

Charakterisierung und Klonierung

von Albino3

Diplomarbeit an der biologischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München



Vorgelegt im Dezember 2002
von Marko Böhm

Betreuer der Arbeit:
PD Dr. Lutz Eichacker

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	IV
1	Einleitung	1
1.1	Die vier Protein-Export-Wege an der Thylakoidmembran.....	1
1.2	Der Sec-abhängige und Sec-unabhängige cpSRP-Weg.....	3
1.3	Die YidC/Oxa1p/Alb3-Protein-Familie.....	6
1.4	Das Alb3-Protein in Chloroplasten.....	8
1.4.1	Das Alb3-Protein von <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
1.4.2	Das PPF1-Protein von <i>Pisum sativum</i>	10
1.4.3	Alb3-Homologe von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	11
2	Material	13
2.1	Chemikalien.....	13
2.2	Pflanzenmaterial.....	13
2.2.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	13
2.2.3	<i>Hordeum vulgare</i>	13
2.3	Antikörper.....	13
2.3.1	primäre Antikörper.....	13
2.3.2	sekundäre Antikörper.....	14
2.4	Bakterienstämme.....	14
2.5	Vektoren.....	14
2.6	Primer.....	14
2.7	Enzyme.....	15
2.8	Kits.....	15
3	Methoden	16
3.1	Biochemische Methoden.....	16
3.1.1	Anzucht der untersuchten Organismen.....	16
3.1.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.1.1.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16
3.1.1.3	<i>Hordeum vulgare</i>	16
3.1.2	Plastidenisolierung.....	17
3.1.2.1	Isolierung intakter Plastiden aus <i>A. thaliana</i>	17
3.1.2.2	Isolierung intakter Plastiden aus <i>C. reinhardtii</i>	17
3.1.2.3	Isolierung intakter Plastiden aus <i>H. vulgare</i>	18
3.1.3	Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration.....	19
3.1.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	19
3.1.4.1	Eindimensionale denaturierende PAGE (SDS-PAGE).....	19
3.1.4.2	Native Gelelektrophorese (BN-PAGE).....	20
3.1.4.3	Zweidimensionale nativ/denaturierende PAGE (2D BN-/SDS-PAGE).....	22
3.1.5	Färbung von Proteinen nach PAGE.....	22
3.1.5.1	Coomassie-Brilliant-Blue-R-250-Färbung.....	22
3.1.5.2	Silberfärbung.....	23

3.1.6	Western Blotting.....	23
3.1.7	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	24
3.1.7.1	Vorbereitung der Plastiden für die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	24
3.1.7.2	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	25
3.1.8	Sequenzauswertung und Datenbankanalyse für Proteine.....	25
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
3.2.1	Präparation kompetenter Bakterien für die Elektroporation.....	25
3.2.2	Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation.....	26
3.2.3	Plasmidisolierung (DNA-Mini-Präparation).....	26
3.2.4	Plasmidisolierung (DNA-Maxi-Präparation)	27
3.2.5	Plasmid-DNA Reinigung für die Sequenzierung.....	27
3.2.6	Fällung von DNA.....	27
3.2.6.1	Natriumacetat-Fällung.....	27
3.2.6.2	Ammoniumacetat-Fällung.....	28
3.2.6.3	Aufarbeitung des Fällungsansatzes.....	28
3.2.7	Agarosegelelektrophorese.....	28
3.2.8	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch die PCR.....	29
3.2.9	Restriktion von Plasmid-DNA.....	30
3.2.10	DNA-Sequenzierung mit dem ABI377-System.....	30
3.2.11	Sequenzauswertung und Datenbankanalysen für DNA.....	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Biochemische Ergebnisse.....	32
4.1.1	Herstellung von Alb3-Antikörpern.....	32
4.1.2	Identifizierung des Alb3-Proteins in Chloroplasten von <i>A. thaliana</i>	33
4.1.3	Identifizierung des PPF1-Proteins in Chloroplasten von <i>P. sativum</i>	36
4.1.4	Western-Analyse an Chloroplasten von <i>C. reinhardtii</i>	38
4.1.5	Western-Analyse an Chloroplasten von <i>H. vulgare</i>	42
4.1.6	Nachweis des Alb3-Proteins nach 2D-Gelelektrophorese.....	43
4.1.6.1	Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_1 nach 2D-Gelelektrophorese.....	44
4.1.6.2	Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_3 nach 2D-Gelelektrophorese.....	47
4.1.6.3	Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_RH nach 2D-Gelelektrophorese.....	50
4.1.7	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	52
4.1.7.1	Western-Analyse mit α -Alb3_1 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	52
4.2	Molekularbiologische Ergebnisse.....	56
4.2.1	Herstellung von alb3-cDNA.....	56
4.2.2	Überprüfung des Ausgangsmaterials auf die alb3-cDNA mit PCR.....	56
4.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA I.....	58
4.2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA mittels DNA-Mini-Präparation I.....	58
4.2.3.2	Kontroll-PCR der isolierten Plasmid-DNA aus 4.2.3.1.....	59
4.2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA mittels DNA-Maxi-Präparation I.....	60
4.2.3.4	Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation I aus 4.2.3.3.....	61
4.2.3.5	Sequenzierung der isolierten Plasmid DNA I.....	62
4.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA II.....	62

4.2.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA mittels DNA-Mini-Präparation II.....	62
4.2.4.2	Kontroll-PCR der isolierten Plasmid-DNA aus 4.2.4.1.....	64
4.2.4.3	Isolierung der Plasmid-DNA mittels DNA-Maxi-Präparation II.....	65
4.2.4.4	Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation II aus 4.2.4.3.....	65
4.2.4.5	Sequenzierung der DNA-Maxi-Präparation II und der PCR-Fragmente aus 4.2.4.4.....	66
5	Zusammenfassung.....	68
5.1	Biochemische Ergebnisse.....	68
5.2	Molekularbiologische Ergebnisse.....	68
6	Diskussion.....	69
6.1	Einsatz von Antikörpern.....	69
6.1.1	Eigene Western-Analysen zur Identifizierung von Alb3.....	70
6.1.1.1	Abundanz des Alb3-Proteins.....	70
6.1.1.2	verwendete Antikörper.....	73
6.1.1.3	Unspezifische Wechselwirkungen von Antikörpern.....	75
6.1.1.4	Tests der Antikörper in verschiedenen Organismen.....	77
6.1.1.5	Spezielle Probleme bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese.....	79
6.1.1.6	Spezielle Probleme bei der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation..	79
6.1.1.7	Technische Probleme während des Western Blottings.....	80
6.1.2	Ergebnisse aus der Literatur.....	81
6.1.2.1	Andere existierende Antikörper.....	81
6.1.3	Lokalisierung von Alb3.....	82
6.1.4	Aufklärung der Funktion von Alb3.....	84
6.1.5	Nachweis von Alb3-haltigen Komplexen.....	85
6.1.6	Schlussfolgerungen aus den biochemischen Ergebnissen.....	85
6.2	Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse.....	87
7	Literaturverzeichnis.....	89
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	94
9	Anhang.....	96
9.1	Größenangaben zu den Proteinen YidC, Oxa1p und Alb3.....	96
9.2	Alignment für die Proteine Alb3, Oxa1p und YidC.....	96
9.3	Alignment für die Proteine Alb3, PPF1 Alb3-1 und Alb3-2.....	97
9.4	Angaben zum lhcb1-Gen (cab3) aus <i>A. thaliana</i>	98
	Danksagung.....	99
	Erklärung.....	100

II Abkürzungen

aa	Aminosäure (amino acid)
ACA	ϵ -Aminocaprinsäure
Alb3	Albino3
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BN-PAGE	Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar(e) (Länge von Nukleinsäuresequenzen)
BSA	Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumin)
cDNA	komplementäre DNA (copy-DNA)
cp	Chloroplast
d	Tag (day)
ddH ₂ O	zweifach über Ionenaustauscher entsalztes Wasser
ddNTP	2'3'-Didesoxynucleosidtriphosphat
DM	N-Dodecyl- β -Maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (double stranded DNA)
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (enhanced chemo-luminescence)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GST	Gluthathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
HA	Hemagglutinin
HAc	Essigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase)
k.A.	keine Angabe
kbp	Basenpaare x 1000
kD	Dalton x 1000 (molekulare Masseneinheit)
kV	Volt x 1000
L.	Linné
LHCP	Lichtsammler-Komplex-Protein (light harvesting complex protein)
mA	Milliampère
max.	maximal
min	Minute
min.	mindestens
mRNA	Boten-RNA („messenger“-RNA)
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge X
Oxa	Oxidase-Assemblierungs-Protein (Oxidase assembly protein)
p.a.	pro analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PSI	Photosystem I

PSII	Photosystem II
Pt	Plastiden
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SB	Solubilisierungspuffer (solubilization buffer)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
Sec	sekretorisch (secretory)
SRP	Signalerkennungspartikel (signal recognition particle)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAT	Doppelt-Arginin Translokation (twin arginine translocation)
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris gepuffertes Salz (tris buffered salt)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TE(H)	Tris-EDTA-Puffer mit erhöhter EDTA-Konzentration (high)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
T _m	Schmelztemperatur
TM	transmembrane Region
TMK	Tris-Magnesium-Kalium-Puffer, pH 6,8
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Konzentration in Volumen pro Volumen
w/v	Konzentration in Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Die Benennung der Basen der DNA sowie die der Aminosäuren im Einbuchstabencode erfolgte gemäß der IUPAC-Nomenklatur.

1 Einleitung

Chloroplasten sind endosymbiontisch aufgenommene Zell-Organellen cyanobakteriellen Ursprungs. Sie sind strukturell komplex organisiert und bestehen aus mehreren Membranen, die wasserlösliche Kompartimente voneinander abgrenzen.

Die innerste Membran in Chloroplasten ist die Thylakoidmembran, die das Stroma vom Thylakoid-Lumen trennt. Sie ist das charakteristische Merkmal photosynthetischer Eukarya und Ort für die lichtgetriebene Photophosphorylierung. In und an der Thylakoidmembran werden für diesen Prozess wenigstens vier supramolekulare, membranintegrale Proteinkomplexe aufgebaut, die einen Quanten-, Elektronen- und Protonen-Transfer katalysieren (Murphy, 1986).

Zusammen mit dem endoplasmatischem Reticulum und der inneren Membran der Mitochondrien stellt die Thylakoidmembran darüber hinaus eine der Proteinexport-Membranen der photosynthetischen Zelle dar.

1.1 Die vier Protein-Export-Wege an der Thylakoidmembran

Obwohl Chloroplasten ihr eigenes Genom und die Fähigkeit zur Proteinsynthese besitzen, wird die Mehrheit der Proteine der Thylakoidmembran vom Nukleus kodiert, im Cytoplasma synthetisiert und von einem Translokations-Mechanismus durch die beiden Hüllmembranen transportiert (Soll et al., 2002). Die importierten Vorläufer-Proteine werden im Stroma zu spezifischen Intermediaten prozessiert und über einen von vier möglichen Transportwegen in die Thylakoidmembran oder durch sie hindurch ins Lumen der Thylakoide exportiert (siehe Abb. 1). Jeder der vier Protein-Export-Wege transportiert dabei einen anderen Satz an Proteinen (Cline und Henry, 1996; Keegstra und Cline, 1999; Dalbey und Robinson, 1999) und benötigt unterschiedliche Energie- und Proteinfaktoren. Die Sortierung der Proteine wird dabei zum Teil über sogenannte Signal-Peptide vermittelt, die als Erkennungssequenz dafür sorgen, dass das jeweilige Protein an seinen Bestimmungsort geleitet wird.

Eine Möglichkeit Proteine in die Thylakoidmembran zu integrieren, wird der „spontane“ oder der „direkte“ Integrations-Weg genannt. Die Bezeichnung macht bereits deutlich, dass neben dem exportiertem Protein keine weiteren Faktoren an der Translokation beteiligt sind. CFo-II,

PsbW und PsbX sind Proteine, die über diesen Weg in die Thylakoidmembran exportiert werden (Schleiff und Klösgen, 2001). Signal-Peptide dieses Export-Weges gleichen den Membran-Integrations-Signalen aus Bakterien (Dalbey und Kuhn, 2000).

Die anderen drei Export-Wege haben sich im Laufe der Evolution aus den Protein-Export-Weegen des prokaryotischen Endosymbionten entwickelt. Der prokaryotische Ursprung von bisher identifizierten Komponenten der Export-Wege cpSec (chloroplast secretory), Δ pH/cpTAT (Δ pH/chloroplast twin arginine translocation) und cpSRP (chloroplast signal recognition particle) ist unverkennbar.

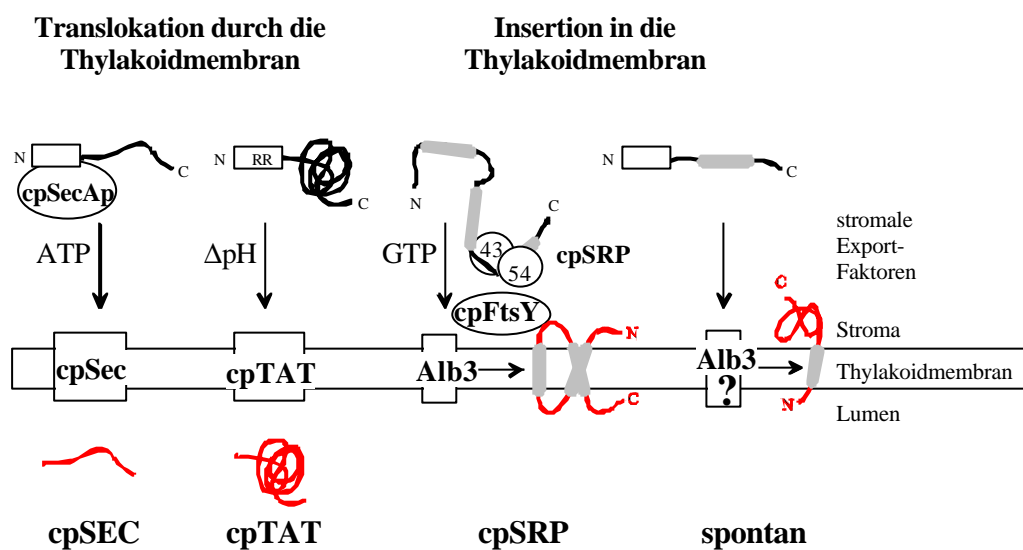


Abbildung 1 (Eichacker und Henry, 2001): Proteinexport an der Thylakoidmembran. In Chloroplasten sind vier, voneinander unabhängige Transportwege beschrieben, die entweder ein N-terminales Signalpeptid (N-terminale Box; cpSec, cpTAT, spontan) und stromale Faktoren (cpSec, cpSecA), keine N-terminale Signal-Sequenz aber stromale Faktoren (cpSRP mit cpSRP43 und 54), oder nur eine Signal-Sequenz, die ausschließlich dem „targeting“ des Proteins zur Thylakoidmembran dient (cpTAT, spontan), benötigen. Weitere Erläuterungen hierzu sind im Text zu finden.

Die Translokation verschiedener luminaler Proteine wird über den cpSec-Weg vermittelt. Plastocyanin, OE33, PsaF und das plastidär kodierte Cytochrom f sind Proteine, die diesen Weg nutzen (Hulford et al., 1994; Karnaukov et al., 1994; Yuan and Cline, 1994). Analog zum bakteriellen Sec-Weg ist cpSecA auch für den cpSec-Weg eine wichtige Komponente, da es durch ATP-abhängige Zyklen von Membraninsertion und -deinsertion die zu transportierenden Proteine durch den Translokator-Komplex, der mindestens aus cpSecY und cpSecE besteht (Schuenemann et al., 1999), drückt. Obwohl der cpSec-Weg nicht in der Lage ist, Δ pH-abhängig translozierte Proteine wie OE23, zu transportieren, kann ein pH-Gradient

über die Thylakoidmembran den cpSec-Weg stimulieren (Mori und Cline, 2001). Die Signal-Peptid-Sequenzen für den cpSec-Weg gleichen sehr stark denen von Proteinen, die in Bakterien über den Sec-Weg exportiert werden (Robinson und Klösgen, 1994).

Ein anderer Transportweg für luminal Proteine wie OE23, OE17, PsbT und PsaN, hängt von einem pH-Gradienten über die Thylakoidmembran ab. Dieser sogenannte Δ pH/cpTAT-Weg benötigt neben einem pH-Gradienten außerdem die Membranproteine Hcf106, cpTatC und Tha4, jedoch keine stromalen Faktoren (Chaddock et al., 1995). Die über diesen Weg exportierten Proteine sind entweder ganz oder teilweise gefaltet (Robinson, 2000) und weisen in ihren N-terminalen Signalsequenzen ein charakteristisches, sogenanntes „twin arginine“-Motif auf, das aus zwei zusammenhängenden Arginin-Resten besteht (Mori und Cline, 2001).

Der vierte Transportweg von kernkodierte Proteinen zur Thylakoidmembran ist der sogenannte cpSRP-Weg, der chlorophyll-bindende Proteine der Lichtsammelkomplexe (LHCP) transportiert. Komponenten dieses GTP-abhängigen cpSRP-Weges sind cpSRP43, cpSRP54 und cpFtsY als lösliche bzw. peripher-membranassoziierte Proteine und das in der Thylakoidmembran lokalisierte Albino3 (Alb3) (Schuenemann et al., 1998; Tu et al., 1999; Moore et al., 2000). Das stromale Protein cpSRP43 ist allein in Chloroplasten zu finden, während cpSRP54 Homologe in Säugetieren (SRP54) und Bakterien (Ffh) besitzt (Keegstra und Cline, 1999). Ein Modell für den Transport und die Membraninsertion von LHCP sieht die Bindung von importierten LHCP an ein cpSRP bestehend aus zwei cpSRP43- und einer cpSRP54-Untereinheit zur Bildung des sogenannter Transit-Komplexes vor (Schuenemann et al., 1998). Neuere Daten deuten aber auf ein cpSRP als Heterodimer aus je einer cpSRP43- und cpSRP54-Untereinheit hin (Eichacker und Henry, 2001 und Abb. 2). Dieser Transit-Komplex leitet LHCP an die Thylakoidmembran, an der die Insertion erfolgt. Für diese Insertion nach einem noch nicht bekannten Mechanismus wird offensichtlich cpFtsY und Alb3 benötigt.

1.2 Der Sec-abhängige und Sec-unabhängige cpSRP-Weg

Mutanten, Organismen mit genetischen Veränderungen, stellen in der Biologie ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung komplexer, molekularer Wechselwirkungen dar. Ist die genetische

Veränderung bekannt, können aus den Auswirkungen auf den Organismus Rückschlüsse auf die Funktion der veränderten Komponente gezogen werden.

Es wurden bereits verschiedene Mutanten von Genen, die für Komponenten der oben genannten Transportwege in Mais (z.B. *Hcf106*, *cpSecA* (*tha1*) und *cpSecY* (*csy1*) (Voelker und Barkan, 1995; Voelker et al., 1997; Roy und Barkan, 1998) und *A. thaliana* (z. B. *cpSRP43* (*chaos*), *cpSRP54* (*ffc1-1*), *Alb3* (*albino3*) und *cpFtsY* (Klimyuk et al., 1999; Pilgrim et al., 1998; Amin et al., 1999; Sundberg et al., 1997; Hutin und Nussaume, unveröffentlicht) beschrieben.

Alle Mutanten mit Mutationen in Genen, die für Komponenten des cpSRP-Weges kodieren, zeigen unterschiedliche Phänotypen und unterschiedliche Effizienzen im LHCP-Transport (Klimyuk et al., 1999; Amin et al., 1999; Sundberg et al., 1997; Hutin und Nussaume, unveröffentlicht). Dies spricht für weitere Funktionen einiger der cpSRP-Komponenten.

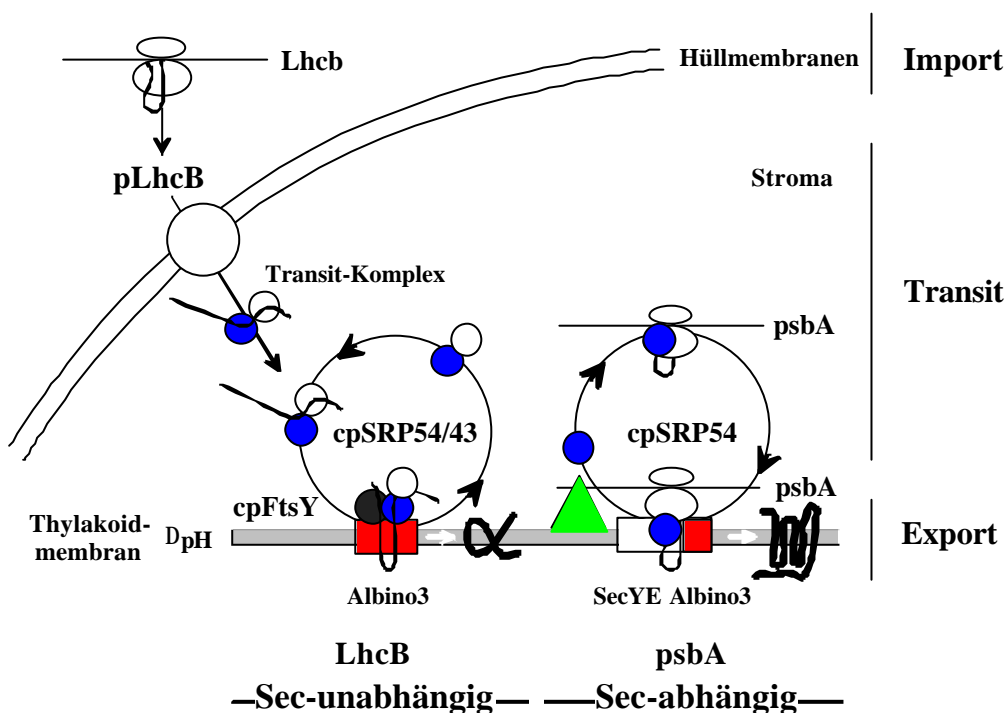


Abbildung 2 (Eichacker und Henry, 2001): cpSRP-Weg: posttranslationaler (Sec-unabhängiger) und kotranslationaler (Sec-abhängiger) Export in die Thylakoidmembran. Erläuterungen sind im Text zu finden.

Für cpSRP54 wurden zum Beispiel zwei verschiedene Komplex-Populationen beobachtet (Abb. 2). Die eine ist am posttranslationalen, sec-unabhängigen Export von LHCII in die Thylakoidmembran beteiligt. Das LHC-Protein der Thylakoidmembran, das den Lichtsammler-Komplexe des Photosystems II in höheren Pflanzen mit aufbaut, ist im Zellkern

der Zelle kodiert, wird im Cytoplasma als Vorläufer-Protein translatiert und posttranslational über die beiden Hüllmembranen des Chloroplasten importiert (Schleiff und Soll, 2000). Im Chloroplasten wird das Vorläufer-Protein prozessiert und LHCP wird mit Hilfe eines cpSRP-abhängigen Transit-Komplexes bestehend aus cpSRP43, cpSRP54 und cpFtsY (Abb. 2; weiße, blaue und schwarze Kreise) an die Thylakoidmembran geleitet (Dalbey und Kuhn, 2000; Tu et al., 1999). Die Sec-unabhängige Membran-Insertion wird durch einen Δ pH stimuliert und das Vorhandensein des zum bakteriellen YidC und zum mitochondriellen Oxa1p homologen Alb3-Proteins (Abb. 2; rote Box) ist eine Voraussetzung dafür (Moore et al., 2000).

Die andere cpSRP54-Population ist am kotranslationalen, Sec-abhängigen Export von Proteinen in die Thylakoidmembran beteiligt. Es wurde gezeigt, dass das im Chloroplasten-Genom kodierte Protein D1, an einem Komplex bindet, der wenigstens aus cpSRP54, Ribosomen, dem naszierenden D1 und der *psbA* mRNA besteht. Dieses impliziert für cpSRP54 eine Sortierungs-Funktion (Nilsson et al., 1999). Diese Interaktion zwischen der naszierenden Kette von D1 und cpSRP54 hat allerdings nur während der Sortierung an die Thylakoidmembran bestand und wird nach der Integration des D1-Proteins in die Thylakoidmembran nicht mehr beobachtet (Zhang und Aro, unveröffentlicht). Die Sortierung der *psbA* mRNA an die Thylakoidmembran könnte darüber hinaus durch die Membran-Assoziation von Translations-Initiations-Regulatoren (Abb. 2; grünes Dreieck) unterstützt werden (Hauser et al., 1998; Rochaix, 1996).

Das Alb3-Protein wurde als Membrankomponente des cpSRP-Weges durch spezifische Blockierung seiner Exportfunktion mittels Antikörper, der gegen das Alb3-Protein der Thylakoidmembran aus *A. thaliana* gerichtet war, identifiziert (Moore et al., 2000). Ebenso wie für cpSRP54 wurde für das Alb3-Protein eine Beteiligung an der Membraninsertion von naszierendem D1 postuliert (Eichacker und Henry, 2001 und Abb. 2). In neueren Studien an der *C. reinhardtii*-Mutante *ac29*, in der das Alb3-Homolog fehlt, konnte gezeigt werden, dass der Export des D1-Proteins in die Thylakoidmembran tatsächlich durch das Fehlen von Alb3 beeinflusst wird. So kann in der *ac29*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nur etwa halb so viel D1-Protein nachgewiesen werden, während andere Proteine und Protein-Komplexe der Thylakoidmembran wie PsaE, der Cytochrom b_6f -Komplex und die ATP-Synthase scheinbar nicht betroffen sind (Bellafiore et al., 2002). Dass die Membran-Insertion an einem Alb3 enthaltendem cpSecYE-Translocon auch Sec-abhängig und kotranslational ablaufen kann, geht aus den Studien mit cpSecY-Null-Mutanten (Roy und Barkan, 1998) und Studien, die die

Funktion des zu Alb3 homologen YidC-Proteins aus Bakterien untersuchen, hervor (Samuelson et al., 2000).

CpSRP43 hingegen scheint spezifisch am posttranslationalen Export der Proteine in die Thylakoidmembran involviert zu sein, da keine Interaktionen mit naszierenden D1-Ketten nachgewiesen werden konnten.

1.3 Die YidC/Oxa1p/Alb3-Protein-Familie

Mitochondrien besitzen zwei Membranen: die innere und die äußere Membran. Chloroplasten haben drei verschiedene Membranen: die äußere und innere Hüllmembran, sowie die Thylakoidmembran. Die innere Membran der Mitochondrien, sowie die Thylakoidmembran der Chloroplasten gleichen der inneren Membran von *E. coli* in vielen Aspekten und es überrascht nicht, dass Ähnlichkeiten zwischen den generellen Protein-Sortierungs-Wegen an diesen Membranen bestehen (Dalbey und Kuhn, 2000).

Eine über die Evolution konservierte Proteinfamilie mit Homologen in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten ist hier am Proteinexport beteiligt. In *E. coli* ist es das Protein YidC, das in der inneren Membran lokalisiert ist. YidC ist homolog zu Oxa1p in Mitochondrien und Alb3 in Chloroplasten (siehe Anhang Tab. I und Abb. I). Für das Endoplasmatische Reticulum, einer Membran, an der ebenso Protein-Export stattfindet, wurde bisher kein Homolog gefunden.

YidC ist je nach zu exportierendem Protein, entweder als eigenständige Einheit oder als Komponente des SecYEG-Translokons an der Translokation von Proteinen beteiligt (Scotti et al., 2000). Da Mitochondrien keinen SecYEG-ähnlichen Komplex besitzen, wird vermutet, dass Oxa1p entweder an sich ein neues Translokon in der inneren Membran von Mitochondrien bildet, oder zumindest an der Formation eines solchen beteiligt ist. Für Alb3, das homologe Protein in Chloroplasten, wurde die Möglichkeit einer Beteiligung an einem Sec-abhängigen und einem Sec-unabhängigen Mechanismus bereits beschrieben (Eichacker und Henry, 2001 und Abb. 2).

Pflanzen weisen mit Oxa1p in Mitochondrien und Alb3 in Chloroplasten zwei Homologe für den Proteinexport mit unterschiedlicher Lokalisation auf. Oxa1p ist in der inneren Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae* essentiell an der Biogenese von Proteinen der

Atmungskette, speziell der Cytochrom Oxidase und der F_1F_0 ATPase, beteiligt (Altamura et al., 1996; Hell et al., 1998). Da aber in der pflanzlichen *albino3*-Mutante keine Hemmung der mitochondrialen Cytochrom Oxidase-Aktivität festgestellt werden konnte, ergibt sich die Frage, welche unterschiedlichen Funktionen die homologen Proteine Oxa1p und Alb3 bei der Biogenese von Proteinen in der inneren Membran der Mitochondrien und der plastidären Thylakoidmembran übernehmen (Sundberg et al. 1997).

Während die Funktion von Alb3 durch seine spezifische Blockierung mittels Antikörper aufgeklärt werden konnte (Moore et al., 2000), kann über den zu Grunde liegenden Mechanismus des Protein-Exportprozesses wenig ausgesagt werden. Bislang wird lediglich vermutet, dass eine Störung der Wechselwirkung des stromalen LHCP/cpSRP54-Komplexes mit dem Membranrezeptor cpFtsY oder eine direkte Hemmung eines Alb3 enthaltenden Translocons zur Hemmung der Membranintegration führen könnte. Zur Funktion des mitochondrialen Homologen Oxa1p liegen bereits umfangreiche Daten vor. Das Oxa1-Protein formt in der inneren Mitochondrien Membran einen Translokationskomplex, der wahrscheinlich aus vier Oxa1p Monomeren besteht (Nargang et al. 2002). Weiter wurde beschrieben, dass Oxa1p in Abhängigkeit vom Membranpotential über der inneren Membran gemäß der „positive-inside“-Regel den Export hydrophiler N-terminaler Enden des COXII-Proteins katalysiert (Herrmann et al., 1995; Hell et al., 1998). Der Mechanismus der Translokation könnte somit nach Anbindung der Exportproteine an den Translokationsapparat zum Teil auf der elektrophoretischen Wirkung des Membranpotentials (negative Matrix-, positive Intermembranseite) auf die negativ geladenen Sequenzabschnitte der Exportproteine beruhen (Herrmann et al., 1997). Für den Export hydrophiler Domänen, die zwischen zwei paarweise inserierten transmembranen Domänen liegen, könnte sowohl ein elektrophoretischer Effekt, wie auch die Hydrophobizität der benachbarten Transmembran-Domänen regulierend wirken (Date et al., 1980; Schuenemann et al., 1999).

Neben den Alb3-Homologen, die zum Protein-Export in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten verwendet werden, gibt es weitere zu Alb3 homologe Proteine, die andere Funktionen wahrnehmen.

So wurde in *Bacillus subtilis* das SpoIIIJ-Protein identifiziert, das sowohl zu Oxa1p und zu Alb3 Homologien aufweist (Errington et al. 1992; Tjalsma et al., 2000). SpoIIIJ wird in *B. subtilis* als Sporulationsgen beschrieben, dessen Inaktivierung einen Zellzyklus-„arrest“ in einem Zwischenschritt der Sporenformation bewirkt. Aus der Homologie zu YidC aus *E. coli*

wird für SpoIIIJ eine Translokase-Aktivität abgeleitet. In Lokalisierungsstudien mit GFP wurde das Protein in vegetativen Zellen in der Zellmembran und in sporulierenden Zellen in den sporulationsspezifischen Septen nachgewiesen (Murakami et al., 2002).

In *A. thaliana* wurde vor Kurzem das Artemis-Protein entdeckt, das in die Chloroplasten-Teilung involviert ist (Fulgosi et al, 2002). Artemis hat ein apparentes Molekulargewicht von 110 kD, ist im Zellkern kodiert und in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten lokalisiert. Das Protein ist aus drei Modulen aufgebaut: einer N-terminalen, Rezeptor-ähnlichen Domäne, einem zentralen Glycin-Strang mit einer Nukleotid-Bindungsstelle und einer C-terminalen YidC/Oxa1p/Alb3-Protein Translokase-ähnlichen Domäne. Die Inaktivierung des Proteins in *A. thaliana* resultiert in spezifischen Defekten bei der Chloroplastenteilung. Das Cyanobakterium *Synechocystis* besitzt ebenfalls ein Artemis-Homolog, dessen Inaktivierung in der *DI471*-Mutante Defekte bei der Zellteilung, jedoch keine bei der Protein-Sortierung, verursacht. *DI471*-Mutanten konnten durch Transformation mit der Alb3-Domäne von Artemis komplementiert werden und waren wieder teilungsfähig. Artemis stellt auf Grund der Homologie und der ähnlichen Funktion in *Synechocystis* und *A. thaliana*, eine Verbindung zwischen prokaryotischer Zell- und Teilung der Chloroplasten dar.

1.4 Das Alb3-Protein in Chloroplasten

Das im Zellkern kodierte Alb3-Gen wurde durch ein „Screening“ entdeckt, das speziell darauf abzielte *A. thaliana* Mutanten mit Defekten in der Pigmentierung zu finden (Sundberg et al., 1997). Die *albino3*-Mutante besaß im Phänotyp Chloroplasten mit abnormaler Morphologie und sehr wenigen Thylakoidmembranen. Inzwischen wurden in anderen Organismen zu Alb3 homologe Proteine gefunden (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht über bekannte Alb3-Homologe der Thylakoidmembran. Die Signalsequenzen wurden mit ChloroP (siehe 3.1.8) und die transmembranen Domänen mit TMPred vorausgesagt (siehe 3.1.8).

Protein	Organismus	Vorläufer-Protein		Signal-Sequenz AS	matures Protein		TM-Domänen	Referenz
		AS	kD		AS	kD		
Alb3	<i>A. thaliana</i>	462	50,2	55	407	44,6	5	Sundberg et al., 1997
PPF1	<i>P. sativum</i>	442	48,2	29	413	45,0	5	Moore et al., 2000
Alb3-1	<i>C. reinhardtii</i>	495	51,6	42	453	46,9	6	Bellafigliore et al., 2002
Alb3-2	<i>C. reinhardtii</i>	422	44,7	51	371	39,4	5	Bellafigliore et al., 2002

1.4.1 Das Alb3-Protein von *Arabidopsis thaliana*

Das Alb3-Vorläuferprotein von *A. thaliana* hat eine Größe von etwa 50 kD (462 AS) und wird nukleär kodiert. Nach dem Import in den Chloroplasten wird die 55 Aminosäuren lange Signalsequenz von der „leader“-Peptidase abgeschnitten. Das mature Protein hat somit eine errechenbare Größe von ca. 44,6 kD (Tab. 1 und Abb. 3).

MARVLVSSPSSFFGSPLIKPSSSLRHSGVGGGGTAQFLPYRSNNNKLF[▼]TSTTV[▼]RFSLNEI
 PPFHGLDSSVDIGAIFTRAESLLYTIADA[▲]AVVGADSVVTTDSSAVQKSGGWFGFISDAMELV
 LKILKDGLSAVHV[▲]PYAYGF[▲]AIILLTIIVKAATYPLTKQQVESTLAMQNLQPKIKAIQQRYAG
 NQERIQLETSRLYKQAGVNPLAGCLPTLATIPVWIGLYQALS[▲]NVANEGLFTEGFFWIPSLGG
 PTSIAARQSGSGISWLF[▲]PFVDGHPPLGWYDTVAYLVLPVLLIASQYV[▲]SMEIMKPPQTDDPAQ
 KNTLLVFKFLPLMIGYFALSVP[▲]SGLSIYWL[▲]TNNVLSTAQQVYLRK[▲]LGGA[▲]KNMDENASKIIS
 AGRAKRSIAQPDDAGERFRQLKEQE[▲]KRSKKNKAVAKDTVELVEESQSESEEGSDDEEE[▲]EARE
 GALASSTTSKPLPEV[▲]GQRRSKRSKRKRTV

Abbildung 3: Die Aminosäure-Sequenz des Alb3-Proteins von *A. thaliana*. Die unterstrichenen Bereiche entsprechen den vorausgesagten transmembranen Domänen des Proteins (TMPred; siehe 3.1.8). Das Dreieck (▼) kennzeichnet die berechnete Prozessierungsstelle (ChloroP; siehe 3.1.8).

