
**Identifizierung und Charakterisierung
nukleärer Mutanten
mit defekter Photoakklimation
in
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation

Zur Erlangung des Akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld

vorgelegt von
Rüdiger Borgstädt

Bielefeld, April 2004

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Allgemeine Einleitung	3
2.2 Die Pflanzenzelle	4
2.3 Der Chloroplast	5
2.3.1 Der thylakoidäre Energietransport	7
2.3.1.1 LichtsammelkomplexII	8
2.3.1.2 PhotosystemII	8
2.3.1.3 Der Cytb6/f-Komplex	10
2.3.1.3.1 Der lineare Elektronentransport	11
2.3.1.3.2 Der zyklische Elektronentransport	12
2.3.1.4 PhotosystemI	12
2.3.1.5 ATP-Synthase	14
2.3.2 Der Calvin-Zyklus und der oxidative Pentose-Phosphat-Weg	15
2.3.3 Die reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)	16
2.4 Die Photoakklimationsprozesse der Photosynthese	17
2.4.1 Die „State Transition“	18
2.4.2 Der Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus	21
2.4.3 Der „PSII-Repair-Cycle“ und die Photoinhibition	22
2.4.4 Das Thioredoxin-System des Chloroplasten	23
2.4.5 Die Antioxidantien des Chloroplasten	24
2.4.6 Die Interaktionen von Chloroplasten und Mitochondrien	26
2.4.7 Die redox-regulierte Gen-Expression des Chloroplasten	28
2.5 Die Zielsetzung der Arbeit	30
2.6 Der Modellorganismus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3. Material und Methoden	32
3.1 Verwendete Organismen und Medien	32
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	32
3.1.1.1 <i>E. coli</i> -Stämme	32
3.1.1.2 Verwendete Antibiotika	32
3.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.1.2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien	33
3.1.2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> -Medien	33
3.1.2.2.1 Hoagland-Medium	34
3.1.2.2.2 Sterilisation der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Samen	34

3.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken	34
3.2.1 Standard-Methoden	34
3.2.1.1 Plasmidisolierung	34
3.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese	35
3.2.1.4 Restriktionsendonuklease-Verdau	35
3.2.1.5 Ligation	36
3.2.1.6 DNA Isolierung	36
3.2.1.6.1 <i>Arabidopsis</i> -DNA Isolierung	36
3.2.1.6.2 DNA-Isolierung	37
3.2.1.7 Sequenzierung	37
3.2.1.8 RNA-Isolierungen	37
3.2.1.8.1 RNA-Isolierung mit Trizol™ (Invitrogen, USA)	37
3.2.1.8.2 RNA-Isolierung	37
3.2.1.9 Transformation von <i>E. coli</i>	38
3.2.1.9.1 CaCl ₂ -Methode	38
3.2.1.9.2 Elektroporation	38
3.2.2 Makroarray	38
3.2.2.1 DNase-Verdau	39
3.2.2.2 Reverse Transkription mit Dig™ Markierung	39
3.2.2.3 Aufreinigung der cDNA QIAquick™ PCR Purification Kit	40
3.2.2.4 Quantifizierung der erhaltenen cDNA	40
3.2.2.5 Hybridisierung und Detektion des Makroarrays	41
3.2.2.6 Film-Entwicklung und -Fixierung	41
3.2.2.7 Auswertung der erhaltenen Daten	42
3.2.3 Vergleichende RT-PCR	42
3.2.4 Northernblot	42
3.2.4.1 Sondenherstellung per PCR	43
3.2.4.2 Sondenherstellung per Klenow-Enzym	43
3.2.5 „mapping“-Ansatz zur Identifikation des mutierten Locus	43
3.2.6 ECFP-Klonierung und Protoplastentransformation	46
3.2.6.1 Klonierung der At4g08870-Transitsequenz in pECFP	46
3.2.6.2 Protoplastentransformation	48
3.2.7 Klonierung und Überexpression des STK1-Fragmentes	49
3.2.7.1 Klonierung des STK1 Fragmentes in pQE80	49
3.2.7.2 Überexpression des STK1-Fragmentes	51

3.3 Proteinbiochemische Arbeitstechniken	52
3.3.1 Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration	52
3.3.2 SDS PAGE	52
3.3.3 Silber-Färbung	53
3.3.4 Coomassie Blue Färbung	53
3.3.5 Westernblot	53
3.3.6 Immunologische Detektion	53
3.3.7 Chloroplastenisolierung	55
3.3.8 Die Isolierung von Chloroplasten nach Baginsky	55
3.3.9 Isolierung von Thylakoidmembranen zur „in vito“-Phosphorylierung	57
3.3.10 Der Arginaseaktivitäts-Assay	58
3.3.11 Maldi (Matrix unterstützte Laserdesorption)	59
3.4 Physiologische Arbeitstechniken	60
3.4.1 Lichtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
3.4.2 Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen	60
3.4.2.1 Raum-Temperatur-Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen	60
3.4.2.1.1 „Video Imaging-Screening“	61
3.4.2.1.2 „State Transition“-Messung	62
3.4.2.1.3 Messung der der Chlorophyll-Fluoreszenz	62
3.4.2.1.4 Messung des NPQ	63
3.4.2.2 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie	63
4. Ergebnisse	64
4.1 Die Identifizierung von „State Transition“-Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
4.1.1 Entwicklung eines „State Transition-Screening“-Verfahrens	65
4.1.2 Identifizierung der „State Transition“-Mutanten	67
4.1.3 Verifizierung der „State Transition“-Mutanten	69
4.1.4 Die Analyse der Stabilität der Mutation	72
4.1.5 Die genotypische Charakterisierung von Stmu10	72
4.1.5.1 Segregationsanalysen	72
4.1.5.2 Die „mapping“-Analyse des Locus	74
4.1.5.3 Die Identifizierung des deletierten Gens durch RT-PCR	78
4.1.5.4 Die Northernblot-Analysen von At4G08870	79
4.1.5.5 „in silico“-Analyse von At4g08870	80
4.1.5.6 Die Lokalisierung der Arginase2	82

4.1.6 Die phänotypische Charakterisierung von Stmu10	83
4.1.6.1 Das veränderte Wachstum von Stmu10 bei Wechsellicht-Bedingungen	83
4.1.6.2 Die Quantifizierung der „State Transition“ (nach Lunde et al., 2000)	84
4.1.6.3 Die Messung des (NPQ)	85
4.1.6.4 Der relative Elektronentransport des PSII, Fv/Fm	87
4.1.6.5 Der Reduktions-Zustand des PQ-Pools 1-qP	88
4.1.6.6 Die Messung der Fluoreszenz bei Wechsel von Licht zu Dunkelheit	89
4.1.6.7 Die Starklicht-Versuche mit Stmu10	90
4.1.6.8 Die „in vivo“-LHCII-Phosphorylierung von Stmu10	91
4.1.6.9 Die „in vitro“-LHCII-Phosphorylierung von Stmu10	92
4.1.6.10 Die Expressions-Analysen chloroplastidärer Gene	93
4.1.6.10.1 Die Makroarray-Analyse chloroplastidärer Gene	94
4.1.6.10.2 Die RT-PCR-Analysen chloroplastidärer Gene	95
4.1.6.10.3 Die Westernblot-Analysen chloroplastidärer Komplex-UE	96
4.1.7 Die Funktion und Regulation von Arginasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
4.1.7.1 Die Arginase-Aktivitätsbestimmung	97
4.1.7.2 Die Transkriptionsraten von Arginase1 und Arginase2	98
4.1.7.3 Die Veränderungen der Arginasen-Expressionsraten bei Starklicht	99
4.1.7.4 Die Western-Blot Analysen mitochondrieller Komplex-UE	100
4.2 Die Serin-/Threonin-Kinase STK1	101
4.2.1 „in silico-Screening“ von STK1	101
4.2.1.1 Das „Screening“ der <i>Arabidopsis</i> -Database (TAIR)	101
4.2.1.2 Die potentielle Serin-Threonin-Kinase STK1	103
4.2.2 Mutanten-Analysen von STK1	105
4.2.3 Charakterisierung der Stkm-Phänotypen	106
4.2.3.1 Die Analyse der „State Transition“ von Stkm1	106
4.2.3.2 Die Untersuchung der Stkm1-D1-„in vivo“-Phosphorylierung	107
4.2.3.3 Die Untersuchung der Stkm1-D1-„in vitro“-Phosphorylierung	108
4.2.3.4 Die Untersuchung des Stkm1-Phänotyps bei Starklicht-Bedingungen	109
4.2.3.4.1 Die Starklicht-Adaptation der Mutante Stkm1	109
4.2.3.4.2 Die Starklicht-Adaptation der Mutante Stkm2	110
4.2.4 Die Expression von STK1 in <i>E.coli</i>	112
4.2.5 Die STK1-Antiserum-Analysen	113
4.2.6 Die MALDI-Analyse des detektierten Antigens	114

5. Diskussion	115
5.1 Die „State Transition“ als redox-regulierter Photoakklimationsprozess	115
5.2 Das verwendete „State Transition-Screening“-Verfahren	116
5.3 Die „State Transition“-Mutante Stmu10	119
5.3.1 Die Segregation der „State Transition“-Mutante Stmu10	119
5.3.2 Die Identifizierung des mutierten Locus	120
5.3.3 Die Auswirkungen der Deletion der Arginase2-Transkription in Stmu10	122
5.3.4 Die Regulation der chloroplastidären Gen-Expression in Stmu10	129
5.3.5 Die potentiell gesteigerte NO-Synthese in Stmu10	132
5.4 Chloroplastidäre Serin-Threonin-Membran-Kinase	137
5.5 Das verwendete „in silico-Screening“-Verfahren	138
5.6 Die Auswirkungen einer STK1-Mutation	139
5.7 Erste Lokalisationsstudien der STK1	141
5.8 Die verwendeten Ansätze zur Identifikation von Photoakklimationskomponenten	144
6. Literaturverzeichnis	145
7. Anhang	166
7.1 Abkürzungen	166
7.2 Abbildungsverzeichnis	168
7.3 Tabellen	170
7.4 Verwendete Primer	170

1. Zusammenfassung

Die Organismen der oxygenen Photosynthese passen sich mit Photoakklimationsprozessen wechselnden Lichtqualitäten und -quantitäten an. Durch Analyse der Redox-Zustände der photosynthetischen Elektronentransportkette werden Sensor-/Regulator-Elemente aktiviert, welche die Photosynthese an die neuen Umweltbedingungen anpassen.

