, 5 und 8). Spuren 3, 4, 6, 7, 9 - 11: Kontrollen; Starteroligonukleotide: M13 fw und rev; Hybridisierungstemperatur: 54 °C; M: DNS-Größenstandard (kB)

Wie bei EST2/*hhoA* wurde auch bei EST7 parallel zu den Hybridisierungsexperimenten mit der Phagen-DNS-Bibliothek der Versuch unternommen, den fehlenden 5'-Bereich des *sppA*-Gens durch PCR aus einer cDNS-Bibliothek zu amplifizieren. Verwendet wurde hierzu ebenfalls die in pGAD424 klonierte, kommerziell erworbene Bibliothek mit den vektorspezifischen

schen Oligonukleotiden pGAD424_fwd bzw. -_rev und dazu das genspezifische Oligonukleotid psEST7a, angepaßt an den Bereich um Position 60 des EST-Fragments, der die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *HgaI* enthält. Im Ansatz mit pGAD424_rev als vektorspezifischem Oligonukleotid wurde dabei ein Produkt von etwa 1,3 - 1,4 kB Länge amplifiziert. Da diese Länge, addiert zu der des EST-Fragments praktisch der des aus der Phagen-Bibliothek erhaltenen Klons entsprach, wurde zunächst angenommen, daß dieser trotz der beschriebenen gegenteiligen Hinweise das vollständige Gen enthielt. Sequenzierung des PCR-Fragments nach dessen Klonierung in pMOSblue ergab hingegen, daß dieses zwar fast vollständig mit dem 5'-Ende des Phagen-Klons identisch war, am 5'-Ende jedoch einige zusätzliche Basen besaß, von denen die letzten neun vor der bereits bekannten Sequenz für die Aminosäurefolge Met – Ala – Lys kodieren. Eine derartige Sequenz ist typisch für den Beginn eines primären Translationsprodukts, deshalb wurde als gesichert angesehen, daß das *sppA*-Gen nach Ersetzen des 5'-Endes des Phagen-Klons durch das des PCR-Klons vollständig vorliegen würde. Nach Subklonierung des Phagen-Klons aus dem Bluescript-Phagemid in pBluescript II KS (-) über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *EcoO109I* wurde dieser Austausch über *EcoRI* und die interne Schnittstelle *NdeI* an Position 484 realisiert (Abb. 3-25).

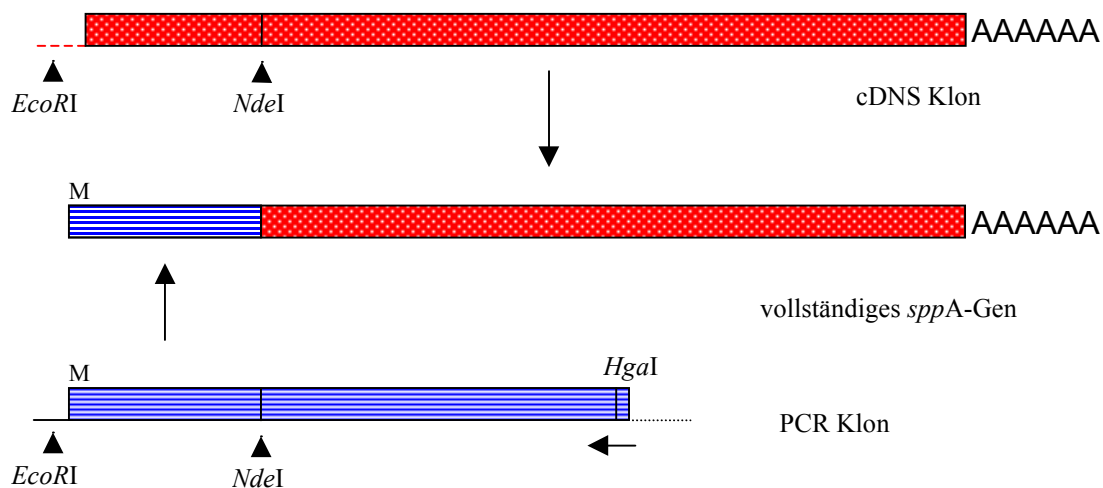


Abb. 3-25. Strategie zur Klonierung des vollständigen *sppA*-Gens aus cDNS- und PCR-Klon.

Eigenschaften des *sppA*-Gens

Die Sequenz von *sppA* (siehe Anhang A-3) hat eine Länge von 2152 Bp, beginnend mit einer kurzen Folge nichttranslatierter Nukleotide inklusive eines im Leseraster befindlichen Stoppkodons an Position -15 und einer typischen Initiationssequenz für die Translation ($^{-6}\text{GAAACAATGGCA}^{+6}$, vgl. Lütcke *et al.*, 1987). Es folgen 2031 Bp für Aminosäuren kodierende Sequenz, abgeschlossen von zwei kurz hintereinander folgenden Stoppkodons im

Leserahmen und einem Poly(A⁺)-Schwanz. Das Primärtranskript hat demnach eine Länge von 677 Aminosäuren und ein kalkuliertes Molekulargewicht von ca. 74,4 kDa. Die Proteinsequenz besitzt eine durchschnittliche Identitätsrate von 27% gegenüber SppA1 von *Synechocystis* PCC6803 und 22% gegenüber SppA (Protease IV) von *E. coli*, die Homologie überschreitet in mehreren hochkonservierten Bereichen in der C-terminalen Hälfte jedoch den Wert von 50% deutlich (vgl. Anhang A-3). An den Positionen 60 und 69 befindet sich die Aminosäure Alanin; beide könnten nach Vorhersage der im Internet verfügbaren Programme PSORT (unter <http://psort.nibb.ac.jp/>) und ChloroP (Emanuelsson *et al.*, 1999; unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) Erkennungsstellen für eine Prozessierung des Primärtranskripts nach Import in das Plastidenstroma darstellen. Obwohl die Bereiche höchster Homologie zu den bakteriellen Äquivalenten zwei von drei in der Literatur als potentielle Transmembrandomänen bei Protease IV von *E. coli* gekennzeichneten Sequenzen mit einschließen, zeigt das Hydropathieprofil von SppA in *Arabidopsis* keinen hydrophoben Bereich, der lang genug wäre, um eine solche Transmembrandomäne darstellen zu können. Es wurde daher zunächst angenommen, daß es sich bei SppA in *Arabidopsis* um ein stromales Protein handelt, welches höchstens peripher mit der Thylakoidmembran assoziiert.

Die bakteriellen Pendanten von SppA wurden aufgrund von Versuchen mit Proteaseinhibitoren in die Gruppe der Serinproteasen eingeordnet (Ichihara *et al.*, 1984; Ichihara *et al.*, 1986); anders als z. B. bei der HtrA-Familie findet sich hier aber keine typische „katalytische Triade“ (vgl. HhoA und Anhang A-1). Im Vergleich der Proteine von *Arabidopsis*, *Synechocystis* sp. PCC6803 und *E. coli* finden sich im Bereich der höchsten Homologien vier Serinreste, die zu 100% konserviert sind. Durch die räumliche Nähe zu einem Lysinrest sind davon bei SppA von *Arabidopsis* vor allem die Serine an den Positionen 426 und 453 mögliche Kandidaten für das katalytische Zentrum (vgl. Diskussion bezüglich der potentiellen räumlichen Struktur).

Molekularbiologische Charakterisierung

Wie bereits bei *hhoA* wurde auch bei *sppA* als erstes eine Hybridisierung des mit ³²P radioaktiv markierten Klons gegen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaute und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisierte Gesamt-DNS von *Arabidopsis*, Spinat und weiteren Pflanzenarten durchgeführt. Die einzigen signifikanten Signale, die dabei erhalten wurden (Abb. 3-26), fanden sich in der *Arabidopsis* - Gesamt-DNS: eine Bande bei ca. 5,5 kB im *EcoRI*-Verdau und zwei bei ca. 2,3 bzw. 2,8 kB im *HindIII*-Verdau (in Übereinstimmung mit der Feststellung, daß die Sequenz des *sppA*-Klons an Position 1055 eine Restriktionsschnittstelle für *HindIII* besitzt). Daraus ließ sich schließen, daß *sppA* im *Arabidopsis*-Genom nur in

einfacher Kopienzahl vorliegt; außerdem ist die Homologie auf DNS-Ebene zu den *sppA*-Genen anderer Pflanzen offenbar nicht ausreichend für eine spezifische Hybridisierung mit der *Arabidopsis*-Sonde.

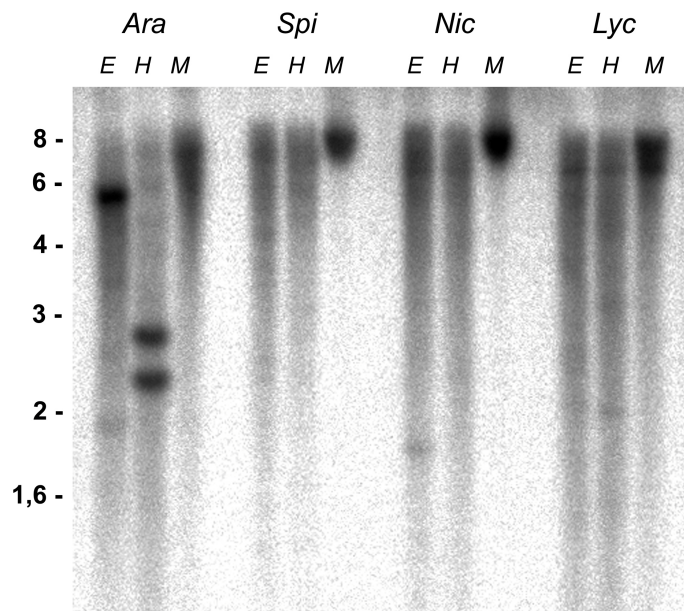


Abb. 3-26. Hybridisierung von mit ^{32}P radioaktiv markierter *sppA*-DNS aus dem cDNS-Klon gegen Gesamt-DNS aus *Arabidopsis thaliana* (*Ara*), *Spinacia oleracea* (*Spi*), *Nicotiana tabacum* (*Nic*) und *Lycopersicon esculentum* (*Lyc*), restriktionsverdaut mit *EcoRI* (*E*), *HindIII* (*H*) und *MluI* (*M*). (Die Restriktion mit *MluI* war offensichtlich nicht erfolgreich). DNS-Lademenge pro Spur: ca. 12 μg ; links: DNS-Größenstandard (kB)

Um die Annahme, daß *sppA* in *Arabidopsis* in singulärer Kopienzahl vorliegt, zu bekräftigen, wurde eine Hybridisierung der gleichen DNS-Sonde gegen das auf einem BAC-Filter immobilisierte nahezu komplette *Arabidopsis*-Genom durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.2.6.2 und die entsprechenden Erläuterungen zur Methode bei *hhoA*). Dabei konnten drei spezifische Signalpaare lokalisiert werden; die Auswertung der Koordinaten ergab für alle drei denselben Bereich des Genoms, „contig“ 4 auf Chromosom I. Später veröffentlichte Ergebnisse des internationalen Sequenzierungsprojekts des *Arabidopsis*-Genoms bestätigten die Lokalisierung des *sppA*-Gens auf Chromosom I (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>).

Expressionsanalyse

Um herauszufinden, ob sich das Expressionsniveau von *sppA* als Antwort auf verschiedene Streßfaktoren in der Umwelt der Pflanzen ändert, wurde die Transkription des Gens zunächst bei Licht- und Hitzestreß näher untersucht. Dazu wurde aus *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial, welches zuvor unterschiedlich lange Temperaturen von 42°C bzw. Lichtintensitäten von etwa 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt worden war, über Oligo-(dT)-Zellulose die Poly-(A⁺)-RNS präpariert und punktförmig auf Nitrozellulose immobilisiert (sog. „dot blot“). Nach Hybridisierung mit einer aus dem *sppA*-Klon konstruierten, radioaktiv markierten RNS-Sonde zeigte sich in der Hitzestreß-Reihe keine Reaktion, die über das Hintergrundniveau hinaus gegangen wäre

(Daten nicht gezeigt); in der Lichtstreß-Reihe ließ sich hingegen in den Proben aus dem länger (beginnend mit 5 h) bestrahlten Pflanzenmaterial ein Anstieg der Radioaktivität gegenüber der Kontrolle feststellen (Abb. 3-27).

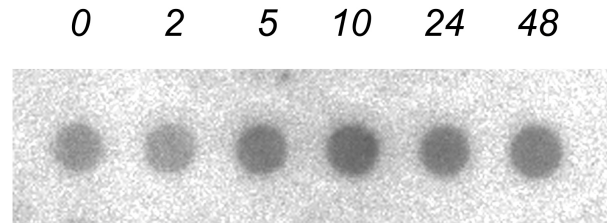


Abb. 3-27. Hybridisierung mit ^{32}P radioaktiv markierter *sppA*-DNS gegen aus unterschiedlich lange mit Hochlicht bestrahltem Pflanzenmaterial gewonnene Poly-(A⁺)-RNS. Auswertung: „Phosphoimager“. 0 - 48: Dauer der Bestrahlung in Stunden; eingesetzte Menge an RNS: 600 ng pro Punkt

Da es mit der Oligo-(dT)-Methode nicht möglich war, ausreichende Mengen an Poly-(A⁺)-RNS für eine elektrophoretische Trennung vor Hybridisierung mit einer RNS-Sonde zu präparieren, wurde nach Wiederholung des Lichtstreßexperiments aus dem geernteten Pflanzenmaterial die Gesamt-RNS isoliert und nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel auf Nitrozellulose immobilisiert. Mit dieser Membran wurde das Hybridisierungsexperiment mit radioaktiv markierter *sppA*-RNS als Sonde wiederholt. Dabei zeigte es sich, daß in der Kontrolle und den Proben aus nur für kürzere Zeit hochlichtbestrahlten Pflanzen praktisch kein spezifisches Hybridisierungssignal zu finden war; nach zehn Stunden Lichtstreß wurde jedoch eine Bande bei knapp 2,4 kB sichtbar, die in den Proben nach 26 und 52 h deutlich an Intensität zunahm (Abb. 3-28).

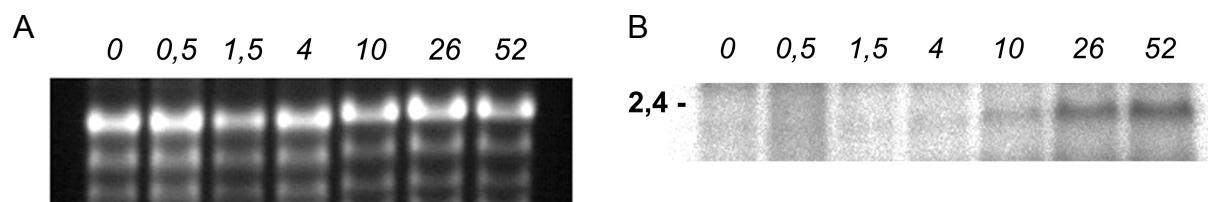


Abb. 3-28. Lichtstreßinduzierte Transkription von *sppA* in *Arabidopsis*. Hybridisierung einer mit ^{32}P radioaktiv markierten *sppA* RNS-Sonde auf Gesamt-RNS aus unterschiedlich lange mit Hochlicht von ca. $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahltem *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial. Eingesetzte RNS-Menge pro Spur: ca. $7 \mu\text{g}$. Die Zahlen oberhalb der Spuren kennzeichnen die Bestrahlungsdauer des der jeweiligen Präparation zugrundeliegenden Pflanzenmaterials in Stunden. **A:** Kontrolle: Quantitative Darstellung der enthaltenen rRNS im Agarosegel unter UV; **B:** Auswertung des Hybridisierungsexperiments mittels „Phosphoimager“. Links: RNS-Größenstandard (kB)

Dieses Ergebnis ließ sich reproduzieren. Um eindeutig auszuschließen, daß die Abhängigkeit der Transkription von der Dauer der Bestrahlung mit Hochlicht in Wirklichkeit auf die durch

die verwendeten Scheinwerfer etwas erhöhte Umgebungstemperatur (ca. 33°C) und somit auf eine Induzierbarkeit durch Hitzestress, zurückzuführen war, wurde zusätzlich mit dem gleichen Hybridisierungsexperiment die Abhängigkeit der Transkriptmenge von der Behandlung mit Hitzestress überprüft (gleiches Material wie im entsprechenden Experiment bei *hhoA*). Dabei konnte in keiner der Spuren ein spezifisch an *sppA* gekoppeltes Signal gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die Abhängigkeit der Transkription von *sppA* von der Dauer der Bestrahlung mit erhöhten Lichtintensitäten wurde daher als erwiesen betrachtet.

in vitro-Transkription,-Translation und Import *in organello*

Zur Verifizierung der aus der cDNA-Sequenz des Klonen gezogenen Schlüsse bezüglich Größe, Prozessierung und suborganellarer Lokalisation des primären Genprodukts von *sppA* wurde zunächst eine *in vitro*-Transkription des Klonen durchgeführt und die daraus erhaltene mRNA in einem Ansatz mit Reticulocytensystem *in vitro* translatiert. Dabei wurde zunächst nur ein Produkt erhalten, welches zwar in großer Menge produziert wurde, vom Molekulargewicht her mit etwa 40 kDa jedoch deutlich unter der vorhergesagten Größe (74,4 kDa) lag (vgl. Abb. 3-30). Darüber hinaus ließ sich dieses Produkt in mehreren Versuchen nicht in frisch isolierte Spinachchloroplasten importieren. Weitere Translationsversuche, bei denen Reticulocytensystem durch Weizenkeimextrakt ersetzt wurde, führten zwar zu einer verbesserten Ausbeute, nicht jedoch zu einer Veränderung der Produktgröße; ein *in organello*-Import war auch mit dem aus Weizenkeimextrakt gewonnenen Translationsprodukt nicht möglich. Erst bei Abgleich der Sequenz des *sppA*-Klonen mit der durch das internationale *Arabidopsis*-Sequenzierungsprojekt neu veröffentlichten genomischen Sequenz von *sppA* (enthalten in Genbank-Zugriffsnummer AC016662) wurde entdeckt, daß der aus der cDNA-Bibliothek gewonnene Klon gegenüber der durch das Sequenzierungsprojekt errechneten translatierbaren Sequenz zwischen den Positionen 898 und 899 (bezogen auf die veröffentlichte Sequenz) zehn zusätzliche Basenpaare enthielt. Durch nochmaliges Sequenzieren der fraglichen Region in allen *sppA*-Klonen mittels des ABI-Systems wurde die Existenz dieser zehn Basenpaare, die an dieser Stelle im Transkript zwangsläufig einen Wechsel des Leserasters mit der Konsequenz eines vorzeitigen Strangabbruchs nach 309 Aminosäuren zur Folge haben, bestätigt. Zugrunde lag offenbar eine fehlerhafte Prozessierung der mRNA, aus der die cDNA-Bibliothek, von der das den 3'-Terminus enthaltende Fragment stammte, erstellt worden war (vgl. Diskussion und Sequenz von *sppA* im Anhang). Die fehlerhafte Zwischensequenz ließ sich mittels der genomischen *sppA*-Sequenz eindeutig auf einen Bereich nichttranslatierter cDNA zurückführen, welcher im Normalfall nach der Transkription des Gens durch Spleißen

der mRNA entfernt wird; sie fand sich bei allen vier originalen Klonen aus der Phagen-cDNS-Bibliothek (Abb. 3-29).

Die das 5'-Ende des Gens enthaltenden PCR-Klone aus einer anderen cDNS-Bibliothek besaßen im fraglichen Abschnitt hingegen die korrekt prozessierte Sequenz, was sich nach nochmaliger Sequenzierung ebenfalls bestätigen ließ. Aus diesem Grund wurde, um den Fehler auszubessern, die gleiche Prozedur wie beim Zusammenfügen von Phagen- und PCR-Klon zum vollständigen Gen noch einmal durchgeführt (vgl. Abb. 3-25), nur wurde als interne Restriktionsschnittstelle statt *NdeI* an Position 484 die hinter dem im Phagen-Klon fehlerhaften Bereich liegende Schnittstelle für *HindIII* an Position 1058 verwendet.



Abb. 3-29. Korrekte und falsche Prozessierung der mRNA von *sppA*. **A:** Ausgangsbasis - aus der genomischen DNS-Sequenz abgeleitete mRNA; der durch Prozessierung (Spleißen) zu entfernende nichttranslatierte Bereich (Intron) ist durch „/“ eingefasst. **P1:** mRNA nach falscher Prozessierung. Die überzähligen Basen aus dem Intron sind rot hervorgehoben. Diese mRNA lag der cDNS aus der Phagen-Bibliothek zugrunde. **P2:** mRNA nach korrekter Prozessierung.

Nach Verifizierung der nunmehr korrekten Sequenz wurden mit dem ausgebesserten Konstrukt die Experimente zur *in vitro*-Transkription und-Translation (im Weizenkeimextrakt-System) wiederholt. Als Resultat wurde nun ein Produkt erhalten, welches deutlich größer als 66 kDa war und somit die aus der DNS-Sequenz abgeleiteten Vorhersagen erfüllte (Abb. 3-30). Im anschließenden Versuch, das korrekte primäre Genprodukt *in organello* in Spinat-chloroplasten zu importieren, fand sich ein schwaches, aber deutliches Signal bei etwa 66 kDa in der Thylakoidfraktion (Pfeil in Abb. 3-30). Bei Auftrennung in Thylakoidmembranen und Lumen ließ sich das Signal nur in den Membranen finden; bei Behandlung der Thylakoide mit Thermolysin verschwand es, was in Übereinstimmung mit dem Fehlen von Transmembran-domänen in der abgeleiteten Proteinsequenz steht. Es wurde gefolgert, daß SppA im Chlo-

roplasten peripher mit der Thylakoidmembran assoziiert, und zwar zur stromalen Seite hin exponiert. Abb. 3-30 faßt die Resultate aus Translation und Import zusammen.

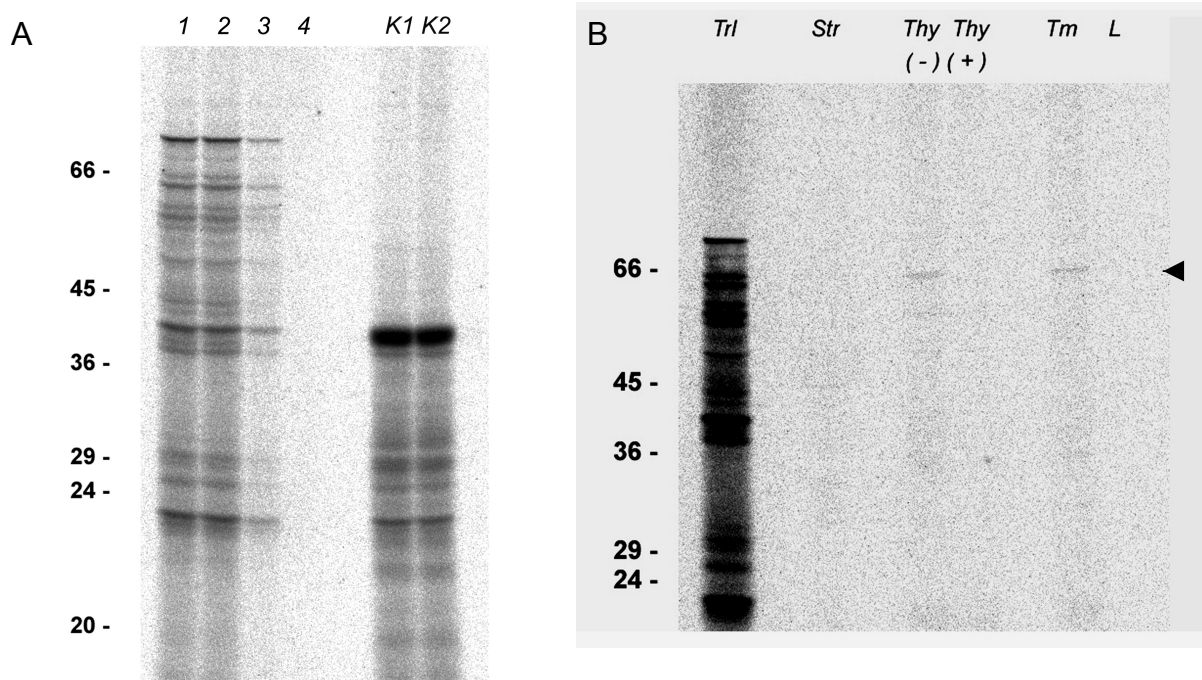


Abb. 3-30. *In vitro*-Translation von *sppA* und Import des Translationsprodukts in Spinatchloroplasten. **A:** *In vitro*-Translation von *sppA* in Weizenkeimextrakt; **1, 2:** Translation ohne Zusatz von Kaliumacetat; **1:** Inkubation für 1 h, **2:** Inkubation für 2 h; **3:** Zusatz von 70 mM Kaliumacetat, 2 h Inkubation; **4:** Zusatz von 140 mM Kaliumacetat, 2 h Inkubation. **K1, K2:** Kontrolle – verwendetes Transkript des ursprünglichen, nicht korrigierten *sppA*-Klons; **K1:** Inkubation für 1 h, **K2:** Inkubation für 2 h. **B:** *In organello*-Import des Translationsprodukts in Chloroplasten aus Spinat; **Trl:** Translation; **Str:** Stroma; **Thy:** Thylakoide gesamt; (-): unbehandelt, (+): Behandlung mit Thermolysin; **Tm:** Thylakoidmembranen; **L:** Lumen. Markierung: ^{35}S -Methionin. Jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Heterologe Expression des *sppA*-Klons in *E. coli*

Unter Verwendung der Oligonukleotide psEST7(+)*fwd_x* und psEST7(+)*rev_x* wurde das vollständige *sppA*-Gen aus pBluescript heraus amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI vor dem 5'-Ende und *Pst*I nach dem 3'-Ende eingefügt. Über diese Endonukleasen wurde das Fragment in die Expressionsvektoren pQE-31 und pRSET5b kloniert. Nach Sicherstellen der erfolgreichen Klonierung durch Sequenzierung der Konstrukte wurden die üblichen Expressionstests durchgeführt; dabei wurde festgestellt, daß unter den Standardbedingungen weder das pQE-31-Konstrukt (getestet in *E. coli* M15 und SG13009) noch das pRSET5b-Konstrukt (in *E. coli* BL-21) zu einer sichtbaren Mehrproduktion einer spezifischen Proteinkomponente in einem der verwendeten Bakterienstämme führte. Immunologische Tests mit Anti-RGS/His-Serum auf den verschiedenen, auf Nitrozellulose immobilisierten Extrakten aus den mit dem pQE-31-Konstrukt durchgeführten Kulturen ergaben, daß im

Stamm SG13009 definitiv kein nachweisbares Produkt entstanden war; im Stamm M15 fand sich eine spezifische Immunreaktion in den Extrakten, die 2 bzw. 4 Stunden nach Expressionsinduktion gewonnen worden waren. Dieses Produkt wies mit ca. 40 kDa jedoch ein deutlich zu geringes Molekulargewicht auf (Abb. 3-31). Da zudem die exprimierte Proteinmenge relativ klein war und so die Aussichten, durch Expressionskultur in größerem Maßstab und anschließende Reinigungsversuche an Ni-NTA-Agarose das Genprodukt präparativ in ausreichender Menge für den Einsatz in der Gewinnung von Antiserum durch Immunisierung von Kaninchen zu erhalten, als gering eingestuft wurden, wurden zunächst Schritte unternommen, die eine Expression von Teilen des Gesamtproteins zum Ziel hatten.

