

**Die SRP-abhängige Proteintranslokation des Chloroplasten  
und des endoplasmatischen Retikulums**

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

**vorgelegt von  
Thomas Brylok  
geboren am 04.09.1987 in Wolfsburg**

**München  
Dezember 2017**

Diese Dissertation wurde angefertigt unter der Leitung von PD Dr. Serena Schwenkert an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Erstgutachterin: PD Dr. Serena Schwenkert

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andreas Klingl

Tag der Abgabe: 11.12.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2018

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	1
Zusammenfassung.....	3
Summary.....	4
1. Einleitung.....	5
1.1. Die Entstehung der Organellen.....	5
1.2. Das Protein- <i>targeting</i> zum Chloroplasten.....	5
1.3. Der Präprotein-Import in die Chloroplasten.....	6
1.4. Die Assemblierung der photosynthetischen Enzymkomplexe.....	7
1.5. Die Translokation cpProteine in und über die Thylakoidmembran.....	8
1.5.1. Das Sec-System.....	9
1.5.2. Das Twin-Arginine-Translokationssystem.....	10
1.5.3. Das <i>signal recognition particle</i> -Alb3 System.....	11
1.6. Die Insertasefamilie Alb3/Oxa1/YidC.....	12
1.6.1. Die Insertase Alb3.....	13
1.7. Der Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum.....	14
1.8. Ziele der Arbeit.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Materialien.....	18
2.1.1. Chemikalien.....	18
2.1.2. Molekulare Gewichts- und Größenmarker.....	18
2.1.3. Oligonukleotide.....	18
2.1.4. Vektoren und Plasmide.....	19
2.1.5. Enzyme.....	21
2.1.6. Bakterienstämme.....	21
2.1.7. Westernblotmembran.....	21
2.1.8. Antisereren.....	21
2.1.9. Säulenmaterial.....	21
2.1.10. Genidentifikationsnummern.....	21
2.1.11. Software.....	22
2.2. Mikrobiologische Methoden.....	22
2.2.1. Medien und Anzucht von <i>E.coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	22
2.2.2. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> und <i>A. tumefaciens</i> .....	23
2.2.3. Transformation.....	23

2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	23
2.3.1.	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) .....	23
2.3.2.	Klonierungsstrategien.....	24
2.3.3.	Plasmidisolaton aus <i>E.coli</i> .....	24
2.3.4.	Sequenzierung.....	24
2.3.5.	Präparation von genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> .....	24
2.3.6.	Isolation der gDNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	24
2.3.7.	Isolation von RNA aus <i>A. thaliana</i> .....	25
2.3.8.	cDNA Synthese.....	25
2.3.9.	Gibson assembly (Gibson, 2009) .....	25
2.4.	Biochemische Methoden .....	26
2.4.1.	<i>In vitro</i> Transkription.....	26
2.4.2.	<i>In vitro</i> Translation.....	26
2.4.3.	Expression rekombinanter Proteine.....	26
2.4.4.	Aufreinigung löslicher Proteine aus <i>E.coli</i> .....	26
2.4.5.	Proteinpräparation aus <i>inclusion bodies</i> .....	27
2.4.6.	Proteinextraktion aus <i>A. thaliana</i> .....	27
2.4.7.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	27
2.4.8.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	28
2.4.9.	Färbung von SDS-Gelen .....	29
2.4.10.	Immunodetektion von Proteinen.....	29
2.4.11.	Phosphorylierungsassay .....	30
2.4.12.	Pull down assay .....	30
2.4.13.	Detektion radioaktiv markierter Proteine.....	31
2.4.14.	Proteinextraktion aus Mikrosomen .....	31
2.4.15.	Isoelektronische Fokussierung (IEF) .....	31
2.4.16.	Massenspektrometrie .....	32
2.5.	Zellbiologische Methoden.....	32
2.5.1.	Isolation von Thylakoidmembranen.....	32
2.5.2.	Solubilisierung von Thylakoidmembranen .....	33
2.5.3.	Isolation mikrosomaler Fraktionen aus <i>A. thaliana</i> .....	33
2.5.4.	<i>In vivo</i> <sup>35</sup> S-Proteinmarkierung (Nickel et al., 2016) .....	33
2.6.	Pflanzenbiologische Methoden.....	34
2.6.1.	Pflanzenzucht .....	34
2.6.2.	Stabile Transformation von <i>A. thaliana</i> mit <i>A. tumefaciens</i> .....	34
2.6.3.	Puls-Amplituden-Modulationsfluorometrie (PAM) .....	35
2.7.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	35

3. Ergebnisse .....	36
3.1. Die Funktion von Alb3 in der Thylakoidmembran .....	36
3.1.1. Der Phänotyp von <i>alb3</i> unter verschiedenen Lichtbedingungen .....	36
3.1.2. Ultrastruktur der Thylakoidmembran in <i>alb3</i> .....	37
3.1.3. Die photosynthetische Aktivität von <i>alb3</i> .....	38
3.1.4. Die Biogenese der PS-Thylakoidmembrankomplexe in <i>alb3</i> .....	39
3.1.5. Die <i>de novo</i> Synthese photosynthetischer Proteine/Komplexe in <i>alb3</i> .....	41
3.2. Die Rolle des Alb3 C-Terminus .....	44
3.2.1. Die Interaktion von A3C mit plastidären Ribosomen.....	44
3.2.2. Die posttranslationale Modifikation innerhalb des A3C .....	45
3.2.3. <i>In vivo</i> Charakterisierung der A3C-Funktion .....	46
3.3. Der Proteinimport in das ER von <i>A. thaliana</i> .....	49
3.3.1. Der <i>knockdown</i> der cotranslationalen Translokation durch SR $\alpha$ .....	50
3.3.2. Charakterisierung mikrosomaler Fraktionen aus <i>sra</i> .....	51
3.3.3. Identifizierung posttranslational importierter Proteine des ERs.....	53
4. Diskussion.....	54
4.1. Alb3 in der Biogenese und Erhaltung der PS-Komplexe.....	54
4.1.1. Der A3C wird durch pCKII posttranslational modifiziert .....	54
4.1.2. Der A3C interagiert mit plastidären ribosomalen Proteinen .....	55
4.1.3. Die Bindung von cpSRP43 am A3C bleibt kontrovers .....	57
4.1.4. Das transgene <i>silencing</i> in <i>A. thaliana</i> .....	59
4.2. Alb3: essentielle oder akzessorische Funktion in der <i>in planta</i> Biogenese? .....	60
4.2.1. Lichtintensität beeinträchtigt die Integration und Assemblierung in <i>alb3</i> .....	60
4.2.2. Alb3 ist in der Biogenese aber nicht in der Erhaltung entbehrlich .....	61
4.3. Die Substrate des posttranslationalen Imports in das ER .....	65
5. Literatur.....	68
6. Anhang.....	80
Danksagung .....	82
Curriculum vitae .....	83
Publikationen.....	84
Eidesstattliche Erklärung .....	85

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A3C</b>	Alb3 C-Terminus
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BN-PAGE</b>	blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
<b>cDNA</b>	komplementäre (copy-) DNA
<b>CLL</b>	konstantes Schwachlicht ( <i>constant low light</i> , $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
<b>CNL</b>	konstantes normales Licht ( <i>constant normal light</i> , $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
<b>Cp</b>	Chloroplastidär
<b>C-Terminus</b>	Carboxy-Terminus
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat
<b>DTT</b>	1,4-Dithiothreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>His<sub>6</sub>-Tag</b>	Hexahistidin-Tag
<b>Hsp</b>	<i>Heat shock protein</i>
<b>IMS</b>	Intermembranraum ( <i>inter membran space</i> )
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LHC</b>	Lichtsammelkomplexproteine ( <i>light harvesting complex</i> )
<b>MBP</b>	<i>Maltose-binding-protein</i>
<b>min</b>	Minute
<b>MS</b>	Murashige-Skoog Salz
<b>NADH/ NADPH</b>	Nicotinamidadenindinukleotid/ -phosphat
<b>NL</b>	Normales Licht ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
<b>N-Terminus</b>	Amino-Terminus
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PS</b>	Photosystem
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	PCR mit revers-transkribierter RNA
<b>sek</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TM</b>	Transmembran-Domäne
<b>TP</b>	Transitpeptid
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>Tween</b>	Polyethylenglycolsorbitanmonolaurat
<b>UTR</b>	untranslatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>xg</b>	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## Zusammenfassung

Chloroplasten besitzen aufgrund der Photosynthese eine bedeutende Funktion in pflanzlichen Zellen. Dementsprechend ist eine fehlerlose Chloroplastenbiogenese essentiell, welche ein Zusammenspiel aus nukleär- und plastidär-kodierten Proteinen umfasst. Neben zahlreichen anderen Faktoren nimmt Alb3 in der Biogenese durch die Integration und Assemblierung photosynthetischer Proteine in die Thylakoidmembran eine wichtige Rolle ein. Entsprechend ist Alb3 sowohl zusammen mit den chloroplastidären *signal recognition particle* in der posttranslationalen Insertion nukleär kodierter Lichtsammelkomplexproteine als auch putativ in der cotranslationalen Insertion chloroplastidärer Proteine, die während der Translation am Ribosomen in die Thylakoidmembran inseriert werden, beteiligt. Eine Deletion von Alb3 geht unter photoautotrophen Bedingungen mit einem albinotischen Phänotypen und Sämlingsletalität einher. Im Zuge dieser Arbeit wurde *alb3* unter konstantem Schwachlicht angezogen, was in einem überraschend hellgrünen Phänotypen resultierte. Elektronenmikroskopische Untersuchungen offenbarten in der Schwachlichtmutante nahezu normale Thylakoidmembranen, während unter normalen Lichtbedingungen *alb3* praktisch keine Membranen auf ultrastruktureller Ebene entwickelte. Gleichzeitig ergaben Messungen der photosynthetischen Aktivität in *alb3* unter Schwachlicht eine nur geringfügig reduzierte, in der unter normalen Lichtbedingungen gewachsene *alb3* eine signifikant reduzierte Aktivität. Untersuchungen der Synthese photosynthetischer Proteine und Assemblierungskomplexe wiesen in der Schwachlichtmutante lediglich eine minimal beeinträchtigte Integration und Synthese von D1 in das Photosystem II auf, wenngleich die Akkumulation der Proteine des Lichtsammelkomplexes reduziert war. Dem gegenüber standen die Ergebnisse der Mutante unter normalen Lichtintensität, in denen kaum photosynthetische Proteine akkumulierten und höhere Komplexe assembliert wurden. Dadurch konnte der Schluss gezogen werden, dass Alb3 primär in der *Signal recognition particle*-unterstützten Insertion nukleär-, nicht aber für die cotranslationalen chloroplastidär-kodierten Proteine wichtig ist. Ferner erscheint Alb3 für die initiale Biogenese photosynthetischer Komplexe teilweise entbehrlich, nicht aber für die konstante Aufrechterhaltung des Proteineinbaus in die Thylakoidmembran zu sein.

*Signal recognition particle*-abhängige Substrattransporte spielen nicht nur im Chloroplasten eine wesentliche Rolle, sondern auch im Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum. Dort interagieren sie mit den an Ribosomen entstehenden Proteinen und transportieren diese zusammen mit den Ribosomen an die Membran des endoplasmatischen Retikulums. Aufgrund fehlender Untersuchungen des pflanzlichen endoplasmatischen Retikulums sind bisher nur grundlegende Funktionen der Proteintranslokation bekannt. Infolge eines induzierbaren *knockdowns* der cotranslationalen Translokation durch eine RNA-Interferenz der  $\alpha$ -Untereinheit des SR-Rezeptors wurden durch den Abgleich mikrosomaler Fraktionen und Massenspektrometrie putative posttranslationale Substrate identifiziert.



## Summary

Due to photosynthesis chloroplasts contain a crucial role within plant cells. Therefore a correct biogenesis of chloroplast with a symbiotic interaction of nuclear and plastid encoded proteins is needed. Moreover several factors like Alb3 mediate the integration and assembly of photosynthetic complexes into the thylakoid membrane. Alb3 participates together with plastid signal recognition particle proteins in the posttranslational insertion of nuclear encoded light harvesting complex proteins into the thylakoid membrane as well as putative in the cotranslational insertion of plastid encoded proteins, where proteins are inserted in the membrane while translation. As a consequence a deletion of Alb3 results in an albinotic phenotype and seedlings lethality when grown under photoautotrophic conditions. In this thesis *alb3* grown under constant low light conditions developed an unexpected and surprising light green phenotype. Furthermore electron-microscopic studies of *alb3* grown under constant low light condition revealed almost normal thylakoid membrane whereas in the same mutant grown under normal light conditions nearly no thylakoid structures could be detected. Measurements of the photosynthetic activity in *alb3* under constant low light showed only a slight reduction while under normal light the photosynthetic activity were significantly reduced. Investigating the synthesis and assembly of photosynthetic proteins and complexes in *alb3* grown under constant low light exhibited just a minimal affected integration and synthesis of D1 into photosystem II, albeit a reduced accumulation, integration and assembly of proteins of the light harvesting complex in the thylakoid membrane. In contrast in *alb3* under normal light intensity photosynthetic proteins as well as assembled photosynthetic complexes were barely detectable. Hence *alb3* might primarily be essential in the signal recognition particle mediated posttranslational translocation of nuclear encoded protein but not for the integration of cotranslational plastid encoded proteins into the thylakoid membrane. Furthermore *alb3* seems to be dispensable for the initial biogenesis of photosynthetic complexes but not for the constant maintenance of these thylakoid proteins. Signal recognition particle depending substrate transports plays not only a significant role in chloroplasts but also in the protein translocation into the endoplasmic reticulum. There signal recognition particle interacts with emerging proteins on ribosomes and transports this complex to the membrane surface of the endoplasmic reticulum. Due to a lack of investigations just basic function of the transport mechanism into endoplasmic reticulum is known. Therefore an inducible knockdown of the cotranslational translocation was generated with an RNA-interference of the  $\alpha$ -subunit of the SR-receptor. With an additional alignment of *sra* and WT microsomal proteins as well as mass spectrometry analysis putative posttranslational substrates were identified.

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Entstehung der Organellen

In der evolutionären Entwicklung der Eukaryoten besitzen endosymbiotische Ereignisse eine essentielle Funktion. Die zweifelsfrei wichtigsten endosymbiotischen Prozesse waren dabei die Entstehung der Plastiden, die heutzutage viele Lebensfunktionen und Synthesen innerhalb der Zelle übernommen haben. Beide Organellen entsprangen aus endosymbiotischen Ereignissen vor ca. zwei bzw. 1,5 Milliarden Jahren (Margulis, 1970). Durch die Phagozytose eines ursprünglichen  $\alpha$ -Proteobakteriums durch eine anaerobe Wirtszelle entwickelten sich die Mitochondrien, während sich Chloroplasten im späteren Verlauf durch eine zweite Endosymbiose der heterotrophen Zellen mit einem photosynthetischen Cyanobakterium entstanden (Gray, 1999). Die zunächst autonomen Organismen verloren im Laufe der Zeit durch lateralen Gentransfer große Teile ihres Genoms zum Wirtszellkern und ihre Unabhängigkeit (Martin et al., 1998; Dyall et al., 2004). Dadurch werden inzwischen ca. 99 % aller mitochondrialen und über 95 % der plastidären Proteine im Zellkern kodiert, im Zytosol translatiert und zurück in die Organellen importiert (Soll, 2002; Rehling et al., 2004). Chloroplasten besitzen, genauso wie Mitochondrien, immer noch eine eigene DNA und werden von zwei Membranen, der äußeren und inneren Membran, umhüllt, die vom Intermembranraum isoliert werden. Im Inneren befindet sich das Stroma, eine plasmatische Phase, welche von Thylakoidmembranen durchzogen wird. Diese Thylakoidmembranen kommen in übereinanderliegenden Stapeln, den Grana, vor, die wiederum über Stromalamellen miteinander verbunden sind. Dadurch formen alle Thylakoidmembranen innerhalb der Chloroplasten ein durchgehendes Netzwerk, welches einen einzelnen, luminalen Raum einschließt (Shimoni et al., 2005). In der Thylakoidmembran sind die photosynthetischen Enzym- und Pigmentkomplexe eingebettet. Um die Biogenese dieser chloroplastidären Komplexe zu gewährleisten, sind eine Vielzahl von Hilfsproteinen und Faktoren involviert. Deletionen solcher Faktoren oder photosynthetischer Proteine führen nicht selten zu abnormalen und ungeordneten Thylakoidsystemen, die oftmals für die Pflanze letal sind.

## 1.2. Das Protein-targeting zum Chloroplasten

Für die Biogenese und Funktionserhaltung der Chloroplasten werden ungefähr 2.000 Proteine benötigt (van Wijk, 2004). Um die Biogenese zu gewährleisten, ist ein Zusammenspiel aus zellkern- und plastidär-kodierten Proteinen essentiell. Der Import nukleär-kodierter Proteine in Organellen umfasst dabei drei Schritte: 1. Die zytosolische Sortierung der Proteine, 2. die Bindung an die Rezeptoren der Organelloberfläche und

3. die konsekutive Translokation (Sjuts et al., 2017). Für die Sortierung innerhalb des Zytosols werden Proteine als größere Präproteine an zytosolischen Ribosomen, entweder mit einer abspaltbaren oder auch internen, nicht abspaltbaren Signalsequenz synthetisiert (Schleiff und Becker, 2011). Chloroplastidäre Proteine werden meistens mit einem N-terminalen Transitpeptid (cpTP) translatiert (Chua und Schmidt, 1979). Das cpTP trägt eine Signalsequenz mit Informationen für einen sicheren Transport und die Erkennung an der Organelloberfläche. Nach der Translokation über die doppelte Hüllmembran wird das cpTP entfernt (Richter und Lamppa, 2003; Schleiff und Becker, 2011). Zusätzlich binden im Zytosol molekulare Chaperone an die Präproteine und halten diese in einer Import-kompetenten Konformation, da sie im Zytosol zur Aggregation und vorzeitigen Faltung neigen (Waegemann et al., 1990). Die im Zytosol vorkommenden Chaperone, das *heat-shock-protein 70* und das HSP90, binden dazu sowohl am cpTP als auch im maturen Protein (Fellerer et al., 2011; Sjuts et al., 2017). Daneben gehen Präproteine auch einen Komplex mit dem 14-3-3 Protein ein, welches hauptsächlich an phosphorylierte Serine und Threonine im cpTP bindet und im weiteren Verlauf in Assoziation mit dem HSP70 die Importeffizienz der Präproteine erhöht (May und Soll, 2000; Fellerer et al., 2011). Neben der Bindung der Chaperone an die Präproteine, die Erhaltung der Importkompetenz und dem zielgerichteten Transport zum Organell, vermitteln Chaperone auch den Erstkontakt mit dem Translokon an der Oberfläche der Organellen (Schleiff und Becker, 2011).

### 1.3. Der Präprotein-Import in die Chloroplasten

Der Erstkontakt der Präproteine an der äußeren Membran der Chloroplasten wird über die GTP-abhängigen Rezeptoren Toc34 und Toc159 vermittelt, die mit dem  $\beta$ -barrel-Membranprotein Toc75 einen stabilen Komplex und den Kern des Toc-Translokons bilden (Kessler et al., 1994; Kessler und Schnell, 2009; Sjuts et al., 2017). Neben Toc159 und Toc34 wurde ein weiterer Rezeptor, Toc64, gefunden, der eine ins Zytosol gerichtete Tetratricopeptid-*repeat*-Domäne (TPR) besitzt (Sohrt und Soll, 2000). Über die TPR-Domäne des Toc64 interagieren die mit dem Präprotein assoziierten HSP70 und HSP90 mit dem Toc-Komplex (Schweiger et al., 2013). Von den Toc-Rezeptoren zum Kanalprotein Toc75 transferiert, wird das Präprotein über die äußere Membran mit Hilfe des IMS-HSP70 in den Intermembranraum transloziert (Kessler und Schnell, 2009). Dort interagiert das Präprotein mit Tic22, das vermutlich als Analogon der zytosolischen Chaperone agiert und die Importkompetenz des Präproteins während des Transfers vom Toc- zum Tic-Komplex aufrecht erhält (Kouranov et al., 1998; Sjuts et al., 2017). In der inneren Membran integriert ist das Kanalprotein Tic110 welches zusammen mit den Proteinen Tic32, Tic55 und Tic62 das Translokon der inneren Membran bildet. Für die mit Tic110 assoziierten Proteine wurden wichtige Funktionen in der Regulation des Redoxpotentials und der Translokation

identifiziert (Stengel et al., 2009). Das ebenfalls in der inneren Membran der Chloroplasten lokalisierte Tic40 fungiert bei der Translokation ankommender Präproteine als Co-Chaperon. Der stromale C-Terminus bildet eine Bindeseite für das Tic110 und die stromalen HSP70/93 und koordiniert zeitgleich die Aktivität des HSP93 (Chou et al., 2006). Neben Tic40 umfasst Tic110 selbst Bindestellen für die stromalen Chaperone HSP93 und Clpc, die anschließend an die Präproteine binden und als Motor der Translokation dienen, während Cpn60 in der Faltung und Assemblierung der Proteine involviert ist (Chou et al., 2006; Kessler und Schnell, 2009; Sjuts et al., 2017). Ins Stroma importiert, spaltet die stromale Prozessierungspeptidase das cpTP ab, das mature Protein wird gefaltet und in die intraorganellen Ziele inseriert (Richter, 2005). Nukleär-kodierte Proteine des photosynthetischen Komplexes werden auf dieser Weise importiert, prozessiert und im Anschluss mit plastidär-kodierten Proteine in höhere Komplexe assembliert, um die Photosynthese in der Pflanze zu gewährleisten.

#### 1.4. Die Assemblierung der photosynthetischen Enzymkomplexe

Die oxygenen Photosynthese in Pflanzen beruht auf der Extraktion von Elektronen aus Wasser, die als Treibstoff für die photosynthetische Elektronentransportkette verwendet werden, um die chemischen Energieträger NADPH und ATP zu generieren. Die Elektronentransportkette beinhaltet kleine mobile Elektronenträger, wie Plastochinon und Plastocyanin, sowie die Multiprotein-/Pigmentkomplexe Photosystem I und II (PSI und II), Cytochrom-*b<sub>6</sub>f* und die ATP-Synthase, die alle im Membransystem der Thylakoide beheimatet sind (Eberhard et al., 2008; Nickelsen und Rengstl, 2013). Während das PSII mit seinen Lichtsammelkomplexen (LHCII) in den Grana lokalisiert ist, können das PS-LHCI, die ATP-Synthase und die im zyklischen Elektronenfluss involvierten Proteine den Stromalamellen und Granarändern räumlich zugeordnet werden (Pribil et al., 2014). Um die Photosynthese konstant aufrecht zu erhalten, ist eine fortlaufende *de novo* Synthese und Assemblierung photosynthetischer Komplexe erforderlich. Die Assemblierung ist dabei ein mehrstufiger Prozess.

Das erste transiente Intermediat der frühen PSII-Biogenese ist die Assemblierung des RC-Komplexes, bestehend aus dem D1, D2, Cyt $b_{559}$  und Psbl. Die Cyt $b_{559}$ -Synthese ist die Voraussetzung für die D2-Akkumulation und Assemblierung des D2-Cyt $b_{559}$ -Subkomplexes (Komenda et al., 2004). Dieser Komplex fungiert als Plattform für den Einbau des pD1-Psbl-Dimers, welches D2-Cyt $b_{559}$ -unabhängig zusammengefügt wird (Dobakova et al., 2007). Inmitten der RC-Komplexformation wird das pD1 prozessiert und der RC47a-Komplex assembliert, welches CP47 aber nicht CP43 umfasst. Mit der Integration des CP47 in die Membran wird ein Intermediat mit weiteren, molekularen PSII-Untereinheiten wie psbL, psbT, psbH, psbM und psbR geformt, das im nächsten Schritt mit der Inkorporation des CP43 und

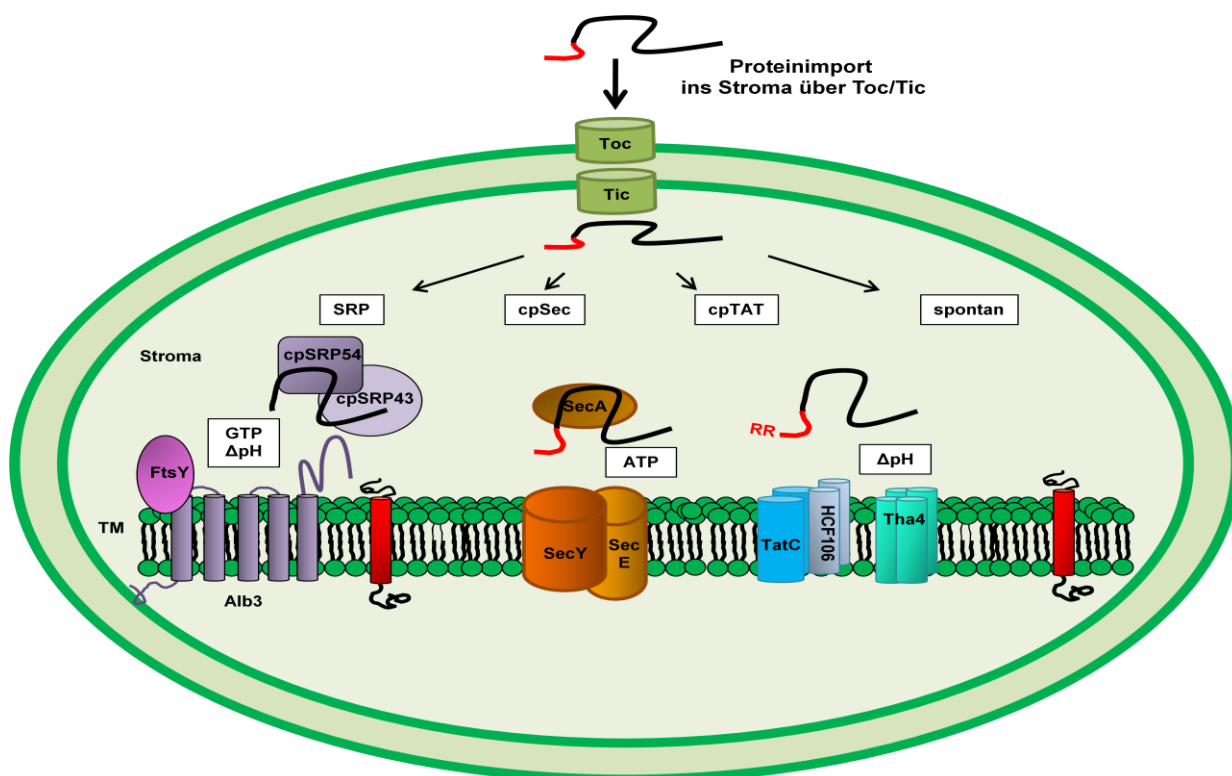
psbK den RC47b-Komplex bildet. Mit der Insertion des LPA19 in das Intermediat wird das PSII Monomer vervollständigt. Die Zusammensetzung des CP43 dient als Grundlage für die Rekrutierung des sauerstoffbildenden  $Mn_4CaO_5$ -Clusters (Dasgupta et al., 2008), welches durch die extrinsischen Untereinheiten PsbO, PsbP und PsbQ stabilisiert wird (Dasgupta et al., 2008; Bricker et al., 2012). Durch die weitere Integration molekularer PSII-Proteine, wie z.B. psbW und psbZ, wird letztlich das PSII-Dimer geformt (Kouril et al., 2012). Im Zuge dessen besitzen vermutlich psbM, psbW und psbI eine essentielle Funktion im Dimerisierungsprozess (Shi et al., 2012). Nach der Assemblierung des PSII-Dimers entsteht im finalen Schritt der PSII-LHCII-Superkomplex, indem die periphere Antenne dem PSII-Dimer hinzugefügt wird (Nixon et al., 2010; Nickelsen und Rengstl, 2013; Lu, 2016). Der LHCII wird aus den Genprodukten Lhcb 1-3, die in Heterotrimeren organisiert sind, zusammengestellt. Jedes dieser LHCII-Apoproteine bindet acht Chlorophyll a, sechs Chlorophyll b und vier Carotenoide (Liu et al., 2004; Drop et al., 2014). Im Gegensatz dazu liegen die anderen LHCII-Proteine, Lhcb4-6, als Monomere vor. Die Trimere sind mit dem PSII-Zentrum unterschiedlich assoziiert und in drei Typen unterteilt: starke (S), moderate (M) und lose (L) Assoziation mit dem PSII-Kern. Der größte untersuchte PSII-LHCII, der  $C_2S_2M_2$ -Komplex, besteht aus zwei PSII-Kernen und zwei LHCII-S-Trimern, die mit dem Zentrum über Lhcb4 und Lhcb5 verbunden sind. Zusätzlich sind zwei M-Trimere vorhanden, die mit dem Kern via Lhcb4 und Lhcb6 assoziiert sind (Boekema et al., 1999). Die Position der LHCII-L-Komplexe sind weitestgehend unbekannt und konnten bisher nur in Spinat beobachtet werden (Boekema et al., 1999).

Der Assemblierungsprozess des PSI ist bisher wenig erforscht, obwohl Informationen über die Funktion und Struktur stetig wachsen. Die PsaB-Synthese und Thylakoidmembranintegration initiiert als Anker für das PsaA die PSI-Assemblierung (Wollman et al., 1999; Yang et al., 2015). Daraufhin folgt die Membranintegration des PsaC, PsaD und PsaE, die zur stromalen Seite ausgerichtet werden. Im späten Assemblierungsstadium werden PsaK und PsaG an den Kernkomplex gebunden, während die Insertion anderer kleiner Integral- und Peripherieproteine bisher ungeklärt ist (Ozawa et al., 2010; Yang et al., 2015). Neben den Bestandteilen der photosynthetischen Komplexe existieren viele Faktoren, die wie Hcf136 die Assemblierung oder wie TerC und Alb3 die Insertion der photosynthetischen Proteine in die Membran unterstützen (Plochinger et al., 2016).

### **1.5. Die Translokation cpProteine in und über die Thylakoidmembran**

Proteine der Thylakoidmembran sowie luminaire Proteine müssen im Anschluss an den Import in das Stroma in oder über die Membran transferiert werden (Abb.1). Dazu beherbergen Thylakoidmembranproteine zusätzlich zum cpTP Informationen im maturen Protein. Im Gegensatz dazu weisen luminaire Proteine ein bipartites cpTP auf,

das nach dem Transport in das Lumen entfernt wird (Keegstra und Cline, 1999). Die ersten Hinweise für das Vorhandensein von mehreren Mechanismen für den Proteintransport in und über die Thylakoidmembran offenbarte eine Analyse der benötigten Energieträger während des Transports (Abb. 1). So war der Transport von OE33 (*oxygen-evolving protein*) und Plastocyanin ATP-abhängig (Kirwin et al., 1989; Bauerle und Keegstra, 1991; Cline et al., 1992), wohingegen der Transport der LHC-Proteine GTP erforderte, während es durch ATP gleichwohl stimuliert wurde (Hoffman und Franklin, 1994; Yuan et al., 2002). Die Proteine PsbO und PsbP setzten keines der Phosphatmoleküle voraus, stattdessen wurde gezeigt, dass die Insertion abhängig vom  $\Delta pH$  der Thylakoiden war (Cline et al., 1992).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Transportwege in und über die Thylakoidmembran.** Stromale und membranintegrale Faktoren der diversen Wege sind dargestellt. Die jeweiligen Energiequellen für die Transporter sind dem Sec-, TAT- und SRP-Transportweg zugeteilt. Das Präprotein besitzt ein cpTP (rot), welches nach dem Import entfernt wird, wodurch es zum murenen Protein (schwarz) prozessiert wird. Luminale Proteine besitzen ein bipartites TP, welches nicht zusätzlich dargestellt wird.

### 1.5.1. Das Sec-System

Die ATP-abhängige sec-Translokation ist evolutionär in allen Organismen konserviert. Das System kann sowohl in der bakteriellen Plasmamembran als auch im ER und Chloroplasten gefunden werden. Der sec-Translokationsmechanismus ist dabei am besten in *E.coli* für die Proteinsekretion über die Plasmamembran untersucht. Dort ist die Transportmaschinerie aus den beiden membranintegralen Proteinen SecE und SecY, den nicht essentiellen SecG, SecD und SecF und der zytoplasmatischen ATPase SecA

zusammengesetzt (Chatzi et al., 2014). Synthetisierte Proteine interagieren zuerst mit SecA, welches das Protein als Komplex zu den Membranproteinen SecEY transportiert. Durch den sich wiederholenden ATPase-Zyklus des SecA zusammen mit der protonen-motorischen Kraft werden die ungefalteten Substrate schrittweise durch die Translokase transferiert (Chatzi et al., 2014). Dieser Mechanismus erlaubt es, eine große Variabilität von Proteinen zu translozieren (Nouwen et al., 2007). Informationen des plastidären sec-Systems basieren weitestgehend aus Homologien des bakteriellen Sekretionsweges. So wurden im Chloroplasten die homologen Proteine zu SecA und den beiden Integralproteinen SecY und SecE identifiziert (Nakai et al., 1994; Yuan et al., 1994; Laidler et al., 1995; Roy und Barkan, 1998; Schuenemann et al., 1999). Der cpSec-Transport über die Thylakoidmembran setzt wie in *E.coli* ATP voraus und wird durch Azide inhibiert (Hulford et al., 1994; Yuan et al., 1994; Haward et al., 1997). Neben der Translokation vieler luminaler Proteine, darunter Plastocyanin und PsbO, wurde cpSec häufig zusammen mit dem Alb3 co-präzipitiert und lässt eine Alb3-beteiligte cpSec Proteininsertion vermuten (Pasch et al., 2005; Scotti et al., 2000). Andere bakterielle Sec-Proteine, wie SecG und SecD/F, fehlen bisher in Chloroplasten. Auch das SecB, welches die Faltung bakterieller Substrate verhindert, konnte bisher nicht identifiziert werden. Höchstwahrscheinlich haben stromale Faktoren im Chloroplasten diese Funktion adaptiert. Das cpSec-System scheint angesichts der vorliegenden Daten eine reduzierte Form des bakteriellen Systems zu sein (Albiniak et al., 2012).