Eine Topologie Analyse mit dem TMPred-Programm sagte fünf transmembrane Bereiche voraus, die jeweils mindestens eine Länge von 17 Aminosäuren aufweisen (Tab. 1 und Tab. 2). Die α -Helices sind vorwiegend im mittleren Bereich des Proteins zu finden, so dass sich sowohl der N- als auch der C-Terminus weit in ein lösliches Kompartiment erstreckt. Der höchste Score (6769; Summe aus den einzelnen Scores der vorausgesagten transmembranen Bereiche) wurde für eine N_{in}-C_{out}-Orientierung angegeben (Tab. 2; A). In der Literatur ist allerdings eine N_{out}-C_{in}-Orientierung für das Protein postuliert worden (Moore et al., 1997), die mit dem Programm TMPred einen minimal kleineren Score (6695) erzielte (Tab. 2; B).

Tabelle 2: Transmembran-Domänen des Alb3-Proteins von *A. thaliana*. Die Analyse wurde mit dem Programm TMPred (siehe 3.1.8) durchgeführt. Um als Transmembran-Domäne (TM) zu gelten ist für eine Abfolge an Aminosäuren ein Score von >500 nötig; (A) die mit dem Score von 6769 als wahrscheinlichste angegebene N_{in}-C_{out}-Orientierung; (B) die mit dem Score von 6695 als alternativ angegebene N_{out}-C_{in}-Orientierung.

(A)

TM	von	bis	Score	Orientierung
1	136	154	1577	i-o
2	205	223	1107	o-i
3	233	253	962	i-o
4	273	294	1520	o-i
5	318	338	1603	i-o

(B)

TM	von	bis	Score	Orientierung
1	136	156	1882	o-i
2	207	223	1004	i-o
3	233	253	915	o-i
4	275	294	1111	i-o
5	318	340	1783	o-i

1.4.2 Das PPF1-Protein von *Pisum sativum*

Das zu Alb3 homologe PPF1-Protein von *P. sativum* wurde mit Hilfe einer BLAST-Datenbank-Analyse entdeckt (Moore et al., 2000). Das PPF1-Vorläuferprotein besteht aus 442 Aminosäuren, seine Molekularmasse beträgt ca. 48 kD und es wird nukleär kodiert. Nach dem Import in den Chloroplasten, wird eine 29 Aminosäuren lange Signalsequenz von der „leader“-Peptidase abgeschnitten und das mature Protein hat eine Größe von ca. 45 kD. Das PPF1-Protein verfügt wie das Alb3-Protein von *A. thaliana* über fünf transmembrane Domänen, für die das TMPred-Programm eine N_{out}-C_{in}-Orientierung voraussagt (Tab. 1 und Abb. 4).

MAKTLISSPSFLGTPPLPSLHRTFSPNRTR ▼ LFTKVQFSFHQLPPIQSVSHSVDLSGIFARA
EGLLYTLADATVAADAAASTDVAAQKNGGWFGEISDGMFVLKVLKDGSSVHVVPYSYGFAL
ILLTVIVKAATLPLTKQQVESTLAMQNLPKIKAIQERYAGNQERIQLETSRLYTQAGVNPL
AGCLPTLATIPVWIGLYQALSNVANEGLLTEGFLWIPSLGGPTSIAARQSGSGISWLFPPVD
GHPLLGWYDTAAAYLVLPVLLIVSQYVSMEIMKPPQTNDPNQKNTLLIFKFLPLMIGYFSLSV
PSGLTIYWFTNNVLSTAQQVWLRKLGAKPAVNENAGGIITAGQAKRSASKPEKGGERFRQL
KEEEKKKKLIKALPVEEVQPLASASASNDGSDVENNKEQEVTEESNTSKVVSQEVQSFSTRERR
SKRSKRKPVA

Abbildung 4 Die Aminosäure-Sequenz des PPF1-Proteins von *P. sativum*. Die unterstrichenen Bereiche entsprechen den vorausgesagten transmembranen Domänen des Proteins (TMPred; siehe 3.1.8). Das Dreieck (▼) kennzeichnet die berechnete Prozessierungsstelle (ChloroP; siehe 3.1.8).

Die Lokalisierung des PPF1-Proteins in der Thylakoidmembran der Chloroplasten von *P. sativum* ist bereits durch Antikörper-Studien (Moore et al, 2000), sowie über radioaktive Importstudien nachgewiesen worden (Moore und Henry, unveröffentlicht).

Auch der Nachweis für die Funktion von Alb3-Homologen erfolgte mit dem zu Alb3 homologen PPF1-Protein. Mit Hilfe von Antikörpern gegen eine Sequenz aus dem Alb3-Protein von *A. thaliana* wurde die Membraninsertion von LHCP in *P. sativum* blockiert und damit gezeigt, dass das Alb3-Protein am LHCP-Export in die Thylakoidmembran der Chloroplasten beteiligt ist (Moore et al., 2000). LHCP wird im Zellkern kodiert und benötigt für die Sortierung an die Thylakoidmembran cpSRP und FtsY (Li et al., 1995; Tu et al., 1999; High et al., 1997). Da die Membranintegration von LHCP durch Antikörper gegen cpSecY nicht gestört wird, legt dies eine Sortierung von LHCP mittels cpSRP/FtsY hin zu Alb3 nahe.

1.4.3 Alb3-Homologe von *Chlamydomonas reinhardtii*

In *C. reinhardtii* wurden vor kurzem zwei Alb3-Homologe (Alb3-1 und Alb3-2) entdeckt (Bellafiore et al. 2002 und Tab. 1). Da in der Literatur jedoch nur das Alb3-1-Protein biochemisch untersucht wurde, wird in der vorliegenden Arbeit nur dieses berücksichtigt.

Das Alb3-1-Vorläuferprotein von *C. reinhardtii* besteht aus 495 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von ca. 52 kD und wird nukleär kodiert. Nach dem Proteinimport durch die Hüllmembranen des Chloroplasten wird die 42 Aminosäuren lange Signalsequenz von der „leader“-Peptidase abgeschnitten und das mature Protein hat eine errechnete Größe von ca. 47 kD. Die sechs transmembranen Domänen, aus denen das Protein besteht, durchspannen die Thylakoidmembran vermutlich in einer N_{in}-C_{in}-Orientierung (Tab. 1 und Abb. 4).

MSSSMCLARCSASLSAGNFPSRMFMGRRLHAQRRTRTLQLRCA ▼ ASLLPDQPTLAASSAISPV
PSDLPEVLGDALHRLGAIYVLADASASTAAAAMPTAVDSAAGAAPQRAGGWVAPVADALEQ
VLYALQEGLDKLVHPYSYGYSIILLTLIVKLLTYPLTKQOVESAMAVQALKPRIDLKDRFG
EDDKKIQKETSVLVEQAGVNPLAGCLPTLATIPIFIGLFSSTNVANDGLLDTQGFYFVPSL
AGPTTMAMRQSGLGTSWLWPLGPDGAPPIGWEDAAAYLTLP~~LLLVAVQY~~ASSSVTSPPIDPK
DENANTQRALLVFLPLMVGWFSLNVPAGLSLYYLANTVLS~~SAIQIYLK~~KLGGANVVMNELGP
VTKPGSGRRNGVAAGEWSVWKPATVLT~~TAEAAKARAEAE~~EAEVERAREAAE~~EEEEAAAA~~AFDNAS
VSLSVDDSTAAIAGTATMAVTAGAPAAAMDP~~SKVNR~~RCKRRRLTSLVQDGSTASAAVAGASA

Abbildung 5 Die Aminosäure-Sequenz des Alb3-1-Proteins von *C. reinhardtii*. Die unterstrichenen Bereiche entsprechen den vorausgesagten transmembranen Domänen des Proteins (TMPred; siehe 3.1.8). Das Dreieck (▼) kennzeichnet die berechnete Prozessierungsstelle (ChloroP; siehe 3.1.8).

In der Literatur wurde das Alb3-1-Protein von *C. reinhardtii* als ein etwa 55 kD Protein nachgewiesen (Bellafiore et al., 2002). Der Nachweis erfolgte in der *C. reinhardtii ac29*-Mutante, die mit einem dreifach-Hemagglutinin (HA) etikettierten *alb3-1*-Gen komplementiert worden war. Der HA-„tag“, der aus 27 Aminosäuren bestand, war für die Identifikation des Proteins mittels Antikörper notwendig geworden, weil die Antikörper-Herstellung gegen eine Sequenz des Alb3-1-Proteins zuvor erfolglos gewesen war.

Weiterhin wurde in dieser Publikation die Beteiligung der Alb3-Homologen an der Integration von LHCP und D1 in die Thylakoidmembran untermauert, in dem reduzierte LHCP- und D1-Mengen in der *ac29*-Mutante nachgewiesen wurden. Diese Daten unterstützen die Vermutung, dass Alb3 sowohl eine Komponente des posttranslationalen, Sec-

unabhängigen als auch des kotranslationalen, Sec-abhängigen Protein-Exportwegs an der Thylakoidmembran ist (Eichacker und Henry, 2001 und Abb. 2).

Das Alb3-1-Protein scheint in *C. reinhardtii* in zwei Komplexen (60 bis 80 kD und 600 bis 700 kD) vorzuliegen, die mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließender Western-Analyse identifiziert werden konnten. Es ist jedoch nicht sicher, dass diese beiden Komplexe tatsächlich in dieser Form in *C. reinhardtii* existieren, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Komplexe auf den zuvor zur Detektion in der Western-Analyse eingeführten HA-„tag“ zurückzuführen sind.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a. Qualität und wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, ICN, Merck, Roth und Sigma bezogen.

2.2 Pflanzenmaterial

2.2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana L., Stamm Landsberg erecta.

2.2.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii cw15-: Kernmutante mit reduzierter Zellwand (Harris, 1989)

2.2.3 *Hordeum vulgare*

Hordeum vulgare L., Sommergerste, Stamm Steffi; Saatzucht Dr. J. Ackermann & Co, Irlbach.

2.3 Antikörper

2.3.1 primäre Antikörper

- α -Alb3_1 polyklonales Antiserum aus Kaninchen (Tier 1) gegen ein Peptid aus dem Alb3-Protein (AS 296 bis 311) von *A. thaliana* mit der Sequenz:
NH₂-MEIMKPPQTDDPAQK-CONH₂
(verwendete Verdünnung: 1:1000; hergestellt von Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland)
- α -Alb3_3 polyklonales Antiserum aus Kaninchen (Tier 3) gegen ein Peptid aus dem Alb3-Protein (AS 296 bis 311) von *A. thaliana* mit der Sequenz:
NH₂-MEIMKPPQTDDPAQK-CONH₂
(verwendete Verdünnung: 1:1000; hergestellt von Pineda Antikörper Service, Berlin, Deutschland)
- α -Alb3_RH polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen ein Fusionsprotein aus GST-Alb3-50aa. Alb3-50aa ist ein 50 Aminosäuren langes Peptid mit der Sequenz aus *A. thaliana*:
NH₂-PLTKQQVESTLAMQNLQPKIKAIQQRYAGNQERIQLETSRLYKQAGVNPL-CONH₂
(verwendete Verdünnung: 1:2000; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Ralph Henry, Department of Biological Sciences; University of Arkansas, Fayetteville, AR, USA)

α -Alb3_CTerm polyklonales Antiserum aus Huhn gegen den C-Terminus des Alb3-Proteins von *A. thaliana* (genaue Sequenz des Epitops nicht bekannt). (verwendete Verdünnung: 1: 2500; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Laurent Nussaume, Carbon Metabolism Laboratory – DEVM, CEA Cadarache, St Paul lez Durance, Frankreich)

2.3.2 sekundäre Antikörper

α -Kaninchen Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase) gekoppeltes F(ab')₂-Fragment aus Esel gegen Kaninchen. (verwendete Verdünnung: 1:5000; Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland)

α -Huhn Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase) gekoppeltes F(ab')₂-Fragment aus Kaninchen gegen Huhn. (verwendete Verdünnung: 1:5000; Pierce, USA)

2.4 Bakterienstämme

Stamm DH5 α (Hanahan, 1983)

Genotyp F', endA1, deoR, hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺), supE44 thi-1, recA1, gyrA96, (Nal^r), relA1 Δ , (lacZYA-argF)_{U169}, (80lcZ Δ M15); Rezipientenstamm für die Vermehrung von Plasmidvektoren und deren Derivaten

2.5 Vektoren

pBluescript[®] II SK + (Stratagene; Katalog 1999, S. 347)

2.6 Primer

Tabelle 3: Verwendete Primer. Alb3-Primer (hergestellt von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland); M13 (Stratagene; zur Verfügung gestellt von Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reinhold Herrmann, Botanisches Institut, LMU München, Deutschland)

Name	Sequenz	Orientierung	T _m
Alb3 fw	5'-CTC ATC CTC CTC TCA AGC TC-3'	-22 bis -3	59,4 °C
Alb3 rev	5'-AAC AAA ACT GAA GCG GGC ATG-3'	+1648 bis +1628	57,9 °C
M13 fw	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	-	54,5 °C
M13 rev	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'	-	52,8 °C

2.7 Enzyme

<i>Eco</i> RI, <i>Hinf</i> I	New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland)
Taq Polymerase	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNase A (Plasmid-Maxi-Präparations-Kit)	Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig, Deutschland)

2.8 Kits

Qiagen [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiagen [®] Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Biochemische Methoden

3.1.1 Anzucht der untersuchten Organismen

3.1.1.1 *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana-Samen wurden in einer Anzuchtschale (21 x 35 cm) auf Einheitserde ausgesät und für 4 Wochen im Gewächshaus in einem 8 h Tag / 16 h Nacht Belichtungsrythmus angezogen.

3.1.1.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Kultivierung des *C. reinhardtii* Stammes *cw15*- erfolgte auf TAP-Festmedium (TAP mit Agar [1,8 % (w/v)]; Gorman und Levine, 1965). Ausgehend von 50 ml Vorkulturen (TAPS-Flüssigmedium; 4 Tage; 40 μ E / m²s; 25 °C) wurden 1000 ml Rührkulturen mit TAPS-Flüssigmedium [2 % (v/v)] angeimpft und kultiviert.

TAP-Medium	10 mM	Tris / HOAc; pH = 7,0
	2,5 %	4 x Beijerinck
	0,1 %	1M (K)PO ₄
	0,1 %	Trace
TAPS-Flüssigmedium	0,1 %	Sorbitol in TAP-Medium
4 x Beijerinck	1,6 %	NH ₄ Cl
	2,0 %	CaCl ₂ x 2H ₂ O
	2,0 %	MgSO ₄ x 7H ₂ O; pH = 7,0
1M (K)PO ₄	0,6 M	K ₂ HPO ₄
	0,4 M	KH ₂ PO ₄
	pH = 7,0	
Trace (Hutner et al., 1950)	5,0 %	EDTA
	5,0 %	ZnSO ₄ x 7H ₂ O
	1,14 %	H ₃ BO ₃
	0,51 %	MnCl ₂ x 4H ₂ O
	0,50 %	FeSO ₄ x 7H ₂ O
	0,16 %	CoCl ₂ x 6H ₂ O
	0,16 %	CuSO ₄ x5H ₂ O
	0,01 %	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O
	1,60 %	KOH

3.1.1.3 *Hordeum vulgare*

H. vulgare-Samen wurden in einer Anzuchtschale (21 x 35 cm) auf Vermikulit angesät (2-3 Samen / cm²), gut mit Wasser befeuchtet und mit einer dünnen Schicht Vermikulit bedeckt. Die Anzucht erfolgte unter einer Lichtbank bei Raumtemperatur für 4,5 Tage.

3.1.2 Plastidenisolierung

3.1.2.1 Isolierung intakter Plastiden aus *A. thaliana*

Die für die Plastidenisolierung benötigten Geräte und Medien wurden auf ca. 4 °C vorgekühlt und sämtliche Isolierungsschritte erfolgten, soweit möglich, auf Eis bzw. in Eiswasser.

Keimlinge einer Anzuchtschale wurden mit einer Schere ca. 0,5 cm oberhalb des Bodenniveaus abgeschnitten und gewogen. Zu jeweils 3 g Pflanzenmaterial wurden 20 ml eisgekühltes Isolierungsmedium hinzugegeben. Das Pflanzenmaterial wurde mit einem Stabmixer (Multiquick MR 404 Typ 4179, Braun) für 5 s fein zerkleinert und der Zellaufschluss über acht Lagen Baumwollgaze filtriert. Der Rückstand wurde in ca. 5 ml Isolierungsmedium je 3 g Pflanzenmaterial aufgenommen, mittels Stabmixer weiter aufgeschlossen und wie oben erwähnt filtriert. Das vereinigte Filtrat wurde zentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge; Rotor A-4-62; 3800 x g; 1 min; 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet in möglichst wenig Isolierungsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf einen eisgekühlten PercollTM-Stufengradienten (30 % / 80 %) geschichtet. Nach der Zentrifugation in einem Ausschwingrotor (HB-4 Rotor; 4100 x g; 20 min; 4 °C) waren zwei Banden zu erkennen. Die obere Bande mit den lysierten Plastiden wurde verworfen und die intakten Plastiden, die sich auf der 80 % PercollTM-Stufe befanden, wurden abgehoben. Die Suspension mit den intakten Plastiden wurde mit Isolierungsmedium auf mindestens das Vierfache verdünnt und die Plastiden erneut pelletiert (Heraeus Tischzentrifuge; Rotor A-4-62; 4100 x g; 3 min; 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in ca. 1 ml Isolierungsmedium aufgenommen.

Isolierungsmedium	0,33 M	Sorbitol
	50mM	Tris / HCl; pH = 8,0
	20mM	EDTA
	0,1%	β-Mercaptoethanol
40% Percoll TM	40 %	Percoll TM
	0,4 M	Sorbitol
	50 mM	HEPES / KOH; pH = 8,0
	2 mM	EDTA
80% Percoll TM	80 %	Percoll TM
	0,4 M	Sorbitol
	50 mM	HEPES / KOH; pH = 8,0
	2 mM	EDTA

3.1.2.2 Isolierung intakter Plastiden aus *C. reinhardtii*

C. reinhardtii-Zellen einer 1000 ml Kultur (Zelldichte etwa 2 bis 3 x 10⁶ Zellen / ml) wurden abzentrifugiert (GS-3 Rotor; 4000 x g; 10 min; 4 °C) und das erhaltene Pellet in 45 ml isotonischem Puffer aufgenommen. Anschließend wurden 5 ml einer 10 %igen Saponin-Lösung hinzugegeben, um eine 1,0 %ige Saponin-Endkonzentration zu erhalten. Die Zelldichte betrug nun in etwa 1 x 10⁷ / ml. Die Zellen wurden vorsichtig geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Suspension zentrifugiert (SS34 Rotor; 6000 x g; 1 min; 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in ca. 6 ml isotonischem Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde im Anschluss daran auf einen vorbereiteten, eisgekühlten PercollTM-Stufengradienten (35 % / 75 % in isotonischem Puffer) geschichtet und zentrifugiert (HB-4 Rotor; 4100 x g; 30 min; 4 °C). Die Chloroplasten an der Grenze zwischen dem 35 und 75 %igem PercollTM wurden abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Nun wurden die

Chloroplasten mit mindestens dem 2,5-fachen Volumen an isotonischem Puffer verdünnt und erneut zentrifugiert (SS34 Rotor; 6000 x g; 10 min; 4 °C). Das Pellet enthält die intakten Chloroplasten und kann, in einem der Ausbeute angemessenen Menge an isotonischem Puffer, aufgenommen werden.

Isotonischer Puffer	10 mM Tricine / HCl; pH = 7,8	
	5 mM	MgCl ₂
	0,3 M	Sorbitol
10 %ige Saponin-Lösung	10 %	Saponin in isotonischem Puffer; pH = 7,8

3.1.2.3 Isolierung intakter Plastiden aus *H. vulgare*

Die für die Plastidenisolierung benötigten Geräte und Medien wurden auf ca. 4 °C vorgekühlt. Sämtliche Isolierungsschritte erfolgten, soweit möglich, auf Eis bzw. in Eiswasser.

Keimlinge einer Anzuchtschale wurden mit einer Schere ca. 1 cm oberhalb des Samens abgeschnitten und in ca. 400 ml eisgekühlten Isolierungsmedium gesammelt. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst mit einer Schere grob und anschließend mit einem drehzahlregulierbaren Ultrathurax (Homogenisator, PT 10-35, Messerinnendurchmesser: 27 mm, Bachofer) fein zerkleinert. Der Zellaufschluss wurde über vier Lagen Baumwollgaze und eine Lage Nylongaze (Porengröße 22 µm) filtriert. Der Rückstand wurde in ca. 300 ml Isolierungsmedium mittels Ultrathurax weiter aufgeschlossen und wie bereits erwähnt erneut filtriert. Das vereinigte Filtrat wurde zentrifugiert (GS-3 Rotor; 3800 x g; 1 min; 4 °C), der Überstand dekantiert und das Pellet in ca. 6 ml Isolierungsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde durch die Nylongaze auf einen vorbereiteten, eisgekühlten PercollTM-Stufengradienten (40 % / 80 %) geschichtet. Nach der Zentrifugation in einem Ausschwingrotor (HB-4 Rotor; 4100 x g; 7,5 min; 4 °C) wurde die 40 %-Stufe mit den lysierten Plastiden verworfen und die intakten Plastiden auf der 80 %-Stufe wurden abgehoben. Diese Suspension wurde mit Waschmedium auf mindestens das Vierfache verdünnt und die Plastiden erneut pelletiert (HB-4 Rotor; 4100 x g; 3 min; 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in ca. 200 µl Waschmedium resuspendiert.

Isolierungsmedium	0,4 M	Sorbitol
	50mM	Tris / HCl; pH = 8,0
	20mM	EDTA
40% Percoll TM	40 %	Percoll TM
	0,4 M	Sorbitol
	50 mM	HEPES / KOH; pH = 8,0
	2 mM	EDTA
80% Percoll TM	80 %	Percoll TM
	0,4 M	Sorbitol
	50 mM	HEPES / KOH; pH = 8,0
	2 mM	EDTA
Waschmedium	0,4 M	Sorbitol
	50mM	HEPES / KOH; pH = 8,0

3.1.3 Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration

Die Menge an einzusetzendem Material für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) oder Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde über die Chlorophyll-Konzentration (Arnon, 1949) der jeweils isolierten Plastiden quantitativ bestimmt.

Je nach Ausbeute wurde zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration ein Aliquot von 2 oder 20 µl zu 998 bzw. 980 µl 80 % Aceton gegeben. Dieser Ansatz wurde zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 1 min; 4 °C), um die ausgefallenen Proteine zu pelletieren. Anschließend wurde die Extinktion bei 652 nm im Photometer (UV-1202 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu) gegen 80 % Aceton gemessen.

Die Berechnung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E = c * d * \epsilon$$

E = Extinktion

d = Schichtdicke in cm (bei der benutzten Küvette 1 cm)

c = Konzentration

ε = molarer Extinktionskoeffizient

Diese Formel wurde umgeformt, so dass sich folgende Berechnungsgrundlage ergab:

$$c(\text{Chl}) [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \frac{OD_{652} * V(S)}{34,5 * V(P)}$$

OD₆₅₂ = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 652 nm

V(S) = Volumen des Überstandes in µl

V(P) = Volumen der Probe vor der Verdünnung in µl

3.1.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

3.1.4.1 Eindimensionale denaturierende PAGE (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zur Trennung von SDS-denaturierten Proteinen entsprechend der Molekularmasse verwendet (Laemmli 1970).

Die Proteinproben wurden dazu mit der Hälfte des Probenvolumens mit Denaturierungspuffer versetzt und für 15 min bei 50 °C inkubiert. Das Gel hatte eine Größe von 20 cm x 20 cm x 0,075 cm (Protean II; Bio-Rad). Das Sammelgel besaß eine Acrylamidkonzentration von 5 % und das Trenngel eine Acrylamidkonzentration von 10 % oder 12,5 %. Der Gellauf erfolgte je Gel (in die Protean II-Apparatur konnten bis zu zwei Gele eingespannt werden) bei 20 mA für 20 min und anschließend bei 15 °C entweder bei 6 mA je Gel über Nacht oder bei 30 mA je Gel für 3 Stunden.

Anschließend wurden die Gele entweder gefärbt (siehe 3.1.5) und getrocknet (GelAir Dryer, Bio Rad), oder für einen Western Blot (siehe 3.1.6) verwendet.

Denaturierungspuffer	6 %	SDS
	30 %	Saccharose
	200 mM	Na ₂ CO ₃
	0,09 %	Bromphenolblau
	0,6 %	β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS

Sammelgel	5 %	PAA (Acrylamid / Bisacrylamid = 30 / 0,8)
	0,125 M	Tris / HCl; pH = 6,8
	0,01 %	TEMED
	0,1 %	APS
Trenngel	10 bzw. 12,5 %	PAA (Acrylamid / Bisacrylamid = 30 / 0,8)
	0,375 M	Tris / HCl; pH = 8,8
	4 M	Harnstoff
	0,01 %	TEMED
	0,1 %	APS

3.1.4.2 Native Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die native Gelelektrophorese (Schägger et al. 1991 und 1994) wurde zur Auftrennung von Proteinkomplexen entsprechend ihrer Molekularmasse durchgeführt.

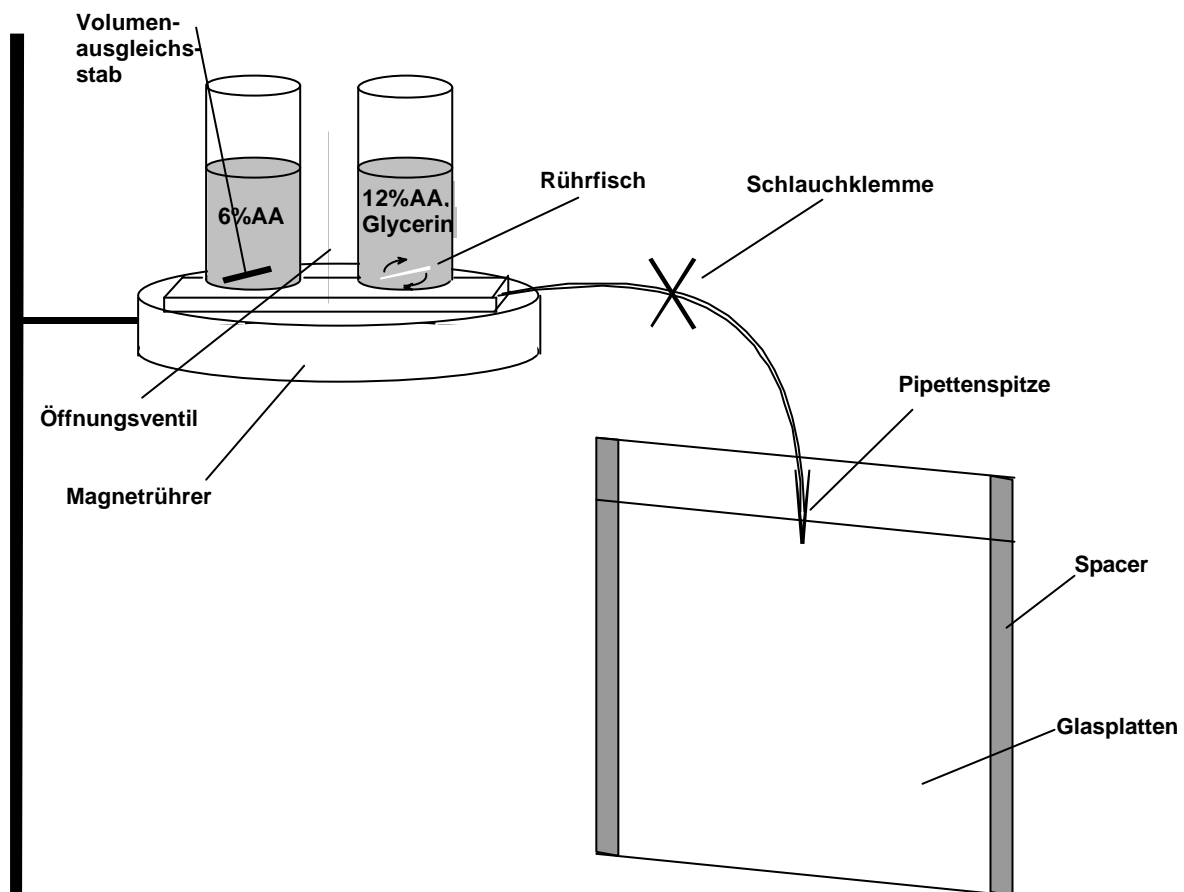


Abbildung 6: (Bisle, 2000): Schematische Darstellung der Gießapparatur zur Anfertigung eines Gradientengels. Der Gradientenmischer wies eine leichte Neigung zum Gel hin auf, damit ein gerichteter Fluss der Polyacrylamidlösungen ermöglicht wurde. Der mit einer Schlauchklemme verschlossene Schlauch, der den Gradientenmischer mit den Glasplatten verband, wurde in der Mitte der beiden Glasplatten befestigt und mündete in eine schräg abgeschnittene Pipettenspitze (Ausgangsdurchmesser 1 mm). Der Verbindungskanal zwischen den beiden Kammern des Gradientenmischers war ebenfalls geschlossen. In die erste Mischkammer vor dem Ausfluss wurde die 12 %ige Polyacrylamidlösung gegeben.

Anschließend öffnete man den Verbindungsgang am Öffnungsventil kurzzeitig soweit, dass sich dieser mit der Polyacrylamidlösung füllte. Die zweite Kammer wurde mit der 6 %igen Polyacrylamidlösung gefüllt und ein Volumenausgleichsstab in die Kammer gegeben. Nachdem in beide Kammern APS und TEMED gegeben wurde, wurden die Lösungen gemischt und der Verbindungsgang zwischen den Kammern geöffnet. Mit dem Entfernen der Schlauchklemme wurde das Gießen des Gradientengels gestartet.

Das verwendete Polyacrylamidgel hatte eine Größe von 20 cm x 20 cm x 0,075 cm (Protean II; Bio-Rad), bestand aus einem 6 bis 12 %igem linearem Gradientengel als Trenngel und einem 4 %igem Sammelgel. Das Gradientengel wurde mittels eines Gradientengelmischers (Werkstatteigenbau; Kammerdurchmesser 2,4 cm) gegossen (Abb. 6). Alle Lösungen zum Gießen des Gels wurden vor Gebrauch auf 4 °C gekühlt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in feuchte Tücher eingeschlagen und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt (max. 4 d).

Vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel wurden die Chloroplasten pelletiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 4100 x g; 3 min; 4 °C), in 70 µl ACA-Puffer resuspendiert und mit 10 µl einer 10%igen N-Dodecyl-β-Maltosid-Lösung 10 min auf Eis solubilisiert. Die Probe wurde anschließend abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 21000 x g; 3 min; 4 °C) und mit 5 µl Beladungslösung gemischt. Jetzt konnten die Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert werden.

Die für die Elektrophorese benötigten Puffer wurden auf 4 °C vorgekühlt. Der Gellauf erfolgte für 3 bis 4 Stunden bei 4 °C und 12 mA je Gel (in die Protean II-Apparatur konnten bis zu zwei Gele eingespannt werden). Nachdem die Lauffront des mit Coomassie-G gefärbten Kathodenpuffers etwa die Hälfte des Trenngels erreicht hatte, wurde dieser aus dem oberen Puffertank abgesaugt und durch einen ungefärbten Kathodenpuffer ersetzt.

Die hier beschriebene BN-PAGE wird im Folgenden als „erste Dimension“ bezeichnet.

Trenngel	6 bzw. 12 %	PAA (Acrylamid / Bisacrylamid = 30 / 0,8)
	500 mM	ε-Aminocapronsäure
	50 mM	Bis-Tris / HCl; pH = 7,0
	20 %	Glycerin; (nur bei 12 % PAA)
	0,05 %	TEMED
	0,015 %	APS
Sammelgel	4 %	PAA (Acrylamid / Bisacrylamid = 30 / 0,8)
	500 mM	ε-Aminocapronsäure
	50 mM	Bis-Tris / HCl; pH = 7,0
	0,05 %	TEMED
	0,015 %	APS
ACA-Puffer	750 mM	ε-Aminocapronsäure
	50 mM	Bis-Tris / HCL; pH = 7,0
	0,5 mM	EDTA
Beladungslösung	5 %	Serva Blue G
	750 mM	ε-Aminocapronsäure
Anodenpuffer	50 mM	Bis-Tris / HCl; pH = 7,0

gefärbter Kathodenpuffer	50 mM 15 mM 0,02 %	Tricine Bis-Tris / HCl; pH = 7,0 Coomassie-G
ungefärbter Kathodenpuffer	50 mM 15 mM	Tricine Bis-Tris / HCl; pH = 7,0

3.1.4.3 Zweidimensionale nativ/denaturierende PAGE (2D BN-/SDS-PAGE)

Mit einer Hintereinanderausführung von BN-PAGE und SDS-PAGE wurden Proteinkomplexe (erste Dimension = nativ) in ihre Einzelproteine (zweite Dimension = denaturierend) zerlegt. Die Auftrennung in beiden Dimensionen erfolgte in Abhängigkeit von der Molekularmasse.

Das Trenngel der Gele (für Ettan Dalt II; Amersham Pharmacia Biotech) bestand standardmäßig aus 12,5 %igem Polyacrylamid. Auf jedes der Trenngele wurde nach der Polymerisation noch ein ca. 1 cm hohes Sammelgel mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 5 % gegossen. (Lösungen, siehe 3.1.4.1)

Für den Lauf der zweiten Dimension wurden die Spuren aus der BN-PAGE (3.1.4.2) mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und unter leichtem Schütteln für 20 min in SDS-Solubilisierungslösung (50 ml / Gelstreifen) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die BN-Streifen kurz abgetupft und luftblasenfrei auf das SDS-Gel von der Größe 25,5 cm x 20,5 cm x 0,1 cm) aufgelegt. Zusätzlich zum Gelstreifen wurde ein kleines Stück Whatmanpapier (3 mm x 3 mm) mit 10 µl Proteinmarker (Low Molecular Weight Marker; Amersham Pharmacia Biotech) getränkt und ebenfalls auf das Sammelgel aufgelegt. Die verbleibenden Hohlräume wurden mit 0,5 %iger Agarose (in Laufpuffer) aufgefüllt.

Der gesamte Gellauf fand bei einer konstanten Temperatur von 15 °C statt. Zum Einlaufen der Proteine in das Gel wurde zunächst für 20 min eine Stromstärke von 30 mA je Gel eingestellt, die dann für den weiteren Lauf über Nacht auf 16 mA je Gel gesenkt wurde. Im Ettan Dalt II-System konnten bis zu zwölf Gele gleichzeitig laufen gelassen werden und zur Füllung der Pufferkammer wurden ca. 10 l SDS-Laufpuffer (pH = 8,4) benötigt.

SDS-Solubilisierungs-Puffer	2% 66 mM 2 %	SDS Na ₂ CO ₃ β-Mercaptoethanol
-----------------------------	--------------------	---

3.1.5 Färbung von Proteinen nach PAGE

3.1.5.1 Coomassie-Brilliant-Blue-R-250-Färbung

Zur Detektion von Proteinen wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese unter leichtem Schwenken für 60 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Proteine und Gel färben sich blau. Der blaue Hintergrund wurde dann durch 30 bis 60 minütiges Schwenken in 1. Entfärber zunächst reduziert und das Gel danach bis zur nahezu vollständigen Entfärbung im 2. Entfärber belassen. Anschließend wurden die Gele gescannt und entweder mit Silber gefärbt oder zwischen zwei Zellophan-Folien (Amersham Pharmacia Biotech) in einem Heisslufttrockner (GelAir Dryer, Bio Rad) getrocknet.

Coomassie-Färbelösung	40 % 10 % 0,2 %	Ethanol (mit Methanol vergällt) Essigsäure Coomassie-Brilliant-Blue-R-250
-----------------------	-----------------------	---

1. Entfärber	40 % 10 %	Ethanol (mit Methanol vergällt) Essigsäure
2. Entfärber	10 %	Essigsäure

3.1.5.2 Silberfärbung

Die im Vergleich zur Coomassie-Färbung um etwa den Faktor 10 sensitivere Silberfärbung erfolgte nach dem in Tabelle 4 aufgeführten Protokoll (Heukeshoven und Dernick, 1988):

Tabelle 4: Silberfärbeprogramm. Silberfärbeprogramm für Gele der Größe 20 cm × 20 cm × 0,075 cm; Alle Chemikalien wurden in ddH₂O gelöst. Für ein Gel wurden von jeder Lösung 150 ml benötigt, wobei die Silber- und Entwickler-Lösung frisch angesetzt wurden.