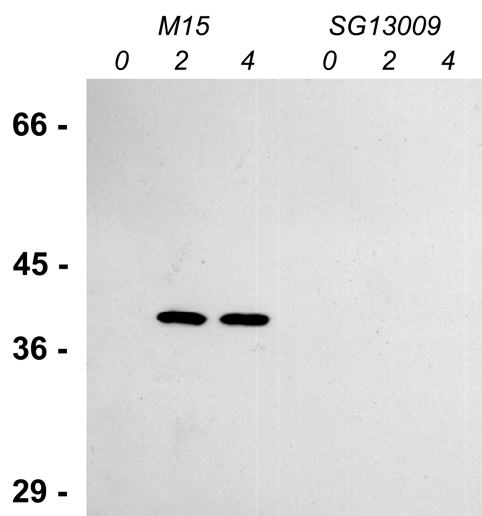


Abb. 3-31. Heterologe Expression des vollständigen *sppA*-Gens, kloniert in pQE-31, in den *E. coli*-Stämmen M15 und SG13009. Immunologischer Nachweis des Expressionsprodukts über Anti-RGS/His-Serum. 0, 2 und 4: Zeit in Stunden nach Induktion mittels IPTG (0 = nichtinduzierte Kontrolle); links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Zu diesem Zeitpunkt konnten weder eine Beeinträchtigung der für die heterologe Expression eingesetzten Bakterien durch ein eventuell aktives und damit toxisches Genprodukt noch eine autoproteolytische Aktivität von SppA, welche zu dem verkürzten Expressionsprodukt geführt haben konnte, ausgeschlossen werden; deshalb wurde angestrebt, durch die Teilexpression möglichst proteolytisch inaktive Produkte zu erhalten. Um das zu erreichen, wurde etwa in der Mitte des Genbereichs, in dem die höchste Homologie der Proteinsequenz im Vergleich mit SppA von *E. coli* und *Synechocystis* PCC6803 vorlag, und wo demnach mit größter Wahrscheinlichkeit das proteolytische Zentrum lokalisiert ist, an Position 1382, eine Trennlinie gezogen und versucht, die 5'-terminal bzw. 3'-terminal dieser Linie gelegenen Bereiche („7x“: 5'-terminaler Teilbereich, bis einschließlich Position 1380; „7y“: 3'-terminaler Abschnitt, Position 1384 bis einschließlich 2036) getrennt in Expressionsvektoren zu klonieren. Die genannten Abschnitte wurden mittels der beiden bereits für die Klonierung des vollständigen Gens in die Expressionsvektoren verwendeten Oligonukleotide psEST7(+)*fwd*_x und psEST7(+)*rev*_x sowie der Oligonukleotide psEST7x_3' und psEST7y_5' amplifiziert und

mit den Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Pst*I versehen. Mittels dieser wurden beide Teilfragmente in pQE-31 und pRSET5b kloniert.

Nach Durchführung der Standard-Expressionsversuche mit *7x*, dem 5'-terminalen Genabschnitt, wurde festgestellt, daß das Expressionsverhalten dieses Konstrukts praktisch dem des vollständigen Gens glich: auch hier wurde ein zunächst nur immunologisch durch Anti-RGS/His Antikörper nachweisbares Expressionsprodukt gefunden, welches nur in der Kombination pQE-Konstrukt/*E. coli*-Stamm M15 auftrat und eine Molekulargröße von ca. 40 kDa aufwies (Abb. 3-32). Eine Expression des pRSET-Konstrukts in optisch nachweisbarem Maßstab gelang nicht. Da das kalkulierte Molekulargewicht des vom klonierten Abschnitt kodierten Peptids etwa 51 kDa betrug, wurde vermutet, daß das gleiche Problem vorlag, das bereits bei den Expressionsversuchen mit dem vollständigen *sppA*-Gen zu einem verkürzten Produkt geführt hatte. Durch Optimierung der Expressionsbedingungen gelang es, die Menge des Expressionsprodukts so weit zu steigern, daß in Verbindung mit immunologischer Kontrolldetektion über RGS/His-Antiserum eine visuelle Identifizierung auf Coomassie-gefärbten Elektrophoresegelen möglich war (Abb. 3-32). Das Produkt verblieb in Solubilisierungstests sowohl nach der nichtdenaturierenden als auch der denaturierenden Methode (unter Verwendung von 8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidiniumchlorid als Solvens) fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion; eine Aufreinigung an Ni/NTA-Agarose erwies sich daher, in einem Probeversuch bestätigt, als nicht durchführbar. Durch Optimierung der Solubilisierungsmethode gelang es jedoch, ausreichend bakterielle Proteine aus der Fraktion, die das Expressionsprodukt enthielt, zu entfernen, was eine direkte Präparation durch den Transfer auf Nitrozellulose und Ausschneiden der Proteinbande nach Färbung mit Ponceau S ermöglichte. Die nach Immunisierung mit diesem Expressionsprodukt gewonnenen Antikörper erwiesen sich aufgrund einer zu hohen Rate an unspezifischen Kreuzreaktionen jedoch letztlich als für die Detektion von SppA in Chloroplastenfraktionen unbrauchbar.

Die Expressionsversuche mit dem 3'-terminalen Abschnitt von *sppA* führten zu einem besseren Ergebnis: Hier gelang zwar mit dem pQE-Konstrukt weder in M15 noch in SG13009 eine Expression; auch mittels RGS/His-Antiserum konnte kein Produkt detektiert werden. Im Ansatz mit dem pRSET-Konstrukt in BL-21 wurde jedoch eine sehr prominente Proteinbande gefunden, welche bereits in der nichtinduzierten Kontrolle auftrat, nach Induktion mit IPTG jedoch mengenmäßig noch stark zunahm. Das Molekulargewicht dieses potentiellen Expressionsprodukts lag bei ca. 25 kDa und entsprach damit fast genau dem rechnerisch ermittelten Wert für das vom klonierten Abschnitt kodierte Peptid (24 kDa).

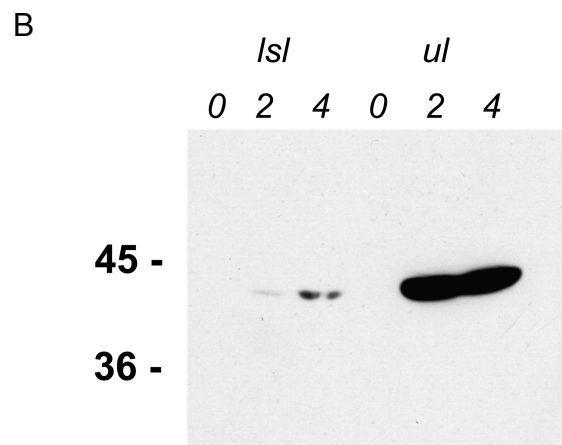
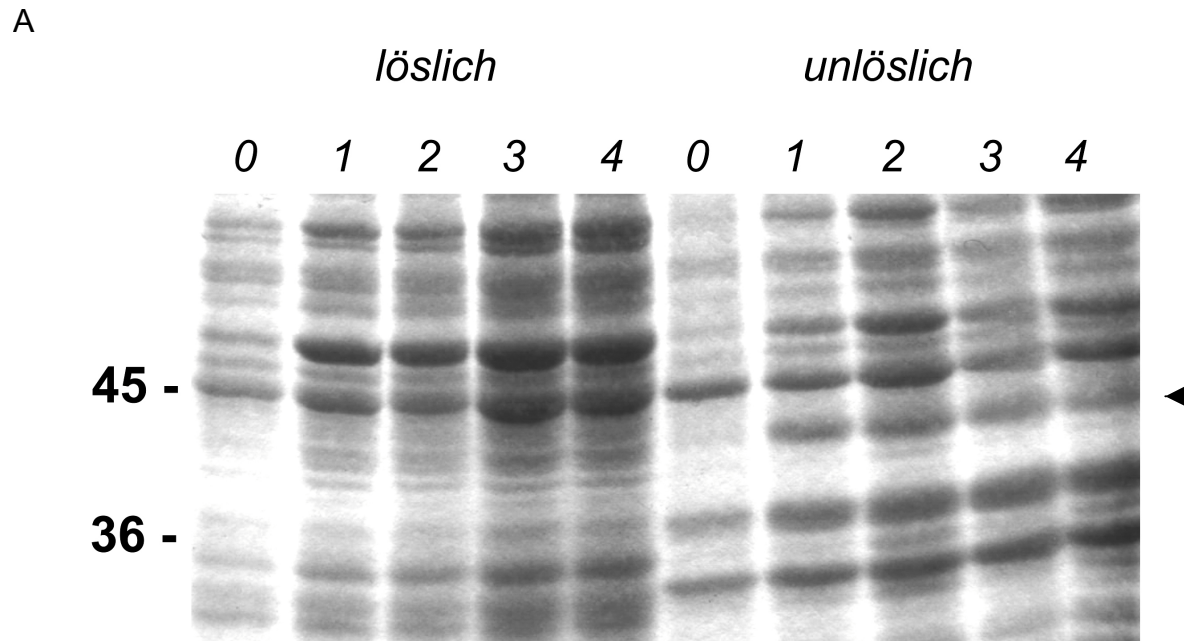


Abb. 3-32. Heterologe Expression des 5'-terminalen Abschnitts 7x von *sppA*, kloniert in pQE-31, in *E. coli* M15. **A:** Nichtdenaturierende Lyse der Bakterienproteine und Auftrennung mittels SDS-PAGE. Färbung: Coomassie Brilliant Blue. Der Pfeil kennzeichnet die dem Expressionsprodukt zugeordnete Proteinbande. **löslich:** Überstand nach Solubilisierung und Zentrifugation, mit Aceton präzipitiert; **unlöslich:** Sediment nach Solubilisierung und Zentrifugation; **0 - 4:** Zeit in Stunden nach Induktion mit IPTG (**0** = nichtinduzierte Kontrolle). **B:** Immunologische Identifizierung des Expressionsprodukts in den nach SDS-PAGE auf Nitrozellulose immobilisierten Fraktionen mittels Anti-RGS/His Serum. **Isl:** lösliche Fraktion; **ul:** unlösliche Fraktion; **0 - 4:** siehe A; jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Bei nativer Solubilisierung des Bakterienextrakts fand sich das Produkt vollständig in der unlöslichen Fraktion; diese war jedoch von verunreinigenden bakteriellen Proteinen ausreichend gesäubert, so daß eine Präparation des Expressionsprodukts durch direktes Ausschneiden der Proteinbande nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue aus dem Polyacrylamidgel möglich wurde (Abb. 3-33).

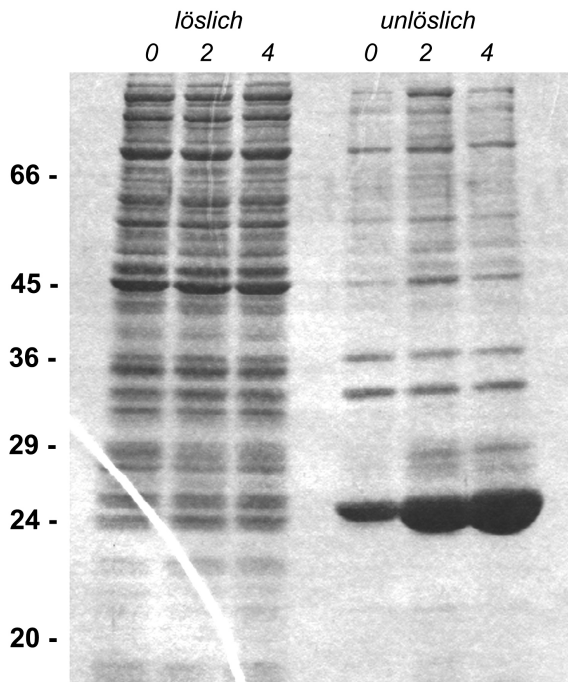


Abb. 3-33. Heterologe Expression des 3'-terminalen Abschnitts γ von *sppA*, kloniert in pRSET5b, in *E. coli* BL-21. Trennung in lösliche und unlösliche Fraktionen durch native Solubilisierung mit Lysozym. Färbung: Coomassie Brilliant Blue. 0, 2 und 4: Stunden nach Expressionsinduktion mit IPTG (0 = nichtinduzierte Kontrolle). Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Immunologischer Nachweis von SppA in Plastidenfraktionen

Um eine Reduzierung der störenden Hintergrundreaktion bei den immunologischen Tests zu erreichen, wurde die aus dem Gel isolierte Proteinbande direkt für die Immunisierung eines Kaninchens zur Gewinnung eines Antiserums gegen den C-terminalen Teil von SppA verwendet (vgl. Abschnitt 2.2.17.). Das erhaltene Immuneserum („AS245“) zeigte bereits in der ersten Präparation eine deutliche Reaktion gegen das Überexpressionsprodukt; nach der zweiten Präparation wurde beim Test auf fraktionierten *Arabidopsis*-Plastiden eine sehr starke Immunreaktion gegen ein Protein in der Thylakoidfraktion mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa gefunden, während in der betreffenden Größe in Stroma und Lumen nur jeweils eine sehr schwache Bande erschien (Abb. 3-34). Diese im Präimmuneserum nicht vorhandene Reaktion erwies sich als reproduzierbar und lieferte den Nachweis, daß SppA *in vivo* in prozessierter Form ca. 10 kDa kleiner ist als das primäre Translationsprodukt und mit der Thylakoidmembran assoziiert. In den vergleichbaren Plastidenfraktionen aus Spinat fand sich nur eine schwache Reaktion mit einem Protein desselben Molekulargewichts; diese schien darüber hinaus in Stroma- und Thylakoidfraktion in etwa gleich stark zu sein. Die Intensität dieser Reaktion nahm auch bei Spinat mit fortschreitender Zahl der Immunisierungen zu, das Verhältnis verschob sich hier jedoch nicht zugunsten der Thylakoidfraktion.

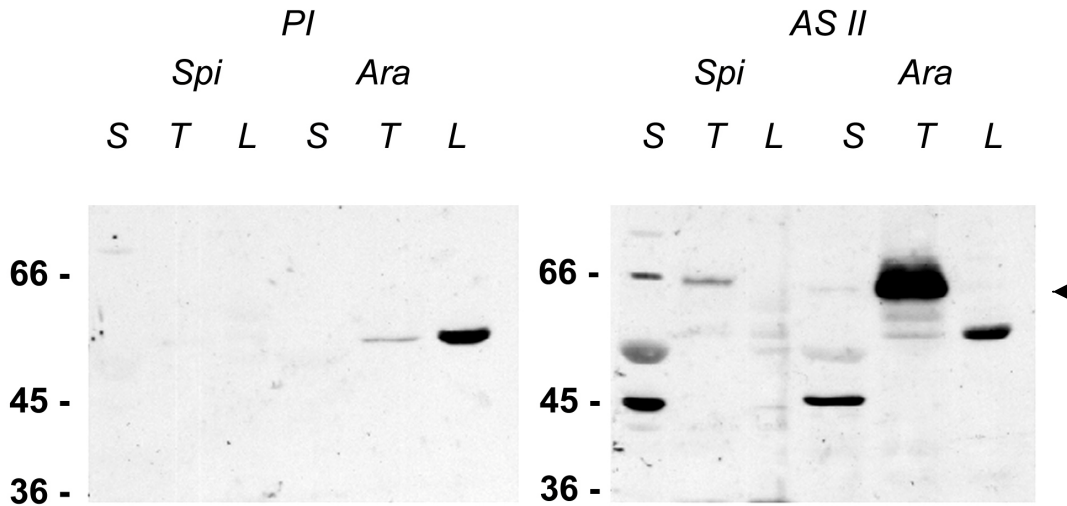


Abb. 3-34. Reaktion einer polyklonalen Antikörperpräparation gegen den C-terminalen Abschnitt 7y von SppA von *Arabidopsis thaliana* L. (Präparation „AS245 (II)“) auf elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nitrozellulose immobilisierten Chloroplastenfractionen aus Spinat und *Arabidopsis*. **PI**: Präimmunsereum (vor Immunisierung des Kaninchens); **AS II**: Antiserum zweite Präparation (nach drei Immunisierungen); **Spi**: Präparationen aus Spinat; **Ara**: Präparationen aus *Arabidopsis*; **S**: Stroma; **T**: Thylakoidmembranen; **L**: Lumen. Der Pfeil weist auf die Position der SppA zugerechneten Immunreaktion hin. Jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

In weiteren Hybridisierungsexperimenten wurde untersucht, inwieweit sich das Ansteigen der Transkriprate des *sppA*-Gens nach Behandlung der Pflanzen mit Lichtstreß auf Proteinebene widerspiegelt. Dazu wurden die Thylakoidfraktionen aus 2 Tage lang dunkeladaptierten, unter normaler Lichtintensität angezogenen und 2 Tage lang lichtstreßbehandelten *Arabidopsis*-Pflanzen isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Experiment zeigte sich keine gesteigerte Intensität des SppA zugeordneten Signals zugunsten des unter erhöhten Lichtbedingungen gewonnenen Materials, es konnte jedoch eine deutliche Intensitätsabnahme einer zweiten spezifisch angefärbten Proteinbande, offenbar ein Abbauprodukt von SppA, bei ca. 62 kDa in Abhängigkeit von der Lichtexposition des Pflanzenmaterials beobachtet werden (Abb. 3.35). Um Genaueres über eine mögliche Akkumulation von SppA in bestimmten Bereichen des Thylakoidsystems herauszufinden, wurde aus Spinat die Thylakoidfraktion isoliert und mittels differentieller Zentrifugation eine weitere Separation in Grana-, marginale Grana- und Stromathylakoide durchgeführt (Abschnitt 2.2.14.). Bei Hybridisierung der SppA-spezifischen Antikörper auf diese Fraktionen fand sich eine deutliche Steigerung der Signalintensität von Grana- zu Stromathylakoiden (Abb. 3-36). Die erfolgreiche Trennung der verschiedenen Thylakoidfraktionen wurde im selben Experiment immunologisch mittels Antiserum gegen CP43, eine Komponente des Photosystems II, nachgewiesen. Das durch diese Immunreaktion hervorgerufene Signal fand sich ausschließlich in den Granathylakoiden.

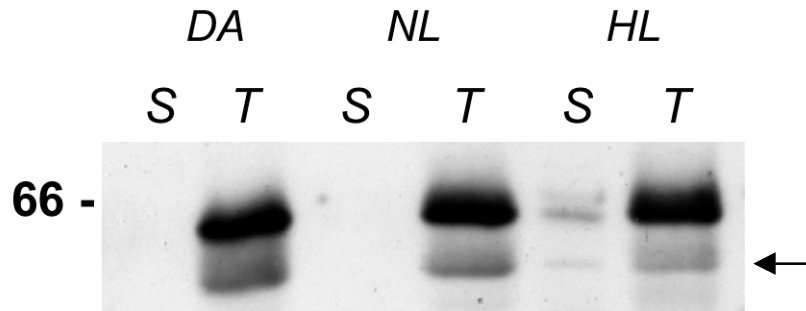


Abb. 3-35. Reaktion einer polyklonalen Antikörperpräparation gegen den C-terminalen Abschnitt 7y von SppA von *Arabidopsis thaliana* L. (Präparation „AS245 (II)“) auf elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nitrozellulose immobilisierten Stroma- und Thylakoidfraktionen aus unter unterschiedlichen Lichtbedingungen gewachsenem *Arabidopsis*-Pflanzenmaterial. Der Pfeil kennzeichnet die mutmaßliche Reaktion mit einem SppA-Abbauprodukt. **DA**: 2 d dunkeladaptierte Pflanzen; **NL**: unter Normallicht gewachsene Pflanzen; **HL**: 2 d mit Hochlicht (ca. 700 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlte Pflanzen; **S**: Stromafraktion; **T**: Thylakoidfraktion. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

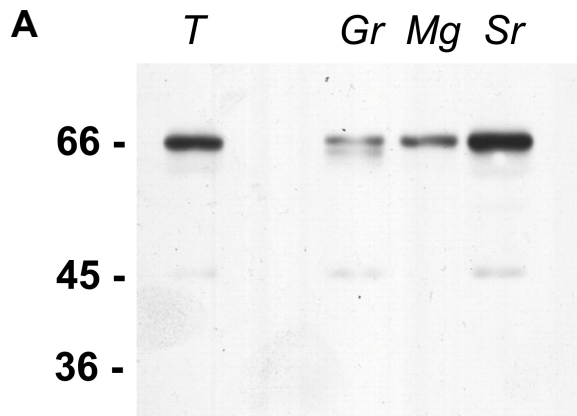
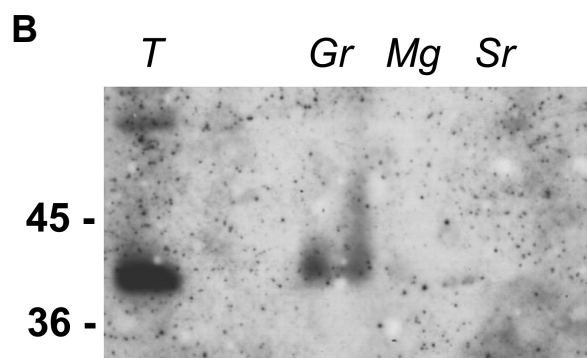


Abb. 3-36. Quantitative Verteilung von SppA in verschiedenen Thylakoidpräparationen aus Spinat. **A**: Hybridisierung mit Antiserum gegen den C-terminalen Abschnitt 7y, „AS245(III)“. **B**: Kontrolle - Hybridisierung mit Antiserum gegen CP43; **T**: Thylakoide gesamt; **Gr**: Granathylakoide; **Mg**: marginale Granathylakoide; **Sr**: Stroma-thylakoide. Jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)



Die genannten Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten einer weiteren Versuchsreihe, bei der die SppA-spezifischen Antikörper (nach Verifizierung der spezifischen Reaktion auch bei Tabak) zur Identifizierung von SppA in einer über einen Saccharosegradienten in 36 Fraktionen aufgetrennten Gesamt-Membranfraktion aus Tabakplastiden eingesetzt wurden.

Hier komigrierte das Signal scheinbar eindeutig mit den Fraktionen, die die mono- und dime-re Form von Photosystem I (PS I) enthielten, was eine Assoziation der Protease mit diesem in Stromathylakoiden akkumulierenden Komplex nahelegen würde (Abb. 3-37). Bei genauerer Betrachtung der Signale zeigt sich jedoch, daß die Signalmaxima in unterschiedlichen Fraktionen liegen; das von SppA in Fraktion 29, das von PS I hingegen in Fraktion 30. Die Assoziation von SppA mit einem von PS I unabhängigen oligomeren Komplex wurde später in einer Untersuchung außerhalb des Rahmens der vorliegenden Arbeit bewiesen (Lensch *et al.*, 2001).

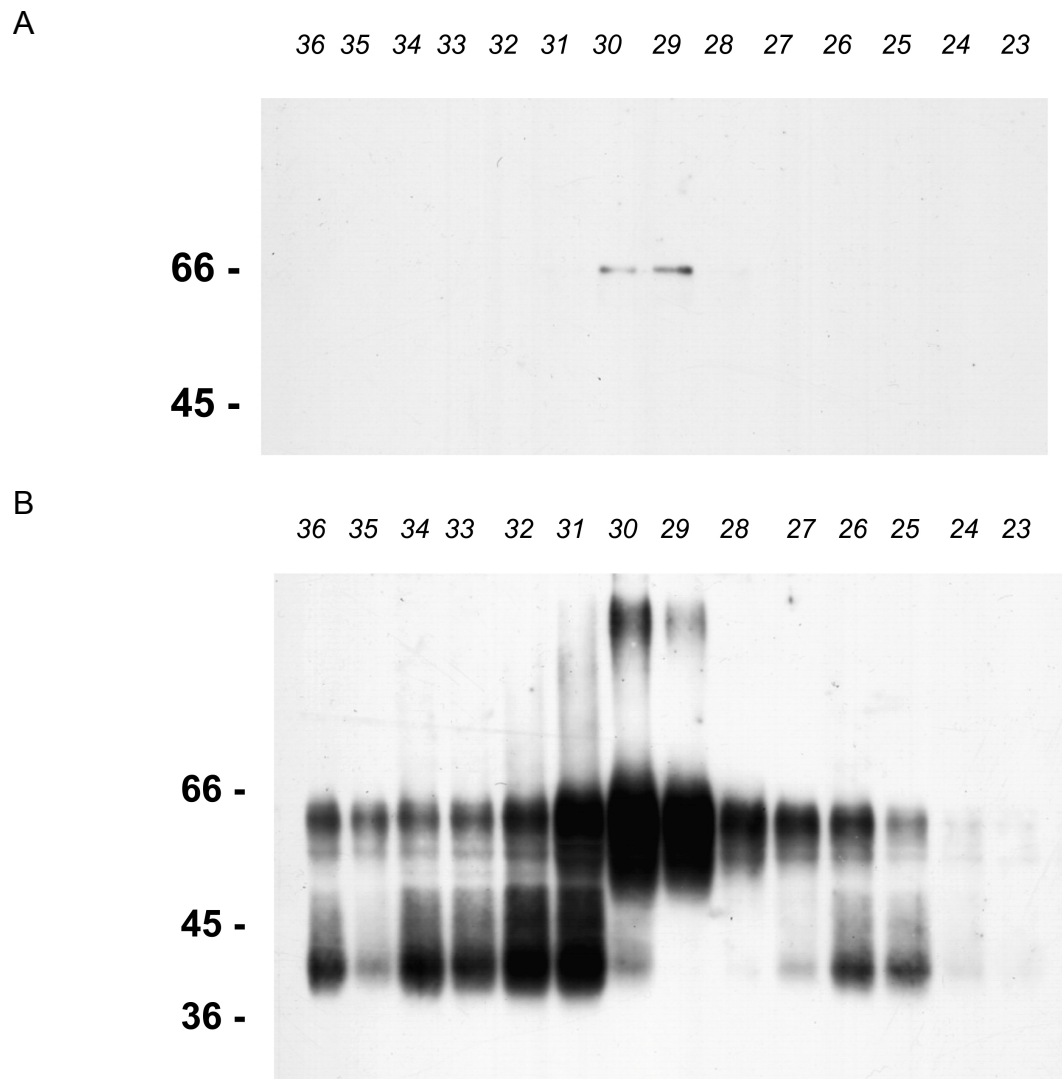


Abb. 3-37. Lokalisation von SppA in einer über Saccharosegradienten fraktionierten Gesamtmembranpräparation aus Tabakchloroplasten; **A:** Hybridisierung mit Antiserum gegen den C-terminalen Abschnitt γ , „AS245(IV)“. **B:** Kontrolle – Hybridisierung mit Antiserum gegen CP43 (PS II) und Reaktionszentrum von PS I (Signal bei ca. 55 kDa); **23 – 36:** Fraktionennummern (**1** = niedrigste, **36** = höchste Saccharosekonzentration). Jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Untersuchungen zur Affinität und Topologie von SppA in der Thylakoidmembran

Um die generelle Affinität von SppA zur Thylakoidmembran zu untersuchen, wurden Thylakoidpräparationen, zunächst aus *Arabidopsis*, später auch aus Spinat, nach dem Vorbild von Karnauchov *et al.* (1997b) bei gleicher Chlorophyllkonzentration mit unterschiedlich starken chaotropen Salzen behandelt. Der Einfluß dieser Behandlung auf die Bindung von SppA an die Thylakoidmembran wurde durch immunologische Untersuchung von Membransedimenten und Überständen mittels des SppA-Antiserums bestimmt. Dabei zeigte sich, daß das Protein entgegen der aufgrund des Hydropathieprofils getroffenen Vorhersagen eine offenbar sehr starke Affinität zur Thylakoidmembran besitzt. Nur die Behandlung mit NaSCN, dem stärksten eingesetzten Chaotrop, konnte eine detektierbare Menge ablösen und in den löslichen Überstand überführen (Abb. 3-38). An diesem Befund änderte weder das mehrmalige Waschen des NaBr-Präzipitats mit Puffer, um eine bloße Präzipitation des Proteins aufgrund einer erhöhten Labilität gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen auszuschließen, noch die Sedimentation des NaSCN-Ansatzes mittels Ultrazentrifugation bei 140000 x g, um eine durch Micellenbildung von Membranfragmenten in der Salzlösung vorgetäuschte Löslichkeit des Proteins zu verhindern, etwas.