### 1.5.2. Das Twin-Arginine-Translokationssystem

Im Gegensatz zum Sec-Transport benötigt das Twin-Arginine-Translokationssystem (TAT) keine stromalen Faktoren oder ATP als Energiequelle. Stattdessen wird der Protonengradient für die Insertion verwendet (Mould und Robinson, 1991; Cline et al., 1992; Klosgen et al., 1992). Die erste cpTAT-Komponente wurde mit Hcf106 zuerst in Mais isoliert (Voelker und Barkan, 1995; Settles et al., 1997). Das cpTAT-System setzt sich aus den membranintegralen Proteinen Tha4, Hcf106 und cpTatC zusammen, welche analog zu den bakteriellen TatA, TatB und TatC sind (Mori et al., 1999; Walker et al., 1999; Mori et al., 2001). Das cpTatC formt mit Hcf106 den Rezeptorkomplex, an dem die Präproteine in direkter Interaktion gefunden wurden (Cline und Mori, 2001). Die Präproteinbindung zusammen mit dem Protonengradienten stimulieren die Assemblierung des Tha4 (Mori und Cline, 2002). Eine zusätzliche Stimulation auf die TAT-Translokation wurde dem VIPP1 nachgewiesen, die jedoch nicht auf eine direkter Interaktion mit dem Substrat oder der Translokase beruht (Lo und Theg, 2012). Die Substrate des TAT-Weges weisen eine Größe zwischen 4 und 60 KDa auf und werden gefaltet transloziert, wenngleich nicht viel über die Faltungsstadien bekannt ist (Peltier et al., 2002). Im Unterschied zu *E.coli* fallen im

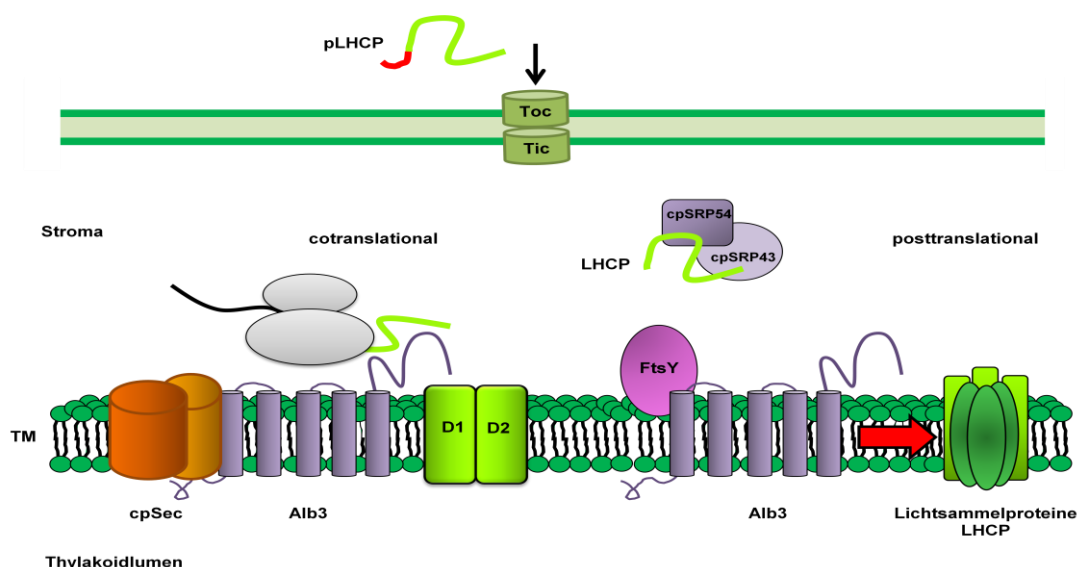
Chloroplasten nur wenige Redoxfaktoren, wie z.B. Polyphenoloxidase, darunter. Die Targetingsignale sowohl vom Sec- als auch vom TAT-System umfassen generell eine N-terminale basische Region, gefolgt von einem hydrophobischen Kern, einem polaren C-Terminus und einer terminalen Ala-X-Ala-Prozessierungsseite (Aldridge et al., 2009). Die TAT-Substrate beinhalten darüber hinaus im N-terminalen Bereich das namensgebende Twin-Arginin (Chaddock et al., 1995).

### 1.5.3. Das *signal recognition particle-Alb3* System

Neben den beschriebenen Sec- und TAT-Systemen existiert ein dritter Proteininsertionsweg in die Thylakoidmembran, der *signal recognition particle-Alb3*-Weg. Studien konnten eine primäre Insertion der nukleär-kodierten LHC-Proteine über das *signal recognition particle* (SRP)-System dokumentieren (Schuenemann et al., 1998; Moore et al., 2000; Woolhead et al., 2001; Bals et al., 2010). Im Gegensatz zum cotranslationalen Weg, in dem Proteine während der Translation am Ribosom in die Membran integriert werden, werden LHC-Proteine im Zytosol vollständig synthetisiert, in die Chloroplasten importiert und dort posttranslational in die Thylakoidmembran inseriert. Dazu interagieren die LHC-Proteine mit den im Chloroplasten spezifischen cpSRP54 und cpSRP43 im Stroma (Abb. 2). Der Proteinkomplex wird zum Membranrezeptor FtsY transportiert, der anschließend Alb3 rekrutiert (Moore et al., 2003). Der detaillierte Mechanismus, über den die Proteine final in die Membran durch Alb3 inseriert werden, ist jedoch noch weitestgehend unbekannt.

Komponenten der SRPs wurden in allen drei Lebensdomänen identifiziert. Dadurch war die Entdeckung eines bakteriellen SRP-Typ im Chloroplasten aufgrund der Abstammung vom Cyanobakterium nicht verwunderlich (Trager et al., 2012). Allerdings weist das chloroplastidäre cpSRP54 keine SRP-RNA auf, welche zusammen mit dem SRP54-Protein den konservierten und funktionalen Kern des SRPs bildet und wahrscheinlich während der Evolution der Landpflanzen vom Cyanobakterium durch die Adaption an das posttranslationale *targeting* verloren ging (Keenan et al., 2001; Trager et al., 2012). CpSR54 liegt im Chloroplasten in zwei stromalen Pools vor, einerseits assoziiert mit dem 70S-Ribosom und andererseits im Komplex mit cpSRP43 (Franklin und Hoffman, 1993; Schuenemann et al., 1998; Klimyuk et al., 1999; Groves et al., 2001; Hermkes et al., 2006; Holdermann et al., 2012). Das Ribosom-assoziierte cpSRP54 wurde in einer Interaktion mit dem naszierenden PSII-D1 beobachtet, was eine Funktion im cotranslationalen Import plastidär-kodierter Proteine vermuten lässt (Nilsson und van Wijk, 2002). Neben dem cpSRP54 entwickelten die Chloroplasten ein spezifisches SRP-Protein, das cpSRP43 (Luirink und Sinning, 2004). Dieses ebenfalls RNA-lose SRP-Protein kommt ausschließlich in Landpflanzen vor, da keine Homologe in Tieren, Glaucophyten oder Cyanobakterien identifiziert werden konnten (Trager et al., 2012; Ziehe et al., 2017).





**Abbildung 2: Darstellung der Proteinintegration in die Thylakoidmembran über das SRP-Alb3-System.** Schematische Darstellung des SRP-Alb3-System. Stromale und membranintegrale Faktoren des SRP-System sind veranschaulicht. Das Präprotein besitzt ein cpTP (rot), welches nach dem Import prozessiert wird, wodurch es zum reifen Protein (grün) wird. Auf der linken Seite wird die Involvement des Alb3 in der cotranslationalen Insertion, auf der rechten Seite im posttranslationalen Transport veranschaulicht.

CpSRP54 und cpSRP43 formen einen Komplex, in dem die spezielle C-terminale Extension des cpSRP54 das cpSRP43 bindet und das cpSRP43 mit der M-Domäne des cpSRP54 interagiert (Groves et al., 2001; Funke et al., 2005; Hermkes et al., 2006). Für die Protein-Protein-Interaktion enthält das cpSRP43 vier Ankyrin-*repeats* und drei Chromodomänen, die das hydrophile LHCI-DPLG-Motiv der dritten TM-Helix binden (Stengel et al., 2008). Das für das posttranslationale *targeting* adaptierte cpSRP43 übernimmt die Substraterkennung. Das cpSRP43 muss im Stroma mit vollständig gefaltete, hydrophobe LHC-Proteine interagieren, welche in wässriger Umgebung zu Aggregation neigen (Akopian et al., 2013). Diese ist das cpSRP43 in der Lage, wieder zu solubilisieren (Falk et al., 2010; Jaru-Ampornpan et al., 2010). Darüber hinaus entwickelte cpSRP43 die Eigenschaft, LHC-Proteine auch autonom, ohne cpSRP54/FtsY direkt zur Alb3-Insertase zu transferieren (Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007).

### 1.6. Die Insertasefamilie Alb3/Oxa1/YidC

Eine wichtige Funktion in der Insertion der LHC-Proteine und der Assemblierung des PSII wird der Membraninsertase des SRP-Systems Alb3 zugeteilt (Abb. 2). Alb3 ist der Proteinfamilie YidC/Alb3/Oxa-Insertasen zugeordnet, die für ähnliche Prozesse verantwortlich sind. Ungeachtet der kaum konservierten Domänen in der primären Aminosäuresequenz haben alle eine hydrophobe Kernregion mit fünf prognostizierten Transmembrandomänen (TM) gemeinsam. Das bakterielle Homolog der Insertasefamilie, YidC, ist am besten erforscht. So weist das *E.coli* YidC eine zusätzliche N-terminale TM auf und konnte sowohl in der secYEG-abhängigen als auch der autonomen Insertion von

Substraten gefunden werden (Saaf et al., 1998). Durch die YidC-Kristallstruktur des *B. halodurans* konnten mehr Informationen über die autonome Funktion aufgedeckt werden. Dazu formt YidC für die Rekrutierung der Substratproteine eine Furche, in der das Substratprotein bindet (Kumazaki et al., 2014). Im Komplex mit SecYEG transportiert YidC diverse Sec-Substrate, wie Untereinheiten der ATP-Synthase, Cytochrom-*bo*<sub>3</sub>-Oxidase und NADH-Dehydrogenase I (Yi et al., 2003; van Bloois et al., 2006; Celebi et al., 2006; du Plessis et al., 2006; Price und Driessen, 2010). Der größte Unterschied des YidC zu den orthologen Alb3/Oxa1 zeigt sich durch die Abwesenheit der C-terminalen, positiv-geladenen Extension. Diese Extension ragt bei Oxa1, welches in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist, in die Matrix hinein und ist für die Interaktion mit mitochondrialen Ribosomen und der Proteintranslokation respiratorischer Komplexproteine essentiell (Jia et al., 2003; Szyrach et al., 2003). Neben Oxa1 wurden weitere *Oxa-like* Proteine in *Arabidopsis thaliana* analysiert, deren Funktion noch nicht endgültig geklärt werden konnte. Interessanterweise besitzt eines der Oxa-Proteine, Oxa2, eine für die Proteinfamilie einzigartige TPR-Domäne, die für Protein-Proteininteraktionen verantwortlich sein könnte (Benz et al., 2013).

### 1.6.1. Die Insertase Alb3

Alb3, das Homolog von YidC/Oxa im Chloroplasten, konnte in der Thylakoidmembran lokalisiert werden. Aufgrund der funktionellen Überlappung zur den Insertasen und des Phänotyps von *alb3*, welche albinotisch war und abnormale Thylakoidmembranen auf ultrastruktureller Ebene aufwies, wurde eine Funktion in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexes vermutet (Sundberg et al., 1997). Gleichwohl Alb3 essentiell für die Insertion und Assemblierung der LHC-Proteine ist, konnte es auch mit anderen photosynthetischen Proteinen in Interaktion gefunden werden. So offenbarte ein Split-Ubiquitin-Experiment Interaktionen mit den PSII-Untereinheiten D1, D2, CP43, aber auch mit PSI-PsaA und der ATP-Synthase-Untereinheit CF<sub>0</sub>-III (Pasch et al., 2005). Zugleich wurde PSII-D1, neben Alb3, auch mit FtsY, cpSRP54 und Vipp1 in einem Komplex beobachtet und suggeriert eine Funktion der beteiligten Proteine in der cotranslationalen D1-Insertion (Zhang et al., 2001; Walter et al., 2015). Des Weiteren deutet die Interaktion mit cpSecY auf eine Einbindung in der cotranslationalen sec-abhängigen Proteininsertion hin (Klostermann et al., 2002; Benz et al., 2009). Außerdem konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie Alb3 eine Funktion in der Cytochrom-*b<sub>6</sub>*-Translokation zugeteilt werden (Kroliczewski et al., 2016). Gleichermaßen interagiert Alb3 mit PSII-Assemblierungsfaktoren wie LPA2 und LPA3, aber auch mit Hilfsproteinen der *de novo* Proteinsynthese des PSII Kernkomplexes, TerC (Ma et al., 2007; Cai et al., 2010; Schneider et al., 2014).

Im Gegensatz zu *A. thaliana* sind in der Grünalge *C. reinhardtii* zwei Alb3 Orthologe präsent, Alb3.1 und Alb3.2. Beide Proteine sind in einem Komplex auffindbar und scheinen komplementäre Funktionen zu besitzen. Eine Alb3.1 Deletion führte zu einer drastischen Reduktion der LHC-Proteine, wohingegen in der Alb3.2-RNAi-Mutante die PSI- und PSII-Akkumulation beeinträchtigt war (Bellafiore et al., 2002; Ossenbuhl et al., 2004; Gohre et al., 2006). Demgegenüber steht ein einziges Alb3-Ortholog in *Synechocystis PCC 6803*, Srl1471, dessen Deletion die D1-Insertion in die Membran und die PSII-Komplex-Assemblierung beeinflusste (Spence et al., 2004; Ossenbuhl et al., 2006). In Arabidopsis konnte ein weiteres homologes Protein zu Alb3, das Alb4, in der Thylakoidmembran identifiziert werden. Der Phänotyp der Alb4-RNAi-Mutante war weniger drastisch als in Alb3 und offenbarte nur leichte Veränderungen in den Ultrastrukturen der Chloroplasten indem die Granastapel weniger dicht gestapelt im Vergleich zum Wildtyp waren. Alb4 interagiert physisch mit den CF<sub>1</sub>β- und CF<sub>0</sub>II-Untereinheiten und ist an der Assemblierung und Stabilität der CF<sub>1</sub>CF<sub>0</sub>-ATP-Synthase beteiligt (Benz et al., 2009).

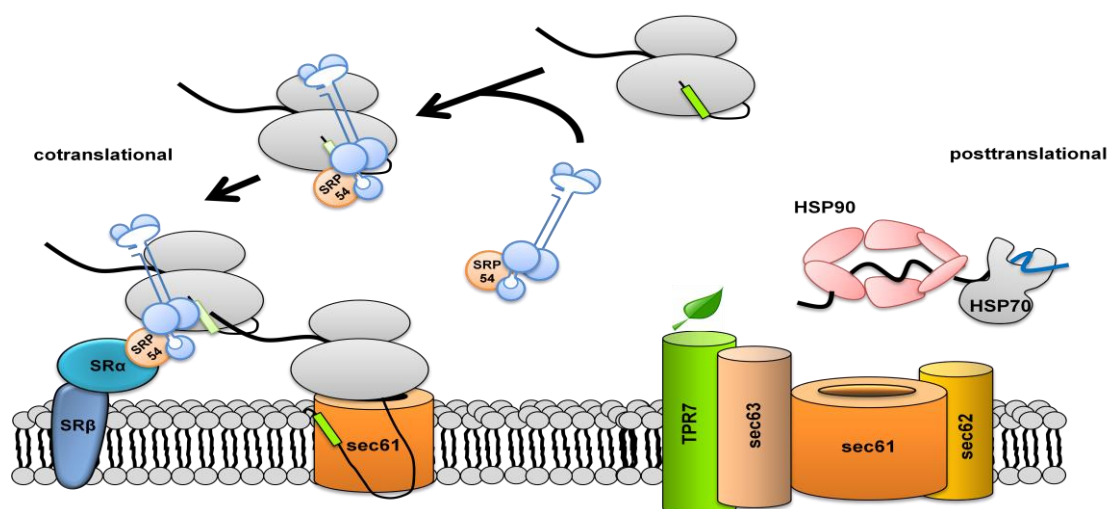
#### **1.6.1.1. Der Bindungsmechanismus innerhalb des A3Cs**

In den letzten Jahren wurde der Mechanismus der Bindung von Alb3 mit den Chromodomänen des cpSRP43 für den Transfer der LHC-Proteine im Detail untersucht (Bals et al., 2010; Falk et al., 2010; Falk und Sinning, 2010; Lewis et al., 2010; Dunschede et al., 2011; Horn et al., 2015). Dadurch konnte der C-Terminus als essentieller Teil der Interaktion identifiziert werden. Dieser besteht aus vier positiv geladenen Motiven, die in höheren Pflanzen konserviert sind. Während der C-Terminus in Lösung intrinsisch ungeordnet ist, bildet er im Verlauf der Interaktion mit cpSRP43 eine α-Helix (Falk et al., 2010; Falk und Sinning, 2010; Horn et al., 2015). Die Bindung des cpSRP43s konnte innerhalb der Motive II und IV identifiziert werden, gleichwohl ein zusätzliches, in der letzten TM der luminalen Seite befindliches, Motiv diskutiert wird (Falk et al., 2010; Dunschede et al., 2011).

#### **1.7. Der Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum**

Das SRP-System besitzt nicht nur eine wichtige Funktion in der plastidären Proteininsertion, sondern repräsentiert einen evolutionär konservierten Mechanismus des Protein-*targetings* (Luirink und Sinning, 2004). Die wesentlichen Elemente des kanonischen Proteintransports sind in allen drei Domänen des Lebens konserviert (Akopian et al., 2013; Nyathi et al., 2013). Im Vergleich zum cpSRP bestehen die *Signal recognition particle* (SRP)-Proteine aus mehreren Proteinkomponenten, die eine SRP-RNA binden. Darüberhinaus konnte in Eukaryoten ein spezifischer, dem bakteriellen FtsY homologer Rezeptor SRα identifiziert werden (Luirink und Sinning, 2004). Das Ribonukelaprotein SRP bindet direkt nach dem

Translationsstart an den ribosomalen Untereinheiten L23a und L35 am Exit-Tunnel und interagiert mit der hydrophoben Signalsequenz des synthetisierten Translationsprodukts (Walter et al., 1981; Krieg et al., 1986; Kurzchalia et al., 1986; Pool et al., 2002). Die Erkennung der Signalsequenz vom SRP führt zu einer transienten Translationsretardation mit einem zeitgleichen Transport zur ER-Membran (Gilmore et al., 1982; Krieg et al., 1986; Kurzchalia et al., 1986). Das hochkonservierte SRP54 umfasst dafür zwei funktionale Domänen. Eine Methionin reiche M-Domäne für die Bindung der Signalsequenz und SRP-RNA, sowie eine NG-Domäne, für die Regulation des Proteintransports und die Interaktion mit dem SR-Rezeptor an der ER-Membran (Romisch et al., 1990; Zopf et al., 1990; Lutcke et al., 1992; Zopf et al., 1993). In der Membran eingebettet ist der SR-Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht, das 70 kDa periphere, lösliche Protein SR $\alpha$ , welches über eine N-terminale SRX-Domäne an dem 30 kDa, membranintegralen SR $\beta$  verankert ist (Gilmore et al., 1982; Tajima et al., 1986; Young et al., 1995). Alle drei Faktoren, das SRP und beide SR-Rezeptor Subproteine enthalten eine GTPase-Funktion, die für den cotranslationalen Zyklus wichtig ist. So ist die GTP-Bindung am SRP54 und SR $\alpha$  für die Komplexformation erforderlich und die GTP-Hydrolyse für die Dissoziation des SRP/SR-Komplexes (Connolly et al., 1991). Ferner reguliert der GDP/GTP-Zyklus des SR $\beta$  die Dimerisierung des Rezeptors und koordiniert zusammen mit dem Sec61-Translokon die Freigabe der Signalsequenz vom SRP (Fulga et al., 2001; Schwartz und Blobel, 2003). Nach der Übermittlung des *ribosome-nascent-chain* (RNC)-Komplex zum Sec61 Kanal wird die Translation der naszierenden Kette direkt vom Ribosomen in das Kanalprotein fortgeführt und das Protein in das ER-Lumen transloziert (Becker et al., 2009).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des co- und posttranslationalen Insertionswegs im ER.** Zytosolische und membranintegrale Proteine der beiden Insertionswege sind herausgearbeitet. Die naszierende Polypeptidkette mit dem Signalpeptid (grün) erscheint an den Ribosomen (grau). Das SRP (blau) bindet am RNC und transportiert es zum membranständigen SR-Rezeptor (blau). Der RNC wird dem Kanalprotein Sec61 übermittleit und das Protein importiert. Auf der rechten Seite ist der posttranslationale sec-Komplex Weg veranschaulicht. Molekulare Chaperone im Zytosol binden an die vollständig translatierten Proteine und vermitteln den Transport zum Translokon.

Neben dem cotranslationalen SRP-abhängigen System wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae*, ein alternativer posttranslationaler Mechanismus für den Transport von Proteinen über die ER-Membran entdeckt. Substratproteine werden an zytosolischen Ribosomen translatiert und via Chaperone in einer ungefalteten Konformation aufgenommen (Chirico et al., 1988; Deshaies et al., 1988). Über den membranständigen Rezeptor Sec62, der in Hefe mit Sec61, Sec63, Sec71 und Sec72 die Translokase formt, werden die Substrate erkannt (Deshaies und Schekman, 1989; Deshaies et al., 1991). Während Sec61 und Sec63 sowohl im co- als auch im posttranslationalen Weg involviert sind (Brodsky et al., 1995), spielen in *S. cerevisiae* das Sec62 und die nicht essentiellen Sec71p und Sec72p speziell in der posttranslationalen Translokation eine Rolle. Das Sec62 bildet zusammen mit Sec71p und Sec72p den trimeren Komplex für die Interaktion mit sekretorischen Präproteinen (Lyman und Schekman, 1997; Plath et al., 1998). Das lösliche Sec72p inkludiert eine TPR-Domäne für die Bindung des HSP70 und ist über Sec71p in der Membran verankert (Fang und Green, 1994; Harada et al., 2011). Beide Wege, der SRP- und sec62-abhängige Weg, laufen schlussendlich im Sec61 zusammen. Um das Substratprotein über die Membran zu transportieren, dient das luminale BIP, ein HSP70 Chaperon, als molekulare Ratsche (Matlack et al., 1999; Maruyama et al., 2014). In der Klasse der Säuger konnten, außer für Sec71p und Sec72p, homologe Proteine des sec-Translokons ermittelt werden, die ebenfalls einen Komplex in der Membran formen (Meyer et al., 2000), während in Pflanzen die posttranslationale Translokation in das ER weitestgehend unerforscht ist. Yamamoto konnte 2008 in *A. thaliana* die essentiellen Komponenten des sec-Komplexes, Sec61, Sec62 und Sec63 im Pflanzengenom identifizieren (Abb. 3). Es stellte sich heraus, dass das Kanalprotein Sec61 in drei Isoformen, sec62 als Einzelgen und Sec63 in zwei Isoformen, das AtERdj2a und AtERdj2b, vorhanden sind. Die Deletion des AtERdj2a ist letal und führt zu einem Defekt in der Pollenenkeimung, während die Deletion von AtERdj2b keine spezifischen Merkmale in Arabidopsis ausbildete (Yamamoto et al., 2008). Darüber hinaus wurde mit AtTPR7 ein neues pflanzenspezifisches Protein gefunden, welches wie Sec72p in Hefe eine TPR-Domäne in sich beherbergt und mit AtERdj2a und sec62 in einem Komplex zu finden ist (Schweiger et al., 2012; Schweiger und S., 2013). AtTPR7 scheint für die Proteintranslokation allerdings nicht essentiell zu sein, da eine *loss-of-function*-Mutante keinen signifikanten Phänotyp aufweist (Schweiger et al., 2012; Schweiger und Schwenkert, 2013). Aufgrund der Komplexität konnte lange Zeit nicht zwischen co- und posttranslationalen Proteinsubstrate differenziert werden. Im Jahr 2012 wurden im Menschen erstmals Proteinsubstrate der posttranslationalen Translokation identifiziert. Die Analyse umfasste kurze sekretorische Proteine wie Insulin, Apelin und Statherin (Johnson et al., 2012; Lakkaraju et al., 2012; Lang et al., 2012). Pflanzenspezifische Substrate des posttranslationalen Proteinimports sind bis heute noch unerforscht.

## 1.8. Ziele der Arbeit

Neben diversen anderen Faktoren besitzt Alb3 in der Chloroplastenbiogenese durch die Integration und Assemblierung photosynthetischer Proteine in die Thylakoidmembran eine essentielle Funktion. Diesbezüglich konnte für Alb3 eine Vielzahl an Interaktionen mit photosynthetischen Proteinen *in vitro* nachgewiesen werden. Folglich offenbart *alb3* unter photoautotrophen Bedingungen einen albinotischen Phänotypen (Sundberg et al., 1997). Dieselbe Mutante unter konstantem Schwachlicht mit  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert, entwickelt unerwartet einen hellgrünen Phänotypen und ließ eine intakte Biogenese photosynthetischer Komplexe in der Thylakoidmembran annehmen. Aufgrund der Beobachtung sollte in dieser Arbeit die Funktion von Alb3 in der Biogenese und Erhaltung photosynthetischer Komplexe im Detail unter verschiedenen Lichtbedingungen *in vivo* untersucht werden.

Darüber hinaus sollten angesichts der konträren Ergebnisse der cpSRP43-Bindungsmotive in Alb3 (Falk und Sinning, 2010; Dunschede et al., 2011; Urbiscek et al., 2015), funktionelle Komplementationsstudien der *alb3* Aufschluss über die Relevanz der positiven Motive im C-Terminus geben. Dazu sollte eine Deletionsonstrukt ohne C-Terminus (*A3ΔC*) und zwei Fusionskonstrukte mit den homologen C-Termini von YidC aus *Synechocystis PCC 6803* und Oxa1 aus *S. cerevisiae* für eine funktionale Komplementation generiert und analysiert werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte die Proteintranslokation des endoplasmatischen Retikulums untersucht werden. *Signal recognition particle* (SRP)- Proteine sind nicht nur durch den posttranslationalen Substrattransfer zur Thylakoidmembran in Chloroplasten wichtig, sondern repräsentieren ein evolutionär konservierter Protein-targeting-Mechanismus in der Zelle. Dementsprechend sind SRP-Proteine durch den Transport des RNC-Komplexes zum membranintegralen SR-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums auch in der cotranslationalen Translokation beteiligt. Hinsichtlich fehlender Forschung in diesem Pflanzenteilgebiet sind nur grundlegende Funktionen des Proteinimports bekannt. Infolgedessen sollte in dieser Studie mit einer induzierbaren SR $\alpha$ -RNAi Mutante die cotranslationalen Translokation inhibiert und spezifisch posttranslationale Substrate des ER identifiziert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Falls nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland) oder Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

#### 2.1.2. Molekulare Gewichts- und Größenmarker

Als Marker für die DNA Gelelektrophorese wurde mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittene Phagen DNA verwendet (Thermo Fisher Scientific). Zur Identifizierung der Proteingröße in der SDS-PAGE wurde der peqGOLD protein marker I (VWR, Ismaning, Deutschland) genutzt.

#### 2.1.3. Oligonukleotide

DNA Oligonukleotide wurden bei Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt und sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. GA steht für Oligonukleotide, die für das Gibson assembly genutzt wurden.**

Oligonukleotide	Sequenz (5'-3' Orientierung)	Verwendung
SRalpha-Ndel-fwd	ATCGCATATGTTAGAACAGCTTTTAATC	pET21a
SRalpha-XhoI-rev	ATCGCTCGAGCTTGAGAAGTG TCTTGACTATG	pET21a
SRalpha TOPO fwd	CACCCCTAAACGGATGGCTTA TGATG	pENTR-D-TOPO
SRalpha TOPO rev	ACCTATACTGTCAGTTTTCC	pENTR-D-TOPO
Alb3 AK fwd	GTCGGATCCCTTTGACTAAG	pGEX6p1
Alb3 AK rev	GACGAATCCTCACAACGGATTAAC	pGEX6p1
Alb3 AS416/418 SA fwd	TTGGTAGAAGAAGCTCAGGCTGAATCAG	Mutagenese
Alb3 AS416/418 rev SA/SD	TTCTTCTACCAATTCAACTGTATC	Mutagenese
Alb3 AS416/418 fwd SD	TTGGTAGAAGAAGATCAGGATGAATCAG	Mutagenese
Alb3 AS424 fwd SA	GAATCAGAAGAAGGGGCT GATGATG	Mutagenese
Alb3 AS424 rev SA	CCTTCTTCTGATTCAGCCTGAGCTTC	Mutagenese
Alb3 AS424 fwd SD	GAATCAGAAGAAGGGGAT GATGATG	Mutagenese
Alb3 AS424 rev SD	CCTTCTTCTGATTCATCCTGATCTTC	Mutagenese
Alb3 AS 420 fwd SD	GAAGATCAGGATGAAGATGAAGAAGG	Mutagenese
Alb3 AS 420 rev SD	TTCATCCTGATCTTCTTCTACCAATTC	Mutagenese
Alb3 AS 420 fwd SA	GAAGCTCAGGCTGAAGCTGAAGAAGG	Mutagenese
Alb3 AS 420 rev SA	TTCAGCCTGAGCTTCTTCTACCAATTC	Mutagenese
Alb3 AS 409 TA fwd	GCGGTTGCGAAAGATGCTGTTGAAT	Mutagenese
Alb3 AS 409 TD fwd	GCGGTTGCGAAAGATGATGTTGAAT	Mutagenese
Alb3 AS 409 TA+TD rev	ATCTTTGCGAACCGCCTTGTTCTTCTTG	Mutagenese
pCKII ohne TP fwd Ndel	ATCGCATATGGCTTCTTTTACCGTCAAC	pET14b/pET21a
pCKII rev stop 14	ATCTCGAGTCACTGGCTGCGCGGCGTAC	pET14b
pCKII rev stop 21	ATCTCGAGCTGGCTGCGCGGCGTACGG	pET21a

A3C fwd NdeI	AGCCATATGACAAATAATGTACTTAGTACC	pET14b
A3C rev XhoI stop	ACCTCGAGCTATACAGTGCCTTTC	pET14b
A3C fwd BamHI	AGCGGATCCACAAATAATGTACTTAGTAC	pET21d
A3C rev NotI	ATGCGCCGCTACAGTGCCTTTC	pET21d
A3C rev XhoI	ACTCTCGAGTACAGTGCCTTTC	pET21d
Alb3 Punktmut. del fwd	ATTTAAAGAGCAAGAGAAGCGCAG	Mutagenese
Alb3 Punktmut. del rev	GCTCTTTTAATTGTCTAAATCTTTCGCC	Mutagenese
Alb3 fwd	ATGGCGAGAGTTCTAGTCTCGTC	Genotypisierung
Alb3 Terminator rev	ACAATGCTTCTTTGTCAGGAAGTAATTGTTG	Genotypisierung
Alb3 Exon8 rev	GTA AAT AGA TAG TCC TGA TGG G	Genotypisierung
atAlb3 + promotor fwd	CACCGATTTGGCATAGGTGTAATAATC	Genotypisierung
Alb3 Exon 5 fwd	GTTGCTTACCAACTTTAGCAACC	Genotypisierung
Oxa CT rev	TTTTTTGTTATTGAAGTTTGATTTG	Genotypisierung
YidC CT rev	CGAGGTTTTTTCCTTCTTTTAC	Genotypisierung
T7 Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung
T7 Seq fwd	TAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenzierung
pDONR207 fwd	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCT	Sequenzierung
pDONR207 rev	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	Sequenzierung
popoff2 P6 sens rev	CATTTGGAGAGGACACGCTGAAGC	Sequenzierung
popoff2 OCST asens fwd	CACATGCTCAGGTTTTTTACAACG	Sequenzierung
DS5-2a	TCCGTTCCGTTTTCCGTTT	Sequenzierung
attL1 rev A3UTR oLap	CTATGCCAAATCAGCCTGCTTTTTTGTACAAA	pDONR207/GA
attL2 fwd A3Term. oLap	AGAAGCATTGTCAGCTTCTTGTACAAAGTGGGCAT	pDONR207/GA
A3 UTR fwd attL1 overlap	AAAAGCAGGCTGATTTGGCATAGGTGTAATAATC	pDONR207/GA
A3Term. rev attL2 oLap	CAAGAAAGCTGACAATGCTTCTTTGTCAGG	pDONR207/GA
A3 UTR rev Term oLap	TTGCTTTGGTTCTAGTAAATAGATAGTCCTGATGGG	pDONR207/GA
Alb3 Term. fwd a3-CT oLap	GGACTATCTATTTACTAAAACCAAAGCAAACG	pDONR207/GA
AttL1 rev A3 Ex1 oLap	ACTCTCGCCATTGCTTTTTTGTACAAACTTG	pDONR207/GA
A3 fwd Ex1 AttL1 oLap	ACAAAAAAGCAATGGCGAGAGTTCTAGTCTC	pDONR207/GA
A3-CT rev attL2 oLap	TCTTATAATGCGTAAATAGATAGTCCTGATGGG	pDONR207/GA
attL2 fwd A3-CT oLap	TATCTATTTACCCATCCAGCTGCAGCTCT	pDONR207/GA
Alb3 rev + Oxa1 oLap	ACCATTAAGGCGTAAATAGATAGTCCTGATGG	pDONR207/GA
OxaCT fwd A3 oLap	TATCTATTTACGCCTTTAATGGTGCCTTC	pDONR207/GA
OxaCT rev A3Term. oLap	TTGCTTTGGTTTTCATTTTTGTATTAAATGAAGTTTG	pDONR207/GA
Alb3 Term+Oxa oLap. Fwd	CATTAATAACAAAAAATGAAA CCAAAGCAAACG	pDONR207/GA
OxaCT rev attL2 oLap	TCTTATAATGCTCATTTTTTGTTATTAATGAAGTTTG	pDONR207/GA
attL2+re fwd Oxa oLap	ACAAAAAATGACATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTT	pDONR207/GA
Alb3 rev + yidC oLap	ATGGCCAACGTCGTAAATAGATAGTCCTGATGG	pDONR207/GA
YidCCT fwd A3 oLap	TATCTATTTACATGGCCAACGTCTTCCAG	pDONR207/GA
YidC-CT A3 Term. oLap rev	TTGCTTTGGTTTTACGAGGTTTTTTCCTTCTTTTTAC	pDONR207/GA
Alb3 Term.+ YidC oLap fwd	GAAAAAACCTCGTAAACCAAAGCAAACG	pDONR207/GA
YidC attL2 oLap rev	TCTTATAATGCTTACGAGGTTTTTTCCTTCTTTTTAC	pDONR207/GA
attL2 fwd YidC oLap	AAACCTCGTAACATTATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTT	pDONR207/GA
A3 ohne mut. CT rev	TTGTCTAAATCTGTTGTGATCCCAATATACATTTATC	pDONR207/GA
A3 mut. CT fwd A3 oLap	ATCACAAACAGATTTAGACAATTAAGAGCAAG	pDONR207/GA
A3 mut CT rev A3 Term.	TGCTTTGGTTCTATACAGTGCCTTTCCG	pDONR207/GA
A3 Term. fwd A3 oLap	CACTGTATAGAACCAAAGCAAACGAAATTG	pDONR207/GA
attL1 fwd pDONR207 oLap	ACGCTAGCATGGATCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTAT TTTTGACTG	pDONR207/GA
attL2-EcoRV rev oLap	GGAAGAAGTGATGCACCTTTGATATCGACCCAAGTACCG CC	pDONR207/GA

#### 2.1.4. Vektoren und Plasmide

Für die heterologe Proteinexpression mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag wurde der pET14b Vektor verwendet, für einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag pET21a oder pET51b (Merck Millipore). Der pET51b diente außerdem als Vektor-*backbone* für die Klonierung von Proteinen für die *in vitro* Transkription und Translation. Für die Expression von Proteinen mit einem N-terminalen GST-Tag wurde der pGEX6p1 verwendet. Die Transformation von Pflanzen wurde mit folgenden binären Vektoren durchgeführt: pB7FWG2 für die unter einem



35S-Promotor kontrollierte Expression und der pBGW unter dem endogenen Promotor (Plant Systems Biology, Zwijnaarde, Belgien). Als Zielvektor für das induzierbare RNA Interferenz System in Pflanzen wurde der popoff2 benutzt. Für die Klonierung in die binären Vektoren wurde das Gateway-System von Thermo Fischer Scientific mit den Vektoren pENTR-D-Topo und pDONR2007 verwendet. Der pDONR207 wurde zusätzlich als Vektor-*backbone* für das *Gibson assembly* genutzt. Die in der Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. Fett markierte Konstrukte besitzen den endogenen Promotor und Terminator von *Alb3*.**

Konstrukt	Organismus	Vektor	Quelle
SRalpha	<i>A. thaliana</i>	pET21a	Diese Arbeit
SRalpha bp 301-720	<i>A. thaliana</i>	pENTR-D-TOPO	Diese Arbeit
SRalpha bp 301-720	<i>A. thaliana</i>	popoff2	Diese Arbeit
Alb3 CT S416/18/20/24A	<i>A. thaliana</i>	pET51b	Diese Arbeit
Alb3 CT ST409/16/18/20/24A	<i>A. thaliana</i>	pET51b	Diese Arbeit
Alb3 CT S416/18/20/24D	<i>A. thaliana</i>	pET14b	Diese Arbeit
Alb3 CT ST409/16/18/20/24D	<i>A. thaliana</i>	pET14b	Diese Arbeit
pCKII	<i>A. thaliana</i>	pET14b	Diese Arbeit
<b>gAlb3</b>	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
<b>gAlb3</b>	<i>A. thaliana</i>	pBGW	Diese Arbeit
gAlb3	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
<b>gA3ΔC</b>	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
<b>gA3ΔC</b>	<i>A. thaliana</i>	pBGW	Diese Arbeit
gA3ΔC	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
gA3ΔC	<i>A. thaliana</i>	pB7FWG2	Diese Arbeit
<b>A3ΔC-OxaCT</b>	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
<b>A3ΔC-OxaCT</b>	<i>A. thaliana</i>	pBGW	Diese Arbeit
A3ΔC-OxaCT	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
A3ΔC-Oxa CT	<i>A. thaliana</i>	pB7FWG2	Diese Arbeit
<b>A3ΔC-YidcCT</b>	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
<b>A3ΔC-YidC CT</b>	<i>A. thaliana</i>	pBGW	Diese Arbeit
A3ΔC-YidC CT	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
A3ΔC-YidC CT	<i>A. thaliana</i>	pB7FWG2	Diese Arbeit
<b>gAlb3 ST409/416/418/420/424A</b>	<i>A. thaliana</i>	pDONR207	Diese Arbeit
<b>gAlb3 ST409/416/418/420/424A</b>	<i>A. thaliana</i>	pBGW	Diese Arbeit
Oxa1	<i>S. cerevisiae</i>	pET14b	AG Prof. Soll
L23	<i>A. thaliana</i>	pET51b	AG Prof. Soll
L22	<i>A. thaliana</i>	pET51b	AG Prof. Soll
S13	<i>A. thaliana</i>	pET51b	AG Prof. Soll
L24	<i>A. thaliana</i>	pET51b	AG Prof. Soll
L29	<i>A. thaliana</i>	pET51b	AG Prof. Soll

### 2.1.5. Enzyme

Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen: Taq DNA Polymerase von Bioron (Ludwigshafen, Deutschland), die Phusion DNA Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland), Endonukleasen von Thermo Fischer Scientific (Braunschweig, Deutschland) oder von New England Biolabs, T4 DNA Ligase von Thermo Fischer Scientific, T5 Exonuklease und Taq Ligase von New England Biolabs.