In einem dieser Prozesse, der „State Transition“, migrieren die mobilen LHCII-Proteine zwischen den Photosystemen und passen so die Lichtenergieversorgung den Umweltbedingungen (Bonaventura und Meyers 1969; Murata 1969) und den Bedürfnissen des Organismus an Reduktions-/Energie-Äquivalenten (Finazzi et al., 1999, 2000, 2001) an. Durch Reduktion des PQ-Pools wird eine Regulationskaskade ausgehend von dem Cytb₆f-Komplex induziert. Diese phosphoryliert die mit dem PSII assoziierten mobilen LHCII-Proteine, die zu PSI migrieren (Kruse, 2001, Wollman, 2001, Allen, 2003). Der genaue Mechanismus dieser Signalkaskade ist noch unbekannt.

Zur Analyse der Regulation des Prozesses der „State Transition“ wurde ein „forward genetics“-Ansatz in *Arabidopsis thaliana* verwendet. Mit der Entwicklung eines „State Transition-Screening“-Systems wurden drei Mutanten aus 10.000 *Arabidopsis thaliana*-EMS und „Neutron bombardment“-Linien mit einer defekten „State Transition“ identifiziert. Eine dieser Mutanten, *Stmu10*, wurde eingehend genotypischen und phänotypisch charakterisiert. Durch die Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms (The Arabidopsis Genome Initiative, 2001) konnte ein „mapping“-Ansatz zur Eingrenzung des Locus der Mutation verwendet werden. Die Deletion der Transkription des Gens *At4G08870* in *Stmu10* konnte mit den Methoden der RT-PCR und des Northern-Blot identifiziert werden. Bei dem Genprodukt handelt es sich um eine Arginase2, die im Mitochondrium lokalisiert ist und deren Deletion in *Stmu10* die Reduktion der Arginase-Aktivität hervorruft. Durch Hemmung der Respiration kommt es in *Stmu10* zur dauerhaften Reduktion des PQ-Pools und damit zu dem Verbleib in State2. Die Hemmung von Stoffwechselwegen durch die Deletion der Arginase2, sowie eine potentielle regulatorische Funktion in der NO-Signaltransduktion als Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen wird diskutiert.

Die Reduktion von Thiol-Resten der „State Transition“-induzierenden LHCII-Kinase durch das Thiordoxin-System hemmt bei Starklicht-Bedingungen die Phosphorylierung der mobilen LHCII-Proteine. Unter diesen Bedingungen wird der Prozess der Photoinhibition induziert.

Bei einer vollständigen Reduktion des PQ-Pools wird eine Signalkaskade induziert, an deren Ende PSII-Proteine als Substrat phosphoryliert werden.

Die Phosphorylierung induziert eine Stabilisierung des Dimeren-Zustandes des PSII und hemmt so den „PSII-Repair-Cycle“. Dieser Mechanismus soll dadurch eine Schutzfunktion gegen ständige Neusynthese und Degradierung des D1-Proteins sein (Kruse, 2001, Aro und Ohad, 2003).

Mit einem „reverse genetics“-Ansatz wurde das *Arabidopsis thaliana*-Genom auf potentielle Mitglieder photosynthetischer Signalkaskaden analysiert. Bei diesen Mitgliedern sollte es sich um chloroplastidäre Serin-Threonin-Membrankinasen handeln, die potentiell durch Phosphorylierung die Prozesse der „State Transition“ oder der Photoinhibition induzieren.

Durch „Screening“ der *Arabidopsis thaliana*-Datenbank (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002) konnten 12 potentielle chloroplastidäre Serin-Threonin-Membrankinasen identifiziert werden, von denen eine, mit der Tair-Nr. At3g24550, charakterisiert wurde. Von der, als STK1 benannten Kinase, wurden „in silico“ T-DNA-Mutanten identifiziert, die phänotypisch charakterisiert wurden. Bei den Mutanten konnte eine Hemmung der D1/D2-Phosphorylierung und bei andauernden Starklicht-Bedingungen (3 Wochen 700 μ E) eine einsetzende Seneszenz detektiert werden. Die Kinase STK1 wurde in *E.coli* expremiert und gegen Kaninchen immunisiert. Mit Immunodetektion durch das STK1-Antiserum wurden erste Lokalisierungsstudien durchgeführt. Dabei konnten durch vergleichende Maldi-Analysen eine potentiell chloroplastidäre Lokalisierung unterstützt werden.

Über die Funktion der STK1 in dem Prozess der Photoinhibition wird diskutiert.

2. Einleitung

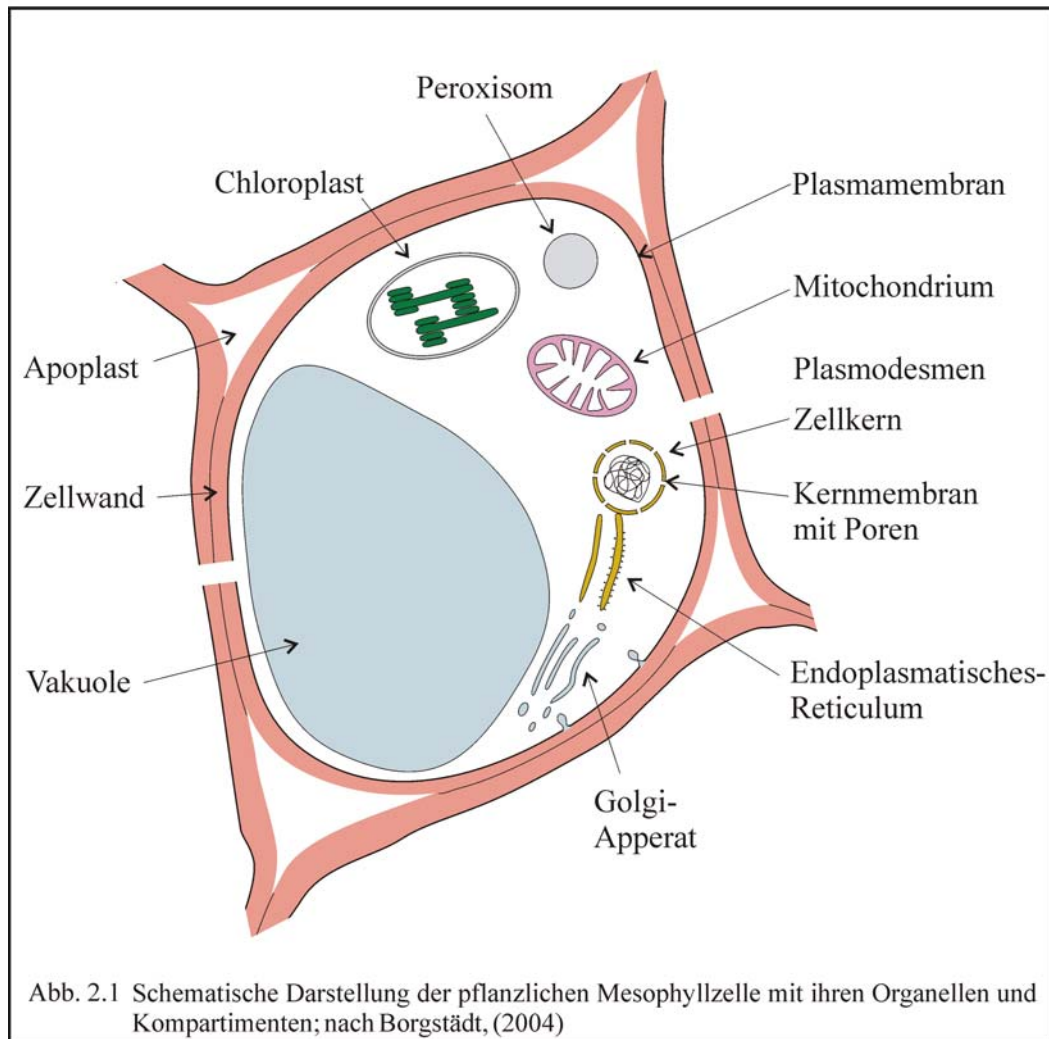
2.1 Allgemeine Einleitung

Diese Arbeit wurde im Rahmen der DFG-Forschergruppe FOR 387 „Redoxsteuerung als zentrales Regulativ der Anpassung von Organismen mit oxygener Photosynthese“ durchgeführt.