Vorgang	Lösung	Zeit [min]
Fixieren	40 % Ethanol	30
	10 % Essigsäure	
Sensibilisierung	30 % Ethanol	30
	10 % Essigsäure	
	4 % Natriumthiosulfat; [5 % w/v]	
	0,5 M Natriumacetattetrahydrat	
Waschen	ddH ₂ O	3×5
Färben	14,6 mM Silbernitrat	20
	0,04 % Formaldehyd (37 % w/v)	
Waschen	ddH ₂ O	2×1
Entwickeln	0,57 M Natriumcarbonat	2-30
	0,02 % Formaldehyd (37 % w/v)	
Stoppen	39,2 mM Na ₂ -EDTA-dihydrat	10
Waschen	ddH ₂ O	3×5
Konservieren	10 % Glycerin	30

3.1.6 Western Blotting

Für die Western-Analyse wurden ungefärbte SDS-Gele nach der Elektrophorese (siehe 3.1.4.1 und 3.1.4.3) in Transfer-Puffer auf unterstützte Nitrocellulosemembranen (Optitran BA-S 85, Schleicher und Schüll) entweder nach dem Tankblot-Verfahren (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979) für 18 Stunden bei 400 mA und 4 °C (Hoefer Dalt 10, Amersham Pharmacia Biotech) oder nach dem Semi-dry-Blot-Verfahren (Bjerrum und Schäfer-Nielsen, 1986) für eine Stunde bei 400 mA und Raumtemperatur (Multiphor, Amersham Pharmacia Biotech) transferiert. Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden mit Ponceau S (Salinovich und Montelaro, 1986) angefärbt. Zunächst wurde der Blot in Wasser gewaschen und die Markerbanden mit einem Buntstift markiert. Danach wurde die Nitrozellulosemembran durch Waschen mit TBS-Puffer entfärbt und für mindestens eine Stunde in Blocking-Puffer inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tab. 5) in Blocking-Puffer über Nacht bei 4 °C. Ungebundene Reste des ersten Antikörpers wurden durch dreimaliges Waschen der Nitrozellulosemembran mit TBS-Puffer (jeweils 15 min) entfernt. Nun erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden, HRP-gekoppelten zweiten Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in Blocking-Puffer. Die Detektion des zweiten Antikörpers erfolgte nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer (jeweils 15 min) durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL;

Durrant, 1990; Schneppenheim et al., 1991). Dazu wurde die Nitrozellulosemembran für eine Minute in einer 1:1 Mischung von Lösung A und Lösung B inkubiert, in eine aufgeschnittene Prospekthülle gelegt und mit einem Röntgenfilm (HyperfilmTM ECLTM; Amersham Pharmacia Biotech) bei Raumtemperatur für ein bis 10 Minuten exponiert. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte nach Herstellerangaben.

Tabelle 5: Verdünnungen der ersten Antikörper.

Erster Antikörper	Verdünnung
α -Alb3_1	1:1000
α -Alb3_3	1:1000
α -Alb3_RH	1:2000
α -Alb3_CTerm	1:2500

Transfer-Puffer	48 mM 39 mM 0,037 % 20 %	Tris Glycin SDS Methanol
Ponceau S	0,2 % 1 %	Ponceau S Essigsäure
TBS-Puffer	10 mM 150 mM	Tris / HCl; pH = 7,5 NaCl
Blocking-Puffer	5 %	Milchpulver (in TBS-Puffer)
Lösung A	100 mM 0,4 mM 250 mM	Tris / HCl; pH = 8,5 pCoumarsäure (in DMSO) Luminol
Lösung B	100 mM 0,0183 %	Tris / HCl; pH = 8,5 H ₂ O ₂

3.1.7 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

3.1.7.1 Vorbereitung der Plastiden für die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Nach Isolierung der intakten Plastiden wurde ein Aliquot entsprechend einer Chlorophyll-Menge von 300 μ g pelletiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 3000 x g; 3 min; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Lyse und Solubilisierung in 500 μ l TMK-Puffer und 50 μ l DM-Lösung vorsichtig auf Eis für 10 min resuspendiert.

Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge; 21000 x g; 10 min; 4 °C) wurde der Überstand auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten geschichtet.

TMK-Puffer	10 mM 10 mM 20 mM	Tris / HCl; pH = 6,8 MgCl ₂ KCl
DM-Lösung	10 %	N-Dodecyl- β -Maltosid

3.1.7.2 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Der lineare Saccharosegradient wurde aus je 5,5 ml einer 0,1 M und einer 1,0 M Saccharoselösung mit Hilfe eines Gradientenmischers (Werkstatteigenbau; Kammerdurchmesser 2,4 cm) und einer Peristaltikpumpe (Minipuls 2, Gilson; Pumpgeschwindigkeit = 1,5 ml / min) gegossen.

Nach Überschichten des Gradienten mit der Probe, wurde diese mittels Ultrazentrifugation (SW40 IT Rotor; 190000 x g, 16,5 h, 4 °C) getrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient von oben nach unten in 1,0 ml Fraktionen aufgeteilt.

Saccharoselösung	0,1 bzw. 1,0 M	Saccharose (in TMK-Puffer)
	0,06 %	N-Dodecyl- β -Maltosid

3.1.8 Sequenzauswertung und Datenbankanalyse für Proteine

Die aufgeführten Proteinsequenzen stammen aus dem Online-Service-Bereich des Schweizerischen Instituts für Bioinformatik (<http://www.expasy.org/>) und des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Die Voraussage von transmembranen Bereichen wurde mit dem Online Programm TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) durchgeführt. Die Berechnungen für die Länge der Signalsequenzen von Proteinen wurde mit dem Programm ChloroP durchgeführt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>). Alignments von Proteinen wurden mit dem Programm CLUSTAL W durchgeführt (Thompson et al. 1994).

3.2 Molekularbiologische Methoden

Alle Lösungen, Puffer und Medien für den molekularbiologischen Bedarf wurden, wenn nicht anders angegeben, für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Es wurden ausschließlich autoklavierte Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet.

3.2.1 Präparation kompetenter Bakterien für die Elektroporation

Für die Präparation elektrokompetenter Bakterienzellen wurden 200 ml 2YT-Flüssigmedium mit einer frischen 2 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 der Kultur herangezogen (3 bis 4 Stunden). Anschließend wurden die Bakterien für 15 min auf Eis gekühlt und danach zentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge; Rotor A-4-62; 4000 x g; 15 min; 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, zum Pellet 200 ml eisgekühltes ddH₂O gegeben und die Zellen im Verlauf einer Stunde auf Eis durch vorsichtiges Umschwenken resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (Heraeus Tischzentrifuge; Rotor A-4-62; 4000 x g; 15 min; 4 °C) wurde das Pellet in 100 ml eisgekühltes ddH₂O aufgenommen. Es wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (Heraeus Tischzentrifuge; Rotor A-4-62; 4000 x g; 15 min; 4 °C) und das Pellet in 4 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Nach einer letzten Zentrifugation (Heraeus Tischzentrifuge; Rotor A-4-62; 3000 x g; 15 min; 4 °C) wurden die Bakterien in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in 50 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen für die Elektroporation wurden bei -70 °C gelagert.

2YT-Flüssigmedium	1,6 %	Pepton
	1 %	Hefe-Extrakt
	0,5 %	NaCl
	mit NaOH pH = 7,5 einstellen	

3.2.2 Transformation von Bakterienzellen durch Elektroporation

Transformationskompetente DH5 α -Zellen (siehe 3.2.1) wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 50 μ l kompetenter Zellen wurden ca. 200 ng DNA gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Nun wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (2 mm Elektrodenabstand) überführt und die Elektroporation (25 μ F; 200 Ω ; 2,5 kV; ~5 msec) durchgeführt (EasyJecT Plus, EquiBio). Es wurde sofort 1 ml Soc-Flüssigmedium in die Küvette pipettiert, die Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden davon je 500 μ l unter sterilen Bedingungen auf LB-Amp-Festmedium ausplattiert und über Nacht unter Selektionsdruck bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit Zahnstochern Einzelkolonien gepickt, die wiederum über Nacht bei 37 °C zu Kolonien angezogen wurden. Die Platten mit den gepickten Klonen wurden dann am nächsten Tag in den Kühlschrank gestellt und bei 4 °C gelagert. Nach maximal 30 Tagen wurden die Kolonien auf neues LB-Amp-Festmedium überimpft.

Soc-Flüssigmedium (pH = 7,5)	2 %	Pepton
	0,5 %	Hefe-Extrakt
	0,05 %	NaCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glucose
LB-Amp-Festmedium (pH = 7,0)	1 %	Pepton
	0,5 %	Hefe-Extrakt
	1 %	NaCl
	1,8 %	Bacto-Agar
	100 μ g / μ l	Ampicilin
	mit NaOH pH = 7,0 einstellen	

3.2.3 Plasmidisolierung (DNA-Mini-Präparation)

Die Plasmidisolierung (DNA-Mini-Präparation) erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979).

Eine 2-ml-LB-Flüssigkultur mit 100 μ g / ml Ampicilin (LB-Amp-Flüssigkultur) wurde in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 1 min; 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ l TE(H) resuspendiert. Anschließend wurden 400 μ l des alkalischen Lysepuffers hinzupipettiert, der Ansatz durchmischt und die Präparation für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Nun wurden 300 μ l 7,5 M Ammoniumacetat hinzugegeben und die Präparation für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurde zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 10 min; 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, in das 600 μ l Isopropanol [100 % (v/v)] vorgelegt worden waren und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 15 min; 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 400 μ l Ethanol [70% (v/v)] gewaschen und wieder abzentrifugiert. (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 15 min; 4 °C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet in der Speed-Vac (Vaccum Concentrator, Bachofer) getrocknet und anschließend in 50 μ l ddH₂O aufgenommen.

TE(H)	50 mM	Tris; pH = 8,0
	50 mM	EDTA

alkalischer Lysepuffer	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
	Wird aus 2-fach konzentrierten Stammlösungen vor Gebrauch frisch gemischt.	

3.2.4 Plasmidisolierung (DNA-Maxi-Präparation)

Die Plasmidisolierung (DNA-Maxi-Präparation) erfolgte aus 200 ml LB-Amp-Flüssigmedium mit dem Qiagen®-Plasmid-Maxi-Kit nach Herstellerangaben (Qiagen Plasmid Purification Handbook 09/2000; S. 15ff).

3.2.5 Plasmid-DNA Reinigung für die Sequenzierung

Die Reinigung der Plasmid-DNA von Verunreinigungen nach der DNA-Mini-Präparation (siehe 3.2.3) wurde durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion erreicht (Sambrook et al. 1989). Diese Reinigung war für ein erfolgreiches Sequenzieren Voraussetzung.

Das Aliquot an zu reinigender DNA wurde mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Phenol versetzt. Nach dem Durchmischen wurde zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 3 min; 4 °C), die abgenommene wässrige Phase mit 100 µl einer Chloroform / Isoamylalkohol-Mischung versetzt und durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 3 min; 4 °C) wurde die obere Phase abgenommen. Der abgenommenen Phase wurden dann zwei Volumenteile einer Ethanol / Natriumacetat-Lösung hinzugegeben. Bei -20 °C wurde die DNA für eine Stunde oder über Nacht gefällt. Im Anschluss an die Fällung wurde die DNA abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 20 min; 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet in 1 ml Ethanol [70 % (v/v)] gewaschen. Nach Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge; 21.000 x g; 20 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der Speed-Vac (Vaccum Concentrator, Bachofer) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach DNA-Menge des Ausgangsaliquots in einer entsprechenden Menge ddH₂O aufgenommen.

Phenol	100%	Tris / HCl gesättigtes Phenol
Chloroform / Isoamylalkohol-Mischung	96 % 4 %	Chloroform Isoamylalkohol
Ethanol / Natriumacetat-Lösung	1 Vol. 20 Vol.	NaAc; pH = 6 Ethanol

3.2.6 Fällung von DNA

Nukleinsäuren in jeder Form (dsDNA, ssDNA, Oligonukleotide und RNA) können bei niedrigen Temperaturen in der Anwesenheit einwertiger Ionen und ausreichender Alkoholkonzentration gefällt werden (Sambrook et al., 1989).

3.2.6.1 Natriumacetat-Fällung

<u>Ansatz:</u>	aa µl	DNA
	0,1 Vol.	3 M Natriumacetat; pH = 5,2
	2,5 Vol.	Ethanol [100 % (v/v)]
	Zur Aufarbeitung des Ansatzes siehe (3.2.6.3).	

3.2.6.2 Ammoniumacetat-Fällung

Bei der Fällung mit Ammoniumacetat werden Triphosphate nicht mitgefällt und können zu 99 % durch zwei aufeinanderfolgende Fällungen entfernt werden. Aus diesem Grund eignet sich die Methode zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen.

Ansatz: aa µl DNA
 1,6 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat
 8 Vol. Ethanol [100 % (v/v)]
 Zur Aufarbeitung des Ansatzes siehe (3.2.6.3).

3.2.6.3 Aufarbeitung des Fällungsansatzes

Nach dem Pipetieren des Ansatzes wurde dieser entweder für 15 min bei -70 °C oder für mindestens eine Stunde bei -20 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert ($21.000 \times g$; 10 min; 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet in 200 µl Ethanol [70 % (v/v)] gewaschen. Nach Zentrifugation ($21.000 \times g$; 10 min; 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in der Speed-Vac (Vaccum Concentrator, Bachofer) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet je nach DNA-Menge des Ausgangsaliquots in einer entsprechenden Menge ddH₂O aufgenommen.

3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Molekülen verwendet. Nach der Anfärbung der DNA-Moleküle und durch die Verwendung eines Markers ließen sich Aussagen über das Molekulargewicht (1 kb *DNA-Ladder*; Gibco BRL; Abb. 7), die Sekundärstruktur (linear/zirkulär) und die vorhandene Menge (DNA-Marker; Eigenherstellung; Abb. 8) der aufgetrennten DNA-Moleküle machen.

12,216 kb*	4,072 kb*	0,344 kb
11,198 kb*	3,054 kb*	0,298 kb
10,180 kb*	2,036 kb*	0,220 kb
9,192 kb*	1,636 kb	0,201 kb
8,144 kb*	1,018 kb*	0,154 kb
7,126 kb*	0,517 kb	0,134 kb
6,108 kb*	0,506 kb	0,075 kb
5,090 kb*	0,396 kb	

Abbildung 7: 1 kb *DNA-Ladder* (Gibco BRL). Dieser DNA-Marker enthält eine Mischung aus jeweils 1 bis 12 Sequenzwiederholungen eines 1018 bp-Fragments (gekennzeichnet mit *). Zusätzlich zu diesen 12 Banden besitzt der DNA-Marker Vektor-DNA-Fragmente, die von 75 bp bis zu 1636 bp reichen. Dieser DNA-Marker dient zur Messung der Größe linearer doppelsträngiger DNA-Fragmente (Hartley und Donelson, 1980).

1409 bp	396 bp	88 bp
800 bp	261 bp	75 bp
517 bp	191 bp	65 bp

Abbildung 8: DNA-Marker (Eigenherstellung). Die Fragmente dieses DNA-Markers entstanden bei der Restriktion des Tth-730 Plasmids mit EcoRI und HinfI. (Sürig, 1989). Dieser Marker diente neben der Bestimmung der Fragmentlänge von DNA-Molekülen auch

Tabelle 7: Programm zur Amplifizierung der alb3-cDNA. Nach dem 1. Schritt wurden die Schritte 2 bis 4 39 mal wiederholt, bevor die Schritte 5 und 6 durchgeführt wurden.

Schritt	Temperatur	Dauer	Vorgang
1	94 °C	2 min	Denaturierung
2	94 °C	45 s	Denaturierung
3	50 °C	1 min	Primer-Anlagerung
4	72 °C	2 min	Elongation
5	72 °C	5 min	Elongation
6	4°C	halten	Lagerung

Der Ansatz wurde zusammenpipettiert und nachdem er mit der Taq-DNA-Polymerase versetzt worden war in das PCR-Gerät überführt. Anschließend lief das in Tabelle 7 aufgeführte Programm zur Amplifizierung der DNA-Fragmente ab.

Nach beendeter Reaktion wurde ein 1 µl Aliquot durch Agarosegelelektrophorese (siehe. 3.2.7) auf Größe und Menge der amplifizierten DNA geprüft.

3.2.9 Restriktion von Plasmid-DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden TypII-Restriktionsendonukleasen verwendet. Der Restriktionsansatz wurde nach Herstellerangaben pipettiert und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Menge an einzusetzendem Enzym wurde mit der nachfolgenden Formel berechnet. Es musste jedoch dabei darauf geachtet werden, dass die eingesetzte Menge an Enzym nur maximal 10 % des Gesamtvolumens betragen durfte.

$$\frac{\text{Enzym}[U]}{F_M[\text{mg}] * h} = \frac{48502 * F_S}{F_L[\text{bp}] * (I - \text{DNA})_S}$$

F_M = Menge an eingesetzter DNA in µg

F_S = Anzahl der Schnitte des gewählten Enzyms im eingesetzten Fragment

F_L = Länge des eingesetzten Fragments in bp

$(\lambda\text{-DNA})_S$ = Anzahl der Schnitte des gewählten Enzyms in der λ -DNA

3.2.10 DNA-Sequenzierung mit dem ABI377-System

Die Sequenzierung wurde durchgeführt, um das Vorhandensein spezifischer DNA-Moleküle nachzuweisen. Die Ansätze wurden eigenständig vorbereitet und die Sequenzierung wurde vom Arbeitskreis Herrmann des Botanischen Institutes der LMU München vorgenommen.

Ansatz für ca. 4 kb große DNA Moleküle:

aa µl DNA (ca. 800 ng)

1 µl Primer (5 pmol/µl)

bb µl ddH₂O

Σ 8 µl

Diese Methode basiert auf der Kopie des zu sequenzierenden Fragmentes mit spezifischen Primern unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten ddNTP's zur Terminierung der DNA-Synthese. Es entstehen eine Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die am

Ende eine spezifische Markierung tragen, entsprechend der Base, die als letztes eingebaut wurde. Die Fragmente werden nach der Synthese elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel mit Hilfe eines Fluoreszenz-Lesegerätes ausgewertet.

3.2.11 Sequenzauswertung und Datenbankanalysen für DNA

Die aufgeführten DNA-Sequenzen stammen aus dem Online-Service-Bereich des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Alignments wurden mit dem Programm CLUSTAL X Multiple Sequence Alignment durchgeführt (National Center for Biotechnology Information, Bethesda).

4 Ergebnisse

Das Alb3-Protein ist an der Integration von LHCP (light harvesting complex protein) in die Thylakoidmembran von Chloroplasten beteiligt (Moore et al. 2000; Bellafigliore et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, das Alb3-Protein und mögliche Alb3-Komplexe in frisch isolierten Chloroplastenextrakten nachzuweisen und Subfraktionen des Chloroplasten zuzuordnen.

Ein weiteres Ziel war es, die cDNA des Alb3-Gens zu klonieren.

4.1 Biochemische Ergebnisse

4.1.1 Herstellung von Alb3-Antikörpern

Die Inhibierung der Membranintegration von LHCP mit einem Antikörper gegen das Alb3-Protein legte eine Beteiligung des Proteins am cpSRP-Protein-Exports in die Thylakoidmembran (siehe Abb. 2) nahe (Moore et al., 2000). Dieses Experiment sollte mit eigenen Antikörpern wiederholt werden. Bei der hierfür notwendigen Antikörper-Herstellung wurde deswegen darauf geachtet, dass die Peptidsequenz des Epitops an der Proteinoberfläche und nicht in einem der transmembranen Bereiche des Alb3-Proteins liegt.

Eine Sequenzanalyse des Alb3-Proteins von *A. thaliana* (Pineda Antikörper Service) lieferte acht mögliche Epitope, die jeweils aus mindestens vier Aminosäuren bestanden. Die folgende Aminosäure-Sequenz (AS 296 bis 311 des Alb3-Proteins) wurde zur Antikörper-Herstellung synthetisiert: NH₂-MEIMKPPQTDDPAQKN-CONH₂

Eine TMPred-Analyse (siehe 3.1.8) sagte voraus, dass diese Aminosäuren-Sequenz zwischen der vierten und fünften transmembranen Domäne des Alb3-Proteins in einem stromalen „loop“ lokalisiert ist (Abb. 3 und Tab. 2). Das ausgewählte Peptid verfügt über 5 geladene Aminosäuren. Die Ladung eines Epitops ist für den erfolgreichen Einsatz von Antipeptid-Antikörpern neben der Lokalisierung der Peptidsequenz an der Proteinoberfläche entscheidend, um eine möglichst große Bindungskraft (Avidität) der Antikörper zu erzielen.

Das Peptid wurde drei Kaninchen zur Immunisierung gespritzt. Eines der Kaninchen verendete bereits bevor das Antikörperserum gewonnen werden konnte. Die polyklonalen Antikörperseren der Tiere 1 und 3 (α -Alb3_1 und α -Alb3_3) wurden zusammen mit dem Präimmunserum nach ca. 3 Monaten erhalten.

4.1.2 Identifizierung des Alb3-Proteins in Chloroplasten von *A. thaliana*

Ziel dieses Versuchs war es das Alb3-Protein in Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* nachzuweisen und die Qualität der selbst hergestellten Antikörper abzuschätzen. Hierzu wurden die beiden selbst hergestellten Antikörper (α -Alb3_1, Abb. 10, Spuren 1 und 2; α -Alb3_3, Abb. 10, Spuren 3 und 4) mit zwei Kontroll-Antikörpern verglichen (α -Alb3_RH, Abb. 10, Spuren 7 und 8; α -Alb3_CTerm, Abb. 10, Spuren 5 und 6).

Es wurde ein eindimensionales, denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel zur Auftrennung des Gesamtproteins von Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* verwendet. Die Identifizierung des Alb3-Proteins wurde mittels Western-Analyse durchgeführt.

```
MARVLVSSPSSFFGSPLIKPSSSLRHSVGGGGTAQFLPYRSNNKLF▼TTSTTV RFSLNEI
PPFHGLDSSVDIGAIUFTRAESLLYTIADAUAVVGADSVVTTDSSAVQKSGGWFGFISDAMELV
LKILKDGLSAVHVPYAYGFUAIILLTIIVKAATYUPLTKQQVESTLAMQNLOPKIKAIQORYAG
UNQERIQLUETSRLYKQAGVNPULAGCLPTLATIPVWIGLYQALSUNVANEGULFTUEGFFWIPSLGG
PTUSIAARQSGSGISWLFUPFVDGHPPLGUWYDTVAYLVLPVLLIASQYVSUMEIMKPPQTDDPAQ
UKNUTLLVFKFLPLMIGYFALSUVPSGLSIYWLUTNNVLSTAQQVYLRKULGAKPNMDENASKIIS
AGRAKRSIAQPDDAGERFRQLKEQEKRUSUKKNKAVAKDTVELVEESQSESEEGSDDEEEARE
GALASSTTSKPLPEVGQRRSKRSKRKRTV
```

Abbildung 9: Die Sequenz des Alb3-Proteins von *A. thaliana*. Die unterstrichenen Bereiche der Sequenz geben die Positionen der vorausgesagten transmembranen Domänen innerhalb des Proteins an (TMPred; 3.1.8). Der **gelb** unterlegte Bereich entspricht dem Epitop, das für die Herstellung der eigenen Antikörper ausgewählt worden war. Die Sequenz des Peptids

gegen das der Antikörper α -Alb3_RH gerichtet ist, ist **rot** unterlegt. Das schwarze Dreieck (\blacktriangledown) kennzeichnet die berechnete Prozessierungsstelle (ChloroP; 3.1.8).

Der Antikörper α -Alb3_RH wurde als Referenz angesehen, denn mit diesem Antikörper war bereits das zu Alb3 homologe PPF1-Protein in der Thylakoidmembran von *P. sativum* nachgewiesen worden (Moore et al. 2000). Das Epitop gegen das der Antikörper gerichtet ist, ist ein 50 Aminosäuren langes Peptid des Alb3-Proteins, das in *A. thaliana* zwischen der ersten und zweiten transmembranen Domäne (Abb. 9, rote Markierung) liegt. Diese Sequenz ist im PPF1-Protein von *P. sativum* zu 96 % konserviert (Abb. 11) und liegt ebenfalls zwischen der ersten und zweiten transmembranen Domäne des Proteins (Abb. 5). Für das mature PPF1-Protein wurde eine Molekularmasse von 45 kD berechnet (Tab. 1).

Die genaue Aminosäuren-Sequenz des Bereichs des C-Terminus gegen den der Antikörper α -Alb3_CTerm gerichtet ist, ist nicht bekannt. Die selbst hergestellten Antikörper (α -Alb3_1 und α -Alb3_3) sind gegen ein Epitop gerichtet, dessen Sequenz zwischen der vierten und fünften transmembranen Domäne des Alb3-Proteins lokalisiert ist (siehe 4.1.1 und Abb. 9, gelbe Markierung).

Arabidopsis thaliana

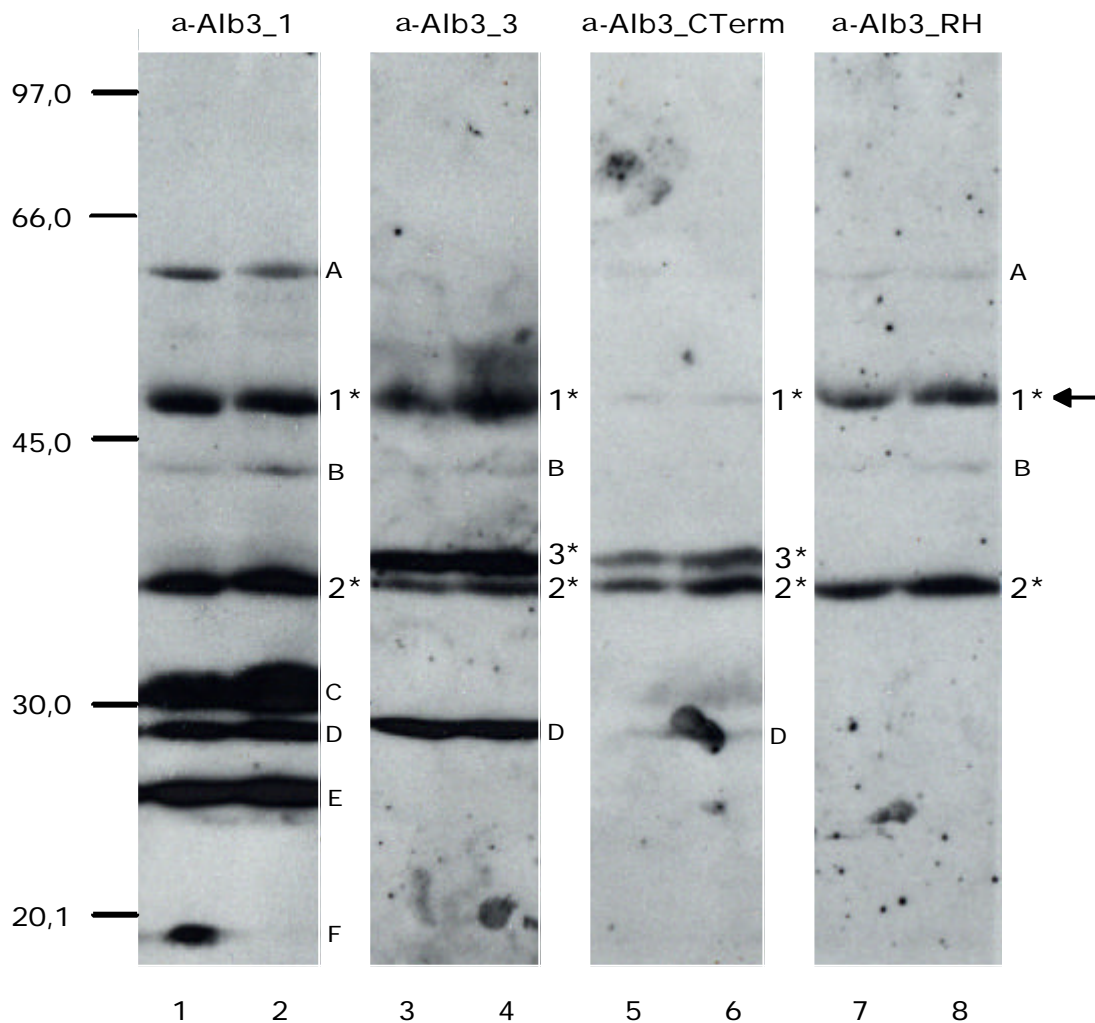


Abbildung 10: Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von *A. thaliana*. Es wurde jeweils ein Aliquot an Chloroplasten entsprechend einer Menge von 10 μg (linke Spuren; 1,3,5,7) bzw. 20 μg (rechte Spuren; 2,4,6,8) an Chlorophyll (siehe 3.1.3) auf ein denaturierendes 10 %iges SDS-Gel (siehe 3.1.4.1) aufgetragen. Die Western-Analyse (siehe 3.1.6) wurde mit folgenden ersten Antikörpern durchgeführt: α -Alb3_1 (1 und 2), α -Alb3_3 (3 und 4), α -Alb3_CTerm (5 und 6) und α -Alb3_RH (7 und 8).

Der Antikörper α -Alb3_RH (Abb. 10, Spuren 7 und 8) reagierte in der vorliegenden Western-Analyse mit zwei Proteinen. Eines der Proteine lag im Bereich von etwa 45 kD (Abb. 10, 1*, Pfeil) und das andere bei etwa 36 kD (Abb. 10, 2*). Das entwickelte Fluoreszenz-Signal bei 45 kD war schwächer als das bei etwa 36 kD. Das Protein bei 45 kD wurde auf Grund seiner Molekularmasse, die für das Alb3-Protein wegen der Homologie zum PPF-1-Protein erwartet worden war, als Nachweis für Alb3 interpretiert. Das Signal auf der Höhe von etwa 36 kD konnte keinem Protein zugeordnet werden. Weitere Versuche zeigten allerdings, dass dieses Fluoreszenz-Signal nicht durch spezifische Reaktion mit dem Antikörper ausgelöst wurde. Wurden die Proteine auf der Blotmembran ohne vorherige Inkubation in einer

Antikörperlösung mit den ECL-Entwicklungslösungen (Luminol, pCoumarat, Puffer, H₂O₂; siehe 3.1.6) behandelt, konnte ebenfalls ein klar erkennbares Signal bei etwa 36 kD nachgewiesen werden (siehe 4.1.7.1, Abb. 19 B). Der Antikörper α -Alb3_RH reagierte darüber hinaus sehr schwach mit zwei weiteren Proteinen (Abb.10, A und B), die auch von den Antikörpern α -Alb3_1 und α -Alb3_3 detektiert wurden (Abb. 10, Spuren 1 bis 4).

Das Alb3-Protein bei etwa 45 kD wird vom Antikörper α -Alb3_CTerm nur sehr schwach erkannt (Abb. 10, Spuren 5 und 6, 1*). Dagegen reagierte dieser Antikörper im Molekularmassenbereich von ca. 37 kD deutlich mit einem weiteren unbekanntem Protein (Abb. 10, 3*).

Die selbst hergestellten Antikörper α -Alb3_1 (Abb. 10, Spuren 1 und 2) und α -Alb3_3 (Abb. 10, Spuren 3 und 4) erkannten ebenfalls das putative Alb3-Protein mit 45 kD (Abb. 10, 1*). Neben den für den Antikörper α -Alb3_RH beobachteten Fluoreszenz-Signalen (Abb. 10, 1*, 2*, A, B) reagierten diese Antikörper noch unterschiedlich intensiv mit einer Vielzahl an Proteinen verschiedener Molekularmassen (Abb. 10, C, D, E, F). Um welche Proteine es sich dabei handelte, konnte nicht aufgeklärt werden.

Aus diesen Untersuchungen wurde deutlich, dass das Alb3-Protein mit allen Antikörpern im Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* identifiziert werden kann, wenn die molekulare Masse des Proteins als zusätzliches Identifikationsmerkmal herangezogen wurde (Abb. 10, 1*).

Nachfolgend sollte nun überprüft werden, ob mit den vorhandenen Antikörpern auch Alb3-Homologe in anderen Organismen nachgewiesen werden können. Da der Antikörper α -Alb3_RH bereits an Thylakoidmembranen von *P. sativum* erfolgreich getestet worden war (Moore et al., 2000), wurden zuerst Western-Analysen an Chloroplastenextrakten von diesem Organismus durchgeführt (siehe 4.1.3).

4.1.3 Identifizierung des PPF1-Proteins in Chloroplasten von *P. sativum*

Nach der Identifizierung des Alb3-Proteins in *A. thaliana* sollte das in der Literatur beschriebene Alb3-Homolog PPF1 in *P. sativum* nachgewiesen werden. Dazu wurden die beiden selbst hergestellten Antikörper (α -Alb3_1, Abb. 12, Spur 2; α -Alb3_3, Abb. 12, Spur

3), der C-terminale Antikörper (α -Alb3_CTerm, Abb. 12, Spur 4), sowie der Referenz-Antikörper (α -Alb3_RH, Abb. 12, Spur 5) verwendet.

Das Gesamtprotein eines Chloroplastenextrakts von *P. sativum* wurde über ein eindimensionales, denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Identifizierung des PPF1-Proteins wurde mittels Western-Analyse durchgeführt.

A:

A.t. (Alb3) : PLTKQQVESTLAMQNLOPKIKAIQORYAGNQERIQLETSRLYKQAGVNPL
P.s. (PPF1) : PLTKQQVESTLAMQNLOPKIKAIQERYAGNQERIQLETSRLYTQAGVNPL

B:

A.t. (Alb3) : MEIMKPPQTDDPAQKN
P.s. (PPF1) : MEIMKPPQTNDPNQKN

Abbildung 11: Vergleich der Sequenzen der Epitope für α -Alb3_RH (A) und α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 (B) zwischen dem Alb3-Protein von *A. thaliana* (*A.t.*) und dem PPF1-Protein von *P. sativum* (*P.s.*). Das Alignment der Proteine erfolgte mit CLUSTAL W (3.1.8). Die farbig (rot und gelb) unterlegten Bereiche sind homolog. Die nicht farbig unterlegten Bereiche der Sequenz aus *P.s.* weichen von der Sequenz des Alb3-Proteins aus *A. thaliana* ab.

Ein Sequenzvergleich für die Proteine Alb3 aus *A. thaliana* und PPF1 aus *P. sativum* in den Bereichen, die für die Antikörper α -Alb3_RH (Abb. 11, A) und α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 (Abb. 11, B) als Epitop ausgewählt wurden, zeigte, dass diese Bereiche sehr konserviert waren. Für den Antikörper α -Alb3_RH betrug die Sequenz-Homologie 96 % und für die Antikörper α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 etwa 87 %. Der C-terminale Antikörper wurde in diesen Vergleich nicht mit einbezogen, da die genaue Sequenz des Epitops nicht bekannt war. Die Homologie zwischen den beiden Proteinen am C-Terminus ist allerdings geringer als in den Bereichen, die für die Antikörper α -Alb3_RH, α -Alb3_1 und α -Alb3_3 als Epitop ausgewählt worden waren (siehe Anhang, Abb. II).

