PIC1, eine Eisen-Permease in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Daniela Duy

München

01.12.2008

Dissertation eingereicht am: 01.12.2008
Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll
Zweitgutachter: Prof. Dr. Jörg Nickelsen

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

_____
Daniela Duy

Erklärung

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

München, den

_____
Daniela Duy

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN IV

I EINLEITUNG 1

1 Eisenaufnahme und -verteilung innerhalb der Pflanze 1
2 Chloroplasten, Organellen mit hohem Metallgehalt 6
3 Prokaryotischer Eisentransport 9
4 ABC-Transportersysteme 11
5 Zielsetzung dieser Arbeit 13

II MATERIAL 14

1 Chemikalien 14
2 Enzyme 14
3 Oligonukleotide 14
4 Vektoren und Konstrukte 15
5 Molekulargewichts- und Größenstandards 16

III METHODEN 17

1 Pflanzenphysiologische Methoden 17
1.1 Saatgut und Anzuchtbedingungen 17
1.2 Transiente Transformation von Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* 17
1.2.1 Protoplasten-Isolation 17
1.2.2 PEG-Transfektion 18
1.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* 19
2 Mikrobiologische Methoden 19
2.1 Medien und Anzucht 19
2.1.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* 19
2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* 20
2.2 Transformation 20
2.2.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* 20
2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* 21
2.3 Hefe-Komplementation 21
3 Molekularbiologische Methoden 22
3.1 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) 22
3.2 Klonierungsstrategien 22
3.3 Isolierung von Plasmid-DNA 23
3.3.1 *Escherichia coli* 23
3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* 23

3.4 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* ... 24
3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA ... 25
3.6 PCR-Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien und PIC1-Überexpressionslinen ... 25
3.7 Sequenzierung von DNA ... 26
3.8 RNA-Präparation aus *Arabidopsis thaliana* ... 26
3.9 Reverse Transkription ... 26
3.10 Quantitative Echtzeit-RT-PCR ... 26
3.11 Affymetrix Microarray-Analyse ... 27
4 Biochemische Methoden ... 28
4.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana* ... 28
4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ... 28
4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 28
4.2.2 Blau-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) ... 28
4.2.3 Coomassie-Blaufärbung ... 29
4.3 Immunodetektion von Proteinen ... 29
4.3.1 Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot) ... 29
4.3.2 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper ... 29
4.3.3 Antiseren ... 30
4.4 *In vitro* Proteinimport ... 30
4.4.1 *In vitro* Transkription und *in vitro* Translation ... 30
4.4.2 Isolierung intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* ... 31
4.4.3 Proteinimport in intakte *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten ... 32
4.5 Isolierung von Hüllmembranen aus *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten ... 32
5 Metallgehalt-Analyse ... 33
6 Mikroskopie ... 33
6.1 Lichtmikroskopie ... 33
6.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie ... 33
7 Computer-Analysen ... 34

IV ERGEBNISSE ... 35

1 Die Permease PIC1 ... 35
1.1 Die PIC1-Familie ... 35
1.2 Strukturmodell von PIC1 ... 36
2 Lokalisation von PIC1 in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran ... 38
2.1 Import von PIC1 in *Arabidopsis* Chloroplasten ... 38
2.2 Immunodetektion von PIC1 in Hüllmembran-Fraktionen von *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten ... 39
3 Homooligomerbildung von PIC1 ... 42
4 Das Gen *PIC1* ... 44
4.1 Expressionsmuster von *PIC1* ... 44
5 Charakterisierung von *PIC1* Mutanten in *Arabidopsis* ... 46
5.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3* ... 46

5.2 Phänotypische Untersuchung homozygoter *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen ... 48
5.3 Analyse der Blattmorphologie von *pic1-1* Mutanten ... 51
5.4 Plastiden-Struktur und –Entwicklung in *pic1* Mutanten ... 52
5.5 Ferritin Eisenspeicherproteine in *pic1* Mutanten ... 54
5.6 Regulation der Genexpression in *pic1* Mutanten: Metall-Homöostase und -Transport ... 55
5.7 Regulation der Genexpression in *pic1* Mutanten: Photosynthese ... 58
6 Analyse von PIC1-Überexpressionspflanzen ... 61
6.1 Charakterisierung der transformierten Pflanzenlinien ... 61
6.2 Phänotypische Untersuchung der Überexpressionslinien 35S::PIC1ox #2.3 und #4.4 ... 62
6.3 Ferritin Expression in PIC1-Überexpressionslinien ... 65
7 sll1656 ist das Ortholog zu PIC1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803 ... 66
7.1 *sll1656* im Genom von Synechocystis ... 67
7.2 *In vivo* Lokalisationsstudien von PIC1 und sll1656 ... 68
8 Funktionsnachweis von PIC1 und sll1656 ... 69
8.1 Wachstumskomplementation der Hefe-Mutante *fet3fet4* durch PIC1 und sll1656 ... 70
8.2 Durch PIC1 und sll1656 vermittelte ^{59}Fe-Akkumulation in der *fet3fet4* Hefe-Mutante ... 73
9 ABC-Untereinheiten als mögliche Interaktionspartner von PIC1 ... 74
9.1 Identifizierung weiterer chloroplastidären Proteine mit einer möglichen Funktion in Metall-Homöostase und -Transport ... 74
9.2 *In vivo* Lokalisationsstudien von Proteinen mit einer möglichen Funktion in Metall-Homöostase und –Transport in Chloroplasten ... 76
9.3 Analyse von *nap13* und *nap14* T-DNA-Insertionslinien ... 80
9.4 Phänotypische Untersuchung von *nap13* und *nap14* Mutantenlinien ... 82
V DISKUSSION ... 85
1 PIC1 ist ein integrales Membranprotein der inneren Hüllmembran von Chloroplasten mit cyanobakteriellem Ursprung ... 85
2 PIC1 und sein Ortholog sll1656 aus *Synechocystis* fungieren *in vitro* als Eisen-Permeasen ... 87
3 PIC1 hat eine essentielle Funktion in der Metall-Homöostase in Chloroplasten sowie der gesamten Pflanzenzelle ... 88
4 Die Funktionen der Eisen-Permease PIC1 und des Eisenspeicherproteins Ferritin sind eng aneinander gekoppelt ... 90
5 Die Rolle von PIC1 in der Biogenese von Fe-S Proteinen in Chloroplasten ... 91
6 PIC1 hat keine Funktion im Protein-Import in Chloroplasten ... 92
7 Struktur und Funktion: PIC1 als Permease eines chloroplastidären ABC-Transporters prokaryotischen Ursprungs? ... 93
VI ZUSAMMENFASSUNG ... 96
LITERATUR ... 98

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre (copy-) DNA
Col-0	Columbia
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cTP	chloroplastidäres Transitpeptid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
GFP	Grün-Fluorezierendes-Protein (green fluorescent protein)
h	Stunde
HAc	Essigsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
IE	innere Chloroplastenhüllmembran (inner envelope)
IgG	Immunglobulin G
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino-)ethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Murashige-Skoog Salz
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau

N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR an revers-transkribierter RNA
SA	Standardabweichung
sec	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Tab.	Tabelle
T-DNA	Transfer-DNA
TIC	Translokon an der inneren Chloroplatenhüllmembran
TL	Translations-Produkt
TM	Transmembran-Domäne
TOC	Translokon an der äußeren Chloroplastenhüllmembran
Tricine	N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
UTR	untranslatierter Bereich
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid

I Einleitung

In Pflanzen spielen Übergangsmetalle wie Kupfer, Mangan und Eisen aufgrund ihrer Redoxeigenschaften, d.h. ihrer Fähigkeit reversibel Elektronen abzugeben bzw. aufzunehmen, eine essentielle Rolle in einer Reihe von physiologisch relevanten Redoxreaktionen. So sind Eisen (Fe^{2+}/Fe^{3+}) und Kupfer (Cu^{+}/Cu^{2+}) wichtige Komponenten in der Elektronentransportkette der pflanzlichen Photosynthese sowie der Atmungskette (Raven et al., 1999; Merchant, 2006). Während Kupfer als Bestandteil von Plastocyanin den Elektronentransfer katalysiert, wird Eisen in Hämproteine sowie in Ferredoxin und Eisen-Schwefel (Fe-S) Proteine eingebaut. Auch Mangan ($Mn^{2+}/Mn^{3+}/Mn^{4+}$) ist in photosynthetischen Prozessen beteiligt, da es im katalytischen Zentrum des Wasserspaltungs-Komplexes lokalisiert ist. Zudem spielen alle drei Übergangsmetalle eine Rolle als Kofaktoren des Enzyms Superoxiddismutase, das atmungsaktive Organismen vor reaktiven Sauerstoffradikalen schützt, indem diese mithilfe des Enzyms zu H_2O_2 und schließlich durch Katalse zu H_2O umgewandelt werden. Übergangsmetalle, vor allem Eisen, sind daher wichtige Mikronährstoffe für die Pflanze (Marschner, 1995). Pflanzen, die unter Eisenmangel leiden, weisen neben einer veränderten Blatt-Ultrastruktur auch Chlorosen sowie ein verringertes Wachstum auf (Henriques et al., 2002; Varotto et al., 2002). Bei agronomisch wichtigen Pflanzenarten hat dies somit auch Auswirkungen auf die menschliche Ernährungssituation. Im Gegensatz dazu ist ein Überschuss an Eisen toxisch für Pflanzen. So können freie Eisen-Ionen (Fe^{2+} und Fe^{3+}) über die Fenton-Reaktion aus H_2O_2 die Bildung von freien, reaktiven Hyroxyl-Radikalen katalysieren. Es ist daher notwendig, dass die Aufnahme von Eisen durch die Wurzeln, aber auch dessen Verteilung in die verschiedenen Organe sowie die Speicherung stark reguliert werden, zum einen um Mangelerscheinungen und zum anderen um für die Pflanze toxische Metall-Konzentrationen zu vermeiden.

1 Eisenaufnahme und -verteilung innerhalb der Pflanze

Für ein optimales Wachstum benötigen Pflanzen eine Eisenkonzentration im Bereich von 10^{-9}-10^{-4}M im Boden. In Anwesenheit von Sauerstoff und bei pH-Werten oberhalb von 7,0 kommt Eisen jedoch in Form von unlöslichem Fe(III) vor, das von den Pflanzenwurzeln nicht aufgenommen werden kann. Deshalb haben sich Pflanzen zwei unterschiedliche Strategien zu eigen gemacht, um unter diesen Bedingungen Eisen über die Wurzeln aufnehmen zu können. Dikotyledonen nehmen Eisen in reduzierter Form in die Wurzelepidermis auf (Strategie I), während Gräser das unlösliche Fe(III) über die Bindung an spezifische, exkretierte Chelatoren in

die Wurzel transportieren (Strategie II). Zunächst beschrieben von Römheld und Marschner (1986), konnten im letzten Jahrzehnt eine Reihe von neuen Komponenten, die an der Eisenaufnahme sowie dessen Transport beteiligt sind, auf molekularer Ebene identifiziert und diesen beiden Aufnahmemechanismen zugeordnet werden.

Unter Eisenmangelbedingungen entlassen Strategie I-Pflanzen (Abb. 1) mittels einer P-type ATPase der Plasmamembran Protonen in die Rhizosphäre, die den pH-Wert im Boden ansäuern und dadurch die Löslichkeit der Fe^{3+}-Ionen steigern. Man geht davon aus, dass in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* mehrere in der Plasmamembran der Wurzel lokalisierte H^+-ATPasen der AHA-Familie (*Arabidopsis* H^+-ATPase) in diesen Mechanismus involviert sind (Hell und Stephan, 2003; Kim und Guerinot, 2007). Im nächsten Schritt wird Fe^{3+} durch eine Fe(III)-Chelat-Reduktase zu dem löslicheren Fe^{2+} reduziert. Fe(III)-Chelat-Reduktasen gehören zu einer Familie von membranständigen Proteinen, die Elektronen von dem cytosolischen Donor NADPH über den Kofaktor FAD und schließlich über Hämgruppen zu dem Elektronenakzeptor Fe^{3+} an der äußeren Membranseite transferieren (Robinson et al., 1999; Hell und Stephan, 2003). Robinson et al. (1999) konnten zeigen, dass FRO2 (engl.: „ferric reductase/oxidase 2“) aus *Arabidopsis* den chlorotischen Phänotyp der *frd1* Mutante (engl.: „ferric-chelate reductase defective 1“), die keine aktive Fe(III)-Chelat-Reduktase induzieren kann, komplementiert. FRO2 wird unter Eisenmangel in den Epidermiszellen der Wurzeln auf Transkriptebene induziert (Wu et al., 2005). Das reduzierte Fe^{2+} wird schließlich durch den hoch affinen Fe^{2+}-Transporter IRT1 (engl.: „iron regulated transporter 1“), einem Mitglied der ZIP-Familie (ZRT, IRT-ähnliche Proteine; Mäser et al., 2001), in die Wurzelepidermis transportiert. IRT1 aus *Arabidopsis* konnte durch Komplementation einer Hefemutante, deren endogene Eisentransportsysteme deletiert wurden, identifiziert werden (Eide et al., 1996). Weitere Aufnahme- und Wachstumsversuche mit verschiedenen Hefemutanten zeigten, dass IRT1 ebenso die Metalle Zink, Mangan, Kobalt und Cadmium transportieren kann (Korshunova et al., 1999). Dieses Eisenaufnahmesystem der Dikotyledonen wird durch den Eisenstatus der Pflanze reguliert. Der Plasmamembran-ständige Transporter IRT1 wird unter Eisenmangel in den Epidermiszellen der Wurzeln exprimiert. *irt1* Mutanten in *Arabidopsis* zeigen daher einen chlorotischen Phänotyp mit stark eingeschränktem Wachstum, der durch externe Eisengaben aufgehoben werden kann (Varotto et al., 2002; Vert et al., 2002). Sowohl *IRT1* als auch *FRO2* Transkripte werden unter Eisenmangelbedingungen verstärkt exprimiert (Eide et al., 1996; Robinson et al., 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor FIT1 (engl.: „Fe-deficiency induced transcription factor 1“) unter Eisenmangel die Akkumulation von FRO2 auf mRNA Ebene und von IRT1 auf Proteinebene steuert (Colangelo und Guerinot, 2004).

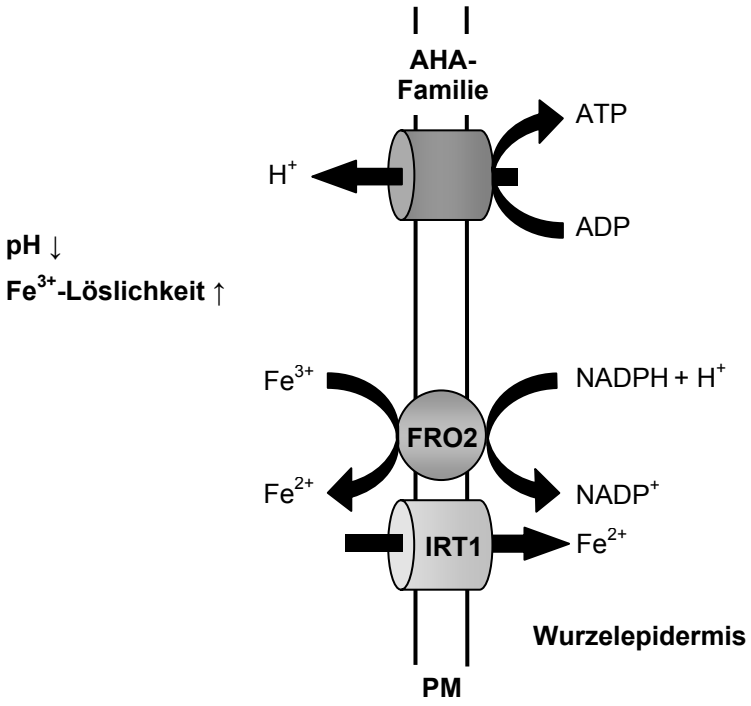


Abbildung 1: Strategie I-Pflanzen nehmen reduziertes Fe^{2+} auf.
Die Aufnahme von Eisen in die Wurzel bei dikotylen Pflanzen (Strategie I) basiert auf drei Schritten: (i) Die Exkretion von Protonen mittels einer P-type ATPase der Wurzelplasmamembran reduziert den pH-Wert im Boden und steigert die Löslichkeit von Fe^{3+}-Ionen. (ii) Die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch die Fe(III)-Chelat-Reduktase FRO2. (iii) Die Aufnahme von Fe^{2+} über die Wurzelplasmamembran durch den hoch affinen Eisentransporter IRT1. Schematische Darstellung modifiziert nach Hell und Stephan (2003). PM: Plasmamembran.

Im Gegensatz zur Strategie I, basiert die Strategie II (Abb. 2) auf der Bindung von Fe^{3+} durch spezifische Chelatoren (Römheld und Marschner, 1986). Unter Eisenmangelbedingungen entlassen monokotyle Pflanzen sogenannte Phytosiderophore (PS) der MA-Familie (engl.: „mugineic acid"; Takagi, 1976). Sie haben eine hohe Affinität für Fe^{3+} und binden dieses in der Rhizosphäre. Charakteristisch für PS ist ihre geringe molare Masse von 0,3-2kDa. Je nach Art der Gräser werden unter Eisenmangel unterschiedliche PS produziert und ausgeschieden (Marschner, 1995; Kim und Guerinot, 2007). Der Mechanismus wie Gräser PS in die Rhizosphäre entlassen, konnte bis jetzt noch nicht identifiziert werden. Die Korrelation einer Vesikelbildung in Wurzelzellen von Gerste und dem Entlassen von PS unter Eisenmangel, lässt jedoch einen vesikulären Transport von PS vermuten (Negishi et al., 2002). Anschließend werden die Fe(III)-PS-Komplexe mittels einem hoch affinen, spezifischen Aufnahmesystem in die Epidermiszellen der Wurzeln transportiert. Curie et al. (2001) konnten zeigen, dass *YS1* Maismutanten keine Fe-PS-Komplexe mehr aufnehmen können und folglich Eisen-mangelsymptome wie intervenale Chlorosen ausbilden. YS1 (engl.: „yellow stripe 1") aus Mais

(*Zea mays*) kodiert für einen Protonen-gekoppelten Transporter, der neben PS auch Metall-Nicotianamin-Chelate transportiert und zur OPT-Familie gehört (engl.: „oligopeptide transporter"; Schaaf et al., 2004).

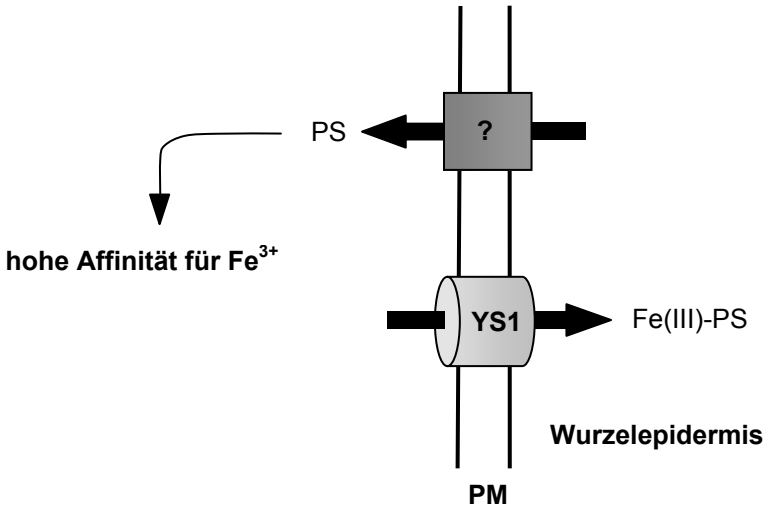


Abbildung 2: Aufnahme von Fe-Phytosiderophoren durch Strategie II-Pflanzen.
Eisenaufnahme in die Wurzel bei monokotylen Pflanzen (Strategie II). Über einen noch unbekannten Mechanismus (?) werden zunächst Phytosiderophore (PS) in die Rhizosphäre entlassen, die spezifisch Fe^{3+} binden. Die Fe(III)-PS-Komplexe werden dann mittels YS1 über die Plasmamembran in die Wurzelepidermis transportiert. Schematische Darstellung modifiziert nach Hell und Stephan (2003). PM: Plasmamembran.

Nach der Aufnahme von Eisen in die Wurzelzelle, wird es sofort wieder durch Chelatkomplexe gebunden, um die Bildung freier Radikale und somit von oxidativem Stress zu vermeiden. Ein solcher Chelator ist Nicotianamin (NA), das unter anderem freies Fe^{2+} komplexiert. NA kommt in allen höheren Pflanzen vor (Scholz et al., 1992). Es ist eine Vorstufe in der Biosynthese von PS und weist daher strukturelle Ähnlichkeiten zu PS auf (Shojima et al., 1990). Untersuchungen zeigen, dass NA nicht ausgeschieden wird und bei hohen pH-Werten neben Fe^{3+} auch Fe^{2+} binden kann, was eine Rolle im intra- und interzellulären Eisentransport in dicotylen sowie monokotylen Pflanzen vermuten lässt (von Wirén et al., 1999). Es wird daher angenommen, dass Eisen in Form von Fe(II)-NA-Komplexen symplastisch von der Wurzelepidermis zum Xylem transportiert wird. Aufgrund der geringen molekularen Masse dieser Komplexe wird ein Transport entlang des Diffusionsgradienten zum Xylem diskutiert (Stephan et al., 1996; Hell und Stephan, 2003). YSL-Transporter (engl.: „yellow stripe1-like"), die eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit zu YS1 aus Mais aufweisen, vermitteln höchstwahrscheinlich den Transport von Fe(II)-NA-Komplexen. YSL2 aus *Arabidopsis* ist unter anderem in der Plasmamembran der Endodermis sowie dem Perizykel lokalisiert (Schaaf et al., 2005), so dass YSL2 vermutlich eine

Rolle im lateralen Transport von Metall-Chelaten spielt. Neben einer Lokalisation in sich differenzierenden Wurzelzellen, konnte zudem eine Expression in Xylem-assoziierten Zellen von Blättern gefunden werden (DiDonato et al., 2004). Vor dem Entlassen von Eisen in das Xylem, wird es vom Symplasten in den Apoplasten transferiert. Obwohl der genaue Ablauf auf molekularer Basis noch ungeklärt ist, gibt es erste Hinweise, dass in *Arabidopsis* IREG1 (engl.: „iron regulated protein 1“) Eisen ins Xylem transportiert (Kim und Guerinot, 2007). Nach dem Transport ins Xylem (pH 5,5-6) wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und als Fe(III)-Citrat-Komplex im Xylemstrom zu den Sprossgeweben transportiert (Tiffin, 1966; Hell und Stephan, 2003). In Arbeiten der letzten Jahre wurde FRD3 aus *Arabidopsis*, ein Mitglied der MATE-Familie (engl.: „multidrug and toxin efflux“), dem Perizykel sowie dem Vaskularzylinder von Wurzeln zugeordnet und als aktiver Citrat-Transporter identifiziert. *frd3* Mutanten sind chlorotisch und ergrünen durch die Zugabe von Citrat reversibel (Rogers und Guerinot, 2002; Green und Rogers, 2004; Durrett et al., 2007). Obwohl bis heute der Mechanismus der Eisenaufnahme vom Xylem ins Blattgewebe noch nicht verstanden ist, deuten Lokalisationsstudien auf das Vorhandensein von Strategie I-Komponenten in der Plasmamembran von Blattzellen hin (Kim und Guerinot, 2007). So können verschiedene FRO Gene in Spross- und Blattgeweben Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren. In *Arabidopsis* gehören neben FRO2 noch sieben weitere Mitglieder zur FRO-Familie, die zum Teil im Sprossgewebe (FRO6, FRO7 und FRO8) exprimiert werden (Wu et al., 2005; Mukherjee et al., 2006). Es wird angenommen, dass anschließend Transporter der ZIP-Familie (ZRT, IRT-ähnliche Proteine) Fe^{2+} in das Cytosol transportieren. Außerdem sind YSL-Transporter wie YSL1 und YSL3 in reproduktiven Organen, Samen bzw. Spross- und Blattgewebe exprimiert, so dass in Blättern eine Aufnahme von Fe(II)-NA über die Plasmamembran nicht ausgeschlossen werden kann (Le Jean et al., 2005; Waters et al., 2006; Briat et al., 2007).

Auch für das Phloem (pH >7) wird neben dem Transport von Fe(III)-ITP-Komplexen (engl.: „iron transport protein“; Krüger et al., 2002), welche in *Ricinus communis* bereits nachgewiesen wurden, ein Transport von Fe(II)-NA-Komplexen angenommen (Briat et al., 2007; Kim und Guerinot, 2007). Vor allem sich entwickelnde Organe wie das Sprossmeristem, Samen oder Wurzelspitzen, in denen das Xylem noch nicht vollständig ausdifferenziert ist, sind auf den Transport von Eisen im Phloem angewiesen. Zudem findet die Re-Mobilisierung von Eisen aus älteren Blättern hin zu jungen Blättern über das Phloem statt.

2 Chloroplasten, Organellen mit hohem Metallgehalt

Die pflanzlichen Chloroplasten stellen Organellen dar, in denen eine Reihe von essentiellen biologischen Funktionen lokalisiert sind und die damit in engem Kontakt sowie regem Stoffaustausch mit anderen Organellen (z.B. Mitochondrien, Peroxisomen) und der pflanzlichen Zelle stehen (vgl. Abb. 3). Neben der Stickstoff- und Schwefel-Assimilation zählt ebenso die Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren und Sekundärmetaboliten zu den zellulären Abläufen, die zumindest teilweise in Chloroplasten stattfinden. Zudem sind Chloroplasten der zentrale Ort für die pflanzliche Photosynthese, bei der Sonnenenergie in chemische Energie umgewandelt und dadurch das autotrophe Wachstum der Pflanzen ermöglicht wird. Es wird heute allgemein angenommen, dass Chloroplasten sich in einem endosymbiotischen Prozess aus einer photosynthetisch aktiven prokaryotischen Zelle entwickelt haben, die zu heutigen Cyanobakterien ähnlich war. Dieses ursprüngliche Cyanobakterium wurde durch eine eukaryotische Wirtszelle, die bereits Mitochondrien beherbergte, aufgenommen (Margulis, 1970; Cavalier-Smith, 2000). Im Laufe der Evolution ging die Integration des Cyanobakteriums mit dem Transfer eines Großteils der genetischen Information in den Zellkern der Wirtszelle einher (Martin und Herrmann, 1998; Leister, 2003 und 2005). Chloroplasten sind aufgrund dieses endosymbiotischen Prozesses von zwei Hüllmembranen umgeben, die der äußeren und inneren Membran der Gram-negativen Cyanobakterien entsprechen. Das Stroma der Chloroplasten enthält das Thylakoidmembransystem, in dem die einzelnen photosynthetischen Komplexe lokalisiert sind. Die äußere und innere Hüllmembran enthalten zwei Proteinkomplexe, den TOC-Komplex (engl.: „translocon at the outer envelope of chloroplasts“) und TIC-Komplex (engl.: „translocon at the inner envelope of chloroplasts“), welche die posttranslationale Translokation von im Cytosol synthetisierten, chloroplastidären Proteinen vermitteln und regulieren (Soll und Schleiff, 2004; Stengel et al., 2007). Außerdem erfordern die vielen Biosynthesevorgänge, die in Chloroplasten ablaufen, einen kontrollierten Austausch von verschiedenen Metaboliten und Ionen sowohl über die äußere als auch die innere Chloroplasten-Hüllmembran (Joyard et al., 1998). An der inneren Chloroplasten-Hüllmembran findet der Metabolitaustausch zwischen Cytosol und dem Stroma des Chloroplasten durch Carrierproteine statt (Abb. 3), die in verschiedene plastidäre Prozesse wie Photosynthese, Photorespiration, die Biosynthese von Stärke, Zuckern und Aminosäuren sowie den oxidativen Pentosephosphatweg und Shikimatweg involviert sind (Flügge und Heldt, 1991; Weber, 2004). Der Transport über die äußere Hüllmembran von Chloroplasten wurde lange Zeit als relativ unselektive Diffusion der Metabolite über Membranporen angesehen (Flügge und Benz, 1984). Erst innerhalb der letzten zehn Jahre konnten spezifische Metabolit-Kanäle (vgl. Abb. 3) in der äußeren Hüllmembran

identifiziert und charakterisiert werden (Pohlmeyer et al., 1997; Pohlmeyer et al., 1998; Bölter et al., 1999; Goetze et al., 2006). Die membranständigen OEPs (engl.: „outer envelope proteins“) bilden Kanäle mit Eigenschaften, die an bakterielle Porine und Kanäle erinnern und daher einen cyanobakteriellen Ursprung vermuten lassen. Sie fungieren als selektive Filter, die in Abhängigkeit ihrer Substratspezifität den Durchgang von kleinen Molekülen wie z.B. Aminosäuren erlauben und somit unterschiedliche Funktionen in metabolischen Prozessen des Chloroplasten und der Pflanzenzelle ausüben (Philippar und Soll, 2007; Duy et al., 2007b).

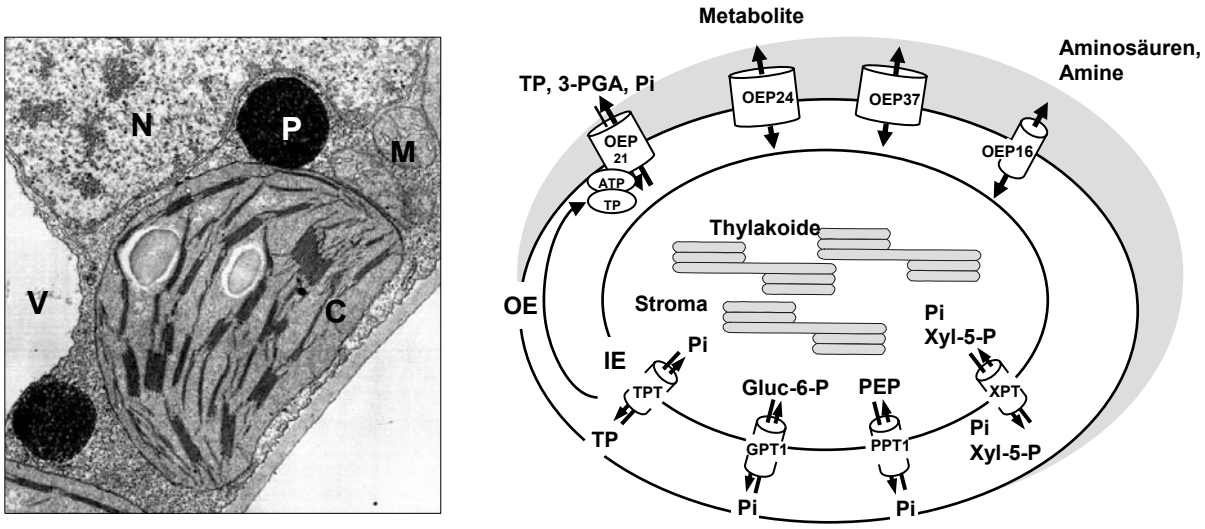


Abbildung 3: Der Metabolit-Transport über die Hüllmembranen von Chloroplasten.
Links: Darstellung eines Chloroplasten im Zellverbund (modifiziert nach Frederick und Newcomb, 1969). C: Chloroplast, M: Mitochondrium, N: Zellkern, P: Peroxisom, V: Vakuole. **Rechts:** Es sind die äußere (OE) und innere (IE) Hüllmembran von Chloroplasten dargestellt (modifiziert nach Philippar und Soll, 2007). Die OEP-Kanäle vermitteln den Metabolit-Transport über die äußere Hüllmembran. Spezifische Carrierproteine transportieren phosphorylierte Metabolite im Austausch gegen Ortho-Phosphat über die innere Hüllmembran. Gluc-6-P: Glukose-6-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, 3-PGA: 3-Phosphoglycerat, Pi: Ortho-Phosphat, TP: Triose-Phosphat, Xyl-5-P: Xylulose-5-Phosphat

Da die Übergangsmetalle Kupfer, Mangan und vor allem Eisen wichtige Bestandteile von Metalloproteinen in der Elektronentransportkette der Photosynthese sind (Raven et al., 1999; Merchant, 2006), ist der Transport dieser Metallionen zu bzw. in den Chloroplasten von großer Bedeutung. Allerdings konnten bis heute nur einige wenige Metalltransportproteine in den Hüllmembranen von Chloroplasten identifiziert werden (siehe Abb. 4). Erst vor wenigen Jahren wurden in *Arabidopsis* die P-type ATPasen PAA1 sowie PAA2 (engl.: „P-type ATPase of *Arabidopsis* 1 und 2“) und HMA1 (engl.: „heavy metal ATPase 1“) als Kupfer-Transporter identifiziert (Shikanai et al., 2003; Abdel-Ghany et al., 2005a; Seigneurin-Berny et al., 2006). Während die beiden ATPasen PAA1 und HMA1 den Transport von Kupfer über die innere

Hüllmembran von Chloroplasten vermitteln, ist PAA2 in der Thylakoidmembran lokalisiert und transportiert Kupfer-Ionen in das Lumen der Thylakoide. Des Weiteren wurde der potentielle Magnesium-Transporter MRS2-11 in der Hüllmembran von Chloroplasten charakterisiert (Drummond et al., 2006).

Chloroplasten weisen mit rund 80% des in Blättern vorkommenden Eisens einen sehr hohen Gehalt dieses Metalls auf (Shikanai et al., 2003). Im photosynthetischen Prozess allein sind eine Reihe von Eisenatomen beteiligt (Photosystem II, Photosystem I, Cytochrom b6-f-Komplex und Ferredoxin). Auch für die Synthese von Fe-S Proteinen im Stroma von Chloroplasten, die neben der Photosynthese eine wichtige Rolle im Proteinimport, in der Chlorophyll-Biosynthese und dessen Abbau sowie in der Stickstoff- und Schwefelreduktion spielen, muss Eisen zur Verfügung stehen (Balk und Lobréaux, 2005; Ye et al., 2006a). Außerdem stellen Chloroplasten neben der Vakuole den wichtigsten Speicherort für Eisen in der Pflanzenzelle dar. Das Protein Ferritin, lokalisiert im Stroma des Chloroplasten, ist der wichtigste Eisenspeicher in der Zelle um Eisenüberschuss und damit oxidativen Stress zu verhindern (Briat und Lobréaux, 1997; Briat et al., 1999).

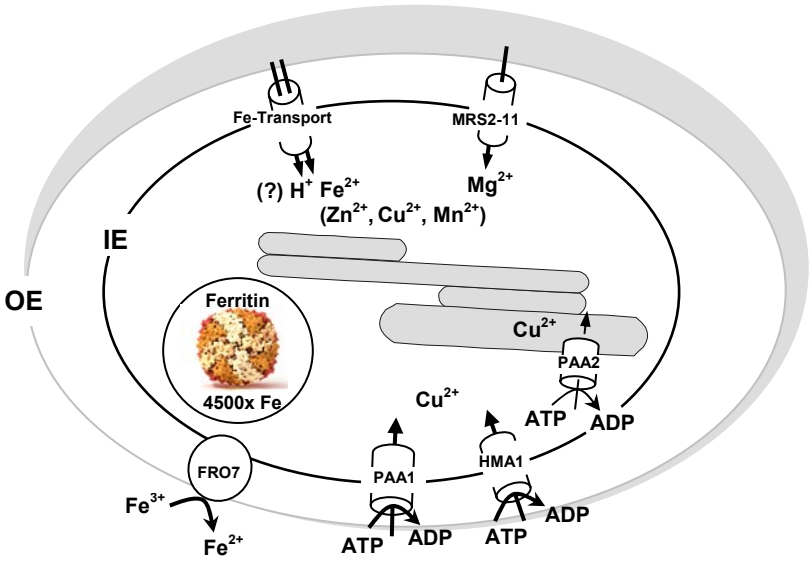


Abbildung 4.: Metalltransport in Chloroplasten.
Dargestellt sind die bereits identifizierten Metalltransportproteine der äußeren (OE) und inneren (IE) Hüllmembran sowie der Thylakoidmembran von Chloroplasten. Es sind jeweils die Art der transportierten Metallionen sowie die Transport-Richtung angegeben. Der direkte Transport von Fe^{2+}-Ionen über die innere Hüllmembran wird wahrscheinlich durch einen Protonen-Gradienten angetrieben und durch die Metallionen Zn^{2+}, Cu^{2+} und Mn^{2+} gehemmt. Die Lokalisation der kürzlich identifizierten Fe(III)-Chelat-Reduktase FRO7 in der äußeren oder inneren Chloroplasten-Hüllmembran konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Das Eisenspeicherprotein Ferritin ist im Stroma von Chloroplasten lokalisiert.

Erst kürzlich wurde für die Fe(III)-Chelat-Reduktase FRO7 eine Lokalisation in den Hüllmembranen des Chloroplasten nachgewiesen (Jeong et al., 2008). Allerdings konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob dieses Protein in der äußeren oder inneren Hüllmembran vorliegt. Damit ist, wie auch beim Transport über die Plasmamembran (vgl. Abb. 1), eine Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} für die Aufnahme von Eisen in das Stroma des Chloroplasten wahrscheinlich. In Arbeiten von Shingles et al. (2001 und 2002) wurde zudem ein direkter Transport von reduziertem Eisen über die innere Hüllmembran isolierter Chloroplasten aus Erbse gezeigt. Der einwärts gerichtete Transport von Fe^{2+}-Ionen wird höchstwahrscheinlich über einen Protonen-Gradienten getrieben und durch andere zweiwertige Metalle wie Zn^{2+}, Cu^{2+} und Mn^{2+} inhibiert (Abb. 4). Trotzdem konnte auf molekularer Ebene bis dato noch kein in Chloroplasten lokalisierter Eisen-Transporter identifiziert werden.

An der Eisenaufnahme und dessen Verteilung innerhalb der Pflanze sind eine Reihe von Membranproteinen unterschiedlicher Transporter-Familien eukaryotischen Ursprungs beteiligt (vgl. I.1). Allerdings konnte außer der Fe(III)-Chelat-Reduktase FRO7 bis jetzt noch kein weiteres Mitglied dieser Familien in Chloroplasten lokalisiert werden. Da sich Chloroplasten im Laufe eines endosymbiotischen Prozesses aus einem ursprünglichen Cyanobakterium entwickelt haben, ist eine Integration von Genen etablierter Eisentransportsysteme des cyanobakteriellen Vorläufers in das Genom der Wirtszelle wahrscheinlich. Daher kann ein Eisentransportsystem in Chloroplasten auch eine prokaryotische Herkunft aufweisen.

3 Prokaryotischer Eisentransport

In Gram-negativen Bakterien, zu denen auch Cyanobakterien zählen, wurden bereits diverse Eisenaufnahmewege charakterisiert. Diese können entweder den Import von Fe^{3+}-Ionen oder von Fe(III) gebunden an Siderophore oder Hämgruppen sowie den Transport von Fe^{2+} beinhalten (Köster, 2001; Andrews et al., 2003). Zu den am besten beschriebenen Aufnahmewegen zählt unter anderem die Aufnahme von Fe(III) in chelatierter Form. Dabei werden zunächst Siderophore entlassen, die mit hoher Affinität Fe^{3+}-Ionen binden. Die Fe(III)-Siderophor-Komplexe werden dann über Rezeptoren, die in der äußeren Membran lokalisiert sind, in die Bakterienzelle transportiert. In *Escherichia coli* konnten mehrere Rezeptoren für die Aufnahme von Fe(III)-Siderophor-Komplexen identifiziert werden, wie beispielsweise FhuA für Ferrichrom, FhuE für Fe(III)-Coprogen, FecA für Fe(III)-Citrat, FepA für Fe(III)-Enterobactin (Braun et al., 1998). Der Transport der Fe(III)-Siderophor-Komplexe in das Periplasma der Bakterien benötigt Energie, die durch einen elektrochemischen Ladungsgradienten der inneren Membran bereitgestellt und über den TonB-ExbB-ExbD-Proteinkomplex übertragen wird

(Larsen et al., 1994; Higgs et al., 1998). Die Weiterleitung der Fe(III)-Siderophor-Komplexe durch das Periplasma sowie die cytoplasmatische Membran wird durch ein ABC-Transportersystem (siehe I.4) vermittelt, das aus einem periplasmatischen Bindeprotein, einer assoziierten Permease in der Cytoplasmamembran und einer löslichen ABC-Domäne besteht (Abb. 5). Das Bindeprotein (z.B. FhuD) fungiert als „Shuttle“, welches den Fe(III)-Siderophor-Komplex vom Rezeptor der äußeren Membran entgegennimmt und ihn zu der entsprechenden Permease (z.B. FhuB) in der inneren Membran transferiert. Die Energie für den Transportprozess in das Cytosol von Bakterien wird mittels einer ATPase (ABC-Untereinheit; z.B. FhuC), die mit der Permease-Einheit verbunden ist, durch die Hydrolyse von ATP gewonnen (Köster, 2001).

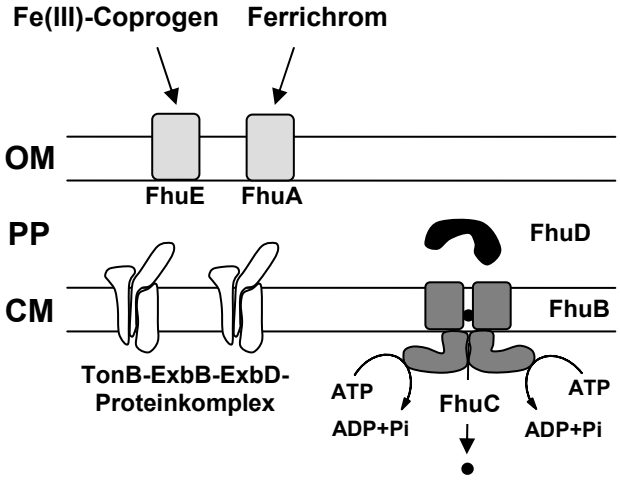


Abbildung 5: FhuBCD-System in *E. coli* zur Aufnahme von Fe(III)-Siderophor-Komplexen.
Die Fe(III)-Siderophor-Komplexe werden mittels FhuA und FhuE durch die äußere Membran (OM) in den periplasmatischen Raum (PP) transportiert. Die dafür notwendige Energie wird durch den TonB-ExbB-ExbD-Komplex bereitgestellt. Das Bindeprotein FhuD bringt das Substrat zu dem FhuBC-Komplex in der cytoplasmatischen Membran (CM). Die für die Translokation durch die ABC-Permease (FhuB) benötigte Energie wird mittels ATP-Hydrolyse (FhuC) gewonnen (modifiziert nach Köster, 2001). Sowohl Permease- als auch ABC-Untereinheiten des ABC-Transporters liegen als Dimere vor (vgl. Abb. 6).

Zudem können Bakterien Eisen in Form von Fe^{2+}-Ionen aufnehmen, welches unter anaeroben Bedingungen bzw. sauren pH-Werten vorliegt. Das von Hantke (1987) in *E. coli* identifizierte Feo-System besteht aus den drei Proteinen FeoA, FeoB und FeoC. Der Transport über die innere Membran wird durch das transmembrane Protein FeoB vermittelt, welches im N-Terminus eine cytosolische G-Protein-Domäne enthält. Außerdem wird für FeoB eine Funktion als ATP/GTPase diskutiert. FeoA, lokalisiert im Cytosol, ist ein kleines, lösliches Protein, das möglicherweise für eine maximale FeoB-Aktivität benötigt wird. Für FeoC wird eine Funktion als Fe-S-abhängiger Transkriptionsfaktor des *FeoABC*-Operons diskutiert (Cartron et al., 2006).

Interessanterweise konnten in dem vollständig sequenzierten Genom des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 über Sequenzvergleich orthologe Proteine zu den bakteriellen Eisenaufnahmesystemen gefunden werden, die ebenso Untereinheiten von ABC-Transportern darstellen (Katoh et al., 2001). Es ist daher nicht auszuschließen, dass chloroplastidäre Membranproteine mit einer Ähnlichkeit zu Permeasen cyanobakterieller ABC-Transporter bzw. lösliche ABC-Domänen im Chloroplasten an dem Transport von Eisen über die Hüllmembranen des Chloroplasten beteiligt sind.

4 ABC-Transportersysteme

ABC-Transporterproteine gehören zu einer großen Familie und sind ubiquitär in allen Organismen vertreten (Higgins, 2001). Sie sind integrale Membranproteine, die verschiedene Substanzen exportieren oder importieren. Die hoch konservierte, cytoplasmatische ATPase-Domäne, auch ABC-Domäne (engl.: „ATP-binding casette“) genannt, ist für die Namensgebung der Familie verantwortlich. Sie bindet und hydrolisiert ATP (Schneider und Hunke, 1998; Davidson und Chen, 2004), wodurch die Energie für den Transport bereitgestellt wird. Die Aminosäuresequenz dieser Domäne besteht aus mehreren konservierten Motiven, wie dem Walker-Motiv A und B und einem zusätzlichen spezifischen „ABC-Signatur“ Motiv (LSGGQ), über das die Familie definiert wird (Higgins et al., 1986). ABC-Exporter gibt es sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Organismen. Sie entfernen Schadstoffe und exportieren verschiedene andere Substrate und Proteine (Young und Holland, 1999). Im Gegensatz dazu kommen ABC-Importer ausschließlich in Prokaryoten vor, wo sie die Aufnahme essentieller Nährstoffe in die Bakterienzelle katalysieren (Davidson und Chen, 2004; Hollenstein et al., 2007b).