Die Komplexität der Photosynthese und die Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren auf diesen Prozess setzen ein komplexes Netzwerk an Regulationsmechanismen voraus. Ein Prinzip dieser Mechanismen ist die Wahrnehmung des energetischen Zustandes des Chloroplasten durch Sensoren. Der energetische Zustand begründet sich auf das Verhältnis von reduzierten zu oxidierten Verbindungen, dem Redox-Zustand, der durch die Nernstsche-Gleichung $E = E_m^- * RT/nF * \ln [\text{red}]/[\text{ox}]$ beschrieben wird. Als Folge von wechselnden physiologischen Bedingungen kommt es in der Pflanze zu einer Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes und zur Generierung von radikalen Sauerstoff-Spezies (ROS), welche Proteine, Lipide und DNA durch Oxidation degradieren (Baier und Dietz, 1999). Zur Vermeidung dieser Bedingungen besitzt die Pflanze Sensor-Systeme, die bei Veränderungen des Redox-Zustandes Signal-Kaskaden aktivieren. Am Ende dieser Kaskaden stehen Regulatoren, welche durch Modifikationen von Enzymen die Photosynthese an die veränderten physiologischen Bedingungen anpassen. Der Stoffwechsel des Chloroplasten darf jedoch nicht autark von der übrigen Zellphysiologie betrachtet werden. Intrazelluläre Kommunikation als Grundlage eines zellulären Energie-Gleichgewichtes scheint der Schlüssel zu dem Verständnis dieser komplexen Regulationsmechanismen zu sein (Hoefnagel et al., 1998; Peltier and Cournac, 2002; Padmasree et al., 2002; Baurain et al., 2003; Allen, 2003a).

2.2 Die Pflanzenzelle

Die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitstechniken fokussierten auf dem Blatt als Pflanzenorgan der Photosynthese und hier besonders auf die pflanzliche Mesophyllzelle (Abb. 2.1).

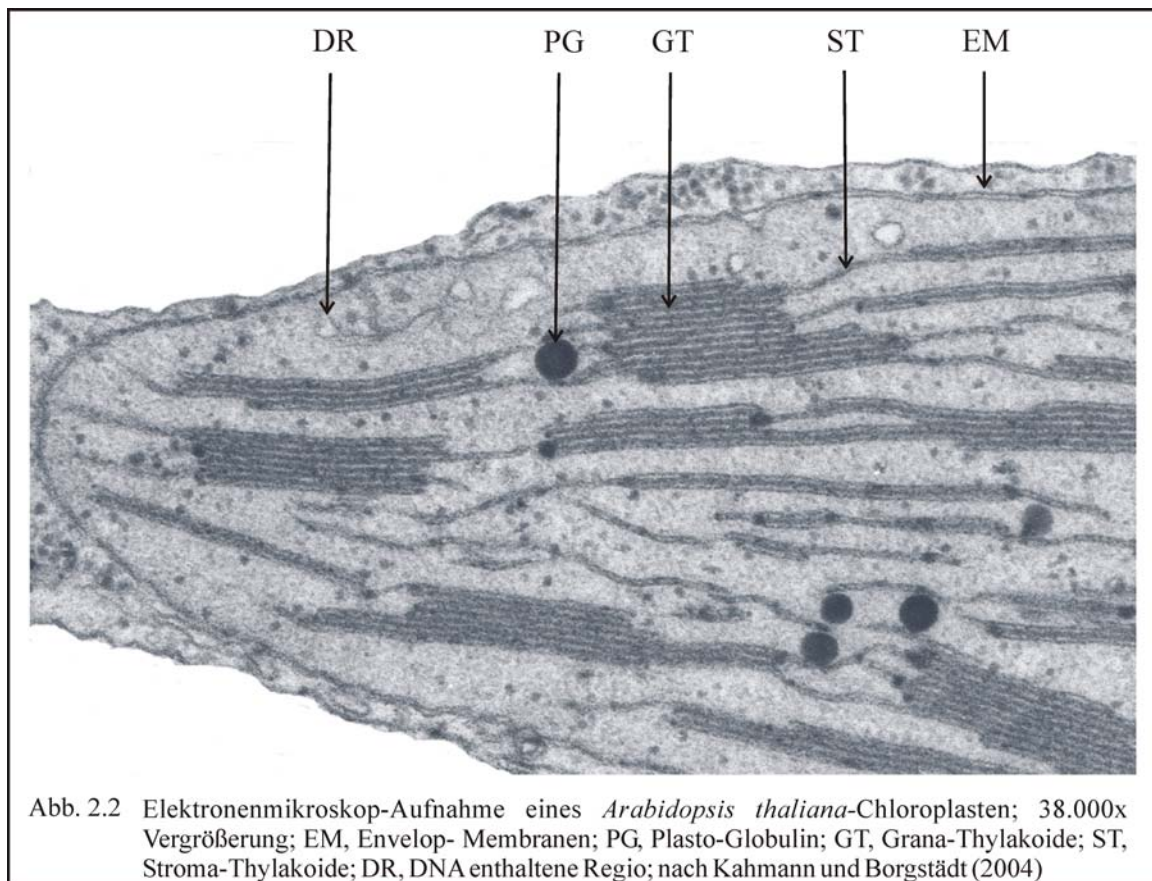


Die Mesophyllzellen werden als Pflanzenzellen von einer Zellwand umschlossen, welche durch den Turgordruck dem Blatt Stabilität verleiht. Als eukaryotische Zelle besitzt sie einen Zellkern mit der genetischen Information (Abb. 2.1). Die translatierten Proteine werden anhand ihrer Transitsequenz von den verschiedenen Zellkompartimenten aufgenommen (de Boer und Weisbeek, 1991, Fulgosi und Soll, 2001, Soll, 2002). Das Mitochondrium und der Chloroplast sind die Orte der Energiegewinnung der pflanzlichen Zelle (Abb. 2.1). Eine Mesophyllzelle enthält im Durchschnitt etwa 50 bis maximal 200 Chloroplasten. Beide Organellen gehen nach der Endosymbionten-Theorie auf phagozytierte Bakterien zurück, die als Endosymbionten bis zu den heutigen Zellorganellen degenerierten.

Die Mitochondrien sollen hierbei aus Archaeobakterien (Berry, 2003), die Chloroplasten aus Cyanobakterien hervorgegangen sein (Mereschkowski, 1905, Raven und Allen, 2003). Beide Zellorganellen besitzen ein kleines zirkuläres Genom (Mitochondrium 367 Kb, Chloroplast 150 Kb, *Arabidopsis thaliana*), das Gene der chloroplastidären Transkription und essentielle redox-regulierte Komplex-UE enthält (Allen, 1993, Forsberg et al., 2001; Allen, 2003a).

2.3 Der Chloroplast

Der Chloroplast höherer Pflanzen besitzt eine elliptische Form und hat einen Durchmesser von 4-8 μ m.

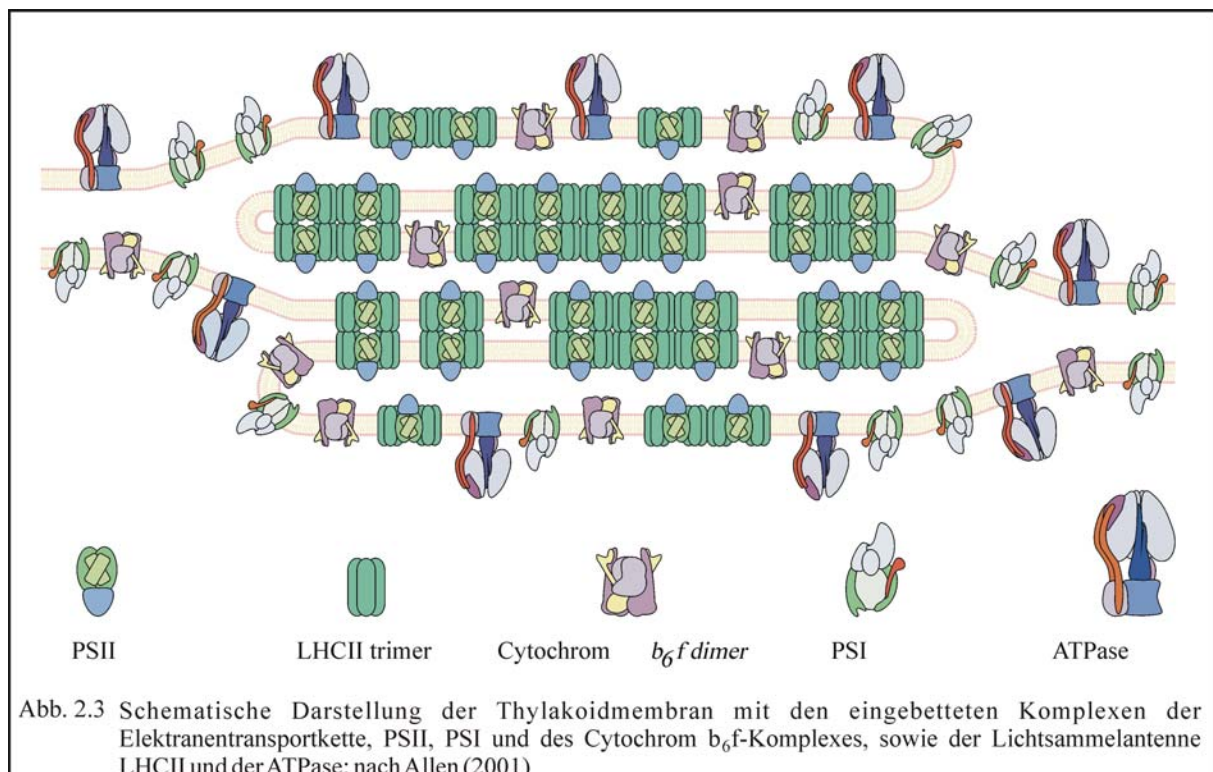


Er wird von einer doppelten Hüllmembran umschlossen (Abb. 2.2), die Transporter-Proteine, sowie die Proteine für den selektiven Import enthält. Von den ca. 3100 Proteinen des Chloroplasten sind lediglich 87 Proteine im Chloroplasten und somit der überwiegende Teil im Kern kodiert (Pesaresi et al., 2001).