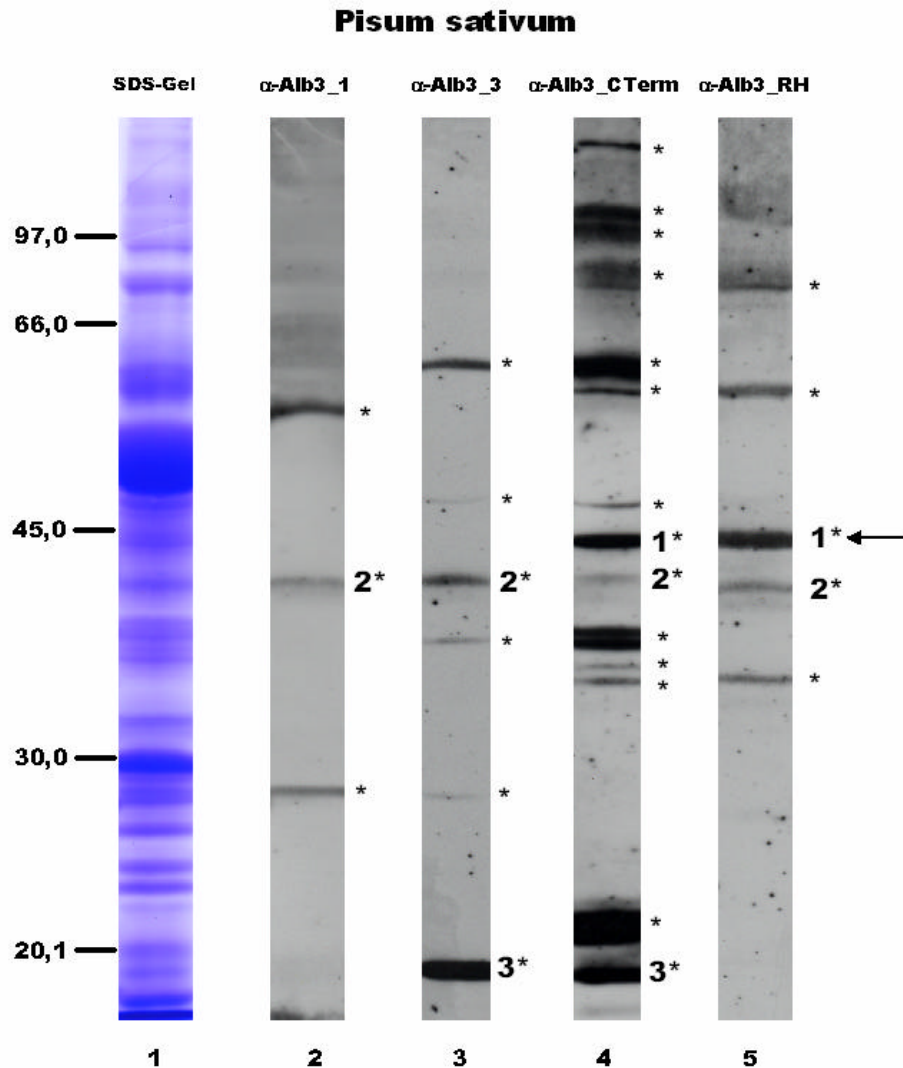


Abbildung 12: Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von *P. sativum*. Es wurde jeweils ein Aliquot an Chloroplasten entsprechend einer Menge von 20 μ g an Chlorophyll (siehe 3.1.3) auf ein denaturierendes 10 %iges SDS-Gel (siehe 3.1.4.1) aufgetragen. Es sind von links nach rechts folgende Spuren angeordnet: Coomassie gefärbtes SDS-Gel (1), die Ergebnisse der Western-Analysen (siehe 3.1.6) folgender erster Antikörper: α -Alb3_1 (2), α -Alb3_3 (3), α -Alb3_CTerm (4) und α -Alb3_RH (5).

Der Referenz-Antikörper α -Alb3_RH reagierte mit mehreren Proteinen unterschiedlicher Molekularmasse (Abb. 12, Spur 5, 1*, 2*, *). Das stärkste Fluoreszenz-Signal lag bei etwa 45 kD (Abb. 12, 1*, Pfeil). In der Literatur wurde das PPF1-Protein mit dem Antikörper α -Alb3_RH bereits nachgewiesen und mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 45 kD beschrieben (Moore et al., 2000). Aus diesem Grund wurde das Signal als Nachweis für das PPF1-Protein angesehen. Interessant war ein weiteres Signal bei etwa 43 kD, denn auf dieser Höhe reagierten alle Antikörper mit einem Protein (Abb. 12, Spuren 2 bis 5, 2*). Ob es sich

bei diesem Signal um ein Degradationsprodukt von PPF1 oder um eine unspezifische Wechselwirkung der Antikörper handelte, war nicht abschließend festzustellen.

Der Antikörper α -Alb3_CTerm reagierte mit einer Vielzahl an Proteinen und erzeugte mehrere starke Fluoreszenz-Signale (Abb. 12, Spur 4, 1*, 2*, 3*, *). Ein intensives Signal lag bei etwa 45 kD und somit auf der Höhe, auf der auch der Antikörper α -Alb3_RH das PPF1-Protein detektierte (Abb. 12, Spur 4, 1*). Dieses Signal wurde ebenfalls auf das PPF1-Protein zurückgeführt. Eine weitere intensive Reaktion des Antikörpers wurde bei etwa 19 kD beobachtet (Abb. 12, 3*). Das stärkste Fluoreszenz-Signal des Antikörpers α -Alb3_3 lag auf der gleichen Höhe. Um welches Protein es sich dabei handelte, konnte nicht geklärt werden.

Das PPF1-Protein wurde von den selbst hergestellten Antikörpern α -Alb3_1 und α -Alb3_3 nicht erkannt. Beide Antikörper lieferten jedoch eine Vielzahl an Reaktionen mit Proteinen unterschiedlicher Molekularmasse, die in der Intensität variierten (Abb. 12, Spuren 2 und 3, 2*, *). Der Antikörper α -Alb3_3 zeigte im Bereich von etwa 19 kD eine intensive Reaktion, die jedoch auf kein spezifisches Protein zurückgeführt werden konnte.

Es wurde deutlich, dass das Alb3-Homolog PPF1 von *P. sativum* in der durchgeführten Western-Analyse mit den Antikörpern α -Alb3_RH und Alb3_CTerm nachgewiesen werden kann. Die selbst hergestellten Antikörpern α -Alb3_1 und α -Alb3_3 eigneten sich für die Identifizierung des PPF1-Proteins nicht. Nach der Identifizierung des PPF1-Proteins von *P. sativum* mit zwei der vier verwendeten Antikörper, sollten im nächsten Versuch die in Literatur beschriebenen (Bellafiore et al., 2002) und zu Alb3 homologen Proteine Alb3-1 und Alb3-2 von *C. reinhardtii* nachgewiesen werden (siehe 4.1.4).

4.1.4 Western-Analyse an Chloroplasten von *C. reinhardtii*

Nachdem die Proteine Alb3 von *A. thaliana* und PPF1 von *P. sativum* identifiziert werden konnten, sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob die vorhandenen Antikörper ebenfalls mit einem Alb3-Homolog aus Chloroplasten von *C. reinhardtii* reagieren. Es wurden die beiden selbst hergestellten Antikörper (α -Alb3_1, Abb. 14, Spur 2; α -Alb3_3, Abb. 14, Spur

3), der C-terminale Antikörper (α -Alb3_CTerm, Abb. 14, Spur 4), sowie der Referenz-Antikörper (α -Alb3_RH, Abb. 14, Spur 5) verwendet.

Zur Auftrennung des Gesamtproteins eines Chloroplastenextrakts von *C. reinhardtii* wurde ein eindimensionales, denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet. Die Identifizierung von Alb3 homologen Proteinen wurde mittels Western-Analyse durchgeführt.

In der Literatur waren die Proteine Alb3-1 und Alb3-2 von *C. reinhardtii* beschrieben worden (Bellafiore et al., 2002; Tab. 1). Bisher wurde nur das Alb3-1-Protein in einer Western-Analyse mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 55 kD nachgewiesen (Bellafiore et al., 2002). Das berechnete Molekulargewicht für das mature Alb3-1-Protein betrug allerdings nur etwa 47 kD (Tab. 1). Das Alb3-2-Protein, mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 39 kD (Tab. 1), wurde noch nicht biochemisch nachgewiesen.

A:

A.t. (Alb3) : PLTKQQVESTLAMQNLOPKIKAIQQRYAGNQERIQLETSRLYKQAGVNPL
 C.r. (Alb3-1) : PLTKQQVESAMAVQALKPRIDLKDRFGEKDKIQKETSPLYEQAGVNPL
 C.r. (Alb3-2) : PLTKQQVESTLSLQALQPRVKELQAKYADDPENLQLETARLYKEAGVNPL

B:

A.t. (Alb3) : MEIMKPPQT DDPAQKN
 C.r. (Alb3-1) : SSVTSPPIDPKDENANT
 C.r. (Alb3-2) : QKI ISSQNN QDPSQQQ

Abbildung 13: Vergleich der Sequenzen der Epitope für α -Alb3_RH (A) und α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 (B) zwischen dem Alb3-Protein von *A. thaliana* (A.t.) und den Proteinen Alb3-1 bzw. Alb3-2 von *C. reinhardtii* (C.r.). Das Alignment der Proteine erfolgte mit CLUSTAL W (3.1.8). Die farbig (rot und gelb) unterlegten Bereiche sind homolog und die nicht farbig unterlegten Bereiche weichen von der Sequenz des Alb3-Proteins aus *A. thaliana* ab.

Für einen Sequenzvergleich der Proteine Alb3 von *A. thaliana* und Alb3-1 bzw. Alb3-2 von *C. reinhardtii* wurden die Sequenzen der Bereiche, die als Epitop für die Herstellung der Antikörper α -Alb3_RH (Abb. 13, A) und α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 (Abb. 13, B) verwendet wurden, nebeneinander angeordnet (aligned). Der Vergleich zeigte, dass weder das Epitop für den Antikörper α -Alb3_RH noch für die Antikörper α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 in den Alb3-Homologen von *C. reinhardtii* konserviert war. Im Fall des Epitops für den Antikörper α -Alb3_RH lag die Homologie zu Alb3 von *A. thaliana* für Alb3-1 bei 60 % und für Alb3-2 bei 64 %. Das Epitop für die Antikörper α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 hatte im Fall von Alb3-1 drei

von sechzehn und für Alb3-2 vier von sechzehn Aminosäuren mit der entsprechenden Sequenz des Alb3-Proteins von *A. thaliana* gemeinsam. Der C-terminale Antikörper konnte in diese Analyse nicht mit einbezogen werden, da die Sequenz gegen die der Antikörper gerichtet war, nicht bekannt war. Die Homologie zwischen den Proteinen am C-Terminus ist allerdings gering (siehe Anhang, Abb. II).

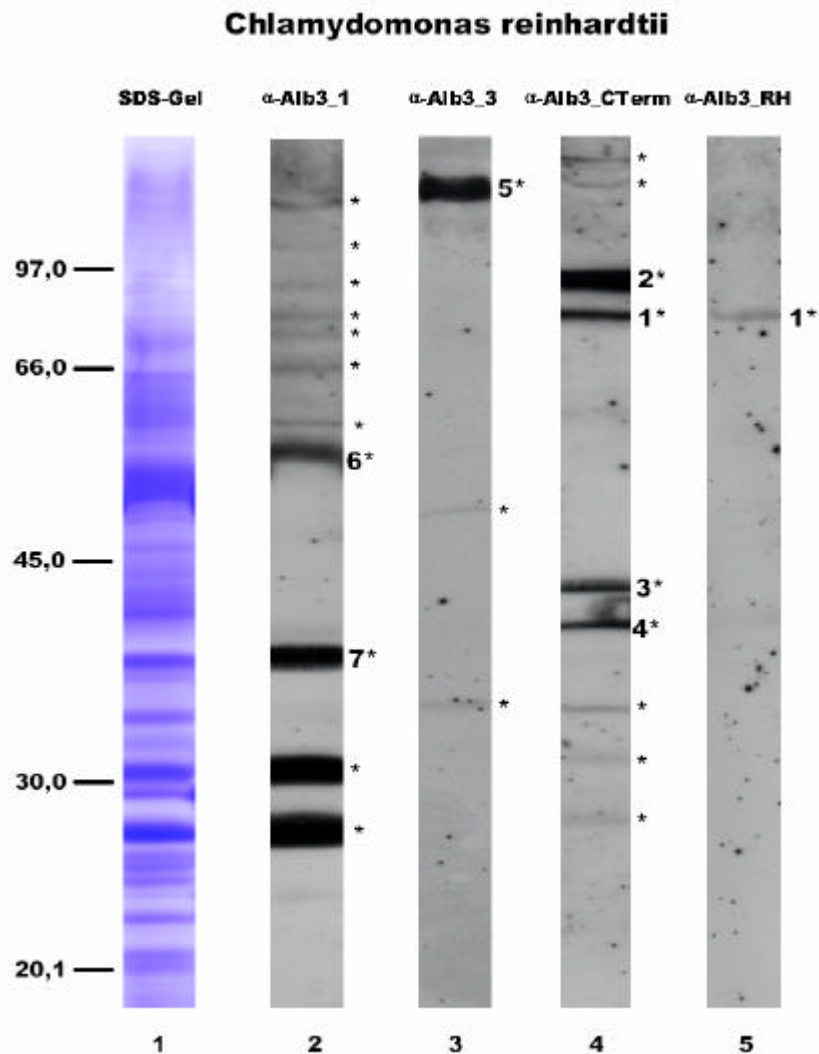


Abbildung 14: Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von *C. reinhardtii*. Es wurde jeweils ein Aliquot an Chloroplasten entsprechend einer Menge von 20 μ g an Chlorophyll (siehe 3.1.3) auf ein denaturierendes 10 %iges SDS-Gel (siehe 3.1.4.1) aufgetragen. Es sind von links nach rechts folgende Spuren zu sehen: Coomassie gefärbtes SDS-Gel (1), die Ergebnisse der Western-Analysen (siehe 3.1.6) mit folgenden ersten Antikörpern: α -Alb3_1 (2), α -Alb3_3 (3), α -Alb3_CTerm (4) und α -Alb3_RH (5).

Der in den vorhergegangenen Versuchen (4.1.2 und 4.1.3) als Referenz-Antikörper angesehene Antikörper α -Alb3_RH reagierte in dieser Western-Analyse nur schwach mit einem Protein, das ein Molekulargewicht von etwa 80 kD besaß (Abb. 14, Spur 5, 1*). Auf Grund der Sequenzunterschiede zwischen Alb3 aus *A. thaliana* und Alb3-1 bzw. Alb3-2 aus

C. reinhardtii in dem Epitop-Bereich, gegen den der Antikörper gerichtet war (Abb. 13, A), wurde nicht davon ausgegangen, dass es sich um ein Alb3-Homolog handelte.

Interessant war, dass auch der Antikörper α -Alb3_CTerm mit einem Protein reagierte, das auf der selben Höhe lag, wie das vom Antikörper α -Alb3_RH erkannte 80 kD Protein (Abb. 14, Spur 4, 1*). Welches Protein von beiden Antikörpern erkannt wurde und ob es sich dabei um das gleiche Protein handelte, konnte nicht geklärt werden. Das stärkste Fluoreszenz-Signal dieses Antikörpers mit einem unbekanntem Protein war bei etwa 90 kD zu beobachten (Abb. 14, 2*). Weitere starke Signale des Antikörpers lagen bei ca. 43 und 39 kD (Abb. 14, 3*, 4*). Auf Grund des berechneten Molekulargewichts des Proteins Alb3-2 (Tab. 1) bestand die Möglichkeit, dass es sich bei dem 39 kD Protein um das mature Alb3-2-Protein handelte. Da sich aber die C-Termini der Proteine Alb3 von *A. thaliana* und Alb3-2 von *C. reinhardtii* deutlich unterscheiden, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass tatsächlich ein Alb3-Homolog von *C. reinhardtii* nachgewiesen werden konnte.

Der Antikörper α -Alb3_3 reagierte spezifisch mit einem einzigen Protein. Das starke Signal dieses Antikörpers lag bei ca. 115 kD (Abb. 14, 5*). Da aber der Epitopvergleich (Abb. 13, B) für diesen Antikörper gezeigt hatte, dass keine Homologie zwischen Alb3 aus *A. thaliana* und Alb3-1 bzw. Alb3-2 von *C. reinhardtii* bestand, handelte es sich nicht um ein Alb3-Homolog. Auf welches Protein dieses Signal zurückzuführen war, wurde nicht aufgeklärt.

Auf der Höhe von etwa 55 kD, was dem apparenten Molekulargewicht des Alb3-1-Proteins in der Literatur entsprach (Bellafiore et al., 2002), erkannte der Antikörper α -Alb3_1 ein Protein (Abb. 14, 6*). Da weder α -Alb3_RH noch α -Alb3_CTerm auf Höhe dieses Signals ein Protein detektierten (Abb. 14, Spuren 4 und 5) und der Epitopvergleich (Abb. 13, B) gezeigt hatte, dass sich der Antikörper α -Alb3_1 schlecht für den Nachweis von Alb3-Homologen in *C. reinhardtii* eignete, wird davon ausgegangen, dass es sich nicht um Alb3-1 oder Alb3-2 handelte.

Neben den beschriebenen Signalen zeigten die verwendeten Antikörper eine Vielzahl an schwächeren Reaktionen mit Proteinen, die sowohl größere als auch kleinere Molekularmassen aufwiesen (Abb.14, Spuren 2 bis 5, *). Keines dieser Proteine konnte identifiziert werden.

Insgesamt eignete sich keiner der verwendeten Antikörper, um ein Alb3-Homolog im Chloroplastenextrakt von *C. reinhardtii* eindeutig nachzuweisen. Nach den Western-Analysen an Organismen mit bereits identifizierten Alb3-Homologen (*A. thaliana*, *P. sativum* und *C. reinhardtii*) sollte anschließend eine Western-Analysen an Chloroplastenextrakt von *H. vulgare* durchgeführt werden (siehe 4.1.5), da die Chloroplasten dieses Organismus standardmäßig im Labor präpariert werden.

4.1.5 Western-Analyse an Chloroplasten von *H. vulgare*

Für den Organismus *H. vulgare*, aus dem in unserem Labor standardmäßig Chloroplasten isoliert werden, wurde eine Western-Analyse mit den selbst hergestellten Antikörpern (α -Alb3_1, Abb. 15, Spur 2; α -Alb3_3, Abb. 15, Spur 3), dem C-terminalen Antikörper (α -Alb3_CTerm, Abb. 15, Spur 4), sowie dem Referenz-Antikörper (α -Alb3_RH, Abb. 15, Spur 5) durchgeführt.

Es wurde ein eindimensionales, denaturierendes SDS-Polyacrylamid-Gel zur Auftrennung des Gesamtproteins von Chloroplastenextrakten aus *H. vulgare* verwendet. Die Identifizierung eines zu Alb3 homologen Proteins wurde mittels Western-Analyse durchgeführt.

Von *H. vulgare* war kein Alb3-Homolog bekannt, so dass für die verwendeten Antikörper kein Vergleich der Epitopsequenzen wie in Abbildung 11 und 13 vorgenommen wurde.

Alle eingesetzten Antikörper (α -Alb3_1, α -Alb3_3, α -Alb3_CTerm und α -Alb3_RH) reagierten mit einer Vielzahl an unbekanntem Proteinen, wobei die Anzahl und Intensität der Signale für die verschiedenen Antikörper variierten (Abb. 15, Spuren 2 bis 5, 1*, 2*, *).

Von den Antikörpern α -Alb3_RH, α -Alb3_CTerm und α -Alb3_3 wurde ein etwa 45 kD Protein erkannt (Abb. 15, 1*, Pfeil). Darüber hinaus reagierten alle Antikörper im Molekularmassenbereich um etwa 40 kD mit zwei weiteren Proteinen (Abb. 15, 2*). Da jedoch weder Molekulargewichte noch Sequenzen von möglichen Alb3-Homologen von *H. vulgare* bekannt waren, konnte nicht geklärt werden, ob die Fluoreszenz-Signale auf ein zu Alb3 homologes Protein zurückzuführen waren.

Zum Zeitpunkt, als diese Arbeit angefertigt wurde, eignete sich *H. vulgare* deswegen nicht als Organismus für den Nachweis von Alb3-Homologen, da kein Alb3-Homolog in der Literatur

beschrieben war und somit auch keine Sequenzdaten vorlagen. Allerdings lieferten die Antikörper Alb3_RH und α -Alb3_CTerm Signale, die aufgrund der Molekularmasse des identifizierten Proteins von einem Alb3-Homologen stammen könnten (Abb. 15, 1*).

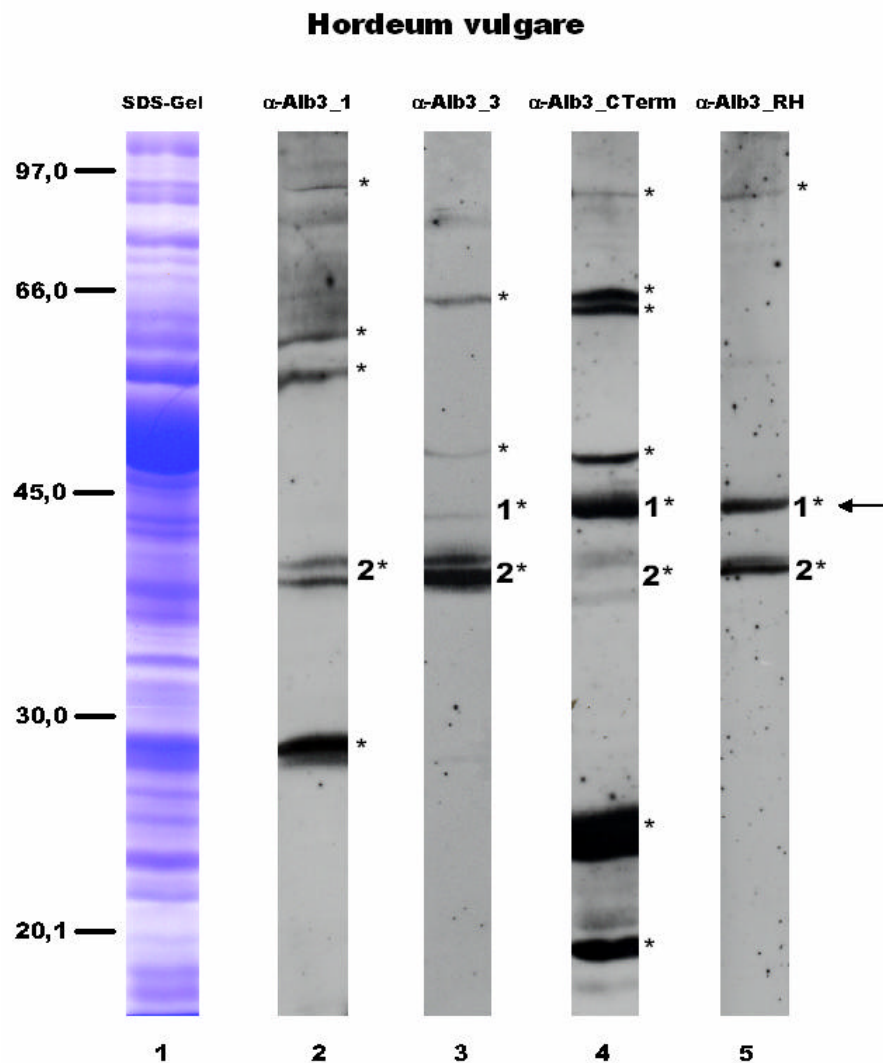


Abbildung 15: Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von *H. vulgare*. Es wurde jeweils ein Aliquot an Chloroplasten entsprechend einer Menge von 20 μ g an Chlorophyll (siehe 3.1.3) auf ein denaturierendes 10 %iges SDS-Gel (siehe 3.1.4.1) aufgetragen. Es sind von links nach rechts folgende Spuren zu sehen: Coomassie gefärbtes SDS-Gel (1), die Ergebnisse der Western-Analysen (siehe 3.1.6) folgender erster Antikörper: α -Alb3_1 (2), α -Alb3_3 (3), α -Alb3_CTerm (4) und α -Alb3_RH (5).

4.1.6 Nachweis des Alb3-Proteins nach 2D-Gelelektrophorese

Mit den Antikörpern α -Alb3_1, α -Alb3_3 und α -Alb3_RH konnte das Alb3-Protein in Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* nach eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese

identifiziert werden (siehe 4.1.2). Als Nächstes sollten Alb3-haltige Komplexe in Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* mit Hilfe von Western-Analysen nach zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Durch die Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist es möglich Protein-Komplexe zu identifizieren und ihre Zusammensetzung zu untersuchen (siehe 3.1.4.3). In der ersten Dimension werden die nativen Protein-Komplexe zunächst über die BN-PAGE aufgetrennt (siehe 3.1.4.2). In der zweiten Dimension werden die Proteinkomplexe aus der ersten Dimension denaturiert und die Einzelproteine dieser Komplexe durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Proteine, die in der zweiten Dimension genau untereinander laufen, stammen aus einem Komplex. Dadurch ist es möglich Protein-Komplexe zu identifizieren und zu analysieren.

4.1.6.1 Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_1 nach 2D-Gelelektrophorese

Ziel dieses Versuchs war es, das Alb3-Protein zu identifizieren und auf Grund der Identifizierung des Alb3-Einzelproteins einen Alb3-haltigen Komplex zu finden (siehe 4.1.6). Dazu wurden zunächst die Protein-Komplexe eines Chloroplastenextrakts von *A. thaliana* in der ersten Dimension über BN-PAGE aufgetrennt (Abb. 16 A). Anschließend erfolgte die Auftrennung der Protein-Komplexe in ihre Einzelproteine in der zweiten Dimension (Abb. 16 B). Der Nachweis des Alb3-Proteins wurde über eine Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_1 vorgenommen. Es wurde sowohl eine Western-Analyse der ersten (Abb. 16 C) als auch der zweiten Dimension (Abb. 16 D) durchgeführt.

In der Western-Analyse der ersten Dimension reagierte der Antikörper mit mehreren Protein-Komplexen und es waren bei etwa 700 kD (Abb. 16 C, K1), 550 kD (Abb. 16 C, K2) und 260 kD (Abb. 16 C, K3) insgesamt drei Banden zu erkennen. Das hochmolekulare Signal bei ca. 700 kD war das stärkste Signal und die anderen beiden Antikörper-Reaktionen waren deutlich schwächer. Zur Identifikation der entsprechenden Proteinkomplexe, wurde ein Vergleich der Ergebnissen nach Western-Analyse und Coomassie-Färbung in der zweiten Dimension durchgeführt.

In der Western-Analyse der zweiten Dimension waren eine Vielzahl an Reaktionen des Antikörpers α -Alb3_1 unterschiedlicher Intensität zu beobachten (Abb. 16 D, 2*, A*, C*, D*,

F*, *). Allerdings konnte auch durch die Überlagerung und den Vergleich der Antikörper-Signale mit dem Coomassie gefärbten Gel keines der Antikörper-Signale zu keinem Protein sicher zugeordnet werden. Da im Molekularmassenbereich von 45 kD kein Signal erkannt wurde, wurde davon ausgegangen, dass der Antikörper α -Alb3_1 das Alb3-Protein nach Transfer in das SDS-Gel nicht detektierte.

Als Nächstes wurden die Daten der Western Analysen aus der ersten und der zweiten Dimension miteinander in Beziehung gebracht. Da die Fluoreszenz-Signal des K2-Komplex aber zu einer Reaktion des Antiköpers mit den drei verschiedenen Proteinen (Abb. 16 D, *, *, A*) die auch nicht genau senkrecht auf einer Linie untereinander lagen, wurde davon ausgegangen, dass es keine direkte Beziehung zwischen den Signalen der 1. und er 2. Dimension des 2D Geles gab. Es wurde angenommen, dass es sich bei dem K3-Komplex um den Cytb6f-Komplex handeln könnte. Dieser Komplex wurde im Fall von *H. vulgare* als Dimer im gleichen Molekularmassenbereich bei etwa 260 kD nachgewiesen (Granvogl, 2001). Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei K2 um den Cytb6f-Komplex handeln könnte, war das Signal bei etwa 36 kD (Abb. 16 D, 2*). Dieses Signal wurde selbst dann beobachtet, wenn die Blotmembran vorher nicht mit einem Antikörper inkubiert worden war (vgl. dazu Abb. 19 B, 2*). Es handelte sich bei diesem Signal wahrscheinlich um das Cytf-Protein, dessen Fe^{2+} -Atom der Häm-Gruppe mit den Entwicklungslösungen reagieren kann und das Fluoreszenz-Signal erzeugt. Daraus folgt, dass es sich bei dem Signal für den Proteinkomplex K2 um den Cytb6f-Komplex gehandelt haben könnte. Für den K1-Komplex wurden in der Western Analyse der zweiten Dimension (Abb. 16 D) ein Proteine mit etwa 120 kD erkannt, das auf einer vertikalen Linie unter diesem Komplex lag. Da aber die Intensität des Signals nicht mit der Signalintensität der 1. Dimension übereinstimmte, und die Molekularmasse nicht für Alb3 sprach, war auch dieses Signal kein sicheres Indiz dafür, dass dieser Komplex tatsächlich das Alb3-Protein enthielt. Für *C. reinhardtii* wurde allerdings ein hochmolekularer Protein-Komplex für das Alb3-1-Protein beschrieben, der in diesem Molekularmassenbereich zu finden wäre (Bellafiore et al, 2002). Zur Klärung wurden weitere Western-Analysen durchgeführt (siehe 4.1.7.1).

Die hier gezeigte Western-Analyse ist mit der in Abb. 10 Spur 1 und 2 zu vergleichen. In beiden Fällen wurde der Antikörper α -Alb3_1 zusammen mit einem Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* verwendet. So ist die Beschriftung der Signale der Western-Analyse der zweiten Dimension (Abb. 16 D) der aus Abb. 10 angepasst. Der Vergleich machte allerdings deutlich,

dass sich die Signale in beiden Western Analysen sowohl in Anzahl und Intensität deutlich unterschieden. So fehlte in der Western-Analyse der zweiten Dimension gänzlich das Signal für das Alb3-Protein, dass in Abb. 10 detektiert worden war (Abb. 10, 1*). Auch die Intensitäten der einzelnen Signale variierten (vgl. Abb. 16 D, C*, D* mit Abb. 10, Spur 1, C*, D*). Die genauen Ursachen hierfür konnten nicht geklärt werden. Die Beobachtung wird jedoch unter 6.1.1 diskutiert.

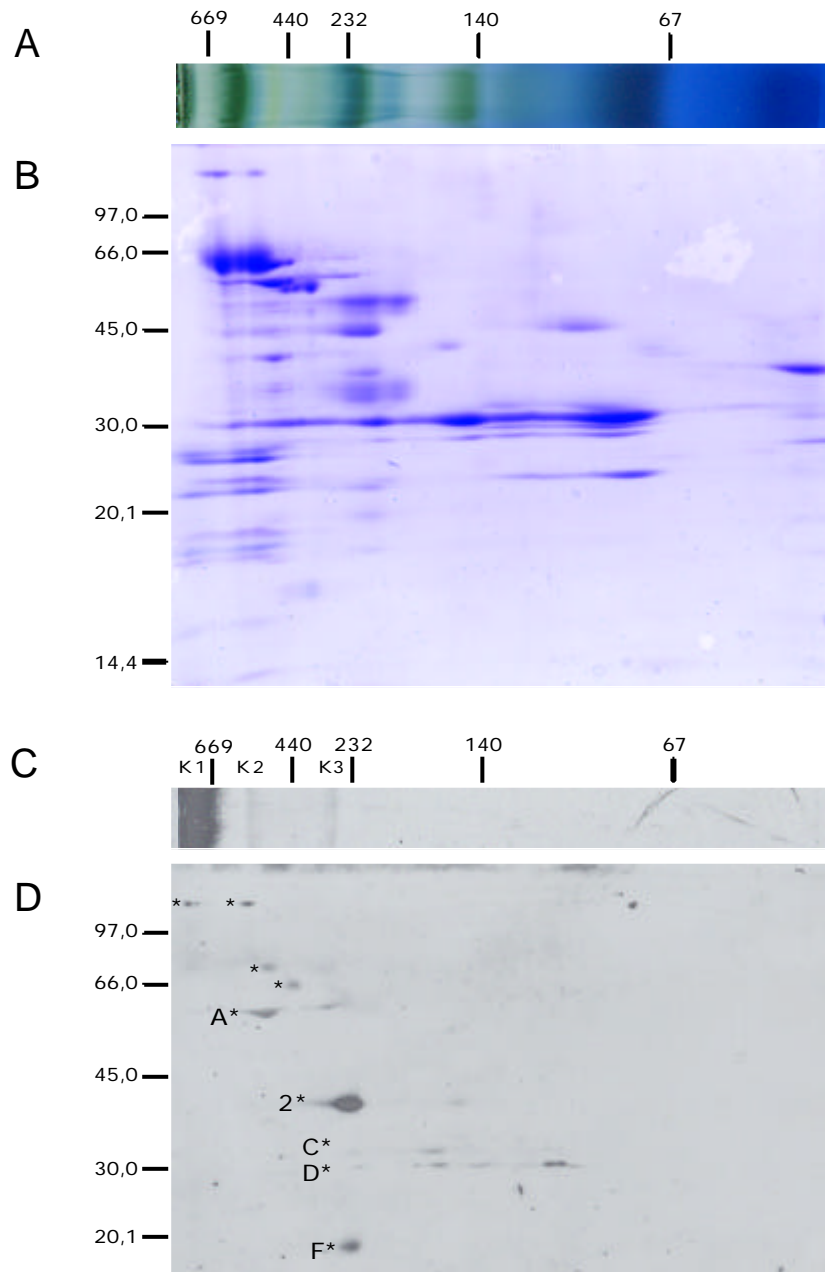


Abbildung 16: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_1. Es wurde ein Aliquot an Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* entsprechend einer Menge von 50 μ g an Chlorophyll (siehe 3.1.1) aufbereitet und über die BN-PAGE aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die zuvor aufgetrennten Komplexe in ihre Einzelproteine zerlegt und entsprechend der Molekularmasse aufgelöst (siehe 3.1.4.3). Ein SDS-Gel wurde mit

Coomassie gefärbt (B) (siehe 3.1.5.1) und ein dazu identisches SDS-Gel wurde zusammen mit einem Streifen aus der ersten Dimension auf eine Membran transferiert und für die anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_1 verwendet (C und D) (siehe 3.1.6). Die Proteine (-Komplexe) des Gelstreifens der ersten Dimension (A) wurden mit Coomassie aus dem gefärbten Kathodenpuffer gefärbt. Die Markerbanden des High Molecular Weight-Markers (A) und (C) und des Low Molecular Weight-Markers (B) und (D) (beide Amersham Pharmacia Biotech) sind angezeichnet. Die Benennung der Signale in der Western-Analyse der zweiten Dimension folgte der aus Abbildung 10.

Insgesamt konnte in diesem Versuch mit dem Antikörper α -Alb3_1 im Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* weder das Alb3-Protein noch ein Alb3-haltiger Komplex identifiziert werden. Als Nächstes wurde eine Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_3 durchgeführt.

4.1.6.2 Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_3 nach 2D-Gelelektrophorese

Ziel dieses Versuchs war es das Alb3-Protein zu identifizieren und auf Grund der Identifizierung des Alb3-Einzelproteins einen Alb3-haltigen Komplex zu finden (siehe 4.1.6). Dazu wurden zunächst die Protein-Komplexe eines Chloroplastenextrakts von *A. thaliana* in der ersten Dimension über BN-PAGE aufgetrennt (Abb. 17 A). Anschließend erfolgte die Auftrennung der Protein-Komplexe in ihre Einzelproteine in der zweiten Dimension (Abb.17 B). Der Nachweis des Alb3-Proteins wurde über eine Western-Analyse der zweiten Dimension mit dem Antikörper α -Alb3_3 vorgenommen (Abb. 17 C). Mit einer ersten Dimension wurde keine Western-Analyse durchgeführt.

In der vorliegenden Western-Analyse nach 2D-PAGE waren eine Vielzahl an Antikörper-Signalen unterschiedlicher Intensität zu beobachten (Abb. 17 C, 1*, 2*, 3*, D1*, D2*, D3*, F*, *). Die verschiedenen Signale waren in unterschiedlichen Molekularmassenbereichen zu finden. Doch auch durch eine Überlagerung der Western-Analyse mit dem Coomassie gefärbten Gel, konnten keine sicheren Aussagen über die Identität der Proteine gemacht werden, mit denen der Antikörper reagierte. Allerdings erkannte der Antikörper α -Alb3_3 ein Signal im Molekularmassenbereich von etwa 47 kD (Abb. 16 C, 1*), das als Identifizierung des Alb3-Proteins interpretiert wurde. Dieses Protein bei ca. 47 kD stammte aus keinem Komplex, da es schon in der ersten Dimension auf der Höhe von etwa 47 kD lief. In diesem Bereich laufen die als „freies“ Protein bezeichneten Proteine, da Proteinkomplexe in den meisten Fällen höhere Molekularmassen besitzen. Die anderen Signale wurden auf Wechselwirkungen des Antikörpers mit unbekanntem Proteinen zurückgeführt.