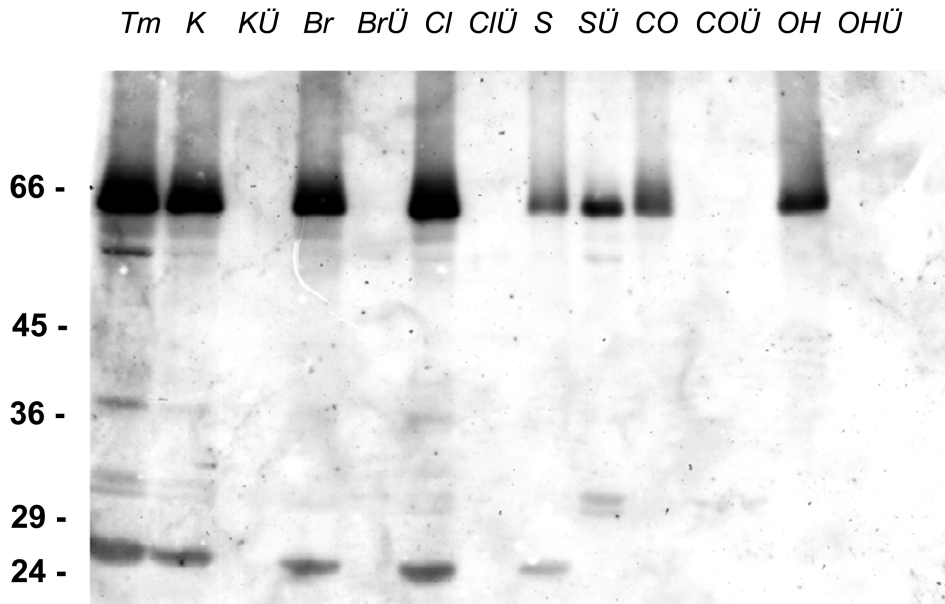


Abb. 3-38. Stabilität der Assoziation von SppA zur Thylakoidmembran in Gegenwart verschiedener Salze. Thylakoidpräparation aus *Arabidopsis*, Hybridisierung mit Antiserum gegen den C-terminalen Abschnitt 7γ, „AS245(III)“. ***Tm***: Thylakoidmembranen unbehandelt Eingesetzte Salze: ***K***: Kontrolle, mit HM Puffer ohne Salz behandelt; ***Br***: HM Puffer mit 2 M NaBr; ***Cl***: HM Puffer mit 2 M NaCl; ***S***: HM Puffer mit 2 M NaSCN; ***CO***: HM Puffer mit 0,1 M Na₂CO₃; ***OH***: HM Puffer mit 0,1 M NaOH; ***Ü***: jeweiliger Überstand, nach Zentrifugation mittels Aceton präzipitiert. Links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

In einem weiteren Versuch wurde die Angreifbarkeit von SppA in der Thylakoidmembran gegenüber extern applizierten Proteasen untersucht. Dazu wurden Präparationen intakter Thylakoide aus *Arabidopsis* bzw. Spinat bei gleicher Chlorophyllkonzentration mit Thermolysin, Trypsin oder Proteinase K inkubiert und anschließend entsprechend dem Versuch mit chaotropen Salzen immunologisch analysiert. Es zeigte sich, daß mit keiner der verwendeten Proteasen eine komplette Verdauung von SppA gelang; mit Proteinase K wurden jedoch nur noch Restfragmente gefunden. Da dies unter Umständen entweder auf eine Transmembrantopologie des Proteins oder eine Assoziation mit der geschützten lumenalen Seite der Thylakoidmembran hindeuten konnte (vgl. Pratt, 1989), wurde der Versuch mit durch Ultraschall lysierten Thylakoiden wiederholt. In diesem Ansatz blieb das Verdauungsmuster praktisch gleich, von einer etwas höheren generellen Abbaurate und einer nun restlosen Verdauung durch Proteinase K abgesehen, was bedeutet daß das Aufbrechen der Thylakoide keinen Einfluß auf die Zugänglichkeit von SppA gegenüber Proteolyse hat. Der intakte bzw. lysierte Zustand der Thylakoide wurde immunologisch mittels Antiserum gegen das 33 kDa-Protein (PsbO) des wasserspaltenden Komplexes von Photosystem II im Lumen verifiziert: in intakten Thylakoiden wurde dies von keiner Protease angegriffen; in lysierten Thylakoiden in geringem Maße bereits von Thermolysin, von Trypsin hingegen ebenso wie von Proteinase K vollständig verdaut. Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Membrantopologie sind in Abb. 3-39 zusammengefaßt.

Die beobachteten Resultate bezüglich Größe und Lokalisation von SppA hatten, im Verbund mit der charakteristischen verzögerten Induzierbarkeit der Expression bei Lichtstreß und der Tatsache, daß das Äquivalent in *E. coli* eine Serinprotease ist, die Vermutung zur Folge, daß das Protein in die hochlichtinduzierte Degradation von überschüssigem LHC II involviert sein könnte (vgl. die Eigenschaften der als für diese Prozessierung verantwortlich charakterisierten unbekannt Protease bei Yang *et al.*, 1998). Auch die mit der *sppA*-defizienten *Synechocystis*-Mutante erzielten Beobachtungen (siehe folgender Abschnitt) schienen diese Möglichkeit zu unterstützen. Zur näheren Untersuchung wurde das SppA-spezifische Antiserum gegen eine von Prof. Andersson (Stockholm) zur Verfügung gestellte Präparation aus Erbsenchloroplasten getestet, die in hohem Maße bezüglich der LHC II-degradierenden Aktivität angereichert war. Dabei konnte jedoch keine spezifische Hybridisierung der Antikörper an ein bestimmtes Protein beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

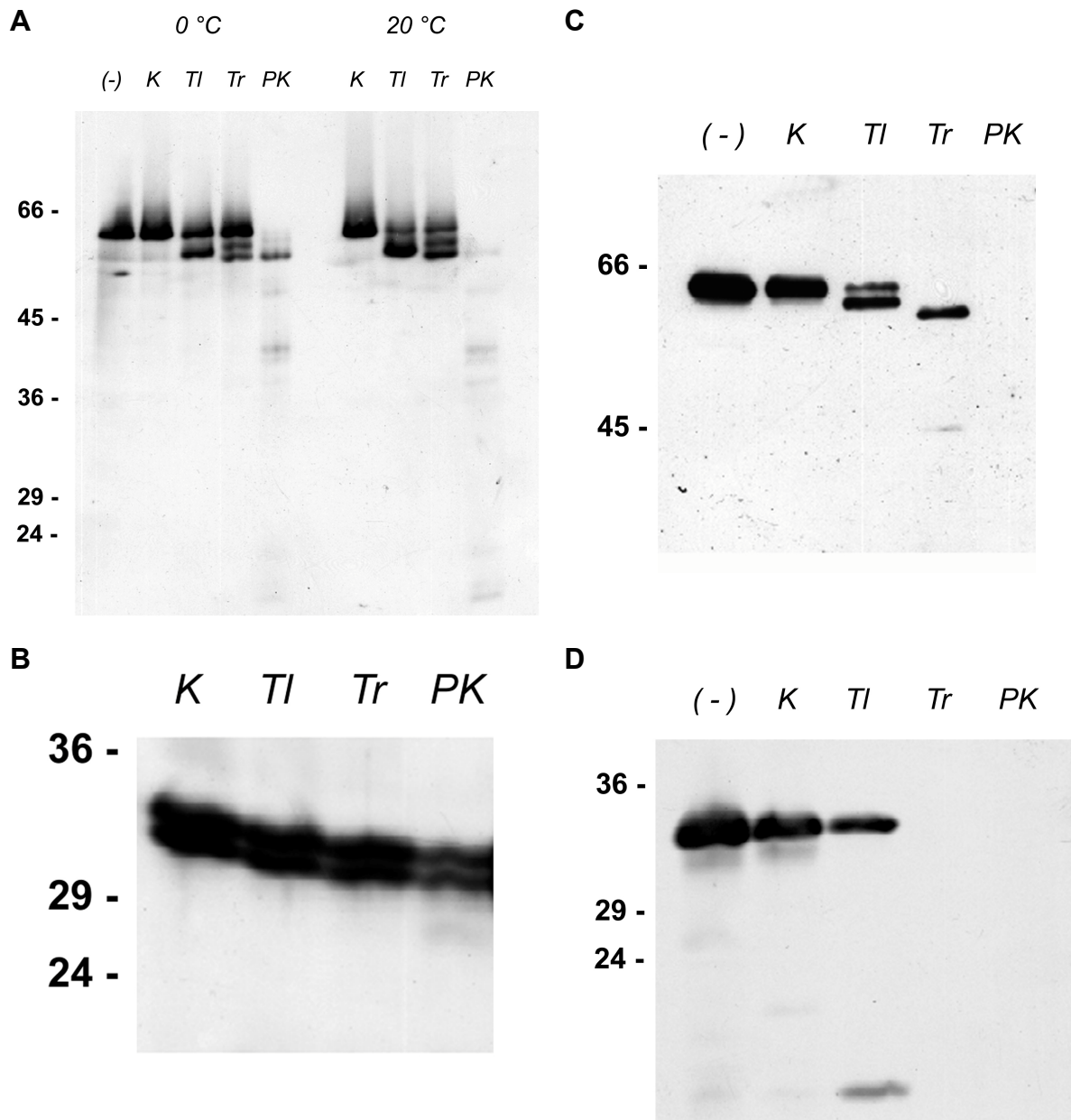


Abb. 3-39. Stabilität von SppA in intakten und lysierten Thylakoiden gegenüber dem Angriff verschieden starker Proteasen. **A, B:** Präparation intakter Thylakoide aus *Arabidopsis*; **C, D:** Präparation lysierter Thylakoide aus Spinat; **A, C:** Hybridisierung mit Antiserum gegen den C-terminalen Abschnitt 7y, „AS245(III)“; **B, D:** Kontrolle - Hybridisierung mit Antiserum gegen das lumenale 33-kDa Protein (PsbO) des wasserspaltenden Komplexes von Photosystem II. (-): unbehandelte Kontrolle; **K:** mit HM-Puffer ohne Protease behandelte Kontrolle; **TI:** Behandlung mit Thermolysin; **Tr:** Behandlung mit Trypsin; **PK:** Behandlung mit Proteinase K. Jeweils links: Molekulargewichtsmarker (kDa)

Charakterisierung einer *sppA*-defizienten *Synechocystis*-Mutante

Im Genom von *Synechocystis* PCC 6803 existieren zwei zu *sppA* homologe Gene, bezeichnet mit den Kürzeln *sll1703* und *slr0021*. Während *sll1703* in vielerlei Hinsicht hohe Ähnlichkeit zu *sppA* von *E. coli* und *Arabidopsis* aufweist, unterscheidet sich *slr0021* in einem gravierenden Aspekt davon: sein Genprodukt ist weniger als halb so lang (278 Aminosäuren) und deckt nur den C-terminalen, das proteolytische Zentrum enthaltenden Teil des Proteins ab (vgl. den

Sequenzvergleich in Anhang A-3). Von Prof. Shestakov, Institut für Genetik der staatlichen Universität Moskau, wurde eine Mutante von *Synechocystis* PCC 6803 bezogen, bei der das Gen *sll1703* durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette ausgeschaltet worden war (sog. „knock-out“-Mutante) und in einigen Testkulturen hinsichtlich phänotypischer Besonderheiten untersucht. In Kultur unter normalen Lichtbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.19.) zeigte die Mutante keinerlei auffällige Abweichungen vom Phänotyp des Wildtyps außer einer in einigen Fällen leicht erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit. Nach mehrtägiger Inkubation unter erhöhter Lichtintensität (ca. 150 – 200 $\mu\text{E m}^{-2}$) zeigte sich jedoch ein gravierender Unterschied: während Wildtyp-Kulturen generell mit zunehmender Dauer des Lichtstresses immer stärker ausbleichten, trat dieser Effekt bei der *sll1703* – Mutante nicht auf; das Pigmentspektrum änderte sich bis zum Absterben der Kulturen nicht (Abb. 3-40). Dieser Befund schien nahezulegen, daß das Genprodukt von *sll1703*, dem *Synechocystis*-Äquivalent zu *sppA* in *Arabidopsis*, in den Reparaturprozeß des durch erhöhte Lichtintensitäten geschädigten Pigmentsystems, also vornehmlich von Photosystem II, involviert ist. Genauere Untersuchungen an dieser *Synechocystis*-Mutante zeigten, nachdem das Projekt von der vorliegenden Arbeit abgekoppelt worden war, daß sich die Verhältnisse um ein Vielfaches verwickelter darstellen, als nach dem geschilderten Test angenommen (siehe auch Diskussion).

Transformation von *Arabidopsis* mit Sinn- bzw. Gegensinnkonstrukten von *sppA*

Parallel zu dem Ansatz, in dem eine Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen mit Sinn- und Gegensinnkonstrukten von *hhoA* versucht wurde (siehe Abschnitt 3.2.2.), wurde das gleiche Experiment auch mit entsprechenden Konstrukten von *sppA* durchgeführt. Für das Gegensinnkonstrukt wurde hierzu, da das *sppA*-Gen an Position 662 eine *SacI* – Restriktionsschnittstelle aufweist und der zur Verfügung stehende Vektor, pGPTV-BAR 35S/nos, nur eine Klonierung über die Schnittstellenkombination *SacI/XbaI* zuläßt, der Genbereich der ersten 662 Basen abwärts vom 5'-Ende mittels der Oligonukleotide psEST7_AS_fw(II) und psEST7_AS_rv unter Einführung der entsprechenden Restriktionsschnittstellen amplifiziert und kloniert. Im Gegenzug ließ sich das Sinnkonstrukt durch einfaches Ausschneiden des entsprechenden Genabschnitts mit *SacI* und *XbaI* aus pBluescript und Ligation in pGPTV-BAR 35S/nos erreichen. Wie auch im Ansatz mit *hhoA* scheiterte der Versuch, die Konstrukte über konjugativen Transfer in *Agrobacterium tumefaciens* einzuführen aus den dort genannten Gründen (vgl. Abschnitt 3.2.2., Seite 104). Anders als bei den *hhoA*-Konstrukten mißlang jedoch auch die direkte Transformation mittels CaCl_2 .

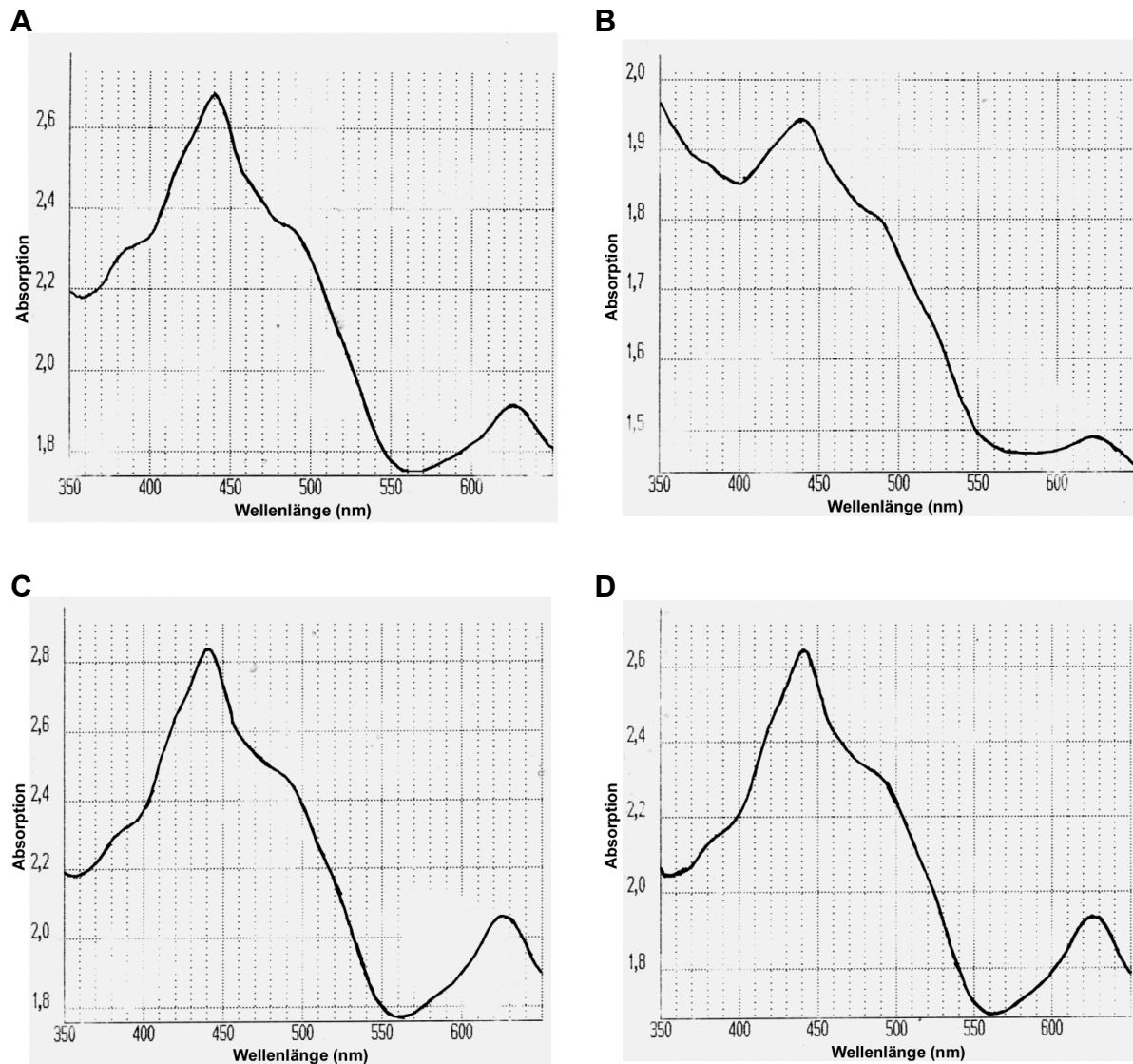


Abb. 3-40. Vergleich der Absorptionsspektren unter verschiedenen hohen Lichtintensitäten angezogener Flüssigkulturen von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Direktmessung der Extinktion der Kulturen. Normallicht: $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; erhöhte Lichtintensität: ca. $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. **A:** Wildtyp, 12 Tage unter Normallicht; **B:** Wildtyp, 6 Tage unter Normallicht + 6 Tage unter erhöhter Lichtintensität; **C:** Mutante *sll1703*, 12 Tage unter Normallicht; **D:** Mutante *sll1703*, 6 Tage unter Normallicht + 6 Tage unter erhöhter Lichtintensität.

Letztlich wurden durch einen Versuch mit einer Art biparentaler Konjugation (entsprechend der zuvor versuchten triparentalen Konjugation) ohne den *E. coli*-Helferstamm Kulturen von *Agrobacterium* erzielt, die die Selektion auf Kanamycin und Rifampicin überstanden und nachweislich (über Plasmid-Minipräparation und Restriktion) die Konstrukte trugen. Das aus den mit diesen Bakterienkulturen infiltrierten *Arabidopsis*-Pflanzen (gleiches Verfahren wie im *hhoA*-Ansatz) gewonnene Saatgut wurde intensiven Tests auf BASTA-haltigem Nährmedium unterzogen; dabei konnte jedoch kein einziger BASTA-resistenter Nachkomme gefunden werden. Die Versuche wurden schließlich unter der Annahme einer falsch-positiven Transformation der Agrobakterien eingestellt.

4. DISKUSSION

4.1. Isolierung und Aufreinigung lichtstreßinduzierter Proteasen aus dem Thylakoidlumen von *Pisum sativum* L.

Das Lumen, das von der Thylakoidmembran umschlossene flüssigkeitserfüllte innerste Subkompartiment des Chloroplasten, ist bis heute vergleichsweise gering erforscht. Die wenigen Studien die bislang zu seiner Charakterisierung beitrugen, entstanden hauptsächlich im Zuge der Photosyntheseforschung und erzielten dadurch auch hauptsächlich Erkenntnisse über Komponenten, die, ob löslich oder peripher membranassoziiert, funktionell am Aufbau der photosynthetischen Komplexe in der Thylakoidmembran beteiligt sind. Erst in neuerer Zeit mehren sich die Hinweise, daß sich die Aufgaben des Thylakoidlumens bei weitem nicht in der Bereitstellung eines flüssigen Kompartiments für die Generierung eines für die photosynthesegetriebene ATP-Synthese essentiellen Protonengradienten und der Beherbergung einiger auf dieser Seite der photosynthetischen Membran benötigter Komponenten der Photosyntheseapparate und ihrer akzessorischen Komplexe erschöpfen. Eine erste Studie, die sich spezifisch die Charakterisierung des Lumens zur Aufgabe gemacht hat, konnte eine hohe Konzentration an Proteinen nachweisen und eine Zahl von mindestens 25 verschiedenen Polypeptiden, davon 15 identifizierbar, als Untergrenze etablieren (Kieselbach *et al.*, 1998). Da es sich bei diesen nur um die durch Elektrophorese und verschiedene Färbetechniken nachweisbaren Proteine handelt, lag die Vermutung nahe, daß die tatsächliche Anzahl lumenaler Proteine noch um einiges höher anzusetzen ist. Eine neuere grundlegende Untersuchung unter Anwendung zweidimensionaler Gelelektrophorese in Kombination mit Proteinsequenzierung lieferte bereits einen Schätzwert von mindestens 200 bis 230 lumenalen Proteinen (Peltier *et al.*, 2000).

Eingehend charakterisierte Proteasen des Thylakoidlumens oder der lumenalen Peripherie der Thylakoidmembran beschränkten sich zu Beginn der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen auf die prozessierenden Proteasen für Plastocyanin (Kirwin *et al.*, 1987; Kirwin *et al.*, 1988) und D1 (Shestakov *et al.*, 1994; Oelmüller *et al.*, 1996); hinzu kamen verschiedene im Zuge allgemeinerer Untersuchungen am Chloroplasten entdeckte, aber nicht intensiver aufgereinigte, proteolytische Aktivitäten (z. B. Sokolenko *et al.*, 1997). Gleichzeitig stieg die Anzahl an beschriebenen Vorgängen, die ein eigenständiges proteolytisches System des Thylakoidlumens erforderlich erscheinen ließen, beispielsweise die Degradation integraler Membran-

proteine unter Beteiligung von Schnittstellen in deren lumenalen Domänen (postuliert z. B. für D1; Itzhaki *et al.*, 1998) oder die Entfernung überschüssiger Lumenproteine ohne korrekten Bindepartner, abgeleitet aus der Detektion spezifischer Abbauprodukte (Haehnel *et al.*, 1994; Herrmann, 1996).

Da im Chloroplasten lichtinduzierte proteolytische Prozesse eine besonders wichtige Rolle bei verschiedensten regulierenden Vorgängen spielen, ist die Identifizierung von an solchen Aktivitäten beteiligten Komponenten auch im Thylakoidlumen von besonderem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, durch Licht induzierbare Proteasen im Lumen von Erbsenkeimlingen nachzuweisen. Dies wurde durch ein spezielles Protokoll zur Isolierung und Aufkonzentrierung des Lumens und ein Nachweissystem unter Verwendung schwach denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sdPAGE) mit einpolymerisierter Gelatine als Proteasesubstrat erreicht. Die Resultate deuten auf eine überraschend hohe Zahl lichtinduzierbarer Proteasen im Lumen von Erbsenchloroplasten hin; die beobachtete Menge lag, ungeachtet der Reproduzierbarkeit einzelner Banden, bei mindestens vier bis fünf klar voneinander abgrenzbaren Aktivitäten, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, daß noch weitere durch Hochlicht induzierbare proteolytische Enzyme im Lumen existieren, die aber eine zu hohe Substratspezifität besitzen, um Gelatine degradieren zu können oder in so geringer Konzentration vorliegen, daß ihre Aktivität unter den angewendeten Versuchsbedingungen nicht für eine Visualisierung ausreicht. Die am deutlichsten erkennbaren Bereiche, in denen die Gelatine degradiert wurde, lagen bei ca. 25, bei ca. 35, um 50 – 55, bei ca. 80 und bei ca. 190 kDa, wobei sich die höhermolekularen Aktivitäten im Lauf der Experimente besser reproduzieren ließen. Alle diese Aktivitäten waren eindeutig durch die Hochlichtbehandlung induziert; sie konnten bei Entfallen der Bestrahlung vor Aufschluß der Chloroplasten nicht im Lumenextrakt nachgewiesen werden. Dies zusammen mit den ermittelten ungefähren Molekulargrößen der zugehörigen Proteasen macht es äußerst unwahrscheinlich, daß eine der Aktivitäten auf eine der wenigen bereits charakterisierten lumenalen Proteasen zurückgeführt werden kann. Bei der Aktivität am oberen Rand der Gele, im Bereich von ca. 190 kDa könnte es sich unter Umständen um eine SDS-stabile Protease unbekannter Größe handeln, die während der Elektrophorese unter schwach denaturierenden Bedingungen aktiv bleibt, sofort an das Substrat bindet und folglich nicht in das Gel eindringt (Sokolenko *et al.*, 1997). Diese Möglichkeit ist nicht vollständig auszuschließen, das erhaltene Erscheinungsbild der betreffenden Bande scheint jedoch ein gewisses Eindringen der Protease in das Gel zu dokumentieren; damit ist die Existenz entweder einer tatsächlich 190 kDa großen Protease in diesem Bereich oder das Auftreten einer der Aktivitäten geringerer Molekulargröße in oligomerer, durch

die schwache Denaturierung nicht monomerisierter Form wahrscheinlicher. Bezüglich der kleinsten, nur in einigen Nachweisen aufgetretenen, proteolytischen Aktivität von ca. 25 kDa besteht der Verdacht, daß es sich hier nicht um eine distinkte Protease handelt, sondern eventuell ein, unter Umständen autoproteolytisch, entstandenes Fragment einer der beobachteten höhermolekularen Proteasen, das die vollständige katalytische Domäne enthielt und somit weiter proteolytisch aktiv war. Inwiefern die Beobachtung, daß diese Proteasebande, im Gegensatz zu den meisten anderen, relativ scharf fokussiert war, die zugehörige Aktivität also offenbar erst nach der Elektrophorese durch die Renaturierung in Triton-haltigem Puffer wiedererlangt wurde, für oder gegen diese Vermutung spricht, läßt sich nicht eindeutig klären.