### 2.1.6. Bakterienstämme

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden *E.coli* Top10 Zellen genutzt. Die Stämme *E.coli* BL21 (DE3), BL21(DE3)pLysS und RIPL (BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL) wurden für die heterologe Proteinexpression eingesetzt. Für die stabile Transformation von *A. thaliana* wurden *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) Zellen verwendet.

### 2.1.7. Westernblotmembran

Die zum Proteintransfer verwendete PVDF Membran wurde von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen, während das Whatman-Filterpapier für das Blotting von Millipore (Darmstadt, Deutschland) kam.

### 2.1.8. Antisereren

Die Antiseren gegen D1, CytF, PsaF und den LHC-Proteine wurden bei Agrisera (Vännäs, Schweden) erworben, während das Antiserum gegen Alb<sub>3</sub><sup>155-205</sup>, SR $\alpha$ <sub>1-670</sub> und TPR7 bei Biogenes (Berlin, Deutschland) produziert wurde. Das zur Applikation genutzte TPR7-Protein wurde von Regina Schweiger (AG Prof. Soll) hergestellt. Der Antikörper gegen den ersten stromalen *loop* von Alb<sub>3</sub> wurde von Danja Schünemann (Ruhr Universität Bochum, Deutschland), das Antiserum gegen HCF136 von Peter Westhoff (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Deutschland) und der Antikörper gegen CF<sub>1</sub>  $\alpha/\beta$  von Stephan Greiner (Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.9. Säulenmaterial

Sowohl Ni-Sepharose 6 Fast Flow als auch Glutathion-Sepharose wurden von GE-Healthcare bezogen.

### 2.1.10. Genidentifikationsnummern

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine und die dazugehörigen Genidentifikationsnummern sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Genidentifikationsnummern der in dieser Arbeit verwendeten Proteine**

<b>Genname</b>	<b>Genidentifikationsnummer</b>
Alb3	At2g28800
SR $\alpha$	At4g30600
Oxa1	YER154W
YidC	slr1471
pCKII	At2g23070
S13	At5g14320
L22	At1g52370
L23	AtCg01300
L24	AtCg01300
L29	At5g65220

### 2.1.11. Software

BioEdit (Ibis Bioscience, Carlsbad, USA) wurde für den Abgleich der DNA Sequenzen verwendet, NCBI Blast Server (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) für den DNA- und Proteinsequenzabgleich. Zur Analyse von potentiellen Phosphorylierungsstellen wurde PhosPhAt 4.0 (Heazlewood et al., 2008) genutzt. Des Weiteren wurde die Datenbank ARAMEMNON 3.2 (Schwacke et al., 2003) verwendet.

## 2.2. Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1. Medien und Anzucht von *E.coli* und *A. tumefaciens*

In dieser Arbeit erfolgte die Anzucht von *E.coli* in LB-Flüssigmedium (1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 171 mM NaCl) schüttelnd bei 37°C. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurde dem LB Medium 1,5 % Agar zugesetzt. Zur Selektion nach einer Plasmidtransformation wurden dem LB Medium entsprechende Antibiotika zugefügt, welche in Tabelle 4 aufgelistet sind. Die Kultivierung von Agrobakterien wurde standardmäßig bei 28°C in LB-Flüssigmedium schüttelnd oder auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika durchgeführt.

**Tabelle 4: Für die Medien verwendete Antibiotika und ihre Endkonzentration**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicilin/ Carbenicillin	100 $\mu$ g/ml
Kanamycin	50 $\mu$ g/ml
Spectinomycin	100 $\mu$ g/ml
Rifampicin	100 $\mu$ g/ml
Gentamycin	10 $\mu$ g/ml
Streptomycin	100 $\mu$ g/ml

### 2.2.2. Herstellung kompetenter *E.coli* und *A. tumefaciens*

Chemisch kompetente *E.coli* Zellen für die DNA Transformation wurden entsprechend dem Protokoll von (Hanahan, 1983) hergestellt. Zur Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* wurde eine Einzelkolonie in 20 ml Flüssigmedium unter Zugabe entsprechender Antibiotika überimpft und üN bei 28°C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine 500 ml Hauptkultur mit der über Nacht gewachsenen Vorkultur angeimpft und schüttelnd bis eine OD<sub>600</sub> 1,0 inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte bei 3000 xg und 4°C für 15 min. Das Pellet wurde in eiskaltem und steril filtriertem CaCl<sub>2</sub> (10 mM) resuspendiert und aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Nutzung bei -80°C gelagert.

### 2.2.3. Transformation

Die Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen erfolgte gemäß Sambrook *et al.*, 1989 durch Hitzeschock (Sambrook, 1989). Für die Transformation kompetenter Agrobakterien wurden den Zellen 1-2 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und 5 min auf Eis inkubiert, bevor sie für weitere 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Im Anschluss inkubierten die Zellen für 5 min bei 37°C. Nachdem dem Transformationsansatz 800 µl LB Medium zugegeben wurde, inkubierte der Ansatz schüttelnd für mindestens 4 h bei 28°C. Bevor die Zellen auf selektiven LB Agarplatten ausplattiert wurden, wurde der 800 µl Ansatz für 5 min bei 2800 xg zentrifugiert und das Pellet in 150 µl LB Medium resuspendiert. Die Platten wurden für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert, bevor Einzelkolonien sichtbar waren.

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

DNA-Fragmente für die Klonierung wurden mittels PCR generiert (Saiki *et al.*, 1988). Für die PCR wurden sowohl gDNA, cDNA als auch Plasmid-DNA verwendet. Mutagenese PCRs und PCRs für die Klonierung wurden mit der Phusion Polymerase aufgrund ihrer *proof-reading* Funktion durchgeführt. Für die Genotypisierung und Kolonie PCRs wurde die Taq Polymerase angewandt. Die Elongationszeiten und die Annealingtemperaturen wurden für die jeweiligen Oligonukleotide und den Genlängen angepasst. Zur Analyse des PCR-Produktes wurden gemäß der Fragmentgröße ein 1 % oder 2 % Agarosegel genutzt. Das Agarosegel lief in TAE Puffer (40 mM Tris, 2,5 mM EDTA, 1 % Essigsäure). Erfolgreich amplifizierte PCR-Produkte wurden im Anschluss aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) für die weitere Verwendung gereinigt.

### 2.3.2. Klonierungsstrategien

Für den Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten wurden den spezifischen Genoligonucleotide die jeweiligen Restriktionsschnittstellen hinzugefügt. Der Restriktionsverdau von Vektoren, die Ligation und die Dephosphorylierung von DNA erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989 sowie gemäß den Angaben des Enzymherstellers. Für die Durchführung der BP- als auch der LR-Rekombination mit dem Gateway System (Thermo Fisher Scientific) wurde ebenfalls die Firmenanleitung befolgt. Die in dieser Arbeit klonierten Plasmide sind in Tab. 2 aufgelistet.

### 2.3.3. Plasmid isolation aus *E.coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit (Macherey-Nagel) unter Befolgung des beigelegten Protokolls durchgeführt. Hierzu wurde eine *E.coli* üN-Kultur angeimpft und am Folgetag pelletiert. Zur Isolierung größerer und hochreiner Plasmid-DNA wurde eine 250 ml Kultur inokuliert und das Nucleobond® AX Plasmid Purification Midi (AX 100) verwendet.

### 2.3.4. Sequenzierung

Zur Verifizierung der Klonierung wurde jede Plasmid-DNA sequenziert. Dazu wurden 150-200 ng der Plasmid-DNA mit den dazugehörigen Primern zum Sequenzierungsservice der biologischen Fakultät (Ludwig-Maximilian-Universität München, Deutschland) geschickt.

### 2.3.5. Präparation von genomischer DNA aus *A. thaliana*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *A. thaliana* wurde ein Blatt mit 500 µl Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1 % w/v PVP40) 3 min in einer Kugelmühle (Tissue Lyser, Retsch/Qiagen) homogenisiert. Dem Homogenisat wurden 66 µl 10 % (w/v) SDS und 166 µl 5 M Kaliumacetat hinzugefügt und im Anschluss 15 min bei 13.200 xg zentrifugiert. Die DNA wurde mit der Zugabe von 500 µl Isopropanol zum Überstand und 10 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.200 xg wurde das DNA-Pellet in 70 % EtOH gewaschen und im Anschluss bei 50°C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O durch die Lagerung bei -20°C und anschließender Inkubation bei 50°C für 5 min resuspendiert. Für die Genotypisierung wurden in der PCR 2 µl gDNA in einem 10 µl Ansatz verwendet.

### 2.3.6. Isolation der gDNA aus *S. cerevisiae*

Zur Präparation der gDNA aus *S. cerevisiae* wurde das Protokoll von (Harju *et al.*, 2004) befolgt. Dafür wurde eine 1,5 ml YPD (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Dextrose) üN Hefekultur bei 20.000 xg für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 400 µl Harjupuffer

(2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) resuspendiert und per Gefrier-Tau Methode mit flüssigem Stickstoff (2 min) und 1 min bei 95°C aufgeschlossen. Der Suspension wurde Chloroform in Verhältnis 1:1 zugefügt und 2 min gevortext. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 20.000 xg bevor das Pellet mit 70 % p.a Ethanol gewaschen wurde. Das Pellet wurde getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Für die PCR wurden 3 µl Hefe gDNA verwendet.

### **2.3.7. Isolation von RNA aus *A. thaliana***

Die RNA aus *A. thaliana* wurde mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) unter Befolgung der Herstellerangaben isoliert. Dafür wurde das Pflanzenmaterial nach der Ernte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und durch Mörsern aufgeschlossen. Der Verdau der DNA wurde während der RNA-Isolation mit der DNaseI von Roche (Mannheim, Deutschland) gemäß Firmenangaben durchgeführt.

### **2.3.8. cDNA Synthese**

Die cDNA wurde mit der M-MLV reverse Transkriptase (Promega) gemäß Firmenanleitung mit 1 µg RNA in einem 10 µl Reaktionsansatz mit 4 µM oligo-dT-Primer, 0,5 mM dNTP synthetisiert. Der Ansatz wurde für 2 min bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Die cDNA wurde für 1,5 h bei 42°C nach der Zugabe von 2 Units reverser Transkriptase transkribiert.

### **2.3.9. Gibson assembly (Gibson, 2009)**

Für die Assemblierung der Fusionsgene wurde das isothermale *in vitro* System nach Gibson *et al.*, 2009 verwendet. Hierzu wurden Fragmente mit 15-20 bp Überhänge zum jeweiligen benachbarten Fragment amplifiziert. Zur *in vitro* Assemblierung der Fragmente wurde ein 2x Mastermix 1:1 mit dem Volumen der Fragmente im Reaktionsansatz gemixt. Der Mastermix bestand aus folgenden Komponenten:

**405 µl isothermaler Start Mix (1,5 g PEG<sub>8000</sub>, 3 ml 1 M Tris, pH 8, 150 µl 2 M MgCl<sub>2</sub>)**

**25 µl 1 M DTT**

**20 µl 25 mM dNTPs**

**50 µl NAD<sup>+</sup>**

**1 µl T5 Exonuclease**

**31.25 µl Phusion High Fidelity DNA Polymerase**

**250 µl Taq Ligase**

**467.75 µl H<sub>2</sub>O**

Für die *in vitro* Assemblierung von 2-3 Fragmenten wurden 0,02-0,5 pmol, bei über 3 je 0,2-1,0 pmol DNA Fragment benötigt. Der isothermale Reaktionsansatz inkubierte für 1 h bei 50°C und anschließend *E.coli* Top10 Zellen gemäß 2.2.3 transformiert.

## 2.4. Biochemische Methoden

### 2.4.1. *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt mit 1 µg Plasmid, 0,05 % BSA (BioLabs), 2 mM DTT (Promega), 0,25 mM m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G Cap analog (Ambion), 0.4 mM ACU (Roche), 50 U RiboLock RI (Thermo Fisher Scientific), 30 U RNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) in Transkriptionspuffer (Thermo Fisher Scientific). Alle Konstrukte dieser Arbeit besaßen vor der Gensequenz ausschließlich eine T7 Promotorregion (Vektor pET51b), bei dem das Cap analog notwendig war. Nach 15 min bei 37°C wurden 1,2 mM GTP zum Reaktionsansatz hinzugefügt und 2 h bei 37°C inkubiert, um die RNA zu transkribieren. Die RNA wurde bis zu weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.4.2. *In vitro* Translation

Für weitere Analysen wurde die transkribierte RNA *in vitro* translatiert. Dazu wurde für einen 50 µl Reaktionsansatz 10 µg der RNA verwendet. Die radioaktive Markierung erfolgte durch die Zugabe von 30 µCi <sup>35</sup>S Methionin und Cystein (Perkin Elmer, Walluf, Deutschland), die mit 80 µM Aminosäurenmix ohne Methionin dem Reaktionsansatz zugefügt wurden. Die Reaktion wurde für 1 h in 50 % wheat germ extract (Promega) mit 50 mM KAc bei 25°C durchgeführt.

### 2.4.3. Expression rekombinanter Proteine

Die Anzucht der transformierten *E.coli*-Kulturen wurde für die Proteinexpression aerob in sterilem LB-Medium mit spezifischen Antibiotika vorgenommen. Für die Messung des Zellwachstums wurde der Anstieg der optischen Dichte (OD) bei 600 nm mit einem UV/VIS-Spektrophotometer bestimmt. Eine Vorkultur (50 ml LB, Inokulation von einer Platte, 37°C, 180 rpm) wurde verwendet, um die Hauptkultur (500-1000 ml) mit einer OD von 0,0025 anzuimpfen. Die Hauptkultur inkubierte bei 37°C und 120 rpm bis eine OD von 0,6-0,8 erreicht wurde. Die Proteinexpression wurde mit der Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid induziert. Im Anschluss inkubierte die *E.coli* Kultur über Nacht bei 18°C und 120 rpm bis die Zellen bei 2.800 xg für 15 min pelletiert wurden.

### 2.4.4. Aufreinigung löslicher Proteine aus *E.coli*

Die pelletierten Zellen der Proteinexpression mit einem His<sub>6</sub>-Tag wurden in 25 ml Lysispuffer (20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch mit einem Microfluidizer (Microfluidics, Westwood, USA) in zwei Durchgängen bei einem Druck von 1,2-1,5 kbar. Der Rohextrakt wurde bei 20.000 xg,

4°C für 30 min zentrifugiert und der Überstand vom Pellet separiert. Zum Überstand wurden 250 µl Ni-Sepharose hinzugefügt und mindestens 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Mit Hilfe einer Poly Prep Chromatography column (Biorad München, Deutschland) wurden die Ni-Sepharose beads 3 x mit 5 ml Waschpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 40 mM Imidazol) gewaschen. Das rekombinante Protein wurde im Anschluss mit der Zugabe von 300 µl Elutionspuffer (20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 200 mM Imidazol) eluiert und zur weiteren Analyse eine SDS-PAGE durchgeführt.

#### **2.4.5. Proteinpräparation aus *inclusion bodies***

Während der Proteinexpression kommt es auch vor, dass *E.coli* unlösliche Proteine in *inclusion bodies* ablagert. Diese unlöslichen Proteine wurden aus den *inclusion bodies* aufgereinigt. Dazu wurden die pelletierten Zellen wie in 2.4.4 mechanisch aufgeschlossen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 20 ml Detergenspuffer (20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 % Desoxycholsäure, 1 % Nonidet P-40, 10 mM β-Mercaptoethanol), zweimal in Tritonpuffer (20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 5 mM β-Mercaptoethanol) und zweimal in Trispuffer (20 mM Tris pH 8.0, 10 mM DTT) gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Suspension bei 12.000 xg für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend in 5-10 ml Harnstoffpuffer (50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 7 M Harnstoff) resuspendiert und für mindestens 2 h bei RT rotierend inkubiert. Nach einer finalen Zentrifugation bei 20.000 xg für 15 min bei RT waren die Proteine im Überstand und wurden folglich wie in 2.4.4 weiter mit Ni-Sepharose aufgereinigt.

#### **2.4.6. Proteinextraktion aus *A. thaliana***

Für die Extraktion von Proteinen aus *A. thaliana* wurde Blattmaterial mit Hilfe eines elektronischen Mikropistills in 300-400 µl Homogenisationspuffer (50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM DTT) homogenisiert. In der Folge inkubierte das homogenisierte Blattmaterial für 10 min dunkel auf Eis, bis es filtriert und bei 9.300 xg für 10 min zentrifugiert wurde. Im Überstand waren nach der Zentrifugation die löslichen Proteine, während die Membranproteine im Pellet akkumulierten. Für Analysen wurden die Membranproteine wieder in Homogenisationspuffer resuspendiert.

#### **2.4.7. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration sämtlicher Proben wurde photometrisch entweder mit der Bradford Methode (Bradford, 1976), auf Basis der Reaktion mit Coomassie, oder mit dem kalorimetrischen DC™ Protein Assay (Biorad) gemessen, die auf der Lowry Konzentrationsbestimmung basiert (Lowry et al., 1951).



#### **2.4.7.1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde die Bradford Reagenz (0,1% Coomassie brillant blau G-250, 5 % Ethanol, 10 % Phosphorsäure) 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und 1 µl der zu bestimmenden Proteinprobe zugefügt. Nach 10 min Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gegen eine Probe mit Puffer gemessen.

#### **2.4.7.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry wurde das RC DC™ protein assay Kit (Biorad) genutzt. Das Kit basiert auf eine modifizierte Form des Lowry assays. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DC Lösung 1:8 mit der RC Lösung verdünnt und 1-25 µl der Proteinprobe hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurden 25 µl H<sub>2</sub>O verwendet. Nach 15 min Inkubation wurde die Proteinabsorption bei 750 nm gemessen.

### **2.4.8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

#### **2.4.8.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer molekularen Masse erfolgte elektrophoretisch mit einem diskontinuierlichen Gel nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Acrylamid-Konzentrationen (Verhältnis Acrylamid zu N, N'-Methylen-Bisacrylamid 30:0,8) von 10-15% im Trenngel wurden auf die Proteingröße abgestimmt, während das Sammelgel immer 5% Polyacrylamid beinhaltete. Den Proteinproben wurden SDS Ladepuffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol, 0.004 % Bromphenolblau) hinzugefügt und zur Denaturierung 10 min bei 95° erhitzt. Die Proteine wurden bei 30 mA (1,0 mm dicke SDS Gele bei 60 mA) aufgetrennt. Zur optischen Visualisierung wurden die Gele mit Coomassie Färbelösung, oder per Silberfärbung angefärbt, oder für weitere Analysen auf eine Membran transferiert (2.4.10).

#### **2.4.8.2. Blue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)**

Photosynthetische Komplexe wurden via blue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert. Hierzu wurden solubilisierte Thylakoide auf ein natives Bis-Tris Gradientengel (5-12 % Polyacrylamid) aufgetragen. Den Probenansätzen wurden vor dem Auftragen BN-Ladepuffer (750 mM ε-Aminocaprinsäure, 5 % Serva-G 250) hinzugefügt. Als Anodenpuffer wurden 50 mM Bis-Tris pH 7.0 eingesetzt, als Kathodenpuffer 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris pH 7.0, 0.2 % Serva-G 250. Nachdem das Gel ün bei 30 V lief, wurde der Kathodenpuffer durch einen Puffer ohne 0,2 % Serva-G 250 ausgetauscht und die Komplexe bei 300 V weiter aufgetrennt. Zur Analyse der einzelnen photosynthetischen Komplexproteine im Anschluss der BN-PAGE wurden die Spuren zur Denaturierung für

20 min in 70 mM SDS und 62 mM NaCO<sub>3</sub> inkubiert. Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte mit einem 12 %, 4 M Harnstoff SDS Gel unter den in 2.4.8.1 beschriebenen Konditionen.

## **2.4.9. Färbung von SDS-Gelen**

### **2.4.9.1. Coomassie Färbung**

Die via Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Gel mit einer Coomassie-Färbelösung (50 % Methanol; 7 % Essigsäure; 0,18 % Coomassie Brilliant Blue R250) unter Schütteln für 20 min gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes im Gel inkubierte das Gel in Entfärber (40 % Methanol, 7 % Essigsäure, 3% Glycerin), bevor das Gel dann per Vakuum für die Datenpflege getrocknet wurde.

### **2.4.9.2. Silberfärbung (Helmut Blum, 1987)**

Zur Visualisierung von Proteinen durch die Silberfärbung wurde das SDS-Gel nach der Proteintrennung für mindestens 1 h in Fixierlösung (50 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 0.05 % Formaldehyd) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Gel 3x in 50 % EtOH jeweils für 30 min gewaschen und für 90 sek in 0,02% Natriumthiosulfat preimprägniert. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift für 3x 30 sek in H<sub>2</sub>O, bevor das Gel zur Imprägnation für 30 min in 0,2 % Silbernitrat und 0,075 % Formaldehyd inkubierte. Nach wiederum 3x Waschen mit H<sub>2</sub>O erfolgte die Anfärbung der Proteine in der Entwicklerlösung (6 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.05 % Formaldehyd, 0.0004 % Natriumthiosulfat). Die Reduktion der Silberionen wurde mit der Stopplösung (50 % Ethanol, 12 % Essigsäure) beendet, nachdem die Proteine sichtbar waren.

## **2.4.10. Immunodetektion von Proteinen**

### **2.4.10.1. Elektrottransfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)**

Mit Hilfe einer Semi-Dry-Blot Apparatur (GE Healthcare) wurden die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF Membrane transferiert. Ausgehend von der Anode wurden für den Transfer drei in Towbinpuffer (372 mM Glycin, 50 mM Tris Base, 20 % Methanol) inkubierte Whatman-Filterpapier gelegt, gefolgt von der PVDF Membran, die zuvor für 10 sek in Methanol aktiviert wurde, und dem SDS Gel, überschichtet wiederum mit 3 Towbinpuffer Filterpapiere. Der Elektrottransfer wurde bei einer Stromstärke pro Fläche von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h, bzw. bei 1 mm SDS-Gelen für 2 h, vorgenommen. Zur temporären Visualisierung der Proteine und des Markers wurde die Membrane kurz in Ponceau S (0,5 % Ponceau S; 1 % Essigsäure) gefärbt.

#### 2.4.10.2. Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern

Zur weiteren Analyse von Proteinen wurde die spezifische Antigenidentifizierung via polyklonaler Antikörper verwendet. Die Visualisierung der spezifischen Reaktion erfolgte mit dem enzymgekoppelten sekundären Antikörper (an Anti-Kaninchen-IgG gekoppelte Meerrettichperoxidase). Dazu wurde die Membran nach dem Transfer in 5 % Milchpulver-TBST (100mM Tris pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.075 % Tween) inkubiert, um freie Stellen auf der Membran zu blockieren. Nachdem die Membran in 1x TBST gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit dem Antiserum gegen das spezifische Protein für 2 h bei RT oder üN bei 4°C, verdünnt in 5 % Milchpulver-TBST in Verhältnissen von 1:500 bis 1:2000. Nach wiederum 2x Waschen in 1x TBST, inkubierte die Membrane für 2 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (1:20.000). Umgebende Peroxidase-Konjugat-Antikörper wurden mit 3x Waschen mit 1x TBST entfernt. Für die Visualisierung wurden die ECL-Entwicklungslösungen 1:1 (Lösung I: 100 mM Tris pH 8.5, 1 % Luminol, 0.44 % Coumarsäure; Lösung II: 100 mM Tris pH 8.5, 0.018 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) vermischt und auf die Membran pipettiert. Das durch die Reaktion entstehende Signal wurde mit dem Image Quant LAS 400 (GE Healthcare) detektiert.

#### 2.4.11. Phosphorylierungsassay

Für die Analyse von potentiell phosphorylierten Proteinen wurden Phosphorylierungsassays durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 µg rekombinantes Substratprotein, 0,7 µl wheat germ lysate, 1 µg rekombinante Kinase in der Anwesenheit von 13,5 µCi gamma <sup>32</sup>P-ATP (Hartmann Analytik, Braunschweig, Deutschland) und Kinasepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>) in einem 25 µl Reaktionsvolumen für 10-20 min bei RT zusammen inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 7,5 µl SDS Ladepuffer dem Reaktionsansatz zugefügt und für die anschließende Analyse auf SDS Gel geladen. Die Detektion der Phosphorylierungssignale wurde gemäß 2.4.13. vorgenommen.

#### 2.4.12. Pull down assay

Die Analyse der putativen Interaktion des Alb3 C-Terminus mit den ribosomalen Untereinheiten wurde mit der pull down Methode durchgeführt. Dazu wurden die ribosomalen Proteine gemäß 2.4.2 *in vitro* radioaktiv markiert translatiert und 15 µl der Translation zu 20 µg Substratprotein und 300 µl 1 x PBS überführt. Der Ansatz inkubierte für 1 h rotierend bei RT, bevor 15 µl Ni-Sepharose für die Kopplung des His<sub>6</sub>::A3C zugefügt wurde. Die Kopplung erfolgte für 1 h rotierend bei RT. Zur Beseitigung von Bindungskontaminationen wurde der Reaktionsansatz in bio spin columns (Biorad) überführt und 6x mit 300 µl PBS, 50 mM Imidazol gewaschen. Die Proben wurden zwischen den Waschschritten jeweils 30 sek bei 1500 xg zentrifugiert.

Zur Elution der Proteine wurden 30 µl PBS mit 300 mM Imidazol hinzugefügt, 5 min inkubiert und die Ansätze anschließend 5 min bei 15.000 xg zentrifugiert. Die Analyse der Proteininteraktion erfolgte in weiterem Verlauf per SDS-PAGE.

#### **2.4.13. Detektion radioaktiv markierter Proteine**

Zur Visualisierung der radioaktiv markierten und per PAGE separierten Proteine, wurde das Gel zuerst getrocknet und anschließend in eine *BAS-MS* phosphor imaging plate (FUJIFILM) auf das Gel gelegt. Die letztendliche Analyse wurde mit dem Typhoon Scanner (GE Healthcare) vorgenommen.

#### **2.4.14. Proteinextraktion aus Mikrosomen**

Um Proteine aus mikrosomalen Fraktionen zu extrahieren wurden zwei unterschiedliche Protokolle angewandt. Zunächst inkubierten Mikrosomen in bei 4°C rotierend in Delipidationspuffer (1:12:1 Tri-N-butylphosphat:Aceton:Methanol). Nach der anschließenden Zentrifugation bei 21.000 xg wurde das Pellet zuerst in Tri-N-butylphosphat und Aceton gewaschen und wiederum bei 21.000 xg für 10 min pelletiert. Die Delipidation und die Waschschrte mit Tri-N-butylphosphat/ Aceton wurden 2x durchgeführt. In Protokoll 1 wurde das Pellet in SDS-Puffer (100 mM Tris-HCL pH 8,5, 4 % w/v SDS, 2 % v/v 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin, 2 mM PMSF) resuspendiert, für 5 min bei 80°C inkubiert und anschließend bei 21.000 xg für 10 min zentrifugiert. Zur Proteinpräzipitation wurden dem Überstand 4 vol. eiskaltes Aceton hinzugefügt und für mindestens 20 min bei -20°C inkubiert. Nach der Proteinpräzipitation wurden die Proteine mit -20°C-kaltem 80 % v/v Aceton gewaschen, im Anschluss getrocknet und in SDS Ladepuffer für die SDS-PAGE resuspendiert. Für eine isoelektronische Fokussierung (2.4.15) wurde das Pellet in IEF-Puffer aufgenommen. In Protokoll 2 wurde das Proteinpellet in kaltem TCA-Extraktionspuffer (10 % v/v TCA in Aceton, 20 mM DTT) (Proteinsuspensionen wurden im Verhältnis 1:4 mit TCA-Extraktionspuffer verdünnt) resuspendiert und 1 h bei -20°C inkubiert. Zur Präzipitation erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 15.000 xg, 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2x in Waschpuffer (Aceton, 20 mM DTT) gewaschen. Zwischen den Waschrten wurde die Probe wiederum für 1 h bei -20°C gelagert. Nach einem finalen Zentrifugationsschritt bei 12.000 xg für 10 min wurde das Pellet getrocknet und für die weitere Analyse in SDS Ladepuffer oder IEF-Puffer aufgenommen.

#### **2.4.15. Isoelektronische Fokussierung (IEF)**

Um Proteine gemäß ihres isoelektronischen Punktes zu separieren, wurde eine isoelektronische Fokussierung durchgeführt. Hierzu wurden die präzipitierten Proteine aus Punkt 2.4.14 im IEF-Puffer resuspendiert (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 0.2 % Biolyte

pH 3-10 (Bio-Rad), 2 % CHAPS, 100 mM DTT, Bromphenolblau, 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1x PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche)), für 1 h inkubiert und 10 min bei 18.200 xg, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und auf einen ReadyStrip™ IPG Streifen 11 cm (Biorad) pH 3-10 geladen. Der IPG Streifen wurde mit IEF Öl überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Die anschließende Auftrennung der Proteine gemäß isoelektronischem Punkt erfolgte mit der Biorad Protean IEF cell mit aktiver Rehydratation gemäß Firmenanleitung. Zur anschließenden Auftrennung der Proteine nach molekularem Gewicht per SDS-PAGE wurden die IPG Streifen zunächst 20 min in Puffer I (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 % Glycerin, 2 % DTT) und dann 10 min in Puffer II (6 M Harnstoff, 2 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 % Glycerin, 2.5 % Iodacetamid) schüttelnd inkubiert.

#### 2.4.16. Massenspektrometrie

Alle massenspektrometrischen Analysen wurden von der Serviceeinheit Massenspektrometrie von Biomolekülen an der LMU (MSBioLMU; Department Biologie I der Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt.

### 2.5. Zellbiologische Methoden

#### 2.5.1. Isolation von Thylakoidmembranen

Zur Isolierung von photosynthetischen Komplexen aus der Thylakoidmembran wurde Blattmaterial von 3-4 Wochen alten, auf ½ MS mit 1 % Zucker Agarplatten gewachsenen *A. thaliana* oder ca. 25 Pflanzen für *in vivo* <sup>35</sup>S-Markierungsexperimente (2.5.4) in Isolationsmedium (330 mM Sorbitol, 50 mM HEPES pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Ascorbinsäure) mehrmals kurz mechanisch mit einem elektronischen Mikropistill homogenisiert. Nachdem das Homogenisat filtriert und bei 760 xg für 4 min zentrifugiert wurde, wurde das Pellet in Waschpuffer (5 mM Sorbitol, 50 mM HEPES pH 7,5) resuspendiert. Die Chloroplasten wurden wiederum bei 760 xg, 4°C zentrifugiert und das Pellet in TMK-Puffer (100 mM Sorbitol, 50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in TMK Puffer, wurde der Chlorophyllgehalt gemäß unten angegebener Formel gemessen. Zum Angleichen bleicher Mutanten wurden Thylakoidproteine äquivalent zu 30 µg Chlorophyll des WT verwendet.

$$\text{Chlorophyll } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{A663} - \text{A750}) \times 8,2 + (\text{A645} - \text{A750}) \times 20,2$$

Bei Proben des *in vivo* <sup>35</sup>S-Markierungsexperimente wurden nach dem Aufschluss im Isolationsmedium die Wurzeln und grobes Blattmaterial per Pinzette entfernt und das

Homogenisat für 15 min bei 20.900 xg, 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteine wurde verworfen, während das Pellet in Waschpuffer resuspendiert und wiederum bei 20.900 xg für 15 min zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde in TMK Puffer aufgenommen und gemäß dem oben beschriebenen Protokoll fortgeföhren.