Daher verfügt der Chloroplast über verschiedene Import-Mechanismen (Vothknecht und Soll, 2003), welche chloroplastidäre Proteine anhand ihrer N-terminalen Transitsequenz erkennen, diese proteolytisch abspalten und das Protein importieren können (Schleiff und Soll, 2000, Fulgosi und Soll, 2001). Die Transitsequenzen chloroplastidärer Proteine besitzen eine konservierte Konsensus-Sequenz, welche von dem Importmechanismus erkannt wird (Soll, 2002).

Die Thylakoidmembran als Ort der photosynthetischen Elektronentransportkette bildet ein dreidimensionales Membrangeflecht (Menke, 1960) und trennt damit das Stroma räumlich von seinem Intermembranraum, dem Lumen, ab. Durch diese räumliche Trennung kann ein Membranpotential aufgebaut werden, welches zur ATP-Synthese verwendet wird (Mitchell, 1975).

Das Stroma des Chloroplasten enthält die Enzyme verschiedener Stoffwechselwege wie die der Nitrit-Reduktion, Sulfid-Reduktion, des Calvin-Zyklus und des Oxidativen-Pentose-Phosphat-Weges. Ebenfalls sind dort die Enzyme der Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress wie die Ascorbat-Peroxidase, Thioredoxine und Peroxoredoxine lokalisiert.

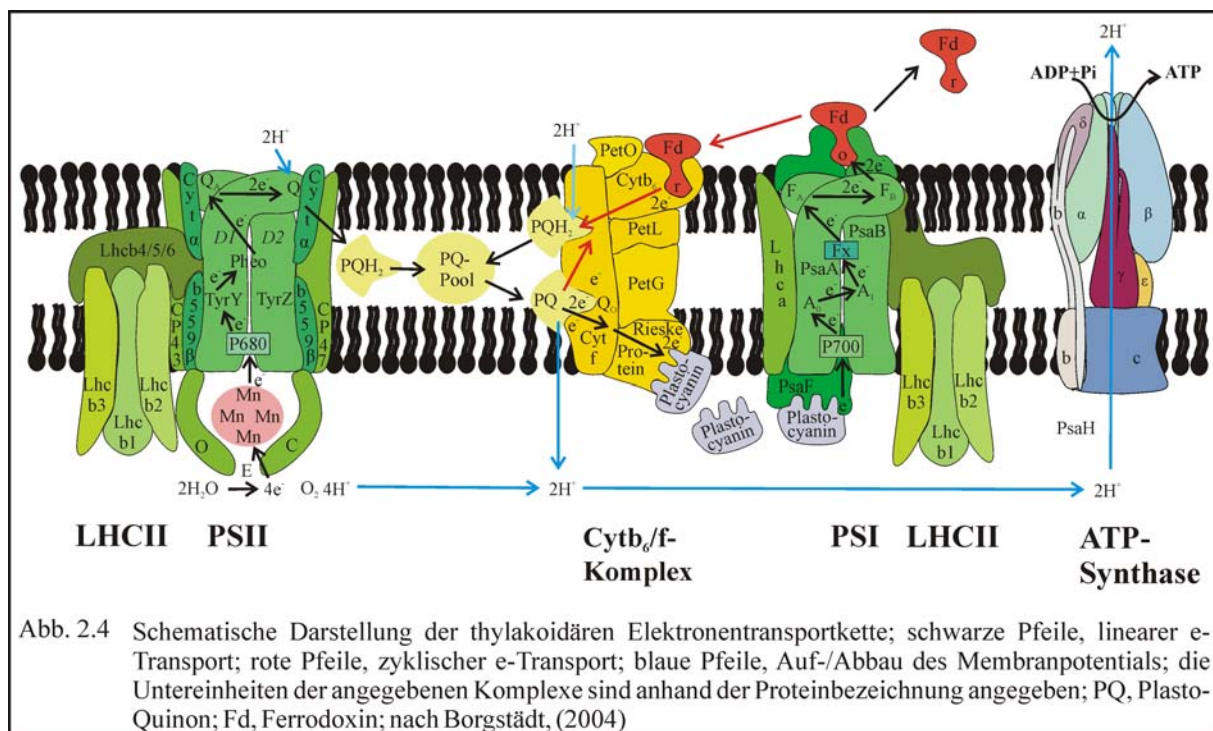


Die Thylakoidmembran höherer Pflanzen enthält die Membrankomplexe der photosynthetischen Elektronen-Transportkette (Abb. 2.3). Sie teilen sich strukturell in die Grana-Thylakoide (Abb. 2.2), Membranstapel, die hauptsächlich PSII und LHCII (Abb. 2.3)

enthalten und die Stroma-Thylakoide (Abb. 2.2), die hauptsächlich PSI, LHCII, Cytb₆/f-Komplex, ATP-Synthase enthalten (Abb. 2.2), auf. Bei Anpassungsreaktionen des Chloroplasten können sich diese beiden Komponenten strukturell verändern (Schmid and Gaffron, 1967) oder in die andere konvertieren (Allen und Forsberg, 2001, Allen et al., 2003b). Die cyanobakterielle Thylakoidmembran enthält neben der photosynthetischen Elektronentransportkette ebenfalls die der Respiration.

2.3.1 Der thylakoidäre Energietransport

Die Thylakoidmembran besteht aus einer doppelten Lipidschicht, welche den Intramembranraum, das Lumen, von dem Stroma abtrennt. Die Komplexe der Photosynthese sind dabei in die Membran eingebettet und durchspannen diese mit ihren Membrandomänen.



Die Elektronentransportkette der Photosynthese wird durch die drei Komplexe PSII, Cytb₆f und PSI gebildet, welche durch die löslichen Komponenten Plastoquinon und Plastocyanin miteinander verbunden sind (Hervas et al., 2003) (Abb. 2.4).

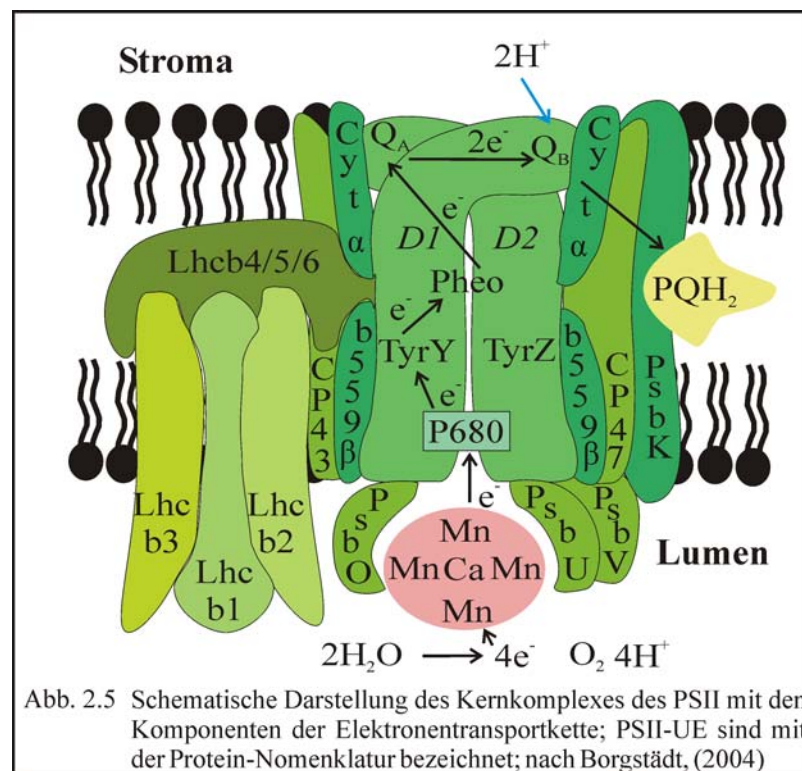
2.3.1.1 LichtsammelkomplexII

Die als LHCII bezeichneten Lichtsammelkomplexe untergliedern sich in Subkomplexe, die aus Chlorophyll a/b und Carotinoid bindenden Proteinen bestehen. In ihrer trimeren Form existieren in *Arabidopsis* mindesten vier verschiedene LHCII-Subkomplexe, ein Lhcb(1)₃ Homotrimer und Lhcb(1)₂-Lhcb(2)- sowie Lhcb-(1)₂-Lhcb(3)- und Lhcb1-Lhcb2-Lhcb3-Heterotrimeren (Jackowski et al., 2001), deren Proteine von fünf Lhcb1-, vier Lhcb2- und einem Lhcb3-Gen kodiert werden. Diese lagern sich in zwei Ebenen um PSII an (Spangfort und Andersson, 1998). Die innere Schicht besteht aus Lhcb(1)-Lhcb(2)- und die äußere Schicht aus Lhcb1-Lhcb2-Lhcb3-Heterotrimeren (Jackowski und Pielucha, 2001). Die äußere Schicht kann bei Lichtanpassungsprozessen dissoziieren/assoziiieren (Larsson et al., 1987) (siehe 2.4.2 Die „State Transition“). Durch Kristallisierung und Röntgenstrukturanalyse konnte die Struktur eines LHCII-Proteins von *Pea mays* bis auf eine Auflösung von 3,8Å aufgeklärt werden (Kühlbrandt et al., 1994). Dieses durchspannt dreimal mit einer α -Helix die Thylakoidmembran und enthält zwei Carotinoide, sieben Chlorophyll a-, und fünf Chlorophyll b-Moleküle. Die Sammlung und Weiterleitung der auftreffenden Lichtenergie erfolgt durch die Carotinoid- und Chlorophyll-Moleküle, die die Energie durch Dexter-Elektronenaustausch (Carotinoid zu Chlorophyll) oder Förster-Resonanz-Verkehr (Chlorophyll zu Chlorophyll), (Naquvi, 1980) zum aktiven Zentrum der Photosysteme weiterleiten.