Die Aufrechterhaltung einer gewissen proteolytischen Restaktivität während der Elektrophorese unter schwach denaturierenden Bedingungen scheint bei den durchgeführten Experimenten generell eine Rolle zu spielen; sie war zwar bei keiner der beobachteten Aktivitäten ausreichend, um das zugehörige Protein am Eintritt in das Gel zu hindern, dürfte jedoch für die Verzerrung vieler Gelläufe und die oft schlechte Fokussierung der proteolytischen Banden mitverantwortlich sein. Auch besteht dadurch die Möglichkeit, daß proteolytische Interaktionen mit der Gelatine während des Laufs die Laufgeschwindigkeit der Proteasen verringert haben, und die beobachteten Molekulargrößen der potentiellen Proteasen daher um einen unbekanntem Faktor zu hoch sind. Prinzipiell läßt sich auch die Verunreinigung der verwendeten Lumenextrakte vor allem durch stromale Proteine aufgrund unvollständiger Waschung vor Aufbrechen der Thylakoide mittels Ultraschall nicht ausschließen; auch mit der Thylakoidmembran peripher assoziierte Proteine könnten während des Isolierungsverfahrens abgelöst worden und so in den Extrakt gelangt sein. Ein definitiver Nachweis der lumenalen Lokalisation der beobachteten proteolytischen Aktivitäten *in vivo* würde daher ein weitaus aufwendigeres und saubereres Reinigungsverfahren, vor allem durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte, erfordern. Dies würde jedoch unweigerlich auch eine Verringerung der Ausbeute, zum einen durch Verluste auf Proteinebene, zum anderen durch Aktivitätsverluste aufgrund der verlängerten Reinigungsprozeduren, mit sich bringen. Da die beobachteten Aktivitäten ausschließlich bei Einsatz hoher Proteinkonzentrationen nachgewiesen werden konnten, hätte dies eine Erhöhung der Menge des pflanzlichen Ausgangsmaterials erfordert, die im Rahmen dieser Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre. Es ist daher denkbar, daß auch lichtinduzierbare Proteasen aus anderen Bereichen des Chloroplasten, vornehmlich dem Stroma, detektiert wurden. Dennoch erscheinen die Ergebnisse ausreichend, einen Eindruck zu vermitteln, welchen potentiellen Umfang das Gebiet proteolytischer Enzyme im Thylakoidlumen möglicherweise annehmen könnte, zumal nur ein ausgewählter Teilbereich (licht-

induzierte, relativ unspezifische und dazu in ausreichend hoher Konzentration vorhandene Proteasen) dargestellt wurde.

Der Versuch, über Studien mit verschiedenen Inhibitoren gegen die meistverbreiteten Proteasentypen den Funktionsmechanismus der beobachteten Aktivitäten zu bestimmen (vgl. Dunn, 1989; Salvesen und Nagase, 1989), brachte keine genauen Erkenntnisse. Während die Proteasebanden bei 190 und 80 kDa offenbar durch keinen der eingesetzten Inhibitoren in ihrer Intensität signifikant beeinträchtigt wurden, es sich bei den verantwortlichen Aktivitäten also offenbar nicht um Serin-, Cystein-, Aspartat- oder Metalloproteasen der durch diese Inhibitoren hemmbaren Sorten handelt, wurde die Bande um 50 kDa durch DCI und noch stärker durch E-64 reduziert, was auf Aktivitäten vom Cystein- und Serintyp hindeutet. Die zuvor in mehreren Fällen beobachteten Aktivitäten geringeren Molekulargewichts waren in den für diese Tests eingesetzten Lumenextrakten nicht detektierbar, so daß auch deren Natur im Unklaren blieb.

Die bislang einzige wirklich umfassend charakterisierte lichtinduzierbare proteolytische Aktivität des Chloroplasten wird durch die Protease FtsH, ein Homolog zu der gleichnamigen Protease bei *E. coli*, vermittelt. Diese zinkabhängige Metalloprotease, die unter anderem nachweislich eine wichtige Rolle im Verlauf der Degradation von photogeschädigtem D1 spielt (Lindahl *et al.*, 2000; siehe Einleitung), besitzt eine Größe von 78 kDa, ist jedoch *in vivo* sehr stark mit der Thylakoidmembran assoziiert, weshalb eine Identität mit der im Versuch beobachteten hochlichtinduzierten Aktivität bei ca. 80 kDa, die darüber hinaus weder durch EDTA noch Phenanthrolin, beides Inhibitoren von Metalloproteasen, hemmbar war, unwahrscheinlich ist.

Insgesamt wiesen die beobachteten proteolytischen Aktivitäten einige interessante Eigenschaften auf. Zum einen ließen sie sich durch Hochlichtbehandlung von isolierten Chloroplasten induzieren, was darauf hindeutet, daß die Induktion vermutlich direkt auf Ebene der Proteasen erfolgte, da eine Induktion auf Ebene der Gene unter diesen Umständen nur erfolgen kann, wenn sich diese auf dem Plastidengenom befinden – ein eher unwahrscheinlicher Umstand, denn im Zuge der zahlreichen Sequenzierungen kompletter Plastome in neuerer Zeit wurde, abgesehen vom Gen der proteolytischen Untereinheit von Clp, *clpP1*, bislang noch kein Sequenzabschnitt als potentielles Proteasegen charakterisiert. Gleich mehrere solche Gene müßten somit bislang trotz des erschöpfenden Datenmaterials gerade über prokaryotische Proteasen übersehen worden sein. Zum anderen ist der beobachtete „Gewöhnungseffekt“ bemerkenswert, der dazu führte, daß aus während der Sommermonate, also unter lang

anhaltender Sonneneinstrahlung, angezogenen Erbsenkeimlingen isolierten Chloroplasten keine Lumenextrakte gewonnen werden konnten, die mittels der zuvor bereits mehrmals erfolgreich angewendeten Bestrahlungsmethoden induzierbare proteolytische Aktivitäten besaßen. Es könnte ein Adaptationseffekt vorliegen, der bewirkt, daß die betreffenden Enzyme in Chloroplasten, welche bereits im Lauf ihrer Entwicklung höheren Lichtintensitäten ausgesetzt waren, zu ihrer Induktion eine entsprechend stärkere Bestrahlung benötigen. Diese ließen sich mit der zur Verfügung stehenden Apparatur jedoch nicht bewerkstelligen. Es wäre auch möglich, daß indirektere Faktoren als die Tagessumme der Lichteinstrahlung eine Rolle spielen. Die Tageslänge selbst fällt als mögliche Ursache jedoch aus, da alle verwendeten Keimlinge, egal zu welcher Jahreszeit, unter den gleichen Bedingungen (Langtag) angezogen worden waren.

Vor diesem Hintergrund wäre eine Aufreinigung der beobachteten proteolytischen Aktivitäten bis zu einer Stufe, auf der eine Identifizierung der verantwortlichen Enzyme möglich gewesen wäre, wünschenswert gewesen. Die diesbezüglichen Versuche scheiterten jedoch jeweils bereits in einem relativ frühen Stadium. Als Ursache dafür dürfte letztlich das hohe Maß zu nennen sein, in dem bereits die Rohextrakte aufkonzentriert werden mußten, um eine Visualisierung der, wie für ein so kleines Kompartiment wie das Thylakoidlumen zu erwarten, *in vivo* in äußerst geringer Menge vorliegenden proteolytischen Aktivitäten überhaupt möglich zu machen. Jede zur Aufreinigung angewandte Methode muß daher einen Reinigungsgrad erzielen, der den gleichzeitig immer auftretenden Materialverlust und den Verdünnungseffekt mindestens kompensiert, da einzelne Enzyme anschließend zwar eventuell in reinerer Form vorliegen, ihre Gesamtkonzentration aber unter die Nachweisgrenze gesunken sein kann. Die im Laufe der Arbeit angewandten klassischen biochemischen Reinigungsmethoden wie Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration oder Anionenaustauschchromatographie erfüllten diesen Zweck offenbar nicht. Wesentlich höhere Erfolgsaussichten bestünden bei einer Bioliganden-Affinitätschromatographie, die sehr hohe Aufreinigungsraten innerhalb eines einzigen Schrittes verspricht; für deren Anwendung müßten aber die spezifischen Substrate der gesuchten Proteasen bekannt sein. Dieses Dilemma ist generell kennzeichnend für die Forschung an unbekannt proteolytischen Enzymen: so lange die eigentlichen Substrate neuentdeckter Aktivitäten unbekannt bleiben, ist die Forschung auf unspezifische Hilfssubstrate angewiesen, die meistens bestenfalls zur Entdeckung einer neuen Aktivität ausreichen, nicht jedoch zu ihrer Charakterisierung (vgl. auch Sarath *et al.*, 1989).

4.2. Klonierung von Genen neuer plastidärer Proteasen aus *Arabidopsis thaliana* und Charakterisierung der kodierten Genprodukte

4.2.1. HtrA (DegP)

HtrA, auch unter dem Namen DegP bekannt, ist ein seit langem intensiv erforschtes und sehr gut charakterisiertes proteolytisches Enzym in *E. coli* (Lipinska *et al.*, 1988 und nachfolgende Arbeiten). Es wird als Teil der Hitzeschockantwort des Bakteriums verstärkt bei erhöhten Temperaturen synthetisiert (über einen speziellen Transkriptionsfaktor σ^E) und ist für das Überleben der Zellen bei diesen Bedingungen essentiell (Maurizi, 1992; Pallen und Wren, 1997). Darüber hinaus wurde seine Beteiligung an Schutzmechanismen des Bakteriums gegen oxidativen Streß beobachtet (Skórko-Glonek *et al.*, 1999). Neuere Untersuchungen enthüllten die Existenz einer ganzen Proteinfamilie von Serinproteasen nach dem charakteristischen HtrA-Typ, die nicht nur zwei weitere Mitglieder in *E. coli* selbst besitzt, sondern vielmehr in Pro- wie Eukaryoten ubiquitär mit Homologen vertreten ist (Pallen und Wren, 1997). HtrA von *E. coli* besitzt neben der proteolytischen Aktivität nachweislich noch eine weitere als Chaperon und ist offenbar in der Lage, temperaturabhängig zwischen beiden Aktivitäten zu wechseln (Spiess *et al.*, 1999). Zusätzliche Informationen bezüglich HtrA und der HtrA-Familie finden sich in der Einleitung.

Die vollständige Sequenz des Gens für das pflanzliche Homolog zu HtrA (DegP) in *Arabidopsis thaliana* wurde 1998 von Itzhaki *et al.* publiziert und eine erste Charakterisierung seines Produktes hinzugefügt. Aufgrund dieser Veröffentlichung wurden die im Zuge der vorliegenden Arbeit begonnenen Versuche, das pflanzliche HtrA-Gen durch Sichtung verschiedener cDNA-Bibliotheken mittels einer auf einem EST-Klon, der den C-Terminus des vollständigen Gens umfaßte, basierenden DNA-Sonde selbst zu isolieren nach mehrmaligem Mißerfolg abgebrochen und nicht wieder aufgenommen. Stattdessen wurde der Versuch unternommen, mittels heterologer Überexpression des EST-Klons, der knapp 42% der kodierenden Sequenz des Vollängengens enthielt, in *E. coli* ein dem C-Terminus des vollständigen Proteins, inklusive der Serindomäne der katalytischen Triade, entsprechendes Polypeptid in ausreichender Menge zu erzeugen, um polyklonale Antikörper gegen diesen Teil von HtrA für den Einsatz in Chloroplastenextrakten zu gewinnen. Sowohl Überexpression als auch die Herstellung des Antiserums waren erfolgreich. Mit letzterem ließ sich eine deutliche Reaktion in den verschiedenen getesteten Chloroplastenfraktionen aus Spinat erzielen, die mit einer Molekular-

größe von ca. 37 kDa relativ genau der von Itzhaki *et al.* (1998) für das vollständige HtrA-Protein errechneten (35,218 kDa) entsprach und sich auch verlässlich reproduzieren ließ. Die Resultate der Lokalisierungstests in verschiedenen Chloroplastenfractionen mittels dieses Antiserums lassen eine eindeutige Interpretation zu: die angesprochene Reaktion bei ca. 37 kDa fand sich in etwa gleicher Intensität in der Gesamtchloroplasten- und der Gesamtthylakoidfraktion, jedoch in mindestens zehnfach stärkerer Intensität in der Lumenfraktion. Im Stroma war keine Spur zu entdecken. Dies deutet offensichtlich auf eine Lokalisation des Enzyms im Thylakoidlumen hin, und zwar in löslicher Form oder einer nur sehr schwachen Assoziation mit der Innenseite der Thylakoidmembran, die bereits durch die zum Aufbruch der Thylakoide angewandte Ultraschallbehandlung gelöst werden und so zu einer Anreicherung von HtrA in der löslichen Fraktion führen konnte. Hier fällt sofort der Widerspruch zu der von Itzhaki *et al.* (1998) veröffentlichten Charakterisierung auf: Neben der vollständigen Gensequenz von *degP1* enthält diese Arbeit auch die Ergebnisse einer immunologischen Untersuchung, bei der mittels eines Antiserums gegen HtrA von *E. coli* die Lokalisation des pflanzlichen Homologs in Chloroplasten aus Erbsenkeimlingen bestimmt wurde. Diese Resultate charakterisieren das Protein eindeutig als an die Innenseite der Thylakoidmembran gebunden, und zwar mit einer hohen, auf hydrophoben eher als auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhender Affinität, da es sich im Experiment nicht mit hohen Salzkonzentrationen von der Membran lösen ließ, wenn nicht zusätzlich eine geringe Menge (0,05%) an Triton-X100 als nichtionisches Detergenz hinzugegeben wurde. Auch HtrA in *E. coli* wurde im Übrigen als ähnlich fest mit der periplasmatischen Oberfläche des Inneren Membran des Bakteriums assoziiert beschrieben (Skórko-Glonek *et al.*, 1997).

Was im Endeffekt diesem Widerspruch zugrunde liegt, läßt sich nur schwer ausmachen. Da sowohl die eigenen, als auch offenbar die Resultate von Itzhaki *et al.* (1998) zuverlässig reproduzierbar waren, erscheinen Fehler in der Versuchsdurchführung unwahrscheinlich. Die einzigen Unterschiede beider Versuchsansätze liegen einerseits in der Wahl unterschiedlicher Pflanzenarten als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der untersuchten Chloroplasten und andererseits in der Verwendung von Antiseren mit unterschiedlicher Spezifität. Beide Unterschiede könnten die Widersprüche bei den Resultaten verursacht haben. Im Falle der unterschiedlichen Pflanzenarten könnte dies bedeuten, daß DegP1 (HtrA) in Spinatchloroplasten eine andere Lokalisation hat als in Erbsenchloroplasten, oder zumindest eine deutlich geringere Affinität zur Thylakoidmembran. Im Falle der Antiseren verschiedener Spezifität könnte die Diskrepanz der Ergebnisse darauf zurückzuführen sein, daß in den beiden Experimenten nicht das gleiche Protein detektiert wurde, was angesichts der mittlerweile gefundenen Zahl

an Mitgliedern der HtrA-Familie in Pflanzen (Adam *et al.*, 2001) und der Tatsache, daß einerseits ein Antiserum gegen HtrA aus *E. coli* auf Chloroplastenfraktionen aus Erbse und andererseits ein Antiserum gegen HtrA aus *Arabidopsis* auf Chloroplastenfraktionen aus Spinat angewandt wurde, weniger unwahrscheinlich ist, als es auf den ersten Blick erscheint. Die in der Arbeit von Adam *et al.* (2001) veröffentlichte Liste von *degP*-Homologen in *Arabidopsis* enthält zumindest zwei weitere im Chloroplasten lokalisierte Proteine ähnlicher Molekülgröße: *degP5*, im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit unter der Bezeichnung *hhoA* charakterisiert, und *degP8*.

4.2.2. HhoA (DegQ/DegP5)

Im Jahr 1996 wurden, unabhängig voneinander und als Ergebnis zweier völlig unterschiedlicher theoretischer Ansätze, zwei neue Mitglieder der HtrA-Familie in *E. coli* charakterisiert und unter den Bezeichnungen HhoA und HhoB (Hho für „HtrA homologue“) beziehungsweise DegQ und DegS (abgeleitet von DegP als alternativer Bezeichnung für HtrA) publiziert (Bass *et al.*, 1996; Waller und Sauer, 1996). Die Gene dieser Proteine liegen gekoppelt auf dem Bakteriengenom in unmittelbarer Nachbarschaft, werden jedoch unabhängig voneinander transkribiert. Die Sequenzen beider Proteine zeigen signifikante Ähnlichkeiten zu HtrA; so besitzen beide die für die Familie typische katalytische Domäne und auch jeweils PDZ-Domänen, HhoB im Gegensatz zu HhoA und auch HtrA selbst jedoch nur in einfacher Ausführung (Pallen und Wren, 1997).

HhoA/DegQ wurde genau wie HtrA selbst als lösliches Protein des Periplasmas charakterisiert, das auch funktionell einige Ähnlichkeiten zu HtrA aufweist. So besitzt es sehr ähnliche Substratspezifitäten (Waller und Sauer, 1996). Im Gegensatz zu *htrA* ist die Transkription von *hhoA* (wie auch von *hhoB*) vom normalen Transkriptionsfaktor σ^{70} abhängig und nicht hitzeinduzierbar. Außerdem scheint der Besitz dieses Gens nicht für das Überleben der Bakterien notwendig zu sein. Speziell hergestellte Nullmutanten zeigten keinen vom Wildtyp unterscheidbaren Phänotyp. Allerdings war es, wohl aufgrund der Überschneidungen im Substratspektrum, experimentell möglich, durch Überexpression von HhoA hitzesensitive HtrA-Mutanten vor dem Absterben zu bewahren (Waller und Sauer, 1996). Eine spezifische Aufgabe von HhoA in *E. coli* wurde bislang nicht beschrieben.

HhoB/DegS besitzt einige Eigenschaften, die das Enzym von HhoA und auch HtrA abgrenzen. Im Gegensatz zu diesen besitzt es einen Sequenzabschnitt, der höchstwahrscheinlich einen Membrananker darstellt; vermutlich ist es *in vivo* an die Außenseite der periplasmatischen Membran gebunden (Waller und Sauer, 1996). Auch bezüglich der Substratspezifität zeigt

HhoB deutliche Unterschiede: im Gegensatz zu HhoA kann es bei Überexpression HtrA nicht ersetzen. Im Gegenzug besitzt es die Fähigkeit, den Verlust einer anderen essentiellen Protease, Tsp (auch als Prc bezeichnet; zuständig für die C-terminale Prozessierung von FtsI und essentiell für das Überleben bei Hitze- und osmotischem Streß), substituieren zu können (Bass *et al.*, 1996; Waller und Sauer, 1996). Im Gegensatz zu HhoA besitzen Nullmutanten von HhoB auch einen Phänotyp, der sich vornehmlich durch erheblich verlangsamtes Koloniewachstum auszeichnet (Bass *et al.*, 1996; Waller und Sauer, 1996). Weitere Information zur HtrA-Familie und ihren Mitgliedern findet sich in der Einleitung.

Der in der vorliegenden Arbeit als Ausgangsbasis für die Klonierung des Gens für eine neue Protease des Chloroplasten verwendete EST-Klon (T22208) und das nach dessen Zusammenfügen mit dem mittels PCR erhaltenen N-terminalen Ende vollständige Gen zeigen ausreichend hohe Homologien zu den Genen der HtrA-Familie aus *E. coli* bzw. *Synechocystis* sp. PCC6803, um das kodierte Genprodukt als neues Mitglied dieser Proteinfamilie zu kennzeichnen. Die Homologieraten gegenüber den bakteriellen Proteinen liegen auf Ebene der Aminosäuresequenz sämtlich zwischen 30 und 40% Identität und 50 – 60% Ähnlichkeit, bezogen auf die gesamte Proteinsequenz, und unterscheiden sich zwischen den einzelnen Proteinen einer Herkunft kaum. Die jeweils größte Gesamthomologie findet sich gegenüber den beiden löslichen HtrA-Homologen in *E. coli* (HhoA) und *Synechocystis* (sll1679/HhoA). Als Arbeitsbezeichnung wurde für das neuentdeckte *Arabidopsis*-Gen daher der Name *hhoA* gewählt. In einer neueren Publikation mit dem Ziel der Aufstellung einer Nomenklatur der vier umfangreichsten Proteasefamilien in pflanzlichen Zellen, Clp, FtsH, Lon und DegP (HtrA) und ihrer bislang bekannten Mitglieder (Adam *et al.*, 2001) werden mittlerweile dreizehn verschiedene Gene für bereits charakterisierte oder hypothetische Proteine der HtrA-Familie aufgezählt. Diese werden der Einfachheit halber alle mit „*degP*“ bezeichnet und von *degP1* bis *degP13* durchnummeriert. Innerhalb dieser Nomenklatur findet sich das in der vorliegenden Arbeit bearbeitete Gen unter der Bezeichnung *degP5*.

Einige der Eigenschaften des *hhoA*-Genprodukts lassen sich bereits aus der DNS-Sequenz ableiten: So besitzt das Protein die für Proteasen aus der HtrA-Familie typische katalytische Triade aus Histidin, Asparaginsäure und Serin, jeweils umgeben von einer Abfolge besonders stark innerhalb der Proteinfamilie konservierter Aminosäuren. Der N-Terminus zeigt charakteristische Kennzeichen eines Transitpeptids, inklusive der für die Prozessierung nach Import in das Thylakoidlumen typischen, aus den drei Aminosäuren *Ala-Ile-Ala* bestehenden, Erkennungsstelle. Bemerkenswerterweise wird DegP5 bei Adam *et al.* (2001) nach Analyse des Transitpeptids mittels des Programms ChloroP Vers. 1.01 als putatives Stromaprotein cha-

rakterisiert. Das Fehlen längerer hydrophober Abschnitte schließt die Möglichkeit aus, daß es sich um ein integrales Membranprotein handelt; neben einer freien, löslichen Form könnte das Genprodukt jedoch auch in einer peripher mit der Membran assoziierten Form vorliegen.

Eine besonders interessante Eigenschaft des von *hhoA* kodierten Proteins ist das Fehlen einer PDZ-Domäne, da der Besitz einer oder, im Falle von HtrA und HhoA von *E. coli*, zweier solcher Domänen neben der hochkonservierten Zusammensetzung der katalytischen Triade das Hauptcharakteristikum der HtrA-Familie darstellt. Diese Struktur soll nach den bisherigen Erkenntnissen für die Vermittlung von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sein (Ponting *et al.*, 1997) und wird im Falle von HtrA von *E. coli* als essentiell für dessen Funktion erachtet (Sassoon *et al.*, 1999; Spiess *et al.*, 1999). Adam *et al.* (2001) konstatieren das Fehlen von PDZ-Domänen neben *degP5* bei insgesamt fünf weiteren der von ihnen aufgelisteten dreizehn *degP*-Gene und nehmen dies zum Anlaß, die Funktionalität der von diesen Genen kodierten Proteine in Frage zu stellen.

Die nach der Klonierung des vollständigen Gens unternommenen Versuche zur weiteren molekularbiologischen und biochemischen Charakterisierung lieferten einige wichtige Erkenntnisse über *hhoA/degP5* bzw. das kodierte Protein. Die molekularbiologische Analyse mittels DNS-Hybridisierung zeigte, daß in genetischem Material aus anderen Pflanzenarten keine Gene existieren, deren Homologie zu *hhoA/degP5* auf DNS-Ebene hoch genug wäre, um eine DNS-Sonde des *Arabidopsis*-Gens spezifisch zu binden. Hybridisierungsexperimente mit einem BAC-Filter des *Arabidopsis*-Genoms bewiesen darüber hinaus, daß es sich um ein singuläres Gen handelt, das in einer einzigen Kopie auf Chromosom IV vorliegt. Die Expressionsanalyse mittels RNS-Hybridisierung zeigte, daß das Gen unter normalen Wachstumsbedingungen des Pflanzenmaterials nicht in auf RNS-Ebene nachweisbarer Menge transkribiert wird. Auch unter den experimentell untersuchten Streßbedingungen Hitze und Hochlicht konnte kein Transkript spezifisch nachgewiesen werden. In Verbindung mit der Tatsache des Fehlens einer PDZ-Domäne in der Proteinsequenz scheinen auch diese Befunde die Vermutung zu unterstützen, daß es sich bei dem vorliegenden Vertreter der HtrA-Familie um ein nicht oder nicht mehr funktionelles Protein handeln könnte. Allerdings läßt sich argumentieren, daß das Pflanzenmaterial aus *Arabidopsis* nur äußerst geringe Gesamtmengen an RNS und erst recht an mRNS für diese Experimente lieferte. Das Scheitern der Bemühungen, Transkripte des Gens nachzuweisen kann daher auch schlicht auf den Mangel an ausreichend Material für den Nachweis zurückzuführen sein. Ein eventueller Test mit artfremdem, ergiebigerem Pflanzenmaterial, beispielsweise aus Spinat, stand aufgrund der bereits angesprochenen ungenügenden Homologie auf DNS-Ebene nicht zur Diskussion.

Die biochemischen Charakterisierungsversuche hatten das primäre Ziel, die aus der Sequenz von *hhoA/degP5* bezüglich des kodierten Proteins gewonnenen Rückschlüsse zu bestätigen oder zu widerlegen. Nach erfolgreicher Transkription und Translation des Klons *in vitro* wurde zunächst der Versuch unternommen, das Translationsprodukt *in organello* in intakte Spinachchloroplasten zu importieren. Die Resultate dieses Versuchs bestätigten, daß das primäre Genprodukt importierbar ist und nach Bildung eines Prozessierungsintermediats von ca. 35 kDa Größe weiter in die Thylakoide gelangt, wo es auf eine endgültige Größe von etwa 33 kDa prozessiert wird. Die Tests mit proteolytischer Verdauung an den intakten Thylakoiden zeigten, daß das Protein nicht an deren Außenseite exponiert ist; nach Subfraktionierung in Thylakoidmembranteil und -lumen fand sich das Signal größtenteils in der löslichen Lumenfraktion. Diese Ergebnisse bestätigen die aus der Gensequenz gezogenen Schlüsse vollständig und widerlegen die rechnergestützte Vorhersage von Adam *et al.* (2001), es handle sich wahrscheinlich um ein stromales Protein.