### **2.5.2. Solubilisierung von Thylakoidmembranen**

Die Analyse der photosynthetischen Komplexe wurde per BN-PAGE (2.4.8.2) durchgeföhrt. Dazu wurden die isolierten Thylakoidmembrane aus 2.5.1 bei 3300 xg und 4°C für 3 min pelletiert und anschließend in 70 µl ACA Puffer (750 mM ε-Aminocaprönsäure, 50 mM Bis-Tris pH 7, 0,5 mM EDTA) mit 1,1 % N-dodecyl-β-D-maltosid für 10 min auf Eis solubilisiert. Nach der Inkubation wurden die solubilisierten Thylakoidmembrane für 10 min bei 18.000 xg, 4°C zentrifugiert und der Überstand auf eine BN-PAGE geladen.

### **2.5.3. Isolation mikrosomaler Fraktionen aus *A. thaliana***

Die Isolation mikrosomaler Fraktionen aus *A. thaliana* wurde mit drei Wochen alten Pflanzen durchgeföhrt, die in ½ MS-Hydrokulturen, auf ½ MS-Agarplatten oder photoautotroph auf Erde gezüchtet wurden. Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, zerkleinert und anschließend in Homogenisationspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 500 mM Saccharose) aufgeschlossen. Zur Separation der mikrosomalen Fraktionen von Zelltrümmern, Chlorplasten und Mitochondrien, wurde das Homogenisat zuerst filtriert und 3x mit steigender Geschwindigkeit zentrifugiert (4.200 xg und 10.000 xg für 10 min und letztlich 30 min bei 22.000 xg). Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde jeweils der Überstand zur weiteren Präparation entnommen. Bevor die Mikrosomen auf einen Stufengradienten mit 12 %, 30 % und 50 % geladen wurden, wurden sie bei 100.000xg für 1h konzentriert und in Puffer 2 resuspendiert (50 mM Tris pH 7,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 12% Saccharose). Der anschließende Stufengradient wurde bei 100.000 xg für 90 min durchgeföhrt. Die isolierten Mikrosomen wurden entnommen, wiederum bei 100.000 xg für 60 min pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in 25 mM Tris pH 7,2, 300 mM Saccharose und 0,5 mM DTT gelagert.

### **2.5.4. *In vivo* <sup>35</sup>S-Proteinmarkierung (Nickel et al., 2016)**

Zur Analyse der Synthese photosynthetischer Proteine bzw. der Assemblierung und Synthese der photosynthetischen Komplexe wurden ca. 25 Pflanzen drei Wochen alte, auf ½ MS-Zucker-Agarplatten gewachsenen *A. thaliana* in Reaktionsgeföhre überföhrt und 70 µl Reaktionspuffer (1 mM Kaliumphosphat, pH 6,3) mit radioaktiv markierten <sup>35</sup>S Methionin/Cystein hinzugeföhgt. Um die Pflanzen mit dem Puffer und dem <sup>35</sup>S Methionin zu infiltrieren, wurden die Reaktionsgeföhre für 1 min in einem Speed Vac Concentrator

(Savant, Thermo Scientific) zentrifugiert und das Vakuum vorsichtig entfernt. Die infiltrierten *A. thaliana* inkubierten anschließend für 5-40 min in einem Wasserbad mit 25°C vor einer Starklichtquelle, um die Proteinsynthese zu induzieren. Überschüssiges radioaktives Methionin/Cystein wurde mit 20 mM Natriumcarbonat aus dem Reaktionsansatz entfernt und die Pflanzen entweder für Experimente gemäß 2.5.1 oder zur Analyse der Proteinsynthese per SDS-PAGE verwendet. Dazu wurden die Pflanzen mechanisch in 100 mM Carbonat homogenisiert und bei 20.900 xg, 4°C für 15 min zentrifugiert. Die im Pellet akkumulierten Membranproteine wurden von den löslichen Proteinen isoliert, mit 20 mM Natriumcarbonat gewaschen und letztlich nach erneuter Zentrifugation in 100 mM Natriumcarbonat resuspendiert.

## 2.6. Pflanzenbiologische Methoden

### 2.6.1. Pflanzenzucht

*A. thaliana* (Ökotyp Columbia und Landsberg) wurden photoautotroph auf Erde sowie heterotroph auf ½ MS mit 1 % Zucker in Flüssigkultur und Agarplatten gezüchtet. Die verwendeten Wachstums- und Lichtbedingungen variierten je nach Experiment und sind in Tabelle 5 protokolliert. Zur Vermehrung von Samen wurden die Pflanzen unter Gewächshausbedingungen kultiviert.

Tabelle 5: Anzuchtbedingungen von *A. thaliana*

Anzuchtbedingungen	Lichtintensität	Tag/ Nacht Rhythmus
Normallicht	120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	16 h / 8 h
Konstantes Normallicht (CNL)	120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	24 h / 0 h
Schwachlicht ( LL)	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	16 h / 8 h
Konstantes Schwachlicht (CLL)	10 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	24h / 0 h

### 2.6.2. Stabile Transformation von *A. thaliana* mit *A. tumefaciens*

Die Transformation von *A. thaliana* erfolgte mit *A. tumefaciens* GV3101. Dazu wurde eine Vorkultur von Platte inokuliert und am Folgetag in eine 400 ml LB-Medium Hauptkultur mit entsprechenden AB transferiert. Sowohl die Vorkultur als auch die Hauptkultur inkubierten schüttelnd bei 28°C. Die *A. tumefaciens* wurden bei 2800 xg für 20 min pelletiert, in Silwetmedium (5 % Saccharose, 0,05 % Silwet L-77) resuspendiert und auf eine OD<sub>600</sub> von 0,8 adjustiert. Für die stabile *A. thaliana* Transformation wurden blühende Pflanzen kopfüber für 10 sek in den resuspendierten *A. tumefaciens* inkubiert und ün abgedunkelt. Zur Erhöhung der Transformationsrate wurden die Pflanzen im Abstand von einer Woche ein zweites Mal transformiert. Nach der Samenernte der transformierten *A. thaliana* erfolgte die Selektion auf Basis der BASTA oder Hygromycin Resistenz, die auf Erde oder ½ MS-Zucker-Agarplatten vorgenommen wurde.

### 2.6.3. Puls-Amplituden-Modulationsfluorometrie (PAM)

Um die Funktion des Photosystems II zu analysieren, wurde eine fluoreszenz-basierte Photosynthesemessung vorgenommen. Dabei wurden die Lichtkurven mit dem Dual-PAM-100 (Walz, Effeltrich, Deutschland) gemessen, der mit einem DUAL-DR Detektor und einem DUAL-E mit P700 NIR Ermittler ausgestattet war. Zur Untersuchung wurde eine 6 mm Lochblende in der DUAL-DR verwendet. Die Lichtkurven wurden in CLL gewachsenen *A. thaliana* unter sich erhöhenden Lichtintensitäten gemessen. Die Elektronentransferrate [ETR (II)] und der PSII Quantum yield [Y (II)] wurden mit der Dual-PAM Software berechnet.

### 2.7. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Analyse der chloroplastidären Ultrastrukturen von *A. thaliana* wurde eine Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Dazu wuchsen die Pflanzen für 21 Tage unter CLL- und NL-Konditionen, bevor sie einen Tag vor der Mikroskopie üN abgedeckt lagerten, um die Stärkeakkumulation zu vermeiden. Die Fixierung und Einbettung am Folgetag sowie die Mikroskopie wurde von Prof. Dr. Andreas Klingl (Department Biologie I, Ludwig-Maximilians-Universität München) vorgenommen. Dazu wurden die Proben in Fixanspuffer (75 mM Cacodylatpuffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7) mit 2,5 % Glutaraldehyd (Endkonzentration) versetzt und geschnitten. Die Kantenlänge der Probestücke war nicht größer als 1 mm. Nach der Fixierung üN wurden die Proben vier Mal mit Fixanspuffer ohne Glutaraldehyd gewaschen (15 min, 30 min, 1 h und 80 min) und anschließend mit 1 % Osmiumtetroxid in Wasser nachfixiert und kontrastiert. Es folgten zwei Waschschrte mit Fixanspuffer für 10 min und vier Waschschrte mit destilliertem Wasser (15 min, 30 min, 1 h und 2 h). Danach wurden die Proben in einer ansteigenden Acetonreihe entwässert bevor die Infiltration mit dem Einbettharz (Spurr`s Resin) erfolgte. Dazu lagen die Proben zunächst üN in einem 1:1 Harz/Aceton-Gemisch und anschließend 3 h in 2:1 Harz/Aceton gefolgt von 3 h in 100% Harz. Es erfolgte eine Inkubation üN in frischen Harz, bevor die Proben für 16 h bei 63°C auspolymerisierten. Aus den fertigen Präparaten wurden Ultradünnschnitte angefertigt, welche mit Bleicitrat für 2 min nachkontrastiert wurden. Die elektronenmikroskopische Untersuchung wurde an einem Zeiss EM 912 mit OMEGA-Filter bei 80 kV im *zero-loss mode* durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einer Tröndle 2k x 2k *slow-scan* CCD-Kamera angefertigt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Funktion von Alb3 in der Thylakoidmembran

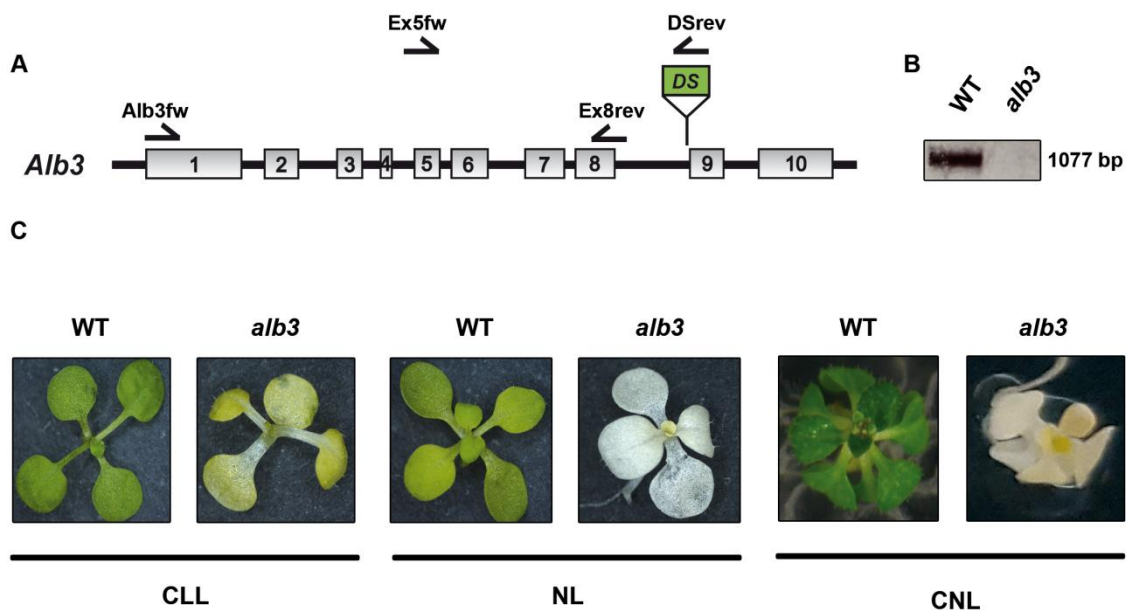
In der Studie von Sundberg *et al.*, 1997 wurde eine Deletionmutante im *ALB3* Gen erstmalig als albinotische Mutante phänotypisch analysiert und charakterisiert. Die Ds(Hyg)-Transposon-Insertionslinie war nicht auf Erde lebensfähig und offenbarte abnormale chloroplastidäre Strukturen mit einer minimalen Anzahl an Thylakoidmembranen und Granastapeln. Funktional konnte Alb3 in diversen Interaktionen mit Zellkern- und plastidär-kodierten Proteinen dokumentiert werden, die auf eine Beteiligung sowohl in der post- als auch in der cotranslationalen Proteininsertion hindeuten. In der *in vivo* Untersuchung von *alb3ΔC*, in der Motiv III und IV des C-Terminus abwesend waren, wiesen Mutanten, die unter konstanten Schwachlicht (CLL) von  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wuchsen, keine signifikanten Unterschiede zum WT auf (Urbischek *et al.*, 2015). Sowohl die PS-Komplexe als auch die Synthese der PS-Proteine waren nur marginal reduziert. Aufgrund dieser Beobachtung sollte in dieser Arbeit detaillierte *in vivo* Analysen mit der *alb3*-Deletionsmutante unter analogen Lichtintensitäten durchgeführt werden, um ausführlicher die Funktion des Alb3s in der Thylakoidmembran während der Synthese und Erhaltung des PSII zu untersuchen.

##### 3.1.1. Der Phänotyp von *alb3* unter verschiedenen Lichtbedingungen

In Folge der Beobachtungen unter CLL-Bedingungen sollte *alb3* erneut im Detail phänotypisch charakterisiert werden. Die Transposoninsertion konnte direkt vor dem Exon 9 im Intron 8 annotiert werden (Abb. 4a). Zur Verifikation wurde genomische DNA aus homozygoten Pflanzen mittels PCR genotypisiert und das amplifizierte Produkt zwischen DS-Transposon und genspezifischem Exon 5 *forward* sequenziert. Dadurch konnte die Transposoninsertion bestätigt werden. Zusätzlich wurde RNA aus 14 Tage alten Blättern isoliert, in cDNA umgeschrieben und das Alb3-Transkript mit den genspezifischen Oligonukleotiden Alb3 *forward* und Exon 8 *reverse* analysiert. Während im Wildtyp Ökotyp Landsberg (WT) *ALB3* cDNA amplifiziert werden konnte, konnte in der homozygoten *alb3* kein Genprodukt detektiert werden (Abb. 4b).

Da die homozygote *alb3*-Mutante, wie bei Sundberg *et al.*, 1997 beschrieben, nicht photoautotroph auf Erde lebensfähig war, wurden fortlaufende Experimente und Charakterisierungen mit Pflanzen durchgeführt, die ausschließlich heterotroph unter Zugabe von 1 % Saccharose auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten wuchsen. Die Mutanten wurden dafür im heterozygoten Zustand propagiert und anschließend selektiert. Für die phänotypische Analyse wuchsen die Pflanzen wie unter Punkt 2.6.1 beschrieben für drei Wochen bei NL, CLL und CNL. Unter NL-Konditionen prägten homozygote *alb3* den unter Sundberg *et al*

beschriebenen drastischen Phänotypen aus. Sowohl die Keim- als auch die ersten Blätter der Mutante waren albinotisch. Die Pflanzen waren außerdem leicht kleiner im Vergleich zum WT (Abb. 4c). Konträr dazu zeigte die gleiche Mutante, unter CLL-Bedingungen angezogen, nach drei Wochen einen hellgrünen Phänotypen, der ebenfalls eine leichte Wachstumsverzögerung gegenüber dem WT aufwies. Zum Vergleich wurde die ebenfalls unter NL-Bedingungen albinotische Mutante *tic20* unter CLL kultiviert, um ein generelles Ergrünen albinotischer Mutanten unter CLL-Konditionen ausschließen zu können. Die *tic20* Mutante prägte jedoch auch unter CLL den charakteristischen weißen Phänotypen aus (Anhang, Abb. 21). Der *alb3*-Phänotyp unter CNL-Konditionen war vergleichbar zu den Ergebnissen unter NL-Bedingungen. Homozygote *alb3* bildeten auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten zwar verzögert kleine Fruchtsände aus, wurden aber aufgrund ihrer Letalität in der Photoautotrophie ausschließlich heterozygot vermehrt.



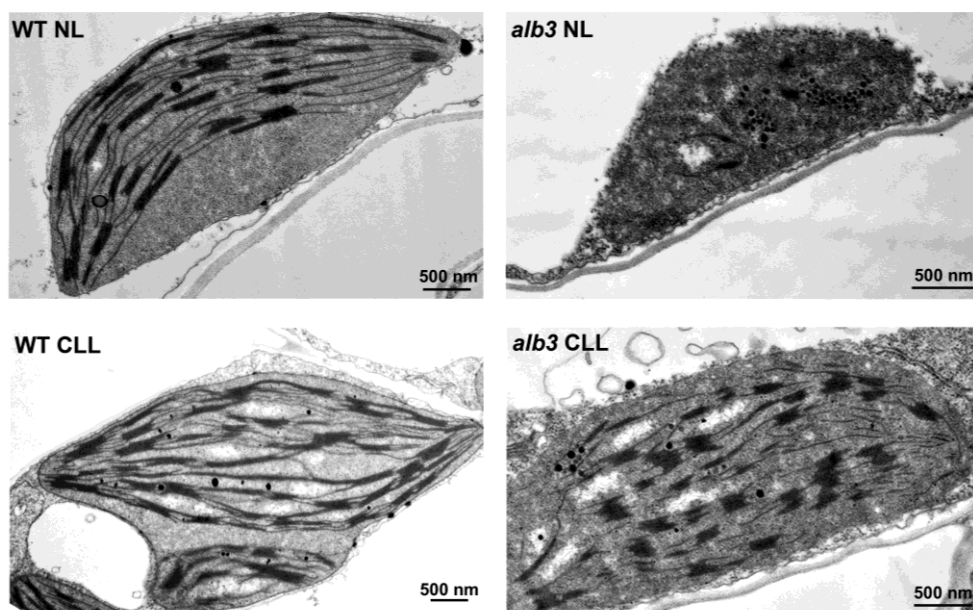
**Abbildung 4: Charakterisierung und Phänotypisierung der *alb3* Ds(Hyg)-Transposon-Insertionlinie.**

A) *ALB3*-Gen mit der Position des Ds(Hyg)-Transposons. Die Exons des Gens sind als graue Kästen dargestellt, die DS-Insertion im Intron 8 in grün. B) RT-PCR mit den Oligonukleotiden Alb3 fwd und Exon 8 rev auf cDNA aus 14 Tage alten WT- und homozygoten *alb3*-Pflanzen. C) Phänotypen homozygoter *alb3* und WT-Pflanzen unter konstantem Schwachlicht ( $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , CLL), Normallicht mit 16/8 Tag-Nacht-Rhythmus ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , NL) und konstantem Normallicht (CNL). Die Pflanzen wuchsen heterotroph für drei Wochen auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit 1 % Zucker.

### 3.1.2. Ultrastruktur der Thylakoidmembran in *alb3*

Hinsichtlich des ungewöhnlichen Phänotyps von *alb3* unter CLL-Konditionen sollten die chloroplastidären Ultrastrukturen per TEM untersucht werden. Überdies hinaus sollte auch homozygote *alb3* unter NL-Bedingungen strukturell analysiert werden, die bei Sundberg *et al.*, 1997 nur wenige Thylakoidmembrane und Granastapel offenbarten. Diese Ergebnisse konnten weitestgehend unter NL-Bedingungen reproduziert werden. So entwickelten *alb3*, die unter NL-Konditionen wuchsen, nur vereinzelt thylakoidähnliche

Strukturen. Nahezu keine stromalen Thylakoide wurden in der Mutante generiert und auch die Granaformation war signifikant betroffen (Abb. 5, oben rechts). Zusätzlich konnte eine erhöhte Bildung von Plastoglobuli in *alb3* beobachtet werden, die vermutlich durch die reduzierte Lipidinkorporation in die Thylakoidmembrane entstanden. Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede in *alb3* unter CLL-Bedingungen verglichen mit dem WT nicht offensichtlich. Die Thylakoide schienen schmaler zu sein, allerdings bildete die Mutante unter den gegebenen Konditionen eine normale Thylakoidorganisation und Grana aus (Abb. 5, rechts unten). Die Granastapel waren gegenüber dem WT kompakter und höher angeordnet, während der WT flachere und breitere Stapel unter CLL- verglichen mit den Stapeln unter NL-Bedingungen ausprägte.



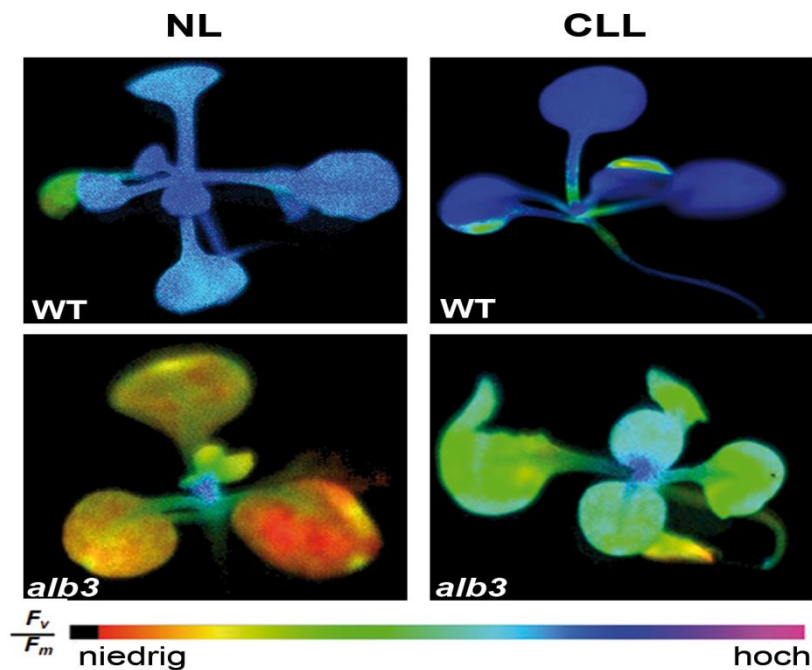
**Abbildung 5: Chloroplastidäre Ultrastrukturen von WT und *alb3* unter NL- und CLL-Bedingungen.**

Oben: Unter NL-Bedingungen gewachsene WT- und homozygote *alb3*-Pflanzen. Unten: Unter CLL-Konditionen gewachsene Pflanzen. Plastoglobuli zeichnen sich durch schwarze runde Punkte zwischen den Thylakoidstrukturen im Stroma aus. Die Pflanzen wuchsen für drei Wochen unter den angegebenen Bedingungen und wurden eine Nacht vor der TEM in Dunkelheit gelagert. Das Größenverhältnis wird durch den Balken mit 500 nm angezeigt.

### 3.1.3. Die photosynthetische Aktivität von *alb3*

Angesichts des beobachteten Phänotyps und der chloroplastidären Strukturen unter CLL-Konditionen sollten funktionelle Analysen durchgeführt werden. Um den Einfluss der Abwesenheit von Alb3 auf die Biogenese der PSII-Komplexe und die damit verbundene photosynthetische Leistungsfähigkeit des PSII zu untersuchen, sollten Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen vorgenommen werden (Abb. 6). Die PAM-Messungen wurden mit *alb3* und WT, die drei Wochen unter NL- und CLL-Konditionen wuchsen, durchgeführt. In der Analyse der maximalen photochemischen Quantenausbeute ( $F_v/F_{max}$ ) konnte für CLL-*alb3* mit einem Wert von 0,594 eine nur gering reduzierte Effizienz der zur Photosynthese genutzten Lichtenergie im Vergleich zum WT mit einem Wert von 0,693 gemessen werden.

Demgegenüber konnte die unter NL gewachsene Mutante kaum die absorbierte Lichtenergie für die Photosynthese verwerten (Abb. 6). Auch die Werte des *non-photochemical quenching* (WT: 0,185 versus *alb3*: 0,157) durch den Aufbau eines pH-Gradienten über der Thylakoidmembran als auch die Werte des *yields* (WT: 0,528 versus *alb3*: 0,483) resultierten in der CLL Mutante in einer nur marginalen Reduktion gegenüber dem WT. Zusammengefasst war die photosynthetische Leistungsfähigkeit der *alb3* unter CLL leicht zu der des WT reduziert, während NL folgenschwerer Leistungsreduzierungen in *alb3* hervorruft.



**Abbildung 6: Spektroskopische Analyse von unter NL und CLL gewachsene WT und *alb3*.**

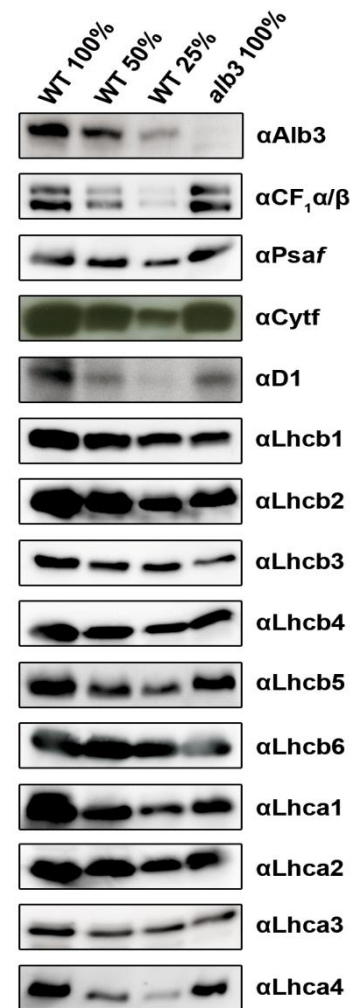
Chlorophyll-Fluoreszenzmessung von NL- und CLL-Pflanzen. Die PSII-Messungen wurden mit einem PAM-Imaging System kontrolliert. Die Experimente wurden mit drei Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Rot indiziert keine photosynthetische Aktivität, blau eine normale Aktivität. Eine Reduktion der Leistungsfähigkeit konnte sowohl unter NL als auch leicht unter CLL beobachtet werden. Die PAM-Messungen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Stephanie Seifert durchgeführt.

### 3.1.4. Die Biogenese der PS-Thylakoidmembrankomplexe in *alb3*

Aufgrund der nur geringen photosynthetischen Leistungsreduktion der homozygoten Mutante und in Folge des markanten Phänotyps unter CLL sollte der Proteingehalt einzelner photosynthetischer Proteine per quantitativer Immunoblotanalyse und die Assemblierung der PSII-Komplexe durch eine BN-PAGE in *alb3* untersucht werden. Dadurch sollte ermittelt werden inwieweit die Deletion von Alb3 auch unter CLL Einflüsse auf einzelne photosynthetische Proteinquantitäten und auf die Biogenese der PS-Komplexe in der Thylakoidmembran besaß. Für die quantitativen Immunoblotanalysen wurden Antikörper gegen verschiedene Untereinheiten der photosynthetischen Komplexe verwendet. Zur Quantifizierung wurden 20 µg (100 %), 10 µg (50 %) und 5 µg (25 %) isolierte Membranproteine von WT und gegen 20 µg *alb3* Membranproteine verglichen.

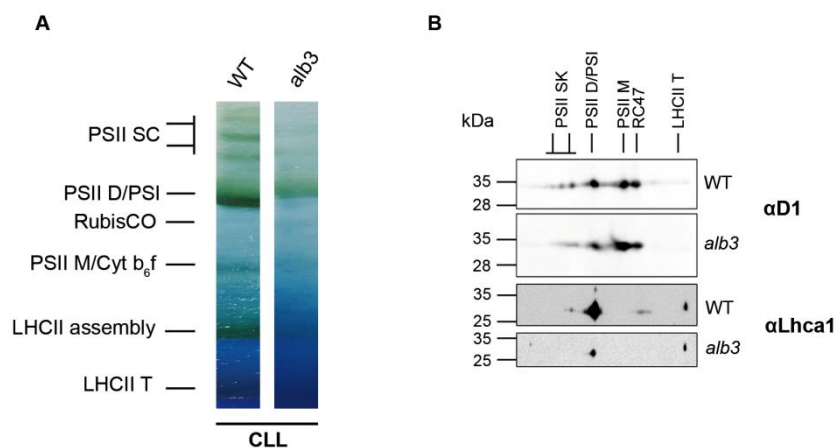
Zur Verifizierung der Alb3-Deletion in der Mutante auf Proteinebene wurde der gegen den ersten stromalen *loop* des Alb3s gerichteten Antikörper verwendet, der folglich im WT aber nicht in *alb3* ein Signal detektieren konnte (Abb. 7). Die Untereinheiten der ATPase CF<sub>1</sub>  $\alpha/\beta$ , das PSI-Protein Psaf und Cytf des Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*-Komplexes akkumulierten in den *alb3*-Membranproteinen in vergleichbarer Quantität verglichen zum WT. Die PSII-Untereinheit D1, der in vorherigen Studien eine direkte Interaktion mit Alb3 nachgewiesen wurde, war im Vergleich zum WT um ca. 25 % reduziert. Die quantitativ größten Unterschiede in *alb3* ergaben sich in der Proteinmenge der LHCII-Proteine. Mit dem spezifischen Antikörper gegen Lhcb1-6 wurden in *alb3* Reduktionen von mindestens 50 % gegenüber dem Proteingehalt des WT ermittelt. Am deutlichsten war die Reduktion im Proteingehalt der Lhcb1 und Lhcb3 zu sehen, die Quantitäten von ca. 20 % des WT offenbarten. Eine Reduktion der Proteinmenge in *alb3* um mindestens 50% konnte auch für die Lhca1-3 detektiert werden, während für Lhca4 ca. 80% der Proteinmenge des WT nachgewiesen wurde. Noch weniger Lhcb4 und Lhca1 akkumulierten *alb3* die unter NL wuchsen. In diesen Pflanzen konnten nur ca. 10% der WT-Menge gemessen werden (Anhang, Abb. 22).

Zur Untersuchung der Integration und der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe in die Thylakoid-membran sollten Thylakoide aus CLL WT- und *alb3*-Pflanzen isoliert, solubilisiert und mit einer nativen PAGE in der ersten Dimension aufgetrennt werden (Abb. 8a). In drei Wochen alten, unter CLL-Konditionen gewachsenen Mutanten konnte eine signifikante Reduzierung aller photosynthetischen Intermediate verglichen zum WT festgestellt werden. Nichtsdestotrotz waren photosynthetische Intermediate und Superkomplexe trotz der ausgeprägten Reduktion in *alb3* detektierbar. Die deutlichsten Reduktionen im Vergleich zum WT zeigte *alb3* in den frühen Assemblierungsintermediaten LHCII-Trimer und dem LHCII-assembly (Abb. 8a). Demgegenüber konnte in *alb3* die unter NL wuchsen nahezu keine Akkumulation von Thylakoidmembrankomplexe im *steady-state* per BN-PAGE festgestellt werden (Anhang, Abb. 23). Zur weiteren spezifischen Untersuchung sollten die isolierten PS-Komplexe und Intermediate der CLL-Mutante in einer



**Abbildung 7: Quantifizierung der akkumulierten Thylakoidmembranproteine in WT und *alb3* unter CLL.** Membranproteine aus WT und *alb3* wurden isoliert, aufgetrennt und mit Antikörpern gegen verschiedene PS-Komplexproteine zur Quantifizierung des Proteingehalts immunodekoriert. PSII-D1, PSII-Lhcb3 und PSI-Lhcas waren reduziert. 100 % Membranproteine entsprachen 20  $\mu$ g und wurden für den WT und *alb3* geladen.

sekundären denaturierenden SDS-PAGE in die einzelnen Proteine separiert und mittels Immunoblot analysiert werden. Angesichts der Reduktion der PSII-LHC-Proteine und PSII-D1 in den quantitativen Westernblots (Abb. 7), wurden spezifische Antiseren gegen PSII-D1 und PSI-Lhca1 für die Analyse verwendet, um Rückschlüsse sowohl auf die Proteinmenge als auch auf deren Lokalisierung in den jeweiligen PSII-Intermediaten zu erhalten. Dabei konnten die Immunoblotanalysen der sekundären Dimension die Ergebnisse der Quantifizierung der Membranproteine bestätigen (Abb. 7 und 8b). Des Weiteren wurden beide Proteine auch in *alb3* in hoch-molekulare Komplexe assembliert. Im WT war Lhca1 dem PSI assoziiert sowie als Monomer vorhanden. Übereinstimmend wurde das Lhca1 in *alb3* detektiert allerdings in reduzierter Form (Abb. 8b). Kongruent zum WT wurde das PSII-D1 in *alb3* im PSII-Superkomplex, PSII-Dimer, PSII-Monomer und RC47 assembliert, wengleich im Superkomplex leicht reduziert.



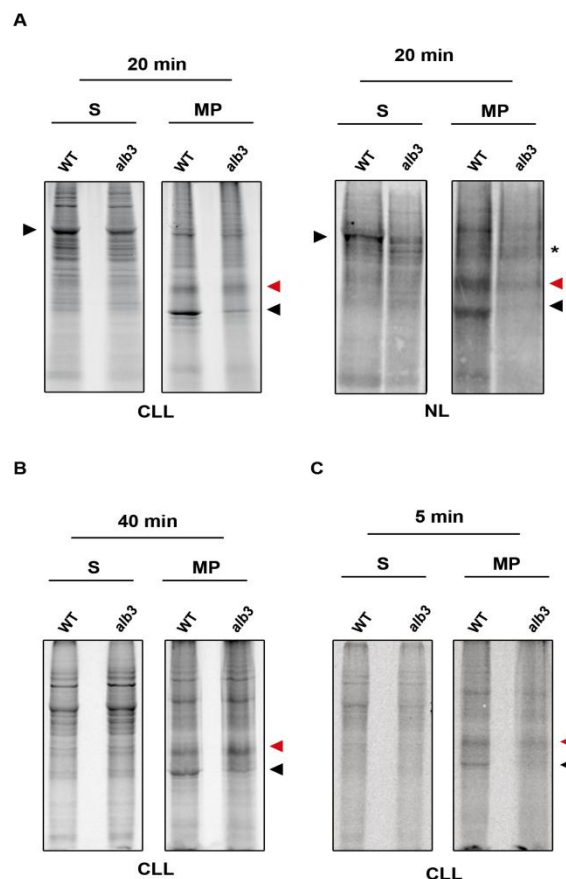
**Abbildung 8: Die Assemblierung und Insertion photosynthetischer Komplexe in WT und *alb3*.**

A) Thylakoide von WT und *alb3* wurden aus drei Wochen alten CLL-Pflanzen isoliert, solubilisiert und per BN-PAGE in der ersten Dimension separiert. Eine signifikante Reduktion photosynthetischer Komplexe ist deutlich in *alb3* sichtbar. B) Immunoblotanalyse der Thylakoidmembrankomplexe aus A), die mit einer denaturierenden, sekundären SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Die Analyse wurde mit Antikörpern gegen D1 und Lhca1 durchgeführt. SC=Superkomplex, D=Dimer, M=Monomer, T=Trimer und RC47 Komplex des PSII Reaktionszentrum mit dem CP47. Die Analysen der sekundären Dimension wurden im Rahmen der Masterarbeit von Stephanie Seifert durchgeführt.