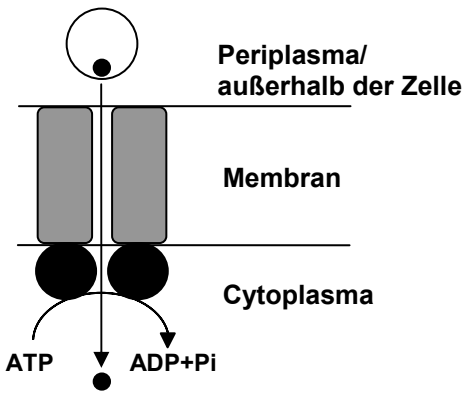


Abbildung 6: Aufbau eines bakteriellen ABC-Transportersystems.

Dargestellt ist ein ABC-Importer bestehend aus dem periplasmatischen Bindeprotein (hellgrau), das im Periplasma (Gram-negative Bakterien) oder außerhalb der Zelle (Gram-positive Bakterien) lokalisiert ist, zwei Permease-Domänen (dunkelgrau) sowie zwei ABC-Domänen (schwarz). Die Translokation des Substrats erfolgt durch die bei der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie.

Generell können bakterielle ABC-Transportersysteme aus drei unterschiedlichen Komponenten bestehen (Abb. 6): einem periplasmatischen Bindeprotein, zwei transmembranen Permease-Domänen und zwei ABC-Domänen (Higgins, 2001). Das periplasmatische Bindeprotein ist nur bei Importern Bestandteil des ABC-Systems und befindet sich bei Gram-positiven Bakterien außerhalb der Zelle bzw. bei Gram-negativen Bakterien im Periplasma, wo es das Substrat bindet und an den membranassoziierten Transportkomplex liefert. ABC-Exporter dagegen rekrutieren ihre Substrate direkt (Hollenstein et al., 2007b). Die Permease-Domänen sind hydrophobe Membranproteine, die aus einer unterschiedlichen Anzahl an transmembranen α-Helices bestehen können und die Pore für die Translokation darstellen (Hollenstein et al., 2007a). Die hydrophilen, cytosolischen ABC-Domänen binden an die Verbindungshelices der Permease-Domänen. Ein funktioneller ABC-Transporter besteht aus zwei Permease- und zwei ABC-Domänen. In ABC-Importern sind die Permease- und ABC-Domänen verschiedene Polypeptidketten. In bakteriellen ABC-Exportern ist jeweils eine Permease- mit einer ABC-Domäne unter Bildung eines halben Transporters auf einer Polypeptidkette fusioniert, der dann entweder als Homo- oder Heterodimer die funktionelle Einheit darstellt (Hollenstein et al., 2007b).

In Eukaryoten sind ABC-Transporter im Allgemeinen als halbe oder auch volle Transporter durch eine Polypeptidkette repräsentiert. Vergleichende Studien von Reis (*Oryza sativa*) und *Arabidopsis* zeigten, dass Pflanzen eine große Anzahl an ABC-Transportern besitzen, die allen Unterfamilien an ABC-Transportern eukaryotischer Organismen zugeordnet werden können (Garcia et al., 2004; Verrier et al., 2008). Interessanterweise haben Pflanzen außerdem ein spezifisches Set an ABC-Transportern, das sie mit Prokaryoten gemeinsam haben und das in Tieren noch nicht gefunden wurde. Es wird angenommen, dass diese ABC-Transportersysteme während der Endosymbiose, aus dem ursprünglichen, prokaryotischen Endosymbiont übernommen wurden (Garcia et al., 2004). Der mitochondriale ABC-Transporter ATM3 (engl.: „ABC transporter of the mitochondria 3“) aus *Arabidopsis* ist beispielsweise an der Biogenese von Fe-S Proteinen sowie der Eisen-Homöostase in Pflanzen beteiligt. Außerdem wird eine Rolle von ATM3 in der Resistenz der Pflanze gegenüber dem Schwermetall Cadmium und in der Regulierung des zellulären Glutathion-Levels diskutiert (Kim et al., 2006). Erst vor Kurzem konnte ein chloroplastidäres ABC-Transportersystem prokaryotischen Ursprungs, das aus TGD1 (engl.: „trigalactosyldiacylglycerol 1“), TGD2 und TGD3 besteht, vollständig identifiziert werden (Xu et al., 2003 und 2005a; Awai et al., 2006; Lu et al., 2007). Es vermittelt den Lipidtransport vom ER über die innere Chloroplasten-Hüllmembran zu den Thylakoiden. Das TGD1 Protein ist die Permease-Domäne, die in der inneren Hüllmembran lokalisiert ist. TGD2 ist im Intermembranraum lokalisiert, wobei es an die innere Hüllmembran anbindet und stellt das

Substrat-Bindeprotein dar. Das TGD3 Protein konnte schließlich als die ABC-Domäne des ABC-Transporters identifiziert werden, das im Stroma des Chloroplasten lokalisiert ist. Ein funktioneller TGD-Transporter besteht aus je zwei Bindeproteinen sowie Permease- und ABC-Domänen.

5 Zielsetzung dieser Arbeit

Vor dem geschilderten Hintergrund sowie dem Kenntnisstand der Forschung sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Ziele erreicht werden:

(i) Die Identifizierung eines Eisentransportproteins in den Hüllmembranen des Chloroplasten.

(ii) Der funktionelle Nachweis des Eisentransports durch die identifizierte Permease PIC1.

(iii) Die molekulare und physiologische Charakterisierung sowie die Aufklärung der genauen subzellulären Lokalisation des Membranproteins PIC1.

(iv) Die *in vivo* Funktion von PIC1 in der Metall-Homöostase des Chloroplasten sowie der gesamten Pflanze.

(v) Die Identifikation und Beschreibung möglicher Interaktionspartner von PIC1 im Chloroplasten.

II Material

1 Chemikalien

Chemikalien wurden von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Biomol (Hamburg, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GibcoBRL (Paisley, UK), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

2 Enzyme

Enzyme wurden von folgenden Herstellern bezogen: Restriktionsenzyme von MBI Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), T4-Ligase von Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Taq-Polymerasen von Diagonal (Münster, Deutschland), Eppendorf, MBI Fermentas und Finnzymes (Espoo, Finnland), Reverse Transkriptase von Promega (Madison, USA), RNase frei DNase I von Roche (Mannheim, Deutschland), Thermolysin von Merck, RNase von Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden).

3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Qiagen/Operon (Köln, Deutschland) oder von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 1 : In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer.

Name	Sequenz (5' → 3' Orientierung)	Verwendung
pic1-1fw	GTTTCGTTGTCCGCTGGCTTTAGC	Genotypisierung von *pic1-1*
pic1-1rev	GGTTAAATGAGTGCTGGAAACCTGGC	Genotypisierung von *pic1-1*
pic1-2fw	TGCAATCACTACTCTTGCCGCCGG	Genotypisierung von *pic1-2*
pic1-2rev	CAATCTCTTTGCAACCTGTGAATA	Genotypisierung von *pic1-2*
pic1-3fw	GTTCCTGTCTCAGTTCTTTATGCC	Genotypisierung von *pic1-3*
pic1-3rev	CAACAACTACCTCCTATCACGATG	Genotypisierung von *pic1-3*
nap13-1fw	CTTGAAAATCCTTAAGAGAAATGAATGGTCACTG	Genotypisierung von *nap13-1*
nap13-1rev	GCCACTGGATGGATTCACTACACCAGC	Genotypisierung von *nap13-1*
nap14-1fw	AGCCCCACGCCTGTCTTCGGC	Genotypisierung von *nap14-1*
nap14-1rev	CCACTCCCACTCTTCCCAAAGATCAAGC	Genotypisierung von *nap14-1*
mPIC1fw	TTTCATATCCGACTGAATTCATGTCCGTTCCCGGTG	Klonierung für *in vitro* Transkription
mPIC1rev	CGGGTACCGAGCTCGTCGATCGACCACG	Klonierung für *in vitro* Transkription
PIC1LCfw	CTCCGTCGAACTTCC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
PIC1LCrev	AACTACGACAGATTCCG	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
LCpic1,2fw	AGAACACCAATTCGCTAC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
LCpic1,2rev	CCTCATTATCACCGGG	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
oligo-dT-Primer	T_{25}V[NQ]-3	Reverse Transkription
GABI LB1	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	Genotypisierung von *pic1-2* und *pic1-3*
SALK LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	Genotypisierung von *pic1-1, nap13-1, nap14-1*
PIC1fw	CACCATGCAATCACTACTCTTGCCGCC	Klonierung in pENTR/D/TOPO, Hefe-Trafo
PIC1rev-stop	AGCAACCTTAGGAACTACGACAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO, Hefe-Trafo
PIC1rev+stop	GGCAGAAACTCAAGCAACCTTAGG	Klonierung Hefe-Transformation

gPIC1fw	CACCCGTCAAACCGAGTCAGATTCCTCTTC	Klonierung in pENTR/D/TOPO
PIC1aa83rev	AAATGCCACCGTGGATGGTGTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
PIC1E3fw	GTTGTGAAAGGTTTGAGGAGCG	Genotypisierung von *pic1-1/pic1-1* gPIC1
attB2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Genotypisierung von *pic1-1/pic1-1* gPIC1
PIC1_5´UTRfw	GCCCATTGCAACTGTGAAGAATAGACG	Genotypisierung von *pic1-1/pic1-1* gPIC1
PIC1_3´UTRrev	CATTGAATCCGCAATCGTTGGTTCTC	Genotypisierung von *pic1-1/pic1-1* gPIC1
sll1656fw	CACCATGAACCGACGCAACACCG	Klonierung in pENTR/D/TOPO, Hefe-Trafo
sll1656rev-stop	CTTGTTCAGACGGTCTAGCAACCACAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO, Hefe-Trafo
sll1656rev+stop	AAATTACTTGTTCAGACGGTCTAGCAACCAC	Klonierung Hefe-Transformation
IRT1fw	ATTCAGGCGGCCGCATGAAAACAATCTTCCTCGTAC	Klonierung Hefe-Transformation
IRT1rev-stop	ATCTGGGCGGCCGCTTAAGCCCATTTGGCGATAATC	Klonierung Hefe-Transformation
IRT1LCfw	AGTGACACTTGCACCA	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
IRT1LCrev	GGCGATAATCGACATTCC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
FER1LCfw	ACTCCACCCTATCGTC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
FER1LCrev	CCCCAACATTGGTCATC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
FER4LCfw	TCAAAGGTCTTGCCAAGT	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
FER4LCrev	AGCTGCTTACCCTTCC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
Actin2/8fw	GGTGATGGTGTGTCT	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
Actin2/8rev	ACTGAGCACAATGTTAC	Quantitative Echtzeit-RT-PCR
NAP5fw0	ATGGATAGAGAACGATATGATAAGGTG	Subklonierung in pCR2.1
NAP5rev+stop	ATAGTTATGATGAATATATACAAGTTTTTGAAC	Subklonierung in pCR2.1
NAP5fw	CACCATGGATAGAGAACGATATGATAAGGTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
NAP5rev-stop	TGATGAATATATACAAGTTTTTGAACAAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
GCN1fw	CACCATGGTGTCTGACGCTAGCAAGAAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
GCN1rev-stop	ATCTTCAAGTCCGGCTTTAGCCTTAAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
CBY-likefw	CACCATGAATCACTCCAATCTTGCCAATC	Klonierung in pENTR/D/TOPO
CBY-likerev-stop	GACAAGAAAGTATTCAGACAAGAGTGCG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
NAP13fw	CACCATGAATGGTCACTGTTTATTTGCAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
NAP13rev-stop	AGAACCAATTTGATCAATGTAAGACGATTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
NAP14fw	CACCATGGCAGTGTCGACGTTTTCG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
NAP14rev-stop	AAGTGGTGGACGTTCTGCAACAAG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
MTPc1fw	CACCATGGGTATTATCAGATTTCAAATCCTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
MTPc1rev-stop	TTCGGAGTTAAGACTAAGCTGAATGCTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
DNAJ-Fdfw	CACCATGGCGCAGATACTTTCCCCTG	Klonierung in pENTR/D/TOPO
DNAJ-Fdrev-stop	GTTGTCTCCTCTGGAGGCGGAGTC	Klonierung in pENTR/D/TOPO

4 Vektoren und Konstrukte

Für die Klonierung der jeweiligen Konstrukte wurden in dieser Arbeit folgende Plasmid-Vektoren verwendet.

Tabelle 2: Verwendete Plasmid-Vektoren.

Plasmid-Vektor	Verwendung	Herkunft
pCR2.1 und pCRII	Subklonierung	Invitrogen
pJET1.2	Subklonierung	Fermentas
pENTR/D/TOPO	Entry-Vektor für GATEWAY-Klonierung	Invitrogen
pGEM 4-Z	*in vitro* Transkription; SP6-Promoter	Promega
pFL61	Expressions-Vektor für Hefe-Zellen	Geschenk von Prof. Dr. P. Dietrich
pDR195	Expressions-Vektor für Hefe-Zellen	Geschenk von Prof. Dr. N. von Wirén
pK7FWG2	GATEWAY-Klonierung	Plant Systems Biology (Universität Ghent, Belgien)
p2GWF7	GATEWAY-Klonierung	Plant Systems Biology (Universität Ghent, Belgien)
pH2GW7	GATEWAY-Klonierung	Plant Systems Biology (Universität Ghent, Belgien)
pKGW	GATEWAY-Klonierung	Plant Systems Biology (Universität Ghent, Belgien)

In Tabelle 3 sind die Konstrukte aufgeführt, die nicht im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden.

Tabelle 3: Verwendete Konstrukte.

Konstrukt	Vektor	Verwendung	Herkunft
PIC1	pUNI51	Klonierung	SSP pUNI51 Klon U18531 (Yamada et al., 2003)
IRT1	pCMV-Sport6	Klonierung	GSLT cDNA U27590 (Castelli et al., 2004)
IRT1	pDR195	Expression in Hefe-Zellen	Geschenk von Prof. Dr. N. von Wirén
GCN1	pUNI51	Klonierung	SSP pUNI51 Klon U24471 (Yamada et al., 2003)
CBY-like	pRAFL	Klonierung	SSP cDNA pda11168 (Yamada et al., 2003)
NAP13	pUNI51	Klonierung	SSP pUNI51 Klon C103512 (Yamada et al., 2003)
NAP14	pUNI51	Klonierung	SSP pUNI51 Klon U51365 (Yamada et al., 2003)
DNAJ-Fd	pUNI51	Klonierung	SSP pUNI51 Klon U21285 (Yamada et al., 2003)

5 Molekulargewichts- und Größenstandards

Als Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE diente ein „Low Molecular Weight Marker“ bestehend aus α-Lactalbumin (14,2kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1kDa), Trypsinogen (24kDa), Carboanhydrase (29kDa), Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase (36kDa), Ovalbumin (45kDa) und Rinderserumalbumin (66kDa) von Sigma-Aldrich. Für die BN-PAGE wurde ein „High Molecular Weight native Marker“ bestehend aus Albumnin (66kDa), Lactat-Dehydrogenase (140kDa), Catalase (232kDa), Ferritin (440kDa) und Thyroglobulin (669kD) von Amersham Pharmacia verwendet. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit *Pst*I geschnittene DNA des Phagen λ (MBI Fermentas) als Größenstandard verwendet.

III Methoden

1 Pflanzenphysiologische Methoden

1.1 Saatgut und Anzuchtbedingungen

Samen von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ecotyp Col-0 wurden bei Lehle Seeds (Round Rock, USA) bezogen. Die T-DNA-Insertionslinien SALK_104852, SALK_084441, SALK_027270, SALK_116866, GABI 577D06 und GABI 804F07 wurden bei NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center, Nottingham, UK) bzw. bei GABI-Kat (Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtung, Köln, Deutschland) erworben. Es wurden Erbsen (*Pisum sativum* L.) der Sorte "Arvica" (Prag, Tschechien) verwendet.

Vor der Aussaat wurden *Arabidopsis* Samen mit 70% EtOH und 5% Hypochlorit oberflächen-sterilisiert. Um die Keimung zu synchronisieren, wurden alle Samen für drei Tage bei 4°C stratifiziert. Die Aussaat erfolgte auf MS-Agarmedium (1% Saccharose; 0,215% MS; 0,05% MES; 0,3-0,5% Gelrite; pH5,8 mit KOH). Zur Selektion transformierter Pflanzen wurde dem MS-Agar entsprechendes Antibiotikum (30-50µg/ml Hygromycin oder 100µg/ml Kanamycin) zugegeben. Nach 2-3 Wochen wurden die *Arabidopsis* Pflänzchen zur weiteren Anzucht in Erde (A210, Stender, Schermbeck, Deutschland) transferiert. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte in einem Zyklus von 16 h Licht bei 21°C und einer durchschnittlichen Lichtintensität von 60-100µmol/m^2s sowie von 8 h Dunkelheit bei 16°C.

1.2 Transiente Transformation von Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

1.2.1 Protoplasten-Isolation

Die Isolierung von Mesophyll-Protoplasten aus *Arabidopsis*-Pflanzen erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Jen Sheen (2002). Alle folgenden Schritte wurden semisteril und bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor Beginn wurden 10ml Enzym-Lösung aus 1% Cellulase R10 (Serva), 0,3% Macerozyme R10 (Yakult, Tokio, Japan), 400mM Mannitol, 20mM KCl und 20mM MES, pH 5,7 frisch angesetzt und für 10 min bei 55°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 10mM $CaCl_2$ und 0,1% BSA zugegeben. Anschließend wurde die Enzym-Lösung durch einen 0,45µM-Sterilfilter (Whatman/Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland) direkt auf 1g Blätter von 3-4 Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen filtriert. Die Blätter wurden dann mit einer neuen Rasierklinge sehr fein gehackt und mit der Enzym-Lösung in einen 100ml-Kolben überführt. Nach einer Vakuuminfiltration von etwa 20 sec (1x Hochsaugen) folgte eine Inkubation der abgedunkelten Kolben auf einem Horizontalschüttler bei

40rpm für etwa 2 h. Danach wurden die Protoplasten für 1 min bei 80rpm freigesetzt. Die Protoplasten-Suspension wurde durch ein 100µm Nylon-Netz in ein 15ml COREX-Röhrchen filtriert und bei 100xg und 8°C für 2 min in einem Ausschwing-Rotor pelletiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810R, Beschleunigung und Bremse auf 3 stellen). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Protoplasten wurden mit 10ml 4°C-kalter W5-Lösung (154mM NaCl; 125mM $CaCl_2$; 5mM KCl; 2mM MES, pH 5,7; Osmolarität auf 550-580mOsm einstellen) durch vorsichtiges Pipettieren mit einer abgeschnittenen 5ml-Spitze resuspendiert. Die Protoplasten-Suspension wurde bei 100xg und 8°C für 2 min erneut pelletiert, nach Abnahme des Überstandes in 5ml W5 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Bestimmung der lebenden Protoplasten wurden 25µl der Protoplasten-Suspension mit 75µl W5 verdünnt und 20µl der Suspension auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Es wurde die Anzahl der intakten Zellen von mindestens sechs Kleinquadraten ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die Gesamtzahl (n) der Protoplasten in der Lösung wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$n = (x \text{ Protoplasten-Mittelwert} / 0{,}2\mu l) \times 5000\mu l$$

Anschließend wurden die Protoplasten erneut für 2 min pelletiert (100xg, 8°C) und der gesamte Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Die Protoplasten wurden dann vorsichtig in soviel MMg-Lösung (400mM Mannitol; 15mM $MgCl_2$; 4mM MES, pH5,7; Osmolarität auf 540mOsm einstellen) aufgenommen, dass eine Konzentration von 400 Protoplasten pro µl erreicht wurde.

1.2.2 PEG-Transfektion

Die *Arabidopsis* Protoplasten wurden gleich im Anschluss mit den entsprechenden GFP-Fusionskonstrukten transformiert. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur und mit abgeschnittenen Spitzen durchgeführt. Alle Lösungen wurden auf 23°C temperiert. Es wurden pro Konstrukt zunächst 10µl Plasmid-DNA (1-2µg/µl) in ein 2ml-Eppi pipettiert, dann wurde 100µl Protoplasten-Suspension zugegeben und vorsichtig unter Drehen gemischt. Anschließend wurde 110µl PEG/Ca (40% (v/v) PEG4000; 200mM Mannitol; 100mM $Ca(NO_3)_2$) hinzugefügt und wiederum vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min im Dunkeln wurden 500µl W5-Lösung zugegeben und vorsichtig vermischt. Die Protoplasten-Suspension wurde bei 100xg für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Protoplasten wurden in 1ml W5 resuspendiert. Anschließend wurde die Protoplasten-Suspension in eine kleine Petrischale (∅ 40mm) überführt und über Nacht abgedunkelt bei 16-21°C inkubiert. Nach etwa 20 h Inkubation wurden die GFP-Fluoreszenzbilder mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (TCS-SP5, Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen.

1.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen bzw. heterozygoten *PIC1*/*pic1-1* Mutanten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Bechtold et al. (1993). Dafür wurde drei Tage vor der Transformation eine 10ml Vorkultur der mit dem jeweiligen Konstrukt transformierten Agrobakterien unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika angesetzt und bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Nach zwei Tagen wurde eine 500ml Hauptkultur mit 5ml der jeweiligen Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Am Tag vor der geplanten Transformation wurden die zu transformierenden Pflanzen luftdicht abgedeckt, um eine maximale Öffnung der Stomata zu erreichen. Für die Transformation wurde die Übernachtkultur der transformierten Agrobakterien bei 6000xg für 10 min pelletiert, in 400ml Infiltrationsmedium (5% Saccharose; 0,215% MS; 0,02% Tween 20) resuspendiert und in einen Exsikkator gestellt. Anschließend wurden jeweils vier der zu transformierenden Pflanzen kopfüber in das Infiltrationsmedium getaucht und unter Vakuum für etwa 5 min infiltriert. Danach wurden die Pflanzen horizontal auf ein feuchtes Papiertuch ausgebreitet und wiederum luftdicht abgedeckt. Am nächsten Tag wurden die Reste des Infiltrationsmediums abgewaschen und die Pflanzen aufgerichtet. Die Selektion der T1-Samen der transformierten Pflanzen erfolgte auf MS-Agar unter Zugabe des jeweiligen Antibiotikums.

2 Mikrobiologische Methoden

2.1 Medien und Anzucht

2.1.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

In dieser Arbeit wurden die *E. coli* Stämme DH5α (Invitrogen), TOP10 (Invitrogen), JM109 (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte standardmäßig bei 37°C unter Schütteln in LB-Flüssigmedium (1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl). Bei Kultivierung auf Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5% Agar zugesetzt. Je nach Resistenz der transformierten Plasmid-Vektoren wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum (100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin, 100µg/ml Spectinomycin) zugegeben. Die Blau/Weiß-Selektion bei Vektoren mit *lac*Zα-Fragment zur Expression der ß-Galactosidase (pCR2.1 und pCRII) erfolgte durch die Zugabe von 60µg/ml X-Gal (Sambrook et al., 1989). Für die Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen wurde *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMK90RK (Koncz und Schell, 1986; erhalten von Dr. J. Meurer [Department Biologie 1, Botanik, Ludwig-Maximilians-Universität München] eingesetzt. Die Anzucht der Agrobakterien wurde standardmäßig bei 28°C in LB-Flüssigmedium unter

Schütteln oder auf LB-Agarplatten durchgeführt. Dem Medium wurden folgende Antibiotika zugesetzt: 50µg/ml Kanamycin (Resistenz Stamm GV3101), 100µg/ml Rifampicin (Resistenz Ti-Plasmid), 100µg/ml Spectinomycin (Resistenz transformierter Plasmid-Vektor).

2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

In dieser Arbeit wurden folgende Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*) eingesetzt:
fet3fet4: DEY1453 beschrieben in Eide et al. (1996) (*MATα/MATα ade2/+ can1/can1 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3 fet3-2::HIS3/fet3-2::HIS3 fet4-1::LEU2/fet4-1::LEU2*)
ctr1: 64p beschrieben in Dancis et al. (1994a) (*MATα gcn4 his3 leu2 trp1 ura3 ctr1::LEU2*)
smf1: SLY8 beschrieben in Korshunova et al. (1999) (*MATα ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 smf1::HIS3*). Alle drei Hefestämme stammten von Prof. Dr. P. Dietrich (Molekulare Pflanzenphysiologie, Universität Erlangen).
Für die Kultivierung der *fet3fet4*, *ctr1* bzw. *smf1*-Hefe-Mutanten wurde YPD-Medium (2% Pepton; 1% Hefeextrakt; 1% Glukose) verwendet. Nach Transformation der *fet3fet4*, *ctr1* und *smf1* Hefe-Mutanten erfolgte die Selektion auf „synthetic complete“ (SC) Minimalmedium (0,67% YNB [Yeast Nitrogene Base, ohne Aminosäuren]; 0,2% Dropout-Mix; 2% Glukose), dem kein Uracil zugesetzt wurde (SC-ura). Der Dropout-Mix (-ura) enthielt jeweils 4,3% der Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Myo-Inositol, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin sowie 1% Adenin, 8,5% Leucin und 0,4% para-Aminobenzoesäure in Gewichtsprozent. Für die Anzucht auf Agarplatten wurde dem Medium entweder 2% Agar (YPD) oder 2% Agarose (SC-ura) zugesetzt. Für ein optimales Wachstum der *fet3fet4* Hefe-Mutante wurde der pH-Wert auf 4,0 (YPD) bzw. auf 3,5 (SC-ura) mit HCl eingestellt. Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte bei 30°C für 3-5 Tage, die Anzucht in Flüssigmedium wurde bei 30°C unter Schütteln (200rpm) durchgeführt.

2.2 Transformation

2.2.1 *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach Hanahan (1983). Die Bakterien wurden durch Hitzeschock zur Aufnahme der Plasmid-DNA veranlasst (Sambrook et al., 1989).
Für die Herstellung kompetenter Agrobakterien wurde zunächst 10ml Flüssigmedium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte in 1ml-Aliquots durch Zentrifugation für 5 min bei 16000xg und 4°C. Die Pellets wurden in 100µl 4°C-kaltem $CaCl_2$

(10mM) resuspendiert und anschließend für 5 min zentrifugiert (16000xg, 4°C). Danach wurden die Pellets in 50µl 4°C-kaltem $CaCl_2$ (10mM) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Transformation bei -80°C gelagert.
Für die Transformation kompetenter Agrobakterien wurde zu 50µl Zellen 0,5µg Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 1 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für 5 min bei 37°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400µl LB-Flüssigmedium wurden der Transformationsansatz für 2-4 h unter Schütteln bei 28°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 sec bei 16000xg. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden schließlich auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgebracht und für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar waren.

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von *fet3fet4*, *ctr1* bzw. *smf1*-Hefestämmen wurde in Anlehnung an die Li-Acetat-Methode von Gietz und Schiestl (1991) durchgeführt. Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurde zunächst eine Hauptkultur in 50ml YPD (pH4 für *fet3fet4*) mit einer optischen Dichte bei 600nm (OD_{600}) von 0,15 angeimpft. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einer OD_{600} von 0,5-0,6 durch Zentrifugation für 3 min bei 1000xg. Die Zellen wurden einmal in 1 Volumenanteil H_2O, sowie einmal in 1/4 Volumenanteil LiSorb (100mM LiOAc; 10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA; 1M Sorbitol) gewaschen und pro 50ml Kultur in 300µl LiSorb resuspendiert. Danach wurden pro 50µl Hefesuspension 7µl einzelsträngige „Carrier-DNA“ (Deoxyribonucleic acid Sodium Salt Type III from Salmon Testes, Sigma-Aldrich, 2mg/ml) zugeben. Die Zellen wurden aliquotiert und direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C gelagert.
Für die Transformation kompetenter Hefezellen wurde zu 50µl Zellen 1-2µg Plasmid-DNA und 300µl LiPEG (100mM LiOAc; 10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA; 40% PEG3500) gegeben, gut vermischt und 20 min inkubiert. Danach wurden 35µl DMSO zugefügt und es erfolgte ein Hitzschock im Wasserbad für 15 min bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (2 min bei 1500xg), in 200µl Selektionsmedium (SC-ura) aufgenommen und auf Selektions-Platten (SC-ura, pH3,5 für *fet3fet4*) ausgebracht. Die Inkubation erfolgte für mehrere Tage bei 30°C bis Einzelkolonien sichtbar waren.

2.3 Hefe-Komplementation

Für den Komplementationstest wurden alle Gefäße zuvor mit 0,5N HCl ausgespült, um etwaige Verunreinigungen durch Metallrückstände zu entfernen. Es wurde eine Übernachtkultur von

10ml SC-ura-Medium, pH5 (für *fet3fet4* mit 20µM $FeCl_3$) mit den transformierten *fet3fet4*, *ctr1* bzw. *smf1* Hefe-Mutanten auf eine OD_{600} von 0,01 angeimpft und bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Hefezellen in 1 Volumenanteil SC-ura, pH5 gewaschen und anschließend in 1ml SC-ura, pH5 resuspendiert. Für den Test wurden die Hefesuspensionen auf eine OD_{600} von 0,1, 0,01 und 0,005 verdünnt und je 10µl jeder Verdünnung auf SC-ura-Platten (pH5) mit einer Konzentration von 0µM, 5µM, 10µM und 20µM $FeCl_3$ (*fet3fet4*), 0mM, 0,05mM, 0,1mM und 0,5mM EDTA (*ctr1*) bzw. 0mM, 5mM, 10mM und 20mM EGTA (*smf1*) ausgebracht. Die Platten wurden bei 30°C für zwei bis vier Tage inkubiert und das Wachstum der Hefezellen wurde anschließend fotographisch dokumentiert. Die Versuche zur Akkumulation von ^{59}Fe-markiertem $FeCl_3$ in *fet3fet4* Hefe-Mutanten wurden von A. R. Meda in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. von Wirén (Institut für Pflanzenernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart) durchgeführt. Die Anzucht und Transformation der Hefen sowie die Durchführung und Auswertung der ^{59}Fe-Akkumulation erfolgte wie in Duy et al. (2007a) beschrieben.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente zur Klonierung in Plasmid-Vektoren wurden mittels Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) generiert (Saiki et al., 1988). Die PCR-Ansätze wurden nach den Empfehlungen der Enzym-Hersteller durchgeführt. Es wurden folgende DNA-Polymerasen verwendet: BioTherm *Taq*-Polymerase (Diagonal) zur PCR-Genotypsisierung und TripleMaster *Taq*-Polymerase (Eppendorf), *Pfu*-Polymerase (MBI Fermentas) bzw. Phusion™-Polymerase (Finnzymes) zur Subklonierung von PCR-Fragmenten.

3.2 Klonierungsstrategien

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, die Ligation von DNA, die Dephosphorylierung von DNA sowie die DNA-Gelelektrophorese erfolgten nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) sowie den Angaben der Hersteller der Enzyme. Die Extraktion von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Gel-Extraktion Kit QIAEX® II von Qiagen (Hilden, Deutschland). Für die Durchführung der LR-Rekombination mit dem GATEWAY System (Invitrogen) wurde ebenso nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Tabelle 4: In dieser Arbeit hergestellte Plasmid-Konstrukte.

Konstrukt	Vektor	Verwendung
mPIC1	pJET1.2	Subklonierung für *in vitro* Transkription
pPIC1	pGEM 4-Z	*in vitro* Transkription
mPIC1	pGEM 4-Z	*in vitro* Transkription
PIC1 (-stop)	pCR II	Subklonierung für Hefeexpression
PIC1	pCR 2.1	Subklonierung für Hefeexpression
sll1656 (-stop)	pCR II	Subklonierung für Hefeexpression
sll1656	pCR 2.1	Subklonierung für Hefeexpression
IRT1 (-stop)	pCR II	Subklonierung für Hefeexpression
PIC1 (-stop)	pFL61	Expression in Hefe-Zellen
sll1656 (-stop)	pFL61	Expression in Hefe-Zellen
IRT1 (-stop)	pFL61	Expression in Hefe-Zellen
PIC1	pDR195	Expression in Hefe-Zellen
sll1656	pDR195	Expression in Hefe-Zellen
PIC1 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
cTP_{PIC1} (AS 1-83)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
sll1656 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
cTP_{PIC1}-sll1656 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
gPIC1 (-stop)	pCR II	Subklonierung für Komplementation der *pic1-1* Mutante
gPIC1 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
PIC1 (-stop)	pK7FWG2	GFP-Fusion
cTP_{PIC1} (AS 1-83)	pK7FWG2	GFP-Fusion
sll1656 (-stop)	pK7FWG2	GFP-Fusion
cTP_{PIC1}-sll1656 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
PIC1 (-stop)	pH2GW7	PIC1-Überexpressionspflanzen
gPIC1 (-stop)	pKGW	Komplementation der *pic1-1* Pflanzen
NAP5	pCR2.1	Subklonierung
NAP5 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
GCN1 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
CBY-like (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
NAP13 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
NAP14 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
MTPc1 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
DTX46 (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
DNAJ-Fd (-stop)	pENTR/D/TOPO	GATEWAY-Rekombination
NAP5 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
GCN1 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
CBY-like (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
NAP13 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
NAP14 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
MTPc1 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
DTX46 (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion
DNAJ-Fd (-stop)	p2GWF7	GFP-Fusion

3.3 Isolierung von Plasmid-DNA

3.3.1 *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Zellen erfolgte durch alkalische Lyse mit SDS und NaOH aus 3-5ml Übernachtkulturen in Anlehnung an das Protokoll von Zhou et al. (1990). Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden die „Nucleobond® AX“ Plasmid Purification Midi („AX 100“) und Maxi („AX 500“) Kits von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen wurde 1ml Übernachtkultur für 3 min pelletiert (1500xg, 4°C), in 500µl Puffer S resuspendiert (10mM K_2HPO_4, pH7,2; 10mM EDTA; 50mM ß-Mercaptoethanol; 50µg/ml Lyticase aus *Arthrobacter luteus* [Sigma-Aldrich]) und

anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100µl Lysis-Puffer (25mM Tris-HCl, pH7,5; 25mM EDTA; 2,5% SDS) zugegeben und für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 166µl 3M KOAc erfolgte eine Inkubation von 10 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 16000xg und 4°C. Die DNA aus dem Überstand wurde durch die Zugabe von 800µl EtOH präzipitiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis erfolgte eine Zentrifugation für 10 min (16000xg, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 40µl H_2O aufgenommen und es wurde ein Nachverdau mit 100µg/ml RNase für 10 min bei 37°C durchgeführt. Für einen PCR-Ansatz (25µl) wurden 5µl DNA eingesetzt.

3.4 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Identifizierung und Genotypisierung von *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien wurden 2-3 Blätter mit 450µl Extraktionspuffer (0,2M Tris-HCl, pH7,5; 0,25M NaCl; 25mM EDTA; 0,5% SDS; 100µg/ml RNase) in einer Kugelmühle („Tissue Lyser“, Retsch/Qiagen) für 3 min zerkleinert und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde mit 300µl Isopropanol präzipitiert und anschließend für 5 min inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation (16000xg, 4°C) wurde das Pellet in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH8; 0,1mM EDTA) resuspendiert. Für einen PCR-Ansatz (25µl) wurden 5µl DNA eingesetzt.
Für die Isolierung großer genomischer Fragmente (z.B. *PIC1* Gen) wurden 200mg Blätter in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver mit 750µl DNA-Extraktionspuffer (1,4M NaCl; 20mM EDTA; 0,1M Tris-HCl, pH8; 3% (w/v) CTAB) und 8µl 10% DTT versetzt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde mit 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und für 15 min bei 16000xg und 4°C zentrifugiert. Die DNA in der oberen Phase wurde danach mit 1 Volumenanteil Isopropanol präzipitiert (Zentrifugation für 15 min bei 16000xg und 4°C). Das Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 400µl TE-Puffer, pH8 aufgenommen. Restliche RNA wurde durch 100µg/ml RNase für 30 min bei 37°C verdaut und es wurde erneut mit 1 Volumenanteil Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Die DNA wurde mit 1/10 Volumenanteil 3M NaOAc, pH5,6 und 2,5 Volumenanteilen EtOH für 2 h bei -20°C präzipitiert und anschließend für 10 min (16000xg, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50-100µl 10mM Tris-HCl, pH8 resuspendiert. Für einen PCR-Ansatz (50µl) wurden 1-2µl DNA verwendet.

3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ermittelt. Dafür wurde die Absorption einer verdünnten Probe bei 260nm und 320nm gemessen. Anschließend wurde die Konzentration in µg/µl nach folgenden Formeln berechnet:

DNA: $c\ [\mu g/\mu l] = (E_{260} - E_{320}) \times 0{,}05 \times f_{verd}$

RNA: $c\ [\mu g/\mu l] = (E_{260} - E_{320}) \times 0{,}04 \times f_{verd}$

E bezeichnet die Absorption der Probe bei der angegebenen Wellenlänge, f_{verd} den Verdünnungsfaktor der Probe. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280nm gemessen, um eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen festzustellen. Bei hochreinen Nukleinsäuren beträgt das Verhältnis E_{260}/E_{280} 1,8.

3.6 PCR-Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien und PIC1-Überexpressionslinen

Die genomische DNA der heterozygoten T-DNA-Insertionslinien *pic1-1* (SALK_104852), *pic1*-2 (GABI-Kat 577D06) und *pic1-3* (GABI-Kat 804F07) sowie der heterozygoten T-DNA-Insertionslinie *nap13-1* (SALK_027270) und *nap14-1* (SALK_116866) wurden in der T3- und T4-Generation (SALK-Linien) bzw. T2- und T3-Generation (GABI-Kat-Linien) mittels PCR genotypisiert. Die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für das *PIC1* Gen amplifizierten auf heterozygoten und homozygoten Pflanzen in Kombination mit dem jeweiligen T-DNA spezifischen „left border“ Oligonukleotid-Primer (SALK LBb1, GABI LB1) für *pic1-1* ein 524 bp langes, für *pic1-2* ein 716 bp langes und für *pic1-3* ein 738 bp langes Produkt (vgl. Abb. 15). Die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für das *NAP13* bzw. *NAP14* Gen erzeugten auf heterozygoten und homozygoten Pflanzen in Kombination mit dem jeweiligen T-DNA spezifischen „left border“ Oligonukleotid-Primer ein 765 bp bzw. 464 bp langes Produkt (vgl. Abb. 38). Um Pflanzen zu identifizieren, die in beiden Allelen eine T-DNA-Insertion tragen, wurden jeweils flankierende Oligonukleotid-Primer zur vorhergesagten T-DNA-Insertion verwendet. Mit DNA aus homozygoten *pic1* bzw. *nap13-1* und *nap14-1* Pflanzen konnte kein Produkt amplifiziert werden, während die amplifizierten Produkte mit DNA aus Wildtyp- und heterozygoten Pflanzen 434 bp (*pic1-1*), 582 bp (*pic1-2*) und 519 bp (*pic1-3*) bzw. 622 bp (*nap13-1*) und 517 bp (*nap14-1*) lang waren (vgl. Abb. 15 und 38).

Die Insertion des 35S::PIC1-Konstrukts in PIC1-Überexpressionslinien wurde in der T3-Generation mittels PCR-Analyse auf genomischer DNA der transgenen Pflanzenlinien mit dem genspezifischen Oligonukleotid-Primer PIC1E3fw und einem Primer, der an die attB2

Rekombinationsstelle des binären Vektors bindet, überprüft. Nachkommen, bei denen das 35S:PIC1-Konstrukt zumindest in einem Allel inserierte, konnten durch ein spezifischen PCR-Produkt von 350 bp identifiziert werden.

3.7 Sequenzierung von DNA

Alle klonierten Konstrukte und Produkte der PCR-Genotypisierung wurden zur Überprüfung sequenziert. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde entweder vom Sequenzierservice des Departments Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München oder von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3.8 RNA-Präparation aus *Arabidopsis thaliana*

Für jeden Gewebetyp wurden drei Proben von jeweils zehn (für mature Pflanzen) bis 500 (für Keimlinge) Einzelpflanzen geerntet, um die biologische Variation zu minimieren. Das Pflanzengewebe wurde nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. Die Isolierung von RNA aus den entsprechenden Pflanzengeweben erfolgte mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Bei geringer Menge an Pflanzenmaterial wurde der RNeasy Micro Kit (Qiagen) verwendet. Es wurde ein DNA-Verdau auf der Säule mit RNase-freier DNase I (Qiagen) durchgeführt.

3.9 Reverse Transkription

RNA wurde mit der Reversen Transkriptase (MMLV, Promega) in einem Volumen von 10µl unter Verwendung von 0,5-1,0µg RNA, 4µM oligo-dT-Primer, 0,5mM dNTP in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde für 2 min bei 70°C inkubiert, anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die Reaktion erfolgte nach der Zugabe von 2 Units reverser Transkriptase für 1,5 h bei 42°C.

3.10 Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Für die quantitative Echtzeit-RT-PCR wurde die cDNA in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt. Die PCR wurde mit dem „FastStart DNA Master SYBR-Green Plus“ Kit von Roche nach Herstellerangaben angesetzt, in Glaskapillaren (Roche) überführt und in einem LightCycler (Roche) durchgeführt. Es wurden 45 Zyklen durchlaufen, die sich wie folgt zusammensetzten: 1 sec bei 95°C (Denaturierung), 7 sec bei 49°C (Annealing), 19 sec bei 72°C (Elongation) und 5

sec bei 79°C (Detektion). Das durch die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für *PIC1* (PIC1LCfw und PIC1LCrev) amplifizierte Produkt umfasste ein Intronbereich des Gens, um eine Amplifikation durch Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen. Nach gleichem Prinzip wurden die genspezifischen Oligonukleotid-Primer für *IRT1* (IRT1LCfw und IRT1LCrev), *FER1* (FER1LCfw und FER1LCrev) und *FER4* (FER4LCfw und FER4LCrev) konstruiert. Zur Quantifizierung der Daten wurden die genspezifischen Signale auf die in den Proben enthaltene Ausgangsmenge an Aktin bezogen. Hierfür wurden in jede PCR mit genspezifischen Oligonukleotid-Primern zusätzlich Fragmente der Aktine AtAct2 (At3g18780) und AtAct8 (At1g49240) amplifiziert. Der relative Gehalt einer bestimmten cDNA in einer untersuchten Probe konnte daher anhand folgender Beziehung berechnet werden:

$$\text{Relativer Gehalt an cDNA} = 2^{[n(\text{Aktin})-n(\text{Gen})]}$$

wobei n die Anzahl der Zyklen bezeichnet, bei der die Menge des jeweiligen Amplifikats einen festgelegten Schwellenwert überstieg. Dieser Schwellenwert war identisch für das genspezifische und das Aktinsignal und wurde in jeder PCR so bestimmt, dass die Messpunkte innerhalb der exponentiellen Phase der PCR lagen. Der Transkriptgehalt wurde jeweils in mindestens drei biologischen Wiederholungen bestimmt.

3.11 Affymetrix Microarray-Analyse

Für die Microarray-Analyse wurden 5µg RNA aus 14 Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen von Wildtyp- und homozygoten *pic1-1* Pflanzen verwendet und auf Affymetrix „GeneChip *Arabidopsis* ATH1 Genome Arrays“ unter Verwendung des Affymetrix „One-Cycle Labeling and Control“ (Target) Kits nach Herstellerangaben (Affymetrix UK, High Wycombe, UK) hybridisiert. Es wurden je drei Col-0 Wildtyp und drei *pic1-1* Proben (n=3) im Abstand von einer Woche ausgesät und geerntet. Für jede Probe wurde RNA aus 40 Keimlingen isoliert. Die Signal-Daten wurden mittels Affymetrix „Data Mining Tool“ und „GeneChip Operating Software“ (vgl. Clausen et al., 2004) ausgewertet. Die statistische Signifikanz der Signal-Differenzen wurde mit Hilfe der SAM Software (Tusher et al., 2001) wie in Duy et al. (2007a) beschrieben, ermittelt. Die Isolation der RNA, sowie die Hybridisierung der Microarrays wurden von D. Eder durchgeführt. Die Evaluierung und Auswertung der Daten erfolgte durch Dr. U. Oster und Dr. K. Philippar (alle Department Biologie 1, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München).

4 Biochemische Methoden

4.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Extraktion von Proteinen wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert, das Pulver mit 1 Volumenanteil Extraktionspuffer (50mM Tris-HCl, pH8; 50mM EDTA; 2% LDS; 10mM DTT; 0,1mM PMSF) versetzt und gemischt. Es folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 16000xg und 4°C sedimentiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) oder Bradford (Bradford, 1976).