2.3.1.2 PhotosystemII

PhotosystemII besteht aus den Kernproteinen D1 und D2, welche die redox-aktiven Komponenten als Liganden beinhalten (Trebst, 1986, Michel und Deisenhofer, 1988) (Abb. 2.5). Die Struktur des PSII wurde in *Thermosynechococcus elongatus* bis zu einer Auflösung von 3,5 Å (Ferreira et al., 2004) durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt. Die Komponenten der primären Elektronentransportkette sind in dem PSII-Reaktionszentrum bestehend aus D1- und D2-Protein, Cytb₅₅₉ und PsbI lokalisiert (Hankammer et al., 1997), (Abb. 2.5). D1 und D2 bilden einen Heterodimer, der von den Antennenproteinen CP43 und CP47 umschlossen wird (Ferreira et al., 2004) (Abb. 2.5). Diesem Komplex sind die beiden UE des Cytb₅₅₉, PsbK und die übrigen PSII-Proteine angelagert (Abb. 2.5).

Die Proteine PsbL, PsbM und PsbT des PSII sollen an der Dimer-Bildung des PSII beteiligt sein (Ferreira et al., 2004), während die Proteine PsbK, PsbJ, PsbN und PsbZ möglicherweise in der Carotinoid-Bindung assoziiert mit CP43 involviert sind (Ferreira et al., 2004). Die beiden Proteine PsbI und PsbX stabilisieren die peripheren Chlorophylle des D1- und D2-Proteins (Ferreira et al., 2004). Der Wasser spaltende Komplex (OEC) mit seinen Proteinen PsbO, PsbU und PsbV ist an der lumenalen Seite des PSII lokalisiert und dem C-Terminus des D2-Protein angelagert (Abb. 2.5). Er bildet eine Kappe über dem aus Mn_3CaO_4 und einem vierten äußeren Mn bestehenden Wasser spaltendem Zentrum (Ferreira et al., 2004).

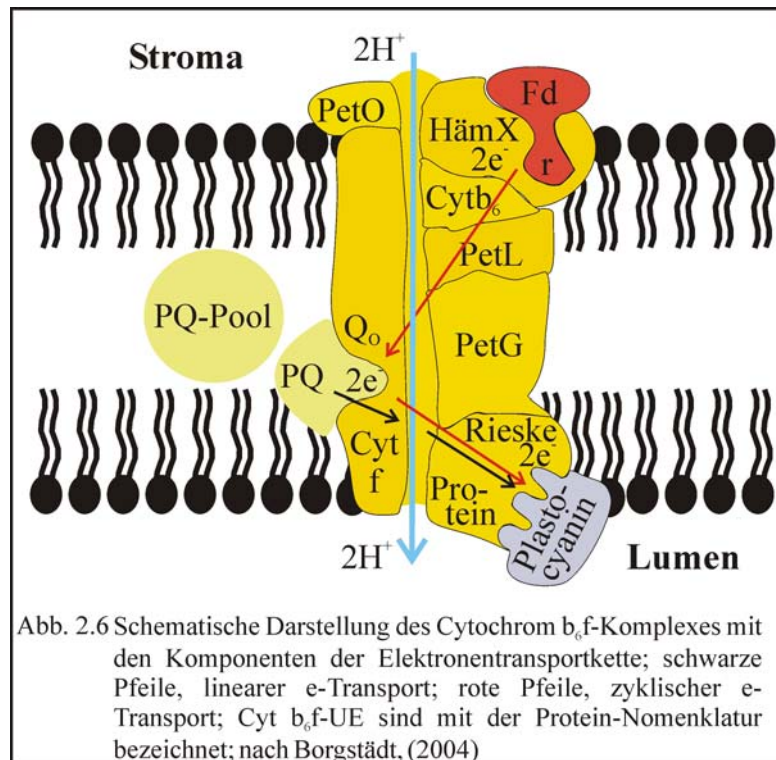


Die Funktion PSII ist die einer H_2O -Plastoquinon-Oxidoreduktase. Für diesen endothermen Prozess wird die Energie des Sonnenlichtes genutzt. Die Lichtquanten werden durch die Chlorophylle der LHCII-Proteine über CP43 oder CP47 auf das zentrale Chlorophyll a-Dimer, P_{680} , übertragen. Durch die Anregung im blauen Wellenlängenbereich, 480nm, delokalisiert das Chlorophyll a- π -Elektron und geht in den Singulett 2 (S₂)-Zustand über. Diesen verlässt es jedoch bereits wieder nach 0,1ps unter Emission von thermischer Energie und geht in den stabileren Singulett 1 (S₁)-Zustand über, welcher ebenfalls durch Absorption von hellrotem Licht, 680nm, erreicht werden kann (Smith et al., 2002).

In seinem S1-Zustand besitzt das π -Elektron ein stark negatives Potential von E_M -0,7 bis -0,9 eV, so dass es auf den primären Elektronenakzeptor TyrY übertragen werden kann (Barber, 2003). Es kann ebenfalls unter Emission von Fluoreszenz in seinen Grundzustand überführt werden. Bei einer Photosynthese im Gleichgewichtszustand tritt dies in ca. 8% aller Anregungen auf. Das Maß an Fluoreszenz wird als Parameter für den Zustand der Elektronentransportkette eingesetzt (Anderson et al., 1997). Das Elektron kann ebenfalls in einen Triplett 1 (T1)-Zustand übergehen. Hierbei kommt es zu einer Radikalbildung des P_{680} , welches das Elektron unkontrolliert auf weitere Moleküle überträgt. Auf diese Möglichkeit und evoluierte Schutzmechanismen der Pflanze wird in Abschnitt 2.4 eingegangen. Nach Abgabe des delokalisierten π -Elektrons wird das oxidierte P_{680} durch ein Tyrosin des D1-Proteins (TyrY) reduziert, welches wiederum durch ein Mangan-Ion des wasserspaltenden Komplexes, OEC, re-reduziert wird (Nugent et al., 2001, Ferreira et al., 2004) (Abb. 2.5). Dieser Komplex enthält drei Mangan- und ein Calcium-Ion (Ferreira et al., 2004) und spaltet nach viermaliger Anregung des P_{680} und Elektronenübertragung Wasser zu Sauerstoff (Hill, 1937) und Protonen (Steffen et al., 2001). Von Phäophytin aus geht das Elektron auf Q_A , einem Plastoquinon über, welches dann das Elektron über einem Eisen als Transmitter auf Q_B überträgt (Abb. 2.5), (Ferreira et al., 2004). Nach zweimaliger Reduktion löst sich Q_B aus seiner Bindestelle am PSII und geht unter Aufnahme zweier Protonen aus dem Lumen als Plastohydroquinol in den PQ-Pool über (Abb. 2.4). Die nun unbesetzte Q_B -Bindestelle wird wiederum von einem Plastohydrochinon besetzt. Die Elektronentransportkette transferiert die Elektronen von der stromalen Wasserspaltung hin zur lumenalen Protonen-Aufnahme durch Q_B (Abb. 2.5).

2.3.1.3 Der *Cytb₆/f*-Komplex

Der *Cytb₆/f*-Komplex besteht aus vier großen Untereinheiten (Cytochrom b_6 , Untereinheit IV, Cytochrom f, Rieske Fe-S Cluster) und fünf kleinen Untereinheiten (PetG, L, M, N, O) (Stroebel et al., 2004) (Abb. 2.6). Er bildet die Schnittstelle zwischen PSI und PSII und fungiert als Sensor für den Redox-Zustand des PQ-Pools, der das Verhältnis von linearem zu zyklischem Elektronentransport reguliert (Vallon et al., 1991; Finazzi et al., 1999; Finazzi et al., 2001, Finazzi et al., 2002; Stroebel et al., 2004).



2.3.1.3.1 Der lineare Elektronentransport

Bei dem linearen Elektronentransport bindet Plastohydrochinol unter Übertragung zweier Protonen in das Stroma an die Q_0 -Bindestelle (Crofts et al., 1983, Moss und Bendall, 1984). Die beiden übertragenen Protonen tragen zur Bildung des Protonengradienten und damit zur späteren Generierung von ATP durch die ATP-Synthase bei (Sacksteder et al., 2000). An der Q_0 -Bindestelle wird Plastohydroquinol zu Plastohydrochinon oxidiert und geht anschließend wieder in den PQ-Pool über. Die Elektronen werden nun einzeln über Cyt f und dem Rieske-Protein, welches ein 4Fe-4S-Zentrum enthält, auf den zweiten mobilen Energieträger, Plastocyanin übertragen (Abb. 2.6). Dieser löst sich nach doppelter Reduktion von seiner Bindestelle am Cyt b_6/f -Komplex und diffundiert zu PSI (Hope, 2000) (Abb. 2.3).