### 3.1.5. Die *de novo* Synthese photosynthetischer Proteine/Komplexe in *alb3*

Da die vorangegangenen Experimente nur Rückschlüsse auf den *steady-state* Level der Proteinquantität und Komplexassemblierung in *alb3* zuließen, sollten im weiteren Verlauf die Proteinsynthese, Membranintegration und Assemblierung *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden  $^{35}\text{S}$ -Markierungsexperimente mit drei Wochen alten WT- und *alb3*-Pflanzen durchgeführt, die zuvor unter NL- oder CLL-Bedingungen wuchsen. Einerseits wurden Thylakoidmembran- und lösliche Proteine extrahiert, um die Proteinsynthese und Integration per SDS-PAGE zu untersuchen, andererseits wurden zusätzlich die Thylakoidmembrane auch für die Analyse der *in vivo* assemblierten PS-Komplexe per BN-PAGE isoliert. Die radioaktiv markierten löslichen Proteine der *in vivo* Synthese dienten als Ladekontrolle,

da die Deletion der Insertase sich nicht auf diese Proteine auswirken sollte. Dies bestätigte die Synthese der große RuBisCO-Untereinheit (RLSU) in den löslichen Proteinen (Abb. 9a links, schwarzer Pfeil). In der Membranfraktion waren hingegen signifikante Unterschiede in *alb3* zu beobachten. So war in CLL und auch in NL *alb3* nach 20 min Markierung die Synthese der LHC-Proteine im Vergleich zum WT signifikant reduziert (Abb. 9a rechts, schwarzer Pfeil). Während in den Thylakoidmembranen von *alb3* unter NL-Bedingungen kaum neusynthetisierte LHC-Proteine detektierbar waren, akkumulierten CLL-Mutanten ca. 10 % der LHC-Proteine der WT-Menge in der Membran. Im Kontrast dazu wurde in CLL-Mutanten PSII-D1, ein potentiell cotranslationales Substrat von Alb3, in nahezu äquivalenter Quantität zum WT synthetisiert und in die Membran inseriert (Abb. 9a, links, roter Pfeil), während in NL das PSII-D1 nahezu nicht detektierbar war (Abb. 9a, rechts, roter Pfeil). Da Thylakoidmembranproteine analysiert wurden, konnte die Synthese der LHC-Proteine ebenso wie die Insertion in die Membran in *alb3* beeinflusst gewesen sein. Andererseits waren die Synthese und Insertion der ebenfalls partiell-zellkernkodierten und membranständigen ATP-Synthase nicht in *alb3* beeinträchtigt (Abb. 9a, Stern).

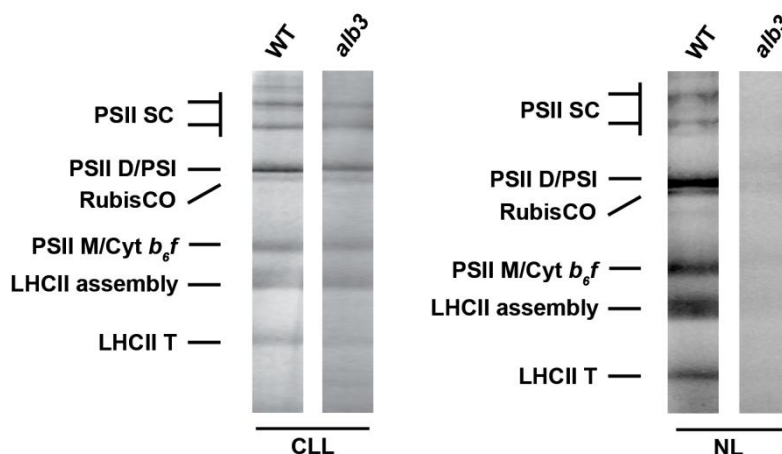


**Abbildung 9:** <sup>35</sup>S-Methionin-markierte *in vivo* Proteinsynthese und Membraninsertion in WT und *alb3*.

A) Extrahierte Membranproteine und lösliche Proteine von WT und *alb3* 20 min nach der Induktion der Proteinsynthese durch eine Starklichtquelle. Das Experiment wurde mit drei Wochen alten, unter CLL- (links) oder NL- (rechts) Bedingungen gewachsenen Pflanzen, durchgeführt. B) und C) <sup>35</sup>S-Markierungsexperimente mit Extension der Inkubationszeit vor der Starklichtquelle auf 40 min bzw. Verkürzung der Zeit auf 5 min für detaillierte Untersuchungen der Proteininsertion in die Thylakoidmembran. Der schwarze Pfeil markiert die LHC-Proteine, der rote die *in vivo* Synthese von PSII-D1. CF1  $\alpha$  und  $\beta$  sind durch den Stern gekennzeichnet. RLSU ist durch einen schwarzen Pfeil in der löslichen Fraktion markiert.

Um einen zeitspezifischen Effekt der Ergebnisse auszuschließen, wurde die Inkubationszeit von CLL-Pflanzen vor der Starklichtquelle auf 40 min verlängert oder auf 5 min reduziert. Auch nach 40-minütiger Synthese konnten die Ergebnisse der 20 min Markierungsexperimente, die unveränderte Synthese des PSII-D1s und die starke Reduktion der LHC-Proteine in *alb3* verglichen zum WT, reproduziert werden (Abb. 9b). Zusätzlich wurden in Experimenten mit 5-minütiger Inkubationszeit, um den Lichtstress für die Pflanzen und die Auswirkungen von Proteindegradationen in Chloroplasten einzuschränken, ebenfalls vergleichbare Ergebnisse zu den Markierungsversuchen nach 20 und 40 min beobachtet (Abb. 9c). Die Insertion von PSII-D1 war kaum, gleichzeitig die LHC-Protein-Membraninsertion nahezu komplett beeinträchtigt.

Neben der Beteiligung von Alb3 an der Insertion der LHC-Proteine in die Thylakoidmembran wird dem Protein eine Funktion während der PSII-Assemblierung zugeschrieben. Da die LHC-Proteininsertion signifikant in *alb3* eingeschränkt war, sollte folgerichtig die Synthese der photosynthetischen Komplexe *in vivo* analysiert werden. Thylakoide wurden aus den <sup>35</sup>S-infiltrierten Pflanzen isoliert und mit einer BN-PAGE die PS-Komplexe gemäß molekularem Masse aufgetrennt. Mutanten, die unter CLL-Konditionen wuchsen, konnten alle PSII-Assemblierungskomplexe (PSII-LHCII-Superkomplex, PSII-Dimer und -Monomer und RC47) neu synthetisieren, inserieren und assemblieren, jedoch unwesentlich reduziert (Abb. 10, links). Die Abwesenheit von Alb3 betraf besonders den frühen LHCII-Trimer, der leicht gegenüber den anderen Intermediaten reduziert war. Demgegenüber wiesen photosynthetische Superkomplexe, in denen die PSII-LHC-Proteine eingegliedert sind, in *alb3* eine vollständige, aber leicht verringerte Assemblierung auf. Konträr dazu waren die PS-Komplexe in extrahierten Thylakoiden von NL-Mutanten nahezu nicht detektierbar (Abb. 10, rechts).



**Abbildung 10:** <sup>35</sup>S-Methionin markierte *in vivo* PSII-Komplexassemblierung in WT und *alb3*.

Isolierte PSII-Komplexe aus der Thylakoidmembran von WT und *alb3*. Zuvor wurden die Pflanzen mit <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein infiltriert und 20 min vor einer Starklichtquelle inkubiert, um die Neusynthese der Komplexe zu induzieren. Thylakoidproteine äquivalent zu 30 µg WT Chlorophyll wurden solubilisiert und durch eine BN-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion der <sup>35</sup>S-markierten Proteine wurde ein Typhoon Scanner verwendet.

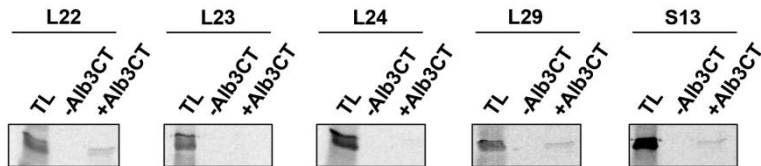


### 3.2. Die Rolle des Alb3 C-Terminus

Mit der Funktion in der post- und cotranslationalen Proteininsertion in die Thylakoidmembran spielt Alb3 eine wesentliche Rolle in der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe. Allerdings werden die potentiellen Bindungsmotive innerhalb Alb3 speziell im C-Terminus während der Interaktion mit cpSRP43 für den Substrattransfer kontrovers diskutiert (Falk und Sinning, 2010; Dunschede et al., 2011; Urbischek et al., 2015). Um die Funktion des Alb3 C-Terminus (A3C) im Detail *in vivo* zu untersuchen, sollte in dieser Arbeit *alb3* mit A3ΔC und Fusionskonstrukten des A3ΔC mit dem C-Terminus von Oxa1 aus *S. cerevisiae* (A3ΔC OXACT) und dem C-Terminus von YidC aus *Synechocystis PCC 6803* (A3ΔC-YidCCT) komplementiert werden. Hierdurch sollte *in vivo* die Signifikanz der Motive I und II des A3C und die funktionelle Komplementation der orthologen C-Termini von Oxa1 und YidC untersucht werden. Darüber hinaus sollte aufgrund der putativen Beteiligung von Alb3 in der cotranslationalen Proteinintegration die Möglichkeit einer ribosomalen Bindung und spezifische posttranslationale Modifikationen des A3Cs analysiert werden.

#### 3.2.1. Die Interaktion von A3C mit plastidären Ribosomen

Aufgrund der putativen Funktion im cotranslationalen Proteinimport durch die dokumentierten Interaktionen mit chloroplastidären Substraten sollte die Bindungsaffinität des A3C zu plastidären Ribosomen untersucht werden. Dies betreffend wurde das mitochondriale Homolog Oxa1 in einer direkten Interaktion mit mitochondrialen Ribosomen dokumentiert (Szyrach et al., 2003). Zur Untersuchung der Bindung plastidärer Ribosomen wurde der A3C heterolog mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag in *E. coli* exprimiert und nach der Aufreinigung für das Experiment wiederum an Ni-Sepharose gekoppelt. Die ribosomalen Untereinheiten L22, L23, L24, L29 (50S Untereinheit) und S13 (30S Untereinheit) wurden zur Markierung *in vitro* in wheat germ extract mit <sup>35</sup>S-Methionin translatiert und zur Interaktionsstudie dem gekoppelten A3C-His<sub>6</sub> zugegeben. Nach mehrmaligem Waschen der Proben mit Waschpuffer wurden der A3C eluiert und die Bindungen durch eine SDS-PAGE analysiert (Abb. 11). Als Negativkontrolle wurden Translationsprodukte mit Ni-Sepharose ohne His<sub>6</sub>-A3C verwendet. Die Proteine L22 und L29 der großen und S13 der kleinen ribosomalen Untereinheit der Chloroplasten konnten mit dem A3C-His<sub>6</sub> co-eluiert werden, während die anderen Proteine der großen ribosomalen Untereinheit L23 und L24 nicht in der Elutionsfraktion zusammen mit A3C detektierbar waren. Dementsprechend interagierten L23 und L24 nicht mit dem A3C.

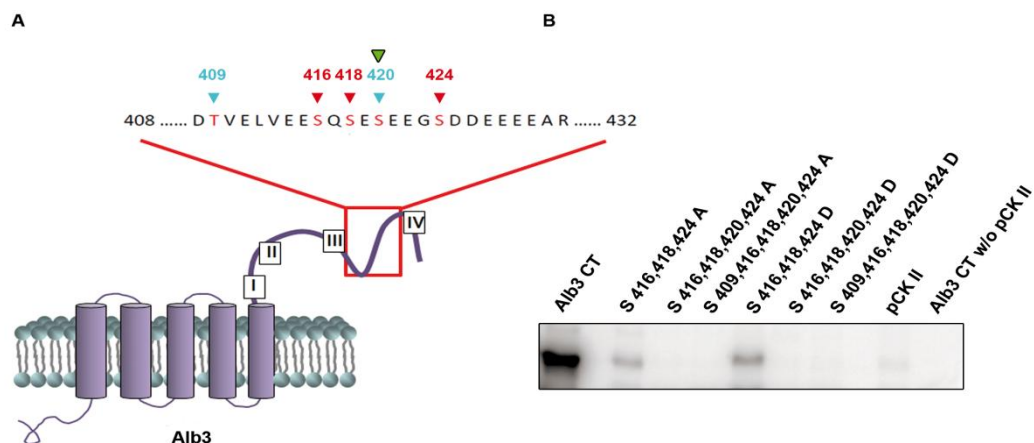


**Abbildung 11: Interaktion des Alb3 C-Terminus mit plastidären, ribosomalen Untereinheiten.**

Für den pull down assay wurde der A3C heterolog mit einem C-terminalen His<sub>6</sub> exprimiert und an Ni-Sepharose gekoppelt. Die ribosomalen Untereinheiten wurden mit <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* translatiert und dem A3C-His<sub>6</sub> zugegeben. Ansätze ohne A3C-His<sub>6</sub> aber mit den ribosomalen Untereinheiten wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Detektion der Interaktionen erfolgten mit dem Typhoon Scanner aufgrund der Radioaktivität. L22, L29 und S13 co-eluierten mit dem A3C.

### 3.2.2. Die posttranslationale Modifikation innerhalb des A3C

Posttranslationale Proteinmodifikationen wie Phosphorylierungen können die Aktivität von Proteinen elementar beeinflussen. In einem peptid microarray von Schönberg et al., 2014 der das Substratspektrum der plastidären Casein Kinase II (pCKII) untersuchte, wurde Alb3 als putatives Substrat der pCKII identifiziert (Schonberg et al., 2014). Nachfolgende Analysen konnten die Sequenz E-X-S-D-D-E mit dem Serin an Position 424 als präferierte pCKII Phosphorylierungsstelle eingrenzen. Ausgehend dieser Initialstudie sollte zunächst die C-terminale Sequenz von Alb3 mit der Datenbank PhosPhAt 4.0 abgeglichen werden. Die Datenbank PhosPhAt 4.0 beinhaltet Informationen über identifizierte Phosphorylierungsstellen in Arabidopsis, die auf massenspektrometrische Analysen beruhen (Heazlewood et al., 2008). Durch den Sequenzabgleich in PhosPhAt 4.0 konnte das von der pCKII präferierte S424 und die von Schönberg et al., 2014 als nicht relevant offerierten S416/418 verifiziert werden (Abb. 12a, rote Pfeile). Daneben wurden zwei zusätzliche Phosphorylierungsstellen, ein Threonin an Position 409 und ein Serin an Position 420, durch das Programm analysiert (Abb. 12a, blaue Pfeile).



**Abbildung 12: Phosphorylierung des A3C durch die plastidäre Casein Kinase II (pCKII).**

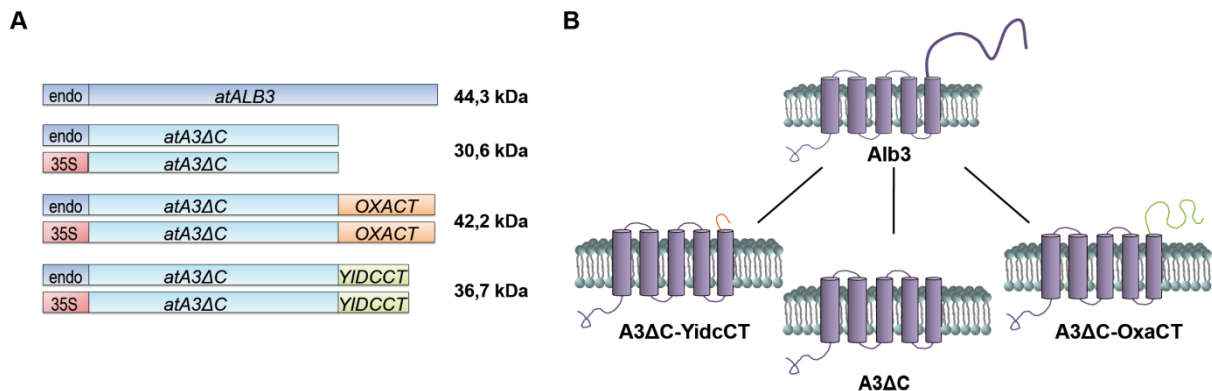
A) Schematische Darstellung des Alb3 C-Terminus mit den fünf hervorgehobenen putativen Phosphorylierungsstellen zwischen Motiv III und IV. Rot markierte Stellen kennzeichnen die von Schönberg et al., 2014 analysierten Phosphorylierungsstellen, blau die von PhosPhat 4.0 durch MS-Daten prognostizierten Stellen. Das zusätzlich im Phosphorylierungsassay analysierte Serin an Position 420 wird durch den grünen Pfeil gekennzeichnet. B) *In vitro* Phosphorylierungsassay des His<sub>6</sub>-A3C mit His<sub>6</sub>-pCKII. Sowohl A3C als auch pCKII wurden heterolog in *E.coli* exprimiert. Als Negativkontrolle wurde His<sub>6</sub>-pCKII ohne A3C bzw. A3C ohne pCKII verwendet. Die Peptide wurden mit <sup>32</sup>P-ATP radioaktiv markiert.

Zur Untersuchung der durch PhosPhAt 4.0 analysierten Phosphorylierungsstellen sollten nachfolgend *in vitro* Phosphorylierungsassays durchgeführt werden. Dazu wurden die vier Serine und das Threonin zwischen den AS 409 bis 409 schrittweise in Gruppen zu Alanin für eine Phosphodeletion oder Asparaginsäure für ein Phosphomimikry mutiert, gefolgt von der heterologen Expression in *E.coli*. Für die Analyse wurde die plastidäre Casein Kinase II mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag exprimiert und anschließend für die Substratphosphorylierung mit den mutierten A3C *in vitro* inkubiert. Zur Kontrolle wurde A3C ohne Kinase als auch pCKII allein in wheat germ inkubiert, um eine potentielle Autophosphorylierung der Kinase detektieren zu können. In den Triplemutanten S416/418/424A und S416/418/424D konnten nach wie vor eine Phosphorylierung detektiert werden, allerdings war dieses Signal schwächer als im A3C (Abb. 12b). Die zusätzlichen Mutationen von S420A respektive S420D zur Generierung der Quadrupelmutanten S416/418/420/424A und S416/418/420/424D führten letztendlich zum Abbruch der Phosphorylierung im A3C und bestätigte die Relevanz des Serins an Position 420 (Abb. 12b und 12a, grüner Pfeil).

### 3.2.3. *In vivo* Charakterisierung der A3C-Funktion

Zur genaueren Untersuchung der Funktion der C-terminalen Region in Alb3 *in vivo* sollten *alb3* mit einem Deletionskonstrukt ohne A3C und zwei Fusionskonstrukten, eines mit dem C-Terminus von Oxa1 aus *S. cerevisiae* und eines mit dem C-Terminus von YidC aus *Synechocystis PCC 680*, komplementiert werden (Abb. 13). Da die Deletion von Motiv III und IV des A3Cs keine signifikante Auswirkungen auf die LHC-Proteininsertion und Komplexassemblierung besaß (Urbischek et al., 2015), sollten ergänzend Motiv I und II deletiert werden (A3ΔC). Dazu wurde ein ALB3-Genfragment amplifiziert, welches für die AS 1-338 des Proteins kodiert und sowohl in den pBGW für die unter dem endogenen ALB3-Promotor kontrollierte Expression (ALB3::A3ΔC) als auch in den pB7FWG2 für die CaMV 35S kontrollierte Expression kloniert (35S::A3ΔC; Abb. 13a). Für die Fusionskonstrukte mit dem Oxa C-Terminus und YidC C-Terminus wurden Genfragmente amplifiziert, die Oxa<sub>302-402</sub> respektive YidC<sub>331-384</sub> kodierten und an A3ΔC fusioniert (A3ΔC-OXACT und A3ΔC-YIDCCT). Auch die Fusionskonstrukte wurden in den pBGW (ALB3::A3ΔC-OXACT und ALB3::A3ΔC-YIDCCT) und in den pB7FWG2 (35S::A3ΔC-OXACT und 35S::A3ΔC-YIDCCT) kloniert. Die C-Termini von Oxa und YidC waren dem A3C strukturell divers und wiesen kaum gemeinsame hoch konservierte Bereiche auf (Anhang Abb. 24). Zusätzlich sollte, ausgehend der Ergebnisse von 3.2.2, *alb3* auch mit einem Konstrukt komplementiert werden, in der die Serine an Position 416, 418, 420 und 424 und das Threonin an Position 409 durch Alanine ausgetauscht wurden (ALB3ST409/416/418/420/424A), um die funktionale Relevanz der Phosphorylierung innerhalb des A3C *in vivo* zu untersuchen. Mit den Konstrukten wurden *A. tumefaciens* transformiert um letztendlich mit den *A. tumefaciens alb3* zu transformieren.

Für die Selektion der Transformanten wurden die Pflanzen mit BASTA behandelt und anschließend propagiert. Zur molekularen Analyse wurde die RNA aus 14 Tage alten Transformanten extrahiert, in cDNA umgeschrieben und per RT-PCR untersucht. Mit dem Alb3 Exon5  *fwd* und den genspezifischen *reverse* Oligonukleotiden *YidCCT rev* und *OxaCT rev* konnten PCR-Produkte in *alb3/A3ΔC-OXACT* und *alb3/A3ΔC-YIDCCT* amplifiziert werden, sowohl in den Transformanten mit dem endogenen als auch dem 35S-Promotor, während die WT cDNA kein Amplifikat ergab (Abb. 14a).

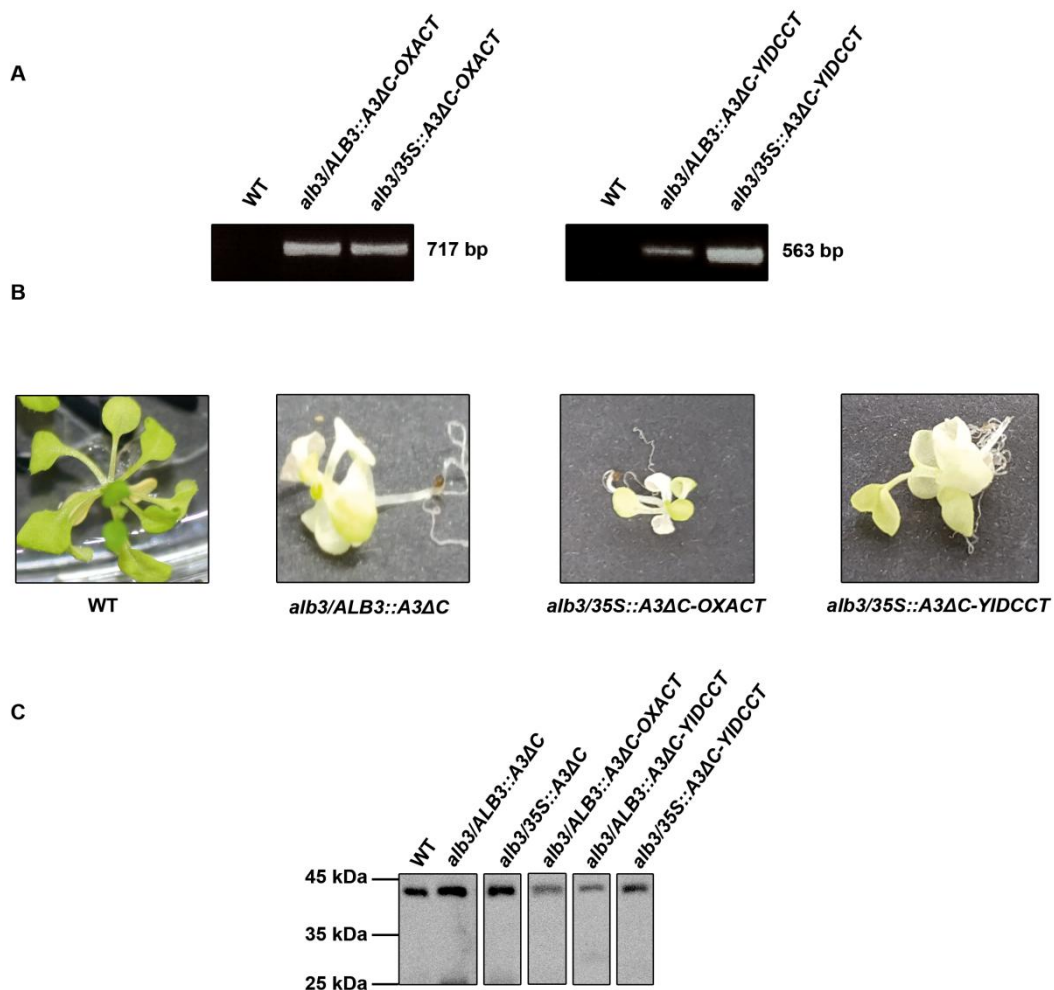


**Abbildung 13: Schematische Darstellung der für die Komplementation von *alb3* genutzten Konstrukte.**

Zur *in vivo* Studie der Funktion von A3C wurde ein C-terminales Deletionskonstrukt von Alb3 (*A3ΔC*) und Fusionskonstrukte mit dem OxaCT von *S. cerevisiae* (*A3ΔC-OXACT*) und YidcCT von *Synechocystis* PCC 6803 (*A3ΔC-YIDCCT*) generiert und *alb3* komplementiert. A) Schematische Darstellung des endogenen *ALB3*-Gens aus *A. thaliana*, des *ALB3*-Deletionsgen ohne C-Terminus (*A3ΔC*) und der Fusionsgene *A3ΔC-OXACT* und *A3ΔC-YIDCCT* mit endogenen *ALB3*- (blau) und 35S-Promotor (rot). Neben den Genen stehen die molekularen Gewichte der Proteine des endogenen Alb3s und die theoretischen Massen der generierten Konstrukte. B) Schematische Abbildung der generierten Konstrukte auf Proteinebene zu Verdeutlichung der C-terminalen Unterschiede.

Aufgrund der BASTA-Selektion und der positiven RT-PCR schien die Transformation von *alb3* mit allen Konstrukten erfolgreich gewesen zu sein. Dementgegen zeichnete sich die zweite Generation der Transformanten, die auf ½ MS Zucker-Agarplatten wuchsen, durch keine spezifischen und einheitlichen Phänotypen aus. Sowohl für die unter dem 35S-Promotor kontrollierten wie auch für die endogenen Promotoren wurden bleiche und grüne Pflanzen beobachtet (Abb. 14b, Beispiel für putativ homozygote *alb3/ALB3::A3ΔC*, *alb3/35S::A3ΔC-OXACT* und *alb3/35S::A3ΔC-YIDCCT*). Diese albinotischen Phänotypen würden, wenn homozygot, auf eine essentielle Funktion des A3C hinweisen, die nicht durch homologe C-Termini des Oxa1 und Yidc komplementiert werden könnte.

Da die Transkription der Konstrukte erfolgreich war, sollte anschließend die Translation der Proteine in den Komplementanten untersucht werden, um verifizieren zu können, dass sich die Phänotypen durch die Komplementation mit *A3ΔC*, *A3ΔC-OXACT* und *A3ΔC-YIDCCT* ausgeprägten.



**Abbildung 14: Komplementation heterozygoter *alb3* mit *A3ΔC*, *A3ΔC-OXACT* und *A3ΔC-YIDCCT*.**

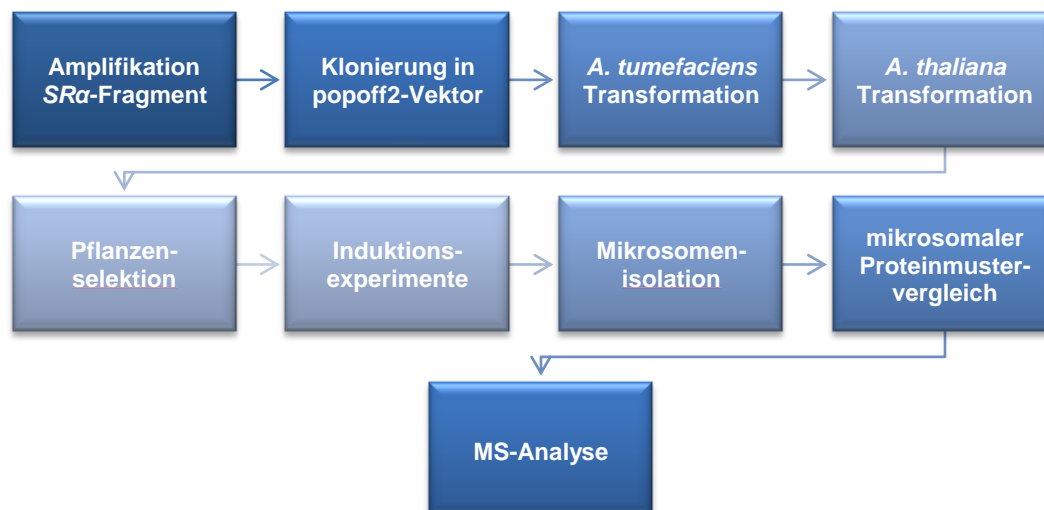
A) RT-PCR mit den Oligonukleotiden *Alb3 Exon5 fwd* und *OxaCT rev/ YidCCT rev* auf cDNA aus 14 Tage alten WT und selektierten Komplementanten. Die RNA wurde in den Pflanzen transkribiert. B) Phänotypen putative homozygoter *alb3/alb3::A3ΔC*, *alb3/35S::A3ΔC-OXACT* und *alb3/35S::A3ΔC-YIDCCT*. Die Genexpression wurde sowohl durch den endogenen *ALB3*- als auch 35S-Promotor kontrolliert. Die Pflanzen wuchsen 21 Tage heterotroph auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit 1% Zucker unter Normallicht mit 16/8 Tag-Nacht-Rhythmus ( $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). C) Immunoblotanalyse der komplementierten Mutanten. Membranproteine aus WT und *alb3*-Komplementanten wurden isoliert, aufgetrennt und mit dem spezifischen *Alb3*-Antikörper detektiert. Das SDS-Gel wurde mit 20  $\mu\text{g}$  Membranproteinen beladen, die Proteine anschließend auf eine Membran transferiert und mit  $\alpha$ -*alb3* immunodekoriert.

Dazu wurden aus den Komplementanten Membranproteine extrahiert, per SDS-PAGE separiert, auf eine Membran transferiert und mit dem *Alb3*-spezifischen Antikörper immunodekoriert. Da der *Alb3*-Antikörper spezifisch gegen den ersten stromalen *loop* des Proteins war, sollten die Fusionsproteine und das *A3ΔC* detektiert werden. Als Kontrolle wurden WT-Membranproteine verwendet, in denen das endogene *Alb3* auf der Höhe von 44,3 kDa detektiert werden konnte (Abb. 14c). In den Membranproteinen der komplementierten Pflanzen *alb3/A3ΔC-OXACT* und *alb3/A3ΔC-YIDCCT* konnte das *A3ΔC*-OxaCT mit einer theoretischen Masse von 42,2 kDa und das *A3ΔC*-YidcCT mit einer Masse von 36,7 kDa sowohl in den 35S- als auch in den endogen kontrollierten Transformanten nicht detektiert werden (Abb. 14c). Wie auch in den 35S- und endogen kontrollierten *alb3/A3ΔC* (theoretische Masse von 30,6 kDa) wurde in *alb3/A3ΔC-OXACT* und

*alb3/A3ΔC-YIDCCT* ausschließlich das im WT beobachtete endogene Alb3 mit dem Antikörper detektiert. Zusammenfassend zeigen die zugrunde liegenden Daten zwar eine erfolgreiche Transformation der *alb3*, die RNA transkribieren, jedoch das A3ΔC und die Fusionsproteine A3ΔC-OxaCT und A3ΔC-YidcCT nicht in den Pflanzen exprimieren. Für die Komplementation von *alb3* mit dem *ALB3ST409/416/418/420/424A* zur Untersuchung der Funktion der Phosphorylierung im C-Terminus von Alb3 konnte trotz dreimaliger Wiederholung der Transformation von *A. thaliana* keine Komplementation erreicht werden.

### 3.3. Der Proteinimport in das ER von *A. thaliana*

Die Proteintranslokation in das endoplasmatische Retikulum der Pflanzen ist bis heute ein weitestgehend unerforschtes Gebiet der Pflanzenwissenschaft. Neben dem post-translationalen Proteinimport können Proteine auch cotranslational transloziert werden. Cotranslationale Substrate werden mit Hilfe des SRP-RNC-Komplexes zum membranständigen SR-Rezeptor transportiert, wo sie infolgedessen zeitgleich translatiert und über das Kanalprotein sec61 importiert werden (Ast und Schuldiner, 2013).



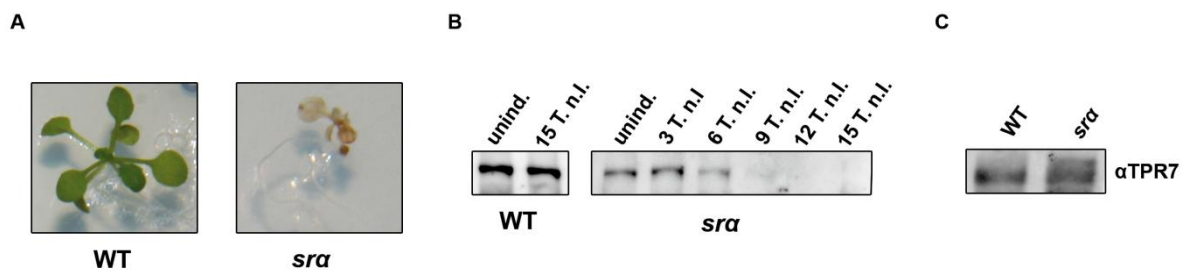
**Abbildung 15: Flussschema zur Identifizierung posttranslational importierter Substrate des ERs.**

Zur Analyse posttranslational importierter Substrate sollte eine stabile und mit Dexamethason induzierbare *A. thaliana* RNAi-knockdown Mutante der SRα-Untereinheit des SR-Rezeptors generiert werden, in der die cotranslationale Proteintranslokation runter reguliert werden konnte. Dadurch sollten in der Mutante primär nur posttranslationale Proteine in die Mikrosomen importiert werden können. Durch den Vergleich der Proteinmuster mikrosomaler Proteine aus WT und *sra* sollten mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen Rückschlüsse auf posttranslationale Substrate gezogen werden.

Aufgrund der fehlenden Forschung in diesem Teilgebiet sind nur wenige Informationen darüber vorhanden, welche Proteine über welchen Translokationsweg in das ER transportiert werden. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht werden, putative Substrate der posttranslationalen Translokation in das ER durch einen spezifischen *knockdown* des cotranslationalen Weges zu identifizieren. Die zur Substratanalyse durchgeführten Schritte sind in Abbildung 15 dargestellt.