4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch in denaturierenden Gelen nach Laemmli (1970) mit Acrylamid-Konzentrationen (Verhältnis Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid 30:0,8) von 12,5-15% im Trenngel. Für das Sammelgel wurde 0,5M Tris-HCl, pH6,8 und für das Trenngel 1,5M Tris-HCl, pH8,8 verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 3-5 min bei 95°C in Solubilisierungspuffer (250mM Tris-HCl, pH6,8; 40% Glycerin; 9% SDS; 20% ß-Mercaptoethanol; 1 Spatelspitze Bromphenolblau) denaturiert.

4.2.2 Blau-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE wurde mit 8-16%igen Gradienten-Gelen nach der Methode von Wittig et al. (2006) zur Auftrennung von nativen Proteinkomplexen durchgeführt. Zur radioaktiven Markierung wurden zunächst 2µg mRNA des PIC1 Vorstufen- und maturen Proteins in einem Volumen von 25µl mit dem „Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate" System (Promega) nach Herstellerangaben *in vitro* translatiert. Anschließend wurden jeweils 2µl der ^{35}S-markierten Proteine in einem 10µl-Ansatz unter Verwendung von 1/10 Volumenanteil Ladepuffer (0,1% Ponceau S; 50% Glycerin) sowie 10mM Cystein und 10mM Methionin in der BN-PAGE eingesetzt. Für die Versuche mit zugesetztem Eisen wurden jeweils 2µg mRNA in einem 50µl-Ansatz mit dem „Wheat Germ System" (Promega) nach Herstellerangaben *in vitro* translatiert. Davon wurden 5µl der ^{35}S-markierten Proteine mit 0µM, 10µM und 50µM $FeSO_4$ versetzt, für 5 min auf Eis inkubiert und mit 1/10 Volumenanteil Ladepuffer (0,1% Ponceau S; 50% Glycerin) sowie 10mM Cystein und 10mM Methionin in einen 10µl-Ansatz in der BN-PAGE eingesetzt. Die Ansätze wurden jeweils auf Gradienten-Gele aufgetragen und nativ bei 4°C aufgetrennt (Wittig et al., 2006). Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt, getrocknet und über

Nacht auf Phosphoimager-Platten exponiert. Die radioaktiven Signale wurden mittels eines FLA-3000 Phosphoimager (FujiFilm, Tokio, Japan) detektiert.

4.2.3 Coomassie-Blaufärbung

Die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Gel 15 min mit Coomassie-Färbelösung (50% MeOH; 7% HAc; 0,18% Coomassie Brilliant Blue R250) unter Schütteln gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte mit Entfärbe-Lösung (40% MeOH; 7% HAc; 3% Glycerin). Anschließend wurden die Gele gewässert und unter Vakuum getrocknet.

4.3 Immunodetektion von Proteinen

4.3.1 Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot)

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry-Blot"-Apparatur (Amersham Biosciences) auf Nitrozellulose-Membranen (PROTRAN BA83, 0,2µm, Whatman/ Schleicher & Schüll) nach Kyhse-Andersen (1984) transferiert. Ausgehend von der Kathode wurde auf sechs in Kathodenpuffer (25mM Tris; 40mM Aminocapronsäure; 20% MeOH; pH7,6) getränkte Filterpapiere (0,2mm) zunächst das in Anodenpuffer 2 (30mM Tris; 20% MeOH; pH10,4) inkubierte Gel und dann die ebenfalls in Anodenpuffer 2 inkubierte Membran gelegt. Darauf wurden drei in Anodenpuffer 2 sowie sechs in Anodenpuffer 1 (300mM Tris; 20% MeOH; pH10,4) getränkte Filterpapiere gelegt, gefolgt von der Anode. Die Dauer des Transfers betrug etwa 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm^2 Membranfläche. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S (0,5% Ponceau S; 1% HAc) gefärbt und die Proteine des Größenstandards markiert.

4.3.2 Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper

Die spezifische Antigenidentifizierung erfolgte durch Reaktion der Proteine mit polyklonalen Antikörpern und anschließender Detektion mittels eines enzymgekoppelten Sekundär-Antikörpers (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG). Die Nitrozellulose-Membran wurde dreimal für 10 min in Magermilch-Puffer (1% Magermilch; 0,03% BSA; 100mM Tris-HCl, pH7,5; 150mM NaCl) abgesättigt und zusammen mit dem Antiserum in einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:1000 in TTBS (100mM Tris-HCl, pH7,5; 0,2% Tween 20; 0,1% BSA; 150mM NaCl) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min in Magermilch-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:30000 in TTBS) für 1 h inkubiert. Ungebundene Phosphatase-Konjugat-Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen für 10 min in Magermilch-Puffer entfernt. Nach

zweimaligem Waschen für 1 min in H_2O wurde die Färbereaktion durch die Zugabe der Färbelösung (100mM Tris-HCl, pH9,5; 100mM NaCl; 5mM $MgCl_2$) mit 66µl/10ml NBT (4-Nitrotetrazoliumchloridblau, 50mg/ml in 70% Dimethylformamid) und 133µl/10ml BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat, 12,5mg/ml in 100% Dimethylformamid) gestartet. Die Farbentwicklung wurde durch das Waschen in H_20 mit 50mM EDTA gestoppt.

4.3.3 Antiseren

Primäre Antikörper gegen das heterolog in *E. coli* überexprimierte und aufgereinigte PIC1 Protein (Aminosäure 155-296) aus *Arabidopsis* wurden in Kaninchen erzeugt (Pineda, Berlin, Deutschland). Die Überexpression und Aufreinigung des Proteins wurde von K. Mayer (Department Biologie 1, Biochemie und Physiologie der Pflanzen, Ludwig-Maximilians-Universität München) wie unter Duy et al. (2007a) beschrieben durchgeführt. Die primären Antikörper gegen Tic110 aus *Pisum sativum*, LSU aus *Pisum sativum*, LHCP aus *Pisum sativum*, RBCS aus *Nicotiana tabacum*, OEP16.1 aus *Arabidopsis* und PORB aus *Arabidopsis* waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden. Der Antikörper gegen LHCB4 aus *Arabidopsis* wurde kommerziell bei AgriSera (Vänäs, Schweden) bezogen. Die primären Antikörper gegen Ferritin waren ein Geschenk von F. Gaymard (Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier, Frankreich), gegen CSD1, CSD2 und FSD1 von M. Pilon (Colorado State University, Fort Collins, USA) und gegen PSBO-1 von R. Berzborn (Universität Bochum, Bochum, Deutschland). Alle primären Antikörper wurden in Kaninchen erzeugt. Der enzymgekoppelte sekundäre Antikörper (alkalische Phosphatase gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG) wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

4.4 *In vitro* Proteinimport

4.4.1 *In vitro* Transkription und *in vitro* Translation

Die *in vitro* Transkription von PIC1 Vorstufen- und maturem Protein erfolgte im Plasmid-Vektor pGEM-4Z (Promega). Zunächst wurden 5µg Plasmid-DNA mit 15 Units Restriktionsenzym in einem 20µl-Ansatz für 1,5 h linearisiert und anschließend für weitere 30 min mit Proteinase K (0,15 mg/ml) und 0,5% SDS bei 37°C inkubiert. Die linearisierte DNA wurde mit Phenol/Chloroform, pH8 extrahiert, mit Isopropanol präzipitiert und in 20µl RNase-freiem H_2O resuspendiert. Die *in vitro* Transkription in mRNA erfolgte mit dem „mMessage mMachine“ Kit von Ambion (Austin, USA) in einem 20µl-Ansatz unter Verwendung von 6µl linearisierter DNA, 2µl 10x Transkriptions-Puffer, 10µl 2x NTP/CAP und 2µl Enzym-Mix. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurden 2 Units DNase I zugefügt, für weitere 15 min bei 37°C

inkubiert und anschließend wurde die Reaktion mit 15µl Stopp-Lösung (5M NH_4OAc; 100mM EDTA) gestoppt. Es folgte eine RNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform, pH4,5, anschließend wurde die mRNA mit Isopropanol präzipitiert und in 15-20µl RNase-freiem H_2O aufgenommen. Die mRNA wurde entweder direkt für die *in vitro* Translation verwendet oder bei -80°C gelagert. Die *in vitro* Translation wurde mit dem „Wheat Germ System" oder dem „Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System" von Promega nach Herstellerangaben durchgeführt. Die optimale Konzentrationen an KOAc (1-100mM) sowie an *PIC1* mRNA wurden durch Test-Translations-ansätze ermittelt. Die radioaktive Markierung erfolgte durch die Zugabe von 143µCi eines ^{35}S-markierten Methionin/Cystein-Gemischs (Amersham Biosciences). Der Reaktionsansatz wurde nach der Translation für 20 min bei 50000xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde für die Import- bzw. BN-PAGE-Versuche verwendet.

4.4.2 Isolierung intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung intakter Chloroplasten aus acht Tage alten *Arabidopsis*-Keimlingen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Aronsson und Jarvis (2002). Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Es wurden 7,5-12g Pflanzengewebe in 20ml Isolations-Puffer (0,3M Sorbitol; 5mM $MgCl_2$; 5mM EGTA; 5mM EDTA; 20mM Hepes/KOH, pH8; 10mM $NaHCO_3$; 50mM Ascorbat) mit einem Polytron (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) für 2-3 sec homogenisiert und durch eine Lage Gaze (30µm Porengröße) gefiltert. Das restliche Pflanzen-material wurde in drei Wiederholungen nochmals in 20ml Isolations-Puffer homogenisiert. Das Filtrat wurde für 5 min bei 1000xg zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 1ml Isolations-Puffer resuspendiert. Die Chloroplasten wurden auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten von 30% und 80% (in 5% (w/v) Sorbitol; 25mM Hepes/NaOH, pH8; 10mM EDTA) geschichtet und für 10 min bei 1500xg im Ausschwing-Rotor ohne Bremse zentrifugiert. Die untere der zwei Banden enthielt die intakten Chloroplasten und wurde entnommen, mit 15-30ml Waschpuffer (0,3M Sorbitol; 50mM Hepes/KOH, pH8; 3mM $MgSO_4$; 50mM Ascorbat) versetzt und für 5 min bei 1000xg im Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem angemessenen Volumen an Waschpuffer resuspendiert und nach Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts direkt in den Import-Versuchen eingesetzt.

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts wurden 5µl Chloroplasten in 5ml 80% Aceton aufgenommen und die optische Dichte wurde bei 645nm, 663nm und 750nm gemessen. Die Chlorophyll-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet (Arnon, 1949):

$$\text{Chlorophyll } [\mu g/\mu l] = (A_{663} - A_{750}) \times 8{,}2 + (A_{645} - A_{750}) \times 20{,}2$$

4.4.3 Proteinimport in intakte *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten

Von dem ^{35}S-markierten PIC1 Vorstufenprotein wurde maximal 10% (v/v) des gesamten Reaktionsvolumens (200µl) eingesetzt und mit frisch isolierten intakten *Arabidopsis* Chloroplasten entsprechend 20µg Chlorophyll in einem Reaktionsansatz von 200µl mit Import-Puffer (0,3M Sorbitol; 200mM Hepes/KOH, pH8; 3mM $MgSO_4$; 200mM Ascorbat; 80mM K-Glukonat; 40mM $NaHCO_3$; 0,8% (w/v) BSA) und 10mM Methionin, 4mM $MgCl_2$ sowie bis zu 3mM ATP gemischt. Der Import-Ansatz wurde für 15 min bei 25°C inkubiert. Nach dem Import wurde eine Hälfte der Chloroplasten mit 100µg/ml Thermolysin für 30 min auf Eis behandelt. Alle Import-Reaktionen wurden mit 1 Volumenanteil kaltem Waschpuffer (0,3M Sorbitol; 50mM Hepes/KOH, pH8; 3mM $MgSO_4$; 50mM Ascorbat) dem 50mM EDTA zugegeben wurde, abgestoppt. Intakte Chloroplasten wurden pelletiert (15 sec bei 1500xg und 4°C), mit Waschpuffer gewaschen, in Solubilisierungspuffer suspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie gefärbt, getrocknet und über Nacht auf Phosphoimager-Platten exponiert. Die radioaktiven Signale wurden mittels eines FLA-3000 Phosphoimager (FujiFilm) detektiert.

4.5 Isolierung von Hüllmembranen aus *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten

Die Isolierung von *Arabidopsis* Chloroplasten erfolgte in Anlehnung an die Methode von Kunst (1998). Zu Beginn wurden vier kontinuierliche Percoll-Gradienten gegossen. Pro Gradient wurden 15ml Percoll und 15ml 2x Puffer B (600mM Sorbitol; 40mM Tricine/KOH, pH7,6; 10mM $MgCl_2$; 5mM EDTA) gemischt und anschließend bei 12000rpm für 20 min zentrifugiert (JA 20, Beckman Coulter). Danach wurde zunächst die Hälfte von 150-200g Blättern vier Wochen alter Pflanzen in 1400ml Puffer A (450mM Sorbitol; 20mM Tricine/KOH, pH8,4; 10mM EDTA; 10mM $NaHCO_3$; 0,1% BSA) in einem Küchenmixer von Braun homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch eine Lage Gaze gefiltert. Die restlichen Blätter wurden zusammen mit dem bereits zerkleinerten Pflanzenmaterial nochmals mit 1400ml Puffer A homogenisiert. Danach wurde das Filtrat auf sechs 500ml-Becher aufgeteilt und für 5 min bei 3500rpm und 4°C zentrifugiert (JA 10, Beckman Coulter). Die Pellets wurden vorsichtig mit einem Pinsel in 20ml 1x Puffer B (300mM Sorbitol; 20mM Tricine/KOH, pH7,6; 5mM $MgCl_2$; 2,5mM EDTA) resuspendiert und auf die vorbereiteten Percoll-Gradienten geschichtet. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 7200rpm und 4°C im Ausschwing-Rotor (HB 6, Sorvall) ohne Bremse wurde zunächst die obere dunkelgrüne Bande abgesaugt, bevor die untere grüne Bande abgenommen wurde. Die intakten Chloroplasten wurden in 1x Puffer B gewaschen und bei 3000rpm für 5 min im Ausschwing-Rotor mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die

Chloroplasten osmotisch in 4ml TE-Puffer lysiert und basierend auf Li et al. (1991) fraktioniert. Je 2ml Chloroplasten-Suspension wurde auf einen Saccharose-Stufengradienten (1,2M, 1,0M und 0,46M Saccharose in TE-Puffer) geschichtet und für 2 h bei 18000rpm bei 4°C im Ausschwing-Rotor (TST41.14, Kontron) zentrifugiert. Die gemischte Hüllmembranen wurden an der Grenzschicht zwischen 0,46M und 1,0M Saccharose abgenommen, mit TE-Puffer aufgefüllt und nochmals für 1 h bei 18000rpm und 4°C im Ausschwing-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in möglichst wenig TE-Puffer (ca. 100µl) aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Isolierung von getrennten äußeren und inneren Hüllmembranen aus intakten Chloroplasten von Erbse (*Pisum sativum*) erfolgte standardmäßig nach der Methode von Waegemann et al. (1992). Als Ausgangsmaterial dienten ca. zehn Tage alte Erbsen, die im Gewächshaus auf Sand kultiviert wurden.

5 Metallgehalt-Analyse

Für die Messung des Metallgehalts von *Arabidopsis* Spross- und Blattgeweben wurden je Probe 10-12 Wildtyp- bzw. homozygote *pic1-1* Pflanzen im Alter von 32 Tagen vereinigt. Die Metall-Konzentrationen wurden mittels ICP-AES-Analyse (engl.: „inductively coupled plasma atomic emission spectrometry“) bestimmt. Die Probenaufbereitung und Messungen wurden durch die Zentrale Anorganische Analytik, Institut für Ökologische Chemie der GSF (Neuherberg, Deutschland) durchgeführt.

6 Mikroskopie

6.1 Lichtmikroskopie

Zur Untersuchung der Blattmorphologie wurden vier Wochen alte Rosettenblätter von *Arabidopsis* Pflanzen in 70% EtOH entfärbt und unter einem Axiophot Mikroskop von Zeiss (Jena, Deutschland) fotografiert. Die Aufnahmen am Axiophot Mikroskop wurden von Prof. Dr. G. Wanner (Department Biologie 1, Ultrastrukturforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

6.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Ultrastruktur von Chloroplasten aus *Arabidopsis* Rosettenblättern (17 Tage alt) und Keimblättern (sieben Tage alt) wurde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht.

Die Selektion Eisen-spezifischer Signale in Ferritin-Clustern wurde elektronenmikroskopisch durch die ESI-Technik (engl. „electron spectroscopic imaging“) durchgeführt. Die Fixierung und Einbettung des Pflanzenmaterials sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden wie unter Duy et al. (2007a) beschreiben von Prof. Dr. G. Wanner (Department Biologie 1, Ultrastrukturforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

7 Computer-Analysen

Folgende Programme und Datenbanken wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Programme und Datenbanken:

Name	Referenz	Internet-Adresse
Für den Sequenzvergleich wurden folgende Datenbanken bzw. Programme verwendet:		
BLAST (Datenbank GenBank)	Altschul et al., 1997	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
PHYSCObase	Nishiyama et al., 2003	http://moss.nibb.ac.jp/
C. reinhardtii version 3.0 database		http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3
C. merolae Genome Project	Matsuzaki et al., 2004	http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/
COGs	Tatusov et al., 2003	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/
ClustalX	Thompson et al., 1997	
Die Analyse der subzellulären Lokalisation erfolgte mit folgenden Datenbanken:		
ARAMEMNON version 3.2	Schwacke et al., 2003	http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de
SUBA	Heazlewood et al., 2007	http://www.plantenergy.uwa.edu.au/applications/suba/flatfile.php
ChloroP 1.1	Reese, 2001	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
Für die Erstellung des Stammbaums wurde folgendes Programm verwendet:		
PAUP version 4.0b10	Swofford, 2002	
Zur Promoter-Analyse wurden folgende Programme verwendet.		
Neural Network Promoter Prediction	Reese, 2001	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
MatInspector at GenomatixSuite 3.4.1	Cartharius et al., 2005	http://www.genomatix.de
Die Analyse der Sekundärstruktur erfolgte mit folgenden Programmen:		
PROF	Rost und Sander, 1993	http://www.predictprotein.org
PSIPRED V2.5	McGuffin et al., 2000	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html
Zur Expressionsanalyse wurde folgende Datenbank verwendet:		
NASC Arrays		http://affymetrix.Arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl.

IV Ergebnisse

1 Die Permease PIC1

Metallionen üben aufgrund ihrer Redoxeigenschaften essentielle Funktionen im Chloroplasten aus. Obwohl beispielsweise die Synthese der in der Elektronentransportkette beteiligten Eisen-Schwefel (Fe-S)-Cluster Proteine im Stroma des Chloroplasten stattfindet, ist bis heute nur sehr wenig über den Transportweg von Eisen über die Hüllmembranen des Chloroplasten bekannt.
Auf der Suche nach potentiellen Metalltransportproteinen der Chloroplasten-Hüllmembranen dienten Proteom-Analysen von gemischten Hüllmembranfraktionen aus *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten als Ausgangsbasis (Froehlich et al., 2003; Rolland et al., 2003). Im Rahmen dieser Analysen wurde das Protein At2g15290 dem hydrophoben Proteom chloroplastidärer Hüllmembranen zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit sollte dieses Protein charakterisiert und seine Funktion als potentieller Transporter von Eisen-Ionen im Chloroplasten analysiert werden.

1.1 Die PIC1-Familie

Zu Beginn der Arbeit waren alle zu At2g15290 ähnlichen Proteine als Proteine mit unbekannter Funktion annotiert. Einige der verwandten cyanobakteriellen Proteine wurden allerdings in der Datenbank GenBank zu bestimmten orthologen Gruppen zugeordnet (Tatusov et al., 2003), unter denen sich zum Beispiel Permease-Untereinheiten von „Major Facilitator“ Proteinen und ABC-Transportersystemen (engl.: „ATP binding casette“) befanden. Deshalb wurde das Protein At2g15290 als PIC1 (engl.: „permease in chloroplasts 1“) benannt. In *Arabidopsis* liegt das kernkodierte AtPIC1 als „single-copy“ Gen vor. Über eine BLAST-Suche in der Datenbank GenBank konnten jeweils zwei orthologe Proteine zu AtPIC1 in den Monokotyledonen *Oryza sativa* (Reis) und *Zea mays* (Mais), sowie ein orthologes Protein in der dikotylen Pflanze *Lotus corniculatus* var. *japonicus* (Abb. 7) gefunden werden. Außerdem konnte über PHYSCObase ein orthologes Protein zu AtPIC1 in dem Moos *Physcomitrella patens* identifiziert werden. Neben der PIC1-Familie in Landpflanzen wurden weitere PIC1 Orthologe noch in den Genomen der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* gefunden (Abb. 7). Zu PIC1 orthologe Proteine existieren damit in allen Entwicklungsstufen photosynthetisch aktiver Eukaryoten.

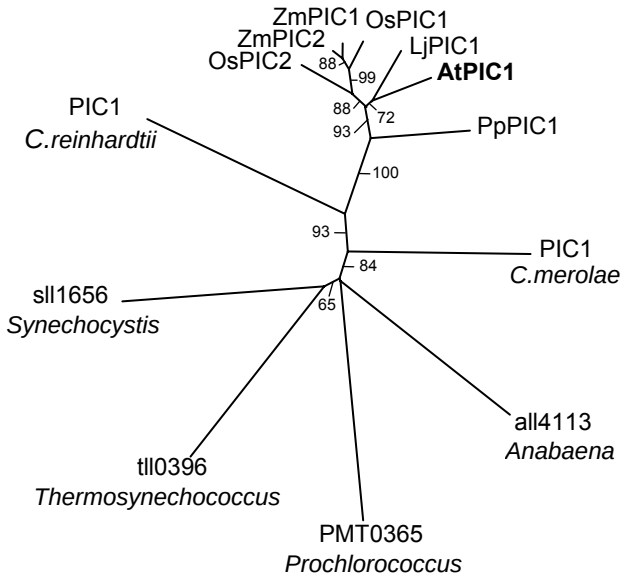


Abbildung 7: PIC1-Familie in photosynthetisch aktiven Eukaryoten und Cyanobakterien.
In Pflanzen gibt es jeweils zwei orthologe Proteine zu AtPIC1 in Reis (OsPIC1 und OsPIC2) und Mais (ZmPIC1 und ZmPIC2) und einen Verwandten in *Lotus japonicus* (LjPIC1) und dem Moos *Physcomitrella patens* (PpPIC1). In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* sowie in der Rotalge *Cyanidioschyzon merolae* wurde jeweils ein orthologes Protein zu AtPIC1 identifiziert. Zu den zu AtPIC1 verwandten cyanobakteriellen Proteinen gehören sll1656 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, all4113 aus *Anabaena* sp. PCC 7120, tll0396 aus *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 und PMT0365 aus *Prochlorococcus marinus* MIT 9313. Alle Proteine wurden durch eine BLAST-Suche der AtPIC1 Aminosäuresequenz gegen die jeweiligen Datenbanken identifiziert. Das Dendrogramm basiert auf 148 Aminosäuren, die den vier Transmembrandomänen der vorhergesagten maturen Proteine entsprechen (vgl. Abb. 8A). Die „Bootstrap"-Werte der jeweiligen Abzweigungen sind angegeben.

Ein Vergleich des unter IV.2.1 bestimmten maturen Proteins PIC1 mit prokaryotischen Proteinen zeigte ausschließlich Sequenzähnlichkeiten mit Proteinen aus Cyanobakterien (vgl. Abb. 8A). Es konnte in allen cyanobakteriellen Genomen mindestens ein orthologes Protein zu AtPIC1 identifiziert werden. Nur in dem ursprünglichen Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus*, das noch kein Thylakoidmembransystem besitzt (Nakamura et al., 2003), existiert kein PIC1 Ortholog.

1.2 Strukturmodell von PIC1

PIC1 wurde als integrales Membranprotein mit vier hydrophoben Transmembranhelices vorhergesagt (ARAMEMNON, Schwacke et al., 2003). Das Vorstufenprotein PIC1 aus *Arabidopsis* ist 296 Aminosäuren lang. Bei allen pflanzlichen PIC1 Proteinen wird ein plastidäres Transitpeptid vorhergesagt und die maturen Aminosäuresequenzen sind mit einer Identität von 60 bis 74% sehr ähnlich. Innerhalb der gesamten PIC1-Familie ist vor allem der Bereich der vier Transmembrandomänen konserviert (Abb. 8A).

A

```
                  *        20         *        40         *        60         *        80
AtPIC1    : ------SVPGDNEVDKAKLAQVAKRLEKTSRYFKRLGSIGFWGQLVSTVVAAVILSFS-IVVTGKPTSP--------ATF :  65
LjPIC1    : SQVSPAFTPSNGESEKAKLDQVAKRLEKTARYFKRLGSLGFWGQLVCTVISAVILSFS-VVVTGKVTSP--------ATF :  71
OsPIC1    : ----PTPPPTEQDIERAKFEQVVKRLGKTARYFKNLGTLGFWSQLVSTVVSAGILSFS-TVITGKVTAP--------FTF :  67
OsPIC2    : ----PAPSPAEDEAERAMLAQVSKRLEKTAQYFKTLGTLGFWSQLVCTTVSAGILSFS-AVATGNATSP--------FTF :  67
PpPIC1    : ----YDKDAFTSEEEASRLAQVSKRLERTAGYFKRFGQLGFWGQLVCTVVAAVILAFS-VAITGQATAP--------VST :  67
sll1656   : ----------MNRRNTELANPIPQAALRASVDLTTWGNIGFWVQIVLGAFSVVTFLFAGFSLSGPNRTTG-----IEAGI :  65
all4113   : MEAESEMRS------SPTVGG-APTLYGIANTIRLTGWITLWVQLGLAVVAG-LALLFASTGRGFAEQPN---AGLGIGI :  69
Np_PIC1   : MSFESARHIGNFLYMSQTPDAPSSSLRAIAQTFRLTGWISFWIQLVLGVVSSIIVLLFAIFNQRTGSPSNN--PGTGFGV :  78
PMT0365   : --------------------MADPLDLQMVSLGLRRMGWIRFWIQTILGVVVVGVLLFNNIGSSLARNSERA--LGLGPGL :  59
SYNW1602  : --------------------MADRLDFQQLSFGVERMGWIRFWIQVVLGVVVVGVLLFNNVGGSLARNAERA--VGLGPGL :  59
tll0396   : ------MERLPGNAPPPSHRGTTQPLHRLGRELQRFGWIGFWIQVVLGFVSLLIIIIVIFSRQFNINRPQNGMNSPTLGL :  74

                  *       100         *       120         *       140         *       160
AtPIC1    : YATASGLAAAFVSVFWSPGYIRLSERLRRTSIDPAKAPPRADVVKGLRSGIMVNILGMGSALLGMQATVGFLVAKALTTS : 145
LjPIC1    : YATAGGLVAGFISVFWSPGYIRLSEKLRKTANQPTKAPPRADVVKSLQNGIVVNLLGMGAAILGMQATVGLLVAKALTSA : 151
OsPIC1    : YATAAGLAAGFISVFWSPGYIRLSERLRKTASEPAKAPPRADVIRSLKNGIVLNMLGMGAAVLGMQATVGALVAKALTTS : 147
OsPIC2    : FATSIGIVAAFISVFWAPGYIRLSQRLKRTANKPAKAPPRADVVKNLKNGIVLNVLGMGAAILGMQATVGALVAKALTTS : 147
PpPIC1    : YLTAGGLAAAFLSVFWSPGYIRLSQRLREATNDPAKAPPRAEVIKKLKSGIVINLLGIGSSVLGLQATVGVLVAKALTSS : 147
sll1656   : LSAFISIVLLGFGIFFSTRYRRLGRNLKDS--EATKHPRRADILKLIRIGLIINLVGMGTAIIGGAAMSGIVLGKALSVP : 143
all4113   : FWAVCGVLALLFSVYWDFRYTRIGKHLANPN--PALHPSKADTTQAIRLGIIVSLVGILLTLIGAGATLGVLIAKSIS-Q : 146
Np_PIC1   : FLAICGLVVLGGGIYLAYRYTRIGKQLESSN--PSNRPRKSETVQVLRLGLWVNLGGTLVTLLGAQAIVGTLVARSISPQ : 156
PMT0365   : SLTSLAFLFLLYSLWQGWLIVRLGRALNSN-----VRPSRGETSRLLRRGVIVDLLGLVFSSIGYQSLAGSLFVQASM-Q : 133
SYNW1602  : SLTTLAFLVLLYSLWQGWLIVRTGRAIDSG-----ARPSRGETARLIKRGLIADLLGLVFAAIGYQALAGSLFVQASM-Q : 133
tll0396   : VLAIIGLVFLGVSIYCCYRYPQLGRRLDQPE----KRPTKEHVIRSLNIGLWVNIAGMIFTVAAAEWNVGMLLLKVLSIP : 150

                  *       180         *    * 200         *       220
AtPIC1    : ANPFYQG---VSQGYSPVLALDVFLVQASANTLLSHFLGLVCSLELLRSVTVP-NSESVVVPKVA-- : 206
LjPIC1    : ANPYYQG---IAPGSSPVLALDVFLVQASANTLLSHFLGLVFSLELLRSVTLP-PSEALPFPKFA-- : 212
OsPIC1    : AVPYYQA---TSPGQSPVLALDVFLVQASANILLSHFLGLASSLELLRSVAIP-PAEAAAA------ : 204
OsPIC2    : AVPYYQG---ISPGQSPVLSLDVFLVQASANTLLSHFLGLSSTLELLRSVTLT-KVEAASTPRSQPA : 210
PpPIC1    : SVPYLQG---ASPQFSPVLALDVFLVQASGNALVAHFLGLVFALELLRSVTLSQPPPDNVIPRAA-- : 209
sll1656   : PGTFASA---ADPN-RFVQSTDLLAIQANINTTIAHFTGLLSSLWLLDRLNK--------------- : 191
all4113   : PPGVAIT-----DPNKIIRALDVFVMVGNINGLAAHFVGALASIWLLERVHQH-------------- : 194
Np_PIC1   : AITTQFF-----DPTRIISGLDMLVVQANTNTVSAHFAGLIASLWLLNRINRP-------------- : 204
PMT0365   : APGISIGAGRSALDNYPITSIEMLSVLSNTQVLFAHLVGLIFSLWLLQRIYRTG------------- : 187
SYNW1602  : TPGIAIG-GRGMADNLAITSIEMLSVLSNTQVLFAHLIGLLFSLWLLQRIYRTS------------- : 186
tll0396   : QGAAVYA------TNVLIEPLEIFVIQAKVNTLAAQLTGIIVALWLLRCVRRPV------------- : 198
```

B

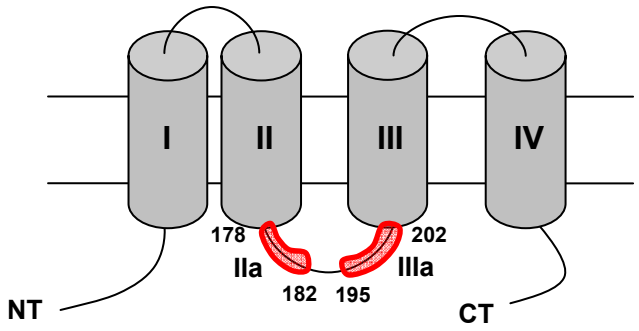


Abbildung 8: Aminosäurevergleich und Strukturmodell von PIC1 Proteinen.
(A) Aminosäurevergleich von Mitgliedern der PIC1-Familie in Eukaryoten und Cyanobakterien. Es wurden nur die vorhergesagten maturen Proteinsequenzen verwendet. Die Balken geben die Position der vier konservierten Transmembrandomänen an. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Die zwei roten Balken markieren die zwei kurzen α-Helices zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne. Der Stern repräsentiert das konservierte Histidin. **(B)** Strukturmodell von PIC1. Die vier Transmembranhelices sind durch graue Zylinder dargestellt. Die rot-hinterlegten Bereiche markieren die zwei kurzen α-Helices IIa und IIIa, die begrenzenden Aminosäuren sind nummeriert. CT: C-Terminus; NT: N-Terminus.

Um die Struktur von PIC1 genauer bestimmen zu können, wurde mittels den Vorhersageprogrammen PROF (Rost und Sander, 1993) und PSIPRED V2.5 (McGuffin et al., 2000) die Sekundärstruktur von PIC1 basierend auf den abgebildeten maturen Proteinsequenzen der PIC1-Familie (Abb. 8A) analysiert. Mit beiden Programmen wurden die vier hydrophoben Transmembranhelices annähernd deckungsgleich vorhergesagt. In der vierten Transmembranhelix ist ein konserviertes Histidin lokalisiert, das mit Ausnahme von tll0396 aus *Thermosynechococcus elongatus* in allen maturen Proteinsequenzen der PIC1-Familie zu finden ist (Abb. 8A). Zudem wurden zwei weitere α-Helices (IIa und IIIa) zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne ermittelt, die nicht in die Membran inseriert werden (Abb. 8B). Die zwei Helices sind durch eine Schleife von zwölf Aminosäuren getrennt. Helix IIa umfasst nur fünf Aminosäuren (178-182), während Helix IIIa acht Aminosäuren (195-202) lang ist.

2 Lokalisation von PIC1 in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran

Das Vorkommen in einer gemischten Hüllmembranfraktion von *Arabidopsis* Chloroplasten, die enge Verwandtschaft zu cyanobakteriellen Proteinen und die Vorhersage eines plastidären Transitpeptids deuten auf ein Vorkommen von PIC1 im Chloroplasten hin. Die genaue subzelluläre Lokalisation von AtPIC1 wurde daher im Folgenden anhand verschiedener experimenteller Ansätze bestimmt.

2.1 Import von PIC1 in *Arabidopsis* Chloroplasten

Die Durchführung von *in vitro* Importexperimenten ermöglicht eine Aussage darüber, ob das Vorstufenprotein PIC1 in den Chloroplasten importiert wird. Gleichzeitig kann durch die Abspaltung des N-terminalen Transitpeptids durch die stromale Prozessierungspeptidase die Größe der maturen Form von PIC1 ermittelt werden. Daher wurde das *in vitro* translatierte, ^{35}S-markierte Vorstufenprotein PIC1 wie unter III.4.6.3 beschrieben für Importexperimente in isolierte Chloroplasten aus acht Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen eingesetzt.

Die Importexperimente in isolierte, intakte Chloroplasten zeigten, dass das Vorstufenprotein PIC1 an die Oberfläche der Chloroplasten bindet, über die Hüllmembranen importiert und zu einem maturen Protein von ca. 22,5kDa prozessiert wird (Abb. 9). Die Nachbehandlung der Importreaktion mit der Protease Thermolysin bestätigte den Import von PIC1. Das noch oberflächlich gebundene Vorstufenprotein wurde durch die Protease abgebaut, während das mature PIC1 Protein noch zu detektieren war, da die Protease die Hüllmembranen nicht durchdringen kann (Abb. 9). Zusätzlich zeigten alle Experimente ein intermediäres Import-

Produkt von ca. 23,5kDa. Die Reduktion des Vorstufenproteins (31kDa) auf 22,5kDa des maturen Proteins ließ ein etwa 80-90 Aminosäuren langes Transitpeptid vermuten. In einer unabhängigen Arbeit wurde mittels N-terminaler Sequenzierung die Lage der Prozessierungsstelle zwischen der Aminosäure 90 und 91 eindeutig bestimmt (Teng et al., 2006). Aufgrund dessen wurde im Folgenden von einem maturen PIC1 Protein mit einer Größe von 206 Aminosäuren ausgegangen (siehe Aminosäurevergleich der PIC1-Familie in Abb. 8A). Rechnerisch ergibt sich damit ein Molekulargewicht von 21,9kDa.

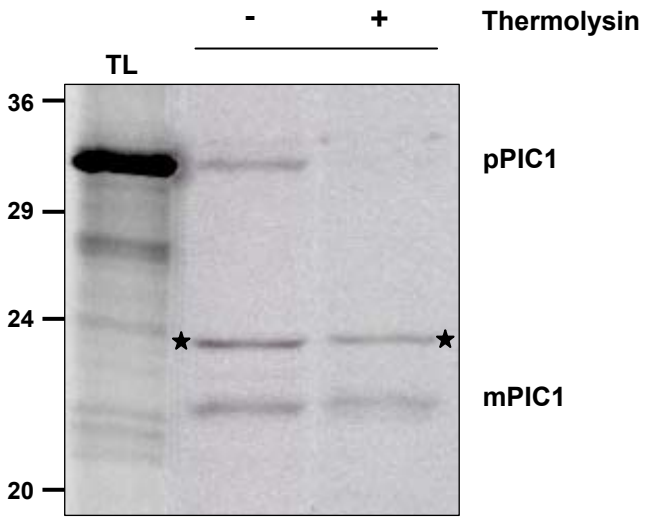


Abbildung 9: *In vitro* Import von PIC1 in *Arabidopsis* Chloroplasten.
Isolierte Chloroplasten (entsprechend 10µg Chlorophyll) aus Kotyledonen acht Tage alter *Arabidopsis* Pflanzen wurden mit ^{35}S-markiertem Vorstufenprotein PIC1 inkubiert. Nach der Importreaktion wurden die Chloroplasten entweder ohne (-) oder mit (+) der Protease Thermolysin behandelt. Die Reaktionsansätze wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Der Stern markiert die intermediäre Form von PIC1. TL: 10% des in der Importreaktion eingesetzten Translationsprodukts; pPIC1: Vorstufenprotein; mPIC1: matures Protein. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

2.2 Immunodetektion von PIC1 in Hüllmembran-Fraktionen von *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten

Die Lokalisation von PIC1 innerhalb des Chloroplasten wurde mithilfe einer Fraktionierung von *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten in Hüllmembranen, Stroma und Thylakoidmembran sowie anschließender Immunoblotanalyse weiter untersucht. Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von AtPIC1 (Aminosäure 155-296) verwendet. Die Fraktionierung von Chloroplasten aus vier Wochen alten *Arabidopsis* Rosettenblättern und zehn Tage alten Erbsen Pflanzen erfolgte wie unter III.4.7 bzw. III.4.8 beschrieben, die Fraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem PIC1 Antikörper immunodekoriert. Als Kontrollen für die Reinheit der einzelnen Fraktionen wurden Antiseren gegen die

Markerproteine Tic110 (Protein-Translokase der inneren Hüllmembran von Chloroplasten), LSU (Große Untereinheit der RuBisCO im Stroma) und LHCP (Lichtsammelkomplex der Thylakoidmembran) verwendet.

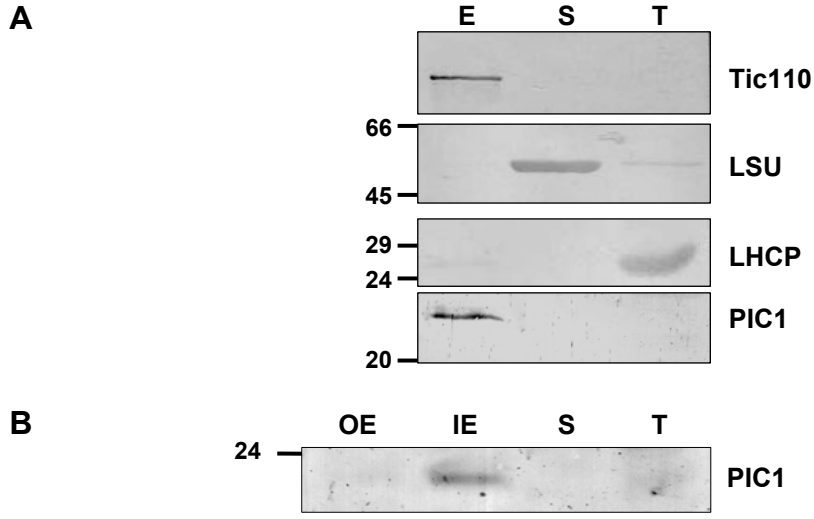


Abbildung 10: Immunoblotanalyse von PIC1 in fraktionierten *Arabidopsis*- und Erbsenchloroplasten.
Es wurden Chloroplasten von vier Wochen alten *Arabidopsis* Rosettenblättern **(A)** und zehn Tage alten Erbsen-Pflanzen **(B)** in gemischte Hüllmembranen (E) bzw. in äußere (OE) und innere (IE) Hüllmembranen, Stroma (S) und Thylakoidmembranen (T) fraktioniert und gleiche Proteinmengen (25µg) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion von PIC1 erfolgte mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Teil von PIC1. Die Antiseren gegen die Markerproteine Tic110 (innere Hüllmembran), LSU (Stroma) und LHCP (Thylakoidmembran) wurden als Kontrollen benutzt. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Der PIC1 Antikörper erkannte eine Bande von ca. 22,5kDa in der Hüllmembran-Fraktion von *Arabidopsis* Chloroplasten (Abb. 10A). Diese Größe des maturen PIC1 Proteins deckt sich mit der molekularen Masse nach dem Import des Vorstufenproteins in isolierte Chloroplasten (vgl. Abb. 9) und dem errechneten Molekulargewicht von 21,9kDa. Außerdem wurde die mature Form von PIC1 aus Erbse in der inneren Hüllmembran-Fraktion auf der erwarteten Höhe von 22,5kDa detektiert (Abb. 10B). Zudem erkannte der PIC1 Antikörper in dieser Fraktion ein mögliches Homooligomer von PIC1 bei ca. 45kDa (vgl. Abb. 11).
Zusammenfassend konnte basierend auf den Importexperimenten (Abb. 9), den Immunoblotanalysen (Abb. 10) und *in vivo* Lokalisationsstudien in *Arabidopsis* Protoplasten (vgl. Abb. 31) gezeigt werden, dass PIC1 ein integrales Membranprotein in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten ist.

Bei der Immunoblotanalyse fraktionierter Erbsenchloroplasten fiel in der inneren Hüllmembran ein relativ starkes Signal bei doppeltem Molekulargewicht auf, was auf eine mögliche Homooligomerbildung von PIC1 hindeutet. Um die Bindungsstabilität des potentiellen PIC1 Homodimers zu untersuchen, wurden innere Hüllmembranvesikel fraktionierter Erbsenchloroplasten vor der SDS-PAGE entweder für drei Minuten bei 95°C erhitzt oder bei Raumtemperatur inkubiert. Außerdem wurde der Einfluss des reduzierenden Agens β-Mercaptoethanol auf die Stabilität des Homodimers getestet (Abb. 11). Dabei fiel auf, dass sowohl bei Hitzedenaturierung als auch bei Inkubation unter Raumtemperatur die Bande bei 45kDa zu detektieren war. Die Zugabe oder das Weglassen von ß-Mercaptoethanol hatte keinen weiteren Einfluss auf die Signalstärke.

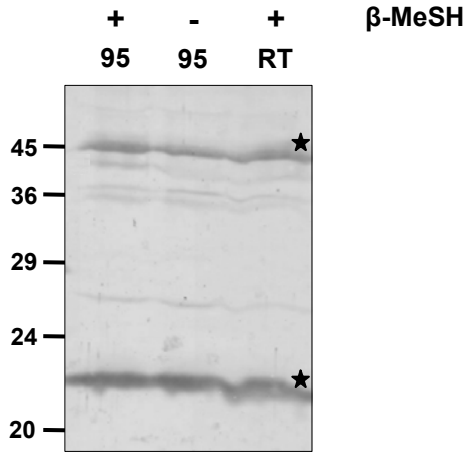


Abbildung 11: Immunoblotanalyse von PIC1 in inneren Hüllmembranen von Erbsenchloroplasten. Innere Hüllmembranvesikel (150µg Protein) fraktionierter Erbsenchloroplasten wurden für 3 min bei 95°C erhitzt oder bei Raumtemperatur (RT) in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 20% β-MeSH im Solubilisierungspuffer behandelt und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt Die Immunodetektion von PIC1 erfolgte mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Teil von PIC1. Die mature Form des PIC1-Proteins (22,5kDa) sowie ein potentielles Homodimer von PIC1 bei 45kDa sind mit einem Stern markiert. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Ein potentielles PIC1-Dimer sollte bei der Reduktion einer Disulfidbrücke, die beispielsweise über das in der vierten Transmembranhelix lokalisierte Cystein gebildet werden kann, jedoch hauptsächlich als Monomer vorliegen. Da die Bande bei 45kDa sowohl unter denaturierenden als auch reduzierenden Bedingungen stabil zu detektieren war (vgl. Abb. 11), ist es möglich, dass entweder eine unspezifische Färbung der Proteinbande durch den PIC1 Antikörper vorliegt oder im Zuge der „Aufarbeitung“ die Disulfidbindungen in den Hüllmembranvesikeln nicht mehr trennbar sind.