Ein weiteres wichtiges Ziel der biochemischen Charakterisierungsversuche war die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen das ganze Genprodukt oder zumindest einen signifikanten Abschnitt davon. Die Versuche, den ganzen Klon bzw. den für den gereiften Proteinabschnitt kodierenden Teil mittels des pQE-Expressionssystems der Fa. Qiagen in *E. coli* heterolog zu überexprimieren, resultierten jeweils nur in einer immunologisch über die durch das System N-terminal angehängte Aminosäurefolge von 6x Histidin nachweisbaren Expression, die in beiden Fällen quantitativ für eine präparative Gewinnung über Affinitätschromatographie nicht ausreichte. Hingegen führte ein alternativ durchgeführter Expressionsversuch mittels des pRSET-Systems im Falle des für den gereiften Proteinabschnitt kodierenden Teil des Klons zum Erfolg in Form eines in quantitativ ausreichender Menge vorliegenden Expressionsprodukts. Die Bemühungen, mittels dieses Überexpressionsprodukts polyklonale Antikörper herzustellen, brachten mehrere Schwierigkeiten mit sich. So war generell festzustellen, daß alle im Laufe dieser Experimente erhaltenen Antiseren mehr oder minder starke unspezifische Kreuzreaktionen gegen verschiedene Proteine der getesteten Chloroplastenextrakte zeigten, noch bevor Reaktionen in dem aufgrund der Importversuche erwarteten Bereich, nämlich um ca. 32 kDa im Thylakoidlumen, detektiert werden konnten. Hier kann ein Zusammenhang mit den Präparationsverfahren des Expressionsprodukts nicht ausgeschlossen werden. Da im pRSET-System keine Modifikationen am exprimierten Protein (wie z. B. die 6 x Histidin-Abfolge bei den pQE-Vektoren) stattfindet, bestand keine Möglichkeit einer kontaminationsfreien Präparation via Affinitätschromatographie etc.. Die letztendlich angewandte Methode des Ausschneidens des zentralen Bereichs der Proteinbande aus der Nitro-

zellulosemembran bzw. aus dem Elektrophoresegel selbst konnte eine Verunreinigung mit bakteriellen Proteinen qualitativ nicht in gleicher Weise ausschließen. Entsprechend zeigten die Tests, in denen zunächst eine Reaktion der Antiseren gegen das Expressionsprodukt selbst untersucht wurde, neben dieser, generell bereits in den ersten Präparationen sehr starken, Reaktion eine Reihe weiterer unspezifischer Reaktionen mit Proteinen des bakteriellen Zellextrakts. In den ersten beiden Versuchen mit verschiedenen Kaninchen wurden jeweils Antiseren gewonnen, die zwar eine sehr starke Reaktion gegen das Expressionsprodukt des *hhoA*-Klons zeigten, jedoch keine Bande in dem erwarteten Bereich in den Chloroplastenextrakten markierten und spätestens ab der dritten Präparation aufgrund zu starker Anfärbung des Hintergrundes, offenbar durch Reaktion mit der Nitrozellulose selbst, unbrauchbar waren. Erst in einem dritten Ansatz, in dem für die Immunisierung des Kaninchens das direkt aus dem Elektrophoresegel gewonnene Protein eingesetzt wurde, konnte die störende Hintergrundreaktion vermieden werden. Ab der vierten Präparation zeigte das Serum dieses Tieres dann auch die erwartete spezifische Reaktion. Das *hhoA*-Gen wird demnach, obwohl der Transkriptionsnachweis nicht gelang, *in vivo* definitiv exprimiert und das Genprodukt in das Thylakoidlumen importiert, wo es in löslicher Form vorliegt, wie bereits aufgrund der *in vitro*-Importversuche vermutet. Die Beobachtung, daß sechs Immunisierungsschritte notwendig waren, bevor das Antiserum die erwünschte Spezifität zweifelsfrei und reproduzierbar aufwies, läßt in Verbindung mit der in der Expressionsanalyse unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Transkription vermuten, daß HhoA/DegP5 unter normalen Bedingungen eine äußerst minore Komponente des proteolytischen Apparates darstellt. Hierfür ließen sich jedoch auch andere, vielleicht näherliegende Ursachen finden, wie z. B. eine allgemeine schlechte Eignung des eingesetzten Überexpressionsprodukts als Antigen, oder eine wie auch immer verursachte schwache Disposition des verwendeten Tieres zur Bildung von Antiserum gegen dieses spezielle Antigen. Ein Test des Antiserums auf Lumenpräparationen aus unter unterschiedlichen Lichtbedingungen angezogenem *Arabidopsis*-Material konnte die bereits in der Expressionsanalyse getroffene Feststellung, daß *hhoA* durch die Lichtintensität offenbar nicht beeinflußt wird, auch auf Ebene des Proteins bestätigen. Unter Hochlicht wurde sogar eine leichte Abnahme der Proteinkonzentration beobachtet.

Da in den Experimenten zur heterologen Expression in *E. coli* mittels des pRSET-Systems der gesamte gereifte Abschnitt des *hhoA*-Klons in präparativer Menge gewonnen werden konnte, lag es nahe, mit diesem Expressionsprodukt Tests zur Funktionalität der potentiellen Protease durchzuführen. Zu diesem Zweck mußte das Protein, das im bakteriellen Zellextrakt ursprünglich praktisch komplett in der unlöslichen Fraktion zu finden war, solubilisiert und an-

schließlich renaturiert werden, was mittels eines modifizierten Ansatzes auch gelang. In den folgenden Funktionsexperimenten wurde die Präparation unter verschiedenen Bedingungen gegen ein potentiell Substrat *in vivo* (eine mutierte und somit als Degradationssubstrat prädestinierte Form von Plastocyanin) sowie ein artifizielles Substrat (β -Casein; wegen des Fehlens von definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen besonders für Proteolysetests geeignet), das auch bereits bei der Charakterisierung der bakteriellen HtrA-Homologe zum Einsatz kam (Waller und Sauer, 1996), getestet. Dabei konnte unter keiner der applizierten Versuchsbedingungen bezüglich des Degradationsmusters ein signifikanter Unterschied zwischen der HhoA-Präparation und dem identisch behandelten Extrakt aus *E. coli*-Zellen ohne Überexpressionsprodukt beobachtet werden. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, daß das Expressionsprodukt des *hhoA*-Klons keine proteolytische Funktion besitzt; vielmehr ist denkbar, daß diese während der denaturierenden Solubilisierung verlorenging und trotz der dialytischen Entfernung des Harnstoffs nicht korrekt wiederhergestellt werden konnte. Zudem ist die Beurteilung der proteolytischen Aktivität gerade von für sehr spezifische Aufgaben zuständigen Proteasen praktisch unmöglich, solange diese nicht gegen das Substrat getestet wird, gegen das sich die Spezifität des Enzyms auch *in vivo* richtet. Die äußerst geringe Abundanz von HhoA *in vivo* läßt, eine grundsätzliche Funktionalität des Enzyms vorausgesetzt, eine solche Spezialisierung auf eine ganz bestimmte Aufgabe möglich erscheinen.

Um Hinweise auf die mögliche Rolle von HhoA im Stoffwechsel des Chloroplasten zu erhalten, wurden zu zwei unterschiedlichen Ansätzen Versuchsreihen gestartet. Zum einen wurde der Versuch unternommen, Nullmutanten von HhoA in *Synechocystis* sp. PCC6803 zu charakterisieren und aus dem Phänotyp dieser Mutanten unter verschiedenen Streßbedingungen im Vergleich zum Wildtyp Aufschlüsse bezüglich der Rolle des Proteins im Cyanobakterium und dadurch letztendlich im Chloroplasten zu erhalten. Die erste Schwierigkeit liegt bereits darin, daß in *Synechocystis*, genau wie in *E. coli*, nur zwei HtrA-Homologe bekannt sind, die die Bezeichnungen *sll1427* (*hhoB*) und *sll1679* (*hhoA*) tragen und beide nur unwesentlich höhere Homologieraten gegenüber dem neuklonierten *Arabidopsis*-Gen zeigen als die entsprechenden *E. coli*-Gene. Da die funktionellen Verwandtschaftsverhältnisse basierend auf der Gensequenz nicht geklärt werden konnten (obwohl das löslich im Periplasma lokalisierte Genprodukt von *sll1679*, eine etwas höhere Homologie aufwies als das Membranprotein *sll1427*; putative Lokalisationen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 zitiert nach Fulda *et al.*, 2000), wurden Nullmutanten beider Gene bezogen und in verschiedenen Testversuchen charakterisiert. Wie im Ergebnisteil geschildert, zeigten beide Mutanten hinsichtlich ihres Phänotyps gegenüber dem Wildtyp weder unter normalen Anzuchtbedingungen noch unter

Licht- oder Hitzestress signifikante und verlässlich reproduzierbare Abweichungen. Ein weiterer gut charakterisierter proteolytischer Prozeß in Chloroplasten und Cyanobakterien, bei dem die partizipierenden Proteasen noch unentdeckt sind, ist die Degradation von D1 nach UV-B-induzierter Schädigung. Im Gegensatz zu der durch hohe Intensitäten sichtbaren Lichts verursachten Degradation wird die durch UV-B-Licht in Gang gesetzte Abbaukaskade mit der proteolytischen Spaltung der N-terminalen A/B-Schleife des Proteins im Lumen initiiert. (siehe auch Einleitung). Um Hinweise darauf zu erhalten, ob eine oder beide der in den Mutanten fehlenden Proteasen an diesem Vorgang in *Synechocystis* beteiligt sind, wurde der D1-Abbau nach UV-B-Bestrahlung immunologisch mittels Antiserum gegen den N-terminalen Abschnitt von D1 aus Spinat dokumentiert. Hier konnte jedoch im Vergleich zum Wildtyp bei keiner der Mutanten ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es dürfte damit feststehen, daß weder *sll1427* noch *sll1679* in *Synechocystis* eine wesentliche Rolle innerhalb dieses Degradationsprozesses spielen. Da beide Mutanten zuvor in den Experimenten bei Lichtstress keine starken Abweichungen in ihren Wachstumsraten und Pigmentwerten gegenüber dem Wildtyp zeigten, mutet es etwas überraschend an, daß im UV-B-Experiment bei der *sll1427*-Mutante eine Bande nicht gefunden werden konnte, die bei der *sll1679*-Mutante und beim Wildtyp deutlich sichtbar war und der Größe nach (ca. 24 kDa) dem durch den Standardumsatz von D1 unter normalen Lichtbedingungen entstehenden N-terminalen Prozessierungsprodukt entsprach, das durch das Antiserum ebenfalls detektiert werden dürfte (vgl. Abb. 3-22). Eine zumindest partielle Involvierung von *sll1427* in den lichtbedingten Umsatz von D1 läßt sich daher trotz des größtenteils indifferenten Phänotyps unter Lichtstressbedingungen nicht völlig ausschließen. Wäre dies der Fall, würde jedoch der ohnehin fragliche funktionelle Zusammenhang zwischen *sll1427* und dem untersuchten Gen für HhoA/DegP5 in *Arabidopsis* noch stärker in Frage gestellt, da hier weder Gen noch Genprodukt im Experiment eine lichtbedingte Akkumulation zeigen. Zudem wurde das bei Pflanzen für die lichtabhängige Degradation von D1 zuständige Enzym mittlerweile als Protease DegP2 charakterisiert (Haußühl *et al.*, 2001). Da *Synechocystis* neben HtrA, *sll1427* und *sll1679* offenbar keine weiteren Vertreter der HtrA-Familie besitzt, besteht möglicherweise bei *sll1427* eher ein funktioneller Zusammenhang mit DegP2 als mit DegP5/HhoA.

Im zweiten Ansatz, Aufschlüsse über die Rolle von HhoA/DegP5 im Stoffwechsel des Chloroplasten zu gewinnen, wurde der Versuch unternommen, das Genprodukt in *Arabidopsis* selbst durch das Einschleusen von Sinn- und Gegensinnkonstrukten zu beeinflussen. Ziel war es, durch das Gegensinnkonstrukt eine Bildung von Duplexstrukturen von dessen transkribierter mRNA mit der mRNA des pflanzlichen *hhoA/degP5*-Gens und dadurch eine Redukti-

on oder vollständiges Verschwinden von HhoA/DegP5 in den Chloroplasten der entstehenden Pflanzen zu erreichen. Die aus den mit dem Sinnkonstrukt transformierten Samen entstehenden Pflanzen wiederum sollten theoretisch durch das zusätzliche *hhoA/degP5*-Gen, welches nicht unter der Translationskontrolle des zelleigenen Gens steht, einen gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhten HhoA/DegP5-Spiegel aufweisen. In beiden Fällen sollten die Prozesse, an denen das Protein *in vivo* im Chloroplasten beteiligt ist, gestört werden. Aus dem Phänotyp der Transformanten ließen sich dann eventuell Rückschlüsse auf diese Prozesse ziehen. Mit beiden Konstrukten gelang es, eine Reihe von Transformanten zu erzielen, bei denen das Konstrukt, belegt durch die BASTA-/Glufosinatresistenz der Nachkommen, stabil und vererbbar in das Genom integriert worden war. Diese Transformanten zeigten jedoch keinen einheitlichen Phänotyp; da ihr Habitus in der überwiegenden Zahl der Fälle optisch vom Wildtyp nicht unterscheidbar war, wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die wenigen Exemplare mit einem auffälligen Hang zu starker Verzweigung und Reduktion der Samenanlagen bis hin zur Sterilität mit höherer Wahrscheinlichkeit auf das zufällige Ausschalten eines anderen Gens am Integrationsort zurückzuführen waren, als auf das integrierte Konstrukt selbst. Im Zuge des Versuchs, die Integration der Konstrukte durch Amplifikation aus der Gesamt-DNS einzelner Pflanzen mittels PCR nachzuweisen, zeigte sich, daß sich nur aus etwa 60 - 70% der Transformanten ein DNS-Abschnitt amplifizieren ließ, der in seiner Länge dem *hhoA/degP5*-Klon entsprach. Bei den negativen Proben hatte zwar offenbar eine Integration des jeweiligen Konstrukts stattgefunden, durch zusätzliche Rekombinationsvorgänge war jedoch vermutlich die klonierte Sinn- bzw. Gegensinn-DNS verlorengegangen.

Aus diesen Resultaten läßt sich noch nichts über die Funktion oder die Bedeutung von HhoA/DegP5 im Stoffwechsel des Chloroplasten ablesen. Die Tatsache, daß die stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen, die auch nachweislich noch das Sinn- bzw. Gegensinn-Konstrukt besaßen, keinen direkt darauf zurückzuführenden Phänotyp besaßen, führt jedoch noch nicht automatisch zu der Schlußfolgerung, daß das Ausschalten des Gens, bzw. die Verstärkung seiner Expression keinen Einfluß auf die Pflanze besitzt und damit zu der Annahme, HhoA/DegP5 habe keine bedeutende Rolle im Stoffwechselhaushalt. Zum einen bedeutet eine erfolgreiche Transformation noch längst nicht, daß die eingeführten Konstrukte auch in der erwarteten Art und Weise exprimiert werden. Darüber hinaus wären selbst bei einer funktionierenden Störung des Plastidenstoffwechsels Änderungen möglich, die sich nicht im optischen Phänotyp der Transformanten widerspiegeln, sondern möglicherweise erst nach Bestimmung weiterer Parameter, z. B. der Chlorophyllfluoreszenz, offenbaren. Zum anderen sind die Funktionsprinzipien von Sinn- und Gegensinnstrategien (obenstehend nur stark ver-

einfach zusammengefaßt) bei weitem noch nicht vollständig erforscht. Es hat sich beispielsweise gezeigt, daß die Wirkungsweisen je nach Art des biologischen Systems stark variieren; auch muß in den meisten Fällen die Expression des eingeführten Sinn- oder Gegensinnkonstrukts um ein Vielfaches höher liegen als die des Zielgens, um überhaupt einen Effekt zu erzielen (Bourque, 1995).

4.2.3. SppA

Die bakterielle Protease IV, später SppA genannt, wurde erstmals bereits 1982 von Pacaud beschrieben und einige ihrer grundlegenden Eigenschaften wurden charakterisiert. Obwohl schon ein Jahr zuvor ein offensichtlich unterschiedliches Enzym unter der Bezeichnung „Protease IV“ veröffentlicht worden war (Régnier, 1981a + b), setzte sich die Nomenklatur von Pacaud, in der diese andere Protease unter der Bezeichnung „Protease V“ aufscheint, allgemein durch. Protease IV wurde als in der inneren Membran von *E. coli* lokalisiertes Enzym vom Serintyp beschrieben (Pacaud, 1982). Als nächster Schritt folgte der experimentelle Nachweis, daß das Enzym für die Degradation von Signalpeptiden, die nach dem Export von Proteinen aus der Bakterienzelle von ihren Vorläuferpeptiden abgespalten wurden, zuständig ist, daß sich die Aktivität spezifisch nur gegen freie Signalpeptide richtet und daß Protease IV vermutlich die wichtigste, wenn nicht einzige Signalpeptid-spaltende Protease oder Peptidase in *E. coli* ist (Ichihara *et al.*, 1984). Nach der Klonierung des, *sppA* genannten, zugehörigen Gens (Ichihara *et al.*, 1986) gelang die weitere Charakterisierung des Enzyms als Protease mit einem Molekulargewicht von 67 kDa, die aufgrund des geringen Anteils hydrophober Abschnitte in der Proteinsequenz kein integrales, sondern wahrscheinlicher peripher mit der inneren Membran assoziiertes Protein ist, das *in vivo* darüber hinaus offenbar als Tetramer vorliegt (Ichihara *et al.*, 1986). In weiteren Studien wurde der Nachweis erbracht, daß der Verlust des *sppA*-Gens für die Bakterien nicht letal ist, und daß die Degradation der abgespaltenen Signalpeptide in den Mutanten zwar stark verlangsamt abläuft, jedoch immer noch stattfindet (Suzuki *et al.*, 1987). Letztendlich gelang die Aufklärung des gesamten Abbauweges der Signalpeptide, indem gezeigt wurde, daß Protease IV, als dominierende Signalpeptid-spaltende Protease der inneren Membran, diese, im Gegensatz zu früheren Vermutungen endoproteolytisch, in kürzere Oligopeptide spaltet, welche dann im Cytosol unter Beteiligung von Oligopeptidase A bis herab zu den einzelnen Aminosäuren degradiert werden (Novak und Dev, 1988). Blockade von Protease IV durch Proteaseinhibitoren hat, wie im *in vitro*-Experiment an Membranvesikeln aus *E. coli* nachgewiesen wurde, gravierende Störungen des gesamten Translokationsapparates zur Folge (Chen und Tai, 1989).

Im Zuge der Sequenzierung des kompletten Genoms von *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde entdeckt, daß sich in diesem Genom zwei Homologe von *sppA* finden: Ein sowohl in der Länge als auch allen anderen wichtigen Eigenschaften ähnliches Gen *sll1703*, später auch als *sppA1* bezeichnet, sowie ein weiteres Gen *slr0021*, später als *sppA2* bezeichnet, welches im Vergleich zu *sppA* von *E. coli* und auch zu *sll1703* um mehr als die Hälfte kürzer ist, dessen hypothetisches Produkt jedoch starke Homologien zu den hochkonservierten Bereichen im C-terminalen Abschnitt der Produkte der beiden langen Gene aufweist. Für beide *Synechocystis*-Gene war bei Beginn der vorliegenden Arbeit noch keine Funktion bekannt.

Die Sequenz des nach Ligation des am 5'-Ende unvollständigen, durch radioaktive Hybridisierung einer cDNS-Bibliothek mit dem als Ausgangsbasis dienenden EST-Klon E8A10T7 (Genbank-Zugriffsnummer AA042706) gewonnenen, cDNS-Klons mit dem das vollständige 5'-Ende enthaltenden PCR-Klon sowie nach Eliminierung der fehlerhaften Prozessierungsstelle nahe der Mitte der Sequenz (siehe weiter unten) erhaltenen korrekten *sppA*-Gens von *Arabidopsis* zeigt eine auf das ganze Gen bezogen nur schwache Homologierate zu den entsprechenden Genen von *E. coli* (*sppA*) bzw. *Synechocystis* PCC6803 (*sll1703* und *slr0021*). In den auch zwischen *E. coli* und *Synechocystis* hochkonservierten Bereichen, vornehmlich in der C-terminalen Hälfte des kodierten Proteins, erreichen die Werte jedoch teilweise über 50% Identität – ausreichend, um die Verwandtschaft mit den prokaryotischen Genen zu belegen.

Aus der Sequenz des Gens selbst lassen sich bereits einige Eigenschaften des kodierten Proteins ablesen: So wird die bereits aus der Existenz von Homologen in Eu- und Cyanobakterien abgeleitete hypothetische plastidäre Lokalisation durch den Besitz einer für plastidäre Transitpeptide typischen Aminosäuresequenz am N-Terminus bekräftigt. Weiter auffällig ist der Besitz von vier auch in den prokaryotischen Homologen zu 100% konservierten Serinresten in der C-terminalen Hälfte des hypothetischen Proteins, von denen vor allem ⁴²⁶Ser und ⁴⁵³Ser aufgrund ihrer jeweiligen Nähe zu einem Lysinrest für die Beteiligung an der aktiven Domäne, durch Bildung einer sogenannten katalytischen Dyade, in Frage kommen. Das hydrophatische Profil schließlich zeigt keine hydrophoben Abschnitte, welche lang genug für eine Transmembrandomäne sein könnten; daraus ergibt sich aber noch nicht zwangsläufig die Annahme, es mit einem löslichen Protein zu tun zu haben – auch SppA von *E. coli* besitzt kaum längere hydrophobe Abschnitte (Ichihara *et al.*, 1986) und wurde dennoch als Membranprotein identifiziert.

Die molekularbiologische Charakterisierung von *sppA* ergab zunächst sehr ähnliche Ergebnisse wie bereits bei *hhoA/degP5*. Genau wie dieses liegt *sppA* auf dem Genom von *Arabidopsis* nur in einer einzigen Kopie vor. Die Homologie auf DNS-Ebene war auch hier nicht ausreichend, um eine Hybridisierung der *sppA*-Sonde mit den entsprechenden Genen aus anderen Pflanzenarten zu ermöglichen. Ebenso konnte wie bei *hhoA/degP5* im Translationstest in der aus unter normalen Anzuchtbedingungen gewachsenem Pflanzenmaterial gewonnenen mRNA keine über der Nachweisgrenze liegende Transkriptmenge von *sppA* gefunden werden. Die Gemeinsamkeiten endeten jedoch mit der Expressionsanalyse: hier wurde festgestellt, daß das Transkript von *sppA* bei längerer Behandlung des Pflanzenmaterials mit Lichtstreß nachweisbar wird und über einen Zeitraum von bis zu zwei Tagen abhängig von der Bestrahlungsdauer akkumuliert. Damit war auch der erste Hinweis dafür gegeben, daß das pflanzliche SppA-Homolog offenbar im Chloroplasten eine funktionelle Neudefinierung erfahren hat, da eine Funktion als Signalpeptid-spaltende Peptidase, wie in *E. coli*, keine lichtabhängige Expression erfordern würde. Der nächste, von dem cDNS-Klon ausgehende Schritt, die *in vitro*-Transkription und -Translation, lieferte lange Zeit ohne offensichtliche Ursache unerwartete Ergebnisse: trotz aller Tests und Optimierungsversuche wurde als größtes Translationsprodukt nur ein etwa 40 kDa großes Protein gefunden – nur etwa halb so groß wie aus der Gensequenz abgeleitet worden war. Das gleiche Problem ergab sich in den parallel laufenden Versuchen mit heterologer Expression des Klons. Die Ursache für diese unerwarteten Resultate lag nicht, wie zwischenzeitlich vermutet, in einer autoproteolytischen Degradation des erwarteten ca. 75 kDa großen Translationsprodukts, sondern in einem Fehler in der DNS-Sequenz des Klons, der beim Edieren der Sequenzierdaten nicht als solcher erkannt worden war. Dieser Fehler wurde erst entdeckt, als durch das internationale *Arabidopsis*-Sequenzierungsprojekt die komplette Sequenz von Chromosom I, auf dem das *sppA*-Gen durch die Hybridisierungsexperimente mit einem BAC-Filter lokalisiert worden war, veröffentlicht, und damit ein Vergleich des cDNS-Klons mit der genomischen Sequenz von *sppA* ermöglicht wurde (Genbank-Zugriffsnummer AC016662). Bei diesem Vergleich wurde festgestellt, daß das aus der genomischen Sequenz errechnete Protein an Position 299 die Aminosäure Threonin trägt, während die eigene, aus dem cDNS-Klon abgeleitete Proteinsequenz hier die Sequenz Glutamin – Asparagin – Tyrosin – Alanin aufwies, also vier statt einer Aminosäure. Nochmaliges Sequenzieren dieser Stelle im cDNS-Klon mittels der ABI-Apparatur enthüllte, daß hier bei der manuellen Edierung der ursprünglich auf dem LICOR-System gewonnenen Sequenz irrtümlich eine Base zuviel entfernt wurde. Insgesamt entsprach die DNS-Sequenz des cDNS-Klons an dieser Stelle der genomischen fast völlig, bis auf den Besitz von

zusätzlichen zehn Nukleotiden, die zwangsläufig einen Wechsel des Leserasters und damit einen vorzeitigen Abbruch der Translation nach 309 Aminosäuren zur Folge hatten. Exakt an der Stelle, an der im cDNS-Klon der Fehler lokalisiert wurde, befindet sich in der genomischen Sequenz ein nichttranslatierter Bereich; die Vermutung lag daher nahe, daß im Falle des cDNS-Klons während des posttranskriptionellen Spleißens ein Fehler unterlaufen war, durch den zehn Nukleotide des Introns in der mRNA verblieben waren. Tatsächlich sind die überzähligen Basen mit den letzten zehn des nichttranslatierten Bereichs identisch, was auf die in Abb. 3-29 verdeutlichte Fehlprozessierung hinweist. Über deren Ursachen lassen sich nur schwer Vermutungen anstellen. Die Position, an der der inkorrekte Spleißvorgang erfolgte, entspricht nicht der Standard-Konsensussequenz für das 3'-Ende einer solchen Prozessierung (Brown, 1986), weist aber eventuell ausreichend Ähnlichkeiten auf, die im Einzelfall zu ihrer fälschlichen Erkennung führen könnten.

Nach der Eliminierung dieses Sequenzfehlers funktionierte die *in vitro*-Translation des Klons ohne Probleme und bestätigte die aus der DNS-Sequenz gezogenen Rückschlüsse bezüglich der Größe des primären Genprodukts sehr genau. Das Resultat des geglückten Importversuchs *in organello* zeigte, daß das Prozessierungsprodukt nach dem Import mit ca. 66 kDa etwa 10 kDa kleiner ist als das Translationsprodukt, förderte darüber hinaus jedoch bereits die nächste unerwartete Erkenntnis zutage: Entgegen aller sequenzbedingter Vorhersagen fand sich das importierte Genprodukt, wenn auch nur schwach, so doch eindeutig mit der stromalen Peripherie der Thylakoidmembran assoziiert wieder. Diese Beobachtung ließ sich reproduzieren und bestätigte die mittlerweile mittels der polyklonalen Antikörper gewonnenen Befunde.

Die als Voraussetzung für die Produktion polyklonaler Antikörper wichtige heterologe Überexpression des Klons in *E. coli* lieferte lange Zeit, genau wie die Versuche zur *in vitro*-Translation und höchstwahrscheinlich aus denselben Gründen, keine nachvollziehbaren Ergebnisse – weder die Expression des gesamten Klons, noch die der 5'-terminalen knapp 1400 Bp erzielte ein Produkt mit der zuvor errechneten Molekulargröße. Die Expression der 3'-terminalen etwa 650 Bp, die von dem zu diesem Zeitpunkt noch nicht entdeckten Fehler in der DNS-Sequenz des Klons nicht betroffen waren, führte mit dem pRSET-System letztlich zu einer guten Überexpression, die für Präparierung und Immunisierung geeignet war. Mit den gegen diesen Teil von SppA gebildeten Antikörpern gelang der erste eindeutige Nachweis des Proteins als ca. 65 kDa große Komponente der Thylakoidmembran, was parallel dazu auch durch den *in organello*-Import bestätigt wurde. Der Nachweis, daß nicht nur das Transkript, sondern auch das Protein bei längerer Behandlung mit Lichtstreß stärker akkumuliert, gelang mit diesem Antiserum zunächst nicht, was zumindest teilweise der, auch aufgrund der

hohen generellen Intensität der Immunreaktion, geringen Eignung der Chemoluminiszenzmethode für quantitative Auswertungen zugeschrieben wurde. In einem unabhängigen Experiment wurde diese Akkumulation später mit denselben Antikörpern, jedoch einer sensitiveren Nachweismethode unter Verwendung von mit ^{125}I radioaktiv markiertem Protein A nachgewiesen (Lensch *et al.*, 2001). Der gleiche Versuch, bei dem mit der ECL-Methode scheinbar keine Differenz in der Proteinmenge von SppA aus unter unterschiedlichen Lichtbedingungen angezogenem Pflanzenmaterial gefunden wurde, zeigte eine deutliche quantitative Abnahme einer zweiten, etwas kleineren Proteinbande, offenbar eines Degradationsprodukts von SppA, in Abhängigkeit von der Lichtbestrahlung. Aus beiden Resultaten läßt sich folgern, daß SppA nicht nur bei ansteigender Belichtung der Pflanzen stärker exprimiert wird und akkumuliert, sondern daß offensichtlich gleichzeitig auch seine Degradationsrate sinkt. Dies führt zwangsläufig zu einer stark erhöhten Verfügbarkeit des Proteins unter Lichtstreibbedingungen.