### 3.3.1. Der *knockdown* der cotranslationalen Translokation durch SR $\alpha$

Zur Identifizierung putativer Substrate des posttranslationalen Weges *in vivo* sollte eine induzierbare RNAi-*knockdown* Mutante der  $\alpha$ -Untereinheit des SR-Rezeptors im cotranslationalen Importweg generiert werden. Infolge der Interferenz des cotranslationalen Proteinimports sollte die Mutante primär posttranslationale Substrate im ER akkumulieren. Dazu wurde ein 420 bp-Fragment mit den Basen 301 bis 720 des SR $\alpha$  amplifiziert, in den popoff2-Vektor kloniert und mit Hilfe von *A. tumefaciens* stabile *A. thaliana* Linien generiert (Abb. 15). Nach der Transformation wurden die *A. thaliana* auf  $\frac{1}{2}$  MS-Zucker Agarplatten mit 20  $\mu$ M Hygromycin selektiert und im Anschluss propagiert. Zur Analyse des RNAi-Systems wuchsen die *sra* heterotroph auf  $\frac{1}{2}$  MS-Zucker Agarplatten mit 10  $\mu$ M Dexamethason, dem Induktor der RNA-Interferenz. Als Kontrolle wurden analog WT-Pflanzen auf identische Agarplatten kultiviert. Im Keimlingsstadium (ca. 7 Tage) wies *sra* einen albinotischen Phänotypen auf (Abb. 16a). Die Keimblätter waren durch die Abwesenheit von Chlorophyll weiß. Im Gegensatz zur *sra* prägten WT auf Dexamethason keine spezifischen Merkmale aus. Die ersten richtigen Blätter nach ca. 14 Tagen ließen, wie schon die Keimblätter, den albinotischen Phänotyp erkennen. Die Wurzeln waren normal ausgeprägt, im Vergleich zum WT jedoch kleiner, was wohl dem Wachstumsrückstand geschuldet war, der in *sra* beobachtet werden konnte. Während der WT nach ca. 4 Wochen begann Organe für die Reproduktion zu entwickeln, stagnierte die Entwicklung der *sra*-Mutante im 6-Blatt-Stadium.



**Abbildung 16: Phänotyp und Charakterisierung der RNAi-*knockdown* *sra*-Mutante.**

A) Phänotyp von *sra* und WT, die auf  $\frac{1}{2}$  MS Medium-Zucker-Agarplatten mit der Zugabe von 10  $\mu$ M Dexamethason drei Wochen wuchsen. B) Immunoblotanalyse des SR $\alpha$ -Proteingehalts in WT und *sra* mit dem spezifischen SR $\alpha$ -Antikörper. 20  $\mu$ g Membranproteine aus WT und *sra*-Hydrokulturen wurden extrahiert, mit einer SDS-PAGE separiert und SR $\alpha$  detektiert. Proben vor und nach Induktion mit Dexamethason wurden analysiert. C) Immunoblotanalyse von 15 Tagen nach Induktion Proben des WT und der *sra*-Mutante mit dem TPR7-spezifischen Antikörper.

Angesichts der frühzeitigen Letalität der *sra* und um zu ermöglichen das RNAi-System erst zu einem späteren Stadium zu induzieren, wurden sämtliche Experimente mit der RNAi-Mutante in Hydrokulturen durchgeführt, welche flüssiges MS-Medium mit Zucker beinhalteten. Das Dexamethason wurde erst nach sieben Tagen dem Medium zugeführt, so dass sich *sra* anfänglich normal entwickeln konnten. Der beobachtete Phänotyp in Abb. 16a konnte auch in den *sra*-Hydrokulturen reproduziert werden, allerdings ca. eine Woche nach Induktion. Zur Verifikation einer Korrelation des Phänotyps mit der Reduktion

des SR $\alpha$ -Proteingehalts nach der Induktion, wurde eine Immunoblotanalyse mit dem spezifischen Antikörper gegen SR $\alpha$  durchgeführt (Abb. 16b). Dazu wurden WT und *sra* wie beschreiben in Hydrokulturen kultiviert und zweimal mit Dexamethason nach je sieben Tagen induziert. Proben wurden vor der Induktion und zu mehreren Zeitpunkten nach der Induktion entnommen. In WT-Membranproteinen wurde sowohl vor als auch 15 Tage nach der Induktion mit Dexamethason SR $\alpha$  identische Mengen detektiert (Abb. 16b). Konträr dazu konnte das Rezeptorprotein zwar vor der Induktion und bis zu sechs Tagen nach Induktion in der *sra* ermittelt werden, nach neun Tagen dagegen war das Proteinlevel unter dem Nachweisniveau (Abb. 16b). Somit konnte der Zeitpunkt, in dem das SR $\alpha$  auf ein Minimum reduziert war, auf neun Tage nach Induktion fixiert werden. Zur Kontrolle ob die Interferenz des SR $\alpha$  Auswirkungen auf Proteine der posttranslationalen Proteininsertion der ER-Membran besaß, wurde der Proteingehalt von TPR7 mit dem spezifischen Antiserum in 15 Tage Nachinduktionsproben ermittelt (Abb. 16c). Dabei konnte in *sra* eine vergleichbare Quantität wie in WT nachgewiesen werden und eine Beeinflussung ausgeschlossen werden.

### 3.3.2. Charakterisierung mikrosomaler Fraktionen aus *sra*

Um spezifisch posttranslational transportierte Proteine zu identifizieren, sollten aus 21 Tage alten Hydrokulturen der WT und *sra*, die für 14 Tage mit Dexamethason induziert wurden, die mikrosomalen Fraktionen isoliert werden. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da *sra* sich zuerst normal entwickeln sollten, neun Tagen nach Induktion die Proteinmenge von SR $\alpha$  unter dem Nachweisniveau lag (Abb. 16b) und dadurch die Wahrscheinlichkeit eines defizitären cotranslationalen Proteinimports am höchsten sein sollte. Die Isolation der Mikrosomen wurde mit einem Saccharosestufengradienten mit Konzentrationen von 15%, 30% und 50% durchgeführt, um mögliche plastidäre Kontaminationen zu reduzieren. Zur Untersuchung der Kontaminationen wurden 20  $\mu$ g Mikrosomen durch eine SDS-PAGE separiert, die Proteine auf eine Membran transferiert und die Proteine mit den Antikörpern gegen Tom40 und Lhcb1 immunodekoriert. Trotz des Gradienten wurden jedoch in der isolierten Fraktion Proteine aus den Chloroplasten und Mitochondrien detektiert (Abb. 17). So waren Tom40 als mitochondriales und Lhcb1 als chloroplastidäres Markerprotein in *sra* in vergleichbaren Mengen wie im WT detektierbar.

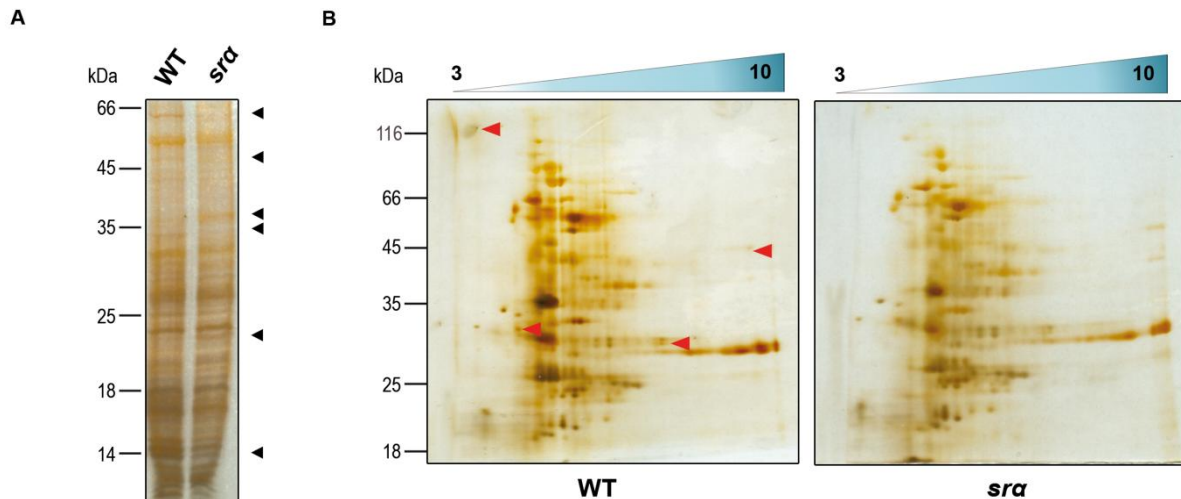


**Abbildung 17: Untersuchung plastidärer Kontaminationen in *sra* Mikrosomen.**

Für die Analyse wurden 20  $\mu$ g WT und *sra* Mikrosomen aus Dexamethason induzierten Pflanzen separiert, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörper gegen Tom40 und Lhcb1 immunodekoriert. Sowohl Tom40 als auch Lhcb1 waren in der Mutante in vergleichbaren Quantitäten zum WT zu finden.



Nachfolgend sollten die Proteine aus den Mikrosomen extrahiert und analysiert werden. Dazu wurden die mikrosomalen Fraktionen delipidiert und Proteine auf Basis einer Acetonfällung präzipitiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE analysiert und zur Visualisierung gering konzentrierter Proteine durch eine Silberfärbemethode angefärbt. In den präzipitierten Proteinen aus *sra*-Mikrosomen konnten deutliche Unterschiede im Vergleich zum WT ermittelt werden (Abb. 18a).



**Abbildung 18: Vergleich mikrosomaler Proteine von WT und *sra* RNAi-Mutante.**

A) Präzipitierte Proteine aus 21 Tage alten WT- und *sra*-Mikrosomen. Die mikrosomalen Fraktionen wurden delipidiert, separiert und per Silberfärbung visualisiert. Signifikante Unterschiede konnten in den akkumulierten Proteinen von *sra* ermittelt werden. B) Präzipitierte Gesamtproteine in einer zweiten, denaturierenden Dimension. Zuvor wurden die Gesamtproteine durch eine IEF gemäß ihrem isoelektrischen Punkt separiert. Der pH-Gradient von 3-10 der IEF wird durch den blauen Gradienten dargestellt.

So waren in *sra* Proteine im höheren molekularen Bereich (Abb. 18a, Pfeil 1 v.o.) in geringerer Quantität als im WT vorhanden. Im Gegensatz dazu konnten aber auch Proteine bei ca. 36 kDa bzw. 22 kDa (Abb. 18a, Pfeil 3 und 5 v.o.) beobachtet werden, die vermutlich durch den *knockdown* des cotranslationalen Imports hochreguliert waren. Interessanterweise waren aber auch die Mengen der Proteine in der Mutante bei ca. 15 kDa (Abb. 18a, Pfeil 6 v.o.) signifikant runter reguliert. Zusätzlich zur Analyse der Proteine auf Basis der molekularen Größe wurden die präzipitierten mikrosomalen Proteine auch zuerst durch eine isoelektronische Fokussierung hinsichtlich des isoelektronischen Punktes von pH 3 bis 10 separiert, um im Anschluss wiederum in einer zweiten Dimension per SDS-PAGE hinsichtlich der molekularen Masse untersucht zu werden. Hierzu wurden die Proteine zuerst durch eine isoelektronische Fokussierung im pH-Bereich 3-10 entsprechend ihres isoelektronischen Punktes und im Anschluss gemäß des molekularen Gewichts per SDS-PAGE separiert. Analog zur ersten Dimension waren auch in der zweiten Dimension Unterschiede zu erkennen (Abb. 18b). Im niedrigen pH-Bereich konnten zwei Proteine, eines im hoch- und eines im niedermolekularen Bereich, im WT aber nicht in *sra* identifiziert werden. Sowohl im intermediären als auch im basischen pH Bereich wurden ebenfalls Proteine detektiert, die exklusiv in den präzipitierten WT-Mikrosomproteinen nachweisbar waren.

### 3.3.3. Identifizierung posttranslational importierter Proteine des ERs

Zur genauen Identifizierung der posttranslationalen Substrate sollten Proteine, die in der ersten Dimension (3.3.2) in *sra* signifikante Differenzen in der Proteinquantität vorwiesen, mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert werden. Dazu wurden die selektierten Proteingelbanden spektrometrisch untersucht, erhaltene Peptide geclustert und Proteinen zugeordnet, die wiederum dann manuell den verschiedenen Zellkompartimenten eingruppiert wurden. Nachdem plastidäre Proteinkontaminationen aus den massenspektrometrischen Ergebnissen selektiert wurden, konnten aus den Peptiden letztlich sieben putative posttranslationale Substrate des ERs ermittelt werden (Tab. 6). Darunter fielen PYK10, welches in ER lokalisiert wurde (Matsushima et al., 2003), Typ I Prohibitin PHB3, das Aquaporin TIP1/2 und das molekulare Chaperon BIP3. Darüber hinaus wurden auch die vakuoläre ATP-Synthase Untereinheit A, die im *trafficking* involvierte GDLS-like Lipase/Acylhydrolase (Jancowski et al., 2014) und das potentiell mit PYK10 interagierende Protein PBP1 durch die MS identifiziert. Diese Proteine stehen nun für weitere zukünftige Experimente, wie z.B. Proteinimporte in das ER, zur Verfügung.

**Tabelle 6: Durch die Massenspektrometrie identifizierte Proteine des posttranslationalen Imports**

GenID	Symbol	Proteinname	~MW (kDa)	Lokalisierung	Referenz
AT3G09260.1	PYK10	Glycosylhydrolase Superfamilyprotein	59.7	ER	Matsushima et al., 2003
AT5G40770.1	PHB3	Prohibitin 3	30.4	ER/ Mito.	Christians und Larson, 2007
AT3G26520.1	TIP1	Tonoplast intrinsisches Protein	25.8	Tonoplast	Schüssler et al., 2008
AT1G09080.2	BIP3	Heatshockprotein70 Familyprotein	75.2	ER	Nishikawa et al., 2005
AT1G78900.2	VHA-A	Vacuolar ATP-Synthase subunit A	68.8	Vakuole	
AT3G16420.3	PBP1	PYK10-bindingprotein1	32.2	ER	Nagano et al., 2005
AT1G54010.1	GLL23	GDLS-like Lipase/Acylhydrolase Superfamilyprotein	43.1	ER	Jancowski et al., 2014

## 4. Diskussion

### 4.1. Alb3 in der Biogenese und Erhaltung der PS-Komplexe

Photosynthetische Proteine werden sowohl im Nukleus als auch in den Plastiden synthetisiert und müssen letztlich in die Thylakoidmembran inseriert und assembliert werden. Viele Faktoren unterstützen diesen Assemblierungs- und Insertionsmechanismus, einer davon ist das Alb3. Dieser Faktor wurde erstmal 1997 durch eine Deletionsmutante charakterisiert und offenbarte abnormale chloroplastidäre Strukturen, die sich dementsprechend auf den Phänotypen auswirkten (Sundberg et al., 1997). In den letzten zwei Jahrzehnten wurden für Alb3 zahlreiche Interaktionen und Funktionen dokumentiert, darunter Interaktionen mit putativen Substraten aber auch Komponenten anderer Translokasen, die auf eine Beteiligung in der post- wie auch cotranslationalen Thylakoidmembraninsertion hindeuten (Klostermann et al., 2002; Pasch et al., 2005; Benz et al., 2009). Dabei scheint der C-Terminus im posttranslationalen Insertionsweg mit seinen vier positiv geladenen Motiven in der Interaktion mit cpSRP43 wichtig zu sein. Allerdings werden die Motive II und IV und ein potentiell Motiv im letzten luminalen loop während der Interaktion mit cpSRP43 bis heute kontrovers diskutiert (Falk et al., 2010; Dunschede et al., 2011). Angesichts der überwiegend *in vitro* durchgeführten Experimente sollte in dieser Arbeit die Bedeutung des Alb3s aber auch spezifisch des A3Cs *in vivo* analysiert werden. Ferner wurde aufgrund des lichtbedingten Phänotyps und der PS-Komplexformation von *alb3ΔC* auch *alb3* unter CLL- und NL-Konditionen im Detail untersucht, um Aufschluss über die tatsächliche Funktion des Alb3s zu erlangen (Urbischek et al., 2015).

#### 4.1.1. Der A3C wird durch pCKII posttranslational modifiziert

Die Phosphorylierung von Proteinen fungiert als Regulation biologischer Prozesse in Zellen, insbesondere in der Kontrolle von Protein-Protein Interaktionen. In einer vorangegangenen Studie von Schönberg et al., 2014, die sich mit dem Substratspektrum der pCKII befasste, wurde im *peptide microarray* ChloroPhos1.0 neben anderen putativen Substratproteinen auch Alb3 identifiziert. Durch Mutation der putativen Phosphorylierungsstellen im Alb3, die die Serine an Position 416, 418 und 424 umfassten, wurde letztlich die Sequenz E-X-S-D-D-E mit dem S424 als präferiertes pCKII-Modifikationsmotiv analysiert (Schönberg et al., 2014). Ausgehend von dieser Initialstudie wurden auf Basis der Datenbank PhosPhAt 4.0 die A3C Sequenz auf Phosphorylierungsstellen verglichen und anschließend *in vitro* durch Mutationsstudien analysiert (Heazlewood et al., 2008). Neben den S416/418/424 analysierte PhosPhAt 4.0 zusätzlich ein Threonin an Position 409

und das S420, welches in einem putativen Phosphorylierungsmotiv mit sauren AS an Position 21 und +1 bis +2 bezüglich des Serinrests war (Abb. 19). Obendrein führte die Mutation des zuvor dem pCKII zugeschriebenen präferierten S424 zusammen mit S416 und S418 zu Alanin (A3C S416/418/424A) zu keiner Inhibition der Phosphorylierung und wurde durch His<sub>6</sub>-pCKII weiterhin phosphoryliert, wenngleich reduziert. Gleiches konnte für die phosphomimische SD-Mutante beobachtet werden. Erst die zusätzliche Mutation des S420 war letztlich phosphodefizitär und verifiziert eine weitere Präferenz vom pCKII innerhalb des A3C (Abb. 12b). Schon Schönberg et al. konnte eine Restphosphorylierung des Alb3 S424A mit dem rekombinanten MBP-tagged-pCKII, nicht aber mit dem His-tagged-pCKII beobachten und schlussfolgerte daraus eine ausschließlich selektive Phosphorylierung des E-X-S-D-D-E in Alb3 (Schonberg et al., 2014). Aufgrund der Nutzung der His-tagged-pCKII und das letztliche Phosphodefizit durch die zusätzliche Mutation des S420 bestätigt die Relevanz an dieser Position. Eine funktionale *in vivo* Analyse der Phosphorylierung durch die Komplementation von *alb3* mit Alb3 ST409/416/418/420/424A konnte aufgrund der fehlenden Komplementation nicht durchgeführt werden. Indes resultierte *alb3ΔC*, in der die letzten 75 AS deletiert waren, die auch die Phosphorylierungsstellen umfassten, unter  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mit einem 16h/8h Tag-Nacht-Rhythmus gewachsen in einem drastischen albinotischen Phänotyp (Urbischek et al., 2015). Unter geringerer Lichtintensität von  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurden jedoch die LHC-Proteine in die Thylakoidmembran inseriert und Komplexe assembliert. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint die Phosphorylierung einerseits Einflüsse auf die Proteininsertion durch die fehlende Interaktion mit dem cpSRP43 besitzen zu können. Andererseits könnte aber auch die Instabilität des Proteins der Unfähigkeit mit putativen Stabilisierungsproteinen zu interagieren, geschuldet sein, was letztlich zur partiellen Degradation des Alb3s führt. Welche Rolle die Phosphorylierung des C-Terminus dabei spielt, müssen weitere Studien belegen.

#### 4.1.2. Der A3C interagiert mit plastidären ribosomalen Proteinen

Durch *in vitro* pull down assays wurde die Fähigkeit der C-terminalen Region des Alb3 Proteins untersucht, Ribosomen zu binden. Vergleichbare ribosomale Interaktionen wurden zuvor den homologen Proteinen YidC und Oxa1 nachgewiesen (Szyrach et al., 2003; Kohler et al., 2009; Geng et al., 2015). So führte eine Deletion der C-terminalen Matrixdomäne des Oxa1 im Mitochondrium zu einem defizitären Atmungskettenkomplex, in der für die mitochondrial kodierte Untereinheit zwei der Cytochromoxidase (Cox2) ein Insertionsdefekt nachgewiesen wurde (Szyrach et al., 2003). In Folge dessen konnte Oxa1 in ribosomalen Fraktionen identifiziert werden, während die C-terminale Mutante des Oxa1 nicht mit den Ribosomen assoziiert war (Szyrach et al., 2003). Zugleich wurde auch dem für den im Vergleich zum Alb3 und Oxa1 kurzen YidC C-Terminus eine essentielle

Funktion in der Ribosombindung zugeschrieben, dessen Deletion allein allerdings nicht zu einem kompletten Abbruch der Bindung führte (Geng et al., 2015). YidC inkludiert einen zusätzlichen positiv geladenen zytosolischen Loop C2, der zusammen mit dem C-Terminus die ribosomale Proteininteraktion vermittelt (Geng et al., 2015). Zur Investigation der putativen Interaktion vom Alb3 C-Terminus wurden einzelne ribosomale Proteine der großen Untereinheit (L22-L29) und das S13 der kleinen Ribosomuntereinheit <sup>35</sup>S-markiert translatiert und zusammen mit dem heterolog exprimierten His<sub>6</sub>::A3C inkubiert. Damit konnten Interaktionen mit den ribosomalen Proteinen L22, L29 und S13 detektiert werden, nicht aber mit den L23 und L24 (Abb. 11). Topologisch sind die Proteine L22 und L29 dem Exit-Tunnel der 50S-Untereinheit zugeordnet und würden eine direkte Übernahme der naszierenden Polypeptidkette ermöglichen (Sharma et al., 2007). Demgegenüber steht die Bindung des S13, ein Protein der 30S-Untereinheit, welches von dem Exit-Tunnel topologisch isoliert liegt. Die Interaktion des A3Cs mit dem S13 könnte eine additive stabilisierende Funktion repräsentieren. Keine Interaktion konnte mit L23 und L24 nachgewiesen werden, die ebenfalls in Reichweite des Exit-Tunnels sind, wobei L23 direkt dem Tunnel assoziiert ist. Dies ist ungewöhnlich, da eine Interaktion mit dem L23 und L24 für die homologen Oxa1 und YidC neben der Interaktion mit den konservierten rRNA Helices 24 und 59 durch Cryo-EM Studien dokumentiert werden konnte (Kohler et al., 2009). Interessanterweise bilden Oxa1 und YidC während der Interaktion mit den Ribosomen Homodimere, welche anscheinend durch die Bindung der Ribosomen stabilisiert werden (Kohler et al., 2009). Tatsächlich deutet die Studie von Dünschede et al., 2011 auf eine Dimerisierung von Alb3 hin und würde eine Funktion als Dimer in der cotranslationalen Proteininsertion mit ribosomalen Interaktionen unterstützen (Dünschede et al., 2011). Zudem kann eine Beteiligung luminaler Alb3-Loops in der Ribosombindung, wie es in YidC nachgewiesen wurde, aufgrund des durchgeführten pull down assays mit dem A3C nicht ausgeschlossen werden. Eine ergänzende Bindung des L23 und L24 könnte so durch diesen Loop vermittelt werden. Allerdings wurde auch für das mitochondriale Homolog Oxa1 wie für Alb3 bisher keine Beteiligung eines Loops in der Bindung der Ribosomen dokumentiert. Interessanterweise beinhalten beide Proteine eine Elongation der C-terminalen Region, die in YidC fehlt. Evolutionär betrachtet könnte dies eine funktionelle Weiterentwicklung der C-Termini von Alb3 und Oxa1 bedeuten. Diese C-terminale Elongation in Oxa1 formt während der Interaktion mit den Ribosomen eine  $\alpha$ -helikale Domäne, um die Interaktion mit den mitochondrialen Ribosomen zu ermöglichen (Szyrach et al., 2003). Vergleichbare Strukturen weist der in Lösung intrinsisch ungeordnete A3C während der Interaktion mit dem cpSRP43 auf, welche dementsprechend auch die ribosomale Bindung unterstützen könnte (Falk et al., 2010; Falk und Sinning, 2010).

### 4.1.3. Die Bindung von cpSRP43 am A3C bleibt kontrovers

Abgesehen von der Bindung ribosomaler Proteine umfasst der C-Terminus von Alb3 durch die Interaktion mit dem cpSRP43 auch eine Funktion im posttranslationalen Substrattransfer, gleichwohl die beteiligten Motive innerhalb des C-Terminus kontrovers diskutiert werden (Falk et al., 2010). Vier positiv geladene Motive befinden sich im A3C in höheren Pflanzen, die alle konserviert sind (Falk et al., 2010). Motiv I umfasst AS 340 bis 362, Motiv II von 369 bis 378, Motiv III von 385 bis 403 und Motiv IV von 451 bis 461 (Abb. 19).

		339		369		385				
		↓	Motiv I	↓	Motiv II	↓	Motiv III			
<i>A. thaliana</i>	339	LTNNVLSTAQQV	YLRKLGGAKP	NMDENASK	IISAGRAKRS	IAQPDDA	GERFRQLKEQEKRSKKNK	403		
<i>V. vinifera</i>	329	FTNNVLSTAQQV	WLRKLGGAKP	VVNEDASG	IITAGRAKRS	ASQPARA	GDRFRQLKEEKKKISK	393		
<i>P. sativum</i>	317	FTNNVLSTQVV	WLRKLGGAAP	AVNENAGG	IITAGQAKRS	ASKPEKG	GERFRQLKEEKKKLIK	381		
							↓			
			Phospho.				Motiv IV			
<i>A. thaliana</i>	404	AVAKD	<u>I</u> VELVEE	SQSE	EEGSDDE	- - -	EEEAREGALASSTTSKPLPEVGQ	RRSKRSKRKR	TV-	462
<i>V. vinifera</i>	394	ALPAEEIQALA	-	SESD	DEGSDDEE	T K	DKGDDVLEEAYVSSGSKQVPQYAGP	RRSKRSKRKR	AG-	455
<i>P. sativum</i>	382	ALPVEEVQPLA	-	SAS	NDGSDVE	-	NNKEQEVTEESNTSKVSQEVQSFRE	RRSKRSKRKP	VA-	442

**Abbildung 19: Sequenzvergleich von A3C verschiedener Pflanzen (modifiziert nach Falk et al., 2010).**

Multipler Sequenzvergleich des Alb3 C-Terminus von *A. thaliana*, *V. vinifera* und *P. sativum*. Vier konservierte, positiv geladene Motive (Motiv I-IV) sind in allen Pflanzen vorhanden. Aminosäuren in blau zeigen die konservierten Motive, die zusätzlich jeweils noch durch die blauen Flächen gekennzeichnet sind. Rot markierte AS und Flächen kennzeichnen die Phosphorylierungsstellen. Das zusätzlich in *A. thaliana* vorhergesagte Threonin an Position 409 ist rot unterstrichen. Die blauen Pfeile mit den dazugehörigen AS-Positionen stellen die Startposition der Motive in *A. thaliana* dar.

Mit Hilfe von Gelfiltration, isotherme Titrationskalorimetrie und pull-down Experimenten konnten Motiv II und IV als Bindungsmotiv des cpSRP43 identifiziert werden (Falk et al., 2010). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Dünschede et al., 2011, die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Pepscan für die Analyse der cpSRP43-Bindemotive verwendeten und ein mit dem Motiv II überlappendes Motiv zwischen AS 374 und 388 identifizierten (Dünschede et al., 2011). Ein zweites analysiertes Motiv verifiziert nicht Motiv IV sondern war eingebettet in der Membran zwischen AS 314 und 318 und umfasst die Theorie einer homodimeren Membranpore durch Alb3 (Dünschede et al., 2011). Eine putative Dimerisierung von Alb3 vermuteten schon Pasch und Kollegen 2005 durch die in einem *yeast-split-ubiquitin* erhaltenen Daten (Pasch et al., 2005). Die Irrelevanz des Motivs IV wurde durch eine *in vivo* Studie von Urbiscek et al., 2015 unterstützt, in der *alb3ΔC*, eine Deletionsmutante ohne die positiven Motive III und IV, unter CLL-Bedingungen LHC-Proteine akkumulierte und höhere Komplexe assemblierte (Urbiscek et al., 2015). Angesichts dieser *in vivo* Daten würden das Motiv II und das putative membraneingebettete Motiv für die cpSRP43 Interaktion und LHC-Proteine Insertion ausreichend sein.

In dieser Arbeit sollte mit einer Komplementationsstudie von *alb3* die Relevanz des C-Terminus weiter *in vivo* analysiert werden. Dazu wurde *alb3* mit einem Deletionskonstrukt ohne C-Terminus und mit Fusionskonstrukten, die die homologen C-Termini von Oxa1 und YidC umfassten, komplementiert. Anlässlich des im Vergleich zum Alb3 verkürzten C-Terminus wurde keine Komplementation durch YidC erwartet, obwohl reziprok eine YidC defizitäre Mutante durch Alb3 funktional komplementiert werden konnte (Jiang et al., 2002). Dabei scheint der kurze und weniger positiv geladene YidC C-Terminus durchaus für die Proteininteraktion ausreichend zu sein, da funktional überlappende Aufgaben zum Oxa1 C-Terminus erfüllt werden. Andererseits wurde durch eine Fusion einer verlängerten C-terminalen Struktur von *Rhodospirellula baltica* und *Oceanicaulis alexandrii* zum kurzen *E.coli* YidC C-Terminus die Substrataffinität erhöht (Seitl et al., 2014). Im Gegensatz dazu ließ die ebenfalls positiv geladene C-terminale Extension von Oxa1 eine funktionale Komplementation vermuten, obwohl Oxa1 primär in der cotranslationalen Insertion involviert ist und in Mitochondrien bisher keine SRP ähnlichen Proteine identifiziert werden konnten (Jia et al., 2003). Dessen ungeachtet unterstützt Oxa1 die posttranslationale Insertion in die innere Membran, wie es für Atp9 dokumentiert werden konnte (Bonney et al., 2009). Die in dieser Arbeit komplementierten Mutanten transkribierten zwar die RNA, exprimierten schließlich aber nicht die Proteine (Abb. 14a+c; Fehlerdiskussion siehe 4.1.4). Demzufolge konnte die Funktion der positiv geladenen Motive des A3Cs *in vivo* bezüglich ihrer Relevanz in der Interaktion mit cpSRP43 und in der Substratübermittlung nicht untersucht werden. Diesen Punkt betreffend veröffentlichte Horn et al., 2015 eine strukturelle und biochemische Analyse der Interaktion des A3C mit dem cpSRP43, in der die Chromodomäne (CD) drei des cpSRP43 spezifisch mit dem Motiv IV interagiert und dadurch die Interaktion eines CD2CD3-IV Komplexes stabilisiert wurde (Horn et al., 2015). Demnach wäre Motiv IV des A3C für die Interaktion mit dem cpSRP43 und für die darauffolgende Substratvermittlung essentiell und würde somit konträr zu den Ergebnisse von Urbischek et al., 2015 sein, in der eine Motiv IV defizitäre Mutante unter bestimmten Bedingungen weiterhin LHC-Proteine inserierte und PS-Komplexe assemblierte (Horn et al., 2015; Urbischek et al., 2015).

Zusammenfassend bleibt die Funktion des C-Terminus hinsichtlich fehlender *in vivo* Daten weiterhin kontrovers. Weitere Untersuchungen bezüglich der positiv geladenen Motive des A3C aber auch dem putativen membraneingebetteten Motiv hinsichtlich der Interaktion mit dem cpSRP43 und dem Substrattransfer sind unerlässlich. Ferner ist die Funktion der Motive I und III bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht identifiziert und benötigt weitere Aufklärung. Es ist denkbar, dass diese Motive in der Bindung ribosomaler Proteine und somit potentiell in der cotranslationalen Interaktion chloroplastidär-kodierter Proteine impliziert sind.

#### 4.1.4. Das transgene *silencing* in *A. thaliana*

Im Verlauf der *in vivo* Komplementationstudie zur Analyse der C-terminalen Funktion konnten zwar transformierte Pflanzen selektiert werden, die nachfolgend die RNA transkribierten nicht aber die Proteine exprimierten. Häufig besitzt das transgene *silencing* einen post-transkriptionalen Ursprung, in dem das Transgen zwar wie in der Arbeit transkribiert wird aber die RNA instabil ist (Meins, 2000). Da die spezifischen Genprodukte per RT-PCR verifiziert werden konnten, scheint die RNA in den transformierten Pflanzen zumindest temporär stabil zu sein, lässt aber post-transkriptionales *gensilencing* aufgrund multipler Ursprünge *in planta* nicht ausschließen. Transgenes *silencing* konnte dementsprechend in diversen Pflanzen neben *A. thaliana* durch den Verlust der Proteinexpression in den Nachkommen der transgenen Linie beobachtet werden. Spezifisch in komplementierten Pflanzenlinien mit Transgenen, die Homologien zu nukleären Genen aufwiesen, wurde eine epigenetische Inaktivierung beobachtet. So führte die Transformation der Alkoholdehydrogenase in einem Mutanten-Komplementationsexperiment aufgrund des pflanzenspezifischen Ursprungs zum *silencing* (Meyer, 1995). Darüber hinaus zeigten transgene Insertionen in Pflanzenlinien, die mehrere Moleküle der transformierenden DNA umfassten vermehrt Inaktivierungen (Meyer, 1995). Obwohl die Agrobakterium vermittelte Transformation allgemein in geringeren integrierten DNA-Kopien resultiert, wurden auch hier schon eine Reihe von Kopien der neuen T-DNA in einem Locus gefunden (Gelvin, 2003). Zwar mindert eine Einzelintegration der T-DNA die Wahrscheinlichkeit des *silencing*-Effekts, allerdings schließt es ihn nicht aus (Elmayan und Vaucheret, 1996). Neben dem numerischen Ursprung wurde *silencing* durch DNA-Methylierung dokumentiert, wobei das geringe transgene Expressionsmuster mit der DNA-Methylierung, welche spezifisch für die neuintegrierte DNA war, korrelierte (Day et al., 2000). Indem alle Transformanten durch eine fehlende Proteinexpression charakterisiert waren, kann eine posttranskriptionale Ursache angenommen werden, obwohl transgenes *silencing* auch vom Charakter der parentalen Linie, des Genotyps und der Generation nach der Transformation abhängig sein kann (Meyer, 1995). Welche Ursache letztlich zur inhibierten Proteinexpression führte, konnte in dieser Arbeit nicht analysiert werden.



## 4.2. Alb3: essentielle oder akzessorische Funktion in der *in planta* Biogenese?

Die Mehrzahl der vorhandenen Proteininteraktionen und der funktionalen Analysen des Alb3 beruhen auf *in vitro* Experimenten. Angesichts der raren *in vivo* Daten und des überraschenden Phänotyps der *alb3ΔC* von Urbiscek et al., 2015 wurde *alb3* unter konstantem Schwachlicht und unter normalen  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert. Durch die nachfolgende *in vivo* Analyse sollte das detaillierte Funktionsspektrum von Alb3 *in planta* während der Biogenese und Erhaltung der photosynthetischen Komplexe ermittelt werden.