3 Homooligomerbildung von PIC1

Eine Möglichkeit die potentielle Bildung von PIC1 Homodimeren oder höher molekularen Komplexen zu untersuchen, ist die Blau-Native Gelelektrophorese (BN-PAGE), bei der Proteinkomplexe in ihrer nativen Form mittels einem Gradienten-Gel aufgetrennt und anschließend über Immunoblot oder radioaktive Markierung identifiziert werden können.
Um die Bildung multimerer PIC1 Komplexe auf eine einfache Art nachzuweisen, wurde daher sowohl das Vorstufenprotein als auch das mature PIC1 Protein aus *Arabidopsis* mit dem Reticulozyten-Lysatsystem *in vitro* translatiert, ^{35}S-markiert und mittels einem Gradienten-Gel wie unter III.4.4.2 beschrieben nativ aufgetrennt. Die Größen der Translationsprodukte wurden zunächst mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 12A).

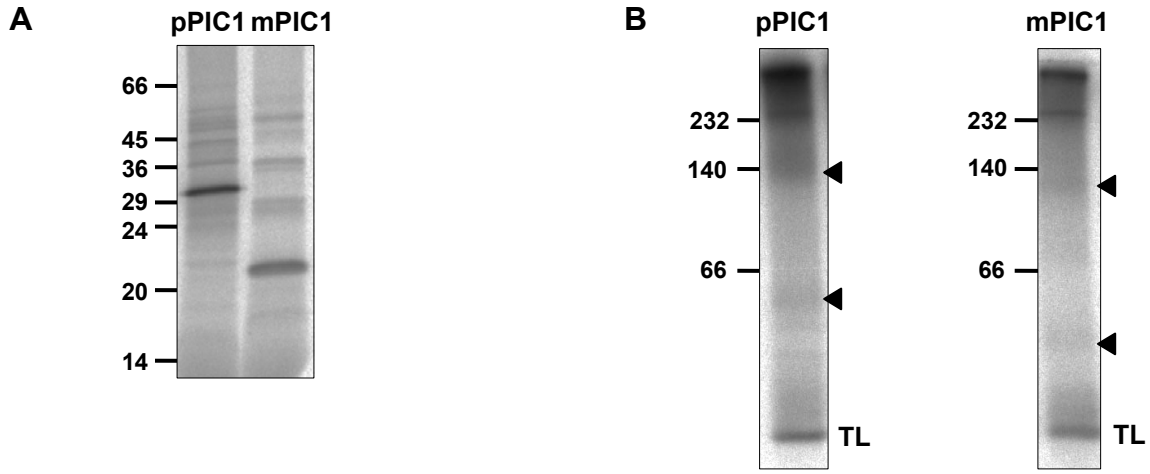


Abbildung 12: Homooligomerbildung von *in vitro* translatiertem PIC1.
(A) SDS-PAGE zur Überprüfung der Translationsprodukte. Es wurden jeweils 1µl des Translationsprodukts des PIC1 Vorstufenproteins (pPIC1; 31kDa) bzw. des maturen PIC1 Proteins (mPIC1; 22,5kDa) aufgetragen und über Autoradiographie analysiert. **(B)** BN-PAGE mit dem PIC1 Vorstufenprotein und dem maturen Protein aus **(A)**. Es wurden 2µl des jeweiligen Translationsprodukts eingesetzt. Die Ansätze wurden mittels Gradienten-Gel nativ aufgetrennt und über Autoradiographie analysiert. Die Pfeilspitzen zeigen die multimeren Komplexe an. TL: Translationsprodukt von pPIC1 bzw. mPIC1, das aufgrund der geringen Auftrennung in diesem Molekulargewichts-Bereich gleich groß erscheint. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Es zeigte sich, dass sowohl das Vorstufenprotein als auch das mature Protein homooligomere Komplexe von unterschiedlicher molekularer Größe bilden. Bei der Analyse der BN-PAGE des Vorstufenproteins PIC1 konnten neben dem monomeren Translationsprodukt von 31kDa noch zwei weitere Komplexe detektiert werden (Abb. 12B, links). Ein Komplex befand sich auf der erwarteten Höhe eines dimeren PIC1 Proteins bei ca. 60kDa, während der zweite Komplex bei 120-140kDa entsprechend eines Tetramers lief. Ebenso konnten für das mature PIC1 Protein

neben dem monomeren Translationsprodukt von 22,5kDa zwei entsprechende Komplexe im Bereich von 40-50kDa und 100-120kDa nachgewiesen werden (Abb. 12B, rechts). Folglich scheint *in vitro* translatiertes PIC1 tatsächlich Homodi- oder Tetramere zu bilden, unabhängig davon, ob das Vorstufenprotein oder das mature Protein verwendet wurde.

Da in der Literatur beschrieben wurde, dass K^+-Ionen einen entscheidenden Einfluss auf die Tetramerbildung von K^+-Kanalproteinen haben (Pagliuca et al., 2007), wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob die Zugabe von Fe^{2+}-Ionen die Komplexbildung der potentiellen Eisen-Permease PIC1 beeinflusst. Es wurden wiederum sowohl das Vorstufenprotein als auch das mature PIC1 Protein ^{35}S-markiert. Die *in vitro* Translation wurde mit einem Weizenkeim-Lysat durchgeführt, da das Reticulozyten-Lysat für diesen Zweck bereits zu viel Eisen enthielt. Die Translationsprodukte wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0µM, 10µM und 50µM) an $FeSO_4$ inkubiert und anschließend mittels einem Gradienten-Gel wie unter III.4.4.2 beschrieben nativ aufgetrennt.

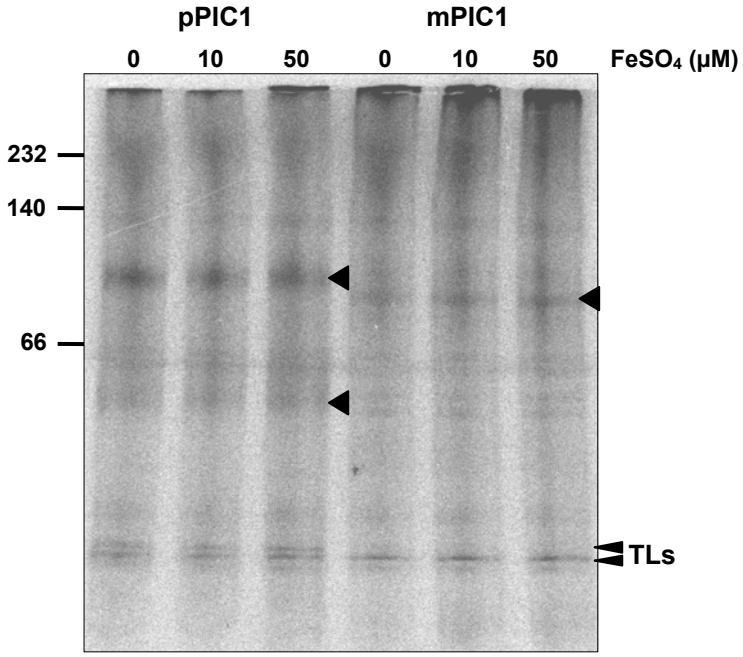


Abbildung 13: Einfluss von Fe^{2+}-Ionen auf die Komplexbildung von PIC1.
BN-PAGE mit dem Vorstufenprotein (pPIC1) und dem maturen PIC1 Protein (mPIC1). Es wurden 5µl des jeweiligen Translationsprodukts mit 0µM, 10µM und 50µM $FeSO_4$ versetzt. Die Ansätze wurden mittels einem Gradienten-Gel nativ aufgetrennt und über Autoradiographie analysiert. Die Pfeilspitzen zeigen die multimeren Komplexe an. TLs: Translationsprodukt von pPIC1 (obere Bande) bzw. mPIC1 (untere Bande). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Das Translationsprodukt des Vorstufenproteins sowie des maturen PIC1 Proteins bildeten auch in diesem Fall Homooligomere (Abb. 13). Die Zugabe von $FeSO_4$ hatte sowohl beim Vorstufenprotein als auch beim maturen PIC1 Protein keinen Einfluss auf die Komplexbildung. Im Gegensatz zu den Translationsprodukten des Reticulozyten-Lysats (vgl. Abb. 13) war jedoch ein Unterschied im Laufverhalten der Komplexe zu erkennen, da die potentiellen tetrameren Komplexe als deutlich definiertere Banden bei ca. 120kDa (Vorstufenprotein) bzw. ca. 80kDa (matures Protein) zu erkennen waren. Ein mögliches Dimer des PIC1 Vorstufenproteins wurde bei etwa 60kDa detektiert, war aber für das mature Protein nicht nachweisbar.
Diese *in vitro* Untersuchungen legen nahe, dass die potentielle Eisen-Permease PIC1 auch *in vivo* einen transmembranen Kanal oder Transporter ausbilden kann, der sich höchstwahrscheinlich aus einem Homotetramer zusammensetzt.

4 Das Gen *PIC1*

In *Arabidopsis* wird *PIC1* von einem „single-copy" Gen (At2g15290) kodiert, das insgesamt 1890 Basenpaare (bp) lang ist und vier Exons umfasst (vgl. Abb. 15). Die Analyse des Promoterbereichs ergab eine pflanzliche TATA-Box sowie einen daraus resultierenden Transkriptionsstart, der 206 bp vom Translationsbeginn in 5'-Richtung liegt. Für die *PIC1* mRNA wurde ein 3'untranslatierter Bereich (3'UTR) von 186 bp annotiert (GenBank Nummer NM_127089, Datenbank GenBank). Der vorhergesagte offene Leserahmen von *PIC1* sowie die Länge des 5'UTR wurden mittels reverser Transkription auf *Arabidopsis* Blatt-RNA experimentell bestätigt.

4.1 Expressionsmuster von *PIC1*

Um einen Überblick über das Expressionsmuster von *PIC1* in verschiedenen Pflanzengeweben zu erhalten, wurden die Microarray Daten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al., 2005) herangezogen. In *Arabidopsis* ist *PIC1* ubiquitär in allen Entwicklungsstadien der Pflanze exprimiert, wobei eine erhöhte Transkriptmenge in Keimblättern, den ersten beiden Blättern und dem Sprossmeristem sieben Tage alter Pflanzen sowie in jungen Rosettenblättern 17-Tage alter Pflanzen zu finden ist (Abb. 14A). Nur in maturen Pollen ist keine *PIC1* mRNA detektierbar (nicht gezeigt). Um dieses Expressionsmusters von *PIC1* experimentell zu überprüfen, wurde mRNA aus Keimlingen bzw. aus Kotyledonen und Wurzeln sieben Tage alter *Arabidopsis* Pflanzen isoliert, revers-transkribiert und mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR analysiert. Es zeigte sich, dass ganze Keimlinge einen relativ hohen Gehalt von 1500 *PIC1* Transkripten pro

10000 *Aktin* Transkripten aufweisen (Abb. 14B). Wurden Keimblätter und Wurzeln getrennt analysiert, konnte bestätigt werden, dass der größte Anteil an *PIC1* mRNA aus grünen Kotyledonen stammt. In Wurzeln war dagegen nur etwa 21% der *PIC1* mRNA Menge der Kotyledonen enthalten (Abb. 14B).

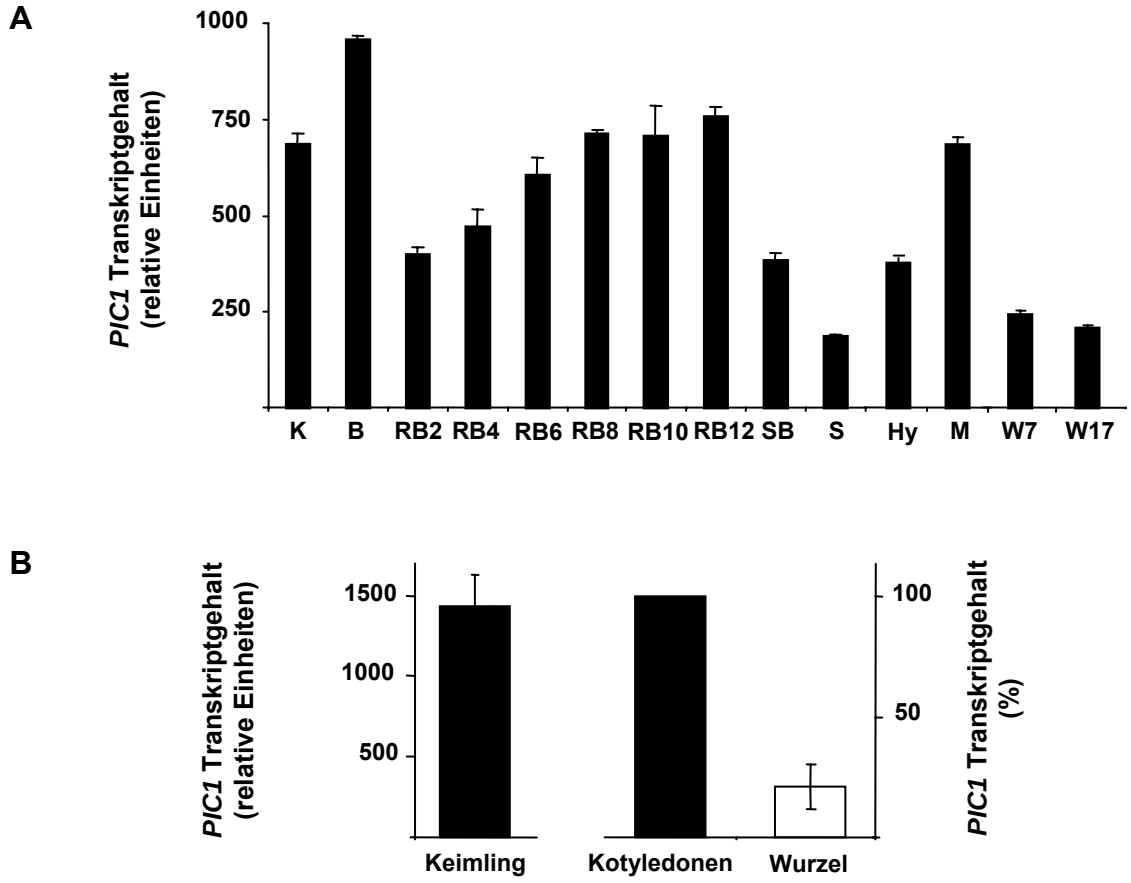


Abbildung 14: Expressionsmuster von *PIC1*.
(A) Transkriptionsprofil von *PIC1* während der Pflanzenentwicklung. Die Daten stammen aus Experimenten des AtGenExpress Konsortiums (Schmid et al., 2005). Die Signalintensitäten wurden aus drei biologischen Wiederholungen (± SA) gemittelt. K: Kotyledonen sieben Tage alter Pflanzen, B: 1. und 2. Blatt sieben Tage alter Pflanzen, RB2 bis 12: Rosettenblatt zwei bis zwölf von 17 Tage alten Pflanzen, SB: Stängelblatt von 21 Tage alten Pflanzen, S: seneszente Blätter 35 Tage alter Pflanzen, Hy: Hypokotyle sieben Tage alter Pflanzen, M: Sprossmeristem sieben Tage alter Pflanzen, W7: Wurzeln sieben Tage alter Pflanzen, W17: Wurzeln 17 Tage alter Pflanzen. **(B)** Quantifizierung der *PIC1* mRNA mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR in sieben Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen. Links: Transkriptgehalt ganzer Keimlinge relativ zu 10000 *Aktin* Transkripten (n=4; ± SA). Rechts: Transkriptgehalt in Kotyledonen bzw. Wurzeln relativ zu 10000 *Aktin* Molekülen (n=3; ± SA) und normalisiert zur Transkriptmenge in Kotyledonen, die 100% entspricht.

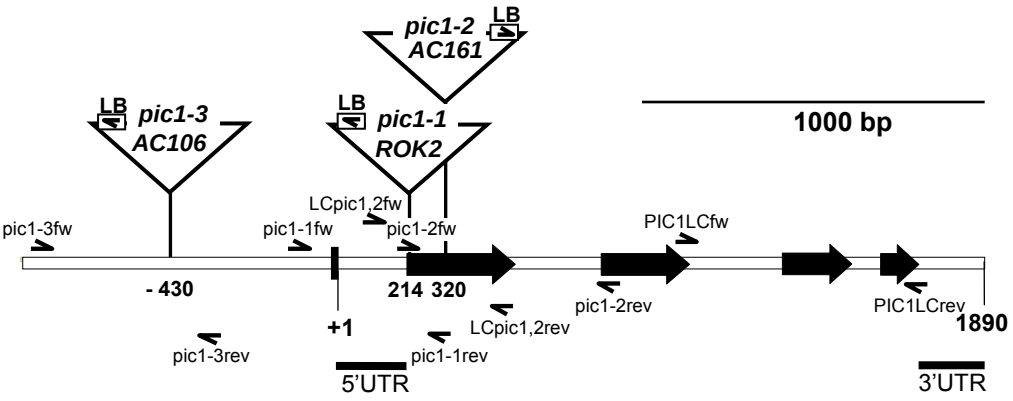
5 Charakterisierung von *PIC1* Mutanten in *Arabidopsis*

Viele pflanzliche Metalltransportproteine haben eine essentielle Funktion, da sie die Metall-Homöostase innerhalb der Pflanze bzw. der Zelle aufrechterhalten. „Knockout" Mutanten des Eisenaufnahmetransporters IRT1 zeigen beispielsweise ein reduziertes Wachstum sowie einen chlorotischen Phänotyp unter Eisenmangel (Henriques et al., 2002; Varotto et al., 2002; Vert et al., 2002). In Verlust-Mutanten der chloroplastidären Kupfertransporter PAA1 (innere Hüllmembran) und PAA2 (Thylakoidmembran) ist der photosynthetische Elektronentransport gestört (Shikanai et al., 2003; Abdel-Ghany et al., 2005a). Um die Funktion von PIC1 im Lebenszyklus der Pflanze und auf eine mögliche Beteiligung am Eisentransport über die innere Chloroplasten-Hüllmembran zu untersuchen, wurden daher im Folgenden drei unabhängige *Arabidopsis* Mutantenlinien phänotypisch analysiert.

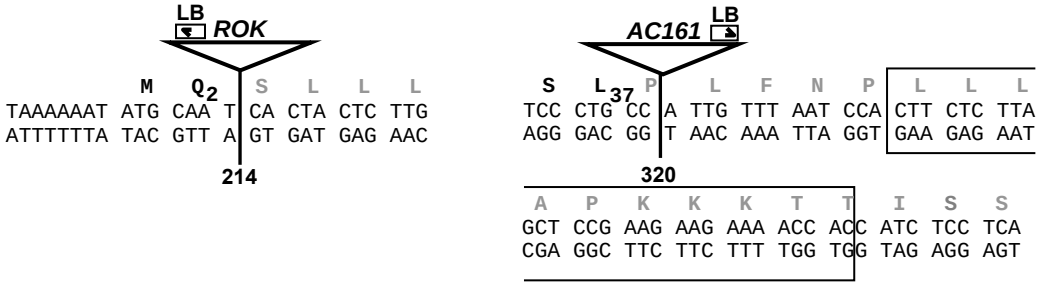
5.1 Charakterisierung der T-DNA Insertionslinien *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3*

Für das Gen *PIC1* standen in *Arabidopsis* drei unabhängige T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Für die Linien *pic1-1* (SALK_104852; Alonso et al., 2003) und *pic1-2* (GABI-Kat-Linie 577D06; Rosso et al., 2003) war eine T-DNA-Insertion im ersten Exon annotiert. Dagegen wurde für die *pic1-3* (GABI-Kat-Linie 804F07) eine inserierte T-DNA im Promoter-Bereich von *PIC1* vorhergesagt. Genomische DNA aller heterozygoten Insertionslinien wurde mittels PCR genotypisiert (Abb. 15C). Die Produkte zwischen T-DNA und den jeweiligen genspezifischen Oligonukleotid-Primern wurden sequenziert, wobei eine T-DNA-Insertion nach der zweiten Aminosäure in Exon 1 (Position 214 des *PIC1* Gens) für *pic1-1* und nach Aminosäure 37 (Position 320 des *PIC1* Gens) für *pic1-2* identifiziert wurde. Zudem wurde für *pic1-2* eine 28 Basenpaar lange Deletion der kodierenden Sequenz von *PIC1* vier Aminosäuren in 3'Richtung nach der T-DNA-Insertion nachgewiesen. Für *pic1-3* konnte die Insertion der T-DNA im Promoter-Bereich an Position -430 verifiziert werden (Abb. 15A und B).

A



B



C

Nachweis	*pic1-1*	*pic1-2*	*pic1-3*
T-DNA	pic1-1fw + LB 524 bp	LB + pic1-2rev 716 bp	pic1-3fw + LB 738 bp
Genspezifisch	pic1-1fw +pic1-1rev 434 bp	pic1-2fw + pic1-2rev 582 bp	pic1-3fw + pic1-3rev 519 bp

Abbildung 15: Charakterisierung von *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3* T-DNA-Insertionslinien.
(A) *PIC1* Gen mit den Positionen der identifizierten T-DNA-Insertionslinien. In drei unabhängigen *pic1* Insertionslinien inserierte die T-DNA an unterschiedlichen Stellen des Exon 1 (*pic1-1* und *pic1-2*) sowie im Promoter-Bereich von *PIC1* (*pic1-3*). ROK2: T-DNA der SALK Kollektion (SALK_104852), AC161 und AC106: T-DNA der GABI-Kat-Linien 577D06 und 804F07. Die Position und Richtung der „left border" T-DNA-Sequenzen (LB) und der genspezifischen Oligonukleotid-Primer zur PCR-Genotypisierung sowie zur RT-PCR-Analyse sind angegeben. Die Exonbereiche sind durch schwarze Pfeile, 5' und 3'UTR durch Balken dargestellt. +1: vorhergesagter Transkriptionsstart. **(B)** Position der T-DNA in *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten. Umrahmte Basenpaare: Deletion der kodierenden Region von *PIC1* von 28 bp in *pic1-2* Mutanten. **(C)** PCR-Genotypisierung der Insertionslinien *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3*. Es sind jeweils die Oligonukleotid-Primer Kombinationen sowie die Größe des zu erwartenden Produkts angegeben.

Um nachzuweisen, ob es sich bei den jeweiligen Insertionslinien um „Knockout" Mutanten von *PIC1* handelt, wurde RNA aus Blättern von sieben Tage alten Pflanzen isoliert, revers-transkribiert und der *PIC1* Transkriptgehalt mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR ermittelt. In homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen wurden mit den C-terminal von der T-DNA-Insertion lokalisierten Primern PIC1LCfw und PIC1LCrev im Vergleich zum Wildtyp noch etwa 10% transkribierte *PIC1* mRNA detektiert (Abb. 16A). Im Gegensatz dazu konnte mit den die T-DNA flankierenden Primern LCpic1,2fw und LCpic1,2rev kein spezifisches Produkt amplifiziert

werden (Abb. 16B). Das zeigt, dass die 10% Rest-Transkript wahrscheinlich aus unvollständiger mRNA hervorgehen, die C-terminal der T-DNA-Insertion transkribiert wurde und es sich bei den Linien *pic1-1* und *pic1-2* um vollständige „Knockout" Mutanten des *PIC1* Gens handelt. Homozygote *pic1-3* Nachkommen enthielten dagegen im Vergleich zum Wildtyp 35% normal transkribierte *PIC1* mRNA (Abb. 16A).

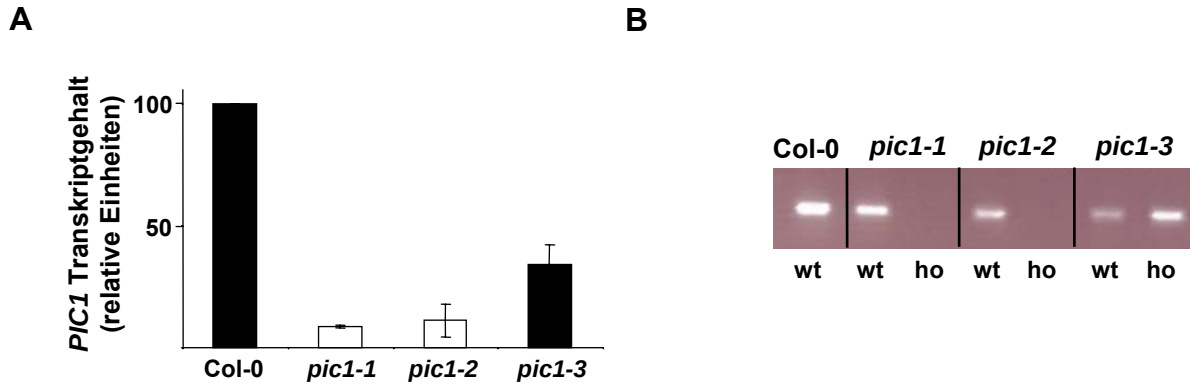


Abbildung 16: *PIC1* Transkriptgehalt der T-DNA-Insertionslinien *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3*.
(A) Quantifizierung des *PIC1* Transkriptgehalts in sieben Tage alten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und homozygoten *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3* Mutanten mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR. Der Gehalt an *PIC1* mRNA (n=3; ± SA) wurde relativ zu 10.000 *Aktin* Transkripten berechnet und auf den Gehalt in Col-0 Keimlingen, der 100% entspricht, normalisiert. **(B)** RT-PCR mit den Oligonukleotid-Primern LCpic1,2fw-rev (vgl. Abb. 15A) auf cDNA aus sieben Tage alten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und homozygoten *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3* Mutanten (ho) sowie den entsprechenden Wildtyp Allelen (wt).

5.2 Phänotypische Untersuchung homozygoter *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen

Die phänotypische Analyse der *pic1* Insertionslinien zeigte, dass homozygote *pic1-3* Mutanten keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen. Offenbar reichen etwa 35% *PIC1* mRNA aus, um normal grüne Pflanzen zu erhalten (Abb. 17C). Ebenso zeigten heterozygote *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen einen grünen Wildtyp-Phänotyp. Im Gegensatz dazu äußerte sich der Verlust von PIC1 bei homozygoten Pflanzen der Linien *pic1-1* und *pic1-2* in einem drastischen Phänotyp. Homozygote *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten waren sehr klein und chlorotisch (Abb. 17A und B), was an Pflanzen erinnert, die unter Eisenmangel leiden (Henriques et al., 2002; Varotto et al., 2002). Im frühen Keimlings-Stadium (bis ca. sieben Tage) waren die Keimblätter von *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten teilweise rot gefärbt, wahrscheinlich aufgrund der Abwesenheit von Chlorophyll und der gleichzeitigen Akkumulation von Anthocyanen (nicht gezeigt).

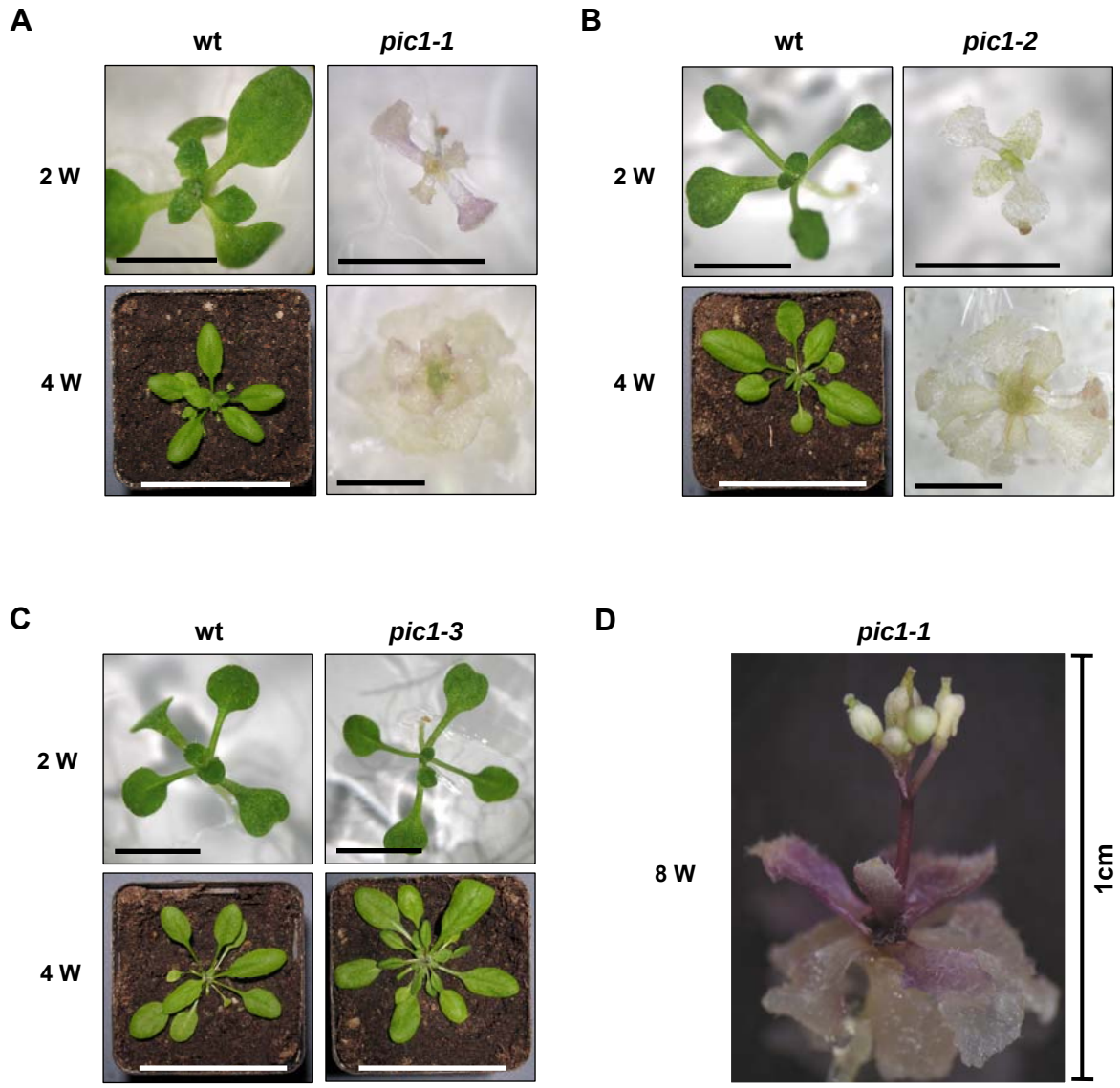


Abbildung 17: Phänotyp von homozygoten *pic1-1*, *pic1-2* und *pic1-3* Mutanten.
Es sind die Phänotypen homozygoter *pic1* Mutanten und ihre entsprechenden Wildtyp-Allele (wt) abgebildet. Das Alter der Pflanzen ist Wochen (W) angegeben. **(A)** Chlorotischer Phänotyp homozygoter *pic1-1* Mutanten. **(B)** Chlorotischer Phänotyp homozygoter *pic1-2* Mutanten. **(C)** Wildtyp-Phänotyp homozygoter *pic1-3* Mutanten. **(D)** Vollständig entwickelte, homozygote *pic1-1* Mutante nach acht Wochen Wachstum. Schwarze Balken: 0,5cm; weiße Balken: 5,0cm.

Die ersten Blätter nach 14 Tagen Wachstum dagegen waren transparent, ebenso die Blätter der voll ausgebildeten Rosette nach vier Wochen. Interessanterweise waren das Sprossmeristem und die sehr jungen Blätter von homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten leicht grün (Abb. 17A und B). Die Wurzeln zeigten keinen spezifischen Phänotyp. Sie waren im Vergleich zum Wildtyp kleiner, was aber dem gesamten Erscheinungsbild von *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen entsprach. Da homozygote *pic1-1* und *pic1-2* Keimlinge auf Erde nicht lebensfähig waren, wurden sie ausschließlich heterotroph unter Zugabe von 1% Saccharose auf MS-Agarmedium angezogen.

Die heterozygote Population von *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen spaltete nur in 20% homozygote Mutanten auf, d.h. dass etwa 5% nicht lebensfähig waren. Nach sechs Wochen entwickelten homozygote *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten einen Fruchtstand und acht Wochen alte Pflanzen waren mit einer Größe von 1cm vollständig ausgewachsen (Abb. 17D). Der Fruchtknoten und die jungen Blütenblätter waren hellgrün, während die Blätter und der Stängel Anthocyane akkumulierten. Aufgrund der Sterilität der Blüten homozygoter Mutanten, wurden *pic1-1* und *pic1-2* Pflanzen nur heterozygot vermehrt.

Obwohl *pic1-1* und *pic1-2* zwei unabhängige Mutantenlinien darstellen und somit der chlorotische Phänotyp homozygoter *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten eindeutig auf das Fehlen von PIC1 zurückgeführt werden konnte, wurde in der *pic1-1* Mutante zusätzlich eine Komplementation des Phänotyps durch PIC1 untersucht. Dazu wurde ein 3327 bp langes genomisches Fragment, bestehend aus dem *PIC1* Gen und der vorhergesagten Promoter-Region (*gPIC1*), mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* stabil in heterozygote *pic1-1* Pflanzen transformiert. Es konnten sechs unabhängige T1-Linien, die sowohl das *gPIC1*-Konstrukt als auch die T-DNA-Insertion *pic1-1* tragen, generiert werden. Eine von ihnen (*pic1-1*/*pic1-1 gPIC1*) wurde durch PCR-Genotypisierung in der T1 und T2-Generation als homozygot für das *pic1-1* Allel identifiziert (Abb. 18B). Alle Nachkommen dieser Linie waren grün und zeigten eine normale Entwicklung (Abb. 18A), was zeigt, dass der chlorotische Phänotyp der *pic1-1* Mutante durch PIC1 komplementiert werden konnte.

A

pic1-1/pic1-1 gPIC1

4 W

B

Nachweis	gPIC1
gPIC1	PIC1E3fw + attB2 422 bp
Homozygotie *pic1-1*	PIC1_5'UTRfw + PIC1_3'UTRrev 1689 bp

Abbildung 18: Komplementation des chlorotischen Phänotyps von *pic1-1* Mutanten.
(A) Es sind vier Wochen alte *pic1-1*/*pic1-1 gPIC1* Pflanzen (T2-Generation) dargestellt, die eine vollständige Komplementation des chlorotischen Phänotyps durch das *PIC1* Gen zeigen. Weißer Balken: 5,0cm **(B)** PCR-Genotypisierung von *pic1-1*/*pic1-1 gPIC1* Pflanzen in der T1- und T2-Generation. Das *gPIC1* Konstrukt wurde neben der Selektion der Pflanzen auf Kanamycin-haltigem Medium durch eine PCR mit einem genspezifischen Oligonukleotid-Primer (PIC1E3fw) und einem Plasmid-Vektor spezifischen Oligonukleotid-Primer (attB2) nachgewiesen. Die Homozygotie des *pic1-1* Allels wurde durch eine PCR mit zwei genspezifischen Oligonukleotid-Primern im 5' bzw. 3'UTR des *PIC1* Gens überprüft. Die Größen der zu erwartenden Produkte sind angegeben.

5.3 Analyse der Blattmorphologie von *pic1-1* Mutanten

Da der chlorotische Phänotyp von *pic1* Mutanten auf eine wichtige Funktion von PIC1 in allen grünen Geweben der Pflanze hindeutet, wurde im Folgenden die Blattmorphologie homozygoter *pic1-1* Mutanten näher charakterisiert. Dazu wurden zunächst Rosettenblätter vier Wochen alter Wildtyp- und *pic1-1* Pflanzen lichtmikroskopisch untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 19A) zeigten mature Blätter homozygoter *pic1-1* Mutanten ein reduziertes Größenwachstum (Abb. 19B). Außerdem war eine Abstufung in primäre, sekundäre sowie tertiäre Venen nicht erkennbar. Die sekundären und tertiären Venen hatten in *pic1-1* einen ähnlich großen Durchmesser wie primäre Venen. Zudem wurden Querschnitte von 17 Tage alten Rosettenblättern sowie von sieben Tage alten Kotyledonen von Wildtyp- und homozygoten *pic1-1* Pflanzen angefertigt und lichtmikroskopisch analysiert.

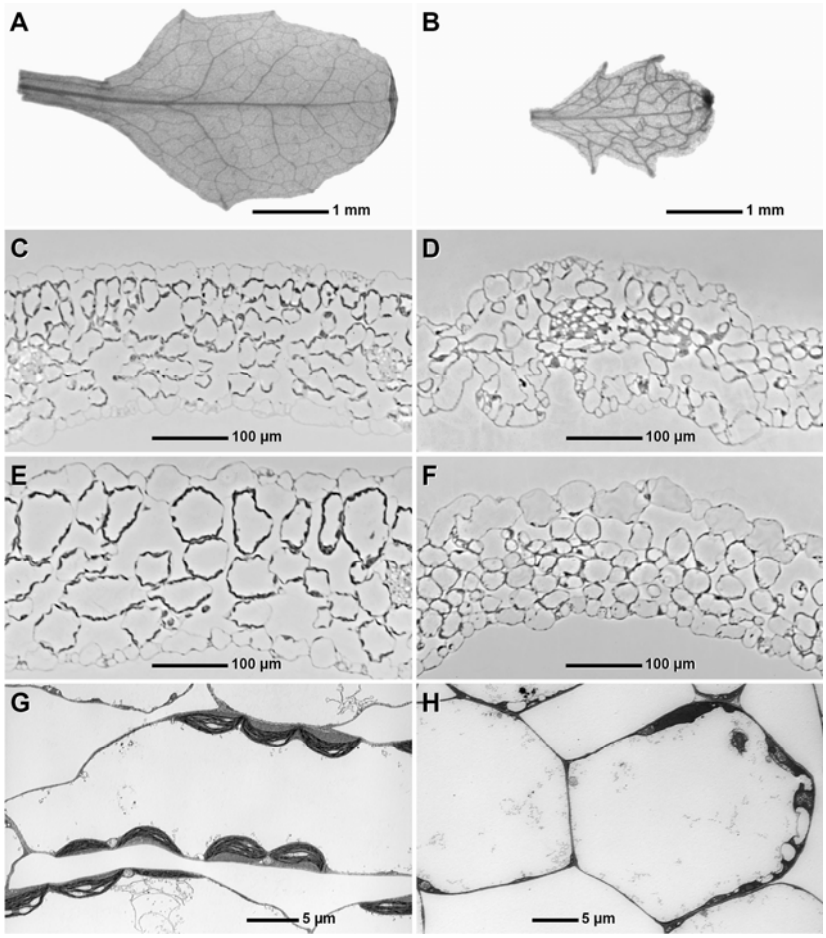


Abbildung 19: Blattmorphologie von homozygoten *pic1-1* Mutanten.
(A) und **(B)** Rosettenblätter von vier Wochen alten Wildtyp-Pflanzen **(A)** und *pic1-1* Mutanten **(B).** Die Blätter wurden mit 70% EtOH entfärbt. **(C)** bis **(F)** „Semi-dünn"-Querschnitte (500nm) von 17 Tage alten Rosettenblättern von Wildtyp-Pflanzen **(C)** und *pic1-1* Mutanten **(D)** sowie von sieben Tage alten Keimblättern von Wildtyp-Pflanzen **(E)** und *pic1-1* Mutanten **(F)**. **(G)** und **(H)** Transmissions-Elektronenmikroskopie von Zellen sieben Tage alter Kotyledonen von Wildtyp **(G)** und *pic1-1* **(H)** Keimlingen.

In *pic1-1* Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp die Unterteilung des Mesophylls in Palisaden- und Schwammparenchym nicht mehr vorhanden (Abb. 19C bis F). Außerdem war die Blattoberfläche extrem wellig und deformiert. In allen Zellen der *pic1-1* Blätter waren zudem keine intakten Chloroplasten zu erkennen (Abb. 19D und F). Dies wurde durch Aufnahmen am Transmissions-Elektronenmikroskop bestätigt. Im Gegensatz zum Wildtyp (Abb. 19G) enthielten sieben Tage alte Kotyledonen von homozygoten *pic1-1* Mutanten keine vollständig ausdifferenzierten Chloroplasten (Abb. 19H).

Der chlorotische Phänotyp der *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten lässt auf eine essentielle Funktion von PIC1 in der Pflanze schließen. Homozygote *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten zeigten sowohl einen ähnlichen chlorotischen Phänotyp als auch eine veränderte Blattmorphologie aus undifferenziertem Palisaden- und Schwammparenchym sowie abnormale Chloroplasten wie die Eisentransporter Mutante *irt1* unter Eisenmangelbedingungen (Henriques et al., 2002; Varotto et al., 2002; Vert et al., 2002). Der Verlust von PIC1 hat daher möglicherweise einen Einfluss auf die Metall-Homöostase und die Photosyntheseleistung der Pflanze.

5.4 Plastiden-Struktur und –Entwicklung in *pic1* Mutanten

Um die Entwicklung der Chloroplasten in homozygoten *pic1-1* Mutanten genauer zu charakterisieren, wurde die Ultrastruktur von Chloroplasten in sieben Tage alten Kotyledonen sowie in 17 Tage alten Rosettenblättern und dem Sprossmeristem mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht (Abb. 20). Auffällig war, dass Zellen homozygoter *pic1-1* Mutanten im Allgemeinen eine geringere Anzahl an Chloroplasten enthielten, die zudem im Vergleich zum Wildtyp wesentlich kleiner waren (vgl. Abb. 20A, D mit B, C, E, F). Außerdem war die Ausbildung des Thylakoidmembransystems in den Plastiden der Mutante erheblich gestört. In den Keimblättern der *pic1-1* Mutante konnten zwei unterschiedliche Plastiden-Typen identifiziert werden. Zum einen Plastiden, die sich in einem Proplastid-ähnlichen Stadium befanden und rudimentäre Thylakoide ausbildeten (Abb. 20B). Zum anderen waren aber auch Plastiden zu finden, die überhaupt keine Thylakoide mehr enthielten (Abb. 20C). Zusätzlich waren Plastiden zu erkennen, die sich in verschiedenen Stadien der Auflösung befanden (nicht gezeigt). In Rosettenblättern der Mutante war diese Auflösung der Thylakoide noch ausgeprägter. Es gab Plastiden, die im Stroma Membran-Vesikel unterschiedlicher Größe bildeten (Abb. 20E) sowie Plastiden ohne Thylakoide (Abb. 20F).

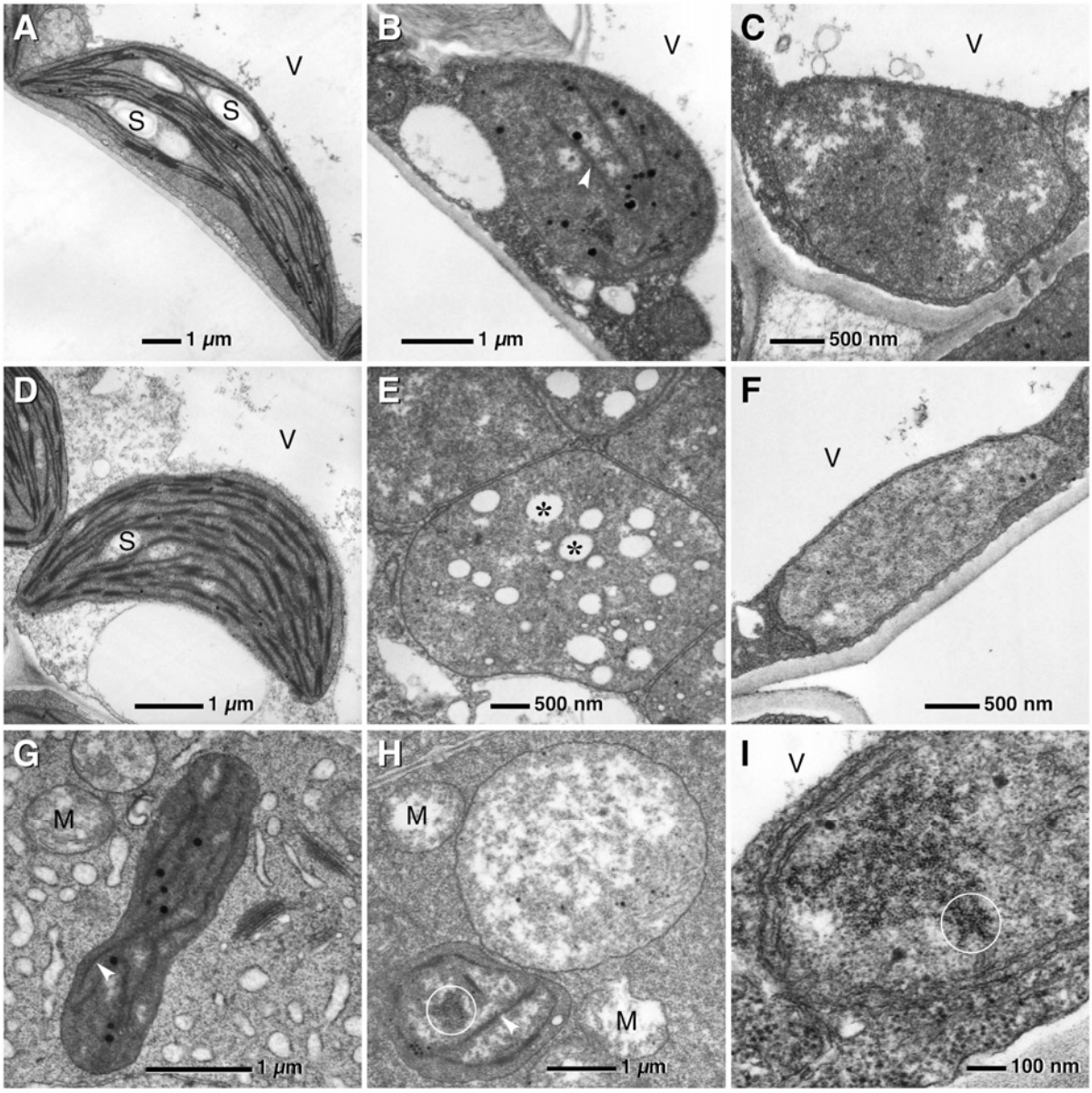


Abbildung 20: Ultrastruktur von Plastiden homozygoter *pic1-1* Mutanten.
Die Ultrastruktur der Plastiden wurde mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Plastoglobuli waren in Plastiden sowohl von Mutanten als auch von Wildtyp-Pflanzen in allen Entwicklungsstadien zu finden. M: Mitochondrien, S: Stärkekörner, V: Vakuolen. **(A**) bis **(C)** Plastiden von sieben Tage alten Kotyledonen von Wildtyp-Pflanzen **(A)** und *pic1-1* Mutanten **(B)** und **(C)**. Weiße Pfeilspitze: rudimentär entwickelte Thylakoide. **(D)** bis **(F)** Chloroplasten 17 Tage alter Rosettenblätter von Wildtyp-Pflanzen **(D)** und *pic1-1* Mutanten **(E)** und **(F)**. Stern: Membran-Vesikel im Stroma. **(G)** und **(H)** Proplastiden des Sprossmeristems 17 Tage alter Wildtyp-Pflanzen **(G)** und *pic1-1* Mutanten **(H)**. Weiße Pfeilspitze: sich entwickelnde Thylakoide, weißer Kreis: Ferritin-Cluster. **(I)** Ferritin-Cluster in Plastiden von sieben Tage alten Kotyledonen von *pic1-1* Mutanten.