Die Untersuchung der lateralen Verteilung von SppA in der Thylakoidmembran erbrachte den Nachweis, daß das Protein vorwiegend in den Stromabereichen akkumuliert. Daraus läßt sich noch nichts Genaues über die Art des oder der potentiellen Substrate schließen, da selbst reine Komponenten der Granabereiche wie beispielsweise D1 oder LHC II zum Zweck der Degradation von ihrer ursprünglichen Position in die nichtapprimierten Regionen der Membran migrieren müssen (Dannehl *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996). Dennoch läßt sich die Vermutung, daß SppA möglicherweise, sei es nun in spezifischer oder eher genereller Funktion, am Aufbau einer spezifisch für die Degradation hochlichtgeschädigter Proteine zuständigen proteolytischen Maschinerie in den Stromathylakoiden beteiligt sein könnte, nicht von der Hand weisen. Die in einem weiteren Versuch festgestellte scheinbare Komigration des Proteins mit Photosystem I in über einem Saccharosegradienten aufgetrennten Membrankomplexen würde durchaus im Einklang mit dieser Vermutung stehen; mittlerweile wurde jedoch gezeigt, daß SppA in *Arabidopsis*, wie auch in *E. coli*, selbst (Ichihara *et al.*, 1986) einen oligomeren Komplex, höchstwahrscheinlich ein Tetramer, bildet (Lensch *et al.*, 2001), was das beobachtete Verhalten des Signals auf dem Saccharosegradienten erklärt.

Wie bereits erwähnt, erschien die Beobachtung, daß SppA mit der Thylakoidmembran assoziiert, zunächst überraschend, da das hydropathische Profil des *sppA*-Genprodukts (vgl. Anhang A-4) den Besitz von Transmembrandomänen auszuschließen scheint und eher typisch für ein lösliches Protein wirkt. Nach den Ergebnissen der immunologischen Charakterisierung und des in *organello*-Imports besteht jedoch kein Zweifel daran. In den Experimenten zur Stabilität der Bindung von SppA an die Membran verhielt sich das Protein darüber hinaus eher wie eine integrale als eine peripher assoziierte Komponente; selbst das stärkste im Test

eingesetzte chaotrope Salz NaSCN konnte SppA in einer Konzentration von 2 M nur zum Teil in den löslichen Überstand überführen. Durch die Behandlung der Thylakoide mit verschiedenen starken Proteasen konnte jedoch gezeigt werden, daß SppA tatsächlich nur an der Oberfläche der Membran sitzt; zwar wurde eine gewisse Resistenz gegen den Abbau durch die beiden schwächeren Proteasen Thermolysin und Trypsin festgestellt, mit Proteinase K ließ sich das Immunsignal jedoch praktisch vollständig aus der Membranfraktion entfernen, was bei einem integralen Protein mit einer ausreichend großen lumenexponierten Domäne nicht möglich gewesen wäre (vgl. Pratt, 1989). Darüber hinaus zeigte das Degradationsmuster von SppA zwischen intakten und durch Ultraschallbehandlung aufgebrochenen Thylakoiden keine Unterschiede, eine Bestätigung dafür, daß das Protein an der stromalen Seite der Membran lokalisiert ist. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Verhältnissen in *E. coli*: Protease IV, das bakterielle Homolog zu SppA, ist ebenfalls membranassoziiert, hier mit der Innenseite der inneren Membran, obwohl auch dieses Protein seiner Hydrophobie zufolge keine Transmembrandomänen erkennen läßt. Es wurden drei relativ hydrophobe Abschnitte als vermutlich für die Membranassoziation verantwortlich beschrieben (Pacaud, 1982). Die beiden C-terminal gelegenen befinden sich in Bereichen, in denen die bakterielle Sequenz hohe Homologien zu dem Protein von *Arabidopsis* aufweist. Gerade der N-terminal gelegene, für einen Membrananker am geeignetsten erscheinende hydrophobe Abschnitt des *E. coli*-Proteins fehlt jedoch bei SppA von *Arabidopsis* (vgl. auch Anhang A-3), daher kommen für die Bindung des pflanzlichen Proteins an die Membran nur die beiden C-terminalen Abschnitte in Frage. Da der erste davon die beiden potentiell an der Bildung der katalytischen Dyade beteiligten Serinreste, ⁴²⁶Ser und ⁴⁵³Ser enthält (siehe Anfang des Kapitels), muß der zweite, zwischen den Positionen 454 und 492, alleine für die hydrophobe Interaktion mit der Membran verantwortlich sein. Auch hier finden sich keine Abschnitte, die über eine ausreichend lange Strecke eine genügend hohe Hydrophobizität besitzen, um sich ganz durch die Lipiddoppelschicht der Membran erstrecken zu können. Daher bleibt das Zustandekommen der hohen Affinität von SppA zu dieser zunächst weiter rätselhaft. Bei dem Versuch, die fraglichen Bereiche des Proteins in ihrer räumlichen Struktur darzustellen, fällt jedoch auf, daß sich die Aminosäuren dieses Abschnitts sowohl bei *Arabidopsis*, als auch bei den Homologen in *E. coli*, sowie *Synechocystis* sp. PCC 6803, in Form einer sogenannten amphiphilen Helix mit zwei einander gegenüberliegenden Oberflächen unterschiedlicher Hydrophobizität anordnen lassen (vgl. Anhang A-5). Daraus ließe sich ein räumliches Modell des monomeren Proteins ableiten, in dem dieser gesamte Abschnitt praktisch längs zu der Membranoberfläche in die Lipiddoppelschicht eintaucht, wobei die hydrophilere Seite der Helix mit den hydro-

philen Glycerinresten („Köpfen“), die hydrophobere gleichzeitig mit den Fettsäureschwänzen der Membranlipide interagiert (Anhang A-6). Durch eine solche Anordnung, die beispielsweise in ähnlicher Form auch für Prostaglandinsynthetase beschrieben wird (Picot und Garavito, 1994), wäre zusätzlich zu einer relativ hohen Bindefestigkeit des Enzyms an die Membran auch eine Positionierung der katalytischen Domäne in unmittelbarer Nähe zu deren Oberfläche gewährleistet (vgl. Anhang A-6) – eine optimale Ausrichtung für die Bindung und Prozessierung von Membranproteinen als Substrate.

Zusammengefaßt lassen alle diese Beobachtungen die Folgerung zu, daß SppA unter Umständen eine Rolle innerhalb der proteolytischen Maschinerie der Thylakoidmembran spielt, und daß diese Funktion für die Pflanze insbesondere unter erhöhten Lichtintensitäten wichtig ist. Ein zusätzliches Indiz hierfür lieferte die Testreihe mit der Mutante von *Synechocystis* sp. PCC 6803, bei der das Gen *sll1703*, das Äquivalent zu *sppA* im Cyanobakterium, durch eine Insertion ausgeschaltet wurde. Bei dieser Mutante zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp unter erhöhten Lichtintensitäten keinerlei erkennbarer Abbau der photosynthetischen Pigmente, was Anlaß zu der Vermutung gab, daß das Homolog von SppA in Cyanobakterien eventuell sogar eine Schlüsselrolle bei diesem Prozeß spielt. Nachdem die Untersuchungen an den *Synechocystis*-Mutanten aus dem Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgegliedert worden waren, zeigte sich jedoch bei aufwendigeren Tests, daß die eigene Beobachtung des fehlenden Pigmentabbaus bei der *sll1703*-Mutante nur bei gegenüber den Normalbedingungen mäßig erhöhten Lichtintensitäten (um $150 \mu\text{E m}^{-2}$) auftritt und die Kulturen bei sehr starkem Lichtstreß (um $450 \mu\text{E m}^{-2}$) hingegen sogar schneller als der Wildtyp ausbleichen (L. Pojidaeva; pers. Mitteilung). Die tatsächlichen Verhältnisse in *Synechocystis* gestalten sich demnach um einiges komplizierter als anhand der Resultate der beschriebenen eigenen Vortests angenommen wurde. Dennoch wird deutlich, daß die physiologische Rolle des ursprünglich rein „haushaltenden“ Enzyms Protease IV bereits auf prokaryotischer Ebene im Zuge der Ausbildung photosynthetischer Lebensweise eine gravierende Neudefinierung erfahren hat.

In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung an *Arabidopsis*-Mutanten mit modifiziertem SppA-Stoffwechsel äußerst interessant gewesen; leider scheiterte bereits die parallel zu *hhoA* versuchte Transformation mit Sinn- und Gegensinnkonstrukten zum 5'-terminalen Teil von *sppA* aus den im Ergebnisteil geschilderten Gründen.

4.3. Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zwei verschiedene Schwerpunkte: auf der einen Seite wurde die direkte Isolierung zuvor unbekannter proteolytischer Enzyme auf biochemischem Weg angestrebt; auf der anderen wurde der Versuch unternommen, solche Enzyme über die Klonierung ihrer Gene und deren weitere Charakterisierung zu finden. Vor allem der zweite Ansatz führte durch die Klonierung zweier zuvor nicht beschriebener Gene zu einer Reihe interessanter Ergebnisse. Im Falle der Isolierung und Aufreinigung lichtstreibinduzierter Proteasen aus dem Thylakoidlumen von Erbsenkeimlingen gab es, wie unter Abschnitt 4.1. dargelegt, grundlegende methodische Probleme. Aus diesem Grund erscheint eine Wiederaufnahme bzw. Fortführung dieser Arbeiten wenig erfolgversprechend, falls nicht ein Weg gefunden wird, die für den Einsatz notwendige Menge an Pflanzenmaterial zu reduzieren und/oder die Sensitivität und Zuverlässigkeit der Nachweismethode (Detektion proteolytischer Aktivität auf substrathaltigen Polyacrylamidgelen) zu verbessern. Hier könnte eventuell die Erprobung anderen Pflanzenmaterials (z. B. aus Spinat) bzw. Tests mit anderem Substrat (z. B. β -Casein statt Gelatine) Fortschritte bringen. Doch auch unter diesen Voraussetzungen erscheint eine Aufreinigung der beobachteten proteolytischen Aktivitäten (äußerst minore Komponenten des Thylakoidlumens) kaum aussichtsreich. Am erfolgversprechendsten dürfte hier die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese sein: Verbesserte Systeme könnten eventuell einen Wegfall der die proteolytischen Aktivitäten stark beeinträchtigenden Vorbehandlung der La-defraktion zur Folge haben. Eine Auftrennung über eine größere Gelfläche als mit der hier verwendeten Ausstattung möglich könnte darüber hinaus eine verbesserte Auflösung zur Folge haben, die unter Umständen die Isolierung einzelner Aktivitätspunkte und ihre Analyse mittels Proteinsequenzierung ermöglicht. Die Methode des Aktivitätsnachweises unter Verwendung substrathaltiger Gele selbst könnte, eine Optimierung je nach Einsatzzweck vorausgesetzt, verschiedene Anwendungsmöglichkeiten in der Proteaseforschung im Allgemeinen bieten, so zum Beispiel bei der Detektion proteolytischer Aktivität eines heterolog überexprimierten Genprodukts.

Die Produkte der beiden neu klonierten Gene *hhoA/degP5* bzw. *sppA* wurden auf molekularbiologischer Ebene weitestgehend und auf biochemischer Ebene teilweise charakterisiert. Die Erforschung ihrer Funktion und physiologischen Bedeutung innerhalb des Stoffwechsels des Chloroplasten hat jedoch gerade erst begonnen. Im Falle von HhoA/DegP5 gelang es trotz der eindeutigen Bestätigung der Expression und der Lokalisation im Thylakoidlumen nicht, den Nachweis zu führen, daß das Protein überhaupt eine Funktion besitzt. Hier könnten modifi-

zierte Ansätze zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität des Überexpressionsprodukts, beispielsweise unter Verwendung der Technik mit substrathaltigen Gelen, in Verbindung mit optimierten Methoden zur Reinigung und Renaturierung des Proteins aus dem Bakterienextrakt möglicherweise Abhilfe schaffen. Außerdem besteht die Möglichkeit der weiteren Charakterisierung der mit Sinn- und Gegensinnkonstrukten transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen auf molekularbiologischer und vor allem auch biochemischer Ebene. Auch die Möglichkeit der Konstruktion direkter „knock-out“-Pflanzen sollte geprüft werden, da hier im Erfolgsfalle die Ausschaltung des Genprodukts wesentlich zuverlässiger stattfinden kann als mit dem Gegensinn-Ansatz. Die weitere Untersuchung der Mutanten von *sll1427* und *sll1679* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 könnte ebenfalls wertvolle Erkenntnisse liefern. Jedoch dürfte aus den in Abschnitt 4.2.2. dargelegten Gründen ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen einem dieser cyanobakteriellen Gene und *hhoA/degP5* von *Arabidopsis* fraglich sein. Im Falle von *sppA* scheint festzustehen, daß das Produkt eine möglicherweise wichtige Rolle innerhalb der lichtinduzierten proteolytischen Maschinerie des Thylakoidsystems und damit der Adaptation des Chloroplasten an wechselnde Lichtintensitäten, einem der wichtigsten pflanzlichen Adaptationsmechanismen, innehat. Eine weitere Erforschung dieser Komponente mit dem Ziel der genauen Aufklärung ihrer Funktion erscheint damit notwendig, auch für das Gesamtverständnis der Lichtadaptation von Pflanzen. Hier könnten die bereits zu einem frühen Zeitpunkt aus der vorliegenden Arbeit ausgegliederten Untersuchungen an einer *sll1703*-Mutante von *Synechocystis* sp. PCC 6803, auch aufgrund der im Vergleich zur HtrA-Familie weitaus eindeutigeren funktionellen Zusammenhänge zwischen dem pflanzlichen und dem cyanobakteriellen Protein, wertvolle Hinweise liefern. Darüber hinaus wäre die Konstruktion von *Arabidopsis*-Mutanten mit verändertem oder ausgeschaltetem *sppA*-Gen, über direkten „knock-out“ oder eine nach Optimierung des Verfahrens eventuell doch noch erfolgreiche Transformation mit Sinn-/Gegensinnkonstrukten, wünschenswert. Eine zunehmend wichtige Rolle könnte allgemein das stetige Anwachsen der verfügbaren genetischen Informationen auch anderer Pflanzenarten, wie z. B. Reis, spielen. So wäre es möglicherweise bald vorstellbar, die entsprechenden Homologe von *hhoA/degP5* bzw. *sppA* auch aus diesen Pflanzen zu klonieren und Vergleichsuntersuchungen in auf biochemischer Ebene möglicherweise einfacher zu charakterisierenden Systemen als *Arabidopsis* durchzuführen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem proteolytischen System des Chloroplasten höherer Pflanzen und hier speziell mit dem des Thylakoidsystems. Vorderstes Ziel war die Isolierung und Charakterisierung neuer, bislang unbekannter Komponenten. Zu diesem Zweck wurden zwei unterschiedliche Ansätze erprobt: Einmal der rein biochemische Weg, bei dem der Versuch unternommen wurde, speziell lichtinduzierte proteolytische Aktivitäten des Thylakoidlumens nachzuweisen, anzureichern, und, falls möglich, aufzureinigen. Mit dem zweiten Ansatz wurde zunächst versucht, in Sequenzvergleichen auf molekularbiologischer Ebene homologe Gene zu bekannten bakteriellen und cyanobakteriellen Proteasen im pflanzlichen Genom ausfindig zu machen, und ausgehend von diesen dann die zugehörigen Genprodukte zu isolieren und charakterisieren.

1. Nachweis, Charakterisierung und Aufreinigung lichtstreibinduzierter Proteasen des Thylakoidlumens: Die zu diesem Ansatz durchgeführten Experimente konnten im Thylakoidlumen von Erbsenchloroplasten durch den Einsatz von Aktivitätstests auf substrathaltigen Polyacrylamidgelen mindestens fünf distinkte proteolytische Aktivitäten sichtbar machen. Diese Aktivitäten erwiesen sich als eindeutig induzierbar durch Hochlicht. Sie wurden jedoch sämtlich durch in äußerst geringer Menge vorliegende Komponenten des Lumens hervorgerufen. An der dadurch, sowie zusätzlich durch einen Lichtadaptationseffekt des Pflanzenmaterials, bedingten schlechten Reproduzierbarkeit der Aktivitäten scheiterten schließlich sowohl die Charakterisierung der unbekannteren Proteasen als auch deren weitere Aufreinigung. Die Arbeiten sind dennoch dazu angetan, eine Vorstellung von der Größe und Komplexität des proteolytischen Systems alleine des Thylakoidlumens zu vermitteln.

2. Klonierung der Gene neuer plastidärer Proteasen und Charakterisierung der zugehörigen Genprodukte: Im Rahmen der Arbeit wurden die Gene zweier zuvor nicht beschriebener mutmaßlicher Proteasen aus *Arabidopsis thaliana* L. isoliert, beides Homologe zu bekannten Proteasen aus *E. coli*.

hhoA: Das Produkt dieses Gens stellt ein Mitglied der ubiquitär verbreiteten HtrA-Familie von Serinproteasen dar, deren Zahl sich in *Arabidopsis* auf mittlerweile vierzehn beläuft. Es besitzt die typische katalytische Triade der Familie, läßt jedoch die zumindest für die meisten charakterisierten Homologe typische sogenannte PDZ-Domäne im N-terminalen Bereich vermissen. In den Experimenten zur Kartierung des Gens konnte gezeigt werden, daß dieses in singulärer Kopienzahl auf Chromosom IV lokalisiert ist. Anschließende Untersuchungen

zur Expression konnten in Pflanzen jedoch weder unter normalen Anzuchtbedingungen, noch nach Streßexperimenten mit Hochlicht und Hitzestreß ein spezifisches Transkript nachweisen. *In vitro*-Experimente belegten die Transkribier- und Translatierbarkeit des Gens; dessen Produkt im *in organello*-Importexperiment als lösliche Komponente im Thylakoidlumen akkumulierte. Weitere Untersuchungen an Chloroplastenfraktionen aus Spinat und *Arabidopsis* unter Zuhilfenahme eines gegen das heterolog exprimierte gereifte Genprodukt produzierten polyklonalen Antikörpers bewiesen, daß *hhoA* auch *in vivo* synthetisiert wird und wie im Importexperiment im Thylakoidlumen lokalisiert ist. Verschiedene Versuche zur Funktion des Proteins brachten kein eindeutiges Ergebnis. Die Transformation von *Arabidopsis* mit Sinn- und Gegensinnkonstrukten des Gens war zwar erfolgreich, erzeugte jedoch Pflanzen ohne erkennbar vom Wildtyp abweichenden Phänotyp.

sppA: Das Homolog zu der Signalpeptid-prozessierenden Protease aus *E. coli*, Protease IV, stellt das bislang einzige beschriebene in höheren Pflanzen dar. Das Gen ist, wie in Experimenten zu seiner Kartierung gezeigt wurde, in singulärer Kopienzahl im Genom vorhanden, lokalisiert auf Chromosom I. In Untersuchungen zur Expression konnte das Transkript unter normalen Anzuchtbedingungen nicht nachgewiesen werden. Bei Behandeln der Pflanzen mit Lichtstreß über längere Zeit wurde jedoch ein nach mehrstündiger Latenzzeit einsetzendes Ansteigen der Transkriprate beobachtet. Das Genprodukt wurde nach *in vitro*-Transkription und -Translation im *in organello*-Importexperiment als peripher mit der stromalen Oberfläche der Thylakoidmembran assoziiert charakterisiert. Untersuchungen an Chloroplastenfraktionen mittels Antikörpern, die gegen den C-Terminus des heterolog exprimierten SppA-Proteins produziert worden waren, bestätigten neben dem Nachweis des Vorhandenseins auch unter Normalbedingungen diese Lokalisation auch *in vivo*. Bei weiterer Subfraktionierung der Thylakoide fand sich das Protein vornehmlich assoziiert mit Stromathylakoiden. Die bei Bestrahlung der Pflanzen mit hohen Lichtintensitäten steigende Expressionsrate deutet auf eine funktionelle Neudefinierung von SppA in photosynthesetreibenden Organismen im Vergleich zu *E. coli* und auf eine Rolle innerhalb der langfristigen Adaptationsmechanismen der Pflanze gegen Lichtstreß hin. Weitere Untersuchungen konnten jedoch keine eindeutigen Hinweise bezüglich der spezifischen Funktion des Proteins liefern.

6. ANHÄNGE

```

1                                                    70
Ara_hhoA M-----ALASSKAFSSIFN T L S
Ara_degP M-----ATTTSC L L L H S P P S Q L S N S T S F F N L S S R R S S P V S
Syn_hhoA M-----KYPTWLRRIGGYLLAFVGTAFG
Syn_hhoB M-----AIHLKASHLGVA V L L L F G C A I G A A G G G Y L
Syn_htrA M S A Q A V F P I A P H R A D F F P R F V L S N S S A N K C H Q A M K D V S L H S P K Q T P S K I S L A Y L G L V L V G M G I G A G G I F V
Eco_hhoA M-----K K Q T Q L L S A L A L S V G L T L S
Eco_hhoB M-----F V K L L R S V A I G L I V G A I L L
Eco_htrA M-----K K T T L A L S R L A L S L G L A L S

71                                                    * 140
Ara_hhoA F I N Q --- S K F V L A C S G S N H V D V I D R G R ----- R I M I F G S S I A L T S S I L G S N Q Q R L P M E S A I T A L E Q F
Ara_degP L Y P I R - S K R Y F R I L S K L P L N D N N G D D D G D T L L L T P F S A V K P F F L L C T S V A L S F S L F A A S P A V E S A S A F V V
Syn_hhoA I A N L P H A V A A A D D L P P A P V I T A Q A S V P ----- L - T S E S ----- F V A A A V S R S G P A V V R I D T E T V
Syn_hhoB L S S G Q N H S S P D S P V N T S P Q S L T P A P V E S N Y R S A L P L T L P R S A Q D D Q E L N F I A R A V Q K I G P A V V R I D S E R T
Syn_htrA L T N P Q W A D H L T N N S V I S P L V T N Q S I A P A N E S L A T N L Q S R L S P R E P S -- N F V V D V V E S T G P A V V R I N A Q K T
Eco_hhoA A S ----- F Q A V A S I P G Q V A D Q A P L P ----- S ----- L A P M L E K V L P A V V S V R V E G T
Eco_hhoB V A M P --- S L R S L N P L S T P Q F D S T D E T P ----- A - S ----- Y N L A V R R A A P A V V N V Y N R G L
Eco_htrA P ----- L S A T A A E T S S A T T A Q M P ----- S ----- L A P M L E K V M P S V V S I N V E G S

141                                                    210
Ara_hhoA K E K E E E L E E E E E R N V N L F Q K T S P S V V Y I E A I E L P K T S S C - - D I L T D E E N G K I E G T G S G F V W D K L - G H I V T
Ara_degP S T P K K L Q - T D E L A T V R L F Q E N T P S V V Y I T N ----- L A V R C D A F T L D V L E V P Q G S G S G F V W D K Q - G H I V T
Syn_hhoA V T R R T D F I L D D P F F Q E F F G R S F P V P P ----- R E R R I A G Q G S G F I I D N S - G I I L T
Syn_hhoB A V S Q G G P M G D Q P F F R R F E G E M P P N P ----- D P R E Q - G T G S G F I I S S D - G E V L T
Syn_htrA V K S Q V P Q A F N D P F L Q R F F G S Q M P P M P ----- N E R V Q R G T G S G F I V S N D - G K I F T
Eco_hhoA A S Q G Q --- K I P E E F K K F E G D D L P D Q P ----- A Q P F E G L G S G V I I N A S K G Y V L T
Eco_hhoB N T N S H N --- Q L E ----- I R T L G S G V I M D Q R - G Y I I I T
Eco_htrA T T V N T P - - R M P R N F Q Q F E G D D S P F C Q E G S P F Q S S P F C Q C G Q G G N G G G Q Q Q K F M A L G S G V I I D A D K G Y V V T

211                                                    280
Ara_hhoA N Y H V I A K L A T D Q F G L Q R C K V S L V D A K G T R F S K E G K I V G L D P D N D L A V L K I E T E G R E L N P V V L G T S N D L R V
Ara_degP N Y H V I R ----- G A S D L R V T L A D Q T --- T F D A K V G E F D Q D K D V A V L R I D A P K N K L R P I P V G V S A D L L V
Syn_hhoA N A H V D ----- G A S K V V T L R D G R --- T F D G Q V R G T D E V T D L A V V K I E P Q G S A L P V A P L G T S S N L Q V
Syn_hhoB N A H V E ----- G A S T V K V T L K D G S --- V L E G K V M C I D T M T D V A V V K V E A E N - - L P V V E I Q S D R L Q P
Syn_htrA N A H V D ----- G A D E V T V T L K D G R --- S F P G R V M C S D P S T D V A V V K I E A G D - - L P T V A L G D S D H L Q V
Eco_hhoA N N H V I N ----- Q A Q K I S I Q L N D G R --- E F D A K L I G S D D Q S D I A L I Q I Q N P S K - L T Q I A I A D S D K L R V
Eco_hhoB N K H V I N ----- D A D Q I I V A L Q D G R --- V F E A L L V C S D S L T D L A V L K I N A T G G - L P T I P I N A R R V P H I
Eco_htrA N N H V D ----- N A T V I K V Q L S D G R --- K F D A K M V G K D P R S D I A L I Q I Q N P K N - L T A I K M A D S D A L R V

281                                                    350
Ara_hhoA G Q S C F A I G N P Y G Y E N T L T I G V V S G L G R E I P S P N G K S I S - E A I Q T D A D I N S G N S G G P L L D S Y G H T I G V N T A
Ara_degP G Q K V F A I G N P F G L D H T L L T G V I S G L R R E I S S A A T G R P I Q D V I Q T D A A I N P G N S G G P L L D S S G T L I G I N T A
Syn_hhoA G D W A I A V G N P V G L D N I V T L C I I S T L G R S A A Q A G I P D K R V E F I Q T D A A I N P G N S G G P L L N A R G E V I G I N T A
Syn_hhoB G E W A I A T G N P L G L D N I V T V G I I S A L G R S S E V G V P D K R V R F I Q T D A A I N P G N S G G P L I N A K G E V I G V N T A
Syn_htrA G E W A I A I G N P L G L D N I V T G I L S A T G R R S A D I G V P D K R V E F I Q T D A A I N P G N S G G P L L N A D G Q V I G M N T A
Eco_hhoA G D F A V A V G N P F G L G Q T A T S G I V S A L G R S G L N L E G L E N --- F I Q T D A S I N R G N S G G A L L N L G E L I G I N T A
Eco_hhoB G D V V L A I G N P Y N L G Q T I T Q G I I S A T G R I G L N P T G R Q N --- F L Q T D A S I N H G N S G G A L V N S I G E L M G I N T L
Eco_htrA G D Y T V G I G N P F G L G E I V T S G I V S A L G R S G L N A E N Y E N --- F I Q T D A A I N R G N S G G A L V N L N G E L I G I N T A

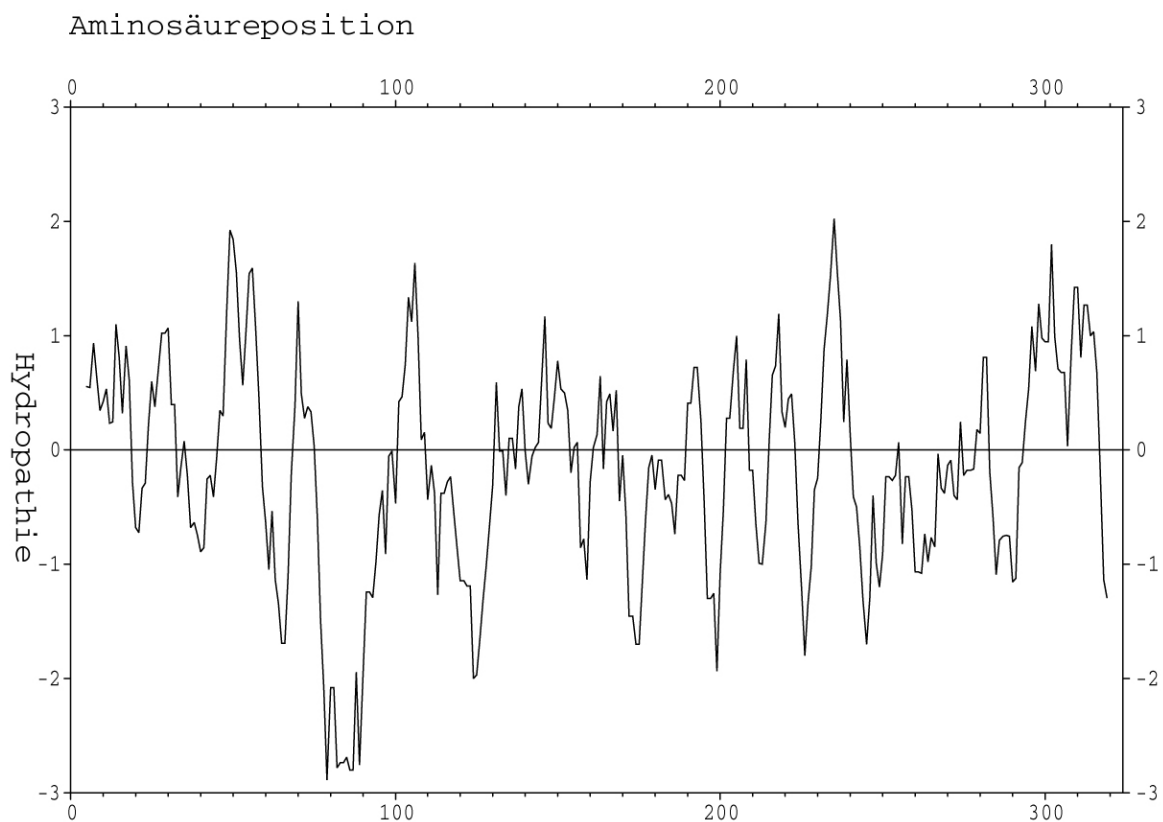
351                                                    420
Ara_hhoA T F T R K S G - M S S G V N F A I P I D T V V R T P Y L I V Y G T A Y R D R F -----
Ara_degP I Y S P S C A S --- S G V C F S I P V D T V G G T V D Q I V R F G K V T R P I L G I K --- F A P D Q S V E Q L G ----- V S
Syn_hhoA I R A D A T G --- I G F A I P I D Q A K A I Q N T L A A G G T V P H P Y I G V Q M N I T V D Q A Q Q N R N P N S F F I I P E V D
Syn_hhoB I R A D A Q G --- I G F A I P I Q T A Q N V A E N L F T K K M E H P Y L G I H M V T L T P E M T K Q L R T S G E L P A G V T A D T
Syn_htrA I I Q N A Q G --- I G F A I P I N K A Q E I A Q Q L I A T G K V E H A Y L G I Q M V T M T P E L Q S Q I R -- Q E T G M N I P V D K
Eco_hhoA I L A P G G S --- V G I G F A I P S N M A R T L A Q Q L I D F G E I K R G L L G I K G T E M S A D I A K A F N ----- L D V Q R
Eco_hhoB S F D K S N D G E T P E G I G F A I P F Q L A T K I M D K L I R D G R V I R G Y I G I G G R E T A P L H A Q G G G ----- I D Q L Q
Eco_htrA I L A P D C G N --- I G I G F A I P S N M V K N L T S Q M V E Y G Q V K R G E L G I M G T E L N S E L A K A M K ----- V D A Q R

421                                                    490
Ara_hhoA -----
Ara_degP G V L L L D A P S G P A G K A G L Q S T K R D G Y G R L I L G D I I T S V N G T K V S N G S D L Y R I L D Q C K V G D E V T V Q V L R G D
Syn_hhoA G I L V M R V L P G T P A E R A G I R R ----- G D V I V A D G T P I S D G A R L Q R I V E Q A G L N K A L K L D L L R G D
Syn_hhoB G V L I I Q V S P G S P A A Q A G L A P ----- G D I I L E V G M G V K T A T D V Q E R V E V S Q I G E P L A I A V K R G Q
Syn_htrA G V V I M Q V M P N S P A A I A K L E Q ----- G D V L Q S L Q G Q P V E N A E Q V Q S L V G K L A V G D E V E L G I L R N G
Eco_hhoA G A F V S E V L P G S G S A K A G V K A ----- G D I I T S L N G K P L N S F A E L R S R I A T T E P T K V K L G L L R N G
Eco_hhoB G I V V N E V S P D G P A A N A G I Q V ----- N D L I I S V D N K P A I S A L E T M D Q V A E I R P G S V I P V V V M R D D
Eco_htrA G A F V S Q V L P N S S A A K A G I K A ----- G D V I T S L N G K P I S S F A A L R A Q V G T M P V G S K L T L G L L R D G