2.3.1.3.2 Der zyklische Elektronentransport

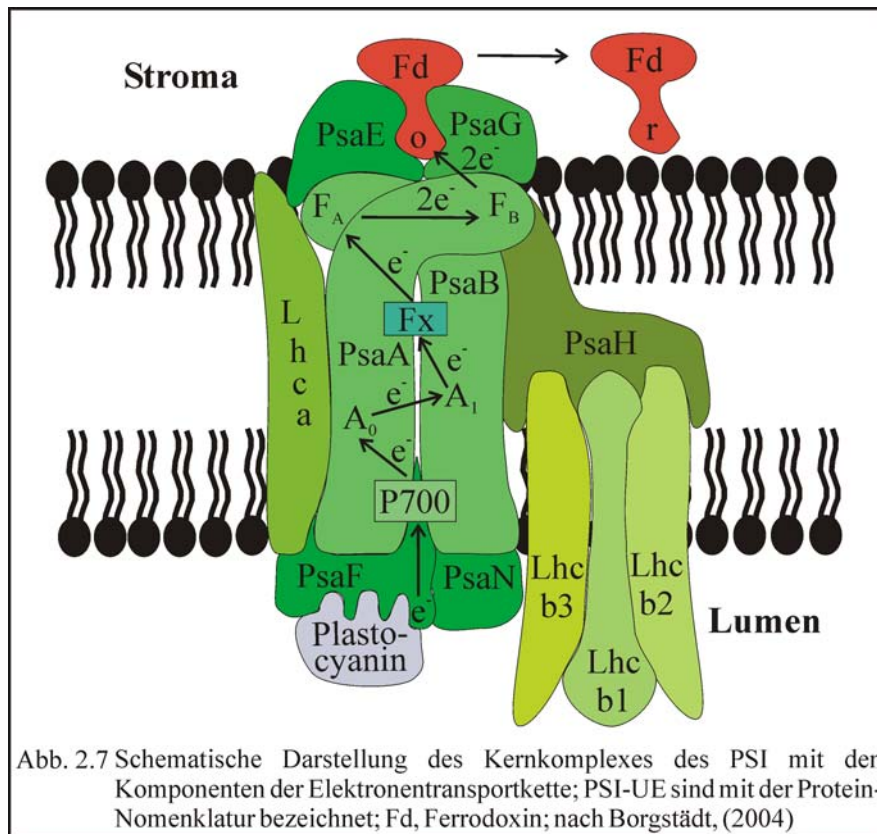
Durch Bindung des von PSI reduzierten Fd an der stromalen Seite des Cytb₆/f-Komplexes werden die Elektronen auf HämX übertragen (Stroebel et al., 2004) (Abb. 2.6). Nach Übertragung auf die Q₀-Bindestelle kommt es zu einem Protonen-Transport aus dem Thylakoid-Lumen in das Stroma (Finazzi et al., 2001, 2002). Die Elektronen werden anschließend wiederum auf Cytf, dem Rieske-Protein und Plastocyanin übertragen (Abb. 2.6). Bei dem zyklischen Elektronentransport wird durch den Protonentransport das Membranpotential der Thylakoidmembran für die ATP-Synthese erhöht.

2.3.1.4 Photosystem I

PSI besteht homolog zu PSII aus zwei zentralen Proteinen PsaA und PsaB, die einen Heterodimere bilden und die Komponenten der Elektronentransportkette enthalten (Abb. 2.7). Die Struktur des PSI wurde von (Jordan et al., 2001) in *Thermosynechocystis elongatus* mit einer Auflösung von 2,5Å aufgeklärt.

Neben vielen strukturellen und stabilisierenden Untereinheiten bilden die Untereinheiten PsaN und PsaF die PC-Bindestelle, sowie PsaE und PsaG die Fd-Bindestelle (Abb. 2.7).

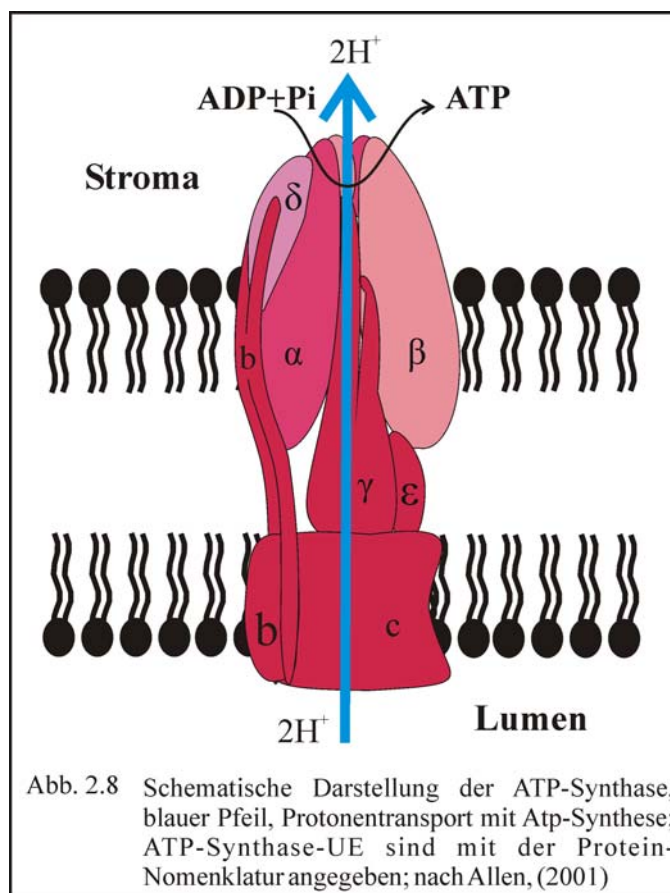
PSI fungiert als Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreductase. Die Lichtenergie für diesen Prozess wird durch die LHCI-Proteine (Byrdin et al., 2002) und dem an PSI assoziierten Teil der mobilen LHCI-Proteine (Lunde et al., 2000) zu dem zentralen Chlorophyll a-Dimer P₇₀₀ transferiert (Byrdin et al., 2002). Durch Absorption im blauen Lichtbereich, 480nm und im dunkelrotem Lichtbereich, 700nm, geht es in seinen S₂ bzw. S₁-Zustand über (Ikegami et al., 2000). Da die Energie des 700nm Lichtes nicht für das PSII ausreicht, kann durch Belichtung mit dunkelrotem Licht gezielt PSI angeregt werden.



Das durch die Anregung des P_{700} delokalisierte π -Elektron wird auf A_0 , einem Chlorophyll *a*-Monomer und A_1 , einem Phylloquinon übertragen (Abb. 2.7). Das oxidierte P_{700} wird durch die Elektronen des an PSI angelagerten Plastocyanin re-reduziert (Fromme et al., 2003). Von A_0 aus wird das Elektron über die 4Fe-4S-Zentren der Proteine F_x , F_A und F_B (Ikegami et al., 2000) auf den mobilen Elektronenakzeptor Ferredoxin (Fd) übertragen. Fd bindet mit seinem 4Fe-4S-Zentrum zwei Elektronen und löst sich nach Reduktion von seiner PSI-Bindestelle (Fromme et al., 2003), (Abb 2.7). Das reduzierte Ferredoxin (Fd_{red}) wird anschließend als Elektronen-Donor für verschiedene Synthese-Reaktionen genutzt. Diese Reaktionen umfassen die Reduktion von $NADP^+$ durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase, die Reduktion von Nitrit und Sulfid, sowie die Regeneration von Thioredoxin und die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff in der Mehler-Reaktion.

2.3.1.5 ATP-Synthase

Das während der Photosynthese aufgebaute elektrochemische Potential $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ wird durch die thylakoidäre ATP-Synthase zur Generierung von ATP genutzt (Mitchell, 1975). Das elektrochemische Potential kann dabei bis zu -20 kJ/mol erreichen (Avron, 1987). Die chloroplastidäre ATP-Synthase (Senior et al., 2002) gehört zur Komplexgruppe der ATPasen, welche ebenfalls in den Membranen des Mitochondriums (Godinot und Di Pietro, 1986) und der Vakuole (Kluge et al., 2003) lokalisiert sind (Mccarty, 1992). Sie besteht aus zwei Subkomplexen, dem CF_1 -Komplex, dem Kopplungsfaktor und dem CF_0 -Komplex, dem Membran durchspannenden Holoenzym (Abb. 2.8).



Der CF_0 -Komplex besteht aus vier UE, die einen Kanal durch die Thylakoidmembran bilden. Der CF_1 -Komplex besteht aus fünf verschiedenen UE, α - ϵ , wobei die α - und die β -UE jeweils dreifach vorhanden sind (Abb. 2.8). Der CF_1 -Komplex ist an der Stroma-Seite der Thylakoidmembran mit dem CF_0 -Komplex assoziiert. Durch Diffusion dreier Protonen durch die ATP-Synthase dreht sich der aus 3α - und 3β -UE bestehende Kopf des CF_1 -Komplex um 360° und generiert dabei aus $\text{ADP} + \text{P}_i$ ATP (Sabbert et al., 1996; Senior et al., 2002).

2.3.2 Der Calvin-Zyklus und der oxidative Pentose-Phosphat-Weg

Die 13 Enzyme des Calvin-Zyklus sind im Stroma des Chloroplasten lokalisiert und katalysieren den Aufbau energiereicher Kohlenwasserstoff-Verbindungen aus den in der Photosynthese gewonnenen Energieäquivalenten $\text{NADPH}+\text{H}^+$ und ATP (Poolman et al., 2003). Das zentrale Enzym des Calvin-Zyklus ist die Rubisco, welche die Bindung von CO_2 an Ribulose-1,5-bisphosphat katalysiert, aber auch eine Oxygenase-Aktivität besitzt (Wingler et al., 2000). Durch die CO_2 -Fixierung entstehen aus der C_5 -Verbindung Ribulose-1,5-bisphosphat zwei C_3 -Verbindungen, 2x 3-Phosphoglycerinsäure (3PGA). Diese werden durch Reduktion mit $\text{NADPH}+\text{H}^+$ und durch ATP zu Glycerinaldehyd-3-phosphat umgesetzt. Glycerinaldehyd-3-phosphat kann nun zu dem Speicherstoff Stärke umgesetzt, in den Metabolismus eingeschleust oder in dem Calvin-Zyklus wieder zu Ribulose-1,5-bisphosphat aufgebaut werden (Poolman et al., 2003). Der so in dem Calvin-Zyklus reduzierte Kohlenstoff wird zur Synthese des pflanzlichen Speicherstoffes Stärke genutzt.

Das durch die Oxygenase-Aktivität gebildete Glycollat-P wird in dem endothermen Prozess der Photorespiration in den Peroxisomen zur Generierung von Wasserstoffperoxid genutzt und als Glycerat wiederum in den Calvin-Cyclus integriert (Douce et al., 1999, Wingler et al., 2000, Corpas et al., 2001).