Das Sprossmeristem von 17 Tage alten Wildtyp-Pflanzen (Abb. 20G) war durch Proplastiden charakterisiert, die das Thylakoidsystem entwickelten. Im Gegensatz dazu enthielt das Sprossmeristem von *pic1-1* Mutanten Zellen, in denen Chloroplasten früher Entwicklungsstadien neben Plastiden ohne Thylakoide zu finden waren (Abb. 20H).

Der Verlust der PIC1 Funktion hat daher drastische Auswirkungen auf die Biogenese der Chloroplasten und insbesondere die Ausbildung des Thylakoidmembransystems. Proplastid-ähnliche Entwicklungsstadien mit rudimentären Thylakoiden konnten nur in jungen Zellen der *pic1* Mutanten in Kotyledonen und Meristemgewebe nachgewiesen werden, während in den Plastiden maturer Blätter die Thylakoide vollständig fehlten.

5.5 Ferritin Eisenspeicherproteine in *pic1* Mutanten

Interessanterweise zeigte die Analyse der Ultrastruktur von Plastiden in homozygoten *pic1-1* Pflanzen, dass diese durch die Akkumulation von Ferritin-Aggregaten gekennzeichnet sind (vgl. Abb. 20H und I). Diese Elektronen-dichten Ferritin-Cluster (Abb. 21A) konnten ausschließlich in Plastiden von Kotyledonen, Rosettenblättern und dem Sprossmeristem der *pic1-1* Mutanten, nicht aber im Wildtyp identifiziert werden (vgl. Abb. 20A, D und G). Der Beladungszustand der Ferritin-Cluster mit Eisen wurde mittels der ESI-Technik (engl.: „electron spectroscopic imaging“) untersucht. Dabei wird die Element spezifische Ablenkung des Elektronenstrahls durch eine Spaltblende herausgefiltert, so dass im vorliegenden Fall auf Eisen spezifische Signale selektiert wurde. Durch diese Methode wurde bestätigt, dass die Ferritin-Aggregate in Plastiden der *pic1* Mutanten mit Eisen beladen sind (Abb. 21 B, rechts).

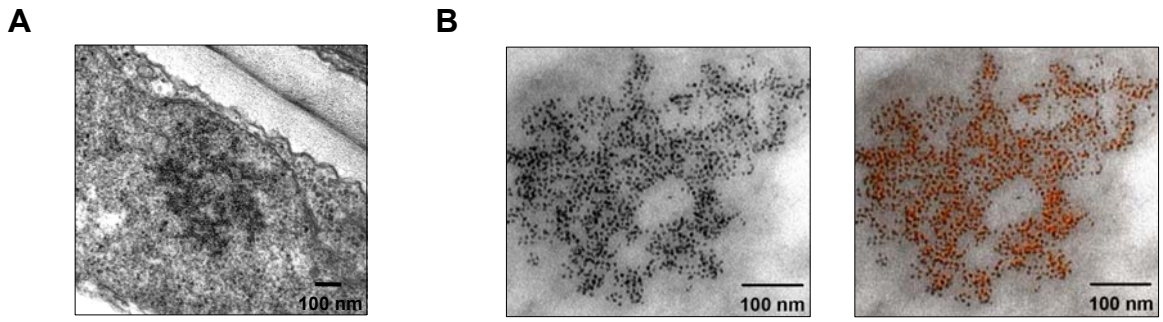


Abbildung 21: Plastiden in homozygoter *pic1-1* Mutante enthalten Ferritin-Cluster.
(A) Ferritin-Cluster in Plastiden von 17 Tage alten Rosettenblättern von *pic1-1* Mutanten. **(B)** Darstellung eines Ferritin-Clusters mittels ESI. Die Orange-gefärbten Signale (rechts) sind spezifisch für Eisenatome.

Die Akkumulation von Ferritinen in *pic1* Mutanten wurde auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden sowohl membranständige als auch lösliche Proteine aus vier Wochen alten homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* sowie Wildtyp-Pflanzen extrahiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Antikörpern gegen Ferritin immunodekoriert. In *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten konnten mature Ferritin Proteine mit einer Größe von 23,5kDa nachgewiesen werden, wohingegen in Wildtyp-Blättern kein Ferritin detektiert werden konnte (Abb. 22).

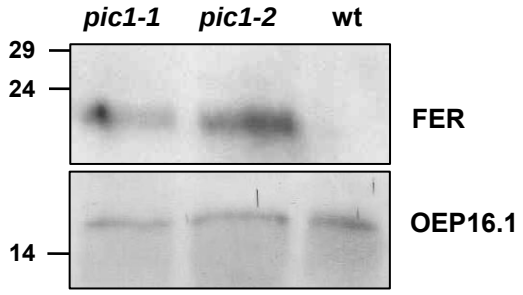


Abbildung 22: Akkumulation von Ferritin Protein in homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten.
Es wurden jeweils 50µg Protein, extrahiert aus vier Wochen alten homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten sowie Wildtyp-Pflanzen (wt), über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunodetektion von Ferritin (FER) erfolgte mit einem Antikörper, der die Ferritin-Proteinfamilie FER1-4 in *Arabidopsis* erkennt. Als Ladekontrolle wurde OEP16.1, ein Aminosäure-selektiver Kanal der äußeren Hüllmembran von Chloroplasten, aus *Arabidopsis* verwendet. Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass *pic1* Mutanten den Ferritin-Gehalt auf Proteinebene erhöhen, was zur Akkumulation von Ferritin-Clustern in den Plastiden führt (vgl. Abb. 20 und Abb. 21). Die beschriebene Eisenspeicher-Funktion von Ferritinen in Zusammenhang mit der Prävention von oxidativen Stress (Ravet et al., 2008) und der Akkumulation von Ferritin-Clustern in den *pic1* Mutanten, bestätigt, dass der Verlust von PIC1 zu einem Ungleichgewicht in der plastidären Eisen-Homöostase führt.

5.6 Regulation der Genexpression in *pic1* Mutanten: Metall-Homöostase und -Transport

Um einen Gesamtüberblick über die Genregulation in *pic1* Mutanten zu erhalten, wurde eine Affymetrix Microarray-Analyse mit 14 Tage alten Keimlingen von homozygoten *pic1-1* Mutanten und Wildtyp-Pflanzen durchgeführt.

Durch den Vergleich der Genexpression von Ferritinen in Wildtyp-Pflanzen und *pic1-1* Mutanten wurde der erhöhte Ferritin-Gehalt in den Plastiden der Mutante auch auf Transkriptebene bestätigt. Wie erwartet war der Transkriptgehalt der ausschließlich in vegetativen Organen exprimierten Gene *FER1* und *FER4* in der Mutante um den Faktor 2,49 bzw. 2,68 erhöht (Tab. 6). Außerdem zeigte sich, dass neben den beiden Ferritin-Genen *FER1* und *FER4*, die Expression weiterer, an der Metall-Homöostase beteiligter Gene in der *pic1-1* Mutante reguliert wird. So war der Transkriptgehalt der beiden Kupfer-Superoxiddismutasen CSD1 und CSD2, die zur Detoxifikation von Sauerstoffradikalen im Cytosol bzw. im Chloroplasten beitragen (Kliebenstein et al., 1998), in der Mutante um den Faktor 3,36 bzw. 3,55 erhöht (Tab. 6). Dagegen war der Transkriptgehalt der chloroplastidären Eisen-abhängigen

Superoxiddismutase FSD1 (Kliebenstein et al., 1998) in der Mutante nur geringfügig (Faktor 0,47) erniedrigt.

Tabelle 6: Regulation der Genexpression in *pic1* Mutanten: Gene mit einer Funktion in Metall-Homöostase und -Transport.
Die Affymetrix ATH1 Microarray-Analyse wurde mit 14 Tage alten Keimlingen von *pic1-1* Mutanten und Wildtyp-Pflanzen (wt) durchgeführt. Die gemittelten Signalwerte (n=3; ± SA) sind angegeben. Die Signalunterschiede wurden mit der SAM Software (Tusher et al., 2001) ausgewertet. Es sind die Richtung der Regulierung, der ermittelte Faktor der Regulierung sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) angegeben. Der AGI-Code (*Arabidopsis* Genome Initiative) für jedes Gen ist aufgelistet. Die subzelluläre Lokalisation der entsprechenden Proteine ist wie folgend definiert: C: Chloroplast, cTP: vorhergesagtes plastidäres Transitpeptid, Cyt: Cytosol, IE: innere Hüllmembran, PM: Plasmamembran, S: Stroma, ?: unbekannt.

Gen	AGI-Code	Signal *pic1-1*	Signal wt	Richtung	Faktor	P-Wert	subzelluläre Lokalisation
Metall-Homöostase							
FER1	At5g01600	1573 ± 188	632 ± 192	+	2,49	0,023	C (S)
FER4	At2g40300	304 ± 41	113 ± 33	+	2,68	0,019	C (S)
CSD1	At1g08830	1921 ± 87	572 ± 111	+	3,36	0,017	Cyt
CSD2	At2g28190	1614 ± 205	454 ± 106	+	3,55	0,047	C (S)
FSD1	At4g25100	1209 ± 293	2574 ± 534	-	0,47	0,053	C (S)
Metalltransport							
NRAMP1	At1g80830	337 ± 31	223 ± 31	+	1,51	0,029	cTP
NRAMP6	At1g15960	47 ± 5,7	25 ± 6	+	1,89	0,029	cTP
YSL1	At4g24120	150 ± 42	27 ± 12	+	5,64	0,027	?
IRT1	At4g19690	5,7 ± 1,4	28 ± 7,2	-	0,20	0,029	PM
PAA1	At4g33520	101 ± 22	185 ± 18	-	0,54	0,029	C (IE)
COPT2	At3g46900	32 ± 9	199 ± 33	-	0,16	0,017	?

Um dies auf Proteinebene zu überprüfen, wurden wiederum die Proteinextrakte von vier Wochen alten homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* sowie Wildtyp-Pflanzen verwendet. Die Extrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen CSD1, CSD2 und FSD1 aus *Arabidopsis* immunodekoriert. CSD1- und CSD2-Proteine wurden von dem jeweiligen spezifischen Antikörper nur in den Mutanten *pic1-1* und *pic1-2*, nicht aber im Wildtyp detektiert (Abb. 23). Damit konnte die in *pic1* Mutanten erhöhte Expression von CSD1 und CSD2 auch auf Proteinebene bestätigt werden. Im Gegensatz dazu war der Proteingehalt der FSD1 in *pic1* Mutanten im Vergleich zur mRNA Menge nicht signifikant erniedrigt. Die im Stroma des Chloroplasten lokalisierten Proteine CSD2 und FSD1 wurden in ihrer maturen Form von 18kDa bzw. 23kDa detektiert.

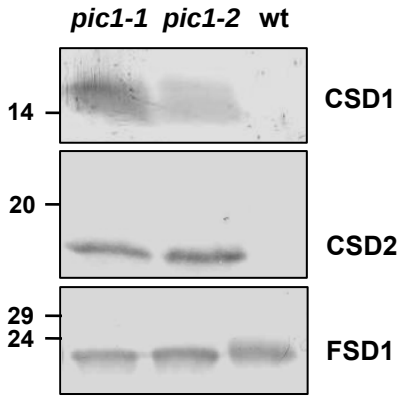


Abbildung 23: Immunoblotanalyse von Superoxiddismutasen in *pic1* Mutanten sowie Wildtyp Pflanzen.
Die Extrakte (entsprechend 50 µg Protein) aus vier Wochen alten *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten sowie Wildtyp-Pflanzen (wt) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit den Antikörpern für CSD1, CSD2 und FSD1 immunodekoriert. Als Ladekontrolle wurde OEP16.1 aus *Arabidopsis* verwendet (nicht gezeigt). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Die Analyse der Daten der Microarrays ergab weiterhin, dass auf Transkriptebene die Expression einer Reihe am Metalltransport beteiligter Gene reguliert wurde. Neben den beiden Metalltransportproteinen NRAMP1 und NRAMP6 (Curie et al., 2000), deren mRNA Gehalt in der *pic1* Mutante um den Faktor 1,51 bzw. 1,89 leicht erhöht war, war die Expression des potentiellen Eisen-Nicotianamin-Transportproteins YSL1 (Le Jean et al., 2005; Waters et al., 2006) um den Faktor 5,64 stark erhöht (Tab. 6). Im Gegensatz dazu war die Expression von *IRT1*, dem Eisentransporter in der Plasmamembran von Wurzeln (Eide et al., 1996) in der homozygoten *pic1-1* Mutante reprimiert. Da die IRT1-Signale an der Detektionsgrenze der Microarray-Analyse lagen (bei einem Wert von 25 [relative Einheiten]), wurde dies mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR in 14 Tage alten Keimlingen von *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten sowie Wildtyp-Pflanzen überprüft (Abb. 24). Im Vergleich zum Wildtyp war in *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten der Gehalt an *IRT1* Transkripten unter normalen Wachstums-Bedingungen sehr stark reduziert, was das Ergebnis der Microarray-Analyse bestätigte. Unter Eisenmangelbedingungen erhöhte sich in *pic1* Mutanten der *IRT1* Transkriptgehalt ebenso wie in Wildtyp-Pflanzen.

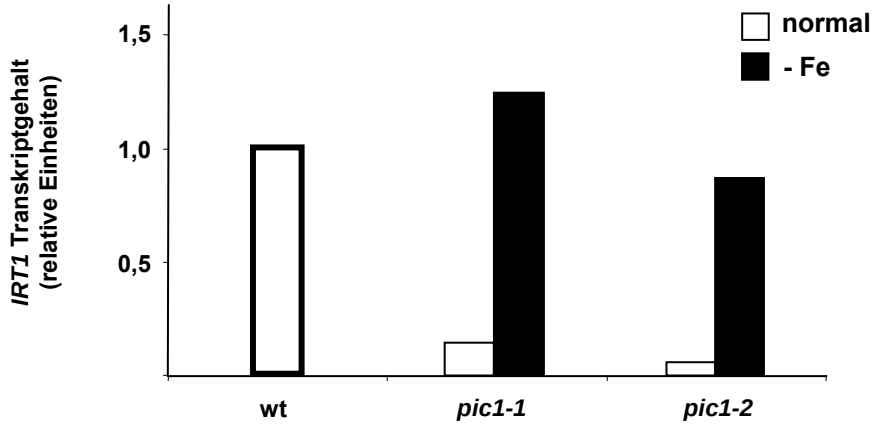


Abbildung 24: Quantifizierung von *IRT1*-Transkripten in homozygoten *pic1* Mutanten.
Es wurden 14 Tage alte Keimlinge von *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten sowie Wildtyp-Pflanzen (wt) auf MS-Medium mit 1% Saccharose (normal, weiße Balken) und Eisenmangel-Medium mit zusätzlich 300µM Ferrozine (Serva; -Fe, schwarze Balken) angezogen. Die Quantifizierung des Transkriptgehalts erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR. Der Gehalt an *IRT1* mRNA wurde relativ zu 10000 *Aktin* Transkripten berechnet und für jede Bedingung auf den *IRT1*-Gehalt in Wildtyp-Keimlingen, der auf 1,0 gesetzt wurde, normalisiert.

Außerdem war der Transkriptgehalt von Transporterproteinen wie PAA1 (Abdel-Ghany et al., 2005a) und COPT2 (Colangelo und Guerinot, 2006), die am Kupfertransport in der Pflanze beteiligt sind, in homozygoten *pic1-1* Mutanten reduziert (Tab. 6).

Die Analyse des Metallgehalts im Sprossgewebe von 32 Tage alten homozygoten *pic1-1* Mutanten und Wildtyp-Pflanzen zeigte, dass *pic1-1* Pflanzen mit 3,44 µg/g Trockengewicht doppelt so viel Kupfer enthalten wie Wildtyp-Pflanzen. Im Gegensatz dazu veränderte sich der Eisengehalt in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht (Tab. 7).

Tabelle 7: Eisen- und Kupfergehalt in Sprossgewebe von *pic1-1* Mutanten und Wildtyp-Pflanzen.
Der Eisen- und Kupfergehalt von 32 Tage alten *pic1-1* Mutanten und Wildtyp-Pflanzen (wt) wurde mittels ICP-AES-Analyse bestimmt. Die Eisen- bzw. Kupferkonzentration ist in µg pro g Trockengewicht (TG) der Pflanzen angegeben.

	Fe (µg/g TG)	Cu (µg/g TG)
pic1-1	117	3,44
wt	106	1,54

5.7 Regulation der Genexpression in *pic1* Mutanten: Photosynthese

Das heterotrophe Wachstum sowie der chlorotische Phänotyp der *pic1-1* und *pic-2* Mutanten (Abb. 17A und B), ebenso wie die gestörte Biogenese und Rückbildung der Thylakoide (Abb. 20) deuteten darauf hin, dass die Photosyntheseleistung in den *pic1* Mutanten drastisch

reduziert ist. Diese Annahme wurde durch die starke Reprimierung der Expression von Genen, die an der Photosynthese beteiligt sind, bestätigt (Tab. 8). Zugrunde gelegt wurden wiederum die Daten aus der Affymetrix Microarray-Analyse der homozygoten *pic1-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die im Folgenden beispielhaft beschriebenen Gene bilden nur eine Auswahl, da in *pic1* Mutanten die Expression aller Gene mit einer Funktion in der Photosynthese und assoziierten Prozessen stark reprimiert war. Die Transkriptgehalte von Chlorophyll-Bindeproteinen wie LHCB4, sowie Protein-Untereinheiten des Wasserspaltungs-Komplexes (PSBO-1) waren in der *pic1-1* Mutante um ein Vielfaches reduziert. Auch die Expression von Genen der Chlorophyll-Biosynthese wie die Protochlorophyllidoxidoreduktase (POR) und der Kohlenstoff-Fixierung wie die RuBisCO (RBCS-1A) war in der Mutante stark reprimiert.

Tabelle 8: Regulation der Genexpression in *pic1* Mutanten: Gene mit einer Funktion in der Photosynthese.
Die Affymetrix ATH1 Microarray-Analyse wurde mit 14 Tage alten Keimlingen von *pic1-1* Mutanten und Wildtyp-Pflanzen (wt) durchgeführt. Die gemittelten Signalwerte (n=3; ± SA) sind angegeben. Die Signalunterschiede wurden mit der SAM Software (Tusher et al., 2001) ausgewertet. Es sind die Richtung der Regulierung, der ermittelte Faktor der Regulierung sowie die entsprechenden Signifikanz-Werte (P-Werte) angegeben. Gene, die an lebenserhaltenden Funktionen des Chloroplasten beteiligt sind, werden nicht unterschiedlich exprimiert. Der AGI-Code für jedes Gen ist aufgelistet. Die subzelluläre Lokalisation der entsprechenden Proteine ist wie folgend definiert: C: Chloroplast, OE: äußere Hüllmembran, S: Stroma, T: Thylakoide.

Gen	AGI-Code	Signal *pic1-1*	Signal wt	Richtung	Faktor	P-Wert	subzelluläre Lokalisation
Photosynthese							
LHCB4.1	At5g01530	1524 ± 102	3929 ± 165	-	0,39	0	C (T)
LHCB4.2	At3g08940	921 ± 105	3954 ± 247	-	0,23	0	C (T)
LHCB4.3	At2g40100	56 ± 10	379 ± 62	-	0,15	0,016	C (T)
PSBO-1	At5g66570	2000 ± 226	4232 ± 344	-	0,47	0,016	C (T)
PORB	At4g27440	117 ± 35	239 ± 38	-	0,49	0,045	C (S)
PORC	At1g03630	182 ± 39	828 ± 120	-	0,22	0,016	C (S)
RBCS-1A	At1g67090	3855 ± 128	7420 ± 442	-	0,52	0,006	C (S)
lebenserhaltende Funktionen							
SerRS	At5g27470	582 ± 55	572 ± 85	0			C (S)
NDPK	At5g63310	765 ± 127	932 ± 89	0			C (S)
Toc 75-III	At3g46740	246 ± 19	184 ± 91	0			C (OE)
OEP16.1	At2g28900	218 ± 35	326 ± 88	0			C (OE)

Über Immunoblotanalyse wurde der Gehalt dieser Proteine in homozygoten *pic1-1* und *pic1-2* sowie in Wildtyp-Pflanzen überprüft. Im Vergleich zum Wildtyp wurde weder LHCB4 noch RBCS (kleine Untereinheit der RuBisCO) Protein in den *pic1* Mutanten detektiert (Abb. 25). Ebenso war der Proteinlevel an PORB und PSBO-1 in den Mutanten reduziert. Wie auch bei Ferritin (vgl. Abb. 22) konnte keine Akkumulation der plastidären Vorstufenproteine LHCB4, PORB und PSBO-1 nachgewiesen werden, d.h. die Proteine wurden in der *pic1-1* Mutante in den

Chloroplasten importiert und zu ihrer maturen Form prozessiert. Man kann deshalb davon ausgehen, dass im Gegensatz zum Photosyntheseapparat der Proteinimport in *pic1* Mutanten funktionsfähig ist.

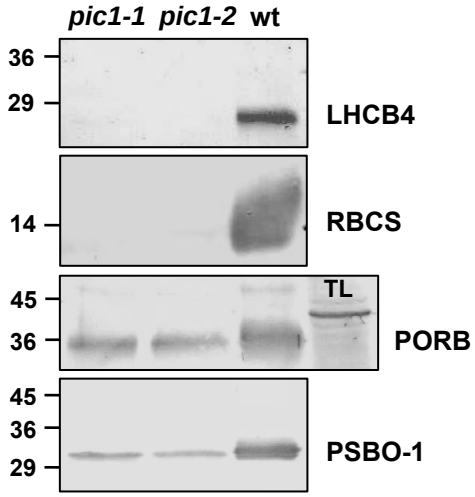


Abbildung 25: Immunoblotanalyse von LHCB4, RBCS, PORB und PSBO-1 in *pic1* Mutanten.
Die Extrakte (entsprechend 50µg Protein) aus vier Wochen alten *pic1-1* und *pic1-2* Mutanten sowie Wildtyp-Pflanzen (wt) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit den Antikörpern für LHCB4, RBCS, PORB und PSBO-1 immunodekoriert. LHCB4 reagiert mit den Proteinen LHCB4.1, -4.2 und -4.3 (siehe Tab. 6). Der PORB Antikörper detektiert PORB und PORC. TL: *in vitro* Translationsprodukt des Vorstufenproteins PORB. Als Ladekontrolle wurde OEP16.1 aus *Arabidopsis* verwendet (nicht gezeigt). Die Molekulargewichte des Proteingrößenstandards sind in kDa angegeben.

Im Gegensatz zur Regulation von Genen, die an der Metall-Homöostase bzw. in der Photosynthese beteiligt sind, waren Gene mit lebenswichtigen Funktionen im Stroma von Chloroplasten wie die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (z.B. *SerRS*) und eine Nukleosid-Diphosphat-Kinase (*NDPK*) in homozygoten *pic1-1* Mutanten nicht betroffen (Tab. 8). Auch die Gene, die für die allgemeine Import-Pore Toc75 (*Toc75-III*) und den Aminosäurekanal OEP16 (*OEP16.1*) in der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten kodieren, waren in der Mutante zu gleichem Level wie im Wildtyp vorhanden. Man kann daher davon ausgehen, dass außer der Metall-Homöostase und Photosynthese keine weiteren lebenswichtigen Funktionen wie beispielsweise die plastidäre Genexpression, der Proteinimport oder auch der Aminosäure-Transport in den Plastiden der *pic1* Mutante ausfallen.

6 Analyse von PIC1-Überexpressionspflanzen

Die Analyse von *pic1* „Knockout“ Mutanten wies bereits auf eine Funktion von PIC1 in der Metall-Homöostase des Chloroplasten und der Pflanze hin. Daher sollten im Folgenden transgene Pflanzen mit erhöhter PIC1-Expression eine weitere Möglichkeit bieten, die Funktion von PIC1 als Eisen-Permease in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten phänotypisch zu analysieren.

6.1 Charakterisierung der transformierten Pflanzenlinien

Die Herstellung von PIC1-Überexpressionspflanzen erfolgte wie unter III.1.3 beschrieben durch die stabile Transformation von *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col-0) mit der *PIC1* cDNA unter Kontrolle des CaMV 35S-Promoters. Es wurden sieben unabhängige T1-Linien, die heterozygot das 35S::PIC1-Konstrukt tragen selektiert, wobei nur fünf Linien in der T2-Generation weitervermehrt werden konnten. In der T2- und T3-Generation zeigten drei dieser Linien einen reproduzierbaren Phänotyp. Während Nachkommen der Linie #3 zu 50% grüne Pflanzen mit weißen Kotyledonen produzierten, spalteten Nachkommen der Linien #2.3 und #4.4 in 30% grüne, 45% grün-gelbe und 25% weiße Pflanzen auf (Tab. 9; vgl. Abb. 27). Eine PCR-Genotypisierung bestätigte, dass es sich bei grünen Nachkommen der Linien #2.3 und #4.4 um Wildtyp-Pflanzen und bei grün-gelben bzw. weißen Nachkommen um Pflanzen handelte, die für das 35S::PIC1-Konstrukt heterozygot bzw. homozygot sind.

Tabelle 9: Segregation der transgenen Linien 35S::PIC1ox #3, #2.3 und #4.4.
Dargestellt ist die Segregation der Linien #3, #2.3 und #4.4 in der T2-Generation. Die Unterteilung erfolgte in Pflanzen mit grünen, grün-gelben und weißen Blättern (Linien #2.3 und #4.4) sowie in Pflanzen mit grünen bzw. grünen Blättern und weißen Kotyledonen (grün/weiß, Linie #3). Die Aufspaltung in Prozent (%) sowie die Gesamtzahl der analysierten Pflanzen ist angegeben.

Linien	grün	grün-gelb	weiß	grün/weiß	gesamt
#3	69 (52%)			63 (48%)	**132**
#2.3	36 (29%)	53 (43%)	34 (28%)		**123**
#4.4	31 (32%)	44 (45%)	22 (23%)		**97**

Um Linien mit einer signifikant erhöhten PIC1-Expression zu identifizieren, wurde RNA aus 14 Tage alten Keimlingen der T2- und T3-Generation isoliert, revers-transkribiert und mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR analysiert. Dabei wurden jeweils alle grünen Pflanzen mit weißen Kotyledonen der Linie #3 sowie alle grün-gelben Pflanzen der Linien #2.3 und #4.4 untersucht. Es zeigte sich, dass die Linie #3 im Vergleich zum Wildtyp einen um den Faktor zwei erhöhten

PIC1 Transkriptgehalt aufwies, wohingegen in den Linien #2.3 und #4.4 ein signifikant erhöhter *PIC1* Transkriptgehalt gefunden wurde (Abb. 26). In beiden Linien war der Transkriptgehalt um den Faktor 23 bzw. 27 erhöht.

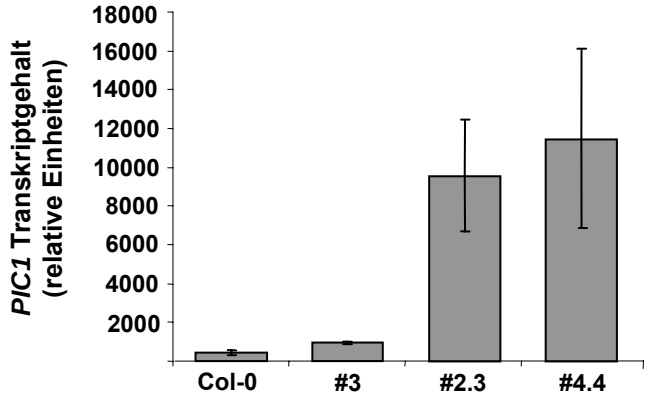


Abbildung 26: *PIC1* Transkriptgehalt in den Linien 35S::PIC1ox #3, #2.3 und #4.4.
Quantifizierung der *PIC1* mRNA mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR aus 14 Tage alten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und den transgenen Linien #3 sowie #2.3 und #4.4 der T2- und T3-Generation. Es wurden die grün-weißen (#3) und grün-gelben (#2.3 und #4.4) Keimlinge der jeweiligen Linie analysiert. Der Gehalt an *PIC1* mRNA (n=3; ± SA; für #3 nur n=2) wurde relativ zu 10000 *Aktin* Transkripten normalisiert.

Die zusätzlich generierten Linien #2 und #4.3 wiesen weder einen erhöhten PIC1 Transkriptgehalt auf, noch zeigten sie einen Phänotyp. Insgesamt wurden mit den Linien #2.3 und #4.4 zwei unabhängige PIC1-Überexpressionslinien von den ursprünglich sieben transgenen Pflanzenlinien identifiziert, die einen signifikant erhöhten Gehalt an *PIC1* Transkripten in der T2- und T3-Generation zeigen.

6.2 Phänotypische Untersuchung der Überexpressionslinien 35S::PIC1ox #2.3 und #4.4

Durch die quantitative Echtzeit-Rt-PCR konnte gezeigt werden, dass die Linien #2.3 und #4.4 einen stark erhöhten *PIC1* Transkriptlevel aufweisen. Eine nähere Untersuchung des Erscheinungsbilds der Überexpressionslinien #2.3 und #4.4 in der T2-Generation ließ außerdem einen zu Wildtyp-Pflanzen bzw. der Linie #3 unterschiedlichen Phänotyp erkennen (Abb. 27). Allerdings prägte sich der „grün-gelbe“ Phänotyp der Blätter heterozygoter Pflanzen der Linien #2.3 und #4.4 erst nach etwa drei Wochen aus (Abb. 27A). Bei einer Kultivierung der Pflanzen auf Erde war dieser Phänotyp deutlicher zu erkennen (Abb. 27B). Außerdem waren alle Pflanzen mit erhöhtem *PIC1* Gehalt auf Erde wesentlich kleiner als Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der Linie #3.

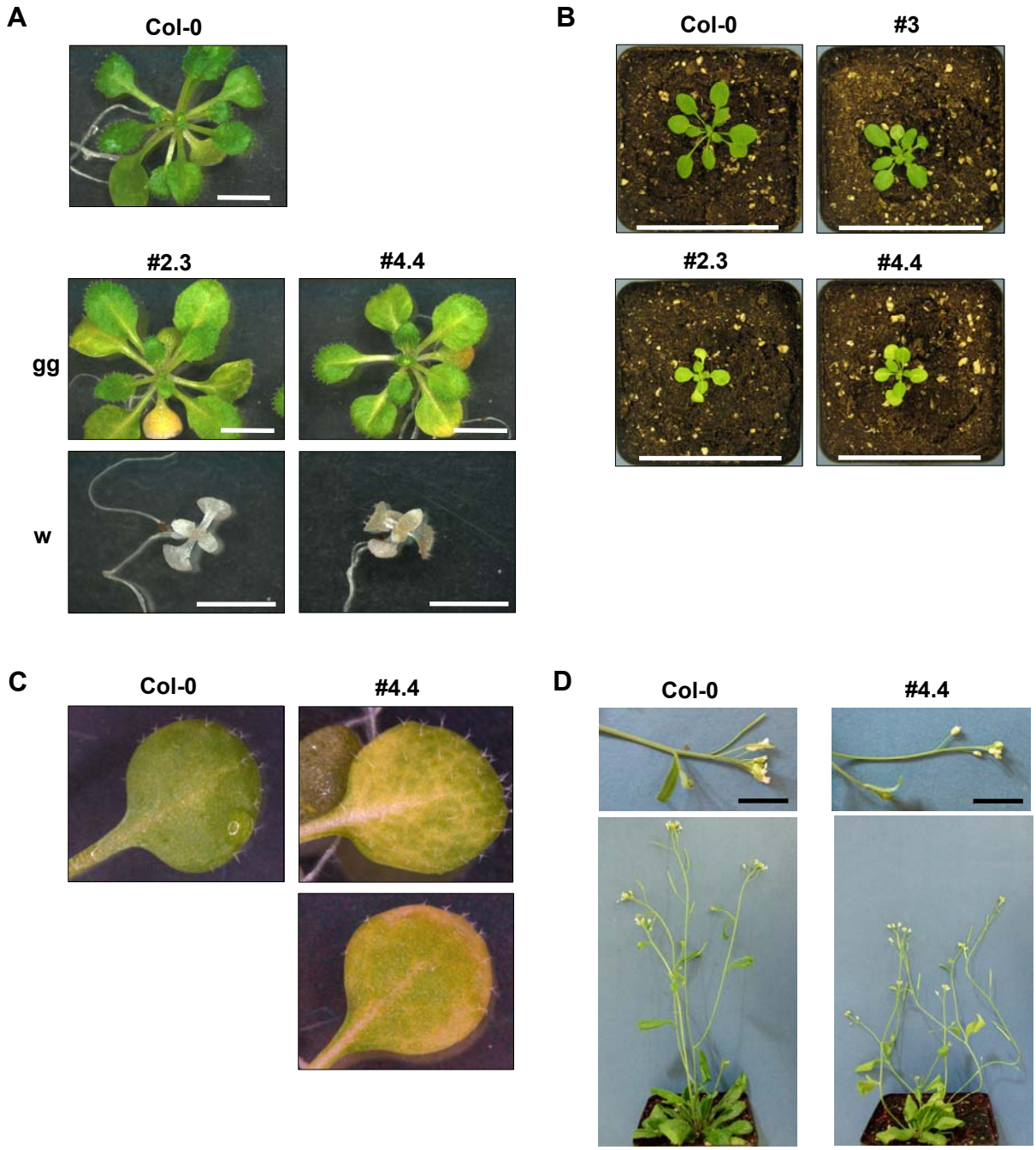


Abbildung 27: Phänotyp der PIC1-Überexpressionslinien 35S::PIC1ox #2.3 und #4.4.
(A) Dargestellt ist der Phänotyp drei Wochen alter Pflanzen der PIC1-Überexpressionslinien #2.3 und #4.4 (T2-Generation) im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen (Col-0). gg: grün-gelbe Pflanzen; w: weiße Pflanzen. Weiße Balken: 0,5cm. **(B)** Drei Wochen alte Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen der transgenen Linien #3, #2.3 und #4.4 (T2-Generation). Weiße Balken: 5cm. **(C)** Oben: Junges Rosettenblatt einer drei Wochen alten Wildtyp-Pflanze sowie einer PIC1-Überexpressionspflanze der Linie #4.4 (T2-Generation). Unten: Erstes Rosettenblatt der Überexpressionspflanze #4.4. **(D)** Vergleich einer fünf bis sechs Wochen alten Wildtyp-Pflanze und einer PIC1-Überexpressionspflanze der Linie #4.4 (T3-Generation). Oben: Infloreszenz der Wildtyp-Pflanze (links) und der Überexpressionspflanze (rechts). Schwarze Balken: 0,5cm. **(A)**, **(C)** Anzucht auf MS-Agarmedium unter Zugabe von 1% Saccharose. **(B)**, **(D)** Wachstum der Pflanzen auf Erde.

Die weißen Pflanzen, welche homozygot für das Konstrukt 35S::PIC1 cDNA waren, konnten dagegen schon im frühen Keimlingsstadium identifiziert werden. Eine Kultivierung dieser Pflanzen auf Erde war jedoch nicht möglich, da sie nach einiger Zeit abstarben. Eine Analyse des *PIC1* mRNA Gehalts zeigte, dass diese Pflanzen sogar einen höheren *PIC1* Transkriptgehalt aufweisen als heterozygote Überexpressionspflanzen (Daten nicht gezeigt). Ein Vergleich eines drei Wochen alten Wildtyp-Blattes mit dem einer heterozygoten Überexpressionspflanze der Linie #4.4 zeigte, dass die Gelbfärbung der Blätter von der Mittelrippe aus begann und sich mit zunehmendem Alter über das gesamte Blatt hin fortsetzte (Abb. 27C, oben). Des Weiteren erschien die Mittelrippe als auch die Blattadern heller als bei Wildtyp-Pflanzen. Die älteren Blätter zeigten zu einem früheren Zeitpunkt erste Anzeichen von Seneszenz (braune Stellen am Blattrand) als vergleichbare Blätter von Wildtyp-Pflanzen (Abb. 27C, unten). Nach 4-5 Wochen auf Erde zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Wachstum der PIC1-Überexpressionspflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Interessanterweise bildeten die Überexpressionspflanzen weniger Rosettenblätter aus, ihre Wuchsform war kleiner und buschig. Es war kein erkennbarer Haupttrieb vorhanden (Abb. 27D). Obwohl die Entwicklung der Blüten bei PIC1-Überexpressionpflanzen und Wildtyp-Pflanzen annähernd zum gleichen Zeitpunkt stattfand, traten bei PIC1-Überexprimierern einige Anomalitäten in der weiteren Entwicklung auf. Zum einen wurde die Entwicklung einiger Schoten nicht vollendet. Die Blütenblätter verblieben teilweise an den Schoten (Abb. 27D), es fand kein Wachstum der Schoten statt und die Schoten samt Blütenblätter vertrockneten schließlich. Zudem vertrockneten eine Vielzahl an normal entwickelten Schoten noch bevor die Samenreife abgeschlossen war.

Tabelle 10: Samenproduktion und -gewicht von PIC1-Überexpressionspflanzen.
Dargestellt ist die Samenproduktion pro Pflanze (Gewicht/Pflanze; Mittelwert ± SA) sowie das Samengewicht (Gewicht 50 Samen; Mittelwert ± SA) von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und Pflanzen der Linien #3, #2.3 und #4.4 in der T3-Generation. Die PIC1-Überexpressionslinien #2.3 und #4.4 wurden in grün-gelbe (gg) und grüne (g) Pflanzen unterteilt. Die Anzahl der analysierten Pflanzen (n) ist angegeben. Für die Ermittlung des Samengewichts wurden pro Pflanze drei mal 50 Samen ausgewogen und gemittelt.

	Gewicht/Pflanze [mg]	n	Gewicht 50 Samen [mg]	n
Col-0	117,86 ± 18,61	3	0,84 ± 0,05	4
#3	113,0 ± 29,8	3	0,74 ± 0,08	3
#2.3gg	2,63 ± 1,36	13	0,42 ± 0,09	8
#2.3g	111,85 ± 39,61	8	0,70 ± 0,08	8
#4.4gg	1,55 ± 0,75	14	0,31 ± 0,10	7
#4.4g	140,5 ± 16,28	8	0,75 ± 0,08	8

Die Quantifizierung der Samen pro Pflanze der PIC1-Überexpressionslinien #2.3 und #4.4 im Vergleich zum Wildtyp und Pflanzen der Linie #3 zeigte, dass die Samenproduktion der heterozygoten, grün-gelben Pflanzen der Linien #2.3 und #4.4 um den Faktor 60-100 reduziert war (Tab. 10). Außerdem waren die einzelnen Samen der grün-gelben Pflanzen dieser Linien um etwa zwei Drittel leichter als Samen von Wildtyp-Pflanzen. Ein erhöhter *PIC1* Transkriptgehalt hatte daher auch einen Einfluss auf die Samenproduktion der PIC1-Überexpressionspflanzen, da diese deutlich weniger und leichtere Samen produzierten, die zudem im Vergleich zum Wildtyp eine sehr schlechte Keimungsrate von 5-20% aufwiesen.

Da es sich bei den Überexpressionspflanzen der Linien #2.3 und #4.4 um zwei unabhängige Linien handelte, kann der beschriebene Phänotyp auf die Überexpression von *PIC1* zurückgeführt werden. Für alle folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich die „grün-gelben" Pflanzen dieser beiden Linien, die heterozygot für das 35S:PIC1-Konstrukt sind, genutzt.

6.3 Ferritin Expression in PIC1-Überexpressionslinien

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in *pic1* „Knockout" Mutanten sowohl auf Transkript-ebene als auch auf Proteinebene die Ferritine 1 und 4 induziert werden (vgl. Tab. 6 und Abb. 22). Im Folgenden wurde daher der Transkriptgehalt der Ferritine *FER1* und *FER4* in den PIC1-Überexpressionslinien mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR überprüft.

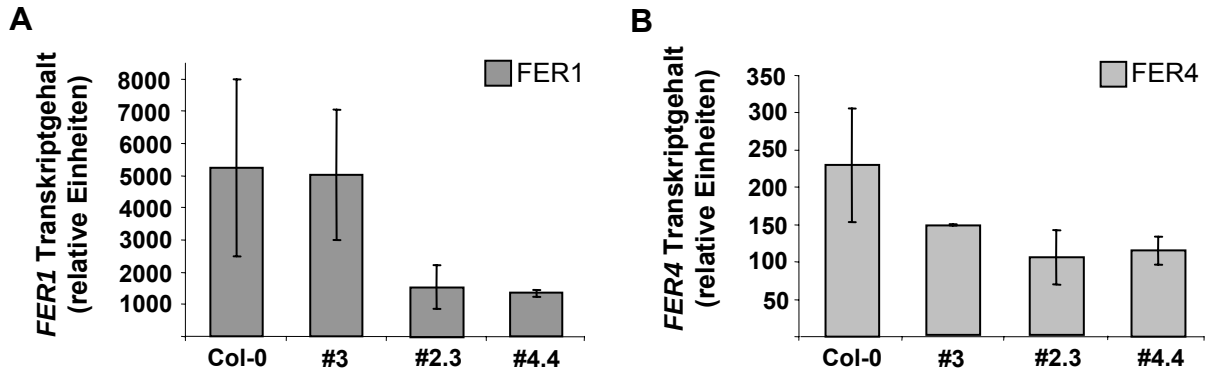


Abbildung 28: *FER1* und *FER4* Transkriptgehalt in den Linien 35S::PIC1ox #3, #2.3 und #4.4.
Quantifizierung der *PIC1* mRNA mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR aus 14 Tage alten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen (Col-0) und den transgenen Linien #3 sowie #2.3 und #4.4 der T2- und T3-Generation. Es wurden die grün-weißen (#3) und grün-gelben (#2.3 und #4.4) Keimlinge der jeweiligen Linie analysiert. Der Gehalt an *FER1* **(A)** und *FER4* **(B)** mRNA (n=3; ± SA; für #3 nur n=2) wurde relativ zu 10000 *Aktin* Transkripten normalisiert.

Während in *pic1* „Knockout“ Mutanten die Expression der Ferritine *FER1* und *FER4* erhöht war (vgl. Tab. 6 und Abb. 22), konnte bei den PIC1-Überexpressionslinien #2.3 und #4.4 ein verminderter Transkriptgehalt von *FER1* und *FER4* festgestellt werden (Abb. 28). Im Vergleich zum Wildtyp hatte die Linie #3 einen annähernd gleichen *FER1* Transkriptgehalt, wohingegen die mRNA Menge in den Linien #2.3 und #4.4 nur etwa 25-30% der Wildtyp-Pflanzen betrug (Abb. 28A). Obwohl im Vergleich zu *FER1* die mRNA Menge für *FER4* in Wildtyp-Pflanzen etwa um den Faktor 2500 niedriger war, zeigte die Linie #3 eine geringe und die beiden Überexpressionslinien #2.3 und #4.4 eine um ca. 50% reduzierte Expression (Abb. 28B). Es kommt somit in Pflanzen, die *PIC1* überexprimieren, zu einer den *pic1* „Knockout“ Mutanten entgegen gesetzten Regulation der beiden Gene *FER1* und *FER4*.