```

	491	560
Ara_hhoA	-----	-----
Ara_degP	HKEKISVTLEPKPDES	-----
Syn_hhoA	RRLSLTVQTAQLRNPTS	-----
Syn_hhoB	KPQMMAVRPGPFEDLGC	-----
Syn_htrA	QQNLTVTIGALPSAPPO	-----
Eco_hhoA	KPLEVEVTLDTSTSSASAEMITPALEGATLSDGQLKDGGKGIKIDEVVKGS	PAAQAGLQKDDVIIGVNR
Eco_hhoB	KQLTLQVTIQEYPATN	-----
Eco_htrA	KQVNVNLELQOSSQNQVDSSSIFNGIEGAEMSN-KGKD	-QG VVVNNVKTCTPAAQIGLKG DVIIGANQ
	561	613
Ara_hhoA	-----	-----
Ara_degP	-----	-----
Syn_hhoA	-----	-----
Syn_hhoB	-----	-----
Syn_htrA	-----	-----
Eco_hhoA	DRVNSIAEMRKVLAAKPAIIALQIVRGNESIYLLMR	-----
Eco_hhoB	-----	-----
Eco_htrA	QAVKNIAELRKVLDSKPSVLAALNIQRGDRHLPVNAVISLNPFLKTGRGSPYNL	-----

Anhang A-1 Aminosäuresequenz von HhoA (DegP5) von *Arabidopsis thaliana* (Ara) im Vergleich mit DegP1 sowie homologen Vertretern der HtrA-Familie in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn) und *Escherichia coli* (Eco). Identische Positionen zwischen der *Arabidopsis*- und einer der anderen Sequenzen sind rot hervorgehoben, identische Positionen zwischen den anderen Sequenzen hellblau. Die Prozessierungsstelle für die stromale, prozessierende Protease ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Positionen der katalytischen Triade sind schwarz hervorgehoben. Die unterstrichenen Abschnitte kennzeichnen die Lage der beiden PDZ-Domänen in HtrA von *E. coli* (nach Sassoon *et al.*, 1999).

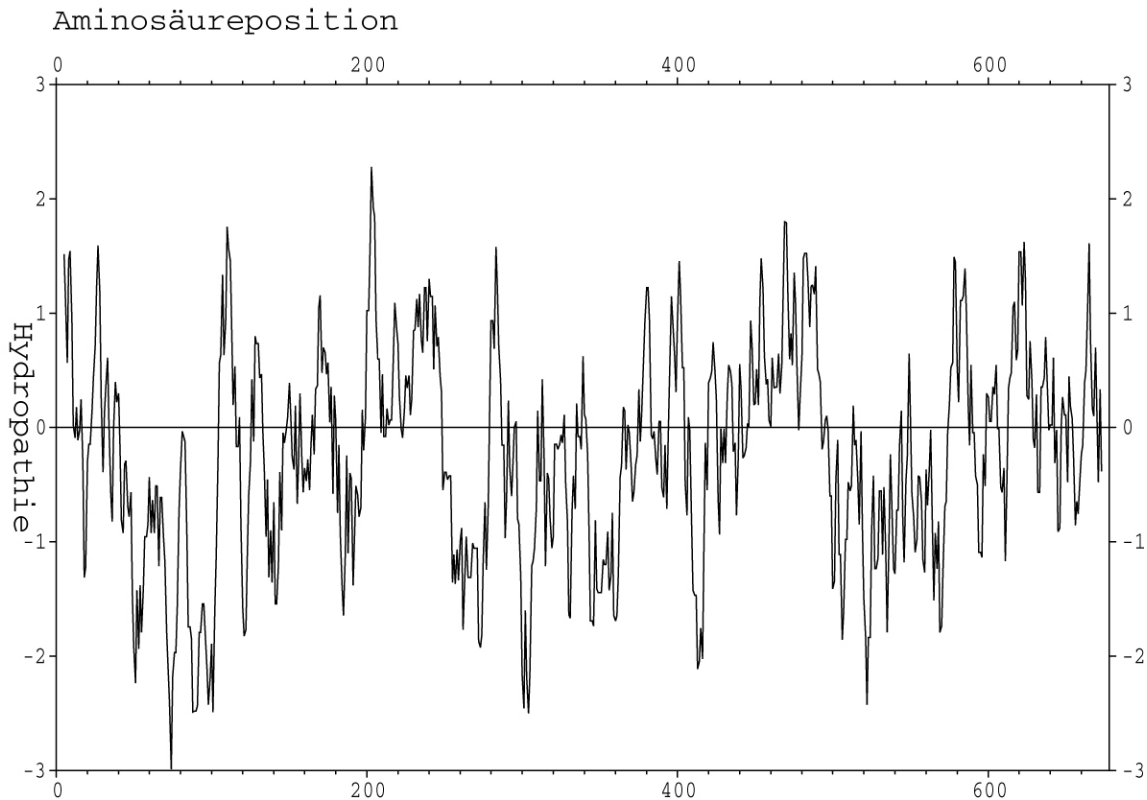


Anhang A-2 Hydropathieprofil nach Kyte und Doolittle (1982) von HhoA (DegP5) von *Arabidopsis thaliana*. Negative Werte stehen für hydrophile, positive Werte für hydrophobe Bereiche.

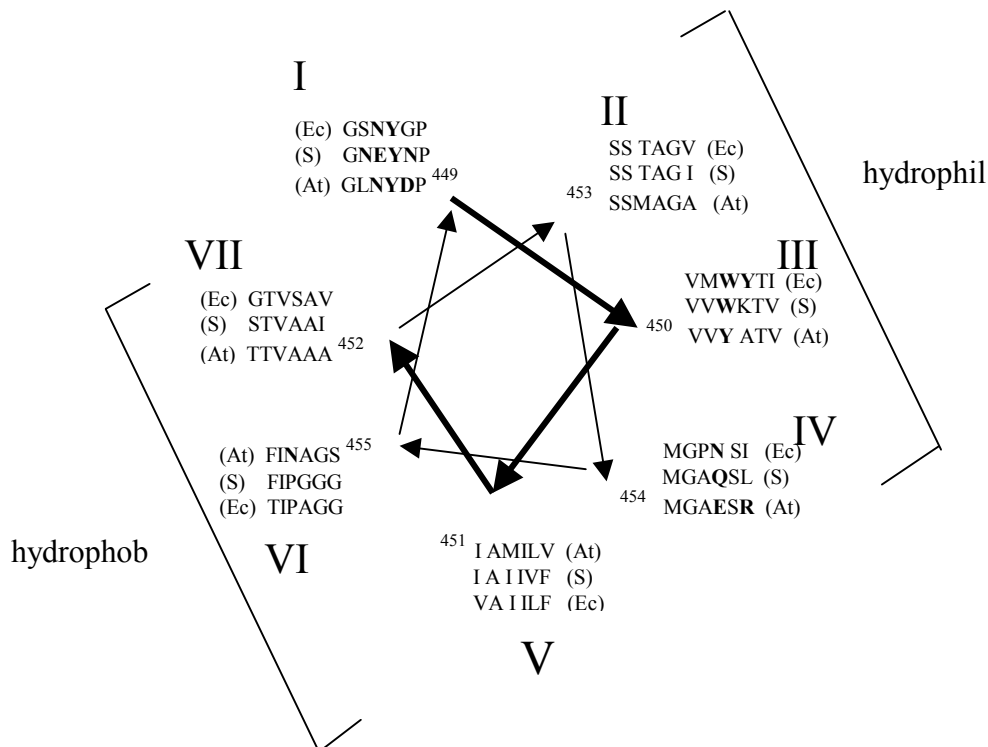
	1		*	*			
AraSppA	MAKLLLLHAPHV	IPRFSSSSSRSLVSAA	LYRRP	LLVNPQF	SHIGPRLHSPYNRRF	SARAF	DDSPASSAE
SynSppA1	MKN-----	EFQQ-----	MVASE	FGTLAAI	VVLLSLGAT	GLVLLF	FILVSAEAD-----
SynSppA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcoSppA	M----	RTLWRF	LAGE	FKWTW----	RLLN	FVREMVL	NLFFIFLVLVG-VGIWMQVSGGDS-----
	71						140
AraSppA	MEKE	QEQLLD	GVSGKK	DE	EDYPTGEMEYENR	NAWEI	FVVKFRMLFAYPWQVRKGSVL
SynSppA1	VLEEK	TALILD	LA---	IPIQ	DTSP	TLSS-----	LQQSILGNQEEIL
SynSppA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcoSppA	ETASR	GALLLD	ISGVI	VDKP	DSSQ	RFSK-----	LSRQITLGASSDRL
	141						207
AraSppA	KSRFNSGL	SLPQL	SENFV	KAA	YDPR-	IACV	YLHIDPLSCW--GKVE
SynSppA1	P-----	LRTV	VNAIE	KAA	EDDR-	I	VALLIDGRSNQVDGYANLSE
SynSppA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcoSppA	QE----	NSL	FDI	VNTI	RQAK-	DDRN	ITCIVMDLKNFAGCD-QPSMQYT
	208						277
AraSppA	GLKE	YYLGC	ACNEL	FAP	PSAYS	FLYGL	TVQASFLGGVFEK
SynSppA1	SELG	YYLA	AATAD	TLLIN	PMCG	VEING	GAQPIFFTGALAKAGI
SynSppA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcoSppA	SQGG	YYLAS	FANKI	WLS	EQGV	VDLH	CFATNGLYYKSLLDKLVSTH
	278						336
AraSppA	EML	SVLTD	NITYS	NW	DG	VSDAT--	GKKRE
SynSppA1	QQQL	LLNQ	IWQI	YLT	S	VANNR	SLTVPOLQAIA-SDQGLLF-----
SynSppA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcoSppA	EAD	SRWIG	ELWQ	NY	NT	V	AANR--QIPAEQVFP-GAQCLE
	337						395
AraSppA	TM	LKERL	GV	E-----	KDK	LPTVD	YK
SynSppA1	AE	LKQA-	GV	WIND	PEKIE	EQE	EDK
SynSppA2	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
EcoSppA	KAL	TKEF	C-WS	KT-----	DKN	YRAIS	YDY
	396						464
AraSppA	GS	ATIA	EQLIE	KIR	S	VRES	KKY
SynSppA1	WEN	IG	DRY	EL	LR	TIR	QDDDI
SynSppA2	RKAV	----	LK	LKT	VEE-	KKY	P
EcoSppA	QGN	V	GD	T	TAA	Q	IR
	465						534
AraSppA	MAMA	AN	A	IVA	ENL	TLT	G
SynSppA1	IAT	A	G	E	K	IVA	Q
SynSppA2	IAM	G	CP	H	I	M	AN
EcoSppA	I	ST	P	AN	Y	I	V
	535						604
AraSppA	QHAY	Q	L	ER	D	K	A
SynSppA1	DQV	Y	E	I	H	L	D
SynSppA2	DDS	Y	G	F	V	S	T
EcoSppA	ENG	Y	K	R	E	I	T
	605						673
AraSppA	ELS	R	P	S	T	S	L
SynSppA1	EYPT	P	R	G	L	N	S
SynSppA2	TIED	P	K	L	V	R	L
EcoSppA	YV	D	E	P	T	F	F
	677						
AraSppA	SSL	R					
SynSppA1	LNP	-					
SynSppA2	----						
EcoSppA	ANM	R					

Anhang A-3 Aminosäuresequenz von SppA von *Arabidopsis thaliana* (Ara) im Vergleich mit den Homologen in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn) und *Escherichia coli* (Eco). Identische Positionen zwischen der *Arabidopsis*- und einer der anderen Sequenzen sind rot hervorgehoben, identische Positionen zwischen den anderen Sequenzen hellblau. Die beiden hypothetischen Prozessierungsstellen für die stromale prozessierende Protease sind durch Sterne gekennzeichnet. Die als Bestandteil der

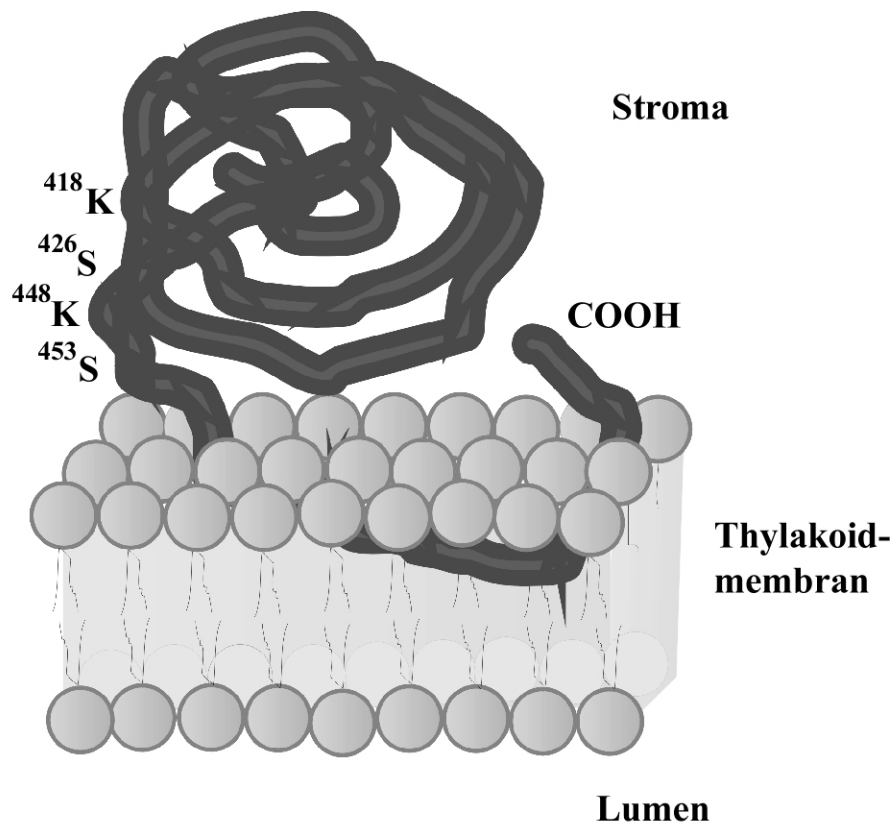
katalytischen Domäne in Frage kommenden Serinreste sind schwarz hervorgehoben. Die unterstrichenen Abschnitte kennzeichnen die Lage der putativen Transmembranabschnitte des *E. coli*-Proteins.



Anhang A-4 Hydropathieprofil nach Kyte und Doolittle (1982) von SppA von *Arabidopsis thaliana*. Negative Werte stehen für hydrophile, positive Werte für hydrophobe Bereiche.



Anhang A-5. Helicale Projektion des zwischen den Positionen 454 und 492 gelegenen hydrophoben Abschnittes von SppA von *Arabidopsis thaliana* (At) und der homologen Proteine von *Synechocystis* sp. PCC 6803 (S) und *E. coli* (Ec). Die Aminosäurepositionen mit der geringsten Hydrophobizität sind fettgedruckt, die Ziffern I – VII kennzeichnen die Oberflächensegmente der Helix.



Anhang A-6. Potentielle topologische Interaktion von SppA in monomerer Form mit der Thylakoidmembran. Die Buchstaben K (für Lysin) und S (für Serin) kennzeichnen die Position der hypothetischen katalytischen Domäne.

7. Literaturverzeichnis

- Adam, Z.:** Protein stability and degradation in chloroplasts. MiniReview, *Plant Mol Biol* **32**, 773 – 783 (1996)
- Adam, Z.:** Chloroplast proteases: Possible regulators of gene expression? *Biochimie* **82**, 647 – 654 (2000)
- Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haußühl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermeil, S. R., Shinozaki, K., Clarke, A., K.:** Chloroplast and Mitochondrial Proteases in *Arabidopsis*. A Proposed Nomenclature. *Plant Physiol* **125**, 1912 – 1918 (2001)
- Adamska, I., Kloppstech, K.:** Evidence for an association of the early light-inducible protein (ELIP) of pea with photosystem II. *Plant Mol Biol* **16**, 209 – 223 (1991)
- Adamska, I., Ohad, I., Kloppstech, K.:** Synthesis of the early-light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 2610 – 2613 (1992a)
- Adamska, I., Kloppstech, K., Ohad, I.:** UV Stress Induces the Synthesis of the Early Light-inducible Protein and Prevents Its Degradation. *J Biol Chem* **267**(34), 24732 – 24737 (1992b)
- Adamska, I., Kloppstech, K., Ohad, I.:** Early Light-inducible Protein in Pea Is Stable during Light Stress but Is Degraded during Recovery at Low Light Intensity. *J Biol Chem* **268**(8), 5438 – 5444 (1993)
- Adamska, I., Lindahl, M., Roobol-Bóza, M., Andersson, B.:** Degradation of the light-stress protein is mediated by an ATP-independent, serine-type protease under low-light conditions. *Eur J Biochem* **236**, 591 – 599 (1996)
- Adamska, I., Roobol-Bóza, M., Lindahl, M., Andersson, B.:** Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem* **260**, 453 – 460 (1999)
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., W., Lipman, D. J.:** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403 – 410 (1990)
- An, G., Ebert, P. R., Mitra, A., Ha, S. B.:** Binary Vectors. In: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A. (eds.) *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **A3**: 1 – 19 (1988)
- Anastassiou, R., Argyroudi-Akoyunoglou, J. H.:** Thylakoid-bound proteolytic activity against LHC II apoprotein in bean. *Photosynthesis Research* **43**, 241 – 250 (1995)
- Anbudurai, P. R., Mor, T. S., Ohad, I., Shestakov, S. V., Pakrasi, H. B.:** The *ctpA* gene encodes the C-terminal processing protease for the D1 protein of the photosystem II reaction center complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8082 – 8086 (1994)

- Anderson, J. M.:** Photoregulation of the Composition, Function, and Structure of Thylakoid Membranes. *Annu Rev Plant Physiol* **37**, 93 – 136 (1986)
- Andersson, B., Adamska, I., Kloppstech, K., Lindahl, M., Ohad, I.:** Proteolytic activities associated with the photosynthetic membrane. In: Moller, I. M., Brodelius, P. (eds.): *Plant Membrane Biology*. Scientific Publications, Oxford; 107 – 126 (1996)
- Arnon, D. I.:** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**, 1 – 14 (1949)
- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B.:** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**, 113 – 134 (1993)
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K.:** *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York (1993)
- Barbato, R., Frizzo, A., Friso, G., Rigoni, F., Giacometti, G. M.:** Degradation of the D1 protein of photosystem-II reaction centre by ultraviolet-B radiation requires the presence of functional manganese on the donor side. *Eur J Biochem* **227**, 723 – 729 (1995)
- Barber, J., Andersson, B.:** Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* **17**, 61 – 66 (1992)
- Barbrook, A., C., Packer, J. C. L., Howe, C. J.:** Inhibition by penem of processing peptidases from cyanobacteria and chloroplast thylakoids. *FEBS Lett* **398**, 198 – 200 (1996)
- Bass, S., Gu, Q., Christen, A.:** Multicopy Suppressors of Prc Mutant *Escherichia coli* include Two HtrA (DegP) Protease Homologs (HhoAB), DksA, and a Truncated RlpA. *J Bacteriol* **178**, 1154 – 1161 (1996)
- Bassham, D. C., Creighton, A. M., Karnauchov, I., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., Robinson, C.:** Mutations at the Stromal Processing Peptidase Cleavage Site of a Thylakoid Lumen Protein Precursor Affect the Rate of Processing but Not the Fidelity. *J Biol Chem* **269**(23), 16062 – 16066 (1994)
- Bechthold, N., Ellis, J., Pelletier, G.:** *In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Compt Rend Acad Life Sci* **316**, 1194 – 1199 (1993)
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J., Masterson, R.:** New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* **20**, 1195 – 1197 (1992)
- Beynon, R. J., Salvesen, G.:** Commercially available protease inhibitors. Appendix III in: Beynon, R. J., Bond, J. S. (eds.): *Proteolytic enzymes – a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press; Oxford, New York, Tokio; 57 – 81 (1989)
- Birnboim, H. C., Doly, J.:** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513 – 1524 (1979)
- Bourque, J. E.:** Antisense strategies for genetic manipulation in plants. Review, *Plant Sci* **105**, 125 – 149 (1995)