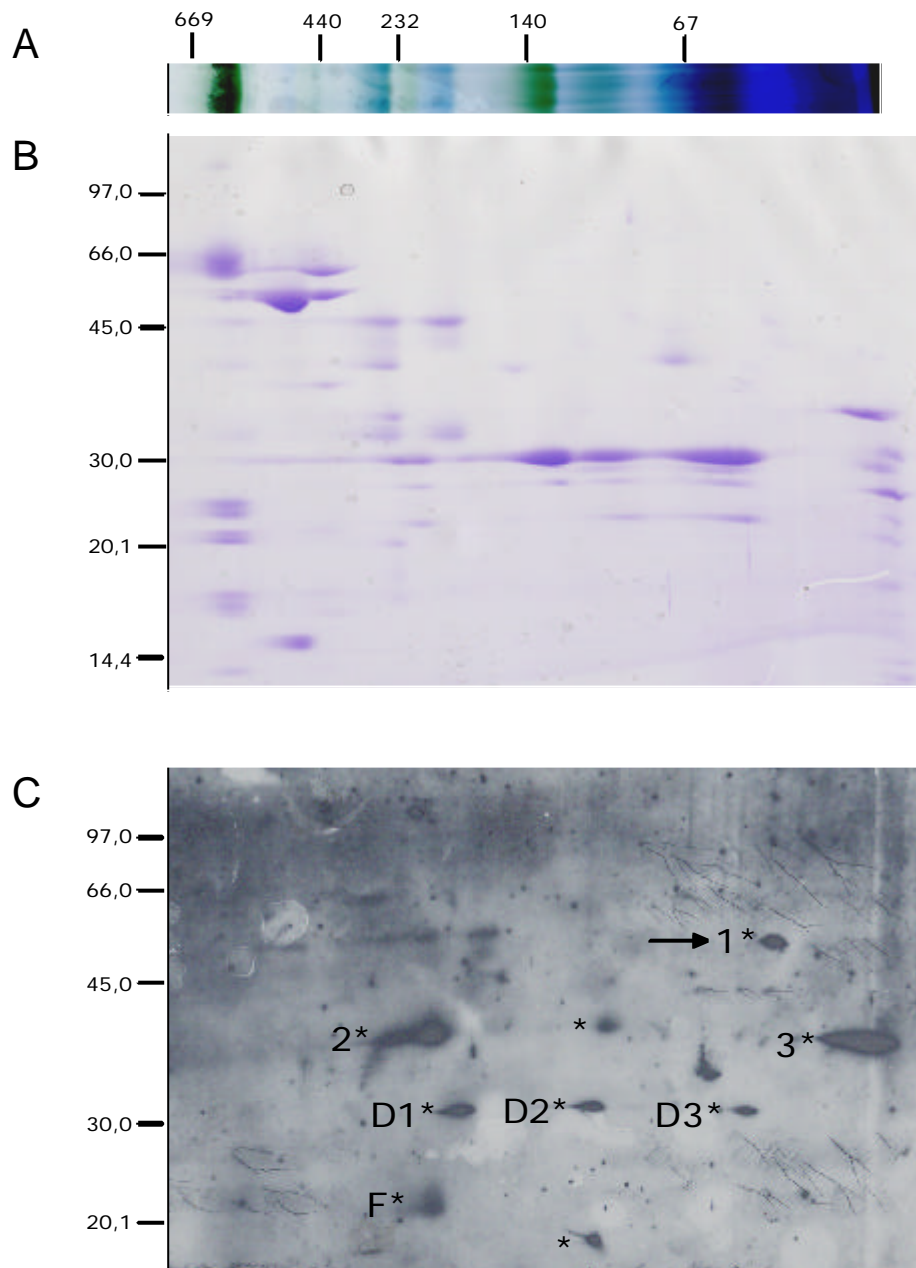


Abbildung 17: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_3. Es wurde ein Aliquot an Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* entsprechend einer Menge von 40 μ g an Chlorophyll (siehe 3.1.3) aufbereitet und mittels BN-PAGE aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die zuvor aufgetrennten Komplexe in ihre Einzelproteine zerlegt und entsprechend der Molekularmasse aufgelöst (siehe 3.1.4.3). Ein SDS-Gel wurde mit Coomassie gefärbt (B) (siehe 3.1.5.1) und ein dazu identisches SDS-Gel wurde zusammen mit einem Streifen aus der ersten Dimension auf eine Membran transferiert und für die anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_3 verwendet (C) (siehe 3.1.6). Die Proteine (-Komplexe) des Gelstreifens der ersten Dimension (A) wurden mit Coomassie aus dem gefärbten Kathodenpuffer gefärbt. Die Markerbanden des High Molecular Weight-Markers (A) und des Low Molecular Weight-Markers (B) und (C) (beide Amersham Pharmacia Biotech) sind angezeichnet. Die Benennung der Signale in der Western-Analyse der zweiten Dimension folgt der aus Abbildung 10.

Die Signale aus dieser Western-Analyse wurden mit den Ergebnissen aus der Western-Analysen dieses Antikörpers nach der 1D-Gelelektrophorese (4.1.2) und der des Antikörpers α -Alb3_1 nach 2D-Gelelektrophorese (4.1.6.1) verglichen.

Zunächst wurde ein Vergleich zwischen den Western-Analysen vorgenommen, die mit dem gleichen Antikörper (α -Alb3_3) durchgeführt wurden. Bei der Benennung der Signale in Abb. 17 C wurde Bezug auf die Beschriftung in Abb. 10 Spur 2 genommen. Wurden alle Signale, die in Abb. 17 C auf einer horizontalen Linie lagen, auf dieser Linie verschoben, wurde deutlich, dass das Muster aller starken Signale aus Abb. 10 auch in Abb. 17 C wiederzufinden war (Abb. 17 C, 1*, 2*, 3*, D1*, D2*, D3*). Das wichtigste Signal (Abb. 17 C, 1*) wurde als Reaktion des Antikörpers mit dem Alb3-Protein interpretiert. Das Alb3-Protein schien in dieser Western-Analyse allerdings bei etwa 47 kD vom Antikörper erkannt zu werden. Ob es sich somit tatsächlich um das Alb3-Protein handelte und warum es hier bei einer etwas höheren Molekularmasse identifiziert wurde, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Beachtenswert waren die Signale der Proteine im Bereich von etwa 36 bis 38 kD. Hier lag für den Antikörper α -Alb3_3 in der Western-Analyse der eindimensionalen Gelelektrophorese eine Doppelbande vor (Abb. 10, Spur 2, 2*, 3*). Auch in der Western-Analyse nach der 2D-Gelelektrophorese fanden sich in diesem Bereich mehrere Proteine wieder. Wurden diese Signale wieder als auf einer horizontalen Linie zusammengeschoben betrachtet, ergäbe sich wieder eine Doppelbande (Abb. 17 C, 2*, 3*, *). Das Protein, das in Abb. 10 bei etwa 30 kD gefunden wurde (Abb. 10, Spur 2, D*), schien Bestandteil von drei Komplexen zu sein. Zog man eine vertikale Linie durch die Signale D1*, D2* und D3*, so stellte man fest, dass diese Proteine Bestandteile von Komplexen gewesen sein müssen, die in der ersten Dimension als grüne, d.h. chlorophyllhaltige Banden aufgetrennt wurden. Die Vermutung, dass es sich aus diesem Grund bei den Signalen D1*, D2* und D3* in Abb. 17 um ein LHCP handelte, lag zwar nahe, konnte aber nicht abschließend bestätigt werden. Im Vergleich zu Abb. 10 wurden in dieser Western-Analyse zwei zusätzliche Proteine bei etwa 21 und 18 kD vom Antikörper α -Alb3_3 erkannt (Abb. 17 C, F*). Warum diese in Abb. 10 nicht detektiert worden waren, konnte ebenfalls nicht geklärt werden (vgl. aber 6.1.1.7).

Der Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Western-Analyse, in der α -Alb3_1 als primärer Antikörper verwendet wurde (4.1.6.1), machte die Probleme mit den Western-Analysen deutlich, die während dieser Arbeit auftraten. So konnte im Fall des

Antikörpers α -Alb3_3 das Alb3-Protein nach eindimensionaler sowie zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Mit dem Antikörper der α -Alb3_1 war das nicht möglich. Hier schien das Signal in der Western-Analyse nach 2D-Gelelektrophorese spezifisch zu fehlen (vgl. Abb. 16 D mit Abb. 10). Erwähnenswert dabei ist, dass der Chloroplastenextrakt für die beiden Western-Analysen von unterschiedlichen Präparationen stammte. Die Aufarbeitungen erfolgten nach dem gleichen Protokoll, aber es ist möglich, dass sich die Chloroplastenextrakte unterschieden. Die genauen Ursachen dafür, dass das Alb3-Protein in einen Fall nachgewiesen werden konnte und im anderen nicht, konnte nicht geklärt werden. Die Beobachtung wird unter 6.1.1.7 diskutiert.

Das Ergebnis dieses Versuchs war, dass es prinzipiell, technisch möglich sein könnte das Alb3-Protein in einer Western-Analyse nach zweidimensionaler Gelelektrophorese zu identifizieren. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte allerdings kein Alb3-haltiger Protein-Komplex nachgewiesen werden.

4.1.6.3 Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_RH nach 2D-Gelelektrophorese

Ziel dieses Versuchs war es das Alb3-Protein zu identifizieren und auf Grund der Identifizierung des Alb3-Einzelproteins einen Alb3-haltigen Komplex zu finden (siehe 4.1.6). Dazu wurden zunächst die Protein-Komplexe eines Chloroplastenextrakts von *A. thaliana* in der ersten Dimension über BN-PAGE aufgetrennt (Abb. 18 A). Anschließend erfolgte die Auftrennung der Protein-Komplexe in ihre Einzelproteine in der zweiten Dimension (Abb. 18 B). Der Nachweis des Alb3-Proteins wurde über eine Western-Analyse der zweiten Dimension mit dem Antikörper α -Alb3_RH vorgenommen (Abb. 18 C). Mit einer ersten Dimension wurde keine Western-Analyse durchgeführt.

In der gezeigten Western-Analyse waren zwei Signale zu erkennen (Abb. 18 C). Das eine lag bei etwa 18 kD (Abb. 18 C; *) und das andere bei etwa 36 kD (Abb. 18 C; 2*). Für beide Signale war nicht bekannt, um welche Proteine es sich handelte, allerdings wurde vermutet, dass es sich bei dem 36 kD-Signal um das Cytf-Protein handelte (siehe 4.1.2 und 4.1.6.1).

Da ca. die 2-fache (im Vergleich zu 4.1.6.1) bzw. 2,5-fache (im Vergleich zu 4.1.6.2) Menge an Chloroplastenextrakt auf die erste Dimension aufgetragen wurde, ist die Intensität der Signale in dieser Western-Analyse gegenüber den anderen beiden Western-Analysen viel stärker.

Es konnte somit weder das Alb3-Protein noch Alb3-haltige Komplexe in dieser Western-Analyse, mit dem ansonsten als Referenz-Antikörper verwendeten Antikörper α -Alb3_RH, nachgewiesen werden.

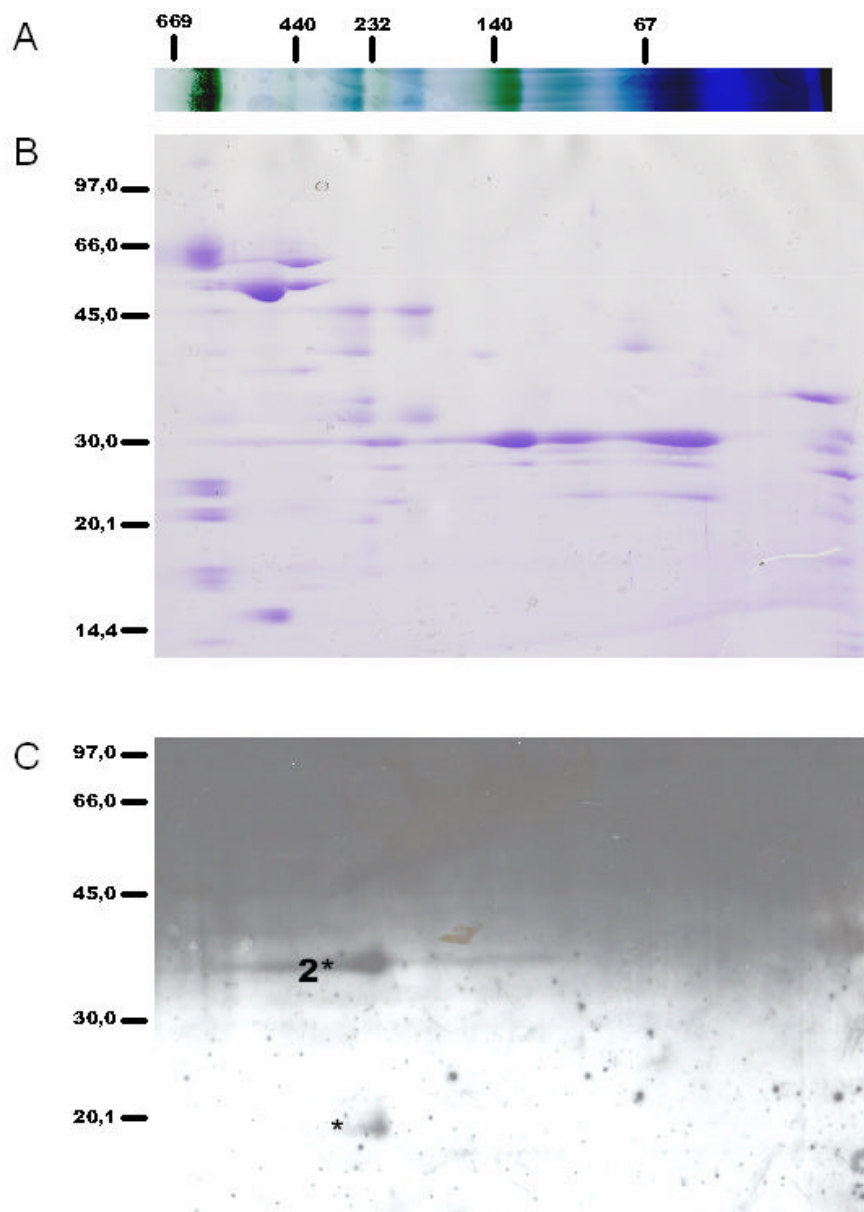


Abbildung 18: Zweidimensionale Gelelektrophorese von Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_RH. Es wurde ein Aliquot an Chloroplastenextrakt aus *A. thaliana* entsprechend einer Menge von 100 μ g an Chlorophyll (siehe 3.1.3) aufbereitet und mittels BN-PAGE aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die zuvor aufgetrennten Komplexe in ihre Einzelproteine zerlegt und entsprechend der Molekularmasse aufgelöst (siehe 3.1.4.3). Das SDS-Gel wurde auf eine Membran transferiert und für die anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_RH verwendet (C) (siehe 3.1.6). Die in dieser Abbildung dargestellte erste Dimension (A) bzw. Coomassie gefärbte zweite Dimension (B) waren nicht mit den zur Western-Analyse verwendeten Gelen identisch. Auf die dargestellten Gele wurde lediglich Chloroplastenextrakt entsprechend einer Menge von 40 μ g (und nicht 100 μ g) an Chlorophyll aufgetragen. Die Proteine (-Komplexe) des Gelstreifens der ersten Dimension (A) wurden mit

Coomassie aus dem gefärbten Kathodenpuffer gefärbt. Die Markerbanden des High Molecular Weight-Markers (A) und des Low Molecular Weight-Markers (B) und (C) (beide Amersham Pharmacia Biotech) sind angezeichnet. Die Benennung der Signale in der Western-Analyse der zweiten Dimension folgt der aus Abbildung 10.

4.1.7 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese wurde das Alb3-Protein in Western-Analysen möglicherweise nur mit dem Antikörper α -Alb3_3 nachgewiesen (Abb. 17 C, 1*). Die Molekularmasse des Signals deutete aber darauf hin, dass mit diesem Antikörper keine Alb3-haltigen Komplexe identifiziert wurden. In der Western-Analyse der ersten Dimension mit dem Antikörper α -Alb3_1 gab es jedoch ein Signal oberhalb von 669 kD (Abb. 16 C, K1), das auf einen Komplex hindeuten könnte.

In einer anderen Arbeit konnten mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation bereits zwei Alb3-Komplexe in einer mit Alb3-1 komplementierten *C. reinhardtii ac29*-Mutante nachgewiesen werden (Bellafiore et al, 2002). Diese Komplexe hatten eine Größe zwischen 60 und 80 kD sowie zwischen 600 und 700 kD.

Um zu überprüfen, ob das hochmolekulare Signal aus der Western-Analyse der ersten Dimension mit dem Antikörper α -Alb3_1 auf einen Alb3-Komplex zurückzuführen ist, wurde auch in dieser Arbeit die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zum Auftrennen des Gesamtproteins aus dem Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* verwendet.

Außerdem gab es die Vermutung, dass das Alb3-Protein als Komponente des cotranslationalen cpSRP-Weges für den Export von Proteinen in die Thylakoidmembran (Abb. 2) in hochmolekularen Komplexen mit Ribosomen assoziiert vorkommen könnte (Nilsson et al, 1999). Diese könnten zu groß sein, um in das Polyacrylamidgel einzulaufen. Mit der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation als Technik zum Auftrennen des Gesamtproteins sollte versucht werden, dieses Problem zu umgehen.

4.1.7.1 Western-Analyse mit α -Alb3_1 nach Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Ziel dieses Versuchs war es zu überprüfen, ob es sich bei dem hochmolekularen Signal in der Western-Analyse der ersten Dimension (Abb. 16 C, K1) mit dem Antikörper α -Alb3_1 um einen Alb3-haltigen Komplex handelte.

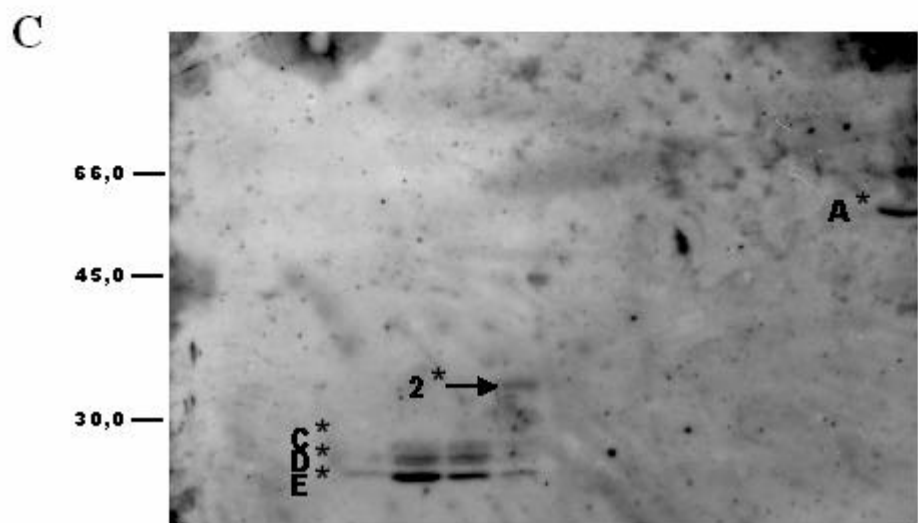
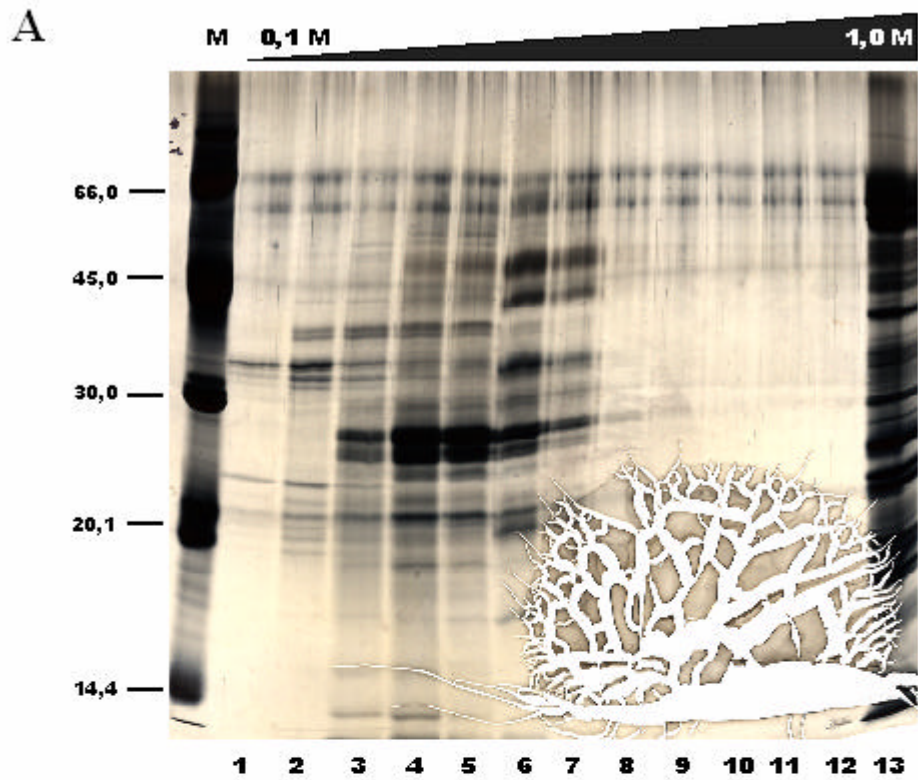


Abbildung 19: Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_1. Es wurde ein Aliquot an Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* entsprechend einer Menge von

300 µg an Chlorophyll aufbereitet (siehe 3.1.3) und auf einen linearen Saccharose-Dichtegradienten (0,1 M bis 1,0 M) aufgetragen (siehe 3.1.7). Nach der beendeten Zentrifugation (190000 x g; 16,5 h; 4 °C) wurde der Gradient von oben nach unten in 1 ml Fraktionen aufgeteilt und jeweils 30 µl davon auf ein 12,5 %iges, denaturierendes SDS-Gel aufgetragen (siehe 3.1.4.1). Eines von zwei identisch behandelten Gelen wurde Silber gefärbt (A) (siehe 3.1.5.2) und das andere wurde ohne vorher mit dem Antikörper inkubiert gewesen zu sein mit den Entwicklungslösungen behandelt (B) und nach der Inkubation mit dem primären Antikörper α -Alb3_1 für die Western-Analyse verwendet (C) (siehe 3.1.6). Die Banden des Low Molecular Weight-Markers (Amersham Pharmacia Biotech) sind angezeichnet. Die Benennung der Signale in der Western-Analyse folgt der aus Abbildung 10.

Die Auftrennung des Gesamtproteins von Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* erfolgte über einen linearen Saccharose-Gradienten. Zur Identifizierung des Alb3-Proteins wurde eine an die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation anschließende Western-Analyse mit dem Antikörper α -Alb3_1 durchgeführt.

Im Bereich von 45 kD der vorliegenden Western-Analyse (Abb. 19 C) erkannte der Antikörper kein Signal, so dass Alb3 nicht identifiziert wurde. Insgesamt waren jedoch eine Vielzahl an Signalen detektiert worden (Abb. 19 C, A*, 2*, C*, D*, E*). In den Fraktionen 4, 5 und 6 wurden jeweils drei Proteine erkannt, die im Molekularmassenbereich zwischen ca. 26 und 28 kD lagen (Abb. 19 C, E*, F*, G*). In der Fraktion 13 (Pellet) erkannte der Antikörper ein etwa 55 kD Protein (Abb. 19 A*). Um welche Proteine es sich in diesen Fällen handelte, konnte nicht geklärt werden.

Ein weiteres Signal dieser Western-Analyse war in der Fraktion 6 auf der Höhe von etwa 33 kD zu beobachten (Abb. 19 B und C, 2*). Dieses Signal war deswegen interessant, weil das Fluoreszenz-Signal nicht durch spezifische Reaktion mit dem Antikörper ausgelöst wurde. Wurden die Proteine auf der Blotmembran ohne vorherige Inkubation in einer Antikörperlösung mit den ECL-Entwicklungslösungen (Luminol, pCoumarat, Puffer, H₂O₂; siehe 3.1.6) behandelt, kam dieses Signal ebenfalls deutlich zum Vorschein (Abb. 19 B, 2*). Das war der Nachweis dafür, dass das Fluoreszenz-Signal nicht aus der Reaktion eines Antikörpers resultierte. Es handelte sich bei diesem Signal wahrscheinlich um das Cytf-Protein, dessen Fe²⁺-Atom der Häm-Gruppe mit den Entwicklungslösungen reagieren kann und das Fluoreszenz-Signal erzeugt. Insgesamt konnte keines der Signale jedoch sicher zu einem Protein zugeordnet werden.

Bei einem Vergleich von Abbildung 10 Spur 1 und 2 mit der hier gezeigten Western-Analyse (Abb. 19 C) wurde deutlich, dass einige der Signale analog zu sein schienen. Dementsprechend wurde die Bezeichnung der Signale der Beschriftung aus Abb. 10

angepasst. Zwar unterschieden sich die Verhältnisse in den Signalintensitäten teilweise deutlich (Abb. 19 C, C* / E* mit Abb. 10 Spur 1 und 2, C / E), jedoch war das Muster der Signale ähnlich. Die Abstände zwischen den Signalen in Abb. 10 sind allerdings etwas größer da eine geringere Acrylamidkonzentration zur Polymerisierung der SDS-Gele verwendet worden war.

Die Ergebnisse zeigten, dass das Alb3-Protein auch nach Auftrennung des Gesamtproteins eines Chloroplastenextrakts von *A. thaliana* mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation nicht mit dem Antikörper α -Alb3_1 identifiziert werden konnte.

Da das Alb3-Protein nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation in der anschließenden Western-Analyse mit den vorhandenen Antikörpern nicht reproduzierbar (vgl. 4.1.2 mit 4.1.6.1 und 4.1.6.2) und nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob die zuvor in den Antikörpertests als Alb3 interpretierten Signale (Abb. 10, 1*, Pfeil) tatsächlich vom Alb3-Protein stammten. Hierzu sollte die cDNA des Alb3-Gens kloniert werden. Nach der anschließenden Herstellung eines Expressionsklons sollte das Alb3-Protein rekombinant synthetisiert werden. Die vorhandenen Antikörper sollten dann in weiteren Western-Analysen mit dem rekombinant synthetisierten Protein erneut getestet werden.

4.2 Molekularbiologische Ergebnisse

Die molekularbiologische Zielstellung war es die alb3-cDNA zu klonieren, um einen Expressionsklon herstellen zu können, mit dem das Alb-Protein rekombinant synthetisiert werden sollte.

4.2.1 Herstellung von alb3-cDNA

Eigene Versuche die alb3-cDNA mittels PCR aus einer λ -Phagenbank oder mittels RT-PCR aus isolierter RNA von *A. thaliana* zu gewinnen, blieben ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Die klonierte alb3-cDNA (Sundberg et al. 1997) wurde von Frau Prof. Dr. Sundberg (Evolutionary Biology Centre, Department of Physiological Botany, University of Uppsala, Schweden) zur Verfügung gestellt und sollte gerichtet (*EcoRV* (5'-Ende) und *XhoI* (3'-Ende)) im Vektor pBlueskript[®] II SK+ (Stratagene, USA) einkloniert vorliegen (Sundberg, persönliche Mitteilung). Die Größe des inserierten alb3-cDNA-Fragmentes entsprach der in der NCBI-Datenbank abgelegten Sequenz von 1,72 kb (Accession # ATU89272).

4.2.2 Überprüfung des Ausgangsmaterials auf die alb3-cDNA mit PCR

Mit einer PCR konnte gezeigt werden, dass das zugesandte Material tatsächlich die alb3-cDNA in der angegebenen Orientierung enthält.

Dazu wurden sechs PCR-Ansätze mit jeweils forward (fw) und reverse (rev) Primern für Alb3 und M13 (siehe 2.6) in unterschiedlichen Kombinationen angesetzt und die erzeugten DNA-Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 20).

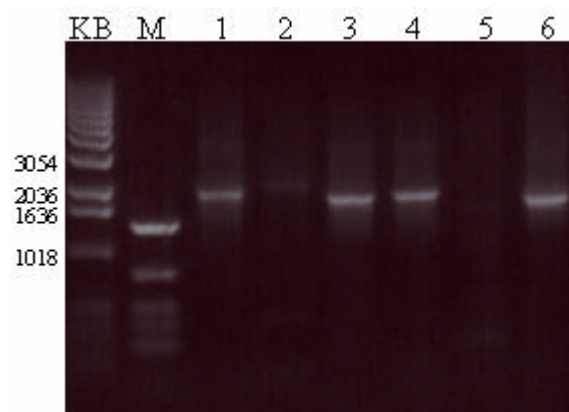


Abbildung 20: PCR mit der zur Verfügung gestellten alb3-cDNA. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), dann jeweils 1 μ l der 10 μ l PCR-Ansätze mit den folgenden Primern (siehe 3.2.8):

- (1) M13 fw, M13 rev
- (2) M13 fw, Alb3 rev
- (3) M13 fw, Alb3 fw
- (4) M13 rev, Alb3 rev
- (5) M13 rev, Alb3 fw
- (6) Alb3 fw, Alb3 rev

Die verwendeten Alb3-Primer (fw und rev) erzeugten in der durchgeführten PCR ein DNA-Fragment (Abb. 20, 6), das zwischen den Größenmarkern von etwa 1,6 kb und 2 kb lag (Abb. 20, KB). Damit konnte nachgewiesen werden, dass das Ausgangsmaterial tatsächlich die alb3-cDNA enthält. Mit den M13-Primern (fw und rev) wurde ein DNA-Fragment erzeugt (Abb. 20, 1), das wie erwartet etwas größer als war als das Fragment, das mit den Alb3-Primern generiert wurde (Abb. 20, 6) (vgl. dazu Abb. 21). Die Kombination aus M13 fw und Alb3 rev (Abb. 20, 2) und M13 rev und Alb3 fw (Abb. 20, 5) lieferten nur schwache, kaum erkennbare Signale. Mit den Primerkombinationen M13 fw und Alb3 fw (Abb. 20, 3) sowie M13 rev und Alb3 rev (Abb. 20, 4) hingegen wurden deutliche DNA-Fragmente erzeugt, die in einer Größenordnung von etwas über 1,6 kb lagen.

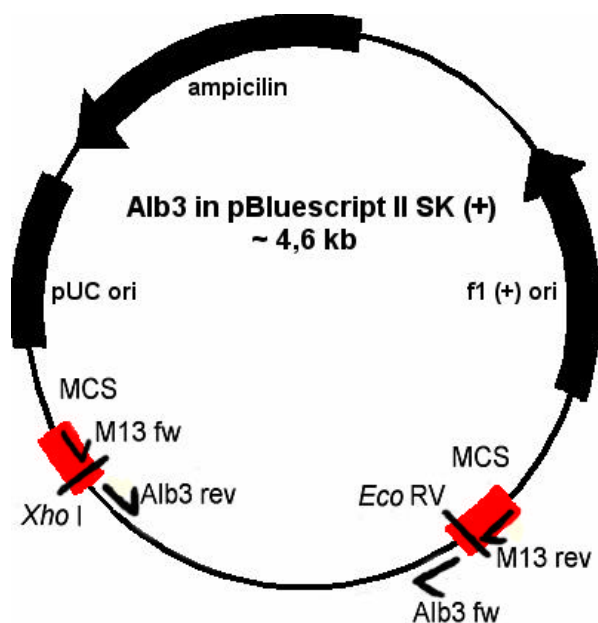


Abbildung 21: Schematischer Aufbau des pBluescript® II SK + Vektors und Orientierung der einklonierten alb3-cDNA. Der Vektor enthält einen f1 (+) ori, eine Ampicilin-Resistenz, einen pUC ori und eine multiple Klonierungsstelle (MCS; rote Box). Die Bindungsstellen der verwendeten Primer (siehe 2.6) und die Schnittstellen von *Xho*I und *Eco*RV sind eingezeichnet.

Das Vorhandensein der alb3-cDNA konnte mit dieser PCR eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 20, 6). Ebenso konnte die Orientierung im pBluescript® II SK + Vektor geklärt werden (vgl. Abb. 21), die der von Prof. Sundberg angegebenen entsprach. Nur bestimmte Kombinationen aus M13- und Alb3-spezifischen Oligonukleotiden generierten PCR-Fragmente (Abb. 20, 3 und 4).

Anschließend wurde die Alb3 cDNA in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert und die Plasmid-DNA aus den Transformanten isoliert.

4.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA I

Aus transformierten Bakterien-Zellen (siehe 3.2.2) konnte das eingebrachte DNA-Plasmid mittels DNA-Mini-Präparation isoliert werden (siehe 3.2.3). Anschließend wurden die verschiedenen isolierten DNA-Plasmide mittels PCR (siehe 3.2.8 und 4.2.3.2) und Sequenzierung (siehe 3.2.10 und 4.2.3.5) analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass sich mit der lhcb1-cDNA auch eine Verunreinigung in den Transformanten befand.

4.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels DNA-Mini-Präparation I

Nachdem der zur Verfügung gestellte cDNA Klon (siehe 4.2.1) in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert worden war (siehe 3.2.2), wurde das eingebrachte DNA-Plasmid anschließend mittels DNA-Mini-Präparation aus den transformierten Bakterien-Zellen isoliert (siehe 3.2.3). Die isolierten Plasmide wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 3.2.7)(Abb. 22).

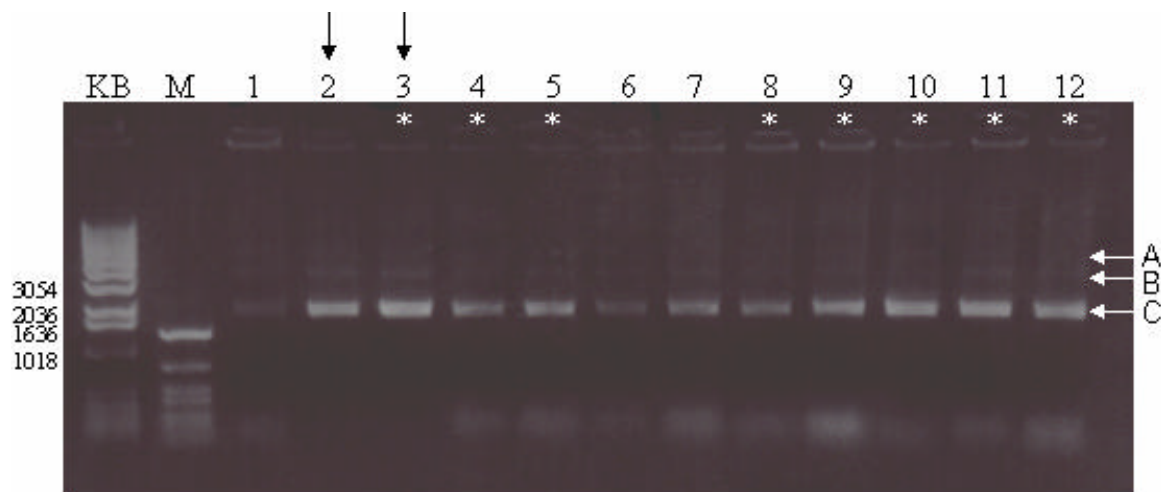


Abbildung 22: DNA-Mini-Präparation I von zwölf willkürlich ausgewählten Klonen. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), (1)-(12) jeweils 1 μ l der Mini-Präparationsausbeute (etwa 30 μ l); Die mit den schwarzen, senkrechten Pfeilen markierten Spuren (2) und (3) wurden sequenziert (siehe 3.2.10 und 4.2.3.5); Die Spuren, die mit Sternchen gekennzeichnet sind (3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12), wurden für eine anschließende Kontroll-PCR (siehe 3.2.8 und Abb. 23 und 24) verwendet. Mit den weißen Pfeilen (A, B, C) wurden Plasmid-Banden markiert.

Die Auswertung des Agarosegels, auf das die gleiche Menge an Plasmid-DNA-Präparation von zwölf willkürlich ausgewählten Klonen aufgetragen und aufgetrennt wurde, zeigte, dass die Transformation erfolgreich gewesen war (Abb. 22). Die intensivste Bande lag bei allen Transformanten etwa zwischen der 1,6 kb- und 2,0 kb-Markerbande (Abb. 22, C-Pfeil). Diese Bande wurde dem topologischen „supercoiled“-Zustand des Plasmids zugeordnet, der einen sehr kompakten Zustand von DNA-Plasmiden darstellt und deswegen weiter ins Gel einläuft,

als das für die Molekularmasse zu erwarten wäre. Durch einen Intensitätsvergleich der Signale wurde offensichtlich, dass die Ausbeuten an Plasmid-DNA unterschiedlich hoch waren (vgl. Abb. 22 Spur 1 und 3). Weiterhin fielen zwei schwächere Banden (Abb. 22, A- und B-Pfeil) auf, die auf der Höhe von etwas über 3 kb liefen und wahrscheinlich anderen topologischen Strukturen des Plasmids entsprachen. Alle drei Banden (Abb. 22, A-, B-, C-Pfeil) liefen für die zwölf ausgewählten Klone im Agarosegel auf der gleichen Höhe. Nachdem das Ausgangsmaterial erfolgreich transformiert worden war, sollten die isolierten DNA-Plasmide auf das Vorhandensein der alb3-cDNA überprüft werden.