In der Pflanze ist daher die Expression von *PIC1* und Ferritin eng aneinander gekoppelt, was sich in einer gegenläufigen Regulation von PIC1 und Ferritin in *pic1* „Knockout“ Mutanten und PIC1-Überexpressionspflanzen äußert (vgl. Tab. 6 und Abb. 28). Dies deutet darauf hin, dass sowohl ein Überschuss als auch ein Verlust von PIC1 zu einem Ungleichgewicht in der Metall-Homöostase der Pflanze führt.

7 sll1656 ist das Ortholog zu PIC1 in *Synechocystis* sp. PCC 6803

Die phylogenetischen Analysen (vgl. Abb. 7) ergaben neben den Orthologen zu AtPIC1 aus Landpflanzen, Grünalgen und Rotalgen ausschließlich Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Proteinen. Es ist daher anzunehmen, dass PIC1 in Chloroplasten seinen Ursprung in der Endosymbiose zwischen Cyanobakterium und eukaryotischer Zelle hat. Da das Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803 bereits vollständig sequenziert wurde (Kaneko et al., 1996), wurde dieses Cyanobakterium im Folgenden als Modell-Organismus herangezogen.

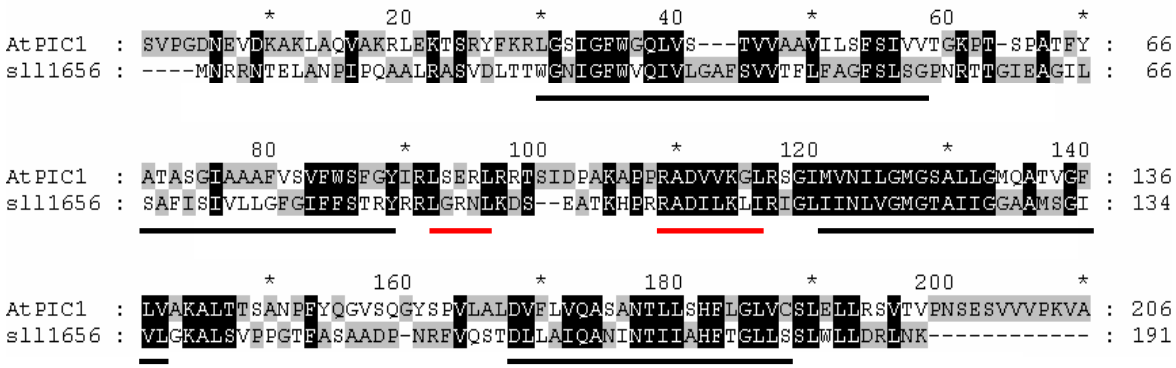


Abbildung 29: Vergleich der Aminosäuresequenzen von AtPIC1 mit sll1656 aus *Synechocystis*.
Es wurde die mature Proteinsequenz von AtPIC1 verwendet. Die schwarzen Balken geben die Position der vier konservierten Transmembrandomänen von AtPIC1 an. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche grau hinterlegt. Die zwei roten Balken markieren die zwei potentiellen α-Helices zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne.

In *Synechocystis* wird das orthologe Protein zu PIC1 von dem Gen *sll1656* kodiert. Das Protein sll1656 hat ein Molekulargewicht von 21kDa und umfasst 191 Aminosäuren, wobei 24% der Aminosäuren zu dem maturen Protein PIC1 aus *Arabidopsis* identisch sind (Abb. 29).

7.1 *sll1656* im Genom von *Synechocystis*

Auf genomischer Ebene ist das Gen *sll1656* in einem potentiellen Operon angeordnet. Dieses Operon umfasst insgesamt sechs kodierende Bereiche, wobei *sll1656* das letzte Gen im Operon ist (Abb. 30).

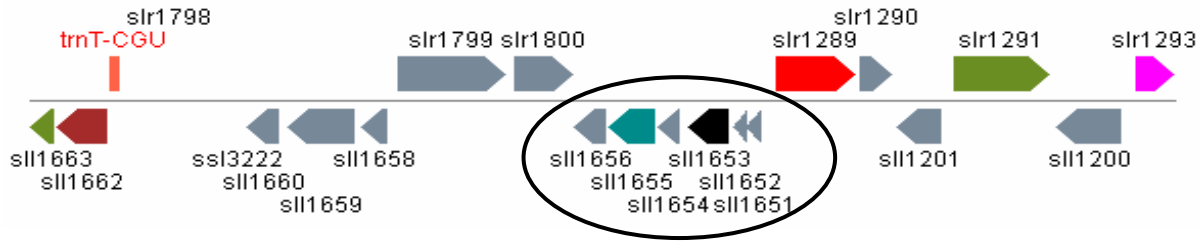


Abbildung 30: Das Gen *sll1656* aus *Synechocystis* ist in einem potentiellen Operon angeordnet. Darstellung der Orientierung der Gene *sll1651-1656* (eingekreist) in dem Genom von *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Ein Sequenzvergleich dieser vorhergesagten sechs Proteine aus *Synechocystis* mit Proteinen aus *Arabidopsis* erlaubte teilweise die Zuordnung einer möglichen Funktion. Während für sll1651 und sll1652 nur eine geringe Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen gefunden wurde, konnte sll1653 und sll1655 eine potentielle Funktion im Koenzym-Metabolismus zugeordnet werden. Sll1653 wurde als Ortholog zu UbiE identifiziert, das in der Biosynthese von Ubichinon/Menachinon aus der Atmungskette von Mitochondrien eine Rolle spielt, während das Ortholog zu sll1655 als eine Biotin-(Acetyl-CoA-Carboxylase)-Ligase annotiert war. Das Protein sll1654 konnte dagegen in die Familie von universellen Stressproteinen (USP) eingeordnet werden. Das Protein sll1656 weist, wie PIC1 auch, Homologien zu Permease-Untereinheiten von ABC-Transportern sowie Transportern der „Major Facilitator"-Familie auf. Ein Vergleich mit den Daten aus der Affymetrix Microarray-Analyse zeigte, dass bis auf UbiE alle potentiellen orthologen Gene aus *Arabidopsis* in der *pic1* „Knockout" Mutante auf Transkriptebene reguliert werden. Der chlorotische Phänotyp und die Akkumulation von Kupfer-Superoxiddismutasen in *pic1* Mutanten lässt vermuten, dass die Pflanzen unter oxidativem Stress leiden. Die Induktion der zu sll1654 orthologen *USP* Gene At3g11930 und At3g58450 unterstreicht diese Annahme.

7.2 *In vivo* Lokalisationsstudien von PIC1 und sll1656

Die subzelluläre Lokalisation von PIC1 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten konnte bereits über *in vitro* Import und Immunoblotanalysen aufgeklärt werden (vgl. Abb. 9 und 10). Im Folgenden wurden verschiedene PIC1- und sll1656-Konstrukte mithilfe des Reporter-Proteins GFP (engl.: „green fluorescence protein“) hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation unter *in vivo* Bedingungen in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten untersucht. Es wurden die Konstrukte sll1656, das Transitpeptid von PIC1 (Aminosäure 1-83) fusioniert mit sll1656 (cTP_{PIC1}sll1656), das Transitpeptid von PIC1 (cTP_{PIC1}) alleine sowie das gesamte Vorstufen-protein PIC1 verwendet. Das GFP-Protein wurde jeweils an den C-Terminus der Proteine fusioniert. Die Lokalisation der jeweiligen Konstrukte wurde über die grüne Fluoreszenz des GFP-Proteins mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert.

Das sll1656-Protein aus *Synechocystis* ohne plastidäres Transitpeptid wurde wie erwartet nicht in *Arabidopsis* Chloroplasten importiert (Abb. 31). Es wurde keine Überlagerung des GFP-Signals und der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls gefunden. Vielmehr deutete die GFP-Fluoreszenz darauf hin, dass die Fusionsproteine als Aggregate im Cytosol der Protoplasten vorliegen. Für sll1656 mit dem Transitpeptid von PIC1 (cTP_{PIC1}sll1656) zeigte die Über-lagerung von GFP- und Chlorophyll-Autofluoreszenz dagegen, dass die GFP-Signale in der Peripherie der Chloroplasten lokalisiert waren. Es konnte weder eine Assoziation mit der Thylakoidmembran noch mit anderen Zellkomponenten festgestellt werden. Eine ähnliche Verteilung der GFP-Signale wurde ebenso für PIC1 gefunden (Abb. 31). Auch in diesem Fall war eine punktartige Lokalisation der GFP-Signale um die Chloroplasten herum zu erkennen, was sich mit der Lokalisation von PIC1 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten deckt (vgl. Abb. 9 und 10). Die GFP-Signale des Transitpeptids von PIC1 alleine waren dagegen sehr wahrscheinlich im Stroma der Chloroplasten lokalisiert, da sich die GFP-Fluoreszenz nicht mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz in der Thylakoidmembran deckte.

Zusammenfassend handelt es sich bei sll1656 wie bei PIC1 um ein integrales Membranprotein, das nach einem Import in die Chloroplasten in die innere Hüllmembran integriert werden kann. Die Aminosäuren 1-83 des Transitpeptids von PIC1 sind ausreichend für ein „Targeting“ des sll1656 Proteins in die innere Chloroplasten-Hüllmembran.

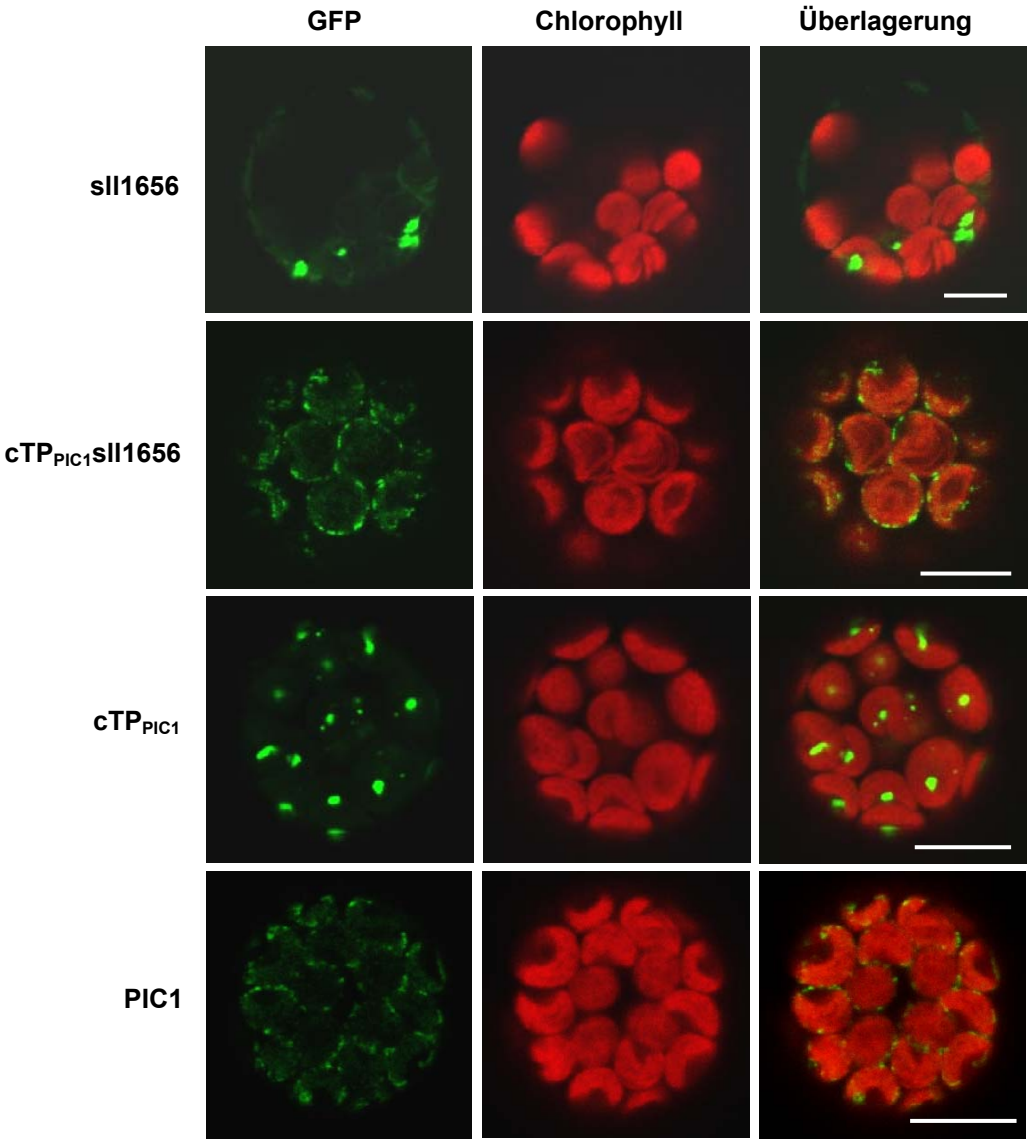


Abbildung 31: Subzellulären Lokalisation von sll1656 und PIC1 in *Arabidopsis* Protoplasten.
Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten wurden transient mit verschiedenen C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten transformiert. sll1656: gesamtes sll1656 Protein; cTP$_{PIC1}$sll1656: sll1656 Protein fusioniert an das Transitpeptid von PIC1 (AS 1-83); cTP$_{PIC1}$: Transitpeptid von PIC1 (AS 1-83); PIC1: gesamtes PIC1 Protein. Die Bilder des GFP-Signals, der Chlorophyll-Autofluoreszenz und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Der Balken entspricht 10µm.

8 Funktionsnachweis von PIC1 und sll1656

Sowohl der beschriebene chlorotische Phänotyp der *pic1* „Knockout" Mutanten im Zusammenhang mit der gestörten Entwicklung der Chloroplasten, dem Verlust der Differenzierung des Mesophylls in Palisaden- und Schwammparenchym und der erhöhten Akkumulation von Ferritin-Clustern in den Plastiden als auch die gegenläufige Expression von Ferritin und die gestörte Samenentwicklung in den PIC1-Überexpressionslinien deuteten auf eine Funktion von

PIC1 im Eisentransport über die Chloroplasten-Hüllmembran und in der Eisen-Homöostase der Pflanze hin. Die Annotation einiger zu AtPIC1 orthologer Proteine aus Cyanobakterien als Permeasen, die am Transport von Metallionen beteiligt sind, unterstreicht diese Vermutung. Aus diesem Grund sollte die Beteiligung von PIC1 und dem Ortholog sll1656 aus *Synechocystis* am Eisentransport mittels heterologer Expression in Hefezellen untersucht werden. Dazu wurde getestet, ob PIC1 und sll1656 Komponenten des hoch und niedrig affinen Eisentransportsystems der Hefe funktionell ersetzten können.

In *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) gibt es mehrere Systeme für die Aufnahme von Eisen. Zwei wesentliche Aufnahmemechanismen sind der hoch- bzw. niedrig affine Transport von Fe^{2+}-Ionen in die Hefezelle (Kosman, 2003). Dafür werden zunächst extrazellulär Fe^{3+}-Ionen durch die beiden Ferrireduktasen Fre1p und Fre2p, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, reduziert (Lesuisse und Labbe, 1989; Dancis et al., 1990; Eide et al., 1992). Das hoch affine Transportsystem wird unter Eisen-Mangel induziert und besteht aus dem Fet3p/Ftr1p Komplex in der Plasmamembran. Die Fe^{2+}-Ionen werden dabei durch die Ferroxidase Fet3p, die vier Kupfer-Ionen als prothetische Gruppen benötigt (Hasset et al., 1998; Taylor et al., 2005), oxidiert (Askwith et al., 1994; de Silva et al., 1997). Anschließend werden die Fe^{3+}-Ionen mittels der hoch affinen Fe(III)-Permease Ftr1p in die Hefezellen transportiert (Stearman et al., 1996). Beim niedrig affinen Transportsystem werden Fe^{2+}-Ionen direkt durch die in der Plasmamembran lokalisierte Fe(II)-Permease Fet4p in die Hefezellen aufgenommen (Dix et al., 1994; Dix et al., 1997). Die *fet3fet4* Hefe-Doppelmutante, in der sowohl der hoch (Fet3p) als auch der niedrig (Fet4p) affine Eisentransport ausgeschaltet wurden, benötigt eine hohe Konzentration an Eisen, um wachsen zu können (Dix et al., 1994), da die Eisenaufnahme dabei von weiteren Aufnahmemechanismen übernommen wird, die aber weniger effizient sind. Daher wird die Wachstumskomplementation der *fet3fet4* Mutante auf Medium mit niedrigem Eisengehalt zum Funktionsnachweis heterologer Proteine genutzt.

8.1 Wachstumskomplementation der Hefe-Mutante *fet3fet4* durch PIC1 und sll1656

Um zu überprüfen, ob PIC1 und sein Ortholog sll1656 die Funktion des deletierten hoch und niedrig affinen Eisentransports in der *fet3fet4* Hefe-Mutante komplementieren können, wurde die cDNA von *AtPIC1* und *sll1656* in Hefezellen dieser Mutante exprimiert. Dafür wurde sowohl die kodierende Sequenz von *AtPIC1* als auch von *sll1656* im Hefeexpressionsvektor pFL61 in die *fet3fet4* Hefe-Mutante transformiert. Da für den hoch affinen Eisentransporter IRT1 in der Plasmamembran von *Arabidopsis* Wurzeln bereits die Komplementation der *fet3fet4* Hefe-Mutante nachgewiesen werden konnte (Eide et al., 1996; Vert et al., 2002), wurde die cDNA von

IRT1 in pFL61 als Positiv-Kontrolle verwendet. Der leere Plasmid-Vektor pFL61 diente als Negativ-Kontrolle. Das Wachstum der mit den entsprechenden Konstrukten transformierten *fet3fet4* Hefezellen wurde auf Minimal-Medien untersucht, denen verschiedene Konzentrationen an Eisen zugesetzt wurden. Sowohl die Expression von *PIC1* als auch von *sll1656* ermöglichten das Wachstum der *fet3fet4* Hefe-Mutante ab einer Eisenkonzentration von 5-10µM $FeCl_3$ (Abb. 32). Im Gegensatz dazu zeigten die mit der Negativ-Kontrolle transformierten *fet3fet4* Zellen bei einer Eisenkonzentration von 5µM und 10µM $FeCl_3$ kein Wachstum. Die Expression von *IRT1* konnte das Wachstum der Hefe-Mutante bereits bei 0µM $FeCl_3$ komplementieren, was dem hoch affinen Transport von Eisen und einer Funktion dieses Transporters in der Plasmamembran von Wurzeln entspricht.

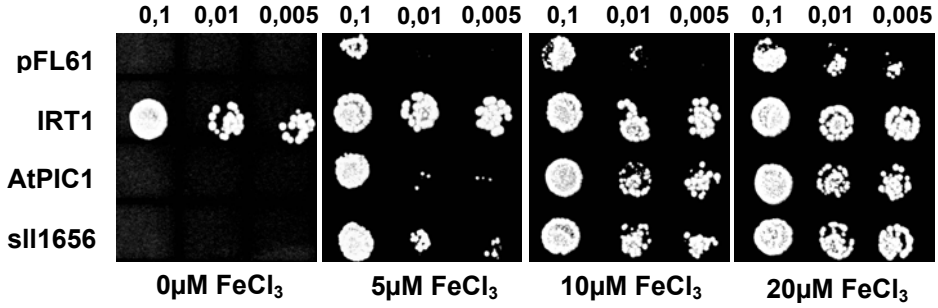


Abbildung 32: Komplementation der *fet3fet4* Hefe-Mutante durch PIC1, sll1656 und IRT1.
Es wurden sowohl der leere Plasmid-Vektor pFL61 (Kontrolle) als auch die cDNA von *IRT1*, *PIC1* und *sll1656* in pFL61 in die Hefe-Mutante *fet3fet4* transformiert. Verdünnungen der exponentiell wachsenden Hefezellen auf eine OD_{600} von 0,1, 0,01 und 0,005 wurden auf Minimal-Medium (SC-ura, pH5) mit verschiedenen Konzentrationen an $FeCl_3$ ausgebracht. Das Wachstum der Hefezellen wurde nach zwei Tagen fotografisch dokumentiert.

Die Aufnahme einer Wachstumskurve von *fet3fet4* Hefezellen, transformiert mit *PIC1*, *IRT1* oder dem leeren Vektor pFL61, bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 33). *PIC1*-exprimierende Hefezellen erreichten die exponentielle Wachstumsphase um 2-3 h schneller als die Negativ-Kontrolle. Im Vergleich mit *IRT1* waren *PIC1*-exprimierende *fet3fet4* Zellen dagegen um ca. 1 h langsamer, was die effizientere Komplementation durch *IRT1* widerspiegelt.

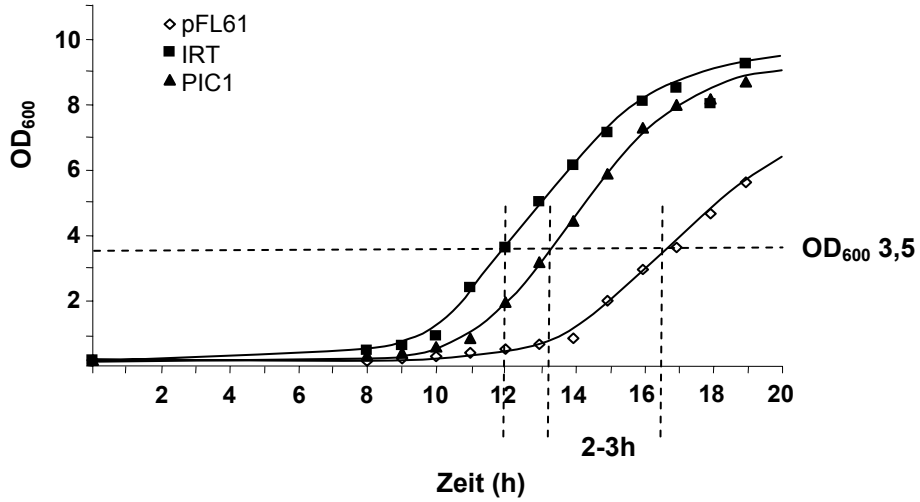


Abbildung 33: Wachstumskurve der durch PIC1 und IRT1 komplementierten *fet3fet4* Mutante.
PIC1 (schwarze Dreiecke) und IRT1 (schwarze Vierecke) im Plasmid-Vektor pFL61 sowie der leere pFL61-Vektor (weiße Rauten) wurden in die Hefe-Mutante *fet3fet4* transformiert. Das Wachstum der Zellen in Minimal-Medium (SC-ura + 20µM $FeCl_3$) wurde über 20 h verfolgt. Die OD_{600} der Flüssigkulturen wurde dazu jede Stunde, beginnend nach 8h, gemessen. Die gestrichelten Linien markieren die Zeitpunkte, an denen eine OD_{600} von 3,5 erreicht wurde, d.h. sich alle Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob PIC1 und sll1656 auch eine Rolle im Transport anderer Metallionen spielen. Da homozygote *pic1* Mutanten-Pflanzen neben der Expressions-Induktion der beiden Kupfer-Superoxiddismutasen CSD1 und CSD2 auch einen erhöhten Gehalt an Kupfer aufwiesen, sollte eine mögliche Funktion von PIC1 und sll1656 im Kupfertransport untersucht werden. In der Hefe-Mutante *ctr1* (Dancis et al., 1994a) wurde Ctr1p, einer der beiden hoch affinen Kupfertransporter in der Plasmamembran von Hefezellen, ausgeschaltet, so dass *ctr1* Hefezellen unter Kupfer-limitierenden Bedingungen nicht wachsen können (Dancis et al., 1994b; Korshunova et al., 1999).

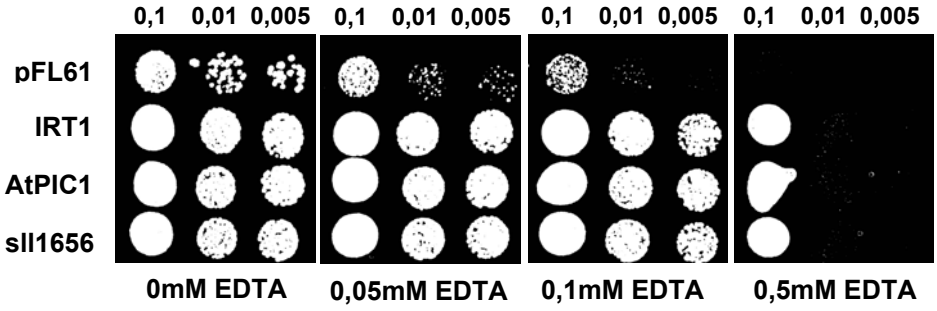


Abbildung 34: Komplementation der *ctr1* Hefe-Mutante durch PIC1, sll1656 und IRT1.
Es wurden sowohl der leere Plasmid-Vektor pFL61 (Kontrolle) als auch die cDNA von *IRT1*, *PIC1* und *sll1656* in pFL61 in die Hefe-Mutante *ctr1* transformiert. Verdünnungen der exponentiell wachsenden Hefezellen auf eine OD_{600} von 0,1, 0,01 und 0,005 wurden auf Minimal-Medium (SC-ura, pH5) mit verschiedenen Konzentrationen an EDTA ausgebracht. Das Wachstum der Hefezellen wurde nach zwei Tagen fotografisch dokumentiert.

Daher wurde das Wachstum der mit den entsprechenden Konstrukten (PIC1, sll1656, IRT1 und Plasmid-Vektor) transformierten *ctr1* Hefezellen auf Minimal-Medium untersucht, dem verschiedene Konzentrationen an EDTA zur Komplexierung der Kupfer-Ionen zugegeben wurden. In den *ctr1* Mutanten, die sowohl *PIC1*, *sll1656* als auch *IRT1* exprimierten, konnte das Wachstum auf Minimal-Medium mit EDTA-Konzentrationen von 0,05mM bis zu 0,5mM komplementiert werden (Abb. 34). Im Gegensatz dazu zeigten mit dem leeren Vektor transformierte Zellen nur ein geringes Wachstum bei einer Konzentration von 0,05mM EDTA und bei einer Konzentration von 0,5mM EDTA war kein Wachstum der nicht komplementierten Zellen mehr möglich. Allerdings kann aufgrund der Kupfer-abhängigen Aktivierung der Ferroxidase Fet3p nicht ausgeschlossen werden, dass die Wachstumskomplementation der *ctr1* Hefe-Mutante auf eine wieder funktionierende Eisenaufnahme, nicht aber einen Kupfer-Transport durch PIC1, sll1656 oder IRT1 zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu konnte das Wachstum der Hefe-Mutante *smf1*, deren Mangantransportsystem deletiert wurde, durch PIC1 und sll1656 nicht komplementiert werden (nicht gezeigt).

8.2 Durch PIC1 und sll1656 vermittelte ^{59}Fe-Akkumulation in der *fet3fet4* Hefe-Mutante

In einem weiteren Experiment wurde analysiert, ob die Wachstumskomplementation der *fet3fet4* Hefe-Mutante durch PIC1 bzw. sll1656 auf der Aufnahme von Eisen in die Hefezellen beruht. Dazu wurde in den transformierten *fet3fet4* Hefezellen die Akkumulation von radioaktiv-markiertem Eisen innerhalb einer kurzen, definierten Zeitperiode gemessen. Um einen möglichen Hintergrundeffekt durch den Vektor pFL61 auszuschließen wurde die cDNA aller Proteine in den Hefeexpressions-Vektor pDR195 subkloniert. Die Versuche zur Akkumulation von ^{59}Fe-markiertem $FeCl_3$ in *fet3fet4* Hefe-Mutanten wurden von Anderson R. Meda in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nicolaus von Wirén (Institut für Pflanzenernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart) durchgeführt.

PIC1- und *sll1656*-exprimierende Hefezellen akkumulierten um den Faktor 1,5 mal mehr Eisen als der Kontroll-Vektor (Tab. 11). Dagegen steigerte die Expression von IRT1 die Eisen-aufnahme der Hefezellen um das Achtfache. Ebenso wie der Wachstumsverlauf in flüssigem Minimal-Medium, repräsentierte dieses Ergebnis im Vergleich zu dem hoch affinen Eisentransporter IRT1, die schwächere, aber signifikante Komplementation des Eisenaufnahme-apparates der *fet3fet4* Hefe-Mutante durch *PIC1* und *sll1656*.

Tabelle 11: Akkumulation von ^{59}Fe-markiertem $FeCl_3$ in mit *IRT1*, *PIC1* und *sll1656* transformierten *fet3fet4* Hefezellen.
Es wurde sowohl der leere Plasmid-Vektor pDR195 (Kontrolle) als auch die cDNA von *IRT1*, *PIC1* und *sll1656* in pDR195 in die Hefe-Mutanten *fet3fet4* transformiert. Der Eisengehalt (pmol Fe/10^6 Zellen ± SA; n=3) wurde 10 min nach Zugabe von 40µM ^{59}Fe-markiertem $FeCl_3$ bestimmt. Im Vergleich zur Vektor-Kontrolle, steigert die Expression aller drei Proteine signifikant den Eisengehalt der Hefezellen (P-Wert <0,05). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Transformanten, bestimmt durch Varianz-Analyse und anschließendem Student-Newman-Keuls (SNK)-Test (P<0,05), sind durch a, b und c gekennzeichnet.

	Fe-Gehalt [pmol Fe/10^6 Zellen]	Faktor	P-Wert	SNK Test
pDR195	104,61 ± 8,93			**c**
IRT1	869,02 ± 29,94	8,3 ± 0,29	P < 0,001	**a**
AtPIC1	153,11 ± 12,85	1,5 ± 0,12	P = 0,020	**b**
sll1656	141,29 ± 1,92	1,4 ± 0,02	P = 0,030	**b**

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl PIC1 als auch sll1656 eine Funktion in der Eisenaufnahme in die Hefezellen übernehmen können. Die Komplementation des Wachstums sowie die erhöhte Eisenakkumulation in *fet3fet4* Hefezellen deuten auf eine direkte Funktion von PIC1 und seinem cyanobakteriellen Ortholog sll1656 im Membrantransport von Eisen hin.

9 ABC-Untereinheiten als mögliche Interaktionspartner von PIC1

Durch die heterologe Expression von und sll1656 in den Hefe-Mutanten *fet3fet4* wurde eine Beteiligung beider Proteine im Transport von Eisen-Ionen nachgewiesen. Eine Funktion von PIC1 als Eisen-Permease konnte somit bestätigt werden. Da PIC1 hohe Ähnlichkeit zu Proteinen aus Cyanobakterien aufweist, die als Komponenten von ABC-Transportersystemen annotiert sind, ist es möglich, dass PIC1 die Permease-Untereinheit eines chloroplastidären ABC-Transporters prokaryotischen Ursprungs darstellt (vgl. auch I.4, IV.1.1). Daher sollten im Folgenden potentielle Kandidaten löslicher ABC-Untereinheiten, die für eine Interaktion mit PIC1 in Frage kommen könnten, ermittelt werden.

9.1 Identifizierung weiterer chloroplastidärer Proteine mit einer möglichen Funktion in Metall-Homöostase und -Transport

Durch Immunoblotanalysen und BN-PAGE mit ^{35}S-markiertem Vorstufen- bzw. maturem PIC1 Protein (vgl. IV.2 und 3) konnte gezeigt werden, dass PIC1 in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten möglicherweise Homodi- bzw. Tetramere bildet. Ist die Permease PIC1 Teil eines ABC-Transportsystems prokaryotischen Ursprungs, so benötigt der PIC1-Komplex weitere

Komponenten, wie zum Beispiel lösliche ABC-Untereinheiten, um voll funktionsfähig zu sein. Aus diesem Grund wurden zum Einen die Daten der DNA Microarray-Analyse von homozygoten *pic1-1* Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen herangezogen, um weitere, in der *pic1* Mutante regulierte Gene zu identifizieren, die der ABC-Transporterfamilie angehören bzw. eine Rolle im Metalltransport oder in der Metall-Homöostase spielen. Zum Anderen wurde die vorhergesagte subzelluläre Lokalisation sowie die Topologie dieser Transporterproteine mittels der Datenbanken ARAMEMNON (Schwacke et al., 2003) und SUBA (Heazlewood et al., 2007) ermittelt (Tab. 12).

Tabelle 12: Proteine mit einer möglichen Funktion in Metall-Homöostase und –Transport in Chloroplasten.
Es sind die Familien und Namen der Proteine (nach Garcia et al., 2004) mit zugehörigem AGI-Code sowie die Signalwerte (n=3; ± SA) in *pic1-1* und Wildtyp-Pflanzen (wt) und der ermittelte Faktor der Regulierung (*pic1-1* versus wt) mit zugehörigem P-Wert der DNA-Microarray-Analyse aufgeführt (Details zur Auswertung vgl. Tab. 6). Die potentielle Lokalisation der Proteine im Chloroplasten, die vorhergesagte Anzahl der Transmembrandomänen (TM) sowie Permease (IM)- und ABC-Domänen ist angegeben. In *pic1-1* reprimierte Gene sind rot, in *pic1-1* induzierte Gene grün gekennzeichnet.

	AGI	*pic1-1*	SA	wt	SA	Faktor	P-Wert	Lokalisation
ABC-Transporter:								
MRP-Familie: 15 Mitglieder + NAP5								
MRP3	At3g13080							12 TMs: (IM-ABC)2, potentiell Chloroplast
NAP5	At1g71330	**36**	5	**16**	6	**2,30**	0,029	2 TMs: ABC (93% identisch zu C-Terminus MRP3)
ART (REG, ABCF)-Familie								
GCN3	At1g64550	**173**	9	**118**	28	**1,47**	0,045	ABC2
GCN4	At3g54540	224	9	162	66			ABC2
GCN2	At5g09930	7	6	5	4			ABC2, potentiell Chloroplast
GCN1	At5g60790	**328**	56	**209**	33	**1,57**	0	ABC2, potentiell Chloroplast
GCN5	At5g64840	**431**	42	**744**	112	**0,58**	0,039	ABC2, potentiell Chloroplast
CBY-Familie								
CBY-like	At3g21580	41	8	44	6			IM (6TMs), potentiell Chloroplast/Mitochondrium
NAP13	At4g33460	39	5	35	14			ABC, potentiell Chloroplast (MassSpec)
NAP14	At5g14100	35	6	41	4			ABC, potentiell Chloroplast
Metall-Toleranz-Proteine, 6-7 TMS								
ZAT1/MTP1	At2g46800	**420**	24	**277**	12	**1,52**	0,017	
MTPc1	At2g47830	**42**	2	**26**	2	**1,61**	0,017	3 TMS, potentiell Chloroplast
Metallionen-Bindeproteine								
DNAJ-Ferredoxin	At2g42750	**120**	15	**464**	60	**0,26**	0,014	keine TMs, potentiell Chloroplast
DRT112	At1g20340	**1914**	131	**4857**	272	**0,39**	0	1 TM, potentiell Chloroplast
metalloth.-like	At1g07600	**4824**	173	**6803**	396	**0,71**	0,019	keine TMs
Transporter-Proteine:								
MATE-Familie: 45 Mitglieder, 10-12 TMs								
MATE-like	At2g04066							4 TMs, potentiell Chloroplast
DTX47	At4g39030	492	35	410	150			
DTX46	At2g21340	67	9	121	47			potentiell Chloroplast
FRD3/DTX43	At3g08040	39	1	39	7			
DTX42	At1g51340	21	2	18	7			
DTX44	At2g38330	72	8	92	13			potentiell Chloroplast
DTX45	At4g38380	9	2	9	4			potentiell Chloroplast
DTX9	At1g66760	**240**	35	**57**	24	**4,18**	0,019	
ALF5/DTX19	At3g23560	**94**	9	**38**	4	**2,47**	0,017	
DTX51	At4g29140	**37**	4	**14**	5	**2,74**	0,019	

Von besonderem Interesse waren ABC-Transporterfamilien, denen lösliche ABC-Proteine zugeordnet werden können, wie den Familien MRP, ART und CBY (nach Garcia et al., 2004). Zudem wurde für eine Reihe von Proteinen dieser drei Familien eine Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt. Allerdings war nur die Expression von *NAP5* (induziert) sowie *GCN1*, *GCN3* (induziert) und *GCN5* (reprimiert) in der *pic1* Mutante reguliert. Dagegen zeigten Mitglieder der CBY-Familie (CBY-like, NAP13 und NAP14) in der *pic1* Mutante keine Regulation auf Transkriptebene. Außerdem waren in der *pic1* Mutante weitere Gene reguliert, die der Familie der Metall-Toleranz Proteine bzw. der Metallionen-Bindeproteine sowie der MATE-Familie (engl.: „multidrug and toxin efflux“) zugeordnet werden konnten. Die Expression der Metall-Toleranz Proteine *ZAT1/MTP1* und *MTPc1* war in der *pic1-1* Mutante induziert. Erst vor Kurzem wurde mit MTP11, ein Mitglied dieser Familie, ein Mangan-Transporter identifiziert, der für die Toleranz von Pflanzen gegenüber Mangan notwendig ist (Delhaize et al., 2007; Peiter et al., 2007). Da für MTPc1 zusätzlich eine chloroplastidäre Lokalisation vorhergesagt wurde (Tab. 12), war dieses Protein als möglicher chloroplastidärer Mangan-Transporter von Interesse. Während beispielsweise die Expression des potentiell im Chloroplasten lokalisierten Metallionen-Bindeproteins DNAJ-Ferredoxin (DNAJ-Fd), reprimiert war, zeigten einige Mitglieder der MATE-Familie eine erhöhte Expression in *pic1* Mutanten. MATE-Proteine zeigen Ähnlichkeiten zu bakteriellen Effluxtransportern und sind für die Detoxifikation von Toxinen und Schwermetallen in der Pflanze zuständig. FRD3 spielt eine Rolle in der Eisen-Homöostase von *Arabidopsis* (Rogers und Guerinot, 2002; Green und Rogers, 2004; Durrett et al., 2007; vgl. I.1). Für andere Mitglieder dieser Familie, wie zum Beispiel DTX46, wurde dagegen eine mögliche Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt.

9.2 *In vivo* Lokalisationsstudien von Proteinen mit einer möglichen Funktion in Metall-Homöostase und –Transport in Chloroplasten

Um die subzelluläre Lokalisation der potentiellen Kandidaten für eine Interaktion mit PIC1 und weiterer Metalltransporter in Chloroplasten experimentell zu untersuchen, wurden für eine Auswahl an ABC-Transportern und Proteinen der Metall-Homöostase GFP-Fusionskonstrukte erstellt und transient in *Arabidopsis* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Bei allen analysierten Proteinen wurde das GFP-Protein an den C-Terminus fusioniert. Die Lokalisation der jeweiligen Proteine wurde über die Fluoreszenz des GFP-Reporterproteins mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops analysiert. Für die Analyse von ABC-Transporterproteinen wurde zum Einen das in der *pic1-1* Mutante regulierte NAP5 ausgewählt (vgl. Tab. 12). Es gehört zur MRP-Familie und besitzt zwei Transmembrandomänen fusioniert mit einer ABC-Domäne und

ist zu 93% identisch mit dem C-Terminus von MRP3, einem vollen ABC-Transporter. Obwohl für MRP3 eine Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt wurde, konnte dies für NAP5 nicht bestätigt werden (Abb. 35). Es wurde keine Überlagerung des GFP-Signals und der roten Autofluoreszenz des Chlorophylls gefunden. Aufgrund der Verteilung der grünen GFP-Fluoreszenz konnte zwischen einer Lokalisation von NAP5-GFP Aggregaten im Cytosol bzw. einer mitochondrialen Lokalisation nicht unterschieden werden. Aus der Familie der ABC-Transporterfamilie ART wurde das Protein GCN1 verwendet, das aus zwei löslichen ABC-Domänen besteht. Es war in der *pic1-1* Mutante reguliert und wurde für den Chloroplasten vorhergesagt (vgl. Tab. 12). Allerdings zeigte die Überlagerung von GFP- und Chlorophyll-Autofluoreszenz eine cytosolische Lokalisation von GCN1 (Abb. 35).

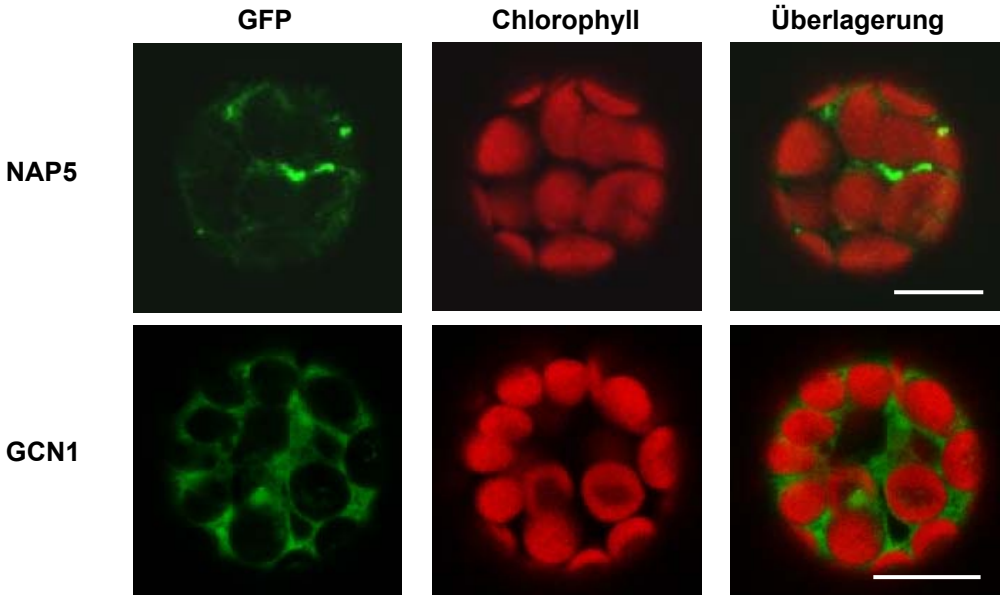


Abbildung 35: Subzelluläre Lokalisation von NAP5 und GCN1 in *Arabidopsis* Protoplasten.
Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten wurden transient mit den C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten für NAP5 und GCN1 transformiert. Die Bilder des GFP-Signals, der Chlorophyll-Autofluoreszenz und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Der Balken entspricht 10µm.

Des Weiteren wurden alle drei Mitglieder der ABC-Transportfamilie CBY auf ihre subzelluläre Lokalisation hin überprüft, auch wenn sie keine Regulation in der *pic1* Mutante zeigten (vgl. Tab. 12). Das Protein „CBY-like“ bildet mit sechs vorhergesagten Transmembrandomänen möglicherweise eine Permease-Untereinheit eines ABC-Transporters aus. Die Überlagerung von GFP- und Chlorophyll-Autofluoreszenz zeigte, dass die GFP-Signale von „CBY-like“ in der Peripherie der Chloroplasten lokalisiert waren. Es konnte weder eine Assoziation mit der Thylakoidmembran noch mit anderen Zellkomponenten festgestellt werden (Abb. 36). Eine

ähnliche Verteilung der GFP-Signale wurde auch für PIC1 gefunden (vgl. Abb. 31), so dass „CBY-like“ ebenso in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten lokalisiert sein könnte.

Die beiden Proteine NAP13 und NAP14 bestehen jeweils aus einer löslichen ABC-Domäne und sind für den Chloroplasten vorhergesagt. NAP13 wurde bereits experimentell in der gemischten Hüllmembranfraktion von *Arabidopsis* Chloroplasten (Froehlich et al., 2003) nachgewiesen. Beide Proteine zeigten eine ähnliche Verteilung der GFP-Signale innerhalb der Chloroplasten (Abb. 36), die auf eine Lokalisation im Stroma oder auch eine Assoziation mit Bereichen der Thylakoidmembran bzw. der inneren Hüllmembran hinweist. Eine vergleichbare Verteilung der GFP-Fluoreszenz im Stroma von Chloroplasten zeigte ebenso das Transitpeptid von PIC1 (vgl. Abb. 31).