### 4.2.1. Lichtintensität beeinträchtigt die Integration und Assemblierung in *alb3*

Die photosynthetischen Prozesse erfolgen an den PS-Komplexen in der Thylakoidmembran. Damit die Prozesse stattfinden können, ist eine intakte Insertion und Assemblierung der photosynthetischen Proteine in die Membran unerlässlich. Im Laufe der letzten 10 Jahre wurden in der Biogenese der Photosysteme mehr als 40 Proteine identifiziert, die an den Komplexen dauerhaft oder transient gebunden sind (Shi et al., 2012; Nickelsen und Rengstl, 2013). Diese Faktoren unterstützen die Assemblierung und den Erhalt des PSII von den frühen Intermediaten des D1/2-PSII-Kerns und des LHCII-Trimers bis hin zum PSII-LHCII Superkomplex. Infolge des schwerwiegenden Phänotypen der *alb3*-Mutante zusammen mit den *in vitro* beobachteten Interaktionen von Alb3 mit einer Vielzahl von photosynthetischen Proteinen wie auch die Assoziationen mit PSII-Intermediaten ließen auf eine Beteiligung sowohl in der cotranslationalen Insertion plastidär-kodierter Proteine als auch im posttranslationalen Import nukleär-kodierter Proteine schließen (Sundberg et al., 1997; Pasch et al., 2005; Urbiscek et al., 2015; Walter et al., 2015; Kroliczewski et al., 2016). Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit unter NL für *alb3* generierten *in vivo* Daten würde diese Hypothese unterstützt werden, denn auch unter den photoheterotrophen Bedingungen wies *alb3* den von Sundberg et al., 1997 charakterisierten Phänotypen auf. Darüber hinaus resultierte die detailliertere Analyse der Deletionsmutante in einer signifikanten Beeinträchtigung der photosynthetischen Aktivität und einer reduzierten Akkumulation der Lhcb4 und Lhca1 in der Thylakoidmembran auf unter 10% der WT-Menge (Anhang, Abb. 22). Ferner konnte in *alb3* eine mangelhafte Akkumulation aller Thylakoidmembrankomplexe im *steady-state* per BN-PAGE festgestellt werden (Anhang, Abb. 23). Nicht nur die PSII-LHCII-Superkomplexe waren unter der Detektionsgrenze sondern auch sämtliche PS-Intermediate des Assemblierungsprozesses. Diese Ergebnisse könnten drei Ursachen besitzen: 1. Die PS-Komplexe in *alb3* waren instabil, 2. der Assemblierungsprozess war beeinträchtigt oder 3. die Synthese der nukleär- und plastidär-kodierten Proteine war reduziert und minderte die Assemblierung der Komplexe. Demzufolge wurde zur Untersuchung der Ursache ein direktes *in vivo* Proteinmarkierung mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin in *alb3* verwendet. Aufgrund der Analyse der radioaktiv-markierten Proteine

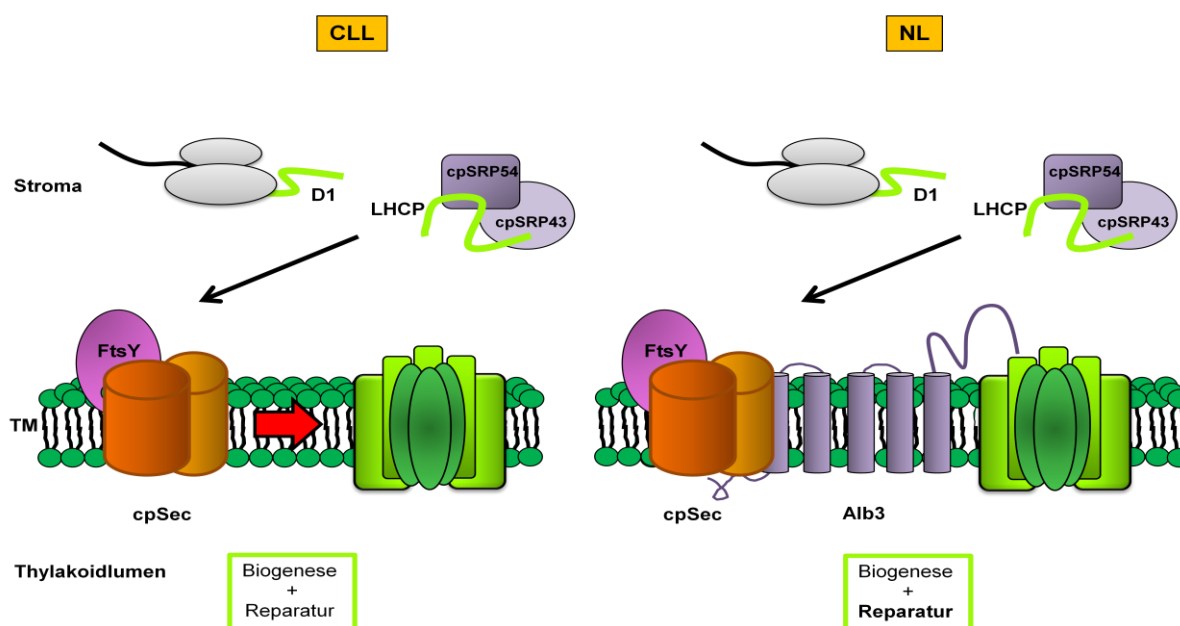
per SDS-PAGE konnte eine drastische Reduktion der Akkumulation *de novo* synthetisierte LHC-Proteine als auch des chloroplastidären D1 beobachtet werden (Abb. 9a, rechts). Quantitativ korrelierte die Akkumulation der Proteine mit der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe in der Mutante. Allerdings konnten sehr geringe Mengen *de novo* PSII-LHCII Superkomplexe und intermediäre Assemblierungsstufen detektiert werden (Abb. 10 rechts). Demgemäß erscheint in *alb3* der Prozess der Assemblierung nicht per se restlos betroffen zu sein. Zusammenfassend scheint die initiale Biogenese der photosynthetischen Komplexe auch in *alb3* unter NL-Bedingungen in sehr geringem Maße weiterhin stattzufinden. Die Synthese und die Proteininsertion waren zwar reduziert und korrelierten mit der Assemblierung, können aber auch durch einen in *alb3* abwesenden Reparaturmechanismus bedingt sein, der zu einer Instabilität der Komplexe führt. Des Weiteren konnten in der Mutante unter NL-Konditionen kaum Strukturen auf ultrastruktureller Ebene beobachtet werden (Abb. 5, oben rechts), so dass ein sekundärer Effekt auf die Proteininsertion und Assemblierung nicht ausgeschlossen werden kann.

#### **4.2.2. Alb3 ist in der Biogenese aber nicht in der Erhaltung entbehrlich**

Ausgehend von den Resultaten der *alb3* unter NL-Konditionen wurden in Folge dessen die Auswirkungen auf die photosynthetischen Komplexe durch die Alb3 Deletion bei reduzierter Lichtintensität von  $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  untersucht. Unter diesen Lichtbedingungen prägte die unter NL albinotische Mutante einen hellgrünen Phänotypen aus (Abb. 4c). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde zuvor für die *alb3ΔC* Mutante bei Urbischek et al., 2015 beobachtet. Die Kultivierung von *tic20* unter identischen Konditionen verifizierte eine *alb3*-spezifische Ursache des Phänotyps (Anhang, Abb. 21). Ausgehend vom CLL-Phänotypen wies die Mutante auch gut entwickelte Chloroplasten auf. *Alb3* entwickelte wie im WT Stromalammellae und Granastapel, die allerdings schmaler und kompakter waren und sich dadurch von den in Lichtenthaler et al., 1981 beschriebenen WT-Strukturen unter CLL differenzierten (Lichtenthaler et al., 1981). Dabei können die kompakten Grana eine adaptive sekundäre Folge der schmälere Stromalammellae sein. Angesichts der Chloroplastenstrukturen konnte für CLL-*alb3* eine photosynthetische Aktivität gemessen werden, die mit der Akkumulation photosynthetischer Proteine korrelierte. Proteine des PSI-, Cytochrom b6f-Komplex aber auch der ATP-Synthase akkumulierten im ähnlichen Verhältnis zum WT, während die Deletion von Alb3 nur marginal Auswirkungen auf die Proteinquantität der posttranslational inserierten LHC-Proteine und des plastidär kodierten PSII-D1 besaß (Abb. 7). Im Gegensatz dazu waren die PS-Intermediate und Komplexe im *steady-state* beachtlich durch die Alb3 Deletion betroffen dennoch waren aber PSII-LHCII-Superkomplexe detektierbar (Abb. 8a). Das Defizit in der PS-Komplexassemblierung und die marginal reduzierte Proteinmenge der LHC-Proteine und des D1 könnte, wie schon bei NL-Mutanten,

auf eine primäre Rolle in der Erhaltung der photosynthetischen Komplexe aber auch in der Biogenese hindeuten, gleichwohl in der Biogenese nicht als Schlüsselfaktor. Dies unterstreichen auch die Ergebnisse der Immunoblotanalyse der sekundären Dimension, in der sowohl PSII-D1 aber auch Lhca1 in höher-molekulare PS-Komplexe detektiert werden konnten. Zusätzlich ließ die Analyse der radioaktiv markierten Proteine per SDS-Page von unter CLL gewachsenen Pflanzen eine Reduktion der *de novo* synthetisierten und in die Membran akkumulierten LHC-Proteine beobachten, während das chloroplastidär-kodierte D1 auf WT-Niveau detektiert wurde (Abb. 9a, rechts).

Alb3 wurde in mehreren Studien in einem Komplex mit dem cpSec und PSII-D1 identifiziert und ließ eine Beteiligung in der cotranslationalen Proteininsertion vermuten (Pasch et al., 2005; Walter et al., 2015). Die mit dem naszierenden D1 assoziierten Ribosomen interagieren für den Transport direkt mit dem cpSRP54, welches im weiteren Verlauf den Komplex zur Translokation zum cpSec transferiert (Zhang et al., 2001; Nilsson und van Wijk, 2002). Aufgrund der Akkumulation des D1 in der Thylakoidmembran könnte Alb3 eine assoziierende, dem cpSec-Translokation Substrat-übermittelnde Funktion beinhalten, wie es auch schon für das bakterielle Homolog YidC zugeordnet werden konnte (Wang und Dalbey, 2011). Interessanterweise akkumulierte das *de novo* synthetisierte D1 in *alb3* nicht nur auf WT-Niveau, sondern auch alle D1-enthaltenden Intermediate wie RC47, PSII Monomer/Dimer und der PSII-Superkomplex in nur leicht reduzierten Mengen (Abb. 9 und 10). Das unterscheidet *alb3* von anderen Mutanten, die wie das *low psii accumulation protein* LPA1 direkt mit dem D1 interagieren und eine spezifische PSII-Kern-reduzierte Synthese und Integration bei gleichzeitiger normaler Translationsrate anderer chloroplastidärer Proteine offenbaren (Peng et al., 2006). Durch die geringere Lichtintensität unter CLL scheint die cpSec-Translokase in *alb3* fähig zu sein, das PSII-D1 cotranslational Alb3-unabhängig in die Thylakoidmembran zu inserieren (Abb. 20). Ferner mindert die reduzierte Lichtintensität auch die photo-oxidative Beschädigung des PS-Komplexes, in dem überwiegend das PSII-Reaktionszentrum mit dem D1 als Kernprotein betroffen ist, wodurch auch in *alb3* mit der putativen Funktion im PS-Reparaturmechanismus die photosynthetischen Komplexe in WT-ähnlichen Mengen akkumulieren konnten (Nixon et al., 2010). Andererseits scheint die unter normalen photoautotrophen Bedingungen höhere *turn-over* Rate des D1 in *alb3* aufgrund des ineffizienten Erhaltungssystems nicht kompensiert werden zu können (Abb. 20, rechts). Dadurch scheint Alb3 besonders unter NL-Konditionen essentiell, unter CLL-Bedingungen jedoch entbehrlich zu sein. Neben dem Komplex mit D1 wurde Alb3 auch in anderen cotranslationalen Prozessen vermutet. So identifizierte Krolczewski et al., 2016 in einer *cross-linking* Studie verbunden mit einer MS-Analyse Alb3 zusammen mit cpSRP und cpFtsY in einem Cytochrom-*b<sub>6</sub>*-insertionsvermittelnden cotranslationalen Komplex (Krolczewski et al., 2016).



**Abbildung 20: Die putative Funktion von Alb3 in der Thylakoidmembran der Chloroplasten.**

Unter CLL-Konditionen werden post- und cotranslationale Proteine Alb3-unabhängig in die Thylakoidmembran inseriert und zu höheren Komplexen assembliert. Die Insertion der Proteine geschieht unter Verwendung alternativer Translokasen wie dem cpSec (links) und gewährleistet die Biogenese der PS-Komplexe. Bei höherem Lichtintensitäten (NL) und damit einhergehenden erhöhten photo-oxidativen Beschädigungen wird Alb3 aufgrund der putativen Funktion im Reparaturmechanismus benötigt, um höhere *turn-over* Raten zu kompensieren und Komplexe zu erhalten.

Cytochrom  $b_6$  bildet zusammen mit dem Cytochrom  $f$  und weiteren molekularen Komponenten den Cytochrom- $b_6f$ -Komplex und formt eine elektronische Verbindungen zwischen den photosynthetischen Zentren PSI und PSII. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit können die Beteiligung des Alb3 an dem Cytochrom  $b_6$  weder verifizieren noch exkludieren. Allerdings konnte das ebenfalls plastidär-kodierte Cytochrom  $f$  des Komplexes in den quantitativen Immunoblotanalysen der *alb3* unter CLL im *steady state* in vergleichbaren Mengen zum WT gefunden werden (Abb. 7). Die Quantität des Cytochrom  $f$  korrelierte mit dem Cytochrom- $b_6f$ -Komplex hinsichtlich der *de novo* Komplexformierung in *alb3* unter CLL, so dass von einer nicht essentiellen Funktion des Alb3 in der Cytochrom- $b_6$ -Biogenese respektive -Erhaltung ausgegangen werden kann. Des Weiteren wurde Alb3 mit den akzessorischen Proteinen *low psii accumulation proteins* (LPA) 2 und 3 aber auch mit dem *tellurite resistance C protein* (TerC) in der CP43-Inkorporation respektive der *de novo* Intergration von Thylakoidmembranproteinen in einem Komplex gefunden, die putativ unter geringen Lichtintensitäten das Alb3 funktional komplementieren können (Ma et al., 2007; Cai et al., 2010; Schneider et al., 2014). Dies lässt zumindest die *de novo* Synthese der frühen photosynthetischen Intermediate inklusive der CP43-inkorporierten Komplexe in *alb3* annehmen.

Im Gegensatz dazu prägte sich die Deletion des Alb3s auch unter CLL-Konditionen deutlich auf die posttranslationalen LHC-Proteine aus. Besonders die Akkumulation der *de novo* synthetisierten LHC-Proteine in der Thylakoidmembran war signifikant betroffen (Abb. 9), welche sich im Anschluss auf das initiale LHCII-Trimer auswirkte (Abb. 10). PSII-LHCII-Superkomplexe konnten jedoch sowohl im *steady-state* als auch *de novo* assembliert detektiert werden. Weitere posttranslational-inserierte Proteine wie CF1  $\alpha/\beta$  akkumulierten auf WT-Niveau und verifizierten eine LHC-Protein-spezifische Reduktion (Abb. 9). Angesichts dessen scheint Alb3 zwar in der posttranslationalen Proteininsertion konträr zum cotranslationalen Import stärker beteiligt, letztlich aber unter geringem Stress abkömmlich zu sein. Unter Berücksichtigung des unbekanntenen posttranslationalen Alb3-Insertionsmechanismus können auch hier weitere, dem Integrationsprozess assoziierte Proteine nicht ausgeschlossen werden, die mit einer einhergehenden Effizienzreduktion die Funktion in *alb3* kompensieren. Diesbezüglich konnte in Bakterien für den Membranrezeptor FtsY, der in der Thylakoidmembran Alb3 rekrutiert, in einer funktionalen und physischen Bindung mit dem secYEG identifiziert werden und lässt auch eine Funktion des cpSec im posttranslationalen Mechanismus in der Abwesenheit von Alb3 mutmaßen (Angelini et al., 2005). Nichtsdestotrotz kann zu diesem Zeitpunkt nicht klar differenziert werden, ob Alb3 in der Aufrechterhaltung der photosynthetischen Komplexe oder auch in der Biogenese der Thylakoidmembranproteine beteiligt ist. Trotz der zahlreichen *in vitro* Interaktionen, die auch essentiell für die Erhaltung der photosynthetischen Komplexe wären, deuten die Resultate der Arbeit eher auf einen Lichtintensität-bedingten PSII-Reparaturmechanismus hin (Abb. 20). Angesichts der Ergebnisse scheint Alb3, wenn an der Biogenese beteiligt, eine akzessorische Funktion in der cotranslationalen und aufgrund der stärker reduzierten Akkumulation der LHC-Proteine eine vorgeordnete Funktion in der posttranslationalen Proteininsertion zu besitzen, die jedoch auch ersetzbar zu sein scheint. In Anbetracht der Verwendung einer *alb3*-Linie, deren Transposoninsertion im Intron 8 dokumentiert wurde, kann aufgrund der Insertionsposition eine Restexpression des Alb3s nicht restlos ausgeschlossen werden, ungeachtet der nachgewiesenen absenten RNA in dieser Arbeit wie auch bei Sundberg et al., 1997 (Sundberg et al., 1997). Diesbezüglich exprimierte in einer Studie von Trösch et al., 2015 eine Alb3 T-DNA Mutante mit einer analogen Introninsertion geringe Mengen an Alb3 (Trosch et al., 2015). Darüber hinaus beobachtete Sundberg et al., 1997 in der erstmaligen Analyse der *alb3* partielle Reversionen, die durch grüne Spots hervorstachen (Sundberg et al., 1997). Aufgrund des hellgrünen Phänotyps der homozygoten *alb3* unter CLL-Bedingungen kann eine phänotypische Interferenz dieser partiellen Spots nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Zukünftige Studien werden klären müssen, inwieweit Alb3 primär am Reparaturmechanismus oder auch an der photosynthetischen Biogenese beteiligt ist. Angesichts der mangelnden Information der

posttranslationalen LHC-Proteininsertion ist es erforderlich, den autonomen Alb3-Mechanismus oder zusätzliche putative akzessorische Proteine/Translokasen im Detail zu untersuchen. In gleicher Weise muss die putative Funktion des Alb3s innerhalb der cotranslationalen Insertion chloroplastidär-kodierter Proteine zusammen mit der Bindung der ribosomalen Proteine analysiert werden.

#### 4.3. Die Substrate des posttranslationalen Imports in das ER

Proteine besitzen in vielen zellulären Prozessen wichtige Funktionen. Im Zytosol translatiert müssen die Proteine über das sec-Translokon in das ER importiert werden. Trotz der wesentlichen Funktionen der Proteine sind in Pflanzen der co- und posttranslationale Transport und die im Prozess beteiligten Proteine nur wenig erforscht. So konnten erst vor kurzem die grundlegenden Proteine des sec-Translokons mit dem sec61, sec62 und sec63 identifiziert werden (Yamamoto et al., 2008). Ergänzend wurde ein pflanzenspezifisches Rezeptorprotein, das TPR7, in Arabidopsis gefunden, welches eine TPR-Domäne inkludiert und die Bindung von zytosolischen molekularen Chaperonen wie HSP70 und HSP90 vermittelt (Schweiger et al., 2012). TPR7 scheint das direkte funktionale Analogon des sec72 zu sein, welches in Hefe über sec71 an der ER-Membran verankert ist (Fang und Green, 1994; Feldheim und Schekman, 1994; Harada et al., 2011). Informationen über die am cotranslationalen Weg beteiligten Proteine beruhen überwiegend auf Homologien anderer Organismen. Analog zu den Informationen der Transportwege ist auch die Differenzierung zwischen post- und cotranslationalen spezifischen Substraten der Pflanze wenig erforscht. Importstudien, wie sie für Substratproteine diverser Spezies in Hundepankreas-Mikrosomen dokumentiert wurden (Watts et al., 1983), konnten bisher nicht erfolgreich auf Pflanzen übertragen werden. Für ER-Proteine aus *S. cerevisiae* und Menschen konnten zwar in den *in vitro* Experimenten importiert werden, aber lange Zeit nicht zwischen co- und posttranslationalen Substraten differenziert werden. Erst 2012 konnten spezifische humane Proteine der posttranslationalen Translokation analysiert werden, die kurze sekretorische Proteinen wie Insulin (12 kDa), Apelin (8,6 kDa) und Statherin (7,3 kDa) einschlossen (Johnson et al., 2012; Lakkaraju et al., 2012; Lang et al., 2012). In *S. cerevisiae* wurde für den Präprotein des *mating factor alpha*, das ppαF, eine posttranslationale Translokation über die ER-Membran *in vitro* beobachtet (Johnson et al., 2013). Aufgrund der Ergebnisse scheinen Proteine des posttranslationalen sekretorischen Weges oftmals kurze AS-Kettenlängen zu umfassen, deren Synthese bereits abgeschlossen ist bevor das SRP effizient binden kann (Johnson et al., 2013). Darüber hinaus wiesen Signalsequenzen SRP-abhängiger Substrate eine höhere Hydrophobizität im Signalsequenzkern auf (Ng et al., 1996).

Auf Basis des RNAi-knockdown der  $\alpha$ -Untereinheit des SR-Rezeptors in *A. thaliana* konnte in dieser Arbeit der cotranslationale Importweg herunter reguliert werden und über den Abgleich des mikrosomalen Musters putative Substrate der posttranslationalen Translokation nach Exklusion plastidärer Kontaminationen identifiziert werden (Tab. 6). Die Regulation des SR $\alpha$  durch das RNAi-System war spezifisch, da der mit dem sec assoziierten Rezeptor TPR7 keinen Unterschied zum WT-Proteinlevel besaß (Abb. 16c). Andererseits kann eine Beeinflussung der MS-Ergebnisse durch die verfrühte einhergehende Seneszenz der Mutante nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu den molekularen Massen der humanen Substrate offenbarte die MS-Analyse Proteine mit einem breiten molekularen Spektrum. Ausgehend von der molekularen Größe würden PBP1, TIP1 und PHB3 mit Massen zwischen 20 und 33 kDa am ehesten dem posttranslationalen Weg zugeordnet werden können. Das PYK10-binding protein 1 (PBP1) wurde dementsprechend 2003 auch im ER lokalisiert (Matsushima et al., 2003; Nagano et al., 2005). PBP1 interagiert mit dem PYK10, welches ebenfalls durch die MS-Analyse in *sra* dokumentiert wurde. Beide Proteine scheinen eine Rolle im pflanzlichen Abwehrsystem zu besitzen (Matsushima et al., 2003; Nagano et al., 2005), sodass eine Expression des PBP1 und PYK10 durch eine geringfügige Kontamination in den Hydrokulturen nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Das Hydrophobizitätsprofil des PYK10 zeigte im Gegensatz zu der These von Ng et al., 1996 eine für posttranslationale Substrate potentiell unüblich hohe Hydrophobizität auf, während für PBP1 keine Signalsequenz vorhergesagt wurde. Gleichermäßen wiesen die Signalsequenzen von PHB3 und GLL23, welche auch in den MS-Daten dokumentiert waren, ebenfalls eine erhöhte Hydrophobizität im Signalsequenzkern auf. Während PHB3 sowohl dem sekretorischen Weg als auch dem Mitochondrium zugeschrieben wurde (Van Aken et al., 2007) und als positiver Regulator Ethylen-regulierter Gene fungiert (Christians und Larsen, 2007), handelt es sich bei GLL23 um eine GDSL-like Lipase, die im Glucosinolatmetabolismus mit der  $\beta$ -Glucosidase-Myrosinase assoziiert ist und ausschließlich im ER akkumuliert (Jancowski et al., 2014). Der GDSL-Esterasen- und -Lipasenfamilie wurde, wie PYK10 und PBP1, eine Funktion in der Pathogenabwehr aber auch im Lipidmetabolismus und eine Funktion im abiotischen Stress zugeteilt (Tan et al., 2014), was ähnlich dem PYK10 und PBP1 durch eine nicht sichtbare Pathogenkontamination hervorgerufen sein könnte. Ferner wurden Peptide in der MS ermittelt, die dem Aquaporin TIP1 zugewiesen werden konnten. Die Regulation des TIP1, welches vermutlich in der Seneszenz involviert ist, könnte mit einer verfrüht einhergehenden Seneszenz der induzierten *sra* zusammenhängen und das gegensätzliche Expressionsmuster zum WT hervorrufen (Schussler et al., 2008). Letztlich wurde auch noch das molekulare Chaperon der *heat shock Protein 70* Familie des ER-Lumens in der MS-Analyse dokumentiert, welches in der Proteintranslokation, -faltung und Qualitätskontrolle

beteiligt ist (Bukau et al., 2006; Nishikawa et al., 2005). Kontrovers zur These, dass hauptsächlich kurze sekretorische Proteine posttranslational importiert werden, besitzt BIP zwar eine molekulare Masse von 75,2 kDa, verfügt allerdings auch über einen übereinstimmenden Signalsequenzkern mit geringer Hydrophobizität.

Alle putativen Substrate der posttranslationalen Translokation des pflanzlichen ERs stimmen überwiegend nur mit maximal einem der Kriterien überein, denen humane Proteine und Proteine aus Hefe zugeordnet wurden. Proteine mit hohen molekularen Massen werden hauptsächlich cotranslational importiert, wie es für die Dipeptyl-Aminopeptidase B in *S. cerevisiae* demonstriert wurde (Janda et al., 2010). Angesichts der Verwendung eines induzierbaren RNAi-Systems kann eine geringe cotranslationale Proteintranslokation in *sra* nicht ausgeschlossen werden. Zwar prägte *sra* einen markanten albinotischen Phänotypen aus, der darüber hinaus durch Immunoblotanalysen verifiziert wurde und auch im Abgleich der mikrosomalen Muster mit dem WT offensichtlich war, indes aber auch durch einen sekundären *off target effect* des RNAi-System unterstützt werden könnte (Senthil Kumar und Mysore, 2011).

Zur weiteren Charakterisierung der putativen Proteine können Interaktionsstudien mit Komponenten der diversen Insertionswege durchgeführt werden. So müssten posttranslationale Substrate entweder mit HSP90 oder HSP70 interagierten, um anschließend zum Translokon transferiert zu werden. Darüber hinaus besteht durch die Identifizierung der Substrate nun die Möglichkeit, die mikrosomale Translokation zu optimieren und zu analysieren. Dadurch können nicht nur zusätzliche Informationen über die Importwege erlangt, sondern auch die Relevanz der einzelnen membranständigen Rezeptorproteinen durch Importstudien in mikrosomalen Fraktionen unterschiedlicher Translokonmutanten untersucht werden.



## 5. Literatur

- Akopian, D., K. Shen, X. Zhang, and S.O. Shan. 2013.** Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annu Rev Biochem.* 82:693-721.
- Aldridge, C., P. Cain, and C. Robinson. 2009.** Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane. *FEBS J.* 276:1177-1186.
- Angelini, S., S. Deitermann, and H.G. Koch. 2005.** FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.* 6:476-481.
- Ast, T., and M. Schuldiner. 2013.** All roads lead to Rome (but some may be harder to travel): SRP-independent translocation into the endoplasmic reticulum. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48:273-288.
- Bals, T., B. Dunschede, S. Funke, and D. Schunemann. 2010.** Interplay between the cpSRP pathway components, the substrate LHCP and the translocase Alb3: an in vivo and in vitro study. *FEBS Lett.* 584:4138-4144.
- Bauerle, C., and K. Keegstra. 1991.** Full-length plastocyanin precursor is translocated across isolated thylakoid membranes. *J Biol Chem.* 266:5876-5883.
- Becker, T., S. Bhushan, A. Jarasch, J.P. Armache, S. Funes, F. Jossinet, J. Gumbart, T. Mielke, O. Berninghausen, K. Schulten, E. Westhof, R. Gilmore, E.C. Mandon, and R. Beckmann. 2009.** Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science.* 326:1369-1373.
- Bellafiore, S., P. Ferris, H. Naver, V. Gohre, and J.D. Rochaix. 2002.** Loss of Albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell.* 14:2303-2314.
- Benz, M., T. Bals, I.L. Gugel, M. Piotrowski, A. Kuhn, D. Schunemann, J. Soll, and E. Ankele. 2009.** Alb4 of Arabidopsis promotes assembly and stabilization of a non chlorophyll-binding photosynthetic complex, the CF1CF0-ATP synthase. *Mol Plant.* 2:1410-1424.
- Benz, M., J. Soll, and E. Ankele. 2013.** Arabidopsis thaliana Oxa proteins locate to mitochondria and fulfill essential roles during embryo development. *Planta.* 237:573-588.
- Boekema, E.J., H. Van Roon, J.F. Van Breemen, and J.P. Dekker. 1999.** Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur J Biochem.* 266:444-452.
- Bonnefoy, N., H.L. Fiumera, G. Dujardin, and T.D. Fox. 2009.** Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochim Biophys Acta.* 1793:60-70.
- 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.
- Bricker, T.M., J.L. Roose, R.D. Fagerlund, L.K. Frankel, and J.J. Eaton-Rye. 2012.** The extrinsic proteins of Photosystem II. *Biochim Biophys Acta.* 1817:121-142.
- Brodsky, J.L., J. Goeckeler, and R. Schekman. 1995.** BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9643-9646.
- Bukau, B., J. Weissman, and A. Horwich. 2006.** Molecular chaperones and protein quality control. *Cell.* 125:443-451.
- Cai, W., J. Ma, W. Chi, M. Zou, J. Guo, C. Lu, and L. Zhang. 2010.** Cooperation of LPA3 and LPA2 is essential for photosystem II assembly in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 154:109-120.

- Celebi, N., L. Yi, S.J. Facey, A. Kuhn, and R.E. Dalbey. 2006.** Membrane biogenesis of subunit II of cytochrome bo oxidase: contrasting requirements for insertion of N-terminal and C-terminal domains. *J Mol Biol.* 357:1428-1436.
- Chaddock, A.M., A. Mant, I. Karnauchov, S. Brink, R.G. Herrmann, R.B. Klosgen, and C. Robinson. 1995.** A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *EMBO J.* 14:2715-2722.
- Chatzi, K.E., M.F. Sardis, A. Economou, and S. Karamanou. 2014.** SecA-mediated targeting and translocation of secretory proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1843:1466-1474.
- Chirico, W.J., M.G. Waters, and G. Blobel. 1988.** 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature.* 332:805-810.
- Chou, M.L., C.C. Chu, L.J. Chen, M. Akita, and H.m. Li. 2006.** Stimulation of transit-peptide release and ATP hydrolysis by a cochaperone during protein import into chloroplasts. *J Cell Biol.* 175:893-900.
- Christians, M.J., and P.B. Larsen. 2007.** Mutational loss of the prohibitin AtPHB3 results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in Arabidopsis seedlings. *J Exp Bot.* 58:2237-2248.
- Chua, N.H., and G.W. Schmidt. 1979.** Transport of proteins into mitochondria and chloroplasts. *J Cell Biol.* 81:461-483.
- Cline, K., W.F. Ettinger, and S.M. Theg. 1992.** Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem.* 267:2688-2696.
- Cline, K., and H. Mori. 2001.** Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol.* 154:719-729.
- Connolly, T., P.J. Rapiejko, and R. Gilmore. 1991.** Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science.* 252:1171-1173.
- Dasgupta, J., G.M. Ananyev, and G.C. Dismukes. 2008.** Photoassembly of the Water-Oxidizing Complex in Photosystem II. *Coord Chem Rev.* 252:347-360.
- Day, C.D., E. Lee, J. Kobayashi, L.D. Holappa, H. Albert, and D.W. Ow. 2000.** Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced. *Genes Dev.* 14:2869-2880.
- Deshaies, R.J., B.D. Koch, M. Werner-Washburne, E.A. Craig, and R. Schekman. 1988.** A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature.* 332:800-805.
- Deshaies, R.J., S.L. Sanders, D.A. Feldheim, and R. Schekman. 1991.** Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature.* 349:806-808.
- Deshaies, R.J., and R. Schekman. 1989.** SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 109:2653-2664.
- Dobakova, M., M. Tichy, and J. Komenda. 2007.** Role of the Psbl protein in photosystem II assembly and repair in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 145:1681-1691.
- Drop, B., M. Webber-Birungi, S.K. Yadav, A. Filipowicz-Szymanska, F. Fusetti, E.J. Boekema, and R. Croce. 2014.** Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.* 1837:63-72.

- du Plessis, D.J., N. Nouwen, and A.J. Driessen. 2006.** Subunit a of cytochrome o oxidase requires both YidC and SecYEG for membrane insertion. *J Biol Chem.* 281:12248-12252.
- Dunschede, B., T. Bals, S. Funke, and D. Schunemann. 2011.** Interaction studies between the chloroplast signal recognition particle subunit cpSRP43 and the full-length translocase Alb3 reveal a membrane-embedded binding region in Alb3 protein. *J Biol Chem.* 286:35187-35195.
- Dyall, S.D., M.T. Brown, and P.J. Johnson. 2004.** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science.* 304:253-257.
- Eberhard, S., G. Finazzi, and F.A. Wollman. 2008.** The dynamics of photosynthesis. *Annu Rev Genet.* 42:463-515.
- Elmayan, T., and H. Vaucheret. 1996.** Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* 9:787-797.
- Falk, S., S. Ravaud, J. Koch, and I. Sinning. 2010.** The C terminus of the Alb3 membrane insertase recruits cpSRP43 to the thylakoid membrane. *J Biol Chem.* 285:5954-5962.
- Falk, S., and I. Sinning. 2010.** The C terminus of Alb3 interacts with the chromodomains 2 and 3 of cpSRP43. *J Biol Chem.* 285:le25-26; author reply le26-28.
- Fang, H., and N. Green. 1994.** Nonlethal sec71-1 and sec72-1 mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S. cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 5:933-942.
- Feldheim, D., and R. Schekman. 1994.** Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol.* 126:935-943.
- Fellerer, C., R. Schweiger, K. Schongruber, J. Soll, and S. Schwenkert. 2011.** Cytosolic HSP90 Cochaperones HOP and FKBP Interact with Freshly Synthesized Chloroplast Preproteins of Arabidopsis. *Mol Plant.* 4:1133-1145.
- Franklin, A.E., and N.E. Hoffman. 1993.** Characterization of a chloroplast homologue of the 54-kDa subunit of the signal recognition particle. *J Biol Chem.* 268:22175-22180.
- Fulga, T.A., I. Sinning, B. Dobberstein, and M.R. Pool. 2001.** SRbeta coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the translocon. *EMBO J.* 20:2338-2347.
- Funke, S., T. Knechten, J. Ollesch, and D. Schunemann. 2005.** A unique sequence motif in the 54-kDa subunit of the chloroplast signal recognition particle mediates binding to the 43-kDa subunit. *J Biol Chem.* 280:8912-8917.
- Gelvin, S.B. 2003.** Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:16-37, table of contents.
- Geng, Y., A. Kedrov, J.J. Caumanns, A.H. Crevenna, D.C. Lamb, R. Beckmann, and A.J. Driessen. 2015.** Role of the Cytosolic Loop C2 and the C Terminus of YidC in Ribosome Binding and Insertion Activity. *J Biol Chem.* 290:17250-17261.
- Gibson, D.G. 2009.** Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 37:6984-6990.
- Gilmore, R., P. Walter, and G. Blobel. 1982.** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol.* 95:470-477.
- Gohre, V., F. Ossenbuhl, M. Crevecoeur, L.A. Eichacker, and J.D. Rochaix. 2006.** One of two alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in *Chlamydomonas*. *Plant Cell.* 18:1454-1466.
- Gray, M.W. 1999.** Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev.* 9:678-687.
- Groves, M.R., A. Mant, A. Kuhn, J. Koch, S. Dubel, C. Robinson, and I. Sinning. 2001.** Functional characterization of recombinant chloroplast signal recognition particle. *J Biol Chem.* 276:27778-27786.

- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* 166:557-580.
- Harada, Y., H. Li, J.S. Wall, and W.J. Lennarz. 2011.** Structural studies and the assembly of the heptameric post-translational translocon complex. *J Biol Chem.* 286:2956-2965.
- Harju, S., H. Fedosyuk, and K.R. Peterson. 2004.** Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol.* 4:8.
- Haward, S.R., J.A. Napier, and J.C. Gray. 1997.** Chloroplast SecA functions as a membrane-associated component of the Sec-like protein translocase of pea chloroplasts. *Eur J Biochem.* 248:724-730.
- Heazlewood, J.L., P. Durek, J. Hummel, J. Selbig, W. Weckwerth, D. Walther, and W.X. Schulze. 2008.** PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Res.* 36:D1015-1021.
- Helmut Blum, D.H.B.H.J.G. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Vol. 8. Electrophoresis. 93-99.
- Hermkes, R., S. Funke, C. Richter, J. Kuhlmann, and D. Schunemann. 2006.** The alpha-helix of the second chromodomain of the 43 kDa subunit of the chloroplast signal recognition particle facilitates binding to the 54 kDa subunit. *FEBS Lett.* 580:3107-3111.
- Hoffman, N.E., and A.E. Franklin. 1994.** Evidence for a stromal GTP requirement for the integration of a chlorophyll a/b-binding polypeptide into thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 105:295-304.
- Holdermann, I., N.H. Meyer, A. Round, K. Wild, M. Sattler, and I. Sinning. 2012.** Chromodomains read the arginine code of post-translational targeting. *Nat Struct Mol Biol.* 19:260-263.
- Horn, A., J. Hennig, Y.L. Ahmed, G. Stier, K. Wild, M. Sattler, and I. Sinning. 2015.** Structural basis for cpSRP43 chromodomain selectivity and dynamics in Alb3 insertase interaction. *Nat Commun.* 6:8875.
- Hulford, A., L. Hazell, R.M. Mould, and C. Robinson. 1994.** Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates. *J Biol Chem.* 269:3251-3256.
- Jancowski, S., A. Catching, J. Pighin, T. Kudo, I. Foissner, and G.O. Wasteneys. 2014.** Trafficking of the myrosinase-associated protein GLL23 requires NUC/MVP1/GOLD36/ERMO3 and the p24 protein CYB. *Plant J.* 77:497-510.
- Janda, C.Y., J. Li, C. Oubridge, H. Hernandez, C.V. Robinson, and K. Nagai. 2010.** Recognition of a signal peptide by the signal recognition particle. *Nature.* 465:507-510.
- Jaru-Ampornpan, P., K. Shen, V.Q. Lam, M. Ali, S. Doniach, T.Z. Jia, and S.O. Shan. 2010.** ATP-independent reversal of a membrane protein aggregate by a chloroplast SRP subunit. *Nat Struct Mol Biol.* 17:696-702.
- Jia, L., M. Dienhart, M. Schramp, M. McCauley, K. Hell, and R.A. Stuart. 2003.** Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. *EMBO J.* 22:6438-6447.
- Jiang, F., L. Yi, M. Moore, M. Chen, T. Rohl, K.J. Van Wijk, J.W. De Gier, R. Henry, and R.E. Dalbey. 2002.** Chloroplast YidC homolog Albino3 can functionally complement the bacterial YidC depletion strain and promote membrane insertion of both bacterial and chloroplast thylakoid proteins. *J Biol Chem.* 277:19281-19288.
- Johnson, N., K. Powis, and S. High. 2013.** Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 1833:2403-2409.

- Johnson, N., F. Vilardi, S. Lang, P. Leznicki, R. Zimmermann, and S. High. 2012.** TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *J Cell Sci.* 125:3612-3620.
- Keegstra, K., and K. Cline. 1999.** Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell.* 11:557-570.
- Keenan, R.J., D.M. Freymann, R.M. Stroud, and P. Walter. 2001.** The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem.* 70:755-775.
- Kessler, F., G. Blobel, H.A. Patel, and D.J. Schnell. 1994.** Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science.* 266:1035-1039.
- Kessler, F., and D. Schnell. 2009.** Chloroplast biogenesis: diversity and regulation of the protein import apparatus. *Curr Opin Cell Biol.* 21:494-500.
- Kirwin, P.M., J.W. Meadows, J.B. Shackleton, J.E. Musgrove, P.D. Elderfield, R. Mould, N.A. Hay, and C. Robinson. 1989.** ATP-dependent import of a luminal protein by isolated thylakoid vesicles. *EMBO J.* 8:2251-2255.
- Klimyuk, V.I., F. Persello-Cartieaux, M. Havaux, P. Contard-David, D. Schuenemann, K. Meierhoff, P. Gouet, J.D. Jones, N.E. Hoffman, and L. Nussaume. 1999.** A chromodomain protein encoded by the arabidopsis CAO gene is a plant-specific component of the chloroplast signal recognition particle pathway that is involved in LHCP targeting. *Plant Cell.* 11:87-99.
- Klosgen, R.B., I.W. Brock, R.G. Herrmann, and C. Robinson. 1992.** Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids. *Plant Mol Biol.* 18:1031-1034.
- Klostermann, E., I. Droste Gen Helling, J.P. Carde, and D. Schuenemann. 2002.** The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J.* 368:777-781.
- Kohler, R., D. Boehringer, B. Greber, R. Bingel-Erlenmeyer, I. Collinson, C. Schaffitzel, and N. Ban. 2009.** YidC and Oxa1 form dimeric insertion pores on the translating ribosome. *Mol Cell.* 34:344-353.
- Komenda, J., V. Reisinger, B.C. Muller, M. Dobakova, B. Granvogl, and L.A. Eichacker. 2004.** Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem.* 279:48620-48629.
- Kouranov, A., X. Chen, B. Fuks, and D.J. Schnell. 1998.** Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol.* 143:991-1002.
- Kouril, R., J.P. Dekker, and E.J. Boekema. 2012.** Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim Biophys Acta.* 1817:2-12.
- Krieg, U.C., P. Walter, and A.E. Johnson. 1986.** Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin to the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:8604-8608.
- Kroliczewski, J., M. Piskozub, R. Bartoszewski, and B. Kroliczewska. 2016.** ALB3 Insertase Mediates Cytochrome b6 Co-translational Import into the Thylakoid Membrane. *Sci Rep.* 6:34557.
- Kumazaki, K., T. Kishimoto, A. Furukawa, H. Mori, Y. Tanaka, N. Dohmae, R. Ishitani, T. Tsukazaki, and O. Nureki. 2014.** Crystal structure of *Escherichia coli* YidC, a membrane protein chaperone and insertase. *Sci Rep.* 4:7299.
- Kurzchalia, T.V., M. Wiedmann, A.S. Girshovich, E.S. Bochkareva, H. Bielka, and T.A. Rapoport. 1986.** The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature.* 320:634-636.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

- Laidler, V., A.M. Chaddock, T.G. Knott, D. Walker, and C. Robinson. 1995. A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts. *J Biol Chem.* 270:17664-17667.
- Lakkaraju, A.K., R. Thankappan, C. Mary, J.L. Garrison, J. Taunton, and K. Strub. 2012. Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell.* 23:2712-2722.
- Lang, S., J. Benedix, S.V. Fedeles, S. Schorr, C. Schirra, N. Schauble, C. Jalal, M. Greiner, S. Hassdenteufel, J. Tatzelt, B. Kreutzer, L. Edelmann, E. Krause, J. Rettig, S. Somlo, R. Zimmermann, and J. Dudek. 2012. Different effects of Sec61alpha, Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci.* 125:1958-1969.
- Lewis, N.E., N.J. Marty, K.M. Kathir, D. Rajalingam, A.D. Kight, A. Daily, T.K. Kumar, R.L. Henry, and R.L. Goforth. 2010. A dynamic cpSRP43-Albino3 interaction mediates translocase regulation of chloroplast signal recognition particle (cpSRP)-targeting components. *J Biol Chem.* 285:34220-34230.
- Lichtenthaler, H.K., C. Buschmann, M. Döll, H.J. Fietz, T. Bach, U. Kozel, D. Meier, and U. Rahmsdorf. 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research.* 2:115-141.
- Liu, Z., H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An, and W. Chang. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature.* 428:287-292.
- Lo, S.M., and S.M. Theg. 2012. Role of vesicle-inducing protein in plastids 1 in cpTat transport at the thylakoid. *Plant J.* 71:656-668.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Lu, Y. 2016. Identification and Roles of Photosystem II Assembly, Stability, and Repair Factors in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 7:168.
- Luirink, J., and I. Sinning. 2004. SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochim Biophys Acta.* 1694:17-35.
- Lutcke, H., S. High, K. Romisch, A.J. Ashford, and B. Dobberstein. 1992. The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. *EMBO J.* 11:1543-1551.
- Lyman, S.K., and R. Schekman. 1997. Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell.* 88:85-96.
- Ma, J., L. Peng, J. Guo, Q. Lu, C. Lu, and L. Zhang. 2007. LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 19:1980-1993.
- Margulis, L. 1970. Origin of Eukaryotic cells. evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. (Yale University Press New Haven).
- Martin, W., B. Stoebe, V. Goremykin, S. Hapsmann, M. Hasegawa, and K.V. Kowallik. 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature.* 393:162-165.
- Maruyama, D., T. Sugiyama, T. Endo, and S. Nishikawa. 2014. Multiple BiP genes of *Arabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness. *Plant Cell Physiol.* 55:801-810.
- Matlack, K.E., B. Misselwitz, K. Plath, and T.A. Rapoport. 1999. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell.* 97:553-564.
- Matsushima, R., M. Kondo, M. Nishimura, and I. Hara-Nishimura. 2003. A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a beta-glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J.* 33:493-502.

- May, T., and J. Soll. 2000.** 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell*. 12:53-64.
- Meins, F., Jr. 2000.** RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. *Plant Mol Biol*. 43:261-273.
- Meyer, H.A., H. Grau, R. Kraft, S. Kostka, S. Prehn, K.U. Kalies, and E. Hartmann. 2000.** Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem*. 275:14550-14557.
- Meyer, P. 1995.** gene silencing in higher plants and related phenomena in other eukaryotes. Springer-Verlag.
- Moore, M., R.L. Goforth, H. Mori, and R. Henry. 2003.** Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required. *J Cell Biol*. 162:1245-1254.
- Moore, M., M.S. Harrison, E.C. Peterson, and R. Henry. 2000.** Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J Biol Chem*. 275:1529-1532.
- Mori, H., and K. Cline. 2002.** A twin arginine signal peptide and the pH gradient trigger reversible assembly of the thylakoid [Delta]pH/Tat translocase. *J Cell Biol*. 157:205-210.
- Mori, H., E.J. Summer, and K. Cline. 2001.** Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport. *FEBS Lett*. 501:65-68.
- Mori, H., E.J. Summer, X. Ma, and K. Cline. 1999.** Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways. *J Cell Biol*. 146:45-56.
- Mould, R.M., and C. Robinson. 1991.** A proton gradient is required for the transport of two luminal oxygen-evolving proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem*. 266:12189-12193.
- Nagano, A.J., R. Matsushima, and I. Hara-Nishimura. 2005.** Activation of an ER-body-localized beta-glucosidase via a cytosolic binding partner in damaged tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 46:1140-1148.
- Nakai, M., A. Goto, T. Nohara, D. Sugita, and T. Endo. 1994.** Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *J Biol Chem*. 269:31338-31341.
- Ng, D.T., J.D. Brown, and P. Walter. 1996.** Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*. 134:269-278.
- Nickel, C., T. Brylok, and S. Schwenkert. 2016.** In Vivo Radiolabeling of Arabidopsis Chloroplast Proteins and Separation of Thylakoid Membrane Complexes by Blue Native PAGE. *Methods Mol Biol*. 1450:233-245.
- Nickelsen, J., and B. Rengstl. 2013.** Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. *Annu Rev Plant Biol*. 64:609-635.
- Nilsson, R., and K.J. van Wijk. 2002.** Transient interaction of cpSRP54 with elongating nascent chains of the chloroplast-encoded D1 protein; 'cpSRP54 caught in the act'. *FEBS Lett*. 524:127-133.
- Nishikawa, S., J.L. Brodsky, and K. Nakatsukasa. 2005.** Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem*. 137:551-555.
- Nixon, P.J., F. Michoux, J. Yu, M. Boehm, and J. Komenda. 2010.** Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann Bot*. 106:1-16.
- Nouwen, N., G. Berrelkamp, and A.J. Driessen. 2007.** Bacterial sec-translocase unfolds and translocates a class of folded protein domains. *J Mol Biol*. 372:422-433.
- Nyathi, Y., B.M. Wilkinson, and M.R. Pool. 2013.** Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 1833:2392-2402.

- Ossenbuhl, F., V. Gohre, J. Meurer, A. Krieger-Liszkay, J.D. Rochaix, and L.A. Eichacker. 2004. Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of Arabidopsis ALBINO3. *Plant Cell*. 16:1790-1800.
- Ossenbuhl, F., M. Inaba-Sulpice, J. Meurer, J. Soll, and L.A. Eichacker. 2006. The synechocystis sp PCC 6803 oxa1 homolog is essential for membrane integration of reaction center precursor protein pD1. *Plant Cell*. 18:2236-2246.
- Ozawa, S., T. Onishi, and Y. Takahashi. 2010. Identification and characterization of an assembly intermediate subcomplex of photosystem I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*. 285:20072-20079.
- Pasch, J.C., J. Nickelsen, and D. Schunemann. 2005. The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 69:440-447.
- Peng, L., J. Ma, W. Chi, J. Guo, S. Zhu, Q. Lu, C. Lu, and L. Zhang. 2006. LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 18:955-969.
- Plath, K., W. Mothes, B.M. Wilkinson, C.J. Stirling, and T.A. Rapoport. 1998. Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*. 94:795-807.
- Plochinger, M., S. Schwenkert, L. von Sydow, W.P. Schroder, and J. Meurer. 2016. Functional Update of the Auxiliary Proteins PsbW, PsbY, HCF136, PsbN, TerC and ALB3 in Maintenance and Assembly of PSII. *Front Plant Sci*. 7:423.
- Pool, M.R., J. Stumm, T.A. Fulga, I. Sinning, and B. Dobberstein. 2002. Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science*. 297:1345-1348.
- Pribil, M., M. Labs, and D. Leister. 2014. Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J Exp Bot*. 65:1955-1972.
- Price, C.E., and A.J. Driessen. 2010. Conserved negative charges in the transmembrane segments of subunit K of the NADH:ubiquinone oxidoreductase determine its dependence on YidC for membrane insertion. *J Biol Chem*. 285:3575-3581.
- Rehling, P., K. Brandner, and N. Pfanner. 2004. Mitochondrial Import and the Twin-Pore Translocase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5:519-530.
- Richter, S., and G.K. Lamppa. 2003. Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal. *J Biol Chem*. 278:39497-39502.
- Richter, S., Zhong, R., Lamppa, G. 2005. Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiol. Plant*. 123 362-368.
- Romisch, K., J. Webb, K. Lingelbach, H. Gausepohl, and B. Dobberstein. 1990. The 54-kD protein of signal recognition particle contains a methionine-rich RNA binding domain. *J Cell Biol*. 111:1793-1802.
- Roy, L.M., and A. Barkan. 1998. A SecY homologue is required for the elaboration of the chloroplast thylakoid membrane and for normal chloroplast gene expression. *J Cell Biol*. 141:385-395.
- Saaf, A., M. Monne, J.W. de Gier, and G. von Heijne. 1998. Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 273:30415-30418.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239:487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. *Cold spring harbor laboratory press New York*.
- Schleiff, E., and T. Becker. 2011. Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:48-59.



- Schneider, A., I. Steinberger, H. Strissel, H.H. Kunz, N. Manavski, J. Meurer, G. Burkhard, S. Jarzombski, D. Schunemann, S. Geimer, U.I. Flugge, and D. Leister. 2014. The Arabidopsis Tellurite resistance C protein together with ALB3 is involved in photosystem II protein synthesis. *Plant J.* 78:344-356.
- Schonberg, A., E. Bergner, S. Helm, B. Agne, B. Dunschede, D. Schunemann, M. Schutkowski, and S. Baginsky. 2014. The peptide microarray "ChloroPhos1.0" identifies new phosphorylation targets of plastid casein kinase II (pCKII) in Arabidopsis thaliana. *PLoS One.* 9:e108344.
- Schuenemann, D., P. Amin, E. Hartmann, and N.E. Hoffman. 1999. Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex. *J Biol Chem.* 274:12177-12182.
- Schuenemann, D., S. Gupta, F. Persello-Cartieaux, V.I. Klimyuk, J.D. Jones, L. Nussaume, and N.E. Hoffman. 1998. A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10312-10316.
- Schussler, M.D., E. Alexandersson, G.P. Bienert, T. Kichey, K.H. Laursen, U. Johanson, P. Kjellbom, J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn. 2008. The effects of the loss of TIP1;1 and TIP1;2 aquaporins in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 56:756-767.
- Schwacke, R., A. Schneider, E. van der Graaff, K. Fischer, E. Catoni, M. Desimone, W.B. Frommer, U.I. Flugge, and R. Kunze. 2003. ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *PLANT PHYSIOLOGY.* 131:16-26.
- Schwartz, T., and G. Blobel. 2003. Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell.* 112:793-803.
- Schweiger, R., N.C. Muller, M.J. Schmitt, J. Soll, and S. Schwenkert. 2012. AtTPR7 is a chaperone docking protein of the Sec translocon in Arabidopsis. *J Cell Sci.*
- Schweiger, R., and S. S. 2013. AtTPR7 as part of the Arabidopsis Sec post-translocon. *Plant Signal Behav.* 8.
- Schweiger, R., and S. Schwenkert. 2013. AtTPR7 as part of the Arabidopsis Sec post-translocon. *Plant Signal Behav.* 8.
- Schweiger, R., J. Soll, K. Jung, R. Heermann, and S. Schwenkert. 2013. Quantification of interaction strengths between chaperones and tetratricopeptide repeat domain-containing membrane proteins. *J Biol Chem.* 288:30614-30625.
- Scotti, P.A., M.L. Urbanus, J. Brunner, J.W. de Gier, G. von Heijne, C. van der Does, A.J. Driessen, B. Oudega, and J. Luirink. 2000. YidC, the Escherichia coli homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* 19:542-549.
- Seitl, I., S. Wickles, R. Beckmann, A. Kuhn, and D. Kiefer. 2014. The C-terminal regions of YidC from Rhodospirillum rubrum and Oceanicaulis alexandrii bind to ribosomes and partially substitute for SRP receptor function in Escherichia coli. *Mol Microbiol.* 91:408-421.
- Senthil-Kumar, M., and K.S. Mysore. 2011. Caveat of RNAi in plants: the off-target effect. *Methods Mol Biol.* 744:13-25.
- Settles, A.M., A. Yonetani, A. Baron, D.R. Bush, K. Cline, and R. Martienssen. 1997. Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science.* 278:1467-1470.
- Sharma, M.R., D.N. Wilson, P.P. Datta, C. Barat, F. Schluenzen, P. Fucini, and R.K. Agrawal. 2007. Cryo-EM study of the spinach chloroplast ribosome reveals the structural and functional roles of plastid-specific ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19315-19320.
- Shi, L.X., M. Hall, C. Funk, and W.P. Schroder. 2012. Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1817:13-25.

- Shimoni, E., O. Rav-Hon, I. Ohad, V. Brumfeld, and Z. Reich. 2005.** Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell*. 17:2580-2586.
- Sjuts, I., J. Soll, and B. Bolter. 2017.** Import of Soluble Proteins into Chloroplasts and Potential Regulatory Mechanisms. *Front Plant Sci*. 8:168.
- Sohrt, K., and J. Soll. 2000.** Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J. Cell Biol*. 148:1213-1221.
- Soll, J. 2002.** Protein import into chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol*. 5:529-535.
- Spence, E., S. Bailey, A. Nenninger, S.G. Moller, and C. Robinson. 2004.** A homolog of Albino3/Oxal is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J Biol Chem*. 279:55792-55800.
- Stengel, A., J.P. Benz, B.B. Buchanan, J. Soll, and B. Bolter. 2009.** Preprotein import into chloroplasts via the Toc and Tic complexes is regulated by redox signals in *Pisum sativum*. *Mol Plant*. 2:1181-1197.
- Stengel, K.F., I. Holdermann, P. Cain, C. Robinson, K. Wild, and I. Sinning. 2008.** Structural basis for specific substrate recognition by the chloroplast signal recognition particle protein cpSRP43. *Science*. 321:253-256.
- Sundberg, E., J.G. Slagter, I. Fridborg, S.P. Cleary, C. Robinson, and G. Coupland. 1997.** ALBINO3, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell*. 9:717-730.
- Szyrach, G., M. Ott, N. Bonnefoy, W. Neupert, and J.M. Herrmann. 2003.** Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J*. 22:6448-6457.
- Tajima, S., L. Lauffer, V.L. Rath, and P. Walter. 1986.** The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol*. 103:1167-1178.
- Tan, X., S. Yan, R. Tan, Z. Zhang, Z. Wang, and J. Chen. 2014.** Characterization and expression of a GDSL-like lipase gene from *Brassica napus* in *Nicotiana benthamiana*. *Protein J*. 33:18-23.
- Trager, C., M.A. Rosenblad, D. Ziehe, C. Garcia-Petit, L. Schrader, K. Kock, C.V. Richter, B. Klinkert, F. Narberhaus, C. Herrmann, E. Hofmann, H. Aronsson, and D. Schunemann. 2012.** Evolution from the prokaryotic to the higher plant chloroplast signal recognition particle: the signal recognition particle RNA is conserved in plastids of a wide range of photosynthetic organisms. *Plant Cell*. 24:4819-4836.
- Trosch, R., M. Topel, U. Flores-Perez, and P. Jarvis. 2015.** Genetic and Physical Interaction Studies Reveal Functional Similarities between ALBINO3 and ALBINO4 in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 169:1292-1306.
- Tzvetkova-Chevolleau, T., C. Hutin, L.D. Noel, R. Goforth, J.P. Carde, S. Caffarri, I. Sinning, M. Groves, J.M. Teulon, N.E. Hoffman, R. Henry, M. Havaux, and L. Nussaume. 2007.** Canonical signal recognition particle components can be bypassed for posttranslational protein targeting in chloroplasts. *Plant Cell*. 19:1635-1648.
- Urbischek, M., S. Nick von Braun, T. Brylok, I.L. Gugel, A. Richter, M. Koskela, B. Grimm, P. Mulo, B. Bolter, J. Soll, E. Ankele, and S. Schwenkert. 2015.** The extreme Albino3 (Alb3) C terminus is required for Alb3 stability and function in Arabidopsis thaliana. *Planta*. 242:733-746.
- Van Aken, O., T. Pecenkova, B. van de Cotte, R. De Rycke, D. Eeckhout, H. Fromm, G. De Jaeger, E. Witters, G.T. Beemster, D. Inze, and F. Van Breusegem. 2007.** Mitochondrial type-I prohibitins of Arabidopsis thaliana are required for supporting proficient meristem development. *Plant J*. 52:850-864.

- van Bloois, E., G.J. Haan, J.W. de Gier, B. Oudega, and J. Luirink. 2006. Distinct requirements for translocation of the N-tail and C-tail of the Escherichia coli inner membrane protein CyoA. *J Biol Chem.* 281:10002-10009.
- van Wijk, K.J. 2004. Plastid proteomics. *Plant Physiol Biochem.* 42:963-977.
- Voelker, R., and A. Barkan. 1995. Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J.* 14:3905-3914.
- Waegemann, K., H. Paulsen, and J. Soll. 1990. Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence. *FEBS Letters.* 261:89-92.
- Walker, M.B., L.M. Roy, E. Coleman, R. Voelker, and A. Barkan. 1999. The maize tha4 gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to hcf106, tatA, and tatB. *J Cell Biol.* 147:267-276.
- Walter, B., A. Hristou, M.M. Nowaczyk, and D. Schunemann. 2015. In vitro reconstitution of cotranslational D1 insertion reveals a role of the cpSec/Alb3 translocase and Vipp1 in photosystem II biogenesis. *Biochem J.*
- Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol.* 91:545-550.
- Wang, P., and R.E. Dalbey. 2011. Inserting membrane proteins: the YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta.* 1808:866-875.
- Watts, C., W. Wickner, and R. Zimmermann. 1983. M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:2809-2813.
- Wollman, F.A., L. Minai, and R. Nechushtai. 1999. The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes1. *Biochim Biophys Acta.* 1411:21-85.
- Woolhead, C.A., S.J. Thompson, M. Moore, C. Tissier, A. Mant, A. Rodger, R. Henry, and C. Robinson. 2001. Distinct Albino3-dependent and -independent pathways for thylakoid membrane protein insertion. *J Biol Chem.* 276:40841-40846.
- Yamamoto, M., D. Maruyama, T. Endo, and S. Nishikawa. 2008. Arabidopsis thaliana has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants. *Plant Cell Physiol.* 49:1547-1562.
- Yang, H., J. Liu, X. Wen, and C. Lu. 2015. Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms. *Biochim Biophys Acta.* 1847:838-848.
- Yi, L., F. Jiang, M. Chen, B. Cain, A. Bolhuis, and R.E. Dalbey. 2003. YidC is strictly required for membrane insertion of subunits a and c of the F(1)F(0)ATP synthase and SecE of the SecYEG translocase. *Biochemistry.* 42:10537-10544.
- Young, J.C., J. Ursini, K.R. Legate, J.D. Miller, P. Walter, and D.W. Andrews. 1995. An amino-terminal domain containing hydrophobic and hydrophilic sequences binds the signal recognition particle receptor alpha subunit to the beta subunit on the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 270:15650-15657.
- Yuan, J., R. Henry, M. McCaffery, and K. Cline. 1994. SecA homolog in protein transport within chloroplasts: evidence for endosymbiont-derived sorting. *Science.* 266:796-798.
- Yuan, J., A. Kight, R.L. Goforth, M. Moore, E.C. Peterson, J. Sakon, and R. Henry. 2002. ATP stimulates signal recognition particle (SRP)/FtsY-supported protein integration in chloroplasts. *J Biol Chem.* 277:32400-32404.
- Zhang, L., V. Paakkari, M. Suorsa, and E.M. Aro. 2001. A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis. *J Biol Chem.* 276:37809-37814.
- Ziehe, D., B. Dunschede, and D. Schunemann. 2017. From bacteria to chloroplasts: evolution of the chloroplast SRP system. *Biol Chem.* 398:653-661.

**Zopf, D., H.D. Bernstein, A.E. Johnson, and P. Walter. 1990.** The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *EMBO J.* 9:4511-4517.

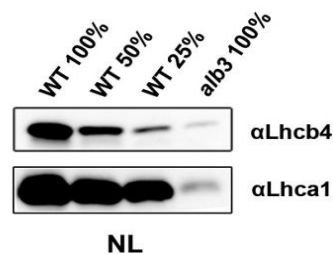
**Zopf, D., H.D. Bernstein, and P. Walter. 1993.** GTPase domain of the 54-kD subunit of the mammalian signal recognition particle is required for protein translocation but not for signal sequence binding. *J Cell Biol.* 120:1113-1121.

## 6. Anhang



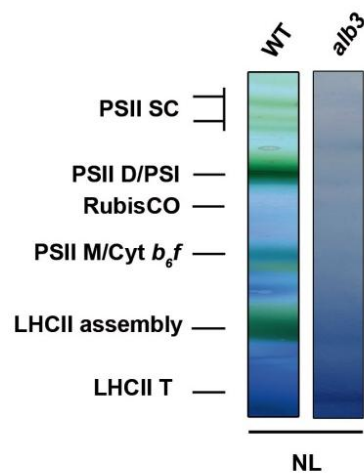
**Abbildung 21: Charakterisierung des Phänotyps der *tic20* unter CLL-Kondition.**

Phänotyp der homozygoten *tic20* unter konstantem Schwachlicht ( $10 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , CLL). Die Mutante wuchs heterotroph für 3 Wochen auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten mit 1 % Zucker. Für kultivierte WT-Pflanzen unter analogen Bedingungen siehe Abb. 4.



**Abbildung 22: Quantifizierung der akkumulierten Thylakoidmembranproteine in *alb3* und WT unter NL.**

Membranproteine aus WT und *alb3* wurden isoliert, aufgetrennt und mit Antikörpern gegen Lhcb4 und Lhca1 der Proteingehalt quantifiziert. Sowohl Lhcb4 als auch Lhca1 waren signifikant reduziert. 100 % Membranproteine entsprachen  $20 \mu\text{g}$  und wurden für den WT und *alb3* geladen.



**Abbildung 23: Analyse der Biogenese photosynthetischer Komplexe in WT und *alb3* unter NL.**

Thylakoide von WT und *alb3*-Mutanten wurden aus drei Wochen alten NL-Pflanzen isoliert, solubilisiert und per BN-PAGE in der ersten Dimension separiert. Thylakoidproteine äquivalent zu  $30 \mu\text{g}$  Chlorophyll des WT wurden auf das Gel geladen. Eine signifikante Reduktion photosynthetischer Komplexe ist deutlich in *alb3* sichtbar. SC=Superkomplex, D=Dimer, M=Monomer, T=Trimer und RC47 Komplex des PSII Reaktionszentrum mit dem CP47.

```

Alb3CT 338 LTNNVLSTAQQVYLR-KLGGAKPNMDENA---SKIISAGRAKRS-IAQPDDAGERFRQLKEQEKRSKKnkavAKDTVELV 413
OxaCT 302 AFNGAFSVLQTMILRnKwVRSKLKITEVAkprTPIAGASPTENMGIF--QSLKHNIQKARDQAERRQL----MQDNEKKL 376
YidCCT 332 -----MANVFQTIQTLILMREPLPENLQKLLDEQQKATQ----GRESLPFE 373

Alb3CT 414 EESQSESEEGSDDEEEEAREGALASSttskplpevgqrrsrkrkrrtv 462
OxaCT 377 QESFKEKRQNSKIKIVHKSNFINNKK----- 402
YidCCT 374 KKSSKKKEKTS----- 384

```

**Abbildung 23: Proteinsequenzvergleich der C-Termini von Alb3, Oxa1 und YidC.**

Multipler Proteinsequenzvergleich der C-terminalen Region von Alb3 aus *A. thaliana*, Oxa1 aus *S. cerevisiae* und YidcCT aus *Synechocystis* PCC 6803. Rot gekennzeichnete AS kennzeichnen hoch konservierte Aminosäurereste, blau weisen auf gering konservierte AS hin. Für den Sequenzvergleich wurde COBALT (National Center of Biotchnology Information) verwendet.

## Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an PD Dr. Serena Schwenkert für die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit. Eine bessere Betreuung bei gleichzeitiger Motivation und Begeisterung hätte ich mir nicht vorstellen können.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Jürgen Soll für seine Unterstützung danken, dafür dass ich meine Arbeit in seiner AG absolvieren durfte und für die ständige Motivation thematisch besser zu werden.

Prof. Dr. Andreas Klingl danke ich für die Übernahme des 2. Gutachtens und für die Anfertigung der Ultrastrukturenbilder meiner alb3 Mutante.

Natürlich gilt ein großes Dankeschön meinen Kollegen für die tolle Zeit innerhalb der Gruppe, für den spaßigen Laboralltag und die Hilfsbereitschaft. Besonders hervorheben möchte ich meine jahrelange (aber nun ehemalige) Kollegin Cathi für die tolle Stimmung im Labor, der Motivation trotz Misserfolges, kurioser Momente und das Kennenlernen veganen Essens (nicht). Diesbezüglich auch großen Dank an Betty und Inga für die vielen Gespräche und lustigen Momente im und außerhalb des Labors.

Der größte Dank geht allerdings an meine Familie, insbesondere an meine Eltern, die mich seit jeher unterstützen und hinter mir stehen, egal welche Entscheidungen ich in meinem Leben getroffen habe und ohne die ich nie bis zu diesem Punkt im Leben gekommen wäre.

Im Einklang dazu möchte ich mich bei meiner Freundin Sabrina bedanken, die mich täglich erträgt und es freiwillig auf sich nimmt. Natürlich auch für das Korrekturlesen der manchmal sehr seltsamen Sätze, die ich kreierte hatte.

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Familiennamen	Brylok
Vorname	Thomas
Geburtstag	04.09.1987
Geburtsort	Wolfsburg

### Schulische und universitäre Ausbildung

Seit 11/2013	<b>Doktorand</b>  Ludwig-Maximilians-Universität München These: Die SRP-abhängige Proteintranslokation des Chloroplasten und des endoplasmatischen Retikulums
10/2011-10/2013	<b>Master of science Biologie</b>  Martin Luther Universität Halle, Deutschland Gutachter: Prof. Hans-Hinrich Kaatz/ Dr. Daniela Kathmann Masterthese: Die Optimierung der proteolytischen Spaltung des humanen Proteins SPR25
10/2008-10/2011	<b>Bachelor of Science Biologie</b>  Martin Luther Universität Halle, Deutschland Gutachter: Prof. Gary Sawers/ Dr. Basem Soboh Bachelorthese: Charakterisierung der [NiFe]-Hydrogenase Reifungsproteine HypDEF
09/1994-07/2007	<b>Allgemeine Hochschulreife</b>  Albert Schweitzer Gymnasium Wolfsburg, Deutschland



## Publikationen

**Urbischek, M., S. Nick von Braun, T. Brylok, I.L. Gugel, A. Richter, M. Koskela, B. Grimm, P. Mulo, B. Bolter, J. Soll, E. Ankele, and S. Schwenkert. 2015.** The extreme Albino3 (Alb3) C-terminus is required for Alb3 stability and function in *Arabidopsis thaliana* *Planta*. 242:733-746.

**Nickel, C., T. Brylok, and S. Schwenkert. 2016.** *In vivo* Radiolabeling of Arabidopsis Chloroplast Proteins and Separation of Thylakoid Membrane Complexes by Blue Native PAGE. *Methods Mol Biol*. 1450:233-245

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „Die SRP-abhängige Proteintranslokation des Chloroplasten und des endoplasmatischen Retikulums“ von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich habe weder versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 09.03.2018

---

Thomas Brylok