4.2.3.2 Kontroll-PCR der isolierten Plasmid-DNA aus 4.2.3.1

Mit einer Kontroll-PCR der isolierten Plasmide aus 4.2.3.1 sollte überprüft werden, ob es sich bei den isolierten Plasmiden um die alb3-cDNA handelte.

Dazu waren willkürlich Plasmid-DNA-Präparationen ausgewählt worden (Abb. 22, Sternchen), aus denen mit den Alb3-Primern (fw und rev) spezifisch das Alb3-Fragment amplifiziert werden sollte (Abb. 23 und 24; Die Ziffern der Spuren bei der Benennung der beiden Abbildungen ist zu den Ziffern aus Abb. 22 analog).

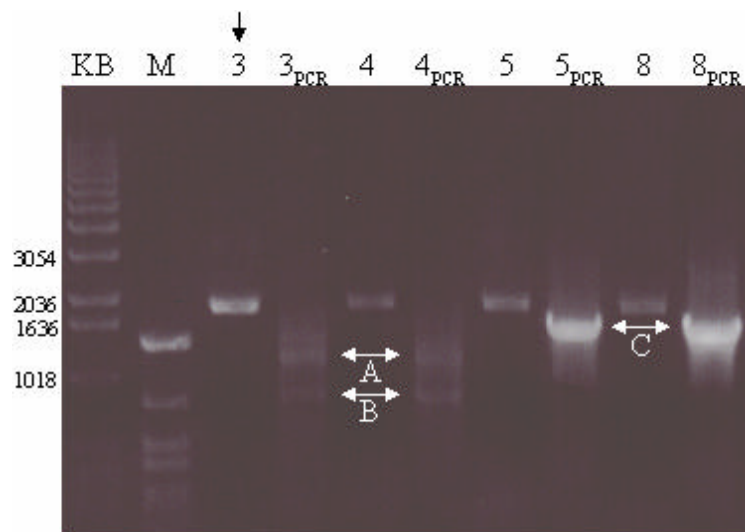


Abbildung 23: Kontroll-PCR für ausgewählte Klone I. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), Die Spuren (3), (4), (5) und (8) wurden mit jeweils 1 µl des zur PCR eingesetzten Plasmids beladen. Die Spuren (3_{PCR}), (4_{PCR}), (5_{PCR}) und (8_{PCR}) wurden mit jeweils 1 µl des PCR-Ansatzes beladen. Die PCR wurde in einem 50 µl Ansatz und mit den Alb3-Primern (fw und rev) durchgeführt (siehe 3.2.8). Der Pfeil (3) markiert das Plasmid, das sequenziert worden ist. Die drei weißen mit (A) (B) und (C) markierten Doppelpfeile zeigen auf amplifizierte DNA-Fragmente.

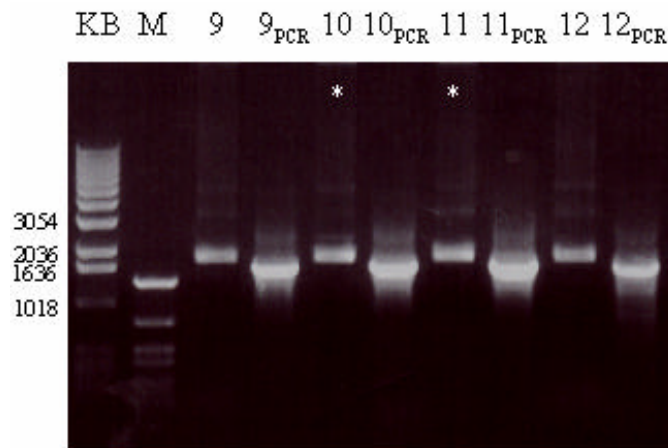


Abbildung 24: Kontroll-PCR für ausgewählte Klone II. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), Die Spuren (9), (10), (11) und (12) wurden mit jeweils 1 μ l des zur PCR eingesetzten Plasmids beladen. Die Spuren (9_{PCR}), (10_{PCR}), (11_{PCR}) und (12_{PCR}) wurden mit jeweils 1 μ l des PCR-Ansatzes beladen. Die PCR wurde in einem 50 μ l Ansatz und mit den Alb3-Primern (fw und rev) durchgeführt (siehe 3.2.8). Die mit Sternchen markierten Klone (10) und (11) wurden für eine DNA-Maxi-Präparation ausgewählt (siehe 4.2.3.3).

Auf die Agarosegele (Abb. 23 und Abb. 24) wurde jeweils ein Aliquot der Plasmid-DNA-Präparation (Abb. 23, 3, 4, 5, 8 und Abb. 24, 9, 10, 11, 12) und ein Aliquot der PCR, die mit den Alb3-Primern (fw und rev) durchgeführten worden war (Abb. 23, 3_{PCR}, 4_{PCR}, 5_{PCR}, 8_{PCR} und Abb. 24, 9_{PCR}, 10_{PCR}, 11_{PCR}, 12_{PCR}) aufgetragen. Die Fragmente, die bei einer Größe von etwa 1,6 kb lagen, entsprachen der amplifizierten alb3-cDNA (Abb. 23, 5_{PCR}, 8_{PCR}, Doppelpfeil C und Abb. 24, 9_{PCR}, 10_{PCR}, 11_{PCR}, 12_{PCR}) und zeigten, dass die alb3-cDNA in verschiedene Klone (Abb. 23, 5, 8 und Abb. 24, 9, 10, 11, 12) transformiert worden war. Neben den Alb3-Fragmenten wurden unbekannte DNA-Fragmente bei etwa 1,3 kb (Abb. 23, Doppelpfeil A) und etwa 0,8 kb (Abb. 23, Doppelpfeil B) generiert. Diese Signale waren zunächst nicht zu erklären und deuteten erstmals auf eine Kontamination hin.

Auf Grund des nicht eindeutigen Nachweis der alb3-cDNA wurden verschiedene Klone (Abb. 22 und 24, 10 und 11) für eine DNA-Maxi-Präparation (siehe 3.2.4) ausgewählt und die Plasmid-DNA weiterer Klone (Abb. 22; 2 und 3) sequenziert (siehe 3.2.10 und 4.2.2.5).

4.2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels DNA-Maxi-Präparation I

Mit der DNA-Maxi-Präparation sollten größere Mengen an Plasmid-DNA isoliert werden. Die Ausbeute an Plasmid-DNA einer DNA-Maxi-Präparation von zwei Klonen (Abb. 24, 10 und 11, Sternchen) wurde anhand eines Agarosegels abgeschätzt (3.2.7). Dazu wurden eine

bekannte Menge an DNA mit auf das Gel aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Durch einen Intensitätsvergleich der Banden (Abb. 25, Spuren 10 und 11) mit dem Standard konnte die gewonnene Menge an Plasmid-DNA grob abgeschätzt werden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden beide DNA-Maxi-Präparationen mittels PCR mit den Alb3-Primern (fw und rev) kontrolliert (siehe 3.2.8 und 4.2.3.4) und sequenziert (siehe 3.2.10 und 4.2.3.5).

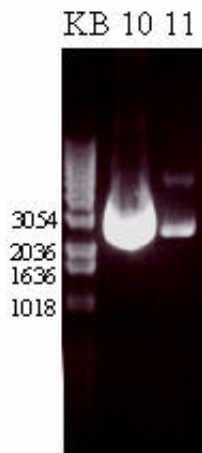


Abbildung 25: DNA-Maxi-Präparation I von zwei ausgewählten Klonen. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), 1 μ l von 250 μ l aus der DNA-Maxi-Präparation des Klons (10) aus Abbildung 22 und 1 μ l von 100 μ l aus der DNA-Maxi-Präparation des Klons (11) aus Abbildung 22.

4.2.3.4 Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation I aus 4.2.3.3

Die aus der in 4.2.3.3 beschriebenen DNA-Maxi-Präparation erhaltenen Plasmide sollten auf das Vorhandensein der alb3-cDNA überprüft werden.

Dazu wurde eine PCR der DNA-Maxi-Präparation mit den Alb3-Primern (fw und rev) durchgeführt und die erzeugten DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 26).

Bei der PCR wurden für beide Klone jeweils ein DNA-Fragment auf der Höhe des erwarteten Alb3-Fragmentes bei ca. 1,6 kb generiert (Abb. 26, 10 und 11). Weiterhin wurden jedoch auch kleinere DNA-Fragmente beobachtet, die wie in 4.2.3.2 auf eine Verunreinigung deuten.

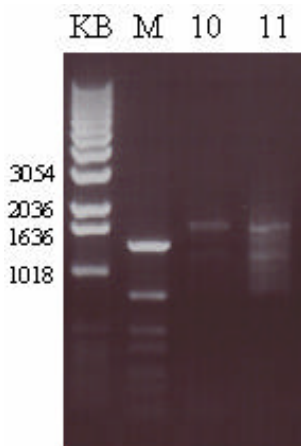


Abbildung 26: Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation I. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), In den Spuren (10) und (11) wurden jeweils 1 μ l des PCR-Ansatzes der DNA-Maxi-Präparation auf das Gel geladen. Die PCR wurde in einem 50 μ l Ansatz und mit den Primern Alb3 fw und rev durchgeführt (siehe 3.2.8).

4.2.3.5 Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA I

Da die verschiedenen Kontroll-PCR's bereits darauf hindeuteten (4.1.3.2 und 4.2.3.4), dass neben der alb3-cDNA ein weiteres Plasmid isoliert wurde, sollte dies mit einer Sequenzierung (siehe 3.2.10) der isolierten Plasmide überprüft werden.

Verschiedene Klone der DNA-Mini- und der DNA-Maxi-Präparation wurden zur Sequenzierung ausgewählt (Abb. 22; 2 und 3 und Abb. 25; 10 und 11).

Die Sequenzierung der Klone aus der DNA-Mini-Präparation (Abb. 22; 2 und 3) mit Alb3-Primern lieferte zunächst kein Ergebnis, was verschiedene Ursachen gehabt haben könnte. Zu dem Zeitpunkt konnten diese Ursachen noch nicht eindeutig geklärt werden. Zur Kontrolle wurden anschließend M13-Primer für die Sequenzierung verwendet und es konnten Sequenzen ermittelt werden. Es wurden dabei Sequenzen für die lhcb1-cDNA gefunden (kodiert für ein chlorophyll-a-bindendes Protein aus *A. thaliana*, siehe Anhang Abb. III), die in einem puc-Vektor kloniert vorlag. Somit wurde ein Nachweis für eine Kontamination des Ausgangsmaterials erbracht (siehe dazu 6.2).

Die Sequenzierung der beiden DNA-Plasmide aus der DNA-Maxi-Präparation (Abb. 25; 10 und 11) lieferte ebenfalls die gleichen lhcb1-cDNA Sequenzen.

Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen noch einmal aus einer Vielzahl an Klonen die Plasmid-DNA isoliert und auf die alb3-cDNA hin überprüft (siehe 4.2.4). Dazu wurden, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, DNA-Mini-Präparationen (siehe 3.2.3), Kontroll-PCR's (siehe 3.2.8) und Sequenzierungen (siehe 3.2.10) durchgeführt.

4.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA II

Nachdem die alb3-cDNA mit Hilfe der Sequenzierung (siehe 4.2.3.5) zunächst nicht in den isolierten DNA-Plasmiden nachgewiesen werden konnte, wurden die Versuche wiederholt.

4.2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels DNA-Mini-Präparation II

Aus transformierten Bakterien-Zellen (siehe 3.2.2) wurde erneut Plasmid-DNA mittels DNA-Mini-Präparation isoliert (siehe 3.2.3). Die Plasmid-DNA wurde anschließend auf zwei Agarosegele aufgetragen und aufgetrennt (Abb. 27 und 28).

Da Plasmid-DNA aus 20 verschiedenen Klonen isoliert wurde, mussten zwei Agarosegele zur Auftrennung der Plasmide verwendet werden (Abb. 27 und Abb. 28). Auf der Höhe zwischen der 1,6 kb- und 2,0 kb-Bande des einen Markers (Abb. 27 und 28, KB), gab es jeweils eine deutliche Bande (Abb. 27 und 28, nicht gesondert markiert). Diese Bande wurde dem topologischen „supercoiled“-Zustand des Plasmids zugeordnet, der einen sehr kompakten Zustand für Plasmide darstellt und deswegen weiter ins Gel einläuft, als das für die Molekularmasse zu erwarten wäre. Weiterhin gab es zwei schwächere Banden zu sehen (vgl. Abb. 22), die wahrscheinlich anderen topologischen Strukturen des Plasmids entsprachen. Mit Hilfe der Agarosegele konnte die Ausbeute an Plasmid-DNA überprüft werden. Der Vergleich der Intensität der einzelnen Banden mit der Intensität der Signals eines Markers (Abb. 27 und 28, M) ermöglichte einen quantitativen Vergleich. Die obere Bande dieses Markers, die bei etwa 1,4 kb lag, entsprach einer DNA-Menge von 180 ng. Beim Vergleich der Signalintensitäten der verschiedenen DNA-Mini-Präparationen wurde deutlich, dass die Ausbeuten unterschiedlich hoch waren (vgl. Abb. 27, E und F). Allerdings befand sich in jedem Ansatz, mit Ausnahme eines Klons (Abb. 27, A), isolierte Plasmid-DNA.

Die hier isolierte Plasmid-DNA wurde in weiteren Versuchen auf das Vorhandensein der Alb3-cDNA untersucht.

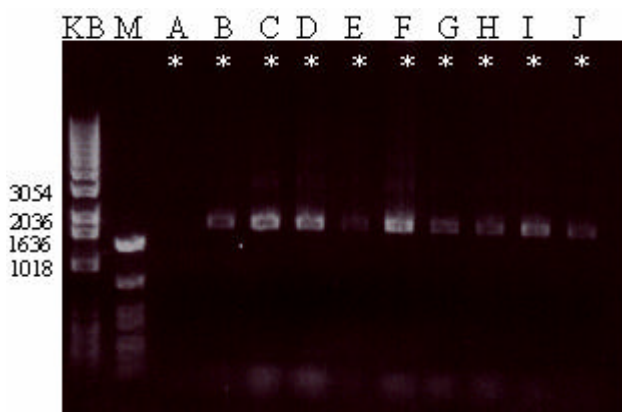


Abbildung 27: DNA-Mini-Präparation II von zehn willkürlich ausgewählten Klonen. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), (1)-(10) jeweils 1 μ l der Mini-Präparationsausbeute (etwa 30 μ l); Die Spuren, die mit Sternchen gekennzeichnet wurden (1) bis (10), wurden für eine anschließende Kontroll-PCR (Abb. 29) verwendet.



Abbildung 28: DNA-Mini-Präparation II von zehn willkürlich ausgewählten Klonen. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), (1)-(10) jeweils 1 μ l der Mini-Präparationsausbeute (etwa 30 μ l); Die Spuren, die mit Sternchen gekennzeichnet wurden (1) bis (10), wurden für eine anschließende Kontroll-PCR (Abb. 29) verwendet. Die mit dem Pfeil markierte Spur (10) wurde sequenziert (siehe 3.2.10 und 4.2.4.5).

4.2.4.2 Kontroll-PCR der isolierten Plasmid-DNA aus 4.2.4.1

Die Kontroll-PCR von isolierten DNA-Plasmiden aus 4.2.4.1 sollte zeigen, ob es sich bei den isolierten Plasmiden um die alb3-cDNA handelte.

Die PCR wurde für alle Plasmid-DNA-Präparationen (Abb. 27 und 28) mit den Alb3-Primern (fw und rev) durchgeführt.

In den meisten Ansätzen wurden mehrere Fragmente amplifiziert, die nicht der erwarteten Molekulargröße von etwa 1,6 kb entsprachen (Abb. 29, A bis J und Abb. 30 K bis T). Lediglich ein Klon (Abb. 30, U, Pfeil), lieferte ausschließlich ein Signal, das der erwarteten Molekularmasse von etwa 1,6 kb und damit dem alb3-cDNA-Fragment entsprach. Das alb3-cDNA-Signal fand sich auch in anderen Klonen wieder (vgl. Abb. 30, O, R und S). Dort wurden aber zusätzlich kleinere und größere DNA-Fragmente synthetisiert, die auf ein weiteres Plasmid in diesen Klonen hindeuten.

Der Klon (Abb. 30, U, Pfeil) wurde für eine DNA-Maxi-Präparation (siehe 4.2.4.3), sowie eine Sequenzierung (siehe 4.2.4.5) ausgewählt.

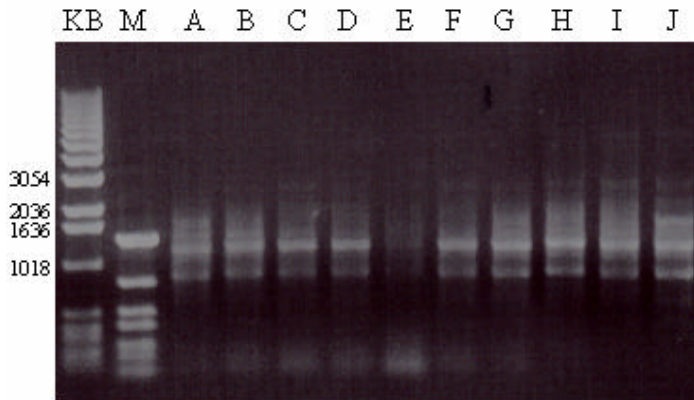


Abbildung 29: Kontroll-PCR für ausgewählte Klone III. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), Die Spuren (A) bis (J) wurden mit jeweils 1 μ l des PCR-Ansatzes beladen. Die PCR wurde in einem 50 μ l Ansatz und mit den Primern Alb3 fw und rev durchgeführt (siehe 3.2.8).

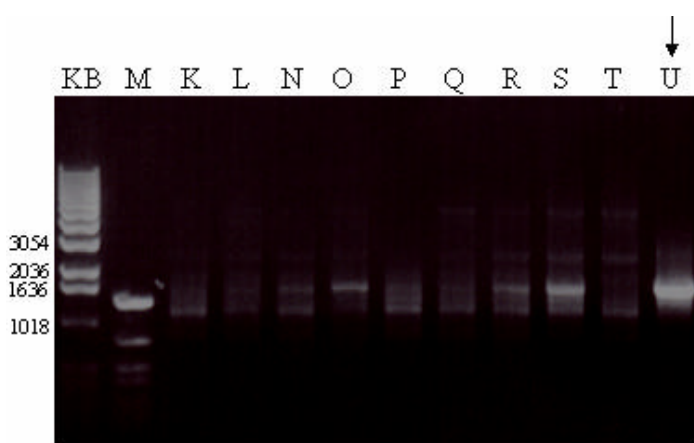


Abbildung 30: Kontroll-PCR für ausgewählte Klone IV. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), Die Spuren (K) bis (U) wurden mit jeweils 1 μ l des PCR-Ansatzes beladen. Die PCR wurde in einem 50 μ l Ansatz und mit den Primern Alb3 fw und rev durchgeführt (siehe 3.2.8). Der Pfeil markiert den Klon (U), der sowohl für die DNA-Maxi-Präparation, als auch für die Sequenzierung ausgewählt wurde.

4.2.4.3 Isolierung der Plasmid-DNA mittels DNA-Maxi-Präparation II

Mit der DNA-Maxi-Präparation sollten größere Mengen an Plasmid-DNA gewonnen werden.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA der Klone (Abb. 31, U₁, U₂ U₃) wurde anhand eines Agarosegels abgeschätzt (3.2.7). Dazu wurde die isolierte Plasmid-DNA in etwa 150 µl ddH₂O aufgenommen und in verschiedenen Verdünnungen auf das Agarosegel aufgetragen (Abb. 31). Zur Mengenabschätzung wurde eine bekannte Menge an DNA mit auf das Gel aufgetragen (Abb. 31, M). Das Signal, das durch die oberste Bande dieses Markers erzeugt wurde, entsprach einer DNA-Menge von 180 ng. Durch einen Intensitätsvergleich der Banden (Abb. 31, U₁, U₂ U₃) konnte die Menge an isolierter Plasmid-DNA grob abgeschätzt werden.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Plasmid-DNA isoliert worden war, sollte diese aus der Maxi-Präparation gewonnene Plasmid-DNA mittels PCR auf das Vorhandensein der alb3-cDNA überprüft werden (siehe 4.2.4.4).

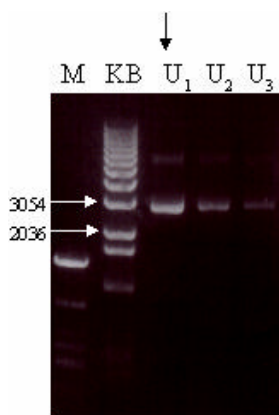


Abbildung 31: DNA-Maxi-Präparation II eines ausgewählten Klons. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): DNA-Marker (M), 1-KB-Leiter (KB), jeweils 1 µl einer 1:10- (U₁), einer 1:20- (U₂) und einer 1:50-Verdünnung (U₃) der isolierten Plasmid-DNA (Ausbeute 150 µl). Die Plasmid-DNA-Präparation wurde per PCR mit den Alb3-Primern kontrolliert (Abb. 32) und sequenziert (siehe 4.2.4.5). Der Pfeil markiert die zur Mengenabschätzung verwendete Verdünnung (die oberste Bande des DNA-Markers (M) entsprach etwa 180 ng).

4.2.4.4 Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation II aus 4.2.4.3

Die aus der in 4.2.4.3 beschriebenen DNA-Maxi-Präparation erhaltenen Plasmide sollten auf das Vorhandensein der alb3-cDNA überprüft werden.

Dazu wurde eine PCR der DNA-Maxi-Präparation mit den Alb3-Primern und den M13-Primern (jeweils fw und rev) durchgeführt und die erzeugten Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 32).

In beiden Spuren (Abb. 32, U_{Alb3} und U_{M13}) war jeweils ein Fragment mit der erwarteten Größe von etwas über 1,6 kb zu sehen. Dabei lieferte die PCR mit den Alb3-Primern (Abb.

32, U_{Alb}) ein etwas kleineres Fragment als die PCR mit den M13-Primern (Abb. 32, U_{M13}). Die generierten Fragmente waren allerdings mit denen aus der PCR des Ausgangsmaterials vergleichbar (vgl. dazu Abb. 20, 1 und 6).

Die amplifizierten Fragmente (Abb. 32, U_{Alb} und U_{M13}) wurden sequenziert (4.2.4.5).

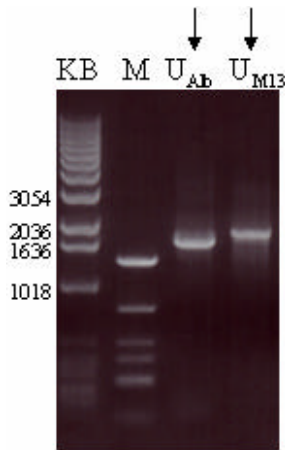


Abbildung 32: Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation II. Das Agarosegel wurde wie folgt beladen (siehe 3.2.7): 1-KB-Leiter (KB), DNA-Marker (M), In den Spuren (U_{Alb}) und (U_{M13}) wurden jeweils 1 µl des PCR-Ansatzes auf das Gel geladen. Die PCR wurde in einem 10 µl Ansatz und mit den Primern Alb3 fw und rev (U_{Alb}) sowie M13 fw und rev (U_{M13}) durchgeführt (siehe 3.2.8). Beide PCR-Fragmente (Pfeil) wurden sequenziert (siehe 3.2.10 und 4.2.4.5).

4.2.4.5 Sequenzierung der DNA-Maxi-Präparation II und der PCR-Fragmente aus 4.2.4.4

Mit der Sequenzierung der PCR-Fragmente (Abb. 32, U_{Alb} und U_{M13}) sowie der DNA-Plasmide aus der DNA-Maxi-Präparation II (Abb. 31) sollte überprüft werden, ob es sich jeweils um die Alb3-cDNA handelte.

Da die Kontroll-PCR der DNA-Mini-Präparation (Abb. 30, U, Pfeil) und die Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation (Abb. 32, U_{Alb} und U_{M13}) einen Hinweis auf das Vorhandensein der alb3-cDNA lieferten, wurden zunächst die PCR-Fragmente, die aus der DNA-Maxi-Präparation amplifiziert worden waren, sequenziert (Tab. 8). Das Fragment, das mit den Alb3-Primern amplifiziert worden war (Abb. 32, U_{Alb}) konnte mit dem Alb3-fw-Primer eindeutig als Alb-cDNA identifiziert werden. Die Sequenzierung des Fragments, das mit den M13-Primern amplifiziert worden war (Abb. 32, U_{M13}) blieb ohne Erfolg. Die Tatsache, dass sich das mit den M13-Primern amplifizierte Fragment nicht sequenzieren ließ, deutete daraufhin, dass es sich wahrscheinlich nicht um die alb3-cDNA handelte.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus der DNA-Maxi-Präparation (Abb. 31) mit verschiedenen Primern sequenziert (Tab. 8). In keinem der Ansätze, in der Alb3 spezifische Primern verwendet worden waren, konnte jedoch die alb3-cDNA nachgewiesen werden. Mit

dem M13-rev-Primer konnte statt dessen die lhcb1-cDNA in der DNA-Maxi-Präparation nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass nicht sicher davon ausgegangen werden konnte, dass die transformierten Bakterien allein die alb3-cDNA beinhalten. Dennoch wurde nachgewiesen, dass sich die alb3-cDNA in die Bakterien transformieren ließ, auch wenn sie möglicherweise als Mischklon mit der lhcb1-cDNA vorlag.

Insgesamt ging aus den molekularbiologischen Versuchen hervor, dass es sich bei dem geschickten Material um eine Mischung verschiedener cDNA-Klone, nämlich der *alb3*- und *lhcb1*-Gene, handelte.

Tabelle 8: Sequenzierungsansätze der PCR-Fragmente sowie der Plasmid-DNA

Eingesetzte DNA	Primer	Ergebnis
Alb3-PCR Maxi-Präp (Abb. 32, U _{Alb})	Alb3 fw	alb3-cDNA
M13-PCR Maxi-Präp (Abb. 32, U _{M13})	M13 fw	Keine Sequenz
Maxi-Präp Plasmid-DNA (Abb. 31)	Alb3 fw	Keine Sequenz
Maxi-Präp Plasmid-DNA (Abb. 31)	Alb3 rev	Keine Sequenz
Maxi-Präp Plasmid-DNA (Abb. 31)	M13 fw	Keine Sequenz
Maxi-Präp Plasmid-DNA (Abb. 31)	M13 rev	lhcb1-cDNA

5 Zusammenfassung

5.1 *Biochemische Ergebnisse*

Es konnten zwei neue polyklonale Antikörperseren (α -Alb3_1 und α -Alb3_3) gegen das Alb3-Protein von *A. thaliana* hergestellt werden (4.1.1).

Das Alb3-Protein konnte mit vier verschiedenen Antikörpern (α -Alb3_RH, α -Alb3_CTerm, α -Alb3-1 und α -Alb3-3) in Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* nach eindimensionaler denaturierender Gelelektrophorese nachgewiesen werden (4.1.2).

Das PPF1-Protein konnte mit zwei verschiedenen Antikörpern (α -Alb3_RH und α -Alb3_CTerm) in Chloroplastenextrakt von *P. sativum* identifiziert werden (4.1.3).

Von den Organismen *C. reinhardtii* und *H. vulgare* konnten keine Alb3-Homologe nachgewiesen werden (4.1.4 und 4.1.5).

Alb3-haltige Komplexe konnten in Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Allerdings konnte nach zweidimensionaler Gelelektrophorese mit einem Antikörper (α -Alb3_3) das Alb3-Protein als „freies“ Protein nachgewiesen werden (4.1.6.2). Nach Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation konnte das Alb3-Protein nicht detektiert werden (4.1.7.1).

Über eine Lokalisierung des Alb3-Proteins und die Funktion des Proteins konnten in dieser Arbeit keine über die Literatur hinausgehenden Erkenntnisse gewonnen werden.

5.2 *Molekularbiologische Ergebnisse*

Die Alb3-cDNA konnte kloniert werden, allerdings wurde diese cDNA zusammen mit einem anderen DNA-Plasmid in Bakterien transformiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass zugeschnittenes Alb3-cDNA-Ausgangsmaterial mit der lhcb1-cDNA kontaminiert gewesen war (4.2.4.5).

6 Diskussion

Die *A. thaliana albino3*-Mutante wurde mit Hilfe eines zwei-Komponenten Transposon-Systems, das auf dem A_c -Element aus Mais basiert, generiert (Long et al., 1993). In der ersten weitergehenden *albino3*-Studie (Sundberg et al., 1997) wurde versucht, dem nukleär-kodierten Alb3-Protein eine Funktion und eine Lokalisierung zuzuweisen. Bei genauerer, mikroskopischer Betrachtung der Morphologie der *albino3*-Mutante wurde beobachtet, dass die Chloroplasten bei weitem weniger organisiert sind als im Wildtyp und weniger Thylakoidmembranen aufweisen. In Immunogold-Lokalisierungsstudien wurde das Alb3-Protein zu einem Großteil (etwa 75 %) in oder an der Thylakoidmembran gefunden. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass Alb3 wahrscheinlich an der Biogenese eines wichtigen Komplexes in der Thylakoidmembran, entweder direkt als eine Komponente, oder indirekt als Assemblierungsfaktor, beteiligt ist.

Weiterhin wurden durch Sequenzvergleiche eine Vielzahl von homologen Proteinen gefunden. Diese Proteine sind mittlerweile in der sogenannten YidC/Oxa1p/Alb3-Familie zusammengefasst und eine konservierte Funktion dieser Proteine ist die Beteiligung an der Membranprotein-Assemblierung (Luirink et al, 2001).

Allerdings scheinen zu Alb3 homologe Proteine auch in anderen Membranen (z.B. in bakteriellen Zellmembranen) lokalisiert und dort an anderen Prozessen beteiligt zu sein. Die Homologie zum SpoIIIJ-Protein aus *B. subtilis* (Errington et al., 1992) ist beispielsweise schon länger bekannt (Sundberg et al., 1997). Dieses Protein befindet sich in der Zellmembran der Bakterien und ist essentiell an der Sporulation und damit der Teilung des Bakteriums beteiligt. Eine Verbindung zwischen Artemis, das eine Alb3-Domäne enthält, und der Teilung von Chloroplasten, wurde allerdings erst vor Kurzem hergestellt (Fulgosi et al., 2002). In der Arbeit wurde Alb3 als die C-terminale Translokase Domäne des Artemis-Proteins beschrieben.

6.1 Einsatz von Antikörpern

In den meisten Studien, die sich bisher mit dem Alb3-Protein in *A. thaliana* oder einem Alb3-Homolog in Chloroplasten anderer Organismen beschäftigten, wurden Antikörper für den spezifischen Nachweis des jeweiligen Proteins verwendet (Sundberg et al., 1997; Moore et al,

2000; Bellafiore et al. 2002; Fulgosi et al., 2002). Aus diesem Grund ist es wichtig die Eigenschaften der verschiedenen Antikörper in Verbindung mit Erkenntnissen zu bringen, die in den einzelnen Arbeiten gewonnenen wurden. Von besonderem Interesse sind dabei die Nachweise zur Lokalisierung, Funktion und Aussagen zu möglichen Komplexen des Proteins in Bezug auf die verschiedenen Antikörper.

6.1.1 Eigene Western-Analysen zur Identifizierung von Alb3

Die erfolgreiche Identifizierung eines Proteins mittels Western-Analyse hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, von denen hier verschiedene diskutiert werden.

6.1.1.1 Abundanz des Alb3-Proteins

Die Interaktionen zwischen Antikörper und Antigen sind so spezifisch und sensitiv, dass im Fall eines Proteins als Antigen selbst pg-Mengen des Proteins ausreichen, um es auch in komplexen Extrakten eindeutig nachzuweisen (Rehm, 2000). Damit die Identifizierung eines Proteins in der Western-Analyse allerdings erfolgreich ist, muss das betreffende Protein in einer Mindestmenge vorliegen. Speziell zur Beantwortung biologischer Fragestellungen ist es notwendig zu wissen, dass ein Protein durchaus nicht zu jedem Zeitpunkt in einem Organismus exprimiert sein muss. So können spezifische Einflüsse, wie z.B. Licht, Temperatur und Entwicklungszustand die Aktivität oder das Vorhandensein von Proteinen beeinflussen.

In der Literatur wurde versucht die Häufigkeit des Alb3-Proteins auf der Basis eines Vergleichs von Antikörper-Signalen zu bestimmen (Moore et al, 2000). Dazu wurde das Antikörper-Signal einer bekannten Konzentration an zur Immunisierung verwendeten Alb3-50-Aminosäuren-Peptids (siehe 2.3.1) mit dem Antikörper-Signal des Alb3-Proteins aus einer definierten Anzahl an *P. sativum* Chloroplasten verglichen. Anhand des quantitativen Vergleichs der Signalintensitäten wurde geschätzt, dass das Alb3-Protein in einer Kopienzahl von etwa 650.000 Molekülen pro Chloroplast vorkommt.

Anhand dieser Kopienzahl des Alb3-Proteins in einem Chloroplasten lassen sich weitere Überlegungen anstellen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Western-Analysen wurden für die zweidimensionale Gelelektrophorese eine Plastidenanzahl von etwa 1×10^8 verwendet

(entspricht im Fall von *A. thaliana* einer Menge von etwa 50 µg Chlorophyll). Bringt man die Anzahl der eingesetzten Plastiden mit der in der Literatur angegebenen Kopienzahl des Alb3-Proteins zusammen, dann müssten in einem Chloroplastenextrakt mit einem Chlorophyllgehalt von 50 µg etwa 100 pmol Alb3-Moleküle vorliegen. Mit Hilfe des Molekulargewichts des Alb3-Proteins von 45 KD lässt sich daraus berechnen, dass in einer im Gel aufgetrennten Alb3-Protein-Bande etwa 4,5 µg Protein vorhanden sein müssten.

Diese Menge an Protein müsste in der Coomassie- und erst recht in der sensitiveren Silberfärbung als eine deutliche Bande sichtbar sein und mit Hilfe der Massenspektrometrie müsste das Alb3-Protein einfach zu identifizieren sein (Granvogl, 2001). Doch weder nach zweidimensionaler Gelelektrophorese von Membranen aus $1,5 \times 10^8$ Plastiden aus *H. vulgare* (Granvogl, 2001), noch in präparativen Gelen von Chloroplastenextrakt aus *A. thaliana* (Daten nicht gezeigt) konnte das Alb3-Protein bisher massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Es ist zu diskutieren warum dem Alb3-Protein bisher kein konkreter Proteinspot auf zweidimensionalen Gelen zugeordnet werden konnte und warum selbst in präparativen Gelen die Identifizierung des Alb3-Proteins noch nicht erfolgte.

Neben der Möglichkeit, dass das Alb3-Protein in verschiedenen Organismen (*P. sativum* und *A. thaliana*) in einer signifikant unterschiedlichen Abundanz vorliegt, kommen folgende Phänomene für eine Erklärung dieses Problems in Betracht: Regulierung, Aggregation und Degradierung des Alb3-Proteins.

Ob das Alb3-Protein lichtabhängig und zeitlich reguliert wird, wurde auf RNA-Niveau untersucht (Sundberg et al., 1997). Southern-Analysen zeigten, dass die Alb3 mRNA in einem 24 Stunden Rhythmus (12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit) nicht signifikant variiert. Selbst nach 6 Tagen Wachstum in kompletter Dunkelheit war Alb3 mRNA nachzuweisen. Eine lichtabhängige oder zeitliche Regulierung von Alb3 scheint nicht vorzuliegen. Andere Faktoren, die das Expressieren des Alb3-Proteins spezifisch beeinflussen könnten, wurden bislang nicht publiziert.