Die Enzyme des Oxidativen-Pentose-Phosphat-Weges sind ebenfalls im Stroma lokalisiert, können aber z.T. ebenfalls im Cytosol lokalisiert sein (Kruger und von Schaewen, 2003). Der Oxidative-Pentose-Phosphat-Weg wird zur Verdauung der im Calvin-Zyklus generierten Stärke genutzt. Im Gegensatz zu dem Calvin-Cyclus wird bei dem Oxidative-Pentose-Phosphat-Weg die C_6 -Verbindung Glucose-6-Phosphat unter Freisetzung von CO_2 und Reduktion zweier NAD(P)^+ zu Ribulose-5-phosphat und zweier $\text{NAD(P)H}+\text{H}^+$ umgesetzt. Die entstandenen C_5 -Verbindungen können durch Transketolasen direkt in die Glykolyse übergehen, in dem Oxidative-Pentose-Phosphat-Weg oder die synthetisierten Verbindungen zur Regeneration von Glucose-6-phosphat genutzt werden. Nach Poolmann et al., (2003) sind beide im Stroma lokalisierten Stoffwechselwege eng miteinander verbunden und nutzen z.T. dieselben Enzyme. Sowohl Enzyme des Calvin-Zyklus als auch des Oxidative-Pentose-Phosphat-Weg unterliegen einer Redox-Regulation durch das Thioredoxin-System (Scheibe, 1994).

2.3.3 Die reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)

Während der Photosynthese kommt es durch die hohen Potentiale der angeregten Elektronen zur Ladungsübertragung auf Sauerstoff, der Mehler-Reaktion (Mehler, 1951). Die Konzentration der gebildeten reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) werden von Sensoren detektiert und induzieren Signal-Kaskaden und Regulatoren (Baier und Dietz, 1999).

Bei einer Störung der Photosynthese durch veränderte Umweltfaktoren kommt es zu einer Steigerung der Synthese von reaktiven Sauerstoff Spezies die als Radikale Moleküle reduzieren und degradieren.

Ein Ort der Entstehung reaktiver Sauerstoff Spezies ist PSII. Bei einer Störung der Elektronenübertragung des PSII geht das Chlorophylla-Dimer des Reaktivenzentrums, P₆₈₀, nach Anregung in seinen stabilen Triplett-Zustand über und reduziert die Hydroxyl-Gruppen assoziierter Moleküle zu Superoxiden (Badger et al., 2000). Ebenfalls kann an dem wasserspaltenden Komplex während des S₃-Zustandes (Wydrzynski et al., 1989) und an der Akzeptor-Seite des PSII (Q_B) durch Elektronen-Übertragung auf O₂ ROS generiert werden (Elstner und Frommeyer, 1979).

Der zweite Ort der Bildung von ROS ist die Donor-Seite des PSI (Asada, 1999). Durch direkte Elektronenübertragung am PSI (Robinson und Gibbs, 1982) oder durch Ferredoxin (Misra und Fridovich, 1971) wird Sauerstoff zu Superoxid reduziert. Das entstandene Superoxid kann durch die Superoxid-Dismutase unter Aufnahme zweier Protonen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff umgesetzt werden (Asada, 1999). Das gebildete Wasserstoffperoxid kann anschließend in der Fenton-Reaktion durch zweiwertige Metall-Ionen wie Eisen zu Hydroxyl-Radikalen und dreiwertigem Metall-Ionen umgesetzt werden (Pfannschmidt, 2003).

Die gebildeten ROS können durch Peroxidation Lipide (Wise, 1995, Schraudner et al., 1997), DNA (Lim et al., 1993) und Proteine (Fucci et al. 1983) degradieren oder durch Katalyse von Metall-Ionen den Haber-Weiss-Zyklus durchlaufen (Halliwell and Gutteridge, 1990, Yruela et al., 1996). Besonders die Oxidation der Schwefelbrücken von Cystein und Methionin (Stadtman, 1992, Zusammenfassungen Baier und Dietz, 1999, Ivanov und Khorobrykh, 2004) führt zur Degradierung von Proteinen.

2.4 Die Photoakklimationsprozesse der Photosynthese

Der Redox-Zustand des photosynthetischen Systems hängt von verschiedenen Umweltfaktoren ab. Zwei der wichtigsten Parameter ist die Lichtqualität und -quantität mit denen die Photosysteme versorgt werden und so die Elektronentransportkette mit Energie versorgen. Zur optimalen Versorgung der Photosysteme mit Lichtenergie einhergehend mit der bedarfsorientierten Produktion von Reduktions- und Energieäquivalenten kommt es zur ständigen Anpassung des Systems an wechselnde Umweltbedingungen. Diese als Photoakklimation bezeichneten Prozesse schützen die Photosysteme vor der Generierung und Schädigung durch ROS (Barber und Andersson, 1998).

Die vermehrte Versorgung PSII mit Lichtenergie führt zu einer Verschiebung des Redox-Verhältnisses des PQ-Pools hin zu Plastohydrochinol. Da die Aktivität PSI nicht mit ansteigt, verbleibt der PQ-Pool reduziert. Diese Imbalance führt zu einer Elektronenübertragung auf Sauerstoff und damit zur Generierung von ROS.

Die vermehrte Versorgung PSI mit Lichtenergie führt zu einer Verschiebung des Redox-Verhältnisses von Ferredoxin hin zu seiner reduzierten Form. Bei anhaltender Reduktion kommt es in Mangel an Elektronen-Akzeptoren zu einer Steigerung der Übertragung auf Sauerstoff und damit zur Generierung von ROS.

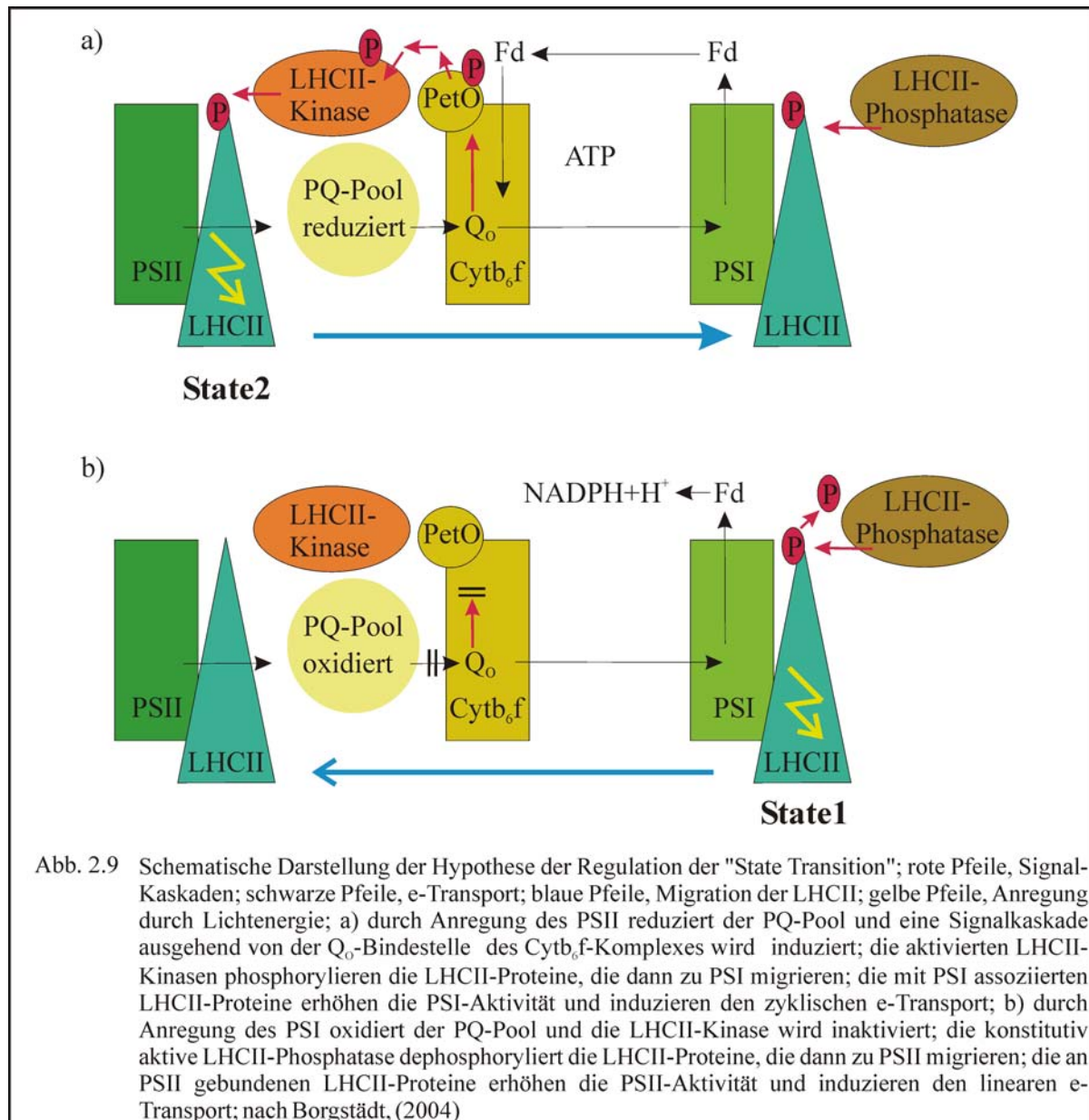
Zur Prävention und Detoxifikation dieser Zustände besitzt das photosynthetische System verschiedene Schutzmechanismen, welche bei Veränderung des Redox-Gleichgewichtes dieses wieder ausgleichen. Diese Anpassungsmechanismen können nach ihrer zeitlichen Abfolge in kurzzeitige und langzeitige Anpassungsmechanismen eingeteilt werden (Pfannschmidt et al., 2003).