- Bracht, E., Trebst, A.:** Hypothesis on the Control of D1 Protein Turnover by Nuclear Coded Proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z Naturforsch* **49c**, 439 – 446 (1994)
- Bradford, M. M.:** 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 (1976)
- Brown, J. W. S.:** A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucleic Acids Res* **14**(24), 9549 – 9559 (1986)
- Bushnell, T. P., Bushnell, D., Jagendorf, A. T.:** A Purified Zinc Protease of Pea Chloroplasts, EP1, Degrades the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *Plant Physiol* **103**, 585 – 591 (1993)
- Callis, J.:** Regulation of Protein Degradation. *Plant Cell* **7**, 845 – 857 (1995)
- Campbell, D., Eriksson, M.-J., Öquist, G., Gustafsson, P., Clarke, A. K.:** The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 363 – 369 (1998)
- Casano, L. M., Gómez, L. D., Trippi, V. S.:** Oxygen- and Light-Induced Proteolysis in Isolated Oat Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **31**(3), 377 – 382 (1990)
- Chaal, B. K., Mould, R. M., Barbrook, A. C., Gray, J. C., Howe, C. J.:** Characterization of a cDNA Encoding the Thylakoidal Processing Peptidase from *Arabidopsis thaliana*. Communication, *J Biol Chem* **273**(2), 689 – 692 (1998)
- Chen, L., Tai, P. C.:** Effects of inhibitors of membrane signal peptide peptidase on protein translocation into membrane vesicles. *Arch Microbiol* **153**, 90 – 94 (1989)
- Dalling, M. J., Nettleton, A. M.:** Chloroplast senescence and proteolytic enzymes. In: Plant Proteolytic Enzymes. CRC Press, New York (1986)
- Dannehl, H., Herbig, A., Godde, D.:** Stress-induced degradation of the photosynthetic apparatus is accompanied by changes in thylakoid protein turnover and phosphorylation. *Physiologia Plantarum* **93**, 179 – 186 (1995)
- Delseny, M., Cooke, R., Raynal, M., Grellet, F.:** The *Arabidopsis thaliana* cDNA sequencing project. Minireview, *FEBS Lett* **403**, 221 – 224 (1997)
- Devereux, J., Haerberli, P., Smithies, O.:** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**(1 Pt 1), 387 – 395 (1984)
- Doyle, J., J., Doyle, J., L.:** Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* **12**(1), 13 – 15 (1990)
- Dunn, B. M.:** Determination of protease mechanism. In: Beynon, R. J., Bond, J. S. (eds.): Proteolytic enzymes – a practical approach. IRL Press at Oxford University Press; Oxford, New York, Tokio; 57 – 81 (1989)
- Eichacker, L. A., Müller, B., Helfrich, M.:** Stabilization of the chlorophyll binding apoproteins, P700, CP47, CP43, D2, and D1, by synthesis of Zn-pheophytin *a* in intact etioplasts from barley. *FEBS Lett* **395**, 251 – 256 (1996)

- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G.:** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**(5), 978 – 984 (1999)
- Fulda, S., Huang, F., Nilsson, F., Hagemann, M., Norling, B.:** Proteomics of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 – Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. *Eur J Biochem* **267**, 5900 – 5907 (2000)
- Giacometti, G. M., Barbato, R., Chiaramonte, S., Friso, G., Rigoni, F.:** Effects of ultraviolet-B radiation on photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **242**, 799 – 806 (1996)
- Gish, W., States, D. J.:** Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266 – 272 (1993)
- Gottesman, S., Maurizi, M. R.:** Regulation by Proteolysis: Energy-Dependent Proteases and Their Targets. *Microbiol Rev* **56**(4), 592 – 621 (1992)
- Haehnel, W., Jansen, T., Gause, K., Klösgen, R. B., Stahl, B., Michl, D., Huvermann, B., Karas, M., Herrmann, R. G.:** Electron transfer from plastocyanin to photosystem I. *EMBO J* **13**, 1028 – 1038 (1994)
- Hageman, J., Robinson, C., Smeekens, S., Weisbeek, P.:** A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin. *Nature* **324**, 567 – 569 (1986)
- Hagman, Å, Shi, L.-X., Rintamäki, E., Andersson, B., Schröder, W. P.:** The Nuclear-Encoded PsbW Protein Subunit of Photosystem II Undergoes Light-Induced Proteolysis. *Biochemistry* **36**, 12666 – 12671 (1997)
- Hanahan, D.:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557 – 580, (1983)
- Harlow, E., Lane, D.:** Antibodies – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1988)
- Haußühl, K., Andersson, B., Adamska, I.:** A chloroplast DegP protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J* **20**(4), 713 – 722 (2001)
- Heddad, M., Adamska, I.:** Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll *a/b*-binding gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(7), 3741 – 3746 (2000)
- Hershko, A., Ciechanover, A.:** The Ubiquitin System. *Annu Rev Biochem* **67**, 425 – 479 (1998)
- Herrmann, R. G.:** Photosynthesis research: aspects and perspectives. In: Andersson, B., Salter, H. A., Barber, J. (eds.): *Frontiers of Molecular Biology: Molecular Genetics in Photosynthesis*. IRL Press; Oxford, 1 – 44 (1996)

- Herrmann, R. G.:** Eukaryotism, towards a new interpretation. In: Schenk, H. E. A., Herrmann, R. G., Jeon, K. W., Müller, N. E., Schwemmler, W. (eds.): Eukaryotism and Symbiosis. Springer Verlag; Heidelberg, New York, 73 – 118 (1997)
- Herrmann, R. G., Westhoff, P.:** Thylakoid biogenesis and dynamics: the result of a complex phylogenetic puzzle. In: Aro, E.-M., Andersson, B. (eds.): Regulation of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1 – 28 (2001)
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., Schillerport, R. A.:** A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179 – 180 (1983)
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., Van Montagu, M., Schell, J.:** Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* **163**, 181 – 187 (1978)
- Ichihara, S., Beppu, N., Mizushima, S.:** Protease IV, a Cytoplasmic Membrane Protein of *Escherichia coli*, Has Signal Peptide Peptidase Activity. *J Biol Chem* **259**, 9853 – 9857 (1984)
- Ichihara, S., Suzuki, T., Suzuki, M., Mizushima, S.:** Molecular Cloning and Sequencing of the *sppA* Gene and Characterization of the Encoded Protease IV, a Signal Peptide Peptidase, of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **261**, 9405 – 9411 (1986)
- Itzhaki, H., Naveh, L., Lindahl, M., Cook, M., Adam, Z.:** Identification and Characterization of DegP, a Serine Protease Associated with the Luminal Side of the Thylakoid Membrane. *J Biol Chem* **273**(12), 7094 – 7098 (1998)
- Karnauchov, I., Herrmann, R. G., Pakrasi, H. B., Klösgen, R. B.:** Transport of CtpA protein from the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 across the thylakoid membrane in chloroplasts. *Eur J Biochem* **249**, 497 – 504 (1997a)
- Karnauchov, I., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B.:** Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b₆f* complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett* **408**, 206 – 210 (1997b)
- Kieselbach, T., Hagman, Å, Andersson, B., Schröder, W. P.:** The Thylakoid Lumen of Chloroplasts. Isolation and Characterization. *J Biol Chem* **273**(12), 6710 – 6716 (1998)
- Kihara, A., Akiyama, Y., Ito, K.:** FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4532 – 4536 (1995)
- Kirwin, P. M., Elderfield, P. D., Robinson, C.:** Transport of Proteins into Chloroplasts. Partial Purification of a Thylakoidal Processing Peptidase Involved in Plastocyanin Biogenesis. *J Biol Chem* **262**(34), 16386 – 16390 (1987)
- Kirwin, P. M., Elderfield, P. D., Williams, R. S., Robinson, C.:** Transport of Proteins into Chloroplasts. Organization, Orientation, and Lateral Distribution of the Plastocyanin Processing Peptidase in the Thylakoid Network. *J Biol Chem* **263**(34), 18128 – 18132 (1988)

- Kyle, D. J., Kuang, T.-Y., Watson, J. L., Arntzen, C. J.:** Movement of a sub-population of the light-harvesting complex (LHC_{II}) from grana to stroma lamellae as a consequence of its phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **765**, 89 – 96 (1984)
- Kyte, J., Doolittle, R. F.:** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105 – 132 (1982)
- Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 660 – 685 (1979)
- Lee, J. H., Hübel, A., Schöffl, F.:** Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant J* **8**, 603 – 612 (1995)
- Lensch, M., Herrmann, R. G., Sokolenko, A.:** Identification and Characterization of SppA, a Novel Light-inducible Chloroplast Protease Complex Associated with Thylakoid Membranes. *J Biol Chem* **276**(36), 33645 – 33651 (2001)
- Li, H. H., Merchant, S.:** Degradation of plastocyanin in copper-deficient *C. reinhardtii*: evidence for a protease-susceptible conformation of the apoprotein and a regulated proteolysis. *J Biol Chem* **270**, 23504 – 23510 (1995)
- Lindahl, M., Yang, D.-H., Andersson, B.:** Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem* **231**, 503 – 509 (1995)
- Lindahl, M., Tabak, S., Cseke, L., Pichersky, E., Andersson, B., Adam, Z.:** Identification, Characterization, and Molecular Cloning of a Homologue of the Bacterial FtsH Protease in Chloroplasts of Higher Plants. *J Biol Chem* **271**(46), 29329 – 29334 (1996)
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A. B., Adam, Z., Andersson, B.:** The Thylakoid FtsH Protease Plays a Role in the Light-Induced Turnover of the Photosystem II D1 Protein. *Plant Cell* **12**, 419 – 431 (2000)
- Lipinska, B., Sharma, S., Georgopoulos, C.:** Sequence analysis and regulation of the *htrA* Gene of *Escherichia coli*: a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* **16**(21), 10053 – 10067 (1988)
- Lipinska, B., Fayet, O., Baird, L., Georgopoulos, C.:** Identification, Characterization, and Mapping of the *Escherichia coli htrA* Gene, Whose Product Is Essential for Bacterial Growth Only at Elevated Temperatures. *J Bacteriol* **171**(3), 1574 – 1584 (1989)
- Lipinska, B., Zylicz, M., Georgopoulos, C.:** The HtrA (DegP) Protein, Essential for *Escherichia coli* Survival at High Temperatures, Is an Endopeptidase. *J Bacteriol* **172**(4), 1791 – 1797 (1990)
- Liu, X.-Q., Jagendorf, A. T.:** ATP-dependent Proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS Lett* **166**(2), 248 – 252 (1984)
- Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L., Randall, R. J.:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265 – 275 (1951)

- Lütcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F., Scheele, G. A.:** Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J* **6**, 43 – 48 (1987)
- Majeran, W., Wollman, F.-A., Vallon, O.:** Evidence for a Role of ClpP in the Degradation of the Chloroplast Cytochrome *b₆f* Complex. *Plant Cell* **12**, 137 – 149 (2000)
- Majeran, W., Olive, J., Drapier, D., Vallon, O., Wollman, F.-A.:** The light sensitivity of ATP synthase mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **126**(1), 421 – 433 (2001)
- Malek, L., Bogorad, L., Ayers, A. R., Goldberg, A. L.:** Newly synthesized proteins are degraded by an ATP-stimulated proteolytic process in isolated pea chloroplasts. *FEBS Lett* **166**(2), 253 – 257 (1984)
- Mann, N. H., Novac, N., Mullineaux, C. W., Newman, J., Bailey, S., Robinson, C.:** Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett* **479**(1-2), 72 – 77 (2000)
- Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I., Nagy, F.:** UV-B-induced Differential Transcription of *psbA* Genes Encoding the D1 Protein of Photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *J Biol Chem* **273**(28), 17439 – 17444 (1998)
- Mattoo, A. K., Hoffman-Falk, H., Marder, J. B., Edelman, M.:** Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1380 – 1384 (1984)
- Maurizi, M., R.:** Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. Review, *Experientia* **48**, 178 – 201 (1992)
- Miyao, M.:** Involvement of active oxygen species in degradation of the D1 protein under strong illumination in isolated subcomplexes of photosystem II. *Biochemistry* **33**, 9722 – 9730 (1994)
- Mozo, T., Fischer, S., Shizuya, H., Altmann, T.:** Construction and characterization of the IGF *Arabidopsis* BAC library. *Mol Gen Genet* **258**, 562 – 570 (1998a)
- Mozo, T., Fischer, S., Meier-Ewert, S., Lehrach, H., Altmann, T.:** Use of IGF BAC library for physical mapping of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant J* **16**, 377 – 384 (1998b)
- Mozo, T., Dewar, K., Dunn, P., Ecker, J. E., Fischer, S., Kloska, S., Lehrach, H., Marra, M., Martienssen, R., Meier-Ewert, S., Altmann, T.:** A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat Genet* **22**, 271 – 275 (1999)
- Murashige, T., Skoog, F.:** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologica Plantarum* **15**, 473 – 497 (1962)
- Musgrove, J. E., Elderfield, P. D., Robinson, C.:** Endopeptidases in the Stroma and Thylakoids of Pea Chloroplasts. *Plant Physiol* **90**, 1616 – 1621 (1989)
- Nakabayashi, K., Ito, M., Kiyosue, T., Shinozaki, K., Watanabe, A.:** Identification of *clp* Genes Expressed in Senescing *Arabidopsis* Leaves. *Plant Cell Physiol* **40**(5), 504 – 514 (1999)

- Novak, P., Dev, I. K.:** Degradation of a Signal Peptide by Protease IV and Oligopeptidase A. *J Bacteriol* **170**, 5067 – 5075 (1988)
- O'Farrell, P. H.:** High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J Biol Chem* **250**, 4007 – 4021 (1975)
- Oblong, J. E., Lamppa, G. K.:** Identification of two structurally related proteins involved in proteolytic processing of precursors targeted to the chloroplast. *EMBO J* **11**(12), 4401 – 4409 (1992)
- Oelmüller, R., Herrmann, R. G., Pakrasi, H. B.:** Molecular Studies of CtpA, the Carboxy-terminal Processing Protease for the D1 Protein of the Photosystem II Reaction Center in Higher Plants. *J Biol Chem* **271**(36), 21848 – 21852 (1996)
- Ostersetzer, O., Tabak, S., Yarden, O., Shapira, R., Adam, Z.:** Immunological detection of proteins similar to bacterial proteases in higher plant chloroplasts. *Eur J Biochem* **236**, 932 – 936 (1996)
- Ostersetzer, O., Adam, Z.:** Effects of light and temperature on expression of ClpC, the regulatory subunit of chloroplastic Clp protease, in pea seedlings. Short communication, *Plant Mol Biol* **31**, 673 – 676 (1996)
- Ostersetzer, O., Adam, Z.:** Light-Stimulated Degradation of an Unassembled Rieske FeS Protein by a Thylakoid-Bound Protease: The Possible Role of the FtsH Protease. *Plant Cell* **9**, 957 – 965 (1997)
- Osteryoung, K. W., Sundberg, H., Vierling, E.:** Poly(A) tail length of a heat shock protein is increased by severe heat stress, but intron splicing is unaffected. *Mol Gen Genet* **239**, 323 – 333 (1993)
- Otto, S., Feierabend, J.:** Assay and Comparative Characterization of the Proteolytic Degradation of Isolated Small Subunit and Holoenzyme of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Chloroplasts from Rye Leaves. *J Plant Physiol* **144**, 26 – 33 (1994)
- Pacaud, M.:** Purification and Characterization of Two Novel Proteolytic Enzymes in Membranes of *Escherichia coli* – Protease IV and Protease V. *J Biol Chem* **257**, 4333 – 4339 (1982)
- Pallen, M. J., Wren, B. W.:** The HtrA family of serine proteases – MicroReview. *Mol Microbiol* **26**(2), 209 – 221 (1997)
- Peltier, J.-B., Friso, G., Kalume, D., E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I., van Wijk, K. J.:** Proteomics of the Chloroplast: Systematic Identification and Targeting Analysis of Lumenal and Peripheral Thylakoid Proteins. *Plant Cell* **12**, 319 – 341 (2000)
- Picot, D., Garavito, R. M.:** Prostaglandin H Synthetase: implications for membrane structure. *FEBS Lett* **346**, 21 – 25 (1994)
- Ponting, C. P.:** Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci* **6**(2), 464 – 468 (1997)

- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K., E., Blake, D., J.:** PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *Bioessays* **19**(6), 469 – 479 (1997)
- Prändl, R., Kloske, E., Schöffl, F.:** Developmental regulation and tissue-specific differences of heat shock gene expression in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Mol Biol* **28**, 73 – 82 (1995)
- Pratt, J. M.:** Proteases as topological probes for membrane proteins. In: Beynon, R. J., Bond, J. S. (eds.): *Proteolytic enzymes – a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press; Oxford, New York, Tokio; 181 – 191 (1989)
- Race, H. L., Herrmann, R. G., Martin, W.:** Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics* **15**(9), 364 – 370 (1999)
- Régnier, P.:** Identification of Protease IV of *E. coli*: An Outer Membrane bound Enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **99**, 844 – 854 (1981a)
- Régnier, P.:** The Purification of Protease IV of *E. coli* and the Demonstration that it is an Endoproteolytic Enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **99**, 1369 – 1376 (1981b)
- Reindl, A., Schöffl, F.:** Interaction between the *Arabidopsis thaliana* heat shock transcription factor HSF1 and the TATA binding protein TBP. *FEBS Lett* **436**, 318 – 322 (1998)
- Richter, S., Lamppa, G. K.:** A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 7463 – 7468 (1998)
- Richter, S., Lamppa, G. K.:** Stromal Processing Peptidase Binds Transit Peptides and Initiates Their ATP-dependent Turnover in Chloroplasts. *J Cell Biol* **147**(1), 33 – 43 (1999)
- Rickwood, D.:** Two-dimensional separations of proteins on the basis of their isoelectric points and mobility in SDS – polyacrylamide gels. In: Hames, B. D., Rickwood, D. (eds.): *Gel electrophoresis of proteins – a practical approach* (2nd ed.). IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio, 228 – 250 (1990)
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., Stanier, R. Y.:** Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**, 1 – 61 (1979)
- Robinson, C., Ellis, R. J.:** Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a chloroplast protease involved in the processing of imported precursor polypeptides. *Eur J Biochem* **142**, 337 – 342 (1984)
- Salter, A. H., Virgin, I., Hagman, Å, Andersson, B.:** On the Molecular Mechanism of Light-Induced D1 Protein Degradation in Photosystem II Core Particles. *Biochemistry* **31**, 3990 – 3998 (1992)
- Salvesen, G., Nagase, H.:** Inhibition of proteolytic enzymes. In: Beynon, R. J., Bond, J. S. (eds.): *Proteolytic enzymes – a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press; Oxford, New York, Tokio; 83 – 104 (1989)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.:** *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)

- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A., R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463 – 5467 (1977)
- Sarath, G., De La Motte, R. S., Wagner, F. W.:** Protease assay methods. In: Beynon, R. J., Bond, J. S. (eds.): *Proteolytic enzymes – a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press; Oxford, New York, Tokio; 25 – 55 (1989)
- Sassoon, N., Arié, J.-P., Betton, J.-M.:** PDZ domains determine the native oligomeric structure of the DegP (HtrA) protease. *Mol Microbiol* **33**(3), 583 – 589 (1999)
- Schoepfer, R.:** The pRSET family of T7 promoter expression vectors for *Escherichia coli*. *Gene* **124**(1), 83-85 (1993)
- Shestakov, S. V., Anbudurai, P. R., Stanbekova, G. E., Gadzhiev, A., Lind, L. K., Pakrasi, H. B.:** Molecular Cloning and Characterization of the *ctpA* Gene Encoding a Carboxy-terminal Processing Protease. Analysis of a Spontaneous Photosystem II-Deficient Mutant Strain of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* **269**(30), 19354 – 19359 (1994)
- Shipton, C. A., Barber, J.:** Photoinduced degradation of the D1 polypeptide in isolated reaction centers of photosystem II: Evidence for an autoproteolytic process triggered by the oxidizing side of the photosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6691 – 6695 (1991)
- Singh, A. K., Singhal, G. S.:** Specific degradation of D1 protein during exposure of thylakoid membranes to high temperature in the dark. *Photosynthetica* **36**(3), 433 – 440 (1999)
- Skórko-Glonek, J., Lipinska, B., Krzewski, K., Zolse, G., Bertoli, E., Tanfani, F.:** HtrA Heat Shock Protease Interacts with Phospholipid Membranes and Undergoes Conformational Changes. *J Biol Chem* **272**(14), 8974 – 8982 (1997)
- Skórko-Glonek, J., Zurawa, D., Kuczvara, E., Wozniak, M., Wypych, Z., Lipinska, B.:** The *Escherichia coli* heat shock protease HtrA participates in defense against oxidative stress. *Mol Gen Genet* **262**, 342 – 350 (1999)
- Sokolenko, A., Altschmied, L., Herrmann, R. G.:** Sodium Dodecyl Sulfate-Stable Proteases in Chloroplasts. Rapid Communication, *Plant Physiol* **115**, 827 – 832 (1997)
- Sokolenko, A., Lerbs-Mache, S., Altschmied, L., Herrmann, R., G.:** Clp protease complexes and their diversity in chloroplasts. *Planta* **207**, 286 – 295 (1998)
- Spetea, C., Hundal, T., Lohmann, F., Andersson, B.:** GTP bound to chloroplast thylakoid membranes is required for light-induced, multienzyme degradation of the photosystem II D1 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 6547 – 6552 (1999)
- Spetea, C., Keren, N., Hundal, T., Doan, J.-M., Ohad, I., Andersson, B.:** GTP Enhances the Degradation of the Photosystem II D1 Protein Irrespective of Its Conformational Heterogeneity at the Q_B Site. *J Biol Chem* **275**(10), 7205 – 7211 (2000)
- Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M.:** A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell* **97**, 339 – 347 (1999)

- Stadtman, E. R.:** Covalent Modifications Are Marking Steps in Protein Turnover. *Biochemistry* **29**, 6323 – 6331 (1990)
- Strauch, K. L., Johnson, K., Beckwith, J.:** Characterization of *degP*, a Gene Required for Proteolysis in the Cell Envelope and Essential for Growth of *Escherichia coli* at High Temperature. *J Bacteriol* **171**(5), 2689 – 2696 (1989)
- Suzuki, T., Itoh, A., Ichihara, S., Mizushima, S.:** Characterization of the *sppA* Gene Coding for Protease IV, a Signal Peptide Peptidase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 2523 – 2528 (1987)
- Suzuki, T. C., Krawitz, D. C., Vierling, E.:** The Chloroplast Small Heat-Shock Protein Oligomer Is Not Phosphorylated and Does Not Dissociate during Heat Stress in Vivo. *Plant Physiol* **116**, 1151 – 1161 (1998)
- Tziveleka, L-A., Argyroudi-Akoyunoglou, J. H.:** Implications of a Developmental-Stage-Dependent Thylakoid-Bound Protease in the Stabilization of the Light-Harvesting Pigment-Protein Complex Serving Photosystem II during Thylakoid Biogenesis in Red Kidney Bean. *Plant Physiol* **117**, 961 – 970 (1998)
- van Wijk, K. J., Roobol-Bóza, M., Kettunen, R., Andersson, B., Aro, E.-M.:** Synthesis and Assembly of the D1 Protein into Photosystem II: Processing of the C-Terminus and Identification of the Initial Assembly Partners and Complexes during Photosystem II Repair. *Biochemistry* **36**, 6178 – 6186 (1997)
- van 't Hof, R., de Kruijff, R.:** Characterization of the Import Process of a Transit Peptide into Chloroplasts. *J Biol Chem* **270**(38), 22368 – 22373 (1995)
- Vass, I., Kirilovsky, D., Perewoska, I., Máté, Z., Nagy, F., Etienne, A.-L.:** UV-B radiation induced exchange of the D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **267**, 2640 – 2648 (2000)
- Vierstra, R. D.:** Protein Degradation in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**, 385 – 410 (1993)
- Walkerpeach, C. R., Velten, J.:** *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: Gelvin, S. B., Schilperoort, R. A. (eds.) *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **B1**: 1 – 19 (1994)
- Waller, P. R. H., Sauer, R. T.:** Characterization of *degQ* and *degS*, *Escherichia coli* Genes Encoding Homologs of the DegP Protease. *J Bacteriol* **178**, 1146 – 1153 (1996)
- Wang, C.-C., Tsou, C.-L.:** Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Lett* **425**, 382 – 384 (1998)
- Westermeier, R.:** Blotting von Biomolekülen, SD RE-071, Version 12/89, Pharmacia LKB GmbH, Biotechnologie, Freiburg im Breisgau (1989)
- Wink, M.:** The Plant Vacuole: A Multifunctional Compartment. *J Exp Bot* **44**, 231 – 246 (1993)

- Yamamoto, Y.:** Quality Control of Photosystem II. Mini Review, *Plant Cell Physiol* **42**(2), 121 – 128 (2001)
- Yang, D.-H., Webster, J., Adam, Z., Lindahl, M., Andersson, B.:** Induction of Acclimative Proteolysis of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein of Photosystem II in Response to Elevated Light Intensities. *Plant Physiol* **118**, 827 – 834 (1998)
- Yang, D.-H., Paulsen, H., Andersson, B.:** The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *FEBS Lett* **466**, 385 – 388 (2000)
- Young, R. A., Davis, R. W.:** Efficient isolation of genes using antibody probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 1194, (1983)
- Zer, H., Vink, M., Keren, N., Dilly-Hartwig, H. G., Paulsen, H., Herrmann, R. G., Andersson, B., Ohad, I.:** Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8277 – 8282 (1999)

8. Publikation

Lensch, M., Herrmann, R. G., Sokolenko, A.: Identification and Characterization of SppA, a Novel Light-inducible Chloroplast Protease Complex Associated with Thylakoid Membranes. *J Biol Chem* **276**(36), 33645 – 33651 (2001)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Herrmann erstellt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Aufgabenstellung, das Bereitstellen von Arbeitsplatz und Sachmitteln, wissenschaftliche Anleitung und das gleichbleibende Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. H. Scheer für die Übernahme des Koreferats.

Frau PD Dr. Iwona Adamska und besonders Frau Dr. Anna Sokolenko möchte ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, die Einführung in die Thematik und die weitergehende wissenschaftliche Unterstützung danken.

Besonderer Dank und Anerkennung gebührt Petra Weber, Magdalena Swiatek und Julia Lege für die Schaffung eines bemerkenswert guten Arbeitsklimas im Labor und stetige Hilfsbereitschaft in praktischen und theoretischen Angelegenheiten.

Weitere große Hilfen bei der Bewältigung der Probleme des Laboralltags waren die Ratschläge von Walburga Gessner, Gabriele Burkhard, Claudia Nickel und Anja Drescher, wobei letztgenannter auch ein besonderer Dank für die Durchsicht des vorliegenden Manuskripts und viele wertvolle Kritikpunkte gilt.

Allen Mitarbeitern des Arbeitsbereichs Herrmann möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die beispielhafte Arbeitsatmosphäre danken.

Abschließend gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern sowie all denen, die mich während der Promotion in praktischer, theoretischer oder auch moralischer Hinsicht unterstützt haben. Sie alle haben Anteil daran, daß die Arbeit in der vorliegenden Form zustande kommen konnte.

LEBENS LAUF

Name: Martin Lensch
 Geburtsdatum: 03. Juni 1969
 Geburtsort: Trostberg
 Familienstand: Ledig
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Wohnort: Leipartstraße 24
 81369 München

Schulbildung:

Sept. 1975 - Juli 1979 Besuch der Grundschule Süd, Traunreut
 Sept. 1979 - Juni 1988 Besuch des Gymnasiums Traunreut
 29. Juni 1988 Bescheinigung der Allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst:

Okt. 1988 - Dez. 1989 Grundwehrdienst bei 1. GebArtBtl 235, Bad Reichenhall

Hochschulausbildung:

Okt. 1989 - Juni 1996 Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Karlsruhe (TH) mit den Schwerpunkten Botanik und Genetik (Hauptfächer) sowie Mikrobiologie und Mathematik
 Juli 1995 - Juni 1996 Diplomarbeit am Lehrstuhl Botanik II bei Prof. Dr. H. K. Lichtenthaler mit dem Thema „Neue Ansätze zur Reinigung der Acetyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.1.) aus *Raphanus sativus* L.“
 12. Juni 1996 Verleihung des akademischen Grades als Diplom-Biologe
 Ab Januar 1997 Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl Botanik I der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Prof. Dr. R. G. Herrmann
 Ab Januar 2002 Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie, physikalische Chemie und Tierernährung der tiermedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München