Die Aggregation des Alb3-Proteins während des Solubilisierens bei der PAGE wäre eine mögliche Ursache dafür, dass das Protein in einer Western-Analyse nicht nachgewiesen werden kann. Ein Protein-Aggregat würde nicht in das Gel einlaufen und wäre damit weder als Proteinspot sichtbar, noch massenspektrometrisch oder über Antikörper identifizierbar. Da

sich ein Protein-Aggregat allerdings noch in der Gel-Tasche befinden müsste, könnte das Sammelgel mit in die Western-Analysen einbezogen werden. Sollten die härteren Solubilisierungsbedingungen zum Transfer der Proteine auf die Blotmembran das Protein-Aggregat auflösen und der Transfer auf die Blotmembran gelingen, sollten Antikörpersignale im oberen Bereich des Gels oder im Bereich der Tasche zu finden sein (siehe 4.1.6.1). Oftmals wurden Antikörper-Signale in eindimensionalen Gelen an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss des Detergenz bzw. der Bedingungen während des Solubilisierens scheinen die Nachweisbarkeit des Alb3-Proteins durchaus zu beeinflussen. Neuere Daten zur Identifizierung des Alb3-Proteins zeigen, dass der Einsatz von Digitonin an Stelle von Dodecylmaltosid während des Solubilisierens beim Nachweis von Alb3 vorteilhaft ist (persönliche Mitteilung Dr. Ossenbühl, Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit für das „Verschwinden“ des Alb3-Proteins könnte sein, dass das Protein während der Aufarbeitung degradiert wird. Bei der Verwendung von Chloroplastenextrakten sollte dies jedoch nicht der Fall sein, da die Chloroplasten bis zur Solubilisierung aller Proteine den nativen Zustand darstellen. Beim Präparieren von Membranfraktionen könnte man allerdings für eine Degradation des Alb3-Proteins durch cytosolische oder stromale Proteasen argumentieren. Warum ein Abbau jedoch spezifisch das Alb3-Protein betreffen sollte, ist nicht klar.

Sowohl gegen das Aggregieren und die spezifische Degradierung des Alb3-Proteins spricht die Tatsache, dass das Alb3-Protein in Western-Analysen in Chloroplastenextrakten (siehe 4.1.2) und in Thylakoidmembranpräparationen (Moore et al, 2000) gefunden wurde. So muss neben diesen biologischen und physikalischen Erklärungsversuchen auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die angenommene Menge von 650000 Kopien je Chloroplast und somit die Berechnungsgrundlage, falsch ermittelt wurde.

Bei der Bestimmung der Häufigkeit des Alb3-Proteins in Chloroplasten von *P. sativum* (Moore et al., 2000) wurde zunächst die Konzentration eines Standards (50-Aminosäuren-Peptid; siehe 2.3.1) durch eine Proteinbestimmung ermittelt und eine bestimmte Menge davon für die Western-Analyse verwendet. Nach dem Transfer des Standards und der Messgröße vom Gel auf die Blotmembran und anschließender Inkubation mit dem Antikörper α Alb3_RH wurde die Absorption der IgG's auf der Blotmembran bei einer Wellenlänge von 280 nm

sowohl für den Standard als auch für die Messgröße bestimmt (Harlow und Lane, 1988). Anhand eines quantitativen Vergleichs der beiden Signale wurde auf die Anzahl der Alb3-Protein-Moleküle in einem Chloroplasten geschlossen.

Die Art der Quantifizierung über den Vergleich von Signalintensitäten eines Standards mit einer Messgröße ist durchaus üblich (Lottspeich, 1998). Allerdings ist es wichtig, dass das Signal für den Standard und für die Messgröße korrekt bestimmt sein muss, um den Wert für die Messgröße korrekt ermitteln zu können. Zu Fehlern kommt es vor allem, wenn sich die Konzentration des Standards oder die der Messgröße über einem Grenzwert befindet.

Alles in allem scheint die errechnete Anzahl von 650.000 Alb3-Protein-Molekülen in einem Chloroplasten, zumindest für *A. thaliana*, nicht zuzutreffen. Worin die Ursache dafür liegt, dass dieser Wert nicht zutrifft bzw. für den Fall, dass der Wert stimmte und das Alb3-Protein nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden kann, blieb unklar.

6.1.1.2 verwendete Antikörper

α Alb3 RH:

Der Antikörper α Alb3_RH wurde in der vorliegenden Arbeit für die Durchführung von Western-Analysen verwendet (siehe 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5 und 4.1.6.3).

Der Antikörper ist gegen ein GST-getaggtetes Fusionsprotein gerichtet, das aus einem 50 Aminosäuren langen Peptid der Alb3-Sequenz von *A. thaliana* und GST (Glutathion-S-Transferase) besteht. Die 50 Aminosäuren lange Sequenz befindet sich, nach Sequenz- und Orientierungsvergleichen mit dem zu Alb3 homolog Protein aus Mitochondrien Oxa1p, in einem stromalem „loop“ zwischen der ersten und zweiten transmembranen Domäne des Alb3-Proteins. Mit diesem Antikörper wurde in *P. sativum* die Lokalisierung in der Thylakoimembran nachgewiesen und die Funktion, eine Beteiligung an der Integration von LHCP in die Thylakoidmembran, blockiert (Moore et al., 2000). Durch diese Versuche wurde für das Alb3-Protein eine Beteiligung am posttranslationalen cpSRP-Export-Weg nachgewiesen (Abb.1 und 2).

Der Antikörper α Alb3_RH scheint der beste, vorhandene Antikörper zu sein. Wie aus den in dieser Arbeit durchgeführten Western-Analyse der eindimensionalen Gelelektrophorese mit Chloroplastenextrakt aus *A. thaliana* hervorgeht (siehe 4.1.2), erkennt dieser Antikörper das

Alb3-Protein spezifisch. Dementsprechend wurde α Alb3_RH als Referenz-Antikörper für die weiteren Western-Analysen ausgewählt (siehe 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5 und 4.1.6).

Diskussionsbedarf besteht allerdings hinsichtlich der Orientierung des Alb3-Proteins in der Thylakoidmembran und somit darin, ob der Antikörper einen stromalen oder einen luminalen „loop“ erkennt. Für Western-Analysen nach denaturierender PAGE ist dies nicht von Relevanz, jedoch spielt die Orientierung des Alb3-Proteins eine entscheidende Rolle bei Versuchen bei denen die Funktion *in organello* durch Antikörperzugabe blockiert werden soll. Moore et al. folgerten aus der Homologie und funktionellen Verwandtschaft von Alb3 zu Oxa1p, dass das Alb3-Protein in einer N_{out}-C_{in}-Orientierung vorliegt. Selbst durchgeführte Topologie Analysen weisen aber durchaus die Möglichkeit einer N_n-C_{out}-Orientierung auf (Tab. 2). Da die selbst hergestellten Antikörper α Alb3_1 und α Alb3_3 gegen einen „loop“ hergestellt wurden, der auf der entgegengesetzten Seite der Thylakoidmembran liegt, wäre mit diesen Antikörpern eine Kontrollmöglichkeit gegeben.

α Alb3 CTerm:

Dieser Antikörper war generell gegen den C-Terminus des Alb3-Proteins von *A. thaliana* gerichtet. Die genaue Sequenz des Epitops gegen das Antikörper gerichtet war jedoch nicht bekannt. Dieser Antikörper wurde nach der Western-Analyse der eindimensionalen Gelelektrophorese (siehe 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 und 4.1.5) nicht weiter eingesetzt.

α Alb3 1 und α Alb3 3:

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei polyklonale Antikörperseren (α Alb3_1 und α Alb3_3) hergestellt, die direkt gegen eine Sequenz aus dem Alb3-Protein von *A. thaliana* gerichtet sind (siehe 4.1.1 und Abb. 9). Das Alb3-Protein konnte in der Western-Analyse der eindimensionalen Gelelektrophorese in Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* mit diesen Antikörpern nachgewiesen werden (4.1.2). In Western-Analysen nach zweidimensionaler Gelelektrophorese (siehe 4.1.6) oder Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (siehe 4.1.7) reagierten die Antikörper größtenteils mit Proteinen, die dem Muster nach zu folgenden Proteinen aus der eindimensionalen Gelelektrophorese entsprachen (vgl. Abb. 10 und Abb. 16 bzw. Abb.17). Das Alb3-Protein konnte in dieser Arbeit jedoch nur mit α Alb3_3 nach zweidimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Dies deutet auf spezifische Probleme bei der Aufarbeitung hin (siehe 6.1.1.7).

Auffallend ist, dass sich die Muster der Signale in den Western-Analysen für diese beiden Antikörper unterscheiden (siehe z. B. Abb. 10), obwohl beide Antikörper gegen das gleiche Epitop gerichtet sind. Die Ursache dafür liegt darin, dass es sich bei den selbst hergestellten Antikörperseren um polyklonale Antikörper handelt. Diese Seren beinhalten eine Vielzahl an verschiedenen Antikörpern, die eine Vielzahl an unspezifischen Wechselwirkungen eingehen (siehe 6.1.1.3).

6.1.1.3 Unspezifische Wechselwirkungen von Antikörpern

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern (α Alb3_RH, α Alb3_CTerm, Alb3_1 und α Alb3_3) handelt es sich um polyklonale Antikörperseren, die in den durchgeführten Western-Analysen eine Vielzahl an unspezifischen Wechselwirkungen eingingen.

Polyklonale Antikörperseren bestehen im Gegensatz zu monoklonalen Antikörperseren aus einer Antikörpermischung. Diese Mischung enthält verschiedene Antikörper, die gegen eine Vielzahl von Epitopen gerichtet ist. Polyklonale Antikörperseren sind weniger spezifisch und weisen daher neben dem eigentlichen Protein oft unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auf, die eine eindeutige Identifizierung des nachzuweisenden Proteins erschwert. Es gilt: je größer das zur Immunisierung verwendete Epitop, desto mehr Möglichkeiten zur Bildung verschiedener Antikörper gibt es.

Die Güte eines Antikörperserums hängt von der Herstellungsmethode und der anschließenden Gewinnung des Antikörperserums ab. Spezifische Modifikationen der Herstellungs-Methode (zum Beispiel dem Einsatz sogenannter Antigenverstärker) können das Auftreten von unspezifischen Wechselwirkungen verstärken (persönliche Mitteilung Pineda Antikörper Service, Berlin).

Unspezifische Wechselwirkungen können die Auswertung einer Western-Analyse wesentlich erschweren (siehe 4.1.3 und 4.1.4). Es entstehen vor allem Schwierigkeiten, wenn das Molekulargewicht eines nachzuweisenden Proteins nicht bekannt ist. Liegen mehrere Signale im relevanten Molekularmassenbereich kann keine eindeutige Zuordnung eines Signals zum gesuchten Protein vorgenommen werden. Selbst wenn es sich um ein Protein handelt, dessen apparentes Molekulargewicht aus anderen Western-Analysen bereits bekannt ist, kann beim Auftreten mehrerer Signale im relevanten Bereich die Auswertung erschwert werden. Laufparameter bei der Gelelektrophorese und Konditionen bei der Probenaufbearbeitung (z.B.

Detergenzeffekte) könnten variiert haben und ein anderes Laufverhalten des gesuchten Proteins zur Folge gehabt haben.

Außerdem kann es sein, dass Degradationsprodukte oder Komplexe des gesuchten Proteins in anderen Molekularmassenbereichen gar nicht wahrgenommen, weil sie dort nicht vermutet werden. Das Auftreten von vielen unspezifischen Wechselwirkungen kann die Auswertung einer Western Analyse unmöglich machen, da die Zuordnung der gesuchten Wechselwirkung zwischen Antikörper und dem nachzuweisenden Protein nicht getroffen werden kann.

Die Schwierigkeiten bei der Auswertung einer Western-Analyse können durch die Eliminierung der unspezifischen Wechselwirkungen minimiert werden. Zur Aufreinigung von Antikörperseren stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (Lottspeich, 1998). Antikörperseren können beispielsweise über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Durch die spezifische Wahl der stationären Phase oder der Elutionsbedingungen kann eine Aufreinigung stattfinden, bei der auf Grund der Stärke der Interaktion zwischen Antigen und Antikörper selektiert wird.

Die beste Kontrolle, um eine korrekte Identifizierung eines Proteins mittels Western-Analyse zu gewährleisten, ist das gesuchte Protein in einer separaten Spur mit auf die Blotmembran zu transferieren. Indem sowohl das gesuchte Protein im Gesamtproteinextrakt als auch das Kontroll-Protein die gleiche Aufarbeitungsprozedur durchlaufen, sind im gleichen Molekularmassenbereich auftretende Antikörper-Reaktionen in verschiedenen Spuren mit großer Wahrscheinlichkeit auf das gleiche Protein zurückzuführen. In dieser Arbeit stand jedoch kein aufgereinigtes oder rekombinant exprimiertes Alb3-Protein zur Verfügung, mit dem diese Kontrolle hätte erfolgen können.

In den Western-Analysen dieser Arbeit wurde das gesuchte Protein über den Vergleich eines Antikörper-Signals mit dem Signal des Referenz-Antikörpers getroffen. Reagiert ein Antikörper mit einem Protein und zeigt der Referenz-Antikörper bei der gleichen Molekularmasse ein Signal, dann wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Signalen um die Reaktion der Antikörper mit dem gleichen Protein handelt. Im Fall von Alb3 von *A. thaliana* und PPF1 von *P. sativum* war bekannt in welchem Molekularmassenbereich die Proteine zu erwarten sind. Auf der Basis des Vergleichs der Signale der verwendeten

Antikörper mit denen des Antikörpers α Alb3_RH konnten beide Proteine in dieser Arbeit identifiziert werden (Abb. 10, Abb. 12).

6.1.1.4 Tests der Antikörper in verschiedenen Organismen

Nachdem das Alb3-Protein mit den vorhandenen Antikörpern in Chloroplastenextrakt von *A. thaliana* identifiziert worden war, wurden Chloroplastenextrakte von *P. sativum*, *C. reinhardtii* und *H. vulgare* für weitere Western-Analysen eingesetzt.

P. sativum:

In *P. sativum* wird von den Antikörpern α Alb3_CTerm und α Alb3_RH das zu Alb3 homologe PPF1-Protein erkannt (siehe 4.1.3). Der Vergleich der Sequenzen der Proteine Alb3 von *A. thaliana* und PPF1 von *P. sativum* in den Bereichen, die als Epitop für die Antikörper-Herstellung von α Alb3_RH und α Alb3_1 bzw. α Alb3_3 ausgewählt worden waren, zeigt dass diese Bereiche in beiden Organismen sehr konserviert sind. Da die genaue Sequenz des Epitops für den Antikörper α Alb3_CTerm nicht bekannt war, konnte diese nicht mit in den Vergleich einbezogen werden.

Im Fall des Antikörpers α Alb3_RH liegt die Homologie der entsprechenden Bereiche bei 96%. Gegenüber dem 50 Aminosäuren langen Bereich in der Alb3-Sequenz von *A. thaliana* wurden in der PPF1-Sequenz von *P. sativum* zwei Aminosäuren ausgetauscht. In einem Fall erfolgte der Austausch durch eine ähnliche Aminosäure (Glutamat für Glutamin) und an der anderen Position wurde eine Aminosäuren durch eine nicht ähnliche ersetzt (Threonin für Lysin). Obwohl durch den Austausch dieser zwei Aminosäuren die Ladungseigenschaften des Bereichs in der Proteinsequenz des PPF1-Proteins verändert wird (eine negative Ladung mehr und eine positive Ladung weniger; Ladungsdifferenz von -2), scheint sich das nicht auf die Interaktion zwischen dem Antikörper und dem Protein auszuwirken.

Die Homologie der Proteine Alb3 und PPF1 am C-Terminus ist geringer (siehe Anhang Abb. II), doch auch der Antikörper α Alb3_CTerm erkennt das Alb3-Homolog von *P. sativum*.

Bei einem Vergleich der Epitope der Antikörper α Alb3_1 bzw. α Alb3_3 fällt die Homologie der beiden Proteine Alb3 und PPF1 ebenfalls auf. In der 16 Aminosäuren langen Sequenz wurden zwei Aminosäuren ausgetauscht, die einander jeweils ähnlich sind (Asparagin für Aspartat und Asparagin für Alanin). Die Ladungseigenschaften des entsprechenden Bereichs im PPF1-Protein werden dadurch um $+1$ verändert. Trotz dieser immer noch gegebenen

Homologie im relevanten Bereich, wird das PPF1-Protein von *P. sativum* im Gegensatz zum Alb3-Protein von *A. thaliana* von den selbst hergestellten Antikörpern nicht mehr erkannt.

C. reinhardtii:

Von *C. reinhardtii* konnte kein Alb3-Homolog identifiziert werden. Ausschlaggebend dabei war, dass der Referenz-Antikörper α Alb3_RH kein Signal im relevanten Molekularmassenbereich lieferte (siehe 4.1.4, Abb. 14, Spur 5). Bei einem Epitopvergleich (Abb. 13) wurde deutlich, dass der für die Antikörper α Alb3_RH und α Alb3_1 bzw. α Alb3_3 jeweils als Epitop ausgewählte Bereich von Alb3 von *A. thaliana* keinesfalls in den Alb3-Homologen von *C. reinhardtii* konserviert ist. Eine Homologie von ca. 60 % für das Epitop des Antikörpers α Alb3_RH und ca. 25 % im Fall von α Alb3_1 bzw. α Alb3_3 reicht scheinbar nicht aus, damit die Antikörper die Proteine Alb3-1 und Alb3-2 detektieren.

Bei der Auswertung der Western-Analyse kam erschwerend hinzu, dass es zur erwarteten Molekularmasse der Proteine Alb3-1 und Alb3-2 widersprüchliche Angaben gab. So entsprachen die berechneten Molekularmassen (Tab. 1) nicht denen aus der Literatur (Bellafiore et al., 2002). Die Ursachen dafür können verschiedene Ursprünge haben. Zum einen können die zur Berechnung der Molekularmasse verwendeten Programme Fehler gemacht haben oder ungeeignet sein. Andererseits kann die Aufarbeitung und das Laufverhalten während der Gelelektrophorese für diese Proteine eine von der berechneten Molekularmasse unterschiedliche apparente Molekularmasse bedingen (siehe auch 6.1.1.3). Worin diese Unstimmigkeit letztendlich liegt bleibt ungeklärt.

H. vulgare:

Von *H. vulgare* konnte kein Alb3-Homolog identifiziert werden, da bisher gar keine Daten zu einem Alb3-Homolog in diesem Organismus in der Literatur existieren, mit denen die Ergebnisse aus den eigenen Versuchen hätten abgeglichen werden können.

Die Antikörper α Alb3_CTerm und α Alb3_RH reagieren allerdings auf der Höhe von etwa 44 KD mit einem Protein, dessen Signal mit dem des PPF1-Proteins von *P. sativum* vergleichbar ist (vgl. Abb. 12 und Abb.15). Ob es sich dabei um ein Alb3-Homolog handelt konnte nicht abschließend beantwortet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Identifizierung von Alb3-Homologen in verschiedenen Organismen nur mit den geeigneten Antikörpern erfolgreich sein kann. Die

Antikörper müssen bevor eine zufriedenstellende Identifizierung eines Proteins erfolgen kann an aufgereinigtem oder rekombinant aus dem betreffenden Organismus hergestelltem Protein getestet werden.

6.1.1.5 Spezielle Probleme bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese

Gründe für die schlechte Reproduzierbarkeit der Western-Analysen lassen sich u.a. aus den Schwierigkeiten beim Auftrennen des Chloroplastenextraktes ableiten.

Das Aggregieren des Alb3-Proteins während des Solubilisierens bei der PAGE wäre eine mögliche Ursache dafür, dass das Protein in einer Western-Analyse nicht nachgewiesen werden kann (siehe auch 6.1.1.1). Das Protein-Aggregat würde gar nicht erst in das Gel einlaufen und wäre so in der Western-Analysen nicht nachweisbar.

Speziell in der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese besteht die Möglichkeit, dass das Alb3-Protein als Bestandteil von Superkomplexen, z.B. assoziiert mit Ribosomen und naszierenden Ketten (Nilsson et al., 1999), gar nicht erst in das Sammelgel einläuft. Hierzu könnte man versuchen das Einlaufen der Probe durch Herabsenken der Polyacrylamidkonzentration des Sammelgels zu erleichtern. Bringt dies nicht den gewünschten Erfolg, so sollten Ribosomen isoliert werden, und die isolierte Ribosomenfraktion auf das Vorhandensein des Alb3-Proteins getestet werden. Für diese Aufgabenstellung bietet sich die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation an.

6.1.1.6 Spezielle Probleme bei der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

In der Western-Analysen im Anschluss an die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation konnte das Alb3-Protein nicht identifiziert werden. Neben den in 6.1.1.1 und 6.1.1.3 angesprochenen Problemen, kann es bei dieser Technik das Problem einer zu starken Verdünnung des Alb3-Proteins geben.

Auf einen linearen Saccharose-Gradienten wurde eine Menge an Chloroplastenextrakt aufgetragen (siehe 4.1.7), die einem Aliquot von etwa 300 µg Chlorophyll entsprach. Auf die eindimensionalen Gele (siehe 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 und 4.1.5) wurden zum Vergleich dazu 10 bzw. 20 µg aufgetragen. Dieser Gradient wurde anschließend in 1 ml Fraktionen aufgeteilt von denen jeweils 30 µl auf das SDS-Gel aufgetragen wurden. Geht man nun davon aus, dass

sich sämtliches Alb3-Protein in einer Fraktion wiederfindet, so wurde auf das Gel etwa ein Aliquot aufgetragen, das der Menge von 10 µg Chlorophyll entspräche. Somit wäre ausreichend Material vorhanden, um Alb3 in einer Western-Analyse nachzuweisen (siehe 4.1.2). Fraglich ist allerdings ob der Nachweis auch dann funktioniert, wenn das Alb3-Protein auf mehrere Fraktionen verteilt vorliegt. Die Menge an eingesetztem Material scheint jedoch für den Nachweis von Alb3 nicht zu gering bemessen zu sein, da das Alb3-Protein bereits in einem Chloroplastenextrakt entsprechend einer Menge von 5 µg Chlorophyll nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

6.1.1.7 Technische Probleme während des Western Blottings

Obwohl das Alb3-Protein in Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* identifiziert werden konnte (siehe 4.1.2), war dies keinesfalls reproduzierbar. So konnte das Alb3-Protein in der Western-Analyse mit α Alb3_3 nach zweidimensionaler Gelelektrophorese gefunden werden, in der gleichen Western-Analyse mit α Alb3_1 als primärem Antikörper jedoch nicht (siehe 4.1.6.1 und 4.1.6.2). Offenbar war es ein Problem, das spezifisch das Alb3-Protein betrifft, denn die unspezifischen Wechselwirkungen konnten sehr wohl zum größten Teil in den angesprochenen Western-Analysen nachgewiesen werden. Insgesamt konnten die Western-Analysen nur schwierig reproduzierbar durchgeführt werden.

Auf die Abundanz des Alb3-Proteins wurde unter 6.1.1.1 bereits eingegangen, so dass an dieser Stelle die technischen Schwierigkeiten zu erwähnen bleiben. Da es sich bei den verwendeten Proben jeweils um Gesamt-Chloroplastenextrakt handelte, kann das Alb3-Protein durch die Aufarbeitung nicht degradiert worden sein, da es sich bis zur Solubilisierung in seinem nativen Kontext befinden sollte. Dies ist lediglich dann ein Problem, wenn es sich beim Ausgangsmaterial nicht um intakte Plastiden handelt, sondern um eine Membranfraktion, in der das Alb3-Protein externen Faktoren ausgesetzt ist. Auf Probleme, die die Auftrennung betreffen, wird unter 6.1.1.6 und 6.1.1.7 eingegangen.

Als nächster Schritt in der Western-Analyse ist der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Blotmembran zu nennen. Sind die Bedingungen während des „Blotting“-Vorganges nicht standardisiert, ist es möglich, dass das Alb3-Protein nicht reproduzierbar auf die Blotmembran transferiert wird (persönliche Mitteilung Dr. Ossenbühl). Das Variieren der Transfer-Bedingungen wäre eine Erklärung für die unregelmäßigen Ergebnisse der Western-Analysen.

6.1.2 Ergebnisse aus der Literatur

6.1.2.1 Andere existierende Antikörper

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern sind in der Literatur weitere Antikörper beschrieben und verwendet worden.

C-terminaler Antikörper gegen das Alb3-Protein von *A. thaliana* (Sundberg et al., 1997):

Ein polyklonales Antikörperserum gegen das Alb3-Protein von *A. thaliana* war gegen den C-Terminus gerichtet. Dieser Teil des Proteins, von Aminosäure 327 bis 462, wurde in *E. coli* synthetisiert, aufgereinigt und Kaninchen zur Immunisierung gespritzt.

Mit Hilfe dieses Antikörpers wurde für das Alb3-Protein aus den Ergebnissen von Immunogold-Lokalisierungsstudien eine Lokalisierung in der Thylakoidmembran des Chloroplasten postuliert. In Western-Analysen an *A. thaliana* konnte das Alb3-Protein mit diesem Antikörper in einem Gesamtextrakt aus jeweils Blättern, Blüten und Schötchen nachgewiesen werden.

Dieser in der Arbeit von Sundberg et al. von 1997 verwendete Antikörper ist direkt gegen die Alb3 Sequenz gerichtet. Diese Sequenz umfasst allerdings 135 Aminosäuren und es ist fraglich, was der Antikörper tatsächlich erkennt. So kann man für das Experiment des „Immungold-Labelings“ zur Lokalisierung von Alb3 durchaus vermutet werden, dass die Signale zu einem großen Teil aus unspezifischen Wechselwirkungen stammen.

Antikörper gegen das getaggte Alb3-1-Protein von *C. reinhardtii* (Bellafiore et al., 2002):

Im Fall des Alb3-Homologs Alb3-1 von *C. reinhardtii* blieb der Versuch, einen Antikörper direkt gegen die Alb3-1-Sequenz herzustellen, ohne Erfolg. Um die Lokalisierung von Alb3-1 dennoch vornehmen zu können, wurde das Alb3-1-Protein mit dreifach-Hemagglutinin (HA) „getaggt“ (3 x 9 Aminosäuren) und in die *C. reinhardtii ac29*-Mutante transformiert. Der Nachweis erfolgte dann indirekt mit einem Antikörper, der gegen den HA-Teil des Protein gerichtet war.

Für *C. reinhardtii* wurde die Lokalisierung in der Thylakoidmembran und eine Beteiligung an der Membran-Integration von LHCP's beschrieben. Weiterhin wurden mit diesem Antikörper zwei Alb3-haltige Komplexe in *C. reinhardtii* gefunden.

Der Nachweis des Alb3-Proteins in der Arbeit von Bellafiore et al. ist insofern problematisch, weil das Alb3-Protein nicht direkt, sondern der „Tag“ nachgewiesen wird. Insofern müssen

bei der Verwendung dieses Antikörpers Kontrollen durchgeführt werden, um absolut sicher zu sein, dass es sich bei einem identifiziertem Protein um ein Alb3-Homolog handelt.

Antikörper gegen das Artemis-Protein von *A. thaliana* (Fulgosi et al., 2002):

Die Versuche zur Lokalisierung des Artemis-Proteins wurden mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen vorgenommen. Der verwendete Antikörper α ArtB war dabei gegen ein Epitop gerichtet, das in der Artemis-Sequenz zwischen den Aminosäuren 733 und 801 lag. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte Artemis in der inneren Hüllmembran von Chloroplasten aus *A. thaliana* nachgewiesen werden.

Interessant sind die Western-Analysen dieser Publikation, denn es wurden zwei verschiedene Antikörper hergestellt, deren Epitope bis in die YidC/Oxa1p/Alb3-Domäne des Artemis-Proteins hineinreichen. Verwirrend ist die Abbildung 2 der erwähnten Arbeit. In der Abbildung wird als verwendeter Antikörper α ART_A angegeben und in der Legende wird α ART_B aufgeführt. Im Falle des Antikörpers α ART_A ist die Homologie des Epitops zu Alb3 nicht so groß. Für den Antikörper α ART_B, liegt das Epitop allerdings in einem zu Alb3 sehr homologen Bereich. So sind über das gesamte Epitop 75 % der Aminosäuren identisch. Im Alb3-Protein entspräche die Sequenz des Epitops den Aminosäuren 233 bis 301, und darin sind zwei transmembrane Domänen beinhaltet. Wird die Sequenz des Alb3-Proteins zwischen den beiden transmembranen Domänen nun mit der Sequenz des Epitops, gegen das α ART_B gerichtet ist, verglichen, so ist die Übereinstimmung noch größer. Von den 18 zwischen den Transmembranen liegenden Aminosäuren sind 15 identisch, was eine Übereinstimmung von etwa 84 % bedeutet. Mit dieser Homologie sollte der Antikörper in der Lage sein auch das Alb3-Protein in *A. thaliana* nachweisen können, doch dies ist nicht der Fall (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Soll).

6.1.3 Lokalisierung von Alb3

Eine Methode zur Lokalisierung von Proteinen ist das „Immunogold-Labeling“. Hierbei wird ein mit einem Goldpartikel kovalent verknüpfter, zweiter Antikörper zum Nachweis des Proteins verwendet. Unter einem Elektronenmikroskop können dann die Goldpartikel, und somit das gesuchte Protein, lokalisiert werden. Mit dieser Methode wurde die Lokalisierung des Alb3-Proteins in der Thylakoidmembran postuliert (Sundberg et al., 1997).

Diese Methode ist funktionell, aber nicht sehr genau und bei den quantitativen Angaben handelt es sich immer nur um Schätzwerte. Das Alb3-Protein wurde in der o.g. Publikation zum Beispiel zu ca. 75 % in der Thylakoidmembran gefunden. Überdies ist die Präparation der Objekte für die Elektronenmikroskopie nicht sehr schonend und die Möglichkeit für Artefakte durch schlechte Präparation ist gegeben.

Die Lokalisierung eines Proteins kann weiterhin durch Subfraktionierung der Kompartimente einer Zelle und anschließender Western-Analyse erfolgen. Dies wurde in verschiedenen Studien durchgeführt. Das Alb3-Protein wurde mit dieser Technik zunächst in Blättern, Blüten und Schötchen aus *A. thaliana* (Sundberg et al., 1997) und in einer nachfolgenden Studie in der Thylakoidmembran von Chloroplasten aus *P. sativum* nachgewiesen (Moore et al., 2000). Auch die Lokalisierung von Artemis in der inneren Hüllmembran wurde mit Hilfe der Subfraktionierung eines Chloroplastenextraktes nachgewiesen.

Diese Methode ist etabliert und hängt von der Güte der Subfraktionierung ab, jedoch sind sowohl die generelle Unterteilung von Membranfraktion und löslicher Fraktion als auch die Fraktionierung unterschiedlicher Membranfraktionen Standardmethoden.

Beachtenswert ist die Spezifizierung der Lokalisierung in der Studie von Sundberg et al. von 1997, die mit Hilfe der radioaktiven Importstudien durchgeführt wurde. Das ist deswegen verwunderlich, da ein Antikörper vorhanden war, mit dem der Nachweis durch eine Subfraktionierung des Chloroplasten und anschließender Western-Analyse hätte vorgenommen werden können. Dies lässt zumindest vermuten, dass auch hier Schwierigkeiten bei der Durchführung einer Western-Analyse auftraten.

Eine alternative Methode für nukleär kodierte Proteinen, die noch zu ihrem Bestimmungsort geleitet werden müssen, stellen die bereits erwähnten, radioaktiven Import-Studien dar. Solche Studien werden mit isolierten Chloroplasten *in vitro* vorgenommen. Die Chloroplasten des Importansatzes, in dem das zu importierende Protein radioaktiv markiert ist, werden nach entsprechender Zeit subfraktioniert und das radioaktive Signal gibt Aufschluss in welchem Kompartiment sich das markierte Protein befindet (Sundberg et al, 1997).

In dieser Arbeit war die Lokalisierung von Alb3 durch Subfraktionierung der Chloroplastenextrakte nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Zum Einen waren die für die Fraktionierung eingesetzten Chloroplasten nicht eindeutig als intakte Plastiden isoliert worden

und zum anderen gab es mit dem vorhandenen Antikörpern eine solche Vielzahl an Signalen, dass zunächst mit dem molekularbiologischen Ansatz geklärt werden sollte, welches der Signale Alb3 tatsächlich nachweist.

Generell eignen sich sowohl Antikörper- als auch radioaktive Import-Studien, da beide Methoden durch eine Signalverstärkung eine hohe Sensitivität für ein spezifisches Substrat gewährleisten. Da jedoch keine radioaktiven Importstudien durchgeführt wurden, wird nicht weiter auf einen Vergleich der beiden Methoden eingegangen.

6.1.4 Aufklärung der Funktion von Alb3

Zur Aufklärung der Funktion des Alb3-Proteins sind verschiedene Experimente durchgeführt worden. Der eine Ansatz dabei war die entsprechende Mutante zu analysieren und ein anderer Weg war die Funktion von Alb3 mittels Antikörper zu blockieren.

Als Mutanten standen die *A. thaliana*-Mutante *albino3* und die *C. reinhardtii*-Mutante *ac29* zur Verfügung. Die *albino3*-Mutante wurde im Wesentlichen morphologisch untersucht. Darüber hinaus wurde zur Aufklärung der Funktion des Alb3-Proteins mit Hilfe dieser Mutante lediglich überprüft, ob die Cytochrom-Oxidase-Aktivität betroffen ist. Diese Vermutung basierte auf der Homologie zum bereits bekannten Oxa1p aus *S. cerevisiae*.

In der *C. reinhardtii ac29*-Mutante wurde die Abundanz von LHCI und LHCII mit der im Wildtyp verglichen und so in Einklang mit Moore et al., 2000, ein Zusammenhang zwischen Alb3-1 und dem posttranslationalen cpSRP-Weg (Abb.2) hergestellt.

Die Blockierung der Integration von LHCP in die Thalkoidmembran mit einem Antikörper ist der Nachweis für die Beteiligung des Alb3-Proteins am cpSRP-Weg gewesen (Moore et al. 2000). Hierzu wurden fraktionierte Thylakoidmembranen zunächst mit Antikörperserum inkubiert, bevor radioaktiv markiertes Vorläufer-LHCP dazugegeben wurde. Nach der Inkubation wurde ein Thermolysinverdau durchgeführt, um nicht integriertes radioaktives Material zu degradieren. Die entsprechenden Kontrollen wurden in diesem Versuch durchgeführt.

Da es beim Nachweis der Funktion mit dieser Methode auf die direkte Wechselwirkung des zu untersuchenden Proteins mit dem primären Antikörper ankommt, musste bei der Herstellung des Antikörpers darauf geachtet werden, dass sich das Epitop z. B. im Fall eines Membranproteins nicht in einer transmembranen Domäne befindet (siehe 4.1.1).

Die Funktion von Artemis wurde über die Komplementation der *Synechocystis D1471*-Mutante nachgewiesen. Diese kann sich unter normalen Bedingungen nicht teilen, doch nach der Transformation mit der Alb3-Domäne von Artemis aus *A. thaliana* waren die Mutanten wieder teilungsfähig. Damit wurde gezeigt, dass die Alb3-Domäne des Artemis-Proteins an der Zellteilung des Cyanobakteriums beteiligt ist.

6.1.5 Nachweis von Alb3-haltigen Komplexen

Komplexe können nur mit nativen Auftrennungsmethoden nachgewiesen werden, bei denen ein Protein-Komplex während der Aufarbeitung nicht zerstört wird. Mögliche Techniken sind: die BN-PAGE oder die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.

Bisher wurden in der Literatur zwei Alb3-haltige Komplexe von *C. reinhardtii* gefunden (Bellafiore et al., 2002). Die Auftrennung der Komplexe erfolgte über die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation und der Nachweis mittels Antikörper in einer Western-Analysen. Bei den nachgewiesenen Komplexen handelt es sich allerdings um Komplexe des „getaggt“ Fusionproteins, mit dem die *ac29*-Mutante komplementiert worden war. Es bleibt somit zu klären, ob die identifizierten Komplex auch mit dem „ungetaggt“ Protein nachgewiesen werden können.

In dieser Arbeit konnte das Alb3-Protein nur als Einzelprotein in Chloroplastenextrakten von *A. thaliana* mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese (BN- / SDS-PAGE) nachgewiesen werden (siehe 4.1.6.2). Ein hochmolekularer Alb3-haltiger Komplex wurde nicht identifiziert. In weiteren Versuchen mit dem Referenz-Antikörper α Alb3_RH (Daten nicht gezeigt), konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reaktion des Antikörpers α Alb3_3 (siehe 4.1.6.2) auf das Alb3-Protein zurückzuführen ist.

6.1.6 Schlussfolgerungen aus den biochemischen Ergebnissen

Insgesamt traten bei den Versuchen zur Identifizierung des Alb3-Proteins mit Hilfe von Western-Analysen eine Reihe von Schwierigkeiten auf. Zum Erreichen der gesteckten Ziele schienen die in dieser Arbeit gewählten Ansätze unter den gegebenen Voraussetzungen nicht erfolgversprechend. Folglich war es sinnvoll andere Wege zu gehen.