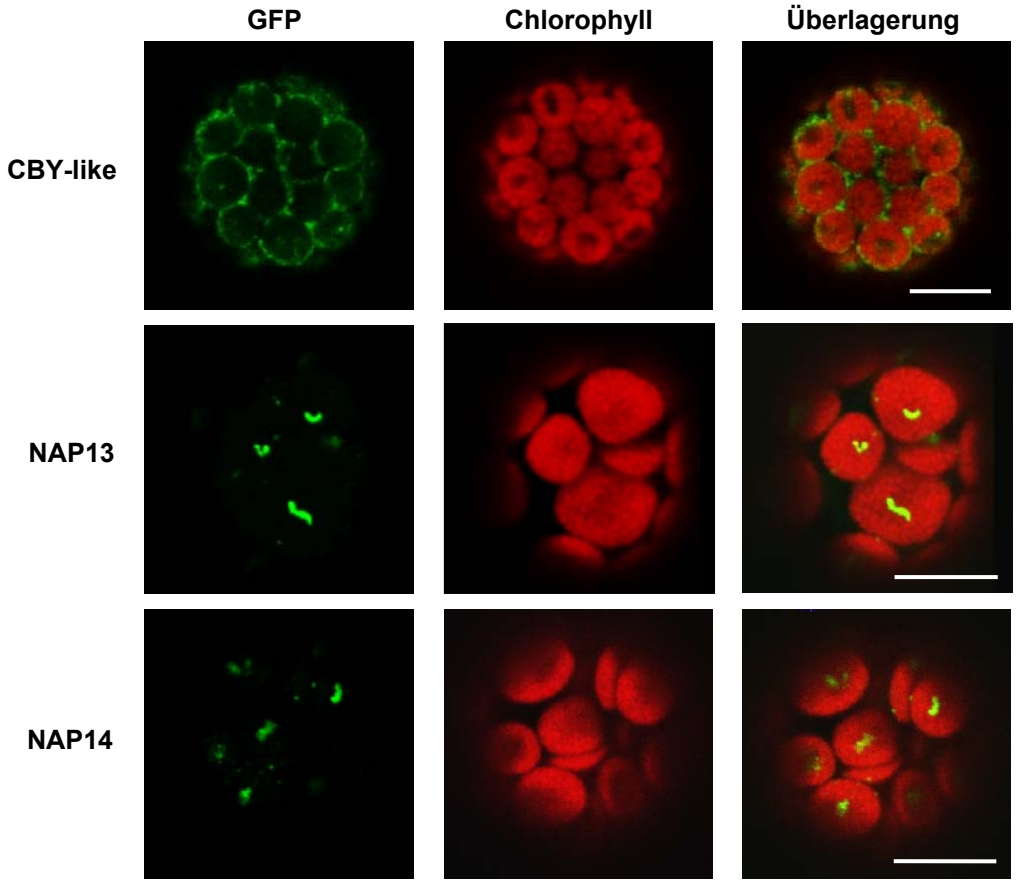


Abbildung 36: Subzelluläre Lokalisation von „CBY-like“, NAP13 und NAP14 in *Arabidopsis* Protoplasten.
Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten wurden transient mit den C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten für CBY-like, NAP13 und NAP14 transformiert. Die Bilder des GFP-Signals, der Chlorophyll-Autofluoreszenz und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Der Balken entspricht 10µm.

Aus der Familie der Metall-Toleranz-Proteine wurde der potentielle Mangan-Transporter MTPc1 auf seine subzelluläre Lokalisation hin untersucht, da seine Transkription in der *pic1-1* Mutante induziert war. Für MTPc1 wurden drei Transmembrandomänen sowie eine Lokalisation im Chloroplasten vorhergesagt. Allerdings konnte die plastidäre Lokalisation nicht bestätigt werden, anhand der GFP-Signale von MTPc1 ist vielmehr eine Lokalisation in der Plasmamembran der Zelle wahrscheinlich (Abb. 37).

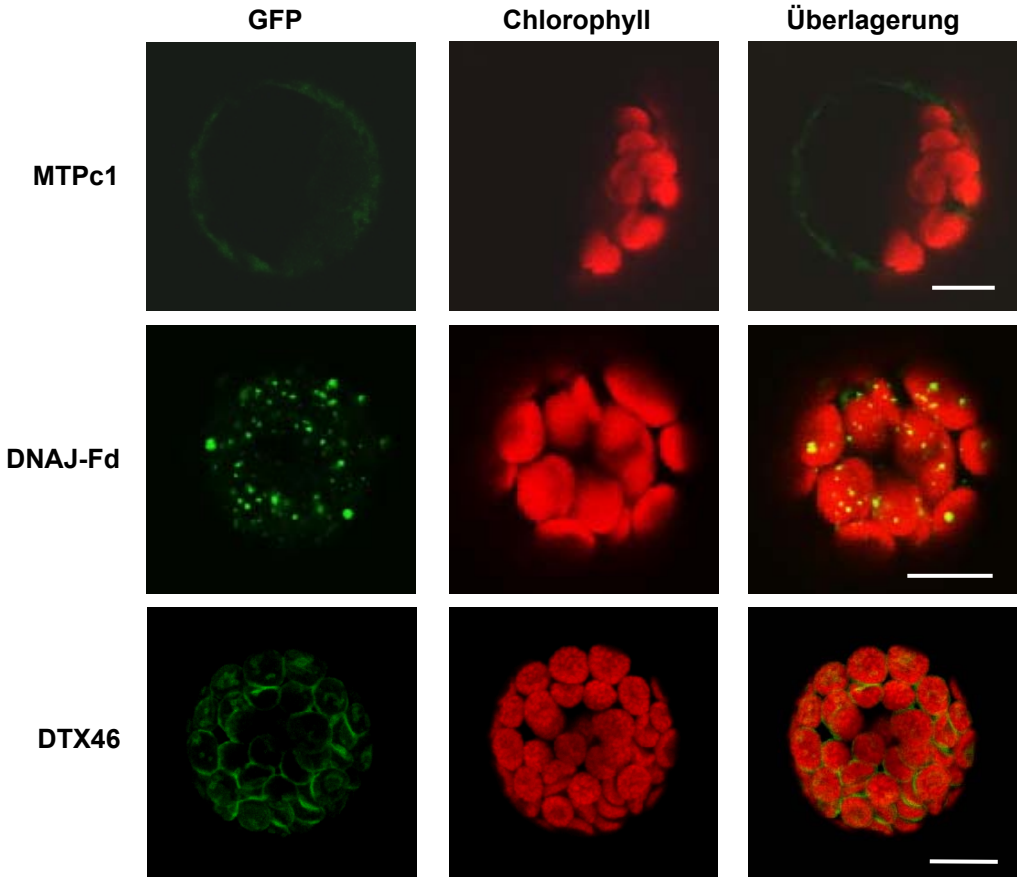


Abbildung 37: Subzelluläre Lokalisation von MTPc1, DNAJ-Fd und DTX46 in *Arabidopsis* Protoplasten.
Arabidopsis Mesophyll-Protoplasten wurden transient mit den C-terminalen GFP-Fusionskonstrukten für MTPc1, DNAJ-Fd und DTX46 transformiert. Die Bilder des GFP-Signals, der Chlorophyll-Autofluoreszenz und der Überlagerung beider Signale sind abgebildet. Der Balken entspricht 10µm.

Als weiterer Kandidat für eine Funktion in der Metall-Homöostase der Chloroplasten wurde das Protein DNAJ-Fd aus der Familie der Metallionen-Bindeproteine analysiert, dessen Expression in der *pic1* Mutante reprimiert war. Das lösliche Protein, das eine Ferredoxin- und eine DNAJ-Domäne beinhaltet, konnte bereits experimentell dem Proteom von *Arabidopsis* Chloroplasten zugeordnet werden (Kleffmann et al., 2004). Die Überlagerung von GFP-Signalen und der

Chlorophyll-Autofluoreszenz bestätigte eine Lokalisierung von DNAJ-Fd in Chloroplasten (Abb. 37). Da sich die Verteilung der GFP-Signale signifikant von einer Lokalisation im Stroma wie bei cTP_{PIC1}, NAP13 und NAP14 (vgl. Abb. 31 und 36) oder der inneren Hüllmembran (PIC1, CBY-like, vgl. Abb. 31 und 36) unterscheidet, ist eine Assoziation des Proteins mit dem Thylakoidmembransystem wahrscheinlich. Als Mitglied der MATE-Familie wurde das Protein DTX46 ausgewählt, auch wenn es in der *pic1* Mutante nicht signifikant reguliert wurde (vgl. Tab. 12). Jedoch wird für dieses Protein eine potentielle chloroplastidäre Lokalisation vorhergesagt. Wie die Überlagerung der GFP-Signale mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz zeigten, kann für DTX46 eine Lokalisation in Chloroplasten bestätigt werden. Die gleichmäßige Verteilung der Signale um die Chloroplasten herum, lassen im Gegensatz zu der punktartigen Verteilung von PIC1 und CBY-like eher auf eine Lokalisation in der äußeren Hüllmembran schließen (Abb. 37).

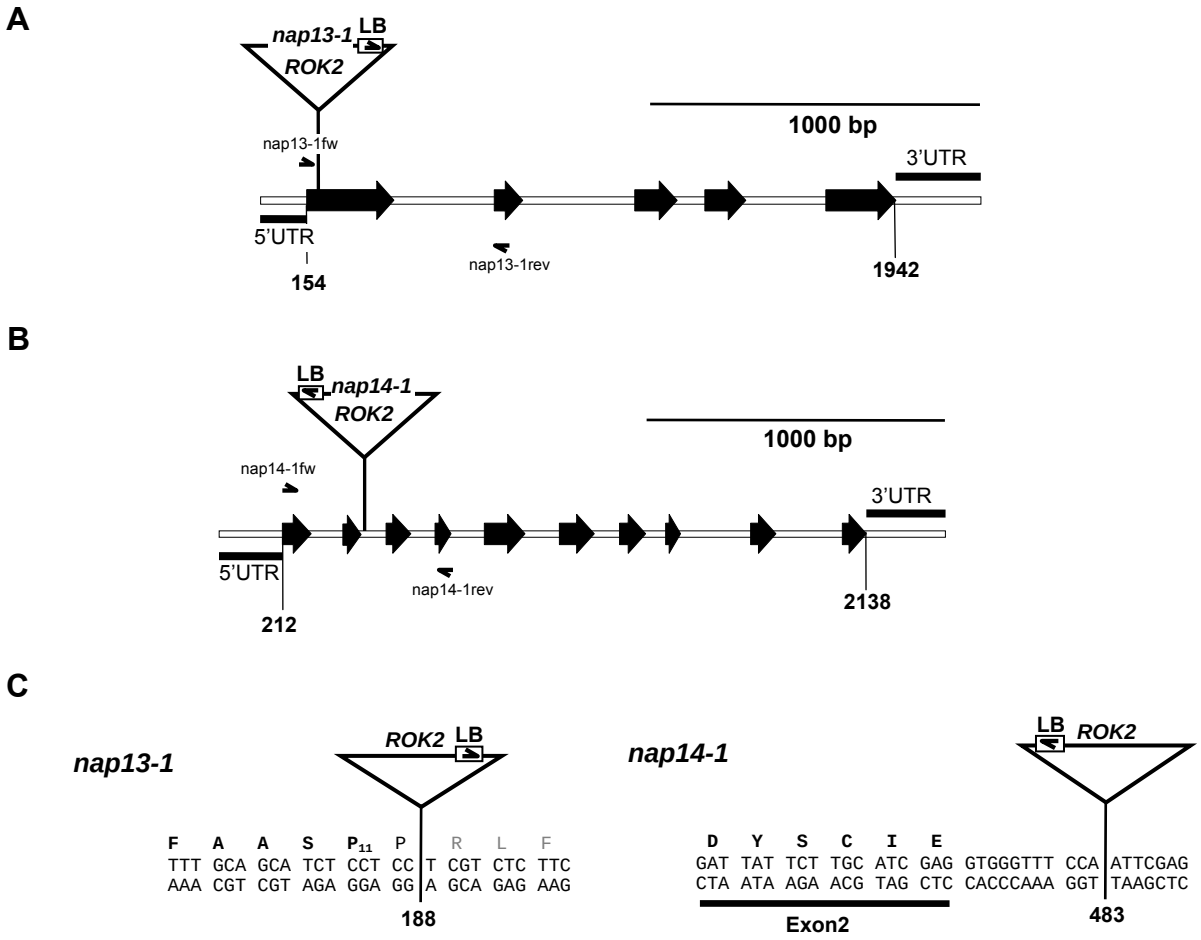
Zusammenfassend konnte von insgesamt fünf Proteinen (CBY-like, NAP13, NAP14, DNAJ-Fd und DTX46) eine Lokalisation in Chloroplasten bestätigt werden. Im Hinblick auf eine potentielle Interaktion mit PIC1 waren die ABC-Transporterproteine „CBY-like“ (Permease-Untereinheit, Hüllmembran) sowie NAP13 und NAP14 (lösliche ABC-Domänen, Stroma) am interessantesten, weshalb diese Proteine im Folgenden näher untersucht wurden.

9.3 Analyse von *nap13* und *nap14* T-DNA-Insertionslinien

Einen ersten Hinweis auf die mögliche Funktion von „CBY-like“, NAP13 und NAP14 im Chloroplasten sollte die Analyse von entsprechenden „Knockout“ Mutanten in *Arabidopsis* geben. Für das Gen *CBY-like* wurde die T-DNA-Insertionslinie SALK_084441 (Alonso et al., 2003) ausgewählt. Allerdings konnte die für diese Linie vorhergesagte T-DNA-Insertion im Intron 5 mittels PCR-Genotypisierung der heterozygoten Insertionslinie nicht bestätigt werden. Daher wurde von einer weiteren Untersuchung dieser T-DNA-Insertionslinie im Rahmen dieser Arbeit abgesehen.

Für die Gene *NAP13* und *NAP14* wurden die T-DNA Insertionslinien SALK_027270 (*nap13-1*) und SALK_116866 (*nap14-1*; Alonso et al., 2003) analysiert, wobei für *nap13-1* die Insertion der T-DNA im Exon 1 und für *nap14-1* im Intron 2 vorhergesagt wurde (Abb. 38A und B). Genomische DNA der heterozygoten Linien der T3-Generation wurde wie unter III.3.6 beschrieben mittels PCR genotypisiert (Abb. 38D). Die T-DNA *ROK2* inserierte in *nap13-1* nach Aminosäure 11 in Exon 1, während für *nap14-1* die Insertion der T-DNA im Intron 2 an Position 483 des *NAP14* Gens bestätigt wurde (Abb. 38C). Außerdem wurde die Aufspaltung der *nap13-1* und *nap14-1* Insertionslinien in der T4-Generation über den Phänotyp der homozygoten

Linien (vgl. Abb. 39) untersucht. Die Insertionslinien *nap13-1* (n=230) und *nap14-1* (n=227) spalteten in 13-14% homozygote und 86-87% heterozygote/Wildtyp-Allele auf.



D

Nachweis	*nap13-1*	*nap14-1*
T-DNA	LB + nap13-1rev 765 bp	nap14-1fw + LB 464 bp
Genspezifisch	nap13-1fw + nap13-1rev 622 bp	nap14-1fw + nap14-1rev 517 bp

Abbildung 38: Charakterisierung der *nap13-1* und *nap14-1* T-DNA-Insertionslinien.
Genomische Organisation von *NAP13* und *NAP14* mit den Positionen der identifizierten T-DNA-Insertionslinien. Die Position und Richtung der „left border" T-DNA-Sequenzen (LB) und der gen-spezifischen Oligonukleotid-Primer zur PCR-Genotypisierung sind angegeben. Die Exonbereiche sind durch schwarze Pfeile, 5' und 3'UTR durch Balken dargestellt. **(A)** Das *NAP13* Gen ist 2197 bp lang und besteht aus fünf Exons (schwarze Pfeile). Für *NAP13* sind ein 5'UTR von 153 bp sowie ein 3'UTR von 255 bp annotiert (NCBI, NM_119500). Die T-DNA *ROK2* (SALK_027270) inseriert in der Linie *nap13-1* im Exon 1. **(B)** Das *NAP14* Gen ist 2406 bp lang und besteht aus zehn Exons (schwarze Pfeile). Für *NAP14* sind ein 5'UTR von 211 bp sowie ein 3'UTR von 268 bp annotiert (NCBI, NM_121413). Die T-DNA *ROK2* (SALK_116866) inseriert in der Linie *nap14-1* im Intron 2. **(C)** Position der T-DNA in *nap13-1* (links) und *nap14-1* (rechts) Mutanten. In *nap13-1* inseriert die T-DNA *ROK2* an Position 188 des Gens (nach Aminosäure 11), in *nap14-1* in Intron 2 an Position 483. **(D)** PCR-Genotypisierung der Insertionslinien *nap13-1* und *nap14-1*. Es sind jeweils die Oligonukleotid-Primer Kombinationen sowie die Größe des zu erwartenden Produkts angegeben.

Um nachzuweisen, dass in homozygoten Mutanten keine vollständige *NAP13* bzw. *NAP14* mRNA transkribiert wird, wurde RNA aus Blättern von elf Tage alten homozygoten *nap13-1* und *nap14-1* Pflanzen der T4-Generation isoliert, revers-transkribiert und mittels RT-PCR analysiert. In homozygoten *nap13-1* Pflanzen konnte mit den die T-DNA flankierenden, gen-spezifischen Oligonukleotid-Primern nap13-1fw und nap13-1rev kein spezifisches Produkt amplifiziert werden (Abb. 39A). Ebenso wurde in homozygoten *nap14-1* Mutanten mit den Oligonukleotid-Primern nap14-1fw und nap14-1rev kein spezifisches Produkt auf Höhe der *NAP14* mRNA gefunden (Abb. 39B). Dies deutet darauf hin, dass in beiden Mutanten keine vollständige *NAP13* bzw. *NAP14* mRNA transkribiert wird. Es handelt sich somit bei beiden Linien um „Knockout" Mutationen der Gene *NAP13* und *NAP14*.

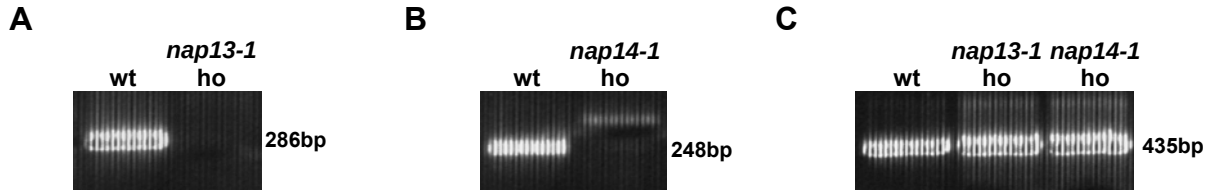


Abbildung 39: RT-PCR Analyse homozygoter *nap13-1* und *nap14-1*.
RT-PCR auf cDNA aus elf Tage alten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen (wt) und homozygoten *nap13-1* bzw. *nap14-1* Mutanten (T4-Generation). **(A)** Die PCR wurde mit den Oligonukleotid-Primern nap13-1fw und nap13-1rev durchgeführt (vgl. Abb. 38). Auf cDNA aus homozygoten *nap13-1* Pflanzen wurde kein spezifisches Produkt von 286 bp amplifiziert. **(B)** Die PCR wurde mit den Oligonukleotid-Primern nap14-1fw und nap14-1rev durchgeführt (vgl. Abb. 38). Auf cDNA aus homozygoten *nap14-1* Pflanzen war kein spezifisches Produkt von 248 bp nachweisbar. **(C)** Als Ladekontrolle dienten spezifische Oligonukleotid-Primer für Aktin 2/8, die auf der cDNA ein Produkt von 435 bp amplifizierten.

9.4 Phänotypische Untersuchung von *nap13* und *nap14* Mutantenlinien

Die phänotypische Analyse der *nap13* und *nap14* Insertionslinien zeigte, dass heterozygote *nap13-1* und *nap14-1* Pflanzen vom Wildtyp nicht zu unterscheiden waren. Im Gegensatz dazu äußerte sich der Verlust von NAP13 bzw. NAP14 bei homozygoten Pflanzen der *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten ähnlich wie bei *pic1* Mutanten in einem stark chlorotischen Phänotyp (Abb. 40). Homozygote *nap13-1* und *nap14-1* Pflanzen waren sehr klein und hatten ein chlorotisches Erscheinungsbild. Die ersten Blätter nach 17 Tagen Wachstum waren sowohl bei homozygoten *nap13-1* als auch bei *nap14-1* Mutanten transparent (Abb. 40A und B). In frühem Keimlings-Stadium (bis ca. sieben Tage) war eine Rotfärbung der Keimblätter von *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten zu erkennen (nicht gezeigt). Während die Kotyledonen von *nap13-1* Pflanzen ebenfalls chlorotisch waren, zeigten die Keimblätter von *nap14-1* Mutanten eine leicht grüne Färbung.

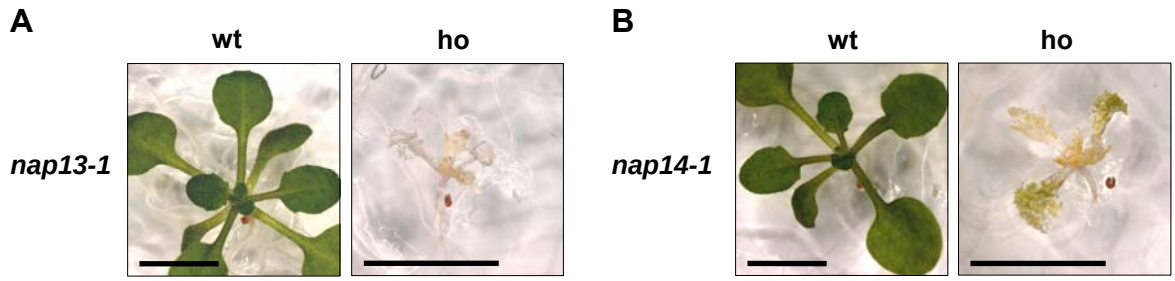


Abbildung 40: Chlorotischer Phänotyp von homozygoten *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten.
Es sind 17 Tage alte homozygote (ho) *nap13-1* **(A)** bzw. *nap14*-1 **(B)** Mutanten sowie ihre entsprechenden Wildtyp-Allele (wt) abgebildet. Schwarze Balken: 0,5cm.

Damit ähnelt der Phänotyp der *nap13-1* und *nap14-1* „Knockout" Mutanten im Wesentlichen dem der bereits charakterisierten *pic1* Mutanten (vgl. Abb. 17). Charakteristisch für homozygote *pic1* Mutanten war eine leichte Grünfärbung des Sprossmeristems sowie der jüngsten Blätter, was jedoch weder bei *nap13-1* noch bei *nap14-1* Mutanten beobachtet werden konnte. Zudem äußerte sich der Verlust von PIC1 in einer Akkumulation von Ferritinen in den Plastiden von *pic1* „Knockout" Mutanten (vgl. Abb. 20 und 21). Um zu überprüfen, ob in den Plastiden von *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten ebenso Ferritin-Cluster zu detektieren sind, wurde die Ultrastruktur von Chloroplasten 17 Tage alter Rosettenblätter von homozygoten *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht.

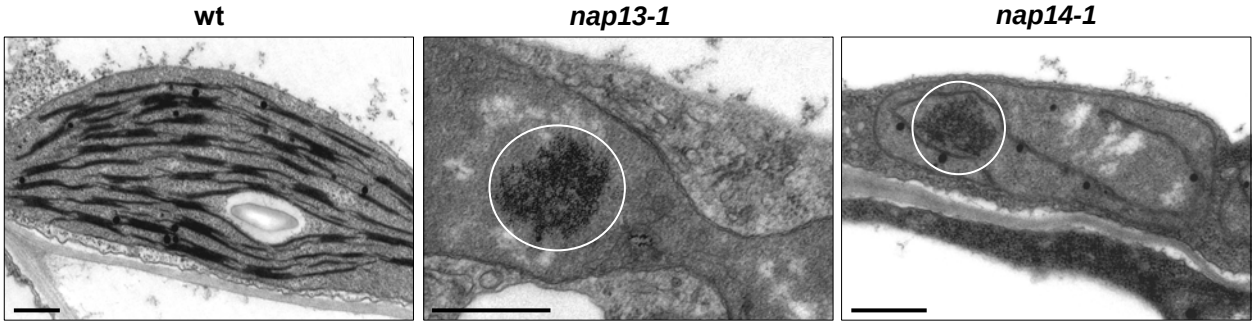


Abbildung 41: Plastiden homozygoter *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten enthalten Ferritin-Cluster.
Analyse der Ultrastruktur der Plastiden von 17 Tage alten Rosettenblättern von *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (wt) mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie. Weißer Kreis: Ferritin-Cluster. Der schwarze Balken entspricht 500nm.

Interessanterweise bestätigte die Analyse der Ultrastruktur, dass der Verlust von NAP13 bzw. von NAP14 eine zu *pic1* Mutanten ähnlich starke Auswirkung auf die Biogenese der Chloroplasten und insbesondere die Ausbildung eines funktionsfähigen Thylakoidmembran-

systems hat (Abb. 41). Außerdem war in den Plastiden von *nap13-1* und *nap14-1* „Knockout“ Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Anreicherung der Elektronen-dichten Ferritin-Aggregate zu beobachten. In Zusammenhang mit den chlorotischen Phänotypen von *nap13-1* und *nap14-1*, eine hohe Ähnlichkeit zu *pic1* Mutanten erkennen lassen, ist eine Überlappung der Funktion und damit auch eine Interaktion dieser löslichen ABC-Untereinheiten mit PIC1 denkbar.

V Diskussion

In Chloroplasten findet eine Reihe von essentiellen Funktionen für das Leben der Pflanze statt. Einige dieser Funktionen wie beispielsweise die Photosynthese und die Detoxifikation von Sauerstoffradikalen durch Superoxiddismutasen sind auf den Import von Übergangsmetallen über die Hüllmembranen des Chloroplasten angewiesen. Dabei spielt neben Kupfer und Mangan vor allem Eisen eine entscheidende Rolle, da es aufgrund seiner Redoxeigenschaften in der Elektronentransportkette der Photosynthese Bestandteil von Ferredoxin, Rieske Fe-S Proteinen und Hämproteinen ist. Aber auch bei der Biosynthese von Eisen-Schwefel (Fe-S) Proteinen im Stroma des Chloroplasten ist Eisen einer der entscheidenden Bausteine. Allerdings wurde in der Literatur bis dato noch kein Transportprotein für Eisen in den Hüllmembranen des Chloroplasten beschrieben. Mit dem Protein PIC1 konnte damit im Rahmen dieser Dissertation erstmals eine Komponente das Eisentransportsystems über die innere Hüllmembranen von Chloroplasten identifiziert und charakterisiert werden.

1 PIC1 ist ein integrales Membranprotein der inneren Hüllmembran von Chloroplasten mit cyanobakteriellem Ursprung

Die durch Proteom-Analysen (Froehlich et al., 2003; Rolland et al., 2003) gefundene Lokalisation von PIC1 in den Hüllmembranen von *Arabidopsis* Chloroplasten konnte durch Immunoblotanalysen, *in vivo* Lokalisationsstudien und *in vitro* Importexperimente in *Arabidopsis* Chloroplasten bestätigt werden. Zusammengefasst weisen die Resultate aller drei Experimente eindeutig auf eine Lokalisation von PIC1 in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten hin. Eine Lokalisation von PIC1 in der Thylakoidmembran konnte anhand der übereinstimmenden Bandengröße des maturen Proteins aus den Importexperimenten, der Größe des immunodekorierten PIC1 sowie der GFP-Signale ausgeschlossen werden. Die Lokalisation von PIC1 in der inneren Hüllmembran konnte weiterhin durch eine unabhängige Studie über eine Fraktionierung der Hüllmembran von Erbsenchloroplasten nach einem *in vitro* Import von AtPIC1 bestätigt werden (Teng et al., 2006). Außerdem wurde von Teng und Mitarbeitern die genaue Größe des Transitpeptids von PIC1 bestimmt. Die Abspaltung des 90 Aminosäure langen Transitpeptids vom importierten Vorstufenprotein resultierte in der vorliegenden Arbeit in einem maturen PIC1 Protein mit einer Größe von 22,5kDa in der inneren Hüllmembran (vgl. Abb. 9). Zudem wurde in allen Importexperimenten im Rahmen dieser Dissertation sowie in der Arbeit von Dr. Ewa Firlej-Kwoka (2008) eine intermediäre Form von 23,5kDa detektiert. In weiteren

Untersuchungen konnte Ewa Firlej-Kwoka zeigen, dass das Vorstufenprotein PIC1 in Abhängigkeit von ATP über den allgemeinen Importweg durch den TOC-Komplex transportiert wird. Die Insertion in die innere Hüllmembran erfolgt über den „Stop-Transfer“ Weg, welcher vermutlich in zwei Schritten abläuft: Im ersten Schritt wird ein unlösliches Intermediat gebildet und in die Membran inseriert. Anschließend wird PIC1 zu seiner maturen Form prozessiert und in seine native Struktur überführt.

Der Stammbaum der PIC1-Familie zeigt, dass PIC1 neben den Orthologen in Landpflanzen und je einem Ortholog in Grün- bzw. Rotalgen ausschließlich Sequenzähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Proteinen aufweist. So ist beispielsweise die abgeleitete Aminosäuresequenz des zu PIC1 orthologen Proteins sll1656 der Blaualge *Synechocystis* mit 24% zu dem maturen PIC1 Protein identisch. *In vivo* Lokalisationsanalysen von sll1656 fusioniert mit dem Transitpeptid von PIC1 ließen, ebenso wie für PIC1, eine Insertion in die innere Chloroplasten-Hüllmembran erkennen (vgl. Abb. 31). Die Generation einer sll1656 „Knockout“ Mutante konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig durchgeführt werden, da keine komplette Segregation der Mutantenlinien erreicht wurde, was die essentielle Funktion des PIC1 Orthologs in *Synechocystis* unterstreicht. Die Analyse einer entsprechenden Mutante könnte in Zukunft jedoch weitere Hinweise auf die Funktion von sll1656 und damit auch von PIC1 liefern. Die offensichtliche Verwandtschaft zu cyanobakteriellen Proteinen deutet darauf hin, dass PIC1 prokaryotischen Ursprungs ist und im Zuge der Endosymbiose eines ursprünglichen Cyanobakteriums mit einer eukaryotischen Zelle, bei der sich letztendlich der Chloroplast entwickelte, in das Genom der Wirtszelle integriert wurde (zur Übersicht über Endosymbiose siehe Leister, 2003 und 2005 ; Vothknecht und Soll, 2005). Der stark ausgeprägte, chlorotische Phänotyp von *pic1* „Knockout“ Mutanten sowie das Vorkommen des Proteins in allen photosynthetisch aktiven Organismen deutet die essentielle Funktion von PIC1 in der Thylakoid-Biogenese und damit auch in der Photosynthese an. Das Fehlen eines PIC1-Orthologen in dem ursprünglichen Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus*, in dem kein Thylakoidmembransystem vorhanden ist (Nakamura et al., 2003), unterstreicht dies. Die starke Expression des *PIC1* Gens in grünen Gewebeteilen korreliert ebenfalls mit der Bedeutung der Funktion von PIC1 für die Photosynthese.

2 PIC1 und sein Ortholog sll1656 aus *Synechocystis* fungieren *in vitro* als Eisen-Permeasen

Der Nachweis, dass PIC1 ebenso wie sein Ortholog sll1656 aus *Synechocystis* eine Funktion im Eisentransport über die innere Hüllmembran von Chloroplasten bzw. die cyanobakterielle Plasmamembran übernehmen können, wurde durch die Wachstumskomplementation der *fet3fet4* Hefe-Mutante erbracht. Zudem zeigte die Messung der Aufnahme von radioaktiv markierten Eisen, dass eine signifikant erhöhte Eisenakkumulation in den mit PIC1 und sll1656 transformierten Hefezellen stattfindet, was auf eine direkte Funktion dieser beiden Proteine im Membrantransport von Eisen hinweist. Im Vergleich mit dem hoch affinen Eisentransporter IRT1 (Eide et al., 1996), der in der Plasmamembran von Wurzelzellen lokalisiert ist, zeigen PIC1 und sll1656 allerdings sowohl eine schlechtere Wachstumskomplementation als auch eine geringere Aufnahme von radioaktiv markiertem Eisen. Möglicherweise werden in eukaryotischen Hefezellen das chloroplastidäre Vorstufenprotein PIC1 sowie sein cyanobakterielles Ortholog nicht vollständig über den sekretorischen Weg in die Plasmamembran der Zellen transportiert. Interessanterweise ließ sich der Wachstumsphänotyp der *fet3fet4* Hefe-Mutanten nicht durch das mature PIC1 sondern nur durch das Vorstufenprotein komplementieren, was zumindest für ein teilweises „Fehl-Targeting" des Proteins in der Hefezelle spricht. Zudem besteht die Möglichkeit, dass beide Proteine im Gegensatz zu dem hoch affinen Transporter IRT1 eher einen niedrig affinen Eisentransport vermitteln. Denkbar ist weiterhin, dass zur vollen Funktionsfähigkeit der Permease PIC1 noch weitere Untereinheiten fehlen (vgl. IV.7). In Arbeiten von Shingles et al. (2001 und 2002) wurde gezeigt, dass der Transport von Fe^{2+}-Ionen über die innere Chloroplasten-Hüllmembran durch die Metallionen Zn^{2+}, Cu^{2+} und Mn^{2+} inhibiert wird. Dies legt nahe, dass ein chloroplastidärer Eisentransporter auch weitere Übergangsmetalle transportieren kann. Die Komplementation der im Kupfertransport gestörten Hefe-Mutante *ctr1* lässt zunächst vermuten, dass PIC1 und sll1656 am Transport weiterer Metallionen beteiligt sein können. Da allerdings die Aktivierung der Ferroxidase Fet3p von der posttranslationalen Insertion von vier Kupfer-Ionen abhängig ist, sind Eisen- und Kupfertransport in Hefe eng miteinander verbunden (Hasset et al., 1998; Taylor et al., 2005). Zellen, deren Kupfer-Aufnahme gestört ist, können daher unter Eisenmangelbedingungen kein Eisen durch das hoch affine Eisentransportsystem Fet3p/Ftr1p aufnehmen. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Komplementation der *ctr1* Hefe-Mutante durch PIC1, sll1656 und vor allem auch IRT1, der nachweislich kein Kupfer transportiert (Korshunova et al., 1999), das Ergebnis einer wiederhergestellten Eisen- und nicht einer

Kupferaufnahme war. Zudem war die Komplementation der *smf1* Hefe-Mutante, deren hoch affines Mangantransportsystem deletiert wurde, durch PIC1 und sll1656 nicht erfolgreich.

3 PIC1 hat eine essentielle Funktion in der Metall-Homöostase in Chloroplasten sowie der gesamten Pflanzenzelle

Der im heterologen Hefesystem erbrachte Nachweis einer Funktion von PIC1 im Eisentransport über biologische Membranen konnte *in planta* durch die Analyse von *pic1* „Knockout" Mutanten unterstützt werden. Die homozygoten Nachkommen der zwei unabhängigen T-DNA-Insertionslinien *pic1-1* und *pic1-2* zeigten einen identischen, chlorotischen Phänotyp, der zudem durch ein stark reduziertes Wachstum sowie einer abnormalen Blattmorphologie mit undifferenziertem Palisaden- und Schwammparenchym charakterisiert war. Die erfolgreiche Komplementation der *pic1-1* „Knockout" Mutante durch das *PIC1* Gen unter Kontrolle seines eigenen Promoters bestätigte, dass dieser drastische Phänotyp eindeutig auf das Fehlen von PIC1 zurückzuführen ist. Ein ähnlicher Phänotyp ist ebenso bei *irt1* „Knockout" Mutanten unter Eisenmangelbedingungen zu beobachten (Henriques et al., 2002; Varotto et al., 2002; Vert et al., 2002). Das chlorotische Erscheinungsbild, welches durch eine gestörte Chlorophyll-Synthese und Chloroplasten-Entwicklung hervorgerufen wird, sowie die veränderte Blattstruktur stellen klassische Eisenmangelsymptome von Pflanzen dar (Briat und Lobréaux, 1997; Henriques et al., 2002; Varotto et al., 2002). Allerdings zeigten junge *pic1*-Blätter zunächst eine leichte Grünfärbung bevor sie schließlich mit zunehmendem Alter chlorotisch wurden. Zudem waren nur etwa 95% der Samen homozygoter *pic1* „Knockout" Mutanten keimfähig. Dies lässt einen alternativen Eisentransportweg in den Plastiden von Meristemgewebe und während der Samenentwicklung vermuten. Da auch die Entwicklung der Wurzeln in *pic1* Mutanten nicht auffällig verändert war, scheint die PIC1 Funktion in nicht-grünen Plastiden von Wurzeln und in der Samenentwicklung nicht essentiell zu sein. Im Gegensatz dazu ist seine Funktion im Eisentransport über die innere Hüllmembran von Chloroplasten essentiell, da ein Verlust von PIC1 zu den beschrieben Eisenmangelsymptomen der Mutanten führt. Zusätzlich zur Charakterisierung der „Knockout" Mutanten konnten zwei unabhängige PIC1-Überexpressionslinien zur weiteren Analyse der *in vivo* Funktion generiert werden. Beide Linien prägten einen identischen Phänotyp aus, so dass dieser auf die Überexpression von PIC1 zurückzuführen ist. Bei Pflanzen, die heterozygot für das 35S::PIC1-Konstrukt waren, äußerte sich ein Überschuss von PIC1 zunächst in einer Gelbfärbung und verfrühten Seneszenz der Blätter (vgl. Abb. 27). Mit zunehmendem Alter der Pflanzen war ein stark reduziertes und eher buschiges Wachstum der Pflanzen erkennbar. Besonders auffallend war die geringe

Samenproduktion der PIC1-Überexprimierer aufgrund einer verfrühten Seneszenz der Schoten. Ein ähnlicher Phänotyp konnte auch bei der *fer1-3-4* „Triple-Knockout" Mutante, bei der die drei in Blättern exprimierten Ferritin Gene *FER1, 3* und *4* ausgeschaltet wurden, beobachtet werden (Ravet et al., 2008). Wurde den Pflanzen kein externes Eisen verabreicht, befanden sich die *fer* Mutanten im gleichen Entwicklungsstadium wie Wildtyp-Pflanzen und setzten zum selben Zeitpunkt Blüten an. Unter Zugabe von externem Eisen zeigten die *fer* Mutanten jedoch ein reduziertes Wachstum sowie eine gestörte Blüten- und Schotenentwicklung, was sich in Folge ebenso in einer stark reduzierten Samenausbeute auswirkte. Zudem führte bei Eisenzugabe die Abwesenheit von Ferritinen in der *fer* „Knockout" Mutante zu einer verstärkten Anreicherung von freiem Eisen in Blütengeweben. Im Gegensatz dazu zeigten PIC1-überexprimiernede Pflanzen jedoch weder eine Akkumulation von freiem Eisen in Blättern oder Blüten noch hatte die Zugabe von externem Eisen einen Einfluss auf die Keimung und Entwicklung junger Pflanzen (nicht gezeigt). In zukünftigen Analysen sollten daher die möglichen Effekte einer externen Zugabe von Eisen auf adulte Pflanzen untersucht werden. Zusammenfassend hat ebenso ein Überschuss wie auch ein Verlust von PIC1 Auswirkungen auf die Metall-Homöostase und Entwicklung der Pflanze und steht in direktem Zusammenhang mit der Funktion des Eisenspeicherproteins Ferritin.

Die Untersuchung der Ultrastruktur von Chloroplasten mittels Transmissions-Elektronen-mikroskopie zeigte zum einen, dass die Plastiden von *pic1* „Knockout" Mutanten eine stark gestörte Thylakoid-Entwicklung aufweisen (vgl. Abb. 20), da in Keimblättern und Meristem-gewebe jeweils nur rudimentäre Thylakoidstrukturen in Proplastiden-ähnlichen Stadien erkennbar waren. Dagegen war in den Plastiden ausgewachsener Rosettenblätter der *pic1* Mutante überhaupt kein Thylakoidsystem mehr vorhanden. Die Funktion der Eisen-Permease PIC1 ist daher essentiell für die Entwicklung eines voll funktionsfähigen Thylakoid-membransystems in Chloroplasten. Während lebenserhaltende Funktionen in *pic1* Plastiden offensichtlich noch gewährleistet waren (vgl. IV.6), wirkte sich die Rückbildung der Thylakoide auf die Photosyntheseleistung der Mutanten aus. Anhand von DNA-Microarray- und Immuno-blotanalysen konnte gezeigt werden, dass vor allem Proteine wie beispielsweise Chlorophyll-Bindeproteine oder Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates, die an der Photosynthese beteiligt sind, in *pic1* Mutanten stark reduziert sind (vgl. Tab. 8 und Abb. 25). Außerdem konnte in der *pic1* Mutante die transkriptionelle Regulierung einer Reihe von Metalltransportern, wie beispielsweise des Eisentransporters IRT1 festgestellt werden, was die Funktion von PIC1 in der Eisen-Homöostase der Pflanze unterstreicht. Eine drastische Reduktion von Proteinen des photosythetischen Apparates wurde auch bei *irt1* Mutanten unter Eisenmangel beobachtet

(Varotto et al., 2002). Zudem ist ebenso eine ähnliche aber weniger starke Rückbildung der Thylakoide für *irt1* Mutanten beschrieben (Henriques et al., 2002).

4 Die Funktionen der Eisen-Permease PIC1 und des Eisenspeicherproteins Ferritin sind eng aneinander gekoppelt

Die Analyse der Chloroplasten-Ultrastruktur zeigte weiterhin, dass die Plastiden von Keimblättern, Rosettenblättern sowie dem Sprossmeristem der *pic1* „Knockout" Mutante durch eine Ansammlung von Elektronen-dichten Ferritin-Clustern charakterisiert sind (vgl. Abb. 20 und 21). Dieses Ergebnis konnte sowohl durch einen erhöhten RNA Gehalt an *FER1* und *FER4* mithilfe von DNA-Microarray-Analysen als auch durch Immunoblotanalysen, die eine Akkumulation von Ferritin Proteinen in *pic1* Mutanten erkennen ließen, verifiziert werden (vgl. Abb. 22). Ferritine sind große Proteinkomplexe aus 24 α-helikalen Untereinheiten, die bis zu 4500 Eisenatome einlagern können und deshalb nicht nur in Pflanzen sondern auch im Tierreich einen wichtigen Speicherort für freies Eisen darstellen (Harrison und Arosio, 1996; Briat und Lobréaux, 1997). Unter normalen physiologischen Bedingungen akkumulieren Ferritine hauptsächlich in nicht-grünen Plastiden, d.h. in maturen Chloroplasten, die photosynthetisch aktiv sind, werden kaum Ferritine detektiert (Lobréaux und Briat, 1991; Theil und Hase, 1993; Briat und Lobréaux, 1997). Es ist allgemein bekannt, dass freies Eisen in Zellen oxidativen Stress induziert, da Eisen-Ionen über die Fenton-Reaktion reaktive Sauerstoffspezies generieren. Die Tatsache, dass in *pic1* Mutanten mit Eisen beladene Ferritin-Aggregate akkumulieren, deutet zum einen auf eine gestörte Metall- bzw. Eisen-Homöostase der Plastiden, aber auch auf oxidativen Stress der Pflanzen hin. Erst kürzlich postulierten Ravet et al. (2008), dass Ferritine nicht nur eine Rolle als Eisenspeicher spielen, sondern in der Zelle auch eine Schutzfunktion gegenüber oxidativen Stress ausüben. Interessanterweise zeigten PIC1-Überexpressionspflanzen einen reduzierten Transkriptgehalt der Ferritine *FER1* und *FER4* sowie einen zu *fer* Mutanten ähnlichen Phänotyp (vgl. IV.3). Die enge Kopplung der Funktion der Permease PIC1 und Ferritin äußert sich ebenfalls in *fer* Mutanten, wo in Abwesenheit von Ferritinen unter Zugabe von externem Eisen ein erhöhter Transktiptgehalt von *PIC1* nachweisbar war (Ravet et al., 2008).

Sowohl die Analyse der DNA-Microarray Daten als auch die Immunoblotanalysen (vgl. Abb. 23) ließen in *pic1* Mutanten einen erhöhten Transkript- und Proteingehalt der cytosolischen Kupfer-Superoxiddismutase CSD1 und der plastidären CSD2 (Kliebenstein et al., 1998) erkennen. Außerdem war im Vergleich zum Wildtyp der Kupfergehalt in *pic1* Mutanten verdoppelt. Im Gegensatz dazu war der Transkript- und Proteingehalt der plastidären, Eisen-

abhängigen Superoxiddismutase FSD1 in *pic1* „Knockout“ Mutanten in geringem Maße reduziert und der Eisengehalt der gesamten Pflanze im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Die Superoxiddismuteasen CSD1 und CSD2 sowie FSD1 werden in Pflanzen in Folge von oxidativem Stress zur Detoxifikation der reaktiven Sauerstoffspezies benötigt (Kliebenstein et al., 1998; Asada, 1999, Abdel-Ghany et al., 2005a). Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Funktionen von PIC1 und Ferritin eng aneinander gekoppelt sind. Das in den Ferritin-Clustern der *pic1* „Knockout“ Mutanten gespeicherte Eisen ist offensichtlich nicht mehr für die Pflanze, beispielsweise zur Biogenese von Fe-S Zentren (siehe unten) nutzbar. Eine mögliche Funktion von PIC1 in der Mobilisierung des in Ferritin-Clustern gespeicherten Eisens ist daher denkbar. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die primäre Funktion von PIC1 im Transport von Eisen über die innere Chloroplasten-Hüllmembran liegt, wodurch Eisen unter anderem für die Fe-S Biogenese bereitgestellt wird. In älteren *pic1* „Knockout“ Mutanten steht daher kein Eisen mehr für die Fe-S Biogenese zur Verfügung, sodass die Synthese der Fe-S Proteine nicht mehr gewährleistet ist und in Folge die Thylakoide abgebaut werden. Das daraus freiwerdende Eisen wird zum Schutz vor oxidativen Stress in Ferritin-Clustern gespeichert. Das Vorhandensein rudimentärer Thylakoide in jungen Plastiden und die kaum reduzierte Keimfähigkeit von *pic1* Mutanten lassen vermuten, dass das Eisen bis dahin durch einen alternativen Transportweg in das Stroma des Chloroplasten gelangt.