Als Nächstes wurde ein molekularbiologischer Ansatz verfolgt. Hier sollte die cDNA des Alb3-Gens kloniert und das Alb3-Protein in folgenden Arbeitsschritten rekombinant produziert werden, um damit eine Kontrolle bei der Auswertung der Antikörper-Signale zu besitzen (siehe 6.1.1.3). Ein Teil der durchgeführten, molekularbiologischen Arbeiten ging in diese Arbeit mit ein (4.2). Neben dem molekularbiologischen Ansatz ließen sich jedoch noch andere Wege beschreiten, die sowohl auf Studien mit Antikörpern, als auch unabhängig davon zu realisieren wären.

Ein Ansatz wäre die selbst hergestellten Antikörper aufzureinigen, d.h. unspezifische Wechselwirkungen der polyklonalen Antikörperseren zu eliminieren (siehe 6.1.1.3).

Hierzu sollte die *albino3*-Mutante von *A. thaliana* angezogen werden, um mit einem Gesamtproteinextrakt aus Chloroplasten der Mutante unspezifische Wechselwirkungen des polyklonalen Serums herauszureinigen. Dies kann über die Inkubation des Antikörperserums mit einer Blotmembran erfolgen, auf der sich die aufgetrennten Proteine des Chloroplastenextrakts von der Mutante befinden. Da das Alb3-Protein nicht in der Mutante vorhanden ist, bleiben die Antikörper, die spezifisch mit dem Alb3-Protein reagieren würden, während andere Antikörper an die Blotmembran binden und aus der Antikörperlösung entfernt werden. Außerdem könnte der Chloroplastenextrakt aus der *albino3*-Mutante als Negativ-Kontrolle in den Western-Analysen mit einbezogen werden. Nur die Reaktionen der Antikörper, die im untersuchten Chloroplastenextrakt auftreten, aber nicht in Extrakt der Mutante zu finden sind, wären dann auf das Alb3-Protein zurückzuführen.

Weiterhin könnten Immunopräzipitationen durchgeführt werden, zu denen die Antikörper von Alb3, cpSRP54, cpSRP43 und FtsY zur Verfügung stünden. Mit einer Immunopräzipitation können Antigene aus einer komplexen Mischung ausgefällt werden, wenn sie mit einem Antikörper reagieren. Das Präzipitat kann elektrophoretisch aufgetrennt und massenspektrometrisch untersucht werden.

Ein weiterer Weg ist das Einbringen eines „Tags“ in das Alb3-Protein oder in dessen Substrat, nämlich LHCP. Mittels Affinitätschromatographie gegen den eingebrachten „tag“ könnten die markierten Proteine isoliert und potentielle Interaktionspartner gefunden werden. Diese Methode ist bereits erfolgreich mit anderen Proteinen verwirklicht.

Mit radioaktiven Importstudien an *P. sativum* wurden bereits Studien zur Lokalisierung durchgeführt (Sundberg et al. 1997). An anderen Organismen fehlen die Ergebnisse solcher Studien. Zur Durchführung müsste jedoch ein Expressionsklon vorliegen, mit dem das Vorläuferprotein von Alb3 rekombinant produziert und während der Translation radioaktiv markiert werden kann. Erst wenn durch den molekularbiologischen Ansatz die Werkzeuge dafür geschaffen wurden, ist es möglich diese Experimente durchzuführen.

Der Versuch das Alb3-Protein mittels Massenspektrometrie eindeutig zu identifizieren war bisher erfolglos. Selbst in präparativen Gelen mit einer großen Menge an aufgetragenem Protein (Daten nicht gezeigt), war es nicht möglich das Alb3-Protein nachzuweisen. Allerdings sollte die massenspektrometrische Identifizierung erleichtert sein, wenn die Reaktionen der Antikörper spezifischer werden und besser zugeordnet werden können. Erst mit einer massenspektrometrischen Identifizierung des Alb3-Proteins kann bestätigt werden, ob es sich bei den bisherigen Antikörper-Signalen tatsächlich um den Nachweis des Alb3-Proteins handelt.

6.2 Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse

Die molekularbiologische Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, die Alb3-cDNA zunächst zu klonieren, um damit einen Expressionsklon herzustellen. Mit dem Expressionsklon sollte das Alb3-Protein rekombinant synthetisiert werden, so dass die vorhandenen Antikörper direkt am Alb3-Protein getestet werden können. Erst durch diese Kontrolle ist die Zuordnung eines Antikörper-Signals zum Alb3-Protein möglich.

Als Ausgangsmaterial zur Bearbeitung dieser Aufgabenstellung stand die Alb3-cDNA aus dem Labor von Prof. Dr. Sundberg zur Verfügung. Diese wurde mittels PCR getestet und es konnte nachgewiesen werden, dass das Ausgangsmaterial tatsächlich die Alb3-cDNA enthielt. Anschließende Sequenzierungen von aus transformierten Bakterien isolierter Plasmid-DNA, lieferten die Sequenzen eines cDNA-Klons des lhcb1-Gens aus *A. thaliana* (siehe Anhang Abb. III). Das Auftreten der lhcb1-DNA war für die weiteren Versuche eine unerwünschte Verunreinigung, für deren Ursprung es mehrere Erklärungsmöglichkeiten gibt. So stehen folgende Möglichkeiten zur Erklärung der Verunreinigung zur Verfügung. Entweder befand sich dieser cDNA-Klon in den kompetenten Zellen für die Elektroporation, in den verwendeten Gefäßen, oder im verwendeten cDNA-Ausgangsmaterial.

Die erste Möglichkeit kann ausgeschlossen werden, da die kompetenten Zellen auf ihre Überlebensfähigkeit in LB-Amp-Flüssigmedium überprüft wurden. Nicht-transformierte Zellen besitzen gegenüber dem Antibiotikum Ampicilin keine Resistenz und können in LB-Amp-Flüssigmedium, in dem transformierte Bakterien angezogen werden, nicht wachsen. Durch diesen Selektionsdruck wird sichergestellt, dass die kompetenten Bakterien nicht schon vor der Transformation ein Plasmid mit einem Resistenzgen (wie z.B. die lhcb1-cDNA) in sich tragen. Die Möglichkeit, dass die verwendeten Gefäße verunreinigt waren kann ebenso ausgeschlossen werden, da neue Elektroporationsküvetten verwendet worden waren. Überdies wurde weder in der eigenen Arbeitsgruppe, noch am Botanischen Institut der LMU München mit einem solchen Klon gearbeitet. Daraus folgt, dass diese Kontamination nur aus dem Ausgangsmaterial stammen kann. Um dies zu überprüfen könnte eine PCR mit spezifischen Primern für die Verunreinigung durchgeführt werden. Ein weiterer Nachweis könnte über die Sequenzierung der PCR-Fragmente, die in der Kontroll-PCR mit den M13-Primern (fw und rev) erzeugt wurden, erbracht werden. Es ist wahrscheinlich, dass dabei die lhcb1-Sequenz ermittelt und damit der eindeutige Beweis für eine Kontamination des Ausgangsmaterials erbracht würde.

Da im Ausgangsmaterial jedoch die Alb3-cDNA enthalten ist und in manchen transformierten Klonen wiedergefunden werden konnte (siehe 4.2.4.5), kann das zugeschickte Material zur Herstellung eines Expressionsklons verwendet werden. Mittlerweile existiert ein solcher Expressionsklon in der Arbeitsgruppe. Zur Herstellung war das Ausgangsmaterial mit Restriktionsenzymen behandelt worden, die lediglich in der Sequenz der lhcb1-cDNA schneiden, jedoch nicht in der Sequenz der Alb3-cDNA. Dadurch wurde die Verunreinigung spezifisch degradiert und das Ausgangsmaterial konnte aufgereinigt werden. Das aufgereinigte Material wurde wiederum für eine PCR eingesetzt und in einen speziellen Vektor zur Klonierung von PCR-Fragmenten (pDrive) eingebracht. Mit Hilfe dieses Vektors kann das Alb3-Protein rekombinant produziert werden.

Eine weitere Alternative wäre es gewesen sich die Alb3-cDNA selbst über eine RT-PCR selbst herzustellen. Dieser Weg ist jedoch der zeitaufwendigste, da das Fragment zuerst amplifiziert und dann in einen Vektor ligiert werden muss, bevor die Alb3-cDNA transformiert werden kann.

Schlussfolgerung aus den molekularbiologischen Ergebnissen ist, dass die Durchführung von Experimenten durch den Einsatz von Kontrollen abgesichert werden müssen. Nur dadurch erspart man sich müßige Analysen zweifelhafter Experimente.

7 Literaturverzeichnis

- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S., and Dujardin, G. (1996).** The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett.* **382**, 111-115.
- Amin, P., Sy, D.A., Pilgrim, M.L., Parry, D.H., Nussaume, L., and Hoffman, N.E. (1999).** *Arabidopsis* mutants lacking the 43- and 54-kilodalton subunits of the chloroplast signal recognition particle have distinct phenotypes. *Plant Physiol.* **121**, 61-70.
- Arnon, D.J. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiol.* **24**, 1-15.
- Bellaïf, S., Ferris, P., Naver, H., Gohre, V., and Rochaix, J.D. (2002).** Loss of albino3 leads to the specific depletion of the light-harvesting system. *Plant Cell* **14**, 2303-2314.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bisle, B. (2000).** Gelelektrophoretische Untersuchungen zur Assemblierung des Photosystem II. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bjerrum, Ole J. and Schafer-Nielson, C. (1986).** Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. In: Dunn (ed), *Electrophoresis 1986*. pp. 315-327. VCH publishers, Deerfield Beach, USA.
- Burnette, W.N. (1981).** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Chaddock, A.M., Mant, A., Karnauchoy, I., Brink, S., Herrmann, R.G., Klosgen, R.B., Robinson, C. (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.
- Cline, K., Henry, R. (1996).** Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 1-26.
- Dalbey, R.E., Kuhn, A. (2000).** Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 51-87.
- Dalbey, R.E., Robinson, C. (1999).** Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 17-22.
- Date, T., Goodman, J.M., Wickner, W.T. (1980).** Procoat, the precursor of M13 coat protein, requires an electrochemical potential for membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4669-4673.
- Durrant, I. (1990).** Light-based detection of biomolecules. *Nature* **346**: 297-298.
- Eichacker, L.A., Henry R. (2001).** Function of a chloroplast SRP in thylakoid protein export. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**, 120-134.

- Errington, J., Appleby, L., Daniel, R.A., Goodfellow, H., Partridge, S.R., Yudkin, M.D. (1992).** Structure and function of the spoIIIJ gene of *Bacillus subtilis*: a vegetatively expressed gene that is essential for sigma G activity at an intermediate stage of sporulation. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2609-2618.
- Fulgosi, H., Gerdes, L., Westphal, S., Glockmann, C., Soll, J. (2002).** Cell and chloroplast division requires ARTEMIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11501-11506.
- Gorman, Donald S., Levine, R. P. (1965).** Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54(6)**: 1665-1669.
- Granvogl, B. (2001).** Massenspektrometrische Charakterisierung von Membranprotein-Komplexen aus Gerstenchloroplasten. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Harlow, E., Lane, D. (1988).** Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 309-312.
- Harris, E.H. (1989).** The *Chlamydomonas* source book. Academic Press Inc., New York.
- Hartley, J.L., Donelson, J.E. (1980).** Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* **286**, 860-865.
- Hauser, C.R., Gillham, N.W., Boynton, J.E. (1998).** Regulation of chloroplast translation. *In: Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. (eds), The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas.* pp. 197-217. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Hell, K., Herrmann, J.M., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R.A. (1998).** Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2250-2255.
- Herrmann, J.M., Koll, H., Cook, R.A., Neupert, W., Stuart, R.A. (1995).** Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **270**, 27079-27086.
- Herrmann, J.M., Neupert, W., Stuart, R.A. (1997).** Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* **16**, 2217-2226.
- Heukeshoven, J., Dernick, R. (1998).** Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.)* **9(1)**, 28-32.
- High, S., Henry, R., Mould, R.M., Valent, Q., Meacock, S., Cline, K., Gray, J.C., Luirink, J. (1997).** Chloroplast SRP54 interacts with a specific subset of thylakoid precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 11622-11628.

- Hulford, A., Hazell, L., Mould, R.M., Robinson, C. (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**, 3251-6.
- Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A., Haskins, C.P. (1950).** Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* **94**: 152-170.
- Karnauchov, I., Cai, D., Schmidt, I., Herrmann, R.G., Klosgen, R.B. (1994).** The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem I, the *psaF* gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 32871-32878.
- Keegstra, K., Cline, K. (1999).** Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11**, 557-570.
- Klimyuk, V.I., Persello-Cartieaux, F., Havaux, M., Contard-David, P., Schuenemann, D., Meierhoff, K., Gouet, P., Jones, J.D., Hoffman, N.E., Nussaume, L. (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.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Li, X., Henry, R., Yuan, J., Cline, K., Hoffman, N.E. (1995).** A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3789-3793.
- Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee, P., Coupland, G. (1993).** The maize transposable element system *Ac/Ds* as a mutagen in *Arabidopsis*: identification of an albino mutation induced by *Ds* insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10370-10374**.
- Lottspeich, F., Zorbas H. (1998).** *Bioanalytik*, 1. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- Luirink, J., Samuelsson, T., de Gier, J.W. (2001).** YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* **501**, 1-5.
- Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., Henry, R. (2000).** Chloroplast Oxa1p homolog *albino3* is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **275**, 1529-32.
- Mori, H., Cline, K. (2001).** Post-translational protein translocation into thylakoids by the Sec and DeltapH-dependent pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1541**, 80-90.
- Murakami, T., Haga, K., Takeuchi, M., Sato, T. (2002).** Analysis of the *Bacillus subtilis* spoIIJ gene and its Parologue gene, *yqjG*. *J. Bacteriol* **184**, 1998-2004.
- Murphy, J.E. (1986).** The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.* **589**, 100-117.

- Nargang, F.E., Preuss, M., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2002).** The Oxal1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **277**, 12846-12853.
- Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N.E., van Wijk, K.J. (1999).** Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast- encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *EMBO J.* **18**, 733-742.
- Pilgrim, M.L., van Wijk, K.J., Parry, D.H., Sy, D.A., Hoffman, N.E. (1998).** Expression of a dominant negative form of cpSRP54 inhibits chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **13**, 177-186.
- Rehm, H. (2000).** *Der Experimentator*, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- Robinson, C. (2000).** The twin-arginine translocation system: a novel means of transporting folded proteins in chloroplasts and bacteria. *Biol. Chem.* **381**, 89-93.
- Robinson, C., Klosgen, R.B. (1994).** Targeting of proteins into and across the thylakoid membrane- a multitude of mechanisms. *Plant Mol. Biol.* **26**, 15-24.
- Rochaix, J.D. (1996).** Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **32**, 327-341.
- Roy, L.M., Barkan, A. (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.
- Salinovich, O., Montelaro, R.C. (1986).** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **156**, 341-347.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Moller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., Dalbey, R.E. (2000).** YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* **406**, 637-641.
- Schagger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. (1994).** Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.
- Schagger, H., von Jagow, G. (1991).** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-31.
- Schleiff, E., Klosgen, R.B. (2001).** Without a little help from 'my' friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochim. Biophys. Acta* **1541**, 22-33.
- Schleiff, E., Soll, J. (2000).** Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* **211**, 449-456.

- Schneppenheim, R., Budde, U., Dahlmann, N., Rautenberg, P. (1991).** Luminography - a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* **12**, 367-72.
- Schuenemann, D., Amin, P., Hartmann, E., Hoffman, N.E. (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., Gupta, S., Persello-Cartieaux, F., Klimyuk, V.I. VI, Jones, J.D.G., Nussaume, L., Hoffman, N.E. (1998).** A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10312-10316.
- Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J.W., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A.J., Oudega, B., Luirink, J. (2000).** YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19**, 542-549.
- Soll, J., Robinson, C., Heins, L. (2002).** The import and sorting of protein into chloroplasts. *Protein Targeting, Transport & Translocation.* 240-267.
- Sundberg, E., Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C., Coupland, G. (1997).** ALBINO3, an *Arabidopsis* nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* **9**, 717-730.
- Sürig, D. (1989).** Untersuchungen zur *in-vivo* Transkription eines menschlichen 7SL RNA-Gens. Diplomarbeit an der Ruhr-Universität Bochum.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994).** ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J.D., Bron, S., van Dijl, J.M. (2000).** Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 515-547.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tu, C.J., Schuenemann, D., Hoffman, N.E. (1999).** Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* **274**, 27219-27224.
- Voelker, R., Barkan, A. (1995).** Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J.* **14**, 3905-3914.
- Voelker, R., Mendel-Hartvig, J., Barkan, A. (1997).** Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *tha1*, encoding a chloroplast SecA homologue: in vivo role of cp-SecA in thylakoid protein targeting. *Genetics* **145**, 467-478.
- Yuan, J. Cline, K. (1994).** Plastocyanin and the 33-kDa subunit of the oxygen-evolving complex are transported into thylakoids with similar requirements as predicted from pathway specificity. *J. Biol. Chem.* **269**, 18463-18467.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1:	Proteinexport an der Thylakoidmembran.....	2
Abb. 2:	cpSRP-Weg: posttranslatiionaler (Sec-unabhängiger) und ko-translatiionaler (Sec-abhängiger) Export in die Thylakoidmembran.....	4
Abb. 3:	Die Aminosäure-Sequenz des Alb3-Proteins von <i>A. thaliana</i>	9
Abb. 4:	Die Aminosäure-Sequenz des PPF1-Proteins von <i>P. sativum</i>	10
Abb. 5:	Die Aminosäure-Sequenz des Alb3-1-Proteins von <i>C. reinhardtii</i>	11
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Gieapparatur zur Anfertigung eines Gradientengels.....	20
Abb. 7:	1 kb <i>DNA-Ladder</i> (Gibco BRL).....	28
Abb. 8:	DNA-Marker (Eigenherstellung).....	28
Abb. 9:	Die Sequenz des Alb3-Proteins von <i>A. thaliana</i>	33
Abb. 10:	Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von <i>A. thaliana</i>	34
Abb. 11:	Vergleich der Sequenzen der Epitope für α -Alb3_RH (A) und α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 (B) zwischen dem Alb3-Protein von <i>A. thaliana</i> (<i>A.t.</i>) und dem PPF1-Protein von <i>P. sativum</i> (<i>P.s.</i>).....	36
Abb. 12:	Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von <i>P. sativum</i>	37
Abb. 13:	Vergleich der Sequenzen der Epitope für α -Alb3_RH (A) und α -Alb3_1 bzw. α -Alb3_3 (B) zwischen dem Alb3-Protein von <i>A. thaliana</i> (<i>A.t.</i>) und den Proteinen Alb3-1 bzw. Alb3-2 von <i>C. reinhardtii</i> (<i>C.r.</i>).....	39
Abb. 14:	Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von <i>C. reinhardtii</i>	40
Abb. 15:	Western-Analyse an Chloroplastenextrakten von <i>H. vulgare</i>	43
Abb. 16:	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Chloroplastenextrakten von <i>A. thaliana</i> und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_1.....	46
Abb. 17:	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Chloroplastenextrakten von <i>A. thaliana</i> und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_3.....	48
Abb. 18:	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Chloroplastenextrakten von <i>A. thaliana</i> und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_RH.....	51
Abb. 19:	Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Chloroplastenextrakten von <i>A. thaliana</i> und anschließende Western-Analyse mit dem primären Antikörper α -Alb3_1.....	53

Abb. 20:	PCR mit der zur Verfügung gestellten alb3-cDNA	56
Abb. 21:	Schematischer Aufbau des pBluescript® II SK + Vektors und Orientierung der einklonierten alb3-cDNA	57
Abb. 22:	DNA-Mini-Präparation I von zwölf willkürlich ausgewählten Klonen	58
Abb. 23:	Kontroll-PCR für ausgewählte Klone I	59
Abb. 24:	Kontroll-PCR für ausgewählte Klone II	60
Abb. 25:	DNA-Maxi-Präparation I von zwei ausgewählten Klonen	61
Abb. 26:	Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation I	61
Abb. 27:	DNA-Mini-Präparation II von zehn willkürlich ausgewählten Klonen	63
Abb. 28:	DNA-Mini-Präparation II von zehn willkürlich ausgewählten Klonen	63
Abb. 29:	Kontroll-PCR für ausgewählte Klone III	64
Abb. 30:	Kontroll-PCR für ausgewählte Klone IV	64
Abb. 31:	DNA-Maxi-Präparation II eines ausgewählten Klons	65
Abb. 32:	Kontroll-PCR der DNA-Maxi-Präparation II	66
Abb. I :	Alignment der Proteine Alb3, Oxa1p und YidC	96
Abb. II:	Alignment der Proteine Alb3 (<i>A. thaliana</i>), PPF1 (<i>P. sativum</i>) Alb3-1 (<i>C. reinhardtii</i>) und Alb3-2 (<i>C. reinhardtii</i>)	96
Abb. III:	Angaben zum lhcb1-Gen aus <i>A. thaliana</i>	96

Tabellen

Tab. 1:	Übersicht über bekannte Alb3-Homologe der Thylakoidmembran	8
Tab. 2:	Transmembran-Domänen des Alb3-Proteins von <i>A. thaliana</i>	9
Tab. 3:	Verwendete Primer	14
Tab. 4:	Silberfärbeprogramm	23
Tab. 5:	Verdünnungen der ersten Antikörper	24
Tab. 6:	Angaben zur Menge an eingesetzten Primern in den verschiedenen PCR-Ansätzen	29
Tab. 7:	Programm zur Amplifizierung der alb3-cDNA	30
Tab. 8:	Sequenzierungsansätze der PCR-Fragmente sowie der Plasmid-DNA	67
Tab. I:	Größenangaben zu den Proteinen YidC (<i>E. coli</i>), Oxa1p (<i>S. cerevisiae</i>) und Alb3 (<i>A. thaliana</i>)	96

9 Anhang

9.1 Größenangaben zu den Proteinen YidC, Oxa1p und Alb3

Tabelle I: Größenangaben zu den Proteinen YidC (*E. coli*), Oxa1p (*S. cerevisiae*) und Alb3 (*A. thaliana*). Die Signalsequenzen wurden mit ChloroP (siehe 3.1.8) und die transmembranen Domänen mit TMPred vorausgesagt (siehe 3.1.8).

Protein	Organismus	Vorläufer-Protein		Signal-Sequenz	matures Protein		TM-Domänen
		AS	kD	AS	AS	kD	
YidC	<i>E. coli</i>	548	61,5	24	524	58,8	5
Oxa1p	<i>S. cerevisiae</i>	402	44,8	43	359	39,9	4
Alb3	<i>A. thaliana</i>	462	50,2	55	407	44,6	5

9.2 Alignment für die Proteine Alb3, Oxa1p und YidC

```

Alb3 110 GWFGFISDAMELVLKILKDGLSAVHVPYA--YGFAIIILLTIIVKAATYPLTKQQVESTLA
Oxa1p 120 -----HVYSGLPWWGTIAATTILIRCLMFPLYVKSSDSTVAR
YidC 330 GWLWFIS---QPLFKLLK----WIHSFVGN-WGFSIIIIITFIVRGIMYPLTKAQYTSMAK

Alb3      MQNLQPKIKAIQORYAG--NQER---IQLETSRLYKQAGVNPLAGCLPTLATIPVWIGLY
Oxa1p     NSHIKPELDALNNKLMSTTDLQQGQLVAMQRKLLSSHGIKNRWLAAP-MLQIPIALGFF
YidC      MRMLQPKIQAMRERLGD--DKQR---ISQEMMALYKAEKVNPLGGCFPLLIQMPIFLALY

Alb3      QALSNVANEGLFTEGFFWIPSLGGPTSIAARQSGSGISWLFPPVDGHPPLGWYDTVAYLV
Oxa1p     NALR-----HMAN--YPVDGFAN-QGVAWFTDLTQADP-----YLG
YidC      YML-----MG---SVELRQAPFAL-WIHDLAQDP-----YYI

Alb3      LPVLLIASQYVSMEIMKPP---QTDDPAQKNTLLVFKFLPLMIGYFALSVPSGLSIYWIT
Oxa1p     LQVITAAVFISFTRLGGETGAQQFSSPMKR----LFTILPIISIPATMNLSSAVVLYFAF
YidC      LPILMGVTMFF-IQKMSPT---TVTDPMQK---IMTFMPVIFTVFFLWFPSGLVLYYIV

Alb3      NNVLSTAQQVYLRKLGAKPNMDENASKIISAGRAKRSIAQPDDAGERFRQLKEQEKRSK
Oxa1p     NGAFSVLQTMILR-----NKWVRSLKITEVAKPR----TPIAG-----ASPTEN--M
YidC      SNLVTIIQQ-----QLIYRGLEKR-----G-----LHSREK--K

Alb3      KNKAVAKDTVELVEESQSESEEGSDDEEEEAAREGALASSTTSKPLPEVGQRRSKRSKRKR
Oxa1p     GIFQSLKHNIQKAR-DQAERRQLMQDNEKKLQESFKEKRQNSK--IKIVHKSNNFINNKK-
YidC      KS-----

Alb3      TV
Oxa1p     --
YidC      --

```

Abbildung I: Alignment der Proteine Alb3, Oxa1p und YidC. Die Aminosäuresequenz des Alb3-Proteins von *A. thaliana* wurde für eine BLAST Homologie-Suche verwendet. Für das Alignment mit dem Alb3-Protein (ab AS 110) von *A. thaliana* wurden die Sequenzen der Proteine Oxa1p (*S. cerevisiae*; ab AS 120) und YidC (*E. coli*; ab AS 330) herangezogen (CLUSTAL W, siehe 3.1.8). Die farbig unterlegten Bereiche (rot, gelb und türkis) entsprechen den berechneten transmembranen Domänen (TMPred, siehe 3.1.8).

9.3 Alignment für die Proteine Alb3, PPF1 Alb3-1 und Alb3-2

```

ALB3 -----MARVLVSSPS-SFFGSPLIKPSSSLRHSGVGGG-GT-AQFLPYRSNNNK-L
PPF-1 -----MAKTLISSPS--FLGTPLP----SLHRT-----FSP---NRTRL
Alb3-1 MSSSMCLARCSASLSAGNFPSRMFMGR-----LHAQRRTRTLQLRCAASLLP---DQPT-L
Alb3-2 -----MALQMKQSPS---MG-----VRRAS-----QP-----

ALB3 FTTSTTVRFSLNEIP-PFH-GLDSSV-DIGAIFTRAESLLYTIA-DAAVVGADSVVTTDSS
PPF-1 FTK---V-QFSFHQLP-PIQ-SVSHSV-DLSGIFARAEGLLYTLA-DATVA-ADAAASTD-V
Alb3-1 AAS-----SAISPVPSDLPEVLGDALHRLGAIYVLADASASTAA-AAVMP--TAVDSAAGA
Alb3-2 -----VLPPRP-IVHRGVGSVS-RRPAVVVKAS--LLDAASAASA-VDAVHHATQL

ALB3 AVQKSGGWFGFISDAMELVLKILKDGLSAHVVPYAYGFAIILLTIIVKAATYPLTKQQVE
PPF-1 AAQKNGGWFGFISDGMFVLKVLKDGLSSVHVVPYSYGFAIILLTVIVKAATLPLTKQQVE
Alb3-1 APQRAGGWVAPVADALEQVLYALQEGLDKLVVPYSYGYSIILLTLIVKLLTYPLTKQQVE
Alb3-2 YTLAEGGPIDVLAQFFEFVLQTLDEGLESAKIPYSYGFAIIALTVLVKVATFPLTKQQVE

ALB3 STLAMQNLPKIKAIQQRYAGNQERIQLETSRLYKQAGVNPLAGCLPTLATIPVWIGLYQ
PPF-1 STLAMQNLPKIKAIQERYAGNQERIQLETSRLYTQAGVNPLAGCLPTLATIPVWIGLYQ
Alb3-1 SAMAVQALKPRIDLIKDRFGEDKDKIQKETSVLYEQAGVNPLAGCLPTLATIPVIFIGLFS
Alb3-2 STLSLQALQPRVKELQAKYADDPENLQLETARLYKEAGVNPLAGCFPTLATIPVFIGLYN

ALB3 ALSNVANEGFL-TEGFFWIPSLGGPTSIAARQSGSGISWLFPPF-VDGHPPLGWYDTVAYL
PPF-1 ALSNVANEGLL-TEGFLWIPSLGGPTSIAARQSGSGISWLFPPF-VDGHPLLGWYDTAAYL
Alb3-1 SLTNVANDGLLDTQGFYFVPSLAGPTTMAMRQSGLGTSWLWPLGPDGAPPIGWEDAAAYL
Alb3-2 ALSNAAKEGLL-TEGFFWIPSLGGPTTIGG-----GLEWLVPF-ENGAPPVGVANAAAYL

ALB3 VLPVLLIASQYVSMEIMKPPQT-DDPAQKNTLLVFKFLPLMIGYFALSVPSGLSIYWLTN
PPF-1 VLPVLLIIVSQYVSMEIMKPPQT-NDPNQKNTLLIFKFLPLMIGYFSLSVPSGLTIYWFTN
Alb3-1 TLPLLLVAVQYASSSVTSPIDPKDENANTQRALLVFLPLMVGWFSLNVPAGLSLYYLAN
Alb3-2 VMPVLLVASQYASQKIISSQNN-QDPSQQQAQAILKFLPLMIGWFSLNVPSGLTLYWVFN

ALB3 NVLSTAQQVYLRKLGKAKPNMDEN--ASKIISAGR-----AKRSIAQPDDAG---ERFRQ
PPF-1 NVLSTAQQVWLRKLGKAKPAVNEN--AGGIITAGQ-----AKRSASKPEKGG---ERFRQ
Alb3-1 TVLSSAIQIYLKKGANVVMNELGPVTKPGSGRRNGVAAGEWSVWKPATVLTAAEAAKA
Alb3-2 NLLSTGQQLYLKAT--VKVNIPEA--IKAPATAG-----SSTPIVKPKE-----ERVKK

ALB3 LKEQE---KRSKKN---KAVAKDTVELVEESQSESEEGSDDEEEEARE---GALA-SSTT
PPF-1 LKEEE---KKKKLI---KALPVEEVQPLA-SASASNDGSDVENNKEQE---VTE-ESNT
Alb3-1 RAEAEAEVERAR-----EAAEEAAAAAFAFDNASVLSVDDSTAAIAGTATMAVTAGAPAA
Alb3-2 VTGKELGSRKKRRNDDGEEVEDVEVEVVS-SGSSSSSGSNGASGRKGEKFRALKA-REAA

ALB3 SKPLPEVG----QRRSKRSKRKRTV-----
PPF-1 SKVSQEVQSFSRERRSKRSKRKPVA-----
Alb3-1 AMDPSKVN----RRCKRRRLTSLVQDGSTASAAVAGASA
Alb3-2 AKAASTVSAG--AGGSEEGKDNSA-----

```

Abbildung II: Alignment der Proteine Alb3 (*A. thaliana*), PPF1 (*P. sativum*) Alb3-1 (*C. reinhardtii*) und Alb3-2 (*C. reinhardtii*). Das Alignment wurde mit CLUSTAL W durchgeführt (siehe 3.1.8). Die unterstrichenen Bereiche der Sequenzen geben die Positionen der vorausgesagten transmembranen Domänen innerhalb der Proteine an (TMPred; 3.1.8). Die Sequenz des Peptids gegen das der Antikörper α -Alb3_{RH} gerichtet ist, ist **rot** unterlegt. Der **gelb** unterlegte Bereich entspricht dem Epitop, das für die Herstellung der eigenen Antikörper ausgewählt worden war. Das weiße Dreieck (▼) kennzeichnet die berechnete Prozessierungsstelle (ChloroP; 3.1.8).

9.4 Angaben zum lhcb1-Gen (cab3) aus *A. thaliana*

Locus: AT5FCAB3; 1004 bp
Definition: *A. thaliana* 5' flanking region of cab3 gene and cab2 gene (partial) for chlorophyll a/b-binding protein.
Accession #: X15222
Organism: *Arabidopsis thaliana*
Reference: 1 (bases 1 to 1004)
AUTHORS: Mitra,A., Choi,H.K. and An,G.
TITLE: Structural and functional analyses of Arabidopsis thaliana chlorophyll a/b binding protein (cab) promoters
JOURNAL: Plant Mol. Biol. 12, 169-179 (1989)
gene: 960..1004/gene="cab3"
CDS: 960..>1004/gene="cab3"/product="chlorophyll a/b-binding protein"
/protein_id="CAA33291.1"/translation="MAASTMALSSPAFAG"

```
1 gaattcatgtgtgagggcaattagtgattgtaaaaaataaaattgtgttttgtaaaaaact
61 ttactgtcgaattatattagggtgatgaaaaaatcagtaaaactacgaatgatagcttaa
121 agagtttctatcaaagtgattgaggaatagtttggtgcaaattaaaccttaacaaaatg
181 tttctgttggtgtttttcatctctacaaattttgaattttatgatgaattagaaagata
241 gaatgagttacttttagattttaaaagggtgttcaagttacaaaacagattactagaatc
301 atgattaaaaatttacaagctacatattgtctaaaccaatgatggtgaacataccagatg
361 atagtttttcagtggttgacaatcaattggatagtttttatggttctgcaaaaatgca
421 aataatcagtggttttgagtctttgcattttgattttaaagcaaaaacaactgagttca
481 aggttaaattaattacatta ttcatgagatttatcaggtagtgataaaactgacaatgg
541 aatcaatggtattgtaaattggtagtgatggtggacttctaattgttactctctatgatgt
601 ttcggtcatcggatcacactatctttacttttatttaaaggaaagatcacacaaataag
661 ttatctctattcagaactattaagctgcttccaaaagacttgcaacatgtggtctcgaaa
721 tgctttggctgcaatgaaaaaatcatagcaaaaagctagtgactagagactgccacataa
781 gaatagtaaactgtaaaaccaaatactcaaaaatccaatgagtaaagagatatagattac
841 ttcatagataacaaacgttactcgcaattttcctatataatccaaccctacctaaccatt
901 ttcaatcactctcactcacaagtttagtcacaaaaaaacacaaaaaagtttcaa
961 tggccgcctccacaatggctctctcctccctgccttcgccgga
```

Abbildung III: Angaben zum lhcb1-Gen aus *A. thaliana*. Die Daten stammen aus der Datenbank des NCBI (siehe 3.2.11). Die Sequenz des **gelb** unterlegten Bereichs war das Ergebnis der Sequenzierung der vermeintlichen „Alb3-Clone“ (siehe 4.2.3.5 und 4.2.4.5).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von PD Dr. Lutz Eichacker angefertigt.

Bei Lutz bedanke ich mich dafür, dass ich an diesem interessanten und fordernden Thema arbeiten durfte. Die besonders freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, der ich seit fast drei Jahren als „HiWi“ und Diplomand angehöre, war für mich immer besonders wichtig. Ich wünsche ihm, dass ihm die Ideen nie ausgehen und wir vielleicht schon in naher Zukunft eine davon umsetzen können.

Friedrich danke ich für die praktische Betreuung meiner Diplomarbeit und für seine Korrekturen am Manuskript. Höher, schneller, weiter!!!

Axel danke ich dafür, dass mir in den nächsten 5 Jahren nie langweilig werden wird. Auch wenn er gar nichts von Fußball versteht, würde ich jederzeit eine Mass mit ihm trinken.

Bernhard danke ich für das Mitgefühl, das er aufgebracht hat, wenn der FC Bayern München gepatzt hat. Mittlerweile weiß ich auch ganz genau, warum das Oddset heißt.

Bei Kerstin bedanke ich mich dafür, dass Sie mir im Labor einen tollen Ausblick verschafft hat. Das Aquarium und der Ritter Sport Fensterrahmen sind wirklich wahnsinnig schön.

Mikael danke ich, weil er extra aus Russland kam, um Mitglied unserer Arbeitsgruppe zu werden. Er hat alles gern kühl und vor allem die längste Anreise.

Veronika danke ich, weil sie mir gezeigt hat die Welt mit anderen Augen zu sehen. Vor dem Spül ist nach dem Spül, die Seife ist rund und das Spülen dauert 90 Minuten!

Den ehemaligen Labormitstreitern Agnes, Birgit, Bernd, Sandra, Thomas und Torsten danke ich, weil es Spaß gemacht hat mit Ihnen in einem Labor zu arbeiten.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit am
Institut für Botanik der LMU München
unter der Betreuung von PD Dr. Lutz Eichacker
selbstständig durchgeführt und keine anderen als die
angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Marko Böhm