5 Die Rolle von PIC1 in der Biogenese von Fe-S Proteinen in Chloroplasten

In Pflanzen übernehmen Fe-S Proteine nicht nur eine zentrale Funktion in der Elektronentransportkette der mitochondrialen Atmungskette, sondern auch in der Photosynthese (Raven et al., 1999), wo Fe-S Zentren beispielsweise im PSI, im Cytochrom b6-f Komplex und an Ferredoxin gebunden sind. In den letzten Jahren konnte bestätigt werden, dass die Assemblierung der an der Photosynthese beteiligten Fe-S Proteine durch eine im Chloroplasten lokalisierte Fe-S-Biogenese Maschinerie stattfindet (zur Übersicht siehe Balk und Lobréaux, 2005; Ye et al., 2006a). Der für die Assemblierung der Fe-S Zentren benötigte elementare Schwefel wird durch das Protein CpNifS bereitgestellt, für das eine Cystein-Desulfurase-Aktivität nachgewiesen wurde (Leon et al., 2002; Leon et al., 2003). Die Aktivität von CpNifS kann durch den Aktivator CpSufE um ein Vielfaches gesteigert werden (Xu und Møller, 2006; Ye et al., 2006b). Da in der *pic1-1* Mutante weder die Genexpression von CpNifS noch von CpSufE reguliert wurde, lässt dies auf eine normale Aktivität dieser Enzyme schließen. Interessanterweise zeigen PIC1 und CpSufE jedoch ein extrem ähnliches Expressionsmuster in der Pflanze, was auf eine Funktion der Proteine im gleichen Prozess schließen lässt (Prof. A.

Weber, Institut für Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zum Schwefel wird Eisen über einen bis jetzt unbekannten Mechanismus mobilisiert und zu Gerüst-Proteinen transferiert, die wahrscheinlich die Integration des Eisens in die Fe-S Zentren koordinieren. Die niedrige Genexpression der Gerüst-Proteine Nfu1, Nfu2 und Nfu3 (Leon et al., 2003) sowie CpIscA (Abdel-Ghany et al., 2005b) in der *pic1* „Knockout" Mutante könnte daher auf eine gestörte Assemblierung der Fe-S Zentren in Chloroplasten hinweisen, vor allem da die korrespondierenden Gene der mitochondrialen Fe-S-Biogenese nicht reguliert wurden (Duy et al., 2007a). Darüber hinaus zeigte die Analyse der DNA-Microarray Daten von *pic1* „Knockout" Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, dass sich der Verlust von PIC1 außerdem in einer reduzierten Expression plastidärer Fe-S Proteine wie zum Beispiel der Ferredoxine FEDA und FD1 sowie der Ferredoxin–Thioredoxin-Reduktasen FTRβ and FTR-A äußert (Duy et al., 2007a). Eine Funktion von PIC1 im Transportweg des für die Fe-S-Cluster Biogenese benötigten Eisens ist daher sehr wahrscheinlich.

6 PIC1 hat keine Funktion im Protein-Import in Chloroplasten

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beschriebenen Funktion von PIC1 im Eisentransport über die innere Chloroplasten-Hüllmembran wurde das Protein PIC1 in einer unabhängigen Studie als Tic21 und damit als Bestandteil der Protein-Import Maschinerie in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten identifiziert (Teng et al., 2006). Die von Teng und Mitarbeitern untersuchten *cia5* „Knockout" Mutanten, von denen *cia5-3* mit der hier charakterisierten *pic1-1* Mutante identisch ist, zeigten den gleichen chlorotischen Phänotyp wie *pic1* Mutanten. Basierend auf Immunoblotanalysen, welche eine sehr geringe Akkumulation der Vorstufenproteine OE33 (PSBO-1) und POR in der *cia5-2* Mutante erkennen ließen, wurde ein Defekt im Protein-Import der Chloroplasten vermutet. Im Gegensatz dazu konnten Immunoblotanalysen der vorliegenden Dissertation eindeutig zeigen, dass weder die Vorstufenproteine von PSBO-1 und POR noch die von weiteren, getesteten Proteinen detektierbar waren (vgl. Abb. 22, 23 und 25). Um die vermutete Funktion von Tic21/PIC1 im Protein-Import genauer zu analysieren wurden von Teng et al. (2006) Importstudien mit isolierten Chloroplasten von transgenen *Arabidopsis* Pflanzen durchgeführt, in denen Tic21/PIC1 eine Punktmutation (K112C) trägt und unter der Kontrolle des 35S-Promoters exprimiert wird. Da diese Chloroplasten einen Importdefekt für die Proteine RBCS und L11 aufweisen, wurde geschlussfolgert, dass dieser auf die gestörte Funktion des mutierten Tic21/PIC1 Proteins zurückzuführen ist. Es wurde allerdings weder unabhängig getestet, ob die Mutation K112C von Tic21/PIC1 tatsächlich die Funktion des Proteins

beeinflusst noch wurden weitere Punktmutationen untersucht. Da zudem noch ein starker Phänotyp der Transformanten, die sowohl homozygot für das *cia5-2* Allel als auch für das 35S::Tic21/PIC1(K112C)-Konstrukt waren, erkennbar war, können pleiotrope Effekte durch das Ausschalten anderer Gene nicht ausgeschlossen werden. Außerdem werden in *pic1* Mutanten mehrere Proteine in den Chloroplasten importiert und zur ihrer maturen Form prozessiert. Dabei konnte im Rahmen dieser Dissertation sogar ein höherer Gehalt an maturen Ferritin und CSD2 Proteinen in Plastiden der *pic1* Mutanten detektiert werden (vgl. Abb. 22, 23 und 25). Es ist daher anzunehmen, dass der in *cia5* Mutanten beschriebene Defekt im Import bestimmter Proteine wie beispielsweise der an der Photosynthese beteiligten Proteine PSBO-1 und POR eher ein indirekter Effekt ist, der durch die stark erniedrigte Expression dieser Proteine in *pic1*/*cia5* Mutanten hervorgerufen wird (vgl. Abb. 25). Zudem sind lebenserhaltende Funktionen außer der Photosynthese in *pic1*/*cia5* Mutanten intakt. Weder die Importpore Toc75 noch der Aminosäurekanal OEP16 in der äußeren Hüllmembran zeigten eine Regulation in den Mutanten. Darüber hinaus sind *pic1*/*cia5* Mutanten heterotroph lebensfähig, was darauf hinweist, dass weder die Stickstoff- und Schwefelfixierung noch die Aminosäure-Biosynthese als auch die Anthocyan-Biosynthese gestört sind.

7 Struktur und Funktion: PIC1 als Permease eines chloroplastidären ABC-Transporters prokaryotischen Ursprungs?

Es konnten einige der zu PIC1 verwandten cyanobakteriellen Proteine in bestimmte orthologe Gruppen (Tatusov et al., 2003) eingeordnet werden, die im allgemeinen eine Rolle im Membrantransport von Ionen oder Metaboliten spielen sowie als potentielle Permease-Untereinheit eines prokaryotischen ABC-Transportersystems annotiert sind. Es wurde daher im Rahmen dieser Dissertation untersucht, ob PIC1 die strukturellen Voraussetzungen für eine Interaktion mit ABC-Untereinheiten mitbringt. Die Bildung von Homodi- und Tetrameren der Permease-Untereinheit PIC1 konnte sowohl durch Immunoblotanalysen als auch durch BN-PAGE Experimente bestätigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass PIC1 wahrscheinlich einen homotetrameren Komplex in der inneren Chloroplasten-Hüllmembran ausbildet, der am Transport von Eisen-Ionen beteiligt ist. Pagliuca et al. (2007) konnten in Experimenten mit dem viralen K^+-Kanal Kcv zeigen, dass die Anwesenheit von Kalium-Ionen einen direkten Einfluss auf die Stabilität des tetrameren Membrankomplexes hat. In Anlehnung an diesen Versuchsansatz wurde mittels BN-PAGE getestet, ob durch die Zugabe von Fe^{2+}-Ionen ein Einfluss auf die Homooligomerbildung des PIC1 Proteins besteht. Es konnte jedoch weder eine Zunahme noch eine Abnahme der tetrameren Komplexe in An- bzw. Abwesenheit von Fe^{2+}-

Ionen beobachtet werden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der PIC1-Familie zeigte, dass ein konservierter Histidin-Rest in der vierten Transmembrandomäne des PIC1 Proteins lokalisiert ist (vgl. Abb. 8A und 42). In der Literatur wird für den Eisentransporter IRT1 eine Funktion von konservierten Histidin-Resten in der Bindung von Metallionen während des Transports diskutiert (Rogers et al., 2000). Interessanterweise weist auch die Struktur des Eisen-Bindeproteins FutA1, das eine Komponente eines ABC-Transportersystems zur Eisenaufnahme in dem Cyanobakterium *Synechocystis* darstellt (vgl. I.4), eine Eisenbindestelle auf, die aus einem Histidin-Rest sowie vier Tyrosin-Resten besteht (Koropatkin et al., 2007). Trotzdem scheint jedoch die Anwesenheit von Eisen-Ionen keinen Einfluss auf die Komplexstabilität des PIC1 Homotetramers auszuüben.

Die Sekundärstruktur von PIC1 besteht aus vier hydrophoben und innerhalb der Familie konservierten Transmembrandomänen. Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei weitere, relativ kurze α-Helices identifiziert. Die aus fünf Aminosäuren bestehende α-Helix IIa befindet sich im Anschluss an die zweite Transmembrandomäne, während die acht Aminosäure lange α-Helix IIIa kurz vor der dritten Transmembrandomäne lokalisiert ist. Da beide Helices mehrere geladene Aminosäuren enthalten, ist anzunehmen, dass sie nicht in die Membran inseriert werden. Aufgrund der Strukturvorhersage (ARAMEMNON, Schwacke et al., 2003) und der PIC1 GFP-Signale (vgl. Abb. 31) wird angenommen, dass N- und C-Terminus von PIC1 im Stroma lokalisiert sind. In den letzten Jahren konnte die Feinstruktur von prokaryotischen ABC-Transportern mittels Röntgenstrukturanalysen an Proteinkristallen aufgeklärt werden (Dawson und Locher, 2006; Hollenstein et al., 2007a und 2007b; vgl. I.4). Dabei konnte gezeigt werden, dass die transmembranen Permease-Domänen sowohl von Exportern als auch von Importern durch ähnliche, kurze cytosolische α-Helices gekennzeichnet sind, welche die Bindungsstellen zu den löslichen ATPase-Untereinheiten (ABC-Domänen) darstellen. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse sowie der Nachweis einer Homooligomerbildung der Permease PIC1 legen daher nahe, dass PIC1 die Permease-Untereinheit eines chloroplastidären ABC-Transportersystems prokaryotischen Ursprungs repräsentiert, welches aus getrennten Permease- und ABC-Untereinheiten besteht und am Transport von Eisen-Ionen beteiligt ist. Die Bildung eines potentiellen Proteinkomplexes aus vier PIC1-Monomeren steht dieser Vermutung allerdings kritisch gegenüber, da ein ABC-Transporter zum derzeitigen Stand der Forschung aus nur zwei Permease-Untereinheiten aufgebaut ist. Darüber hinaus ist für die volle Funktionsfähigkeit des Transporters eine Interaktion mit löslichen ABC-Untereinheiten über die beiden kurzen α-Helices IIa und IIIa notwendig (Abb. 42).

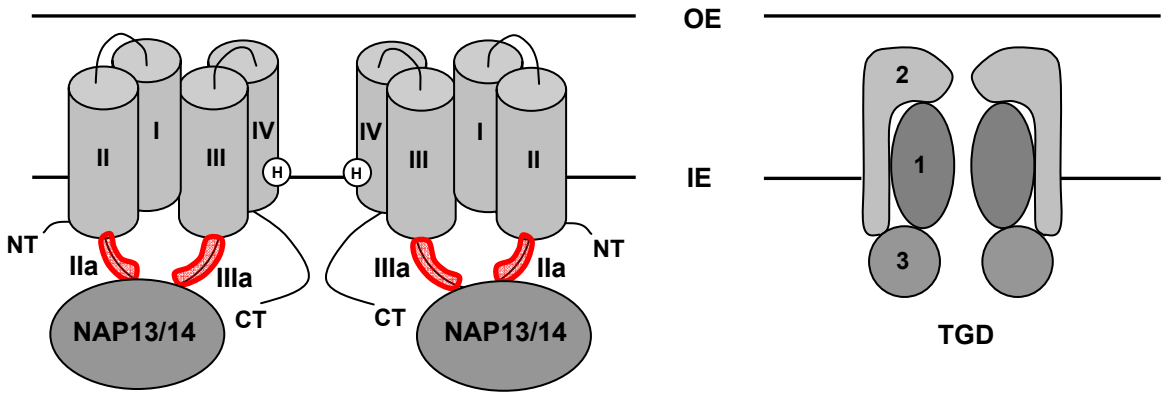


Abbildung 42: Hypothetisches Modell der Permease-Untereinheit PIC1 und der löslichen ABC-Untereinheiten NAP13 bzw. NAP14 im Vergleich zum Lipidtransporter-Komplex TGD.
Links: Hypothetisches Modell zweier PIC1 Permease-Untereinheiten. Jede Untereinheit interagiert über die zwei kurzen α-Helices (rot) mit jeweils einer löslichen NAP13 oder NAP14 ABC-Untereinheit. Das konservierte Histidin in der vierten Transmembranhelix ist dargestellt. **Rechts:** Dimerer Komplex des ABC-Transportersystems TGD, bestehend aus den Proteinen TGD1, TGD2 und TGD3 (modifiziert nach Lu et al., 2007). Die äußere (OE) und innere (IE) Hüllmembran von Chloroplasten sind aufgezeigt.

In den letzten Jahren konnten bereits einige lösliche ABC-Proteine als Komponenten von ABC-Transportern im Chloroplasten identifiziert werden. So sind beispielsweise AtSufC (NAP7) und AtSufB (NAP1) an der Fe-S-Cluster Biogenese im Stroma (Xu und Møller, 2004; Xu et al., 2005b) und TGD3 am Transport von Lipiden über die innere Hüllmembran (Lu et al., 2007; vgl. I.4) beteiligt. Durch *in vivo* Lokalisationsstudien von Proteinen, die der ABC-Transporterfamilie angehören bzw. eine Rolle im Metalltransport oder in der Metall-Homöostase spielen (vgl. Tab. 12), konnten in dieser Arbeit weitere, plastidäre ABC-Transporterproteine unbekannter Funktion identifiziert werden. Während das Protein CBY-like, bestehend aus sechs transmembranen α-Helices, wahrscheinlich in der inneren Hüllmembran lokalisiert ist, zeigten die beiden löslichen ABC-Untereinheiten NAP13 und NAP14 eine stromale Lokalisation. Da im Rahmen dieser Arbeit nur zu den löslichen ABC-Untereinheiten T-DNA-Insertionslinien analysiert werden konnten, kann für das Protein CBY-like noch keine Aussage über dessen mögliche Funktion in der Hüllmembran von Chloroplasten getroffen werden. Die phänotypische Analyse von homozygoten *nap13-1* und *nap14-1* Mutanten ließ ein zu *pic1* „Knockout“ Mutanten ähnliches, chlorotisches Erscheinungsbild erkennen (vgl. Abb. 40). Interessanterweise zeigten sowohl *nap13* als auch *nap14* „Knockout“ Mutanten die für *pic1* Mutanten typische Akkumulation von Ferritin-Clustern (vgl. Abb. 41). Obwohl zum jetzigen Zeitpunkt sowohl über die *in vivo* Funktion dieser beiden chloroplastidären ABC-Untereinheiten als auch über eine potentielle Interaktion mit PIC1 nur spekuliert werden kann, ist grundsätzlich eine überlappende Funktion von NAP13 bzw. NAP14 mit PIC1 und eine Interaktion der Proteine sehr wahrscheinlich (vgl. Abb. 42).

VI Zusammenfassung

Der Transport von Übergangsmetallen in das Stroma von Chloroplasten ist für Pflanzen lebenswichtig. Neben Mangan und Kupfer spielt vor allem Eisen aufgrund seiner Redoxeigenschaften eine zentrale Rolle in der Elektronentransportkette der Photosynthese sowie als Kofaktor der chloroplastidären Superoxiddismutasen. Des Weiteren ist Eisen essentiell für die Biogenese von Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen im Chloroplasten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protein PIC1 aus *Arabidopsis* als bisher erste bekannte Komponente des chloroplastidären Eisentransportsystems über die innere Hüllmembran beschrieben. PIC1 (engl. für „permease in chloroplasts 1“) bildet dabei höchstwahrscheinlich die transmembrane Permease-Untereinheit des Eisentransporters aus. Durch Immunoblotanalysen, *in vivo* Lokalisationsstudien und *in vitro* Importexperimente in Chloroplasten konnte die Integration von PIC1 in die innere Hüllmembran von Chloroplasten nachgewiesen werden. PIC1 weist neben orthologen Proteinen in photosynthetisch aktiven Eukaryoten ausschließlich Sequenzähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Proteinen auf, was darauf hindeutet, dass PIC1 prokaryotischen Ursprungs ist. Die Beteiligung von PIC1 und seinem Ortholog sll1656 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* am Membrantransport von Eisen konnte funktionell durch die Wachstumskomplementation sowie die erhöhte Eisenakkumulation in mit PIC1 und sll1656 transformierten Hefezellen erbracht werden. Die Analyse von *pic1* „Knockout“ Mutanten in *Arabidopsis* zeigte, dass homozygote *pic1* Pflanzen neben einem reduzierten Wachstum auch einen stark chlorotischen Phänotyp aufweisen. In Zusammenhang mit einer abnormalen Blattmorphologie aus undifferenziertem Palisaden- und Schwammparenchym, ist dieses chlorotische Erscheinungsbild ein klassisches Eisenmangelsymptom von Pflanzen. Untersuchungen zur Ultrastruktur der Chloroplasten von *pic1* „Knockout“ Mutanten bestätigten, dass *pic1* Plastiden eine stark gestörte Thylakoid-Entwicklung aufweisen. Während lebenserhaltende Funktionen noch gewährleistet waren, hatte diese Rückbildung der Thylakoide eine negative Auswirkung auf die Photosyntheseleistung der Pflanzen. Zudem deutet die Akkumulation des Eisenspeicherproteins Ferritin auf eine gestörte Metall- und Eisen-Homöostase der Plastiden sowie auf oxidativen Stress der gesamten Pflanze hin. Die Regulation weiterer am Metalltransport bzw. in der Metall-Homöostase beteiligter Proteine in *pic1* Mutanten bestätigte dies. PIC1-überexprimierende Pflanzen zeigten dagegen einen reduzierten Transkriptgehalt von Ferritin und wiesen einen zu *fer* Mutanten ähnlichen Phänotyp auf, was eine enge Kopplung der Funktion von PIC1 und Ferritin vermuten lässt. Zusammenfassend ergibt sich aus den im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnissen eine Funktion der

Permease PIC1 bei dem Transport von Eisen-Ionen über die innere Hüllmembran der Chloroplasten. PIC1 liefert somit zum einen das für die Bildung von Fe-S Proteinen im Stroma benötigte Eisen und steht zum anderen in engem funktionellen Kontakt mit dem plastidären Eisenspeicherprotein Ferritin. Die Analyse der Struktur des Membranproteins PIC1 legt weiterhin nahe, dass PIC1 die Permease-Untereinheit eines chloroplastidären ABC-Transportersystems prokaryotischen Ursprungs darstellt. Zur vollen Funktionsfähigkeit benötigt dieses potentielle ABC-Transportersystem allerdings noch lösliche, an die Permease bindende ABC-Domänen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die bisher in der Literatur nicht beschriebenen ABC-Untereinheiten NAP13 und NAP14 im Stroma des Chloroplasten lokalisiert werden. Eine Analyse von *nap13* und *nap14* „Knockout“ Mutanten in Arabidopsis zeigte weiterhin einen zu *pic1* Mutanten ähnlichen, chlorotischen Phänotyp sowie eine Akkumulation von Ferritin im Stroma der Plastiden. Damit konnten mit den ABC-Untereinheiten NAP13 und NAP14 mögliche Interaktionspartner von PIC1 und somit weitere Komponenten des Eisentransportsystems in Chloroplasten identifiziert werden.

Literatur

Abdel-Ghany, S.E., Muller-Moule, P., Niyogi, K.K., Pilon, M. und Shikanai, T. (2005a) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* **17**, 1233-1251.

Abdel-Ghany, S.E., Ye, H., Garifullina, G.F., Zhang, L., Pilon-Smits, E.A.H. und Pilon, M. (2005b) Iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. Involvement of the scaffold protein CpIscA. *Plant Physiol.* **138**, 161-172.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R. und Heller, C. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

Andrews, S.C., Robinson, A.K. und Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 215-237.

Arnon, D.J. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 42-45.

Aronsson, H. und Jarvis, P. (2002) A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts. *FEBS Lett.* **529**, 215-220.

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601-639.

Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P.S., Li, L., Davis-Kaplan, S. et al. (1994) The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**, 403-410.

Awai, K., Xu, C., Tamot, B. und Benning, C. (2006) A phosphatidic acid-binding protein of the chloroplast inner envelope membrane involved in lipid trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 10817–10822.

Balk, J. und Lobréaux, S. (2005) Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends Plant Sci*. **10**, 324-331.

Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993) *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris*/*Life Sci.* **316**, 1194-1199.

Bölter, B., Soll, J., Hill, K., Hemmler, R. und Wagner, R. (1999) A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastidic outer envelope of pea. *EMBO Journal* **18**, 5505-5516.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Braun, V., Hantke, K. und Koster, W. (1998) Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Metal Ions Biol. Syst*. **35**, 67-145.

Briat, J-F. und Lobréaux, S. (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 187-193.

Briat, J-F., Lobréaux, S., Grignon, N. und Vansuyt, G. (1999) Regulation of plant ferritin synthesis: How and why. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 155-166.

Briat, J-F., Curie, C. und Gaymard, F. (2007) Iron utilization and metabolism in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 276-82.

Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M. und Werner, T. (2005) MatInspector and beyond: Promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **13**, 2933-2942 .

Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J. und Andrews, S.C. (2006) Feo - Transport of ferrous iron into bacteria. *BioMetals* **19**, 143-157.

Castelli, V., et al. (2004) Whole genome sequence comparisons and "full-length" cDNA sequences: A combined approach to evaluate and improve *Arabidopsis* genome annotation. *Genome Res.* **14**, 406-413.

Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci*. **5**, 174-182.

Clausen, C., Ilkavets, I., Thomson, R., Philippar, K., Vojta, A., Möhlmann, T., Neuhaus, E., Fulgosi, H. und Soll, J. (2004) Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta* **220**, 30-37.

Colangelo, E.P. und Guerinot, M.L. (2004) The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell* **16**, 3400-3412.

Colangelo, E.P. und Guerinot, M.L. (2006) Put the metal to the petal: Metal uptake and transport throughout plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 322-330.

Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R. und Briat, J-F. (2000) Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* **347**, 749-755.

Curie, C. Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J-F. und Walker, E.L. (2001) Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature* **409**, 346-349

Dancis, A., Klausner, R.D., Hinnebusch, A.G. und Barriocanal, J.G. (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2294-2301.

Dancis, A., Haile, D., Yuan, D.S. und Klausner, R.D. (1994a) The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* **269**, 25660-25667.

Dancis, A., Yuan, D.S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J. und Klausner, R.D. (1994b) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**, 393-402.

Davidson, A.L. und Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**, 241-268.

Dawson, R.J.P. und Locher, K.P. (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180-185.

Delhaize, E., Gruber, B.D., Pittman, J.K., White, R.G., Leung, H., Miao, Y., Jiang, L., Ryan, P.R. und Richardson, A.E. (2007) A role for the *AtMTP11* gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance. *Plant J*. **51**, 198-210.

De Silva, D.S., Davis-Kaplan, S.R., Fergestad, J. und Kaplan, J. (1997) Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **272**, 14208-14213.

DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Sanderson, T., Bosler Eisley, R. und Walker, E.L. (2004) *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J.l* **39**, 403-414.

Dix, D.R., Bridgham, J.T., Broderius, M.A., Byersdorfer, C.A. und Eide, D.J. (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26092-26099.

Dix, D.R., Bridgham, J.T., Broderius, M. und Eide, D. (1997) Characterization of the FET4 protein of yeast. Evidence for a direct role in the transport of iron. *J. Biol. Chem.* **272**, 11770-11777.

Drummond, R.S.M., Tutone, A., Li, Y.C. und Gardner, R.C. (2006) A putative magnesium transporter AtMRS2-11 is localized to the plant chloroplast envelope membrane system. *Plant Science* **170,** 78-89.

Durrett, T.P., Gassmann, W. und Rogers, E.E. (2007) The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol*. **144**, 197-205.

Duy, D., Wanner, G., Meda, A.R., von Wirén, N., Soll, J. und Philippar, K. (2007a) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell* **19**, 986-1006.

Duy, D., Soll, J. und Philippar, K. (2007b) Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol. Chem.* **388**, 879-889.

Eide, D., Davis-Kaplan, S., Jordan, I., Sipe, D. und Kaplan, J. (1992) Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. The ferrireductase and Fe(II) transporter are regulated independently. *J. Biol. Chem.* **267**, 20774-20781.

Eide, D., Broderius, M., Fett, J. und Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5624-5628.

Firlej-Kwoka, E. (2008) Protein import into the inner envelope membrane of chloroplasts. *Dissertation*.

Flügge, U.I. und Benz, R. (1984) Pore-forming activity in the outer membrane of the chloroplast envelope. *FEBS Lett.* **169**, 85-89.

Flügge, U.I. und Heldt, H.W. (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 129-44.

Frederick, S.E. und Newcomb, E.H. (1969) Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *Journal of Cell Biology* **43**, 343-353.

Froehlich, J.E., Wilkerson, C.G., Ray, W.K., McAndrew, R.S., Osteryoung, K.W., Gage, D.A und Phinney, B.S. (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* **2**, 413-425.

Garcia, O., Bouige, P., Forestier, C. und Dassa, E. (2004) Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *J. Mol. Biol.* **343**, 249-265.

Gietz, R.D. und Schiestl, R.H. (1991) Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* **7**, 253-263.

Goetze, T., Philippar, K., Ilkavets, I., Soll, J. und Wagner, R. (2006) OEP37 is a new member of the chloroplast outer membrane ion channels. *J. Biol. Chem.* **281**, 17989-17998.

Green, L.S. und Rogers, E.E. (2004) FRD3 controls iron localization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 136, 2523-2531.

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

Hantke, K. (1987) Ferrous iron transport mutants in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **44**, 53-57.

Harrison, P.M. und Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1275,** 161-203.

Hassett, R.F., Yuan, D.S. und Kosman, D.J. (1998) Spectral and kinetic properties of the Fet3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*, a multinuclear copper ferroxidase enzyme. *J. Biol. Chem.* **273**, 23274-23282.

Heazlewood, J.L., Verboom, R.E., Tonti-Filippini, J., Small, I. und Millar, A.H. (2007) SUBA: the *Arabidopsis* subcellular database. *Nucleic Acids Res.* **35**, 213-218.

Hell, R. und Stephan, U.W. (2003) Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta* **216**, 541-551.

Henriques, R., Jasik, J., Klein, M., Martinoia, E., Feller, U., Schell, J., Pais, M.S. und Koncz, C. (2002) Knock-out of *Arabidopsis* metal transporter gene IRT1 results in iron deficiency accompanied by cell differentiation defects. *Plant Mol. Biol.* **50**, 587-597.

Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P.C., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., Holland, B., Gray, L., Buckel, S.D., Bell, A.W. und Hermodson, M.A. (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**, 448-450.

Higgins, C.F. (2001) ABC transporters. Physiology, structure and mechanism - An overview. *Res. Microbiol.* **152**, 205-210.

Higgs, P.I., Myers, P.S. und Postle, K. (1998) Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* **180**, 6031-6038.

Hollenstein, K., Frei, D.C. und Locher, K.P. (2007a) Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **446**, 213-216.

Hollenstein, K., Dawson, R.J.P. und Locher, K.P. (2007b) Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 412-418.

Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E.L. und Guerinot, M.L. (2008) Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 10619–10624.

Joyard, J., Teyssier, E., Miège, C., Berny-Seigneurin, D., Maréchal, E., Block, M.A., Dorne, A-J., Rolland, N., Ajlani, G. und Douce, R. (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol* **118**, 715-723.

Kaneko, T., et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.

Katoh, H., Hagino, N., Grossman, A.R. und Ogawa, T. (2001) Genes essential to iron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriolgy* **183**, 2779-2784.

Kim, D-Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. und Lee, Y. (2006) AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **140**, 922-932.

Kim, S.A. und Guerinot, M.L. (2007) Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett.* **581**, 2273-2280.

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

Kliebenstein, D.J., Monde, R.A. und Last, R.L. (1998) Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiol.* **118**, 637-650.

Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 383-396.

Koropatkin, N., Randich, A.M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H.B. und Smith, T.J. (2007) The structure of the iron-binding Protein, FutA1, from *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* **282**, 27468-27477.

Korshunova, Y.O., Eide, D., Clark, W.G., Guerinot, M.L. und Pakrasi, H.B. (1999) The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* **40**, 37-44.

Kosman, D.J. (2003) Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Molecular Microbiology* **47**, 1185-1197.

Köster, W. (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol*. **152**, 291-301.

Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W. und Hell, R. (2002) A metalbinding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* **277**, 25062-25069.

Kunst, L. (1998) Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* **82**, 43-48.

Kyhse-Anderson, J. (1984) Electroblotting of multiple gels-a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.

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

Larsen, R.A., Thomas, M.G., Wood, G.E. und Postle, K. (1994) Partial suppression of an *Escherichia coli* TonB transmembrane domain mutation (ΔV17) by a missense mutation in ExbB. *Mol. Microbiol.* **13**, 627-640.

Leister, D. (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics* **19**, 47-56.

Leister, D. (2005) Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends in Genetics* **21**, 655-663.

Le Jean, M., Schikora, A., Mari, S., Briat, J.F. und Curie, C. (2005). A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *Plant J.* **44**, 769-782.

Leon, S., Touraine, B., Briat, J-F. und LobréauxS. (2002) The AtNFS2 gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem J* **366**, 557-564.

Leon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J-F. und Lobréaux, S. (2003) Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **371**, 823-830.

Lesuisse, E. und Labbe, P (1989) Reductive and non-reductive mechanisms of iron assimilation by the yeast *Saccharomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 257-263.

Li, H.M., Moore, T. und Keegstra, K. (1991) Targeting of proteins to the outer envelope membrane uses a different pathway than transport into chloroplasts. *Plant Cell* **3**, 709-717.

Lobréaux, S. und Briat, J-F. (1991). Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem. J.* **274**, 601-606.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

Lu, B., Xu, C., Awai, K, Jones, A.D. und Benning, C. (2007) A Small ATPase Protein of *Arabidopsis*, TGD3, Involved in Chloroplast Lipid Import. *J. Biol. Chem.* **282**, 35945-35953.

Margulis, L. (1970) Origin of Eucaryotic Cells. Yale Univ. Press, New Haven

Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.

Martin, W. und Herrmann, R.G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol.* **118**, 9-17.

Matsuzaki, M., et al. (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**, 653-657.

Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Matthuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A. und Guerinot, M.L. (2001) Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 1646-1667.

McGuffin, L.J., Bryson, K. und Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-405.

Merchant, S. (2006). Trace Metal Utilization in Chloroplasts. In *The Structure and Function of Plastids*, 199-218, Eds. Wise, R.R. und Hoober, K.J. Springer, Dordrecht, Niederlande.

Mukherjee, I., Campbell, N.H., Ash, J.S. und Connolly, E.L. (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* **223**, 1178-1190.

Nakamura, Y. et al. (2003). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* **10**, 137-145.

Negishi, T., Nakanishi, H., Yazaki, J., Kishimoto, N., Fujii, F., Shimbo, K., Yamamoto, K., Sakata, K., Sasaki, T., Kikuchi, S., Mori, S. und Nishizawa, N.K. (2002) cDNA microarray analysis of gene expression during Fe-deficiency stress in barley suggests that polar transport of vesicles is implicated in phytosiderophore secretion in Fe-deficient barley roots. *Plant J.* **30**, 83-94.

Nishiyama, T., et al. (2003). Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: Implication for land plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8007-8012.

Pagliuca, C., Goetze, T.A., WagnerR., Thiel, G., Moroni, A. und Parcej, D. (2007) Molecular properties of Kcv, a virus encoded K+ channel. *Biochemistry* **46**, 1079-1090.

Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M., Blaudez, D., Chalot, M. und Sanders, D. (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8532-8537.

Philippar, K. und Soll, J. (2007). Intracellular transport: solute transport in chloroplasts, mitochondria, peroxisomes and vacuoles, and between organelles. In *Plant Solute Transport*, Eds. Yeo, A. und Flowers, T. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Pohlmeyer, K., Soll, J., Steinkamp, T., Hinnah, S. und Wagner, R. (1997) Isolation and characterization of an amino acid selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9504-9509.

Pohlmeyer, K., Soll, J., Grimm, R., Hill, K. und Wagner, R. (1998) A high-conductance solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. *Plant Cell* **10**, 1207-1216.

Raven, J.A., Evans, M.C.E. und Korb, R.E. (1999) The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O2-evolving organisms. *Photosynth. Res*. **60**, 111-149.

Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J-F., Gaymard, F. und Cellier, F. (2008) Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x

Reese, M.G. (2001) Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.* **26**, 51-56.

Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L. und Guerinot, M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694-697.

Rogers, E.F., Eide, D.J. und Guerinot, M.L. (2000) Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12356-12360.

Rogers, E.E. und Guerinot, M.L. (2002) FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1787-1799.

Rolland, N., Ferro, M., Seigneurin-Berny, D., Garin, J., Douce, R. und Joyard, J. (2003) Proteomics of chloroplast envelope membranes. *Photosynth. Res.* **78**, 205-230.

Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**, 247-259.

Rost, B. und Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**, 584-599.

Römheld, V. und Marschner, H. (1986) Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiol*. **80**, 175-180.

Saiki, R.K, Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. *A Laborytory Manual.* ColdSpring Harbor Laboratory Press, New York.

Schaaf, G., Ludewig, U., Erenoglu, B.E., Mori, S., Kitahara, T. und von Wirén, N. (2004) ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J. Biol. Chem.* **279**, 9091-9096.

Schaaf, G., Schikora, A., Häberle, J., Vert, G., Ludewig, U., Briat, J-F., Curie, C. und von Wirén, N. (2005) A putative function for the **Arabidopsis** Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol*. **46**, 762-774.

Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. und Lohmann, J.U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **37**, 501-506.

Schneider, E. und Hunke, S. (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* **22**, 1-20.

Scholz, G., Becker, R., Pich, A. und Stephan, U.W. (1992) Nicotianamine - a common constituent of strategies I and II of iron acquisition in plants. *J Plant Nutr* **15**, 1649-1665.

Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flugge, U.I. und Kunze, R. (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* **131**, 16-26.

Seigneurin-Berny, D., et al. (2006). HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J. Biol. Chem*. **182**, 2882-2892.

Sheen, J. (2002) A transient expression assay using *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/.

Shikanai, T., Muller-Moule, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K. und Pilon, M. (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* **15**, 1333-1346.

Shingles, R., North, M. und McCarty, R.E. (2001). Direct measurement of ferrous ion transport across membranes using a sensitive fluorometric assay. *Analytical Biochem.* **296**, 106-113.

Shingles, R., North, M. und McCarty, R.E. (2002). Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes. *Plant Physiol.* **128**, 1022-1030.

Shojima, S., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irifune, T. und Mori, S. (1990) Biosynthesis of phytosiderophores: *in vitro* biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from l-methionine and nicotianamine. *Plant Physiol.* **93,** 1497-1503.

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

Stearman, R.D., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D. und Dancis, A. (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**, 1552-1557.

Stengel, A., Soll, J. und Bölter, B. (2007) Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol. Chem.* **388**, 765-772.

Stephan, U.W., Schmidke, I., Stephan, V.W. und Scholz, G. (1996) The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *Biometals* **9**, 84-90.

Swofford, D.L. (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony *and Other Methods, Version 4. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Takagi, S. (1976) Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washings. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Sci Plant Nutr* **22**, 423-433.

Tatusov, R., et al. (2003) The COG database: An updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics* **4**, 41.

Taylor, A.B., Stoj, C.S., Ziegler, L., Kosman, D.J. und Hart, P.J. (2005) The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15459-15464.

Teng, Y.S., Su, Y.s., Chen, L.J., Lee, Y.J., Hwang, I. und Li, H.m. (2006) Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* **18,** 2247-2257.

Theil, E.C. und Hase, T. (1993) Plant and microbial ferritins. Academic Press Inc., New York.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.

Tiffin, L.O. (1966) Iron translocation: plant culture, exudate sampling, iron citrate analysis. *Plant Physiol.* **45**, 280-283.

Tusher, V.G., Tibshirani, R. und Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5116-5121.

Varotto, C., Maiwald, D., Pesaresi, P., Jahns, P., Salamini, F. und Leister, D. (2002) The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **31**, 589-599.

Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K. und Theodoulou, F.L. (2008) Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* **13**, 151-159.

Vert, G., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. und Curie, C. (2002) IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**, 1223-1233.

von Wirén, N., Klair, S., Bansal, S., Briat, J-F., Khodr, H., Shioiri, T., Leigh, R.A. und Hider, R.C. (1999) Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* **119**, 1107-1114.

Vothknecht, U.C. und Soll, J. (2005) Chloroplast membrane transport: Interplay of prokaryotic and eukaryotic traits. *Gene* **354**, 99-109.

Waegemann, K., Eichacker, S., und Soll, J. (1992) Outer envelope membranes from chloroplasts are isolated as right-side-out vesicles. *Planta* **187,** 89-94.

Waters, B.M., Chu, H.H., DiDonato, R.J., Roberts, L.A., Eisley, R.B., Lahner, B., Salt, D.E. und Walker, E.L. (2006) Mutations in *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol.* **141**, 1446-1458.

Weber, A.P. (2004). Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 247-253.

Wittig, I., Braun, H-P. und Schägger, H. (2006) Blue native PAGE. *Nature Protocols* **1**, 418-428.

Wu, H., Lihua, L., Du, J., Yuan, Y., Cheng, X. und Ling, H.Q. (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1505-1514.

Xu, C., Fan, J., Riekhof, W., Froehlich, J.E. und Benning, C. (2003) A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **22,** 2370-2379.

Xu, C., Fan, J., Froehlich, J.E., Awai, K. und Benning, C. (2005a) Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3094-3110.

Xu, X.M. und Møller, S.G. (2004) AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for *Arabidopsis* embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 9143-9148.

Xu, X.M., Adams, S., Chua, N.H. und Møller, S.G. (2005b) AtNAP1 represents an atypical SufB protein in *Arabidopsis* plastids. *J. Biol.Chem.* **280**, 6648-6654.

Xu, X.M. und Møller, S.G. (2006) AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **25**, 900-909.

Yamada, K., et al. (2003) Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* **302**, 842-846.

Ye, H., Pilon, M. und Pilon-Smits, E.A.H. (2006a) CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. *New Phytol*. **171**, 285-292.

Ye, H., Abdel-Ghany, S.E., Anderson, T.D., Pilon-Smits, E.A.H. und Pilon, M. (2006b) CpSufE activates the cysteine desulfurase CpNifS for chloroplastic Fe-S cluster formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 13264-13272.

Young, J. und Holland, I. B. (1999) ABC transporters: bacterial exporters - revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 177-200.

Zhou, C., Yang, Y.J. und Jong, A.Y. (1990) Mini-Prep in 10 minutes. *Biotechniques* **8**, 172-173.

Lebenslauf

Name:	Daniela Duy
Geburtsdatum:	09.08.1978
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch

09/1985 – 07/1989	Grundschule Feldkirchen-Westerham
09/1989 – 06/1998	Gymnasium Bad Aibling, Abitur
26.06.1998	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

11/1998 – 05/2004	Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München, Freising
11/2003 – 05/2004	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau von Prof. Dr. G. Forkmann zum Thema „Anthocyanidinreduktase - Enzymatische Untersuchungen beim Tee, Apfel und bei weiteren Nutzpflanzen“
28.05.2004	Erwerb des Diploms in Gartenbauwissenschaften
10/2004 – 11/2008	Promotion an der LMU München am Lehrstuhl für Biochemie und Physiologie der Pflanzen von Prof. Dr. J. Soll unter Betreuung von Dr. K. Philippar

Veröffentlichungen

Duy, D., Wanner, G., Meda, A. R., von Wirén, N., Soll, J. und Philippar, K. (2007) PIC1, an ancient permease in *Arabidopsis* chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell* 19, 986-1006.

Duy, D., Soll, J. und Philippar, K. (2007) Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biol. Chem.* 388, 879-889.

Duy, D., Soll, J. und Philippar, K. (2009) Overexpression of the chloroplast iron permease PIC1 results in reduced plant productivity and growth. In Vorbereitung.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Jürgen Soll bedanken, dass ich meine Promotion in seiner Arbeitgruppe anfertigen konnte. Seine Unterstützung hat einen großen Beitrag zum Zustandekommen dieser Arbeit geleistet.

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin Dr. Katrin Philippar für die Möglichkeit, diese interessante Themenstellung zu bearbeiten. Vielen herzlichen Dank für die großartige Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei Problemen, die Möglichkeit internationale „Konferenzluft“ zu schnuppern sowie das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit. Die Grillabende am Wörthsee haben viel Spaß gemacht.

Bei Dr. Elisabeth Ankele und Dr. Mark Hünken möchte ich mich für Ihre Ratschläge zur Kultivierung und Transformation von *Synechocystis* Zellen bedanken. Dr. Monica Balsera danke ich für ihre Informationen zur Sekundärstrukturanalyse. Außerdem geht ein Dankeschön an Dr. Bettina Bölter für die Einführung in die „Hefe-Methodik“.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Gerhard Wanner und Sylvia Dobler für die schnelle und hervorragende Durchführung der Transmissions-Elektronenmikroskopie.

Ich möchte mich bei allen TA’s, Doktoranden und Postdocs der gesamten Arbeitsgruppe für die vielen kleinen Tipps und Hilfeleistungen bedanken, die meinen Labor-Alltag so manches Mal erheblich erleichtert haben. Danke an Johanna und Fatima für all die aufmunternden Worte.

Mein spezieller Dank gilt dem Labor „111“ für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und den vielen Spaß auch außerhalb des Labors während der letzten Jahre. Ein großer Dank gebührt Daniela und Karl für die Einführung in neue Methoden, Ihre stetige Hilfsbereitschaft im Labor-Alltag und Ihre praktische Unterstützung zu Bereichen dieser Arbeit. Vielen Dank auch an Julia für Ihren Einsatz bei der Samenernte. Andreas danke ich für die zahlreichen experimentellen Tipps und das geduldige Beantworten meiner Fragen. Tina, Isabell, Ingrid und Manu danke ich für die nette Zusammenarbeit und Manu außerdem für Ihre Hilfe bei der Isolierung von *Arabidopsis* Chloroplasten. Bei Bea, Sabrina und Birgit möchte ich mich recht herzlich für Ihre Unterstützung und immerwährenden Aufmunterungen sowie die netten Abende auch außerhalb des Instituts bedanken. Ohne Euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht. Bei Sabrina und Birgit möchte ich mich auch für das kritische Lesen dieser Arbeit bedanken.

Meinen Freunden und vor allem meiner Familie möchte ich an dieser Stelle besonders herzlich danken. Meinem Mann Sebastian danke ich dafür, dass er immer für mich da ist und mich in allen meinen Entscheidungen bedingungslos unterstützt. Meiner Mama und meinem Papa danke ich sehr für Ihre stetige Unterstützung während meines Studiums sowie dieser Promotion, ohne die ich nie soweit gekommen wäre. Meinen beiden Oma's, die immer wieder versucht haben diese komplexe Materie zu verstehen, möchte ich für Ihr Interesse danken - ich bin jetzt mit der Schule endlich fertig!