Die kurzzeitigen Anpassungsmechanismen werden z.T. durch ihre charakteristische RT-Chlorophyll-Fluoreszenz-Abnahme (Quenching) gekennzeichnet. Die drei Arten der nicht-photosynthetischen Chlorophyll-Fluoreszenz-Abnahme (NPQ) sind die Fluoreszenz-Abnahme q_E , durch den Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus, q_I , durch einem ebenfalls dem Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus zugeordneten Mechanismus innerhalb des PSII und q_T , durch die „State Transition“ (Müller et al., 2001). Ein weiterer Prozess, die Photoinhibition, ist die Reaktion der Pflanze auf Starklicht. Durch gebildete ROS kommt es zur Degradierung der PSII-UE D1, die modifiziert und anschließend durch den „PSII-Repair Cycle“ regeneriert wird (Kruse, 2001). Das Thioredoxin-System als Sensor für den Redox-Zustand von Ferredoxin reguliert ebenfalls die Photosynthese durch Aktivierung/Deaktivierung verschiedene metabolischer Enzyme (Scheibe, 1994).

Als Schutz gegen schon entstandenen ROS-Stress übertragen verschiedene Peroxidasen die radikalen Elektronen auf Sauerstoff und generieren Wasser (Dietz, 2003). Die Anpassungsmechanismen an langfristig veränderte Lichtbedingungen haben dagegen einen Umbau bzw. Erhöhung/Erniedrigung der photosynthetischen Kapazitäten zur Folge (Allen und Pfannschmidt, 2000). Die verschiedenen Sensor- und Regulator-Systeme agieren nicht unabhängig voneinander, sondern sind durch verschiedenen Prozesse miteinander vernetzt.

2.4.1 Die „State Transition“

Der Prozess der „State Transition“ wurde erstmals von Bonaventura und Myers, (1969) und Murata, (1969) identifiziert. Als Anpassung auf wechselnde Lichtbedingungen kommt es zu einer Migration von Teilen der LHCII-Proteine zwischen den Photosystemen. Die Anzahl der migrierenden LHCII-Proteine unterscheidet sich dabei zwischen den Organismen. In höheren Pflanzen migrieren zwischen 15 und 20% der LHCII-Proteine (Allen, 1992), in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* dagegen bis zu 85% (Delosome et al., 1996). Die Phycobilisomen enthaltenden Cyanobakterien besitzen einen vergleichbaren Prozess (Zusammenfassung von Thor et al., 1998, Mullineaux, 2001), dessen Mechanismus sich aber von dem höheren Pflanzen und Algen unterscheidet.



Ausgehend von einer vermehrten Versorgung des PSII mit Lichtenergie kommt es zu einer Reduktion des PQ-Pools. Dieser Zustand induziert eine Signal-Kaskade, an deren Ende die Migration der LHCII von PSII zu PSI steht (Allen et al., 1981) und der als State2 bezeichnet wird (Barber, 1982) (Abb. 2.9, a).

Die verstärkte Reduktion des PQ-Pools bewirkt die häufige Bindung von Plastoquinon an die Q_o-Bindestelle des Cytb₆/f-Komplexes (Vener et al., 1995, Vener et al., 1997, Zito et al., 1999, Finazzi et al., 2001). Diese Bindung induziert eine bislang unbekannte Kinase, die die Cytb₆/f-UE PetO phosphoryliert (Hamel et al., 2000) (Abb.2.9, a). Die Phosphorylierung von petO aktiviert wiederum eine Kinase-Kaskade mit LHCII als Endsubstrat (Bennett, 1977, Bennett, 1979, Allen et al., 1981, Telfer et al., 1983, Gal et al., 1997, Hou et al., 2003, Aro und Ohad, 2003).

In *Arabidopsis thaliana* wurden mit den „Thylakoid Associated Kinases“, TAK (Snyders und Kohorn, 1999), Mitglieder dieser Kinase-Kaskade identifiziert. In *Chlamydomonas reinhardtii* wurde mit *stt7* eine Kinase identifiziert, die eine UE des migrierenden LHCII (P11) phosphoryliert (Depege et al., 2003). Der Mechanismus der Signaltransduktion und die LHCII-Kinasen in höheren Pflanzen sind dagegen noch unbekannt. In Folge von Starklicht-Bedingungen kommt es zu einer Hemmung der LHCII-Kinase durch Reduktion von Thiolresten mit Thioredoxin als Reduktant (Rintamäki et al., 2000, Martinsuo et al., 2003).

Die phosphorylierten LHCII lösen sich unter Monomerisierung von PSII und migrieren zu PSI (Fork und Satoh, 1986). Mit PsaH wurde die LHCII-Bindestelle des PSI von Lunde et al., (2000) in *Arabidopsis thaliana* identifiziert.

Die molekularen Grundlagen dieses Prozesses sind noch ungeklärt. Nach einer Hypothese von Barber (1986) beruht die Ablösung der phosphorylierten LHCII von PSII und Migration zu PSI auf den elektromagnetischen Abstoßungskräften der negativen Phosphatgruppen. Nach einer Hypothese von Allen (2003b) bewirkt die Anziehung der unbesetzten PSI-LHCII-Bindestelle PsaH diesen Prozess.

Die Migration des LHCII vollzieht sich in den Randbereichen der PSII enthaltenen Grana-Thylakoiden zu den PSI-enthaltenen Stroma-Bereichen der Thylakoid-Membran (Allen, 2003b).

Die vermehrte Versorgung des PSI mit Lichtenergie führt zu einer Oxidation des PQ-Pools. Ein Gleichgewichtszustand der photosynthetischen Energieversorgung ist dann erreicht, wenn die induzierte Kinase-Aktivität der Aktivität der konstitutiven LHCII-Phosphatase (Silverstein et al., 1993) entspricht.

Bei vermehrter Energieversorgung des PSI konvertiert dieser Prozess (State1), (Abb.2.9, b). In Folge vermehrter PSI-Aktivität kommt es zu einer Oxidation des PQ-Pools und einem Abbruch der LHCII-Phosphorylierungs-Kaskade (Allen et al., 1981) (Abb. 2.9, b). Da die Aktivität der Phosphatase höher ist als die der Kinase, lösen sich die dephosphorylierten LHCII von PSI und migrieren zu PSII. Die erhöhte Lichtsammelkapazität führt zu einer vermehrten Ladungstrennung an PSII und damit zu einer Reduktion des PQ-Pools (Haldrup et al., 2001).

Neben lichtbedingten Veränderungen des Redox-Zustandes des PQ-Pools kann dieser auch durch andere Faktoren beeinflusst werden (Hoefnagel et al., 1998). Die Mechanismen dieser Veränderungen sind weitgehend unbekannt, doch konnten durch Mutaten-Analysen ein Einfluss des NADH(P)H+H⁺ zu ATP-Verhältnisses auf den Prozess der „State Transition“ beobachtet werden. Bei einem zellulären NADH(P)H+H⁺-Bedarf kommt es zur Induktion von State1. Durch die erhöhte Energieversorgung des PSII kommt es zu einer Steigerung des linearen Elektronentransportes (Abb. 2.9 b). Das gebildete Fd_{red} wird durch die NADH(P)H-Fd-Reduktase zur Synthese von NADH(P)H+H⁺ genutzt.

Bei einem erhöhten ATP-Bedarf wird State2 induziert. Dieses führt zu einer erhöhten Energieversorgung des PSI und einer Steigerung des zyklischen Elektronentransportes. Das gestiegene Membranpotential wird durch die ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt. Die Schalter-Funktion zwischen zyklischen und linearen Elektronentransport wird hierbei dem Cytb₆f-Komplex zugeordnet (Vallon et al., 1991; Finazzi et al., 1999; Finazzi et al., 2001, Finazzi et al., 2002; Stroebel et al., 2004).

Zur Identifizierung von „State Transition“-Mutanten wurden in *Chlamydomonas reinhardtii* (Kruse et al., 1999, Fleischmann et al., 1999) und in *Synechocystis PCC6803* (Emlyn-Jones et al., 1999) „Screening“-Verfahren entwickelt, die auf RT-Chlorophyll-Fluoreszenz-Spektrometrie beruhen. Die Migration der Lichtsammelkomplexe zwischen den Photosystemen kann mit dieser Methode als Ab-/Zunahmen der Fluoreszenz detektiert werden (Murata, 1969, Bonaventura und Myers, 1969, Lunde et al., 2000). Die Abnahme der Fluoreszenz bei State2-Bedingungen wird als Teil der nicht photosynthetischen Fluoreszenz-Abnahme mit qT bezeichnet (Jensen et al., 2000).

2.4.2 Der Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus

In folge von Starklicht-Bedingungen kommt es zu einer vollständigen Reduktion des PQ-Pools, und einer Hemmung der „State Transition“ durch das Thioredoxin-System. Die Hemmung der Elektronentransportkette induziert am PSII den Triplett-Zustand des P₆₈₀ und die Generierung von ROS (2.3.4). Damit einhergehend kommt es in Mangel an ADP für die ATP-Synthase zu Anreicherung von Protonen in dem Thylakoid-Lumen, die zu einer Ansäuerung führen. Wird ein pH-Wert von 5,8 (Kramer et al., 1999) unterschritten, bindet die Violaxanthin-De-Epoxidase (VDE) an die Thylakoidmembran und wird durch Ascorbinsäure zu seiner aktiven Form reduziert.

Diese katalysiert die Umwandlung von Violaxanthin zu Antheraxanthin und Zeaxanthin das in LHCII-Proteine und PsbD integriert wird (Verhoeven et al., 1999).

Die überschüssige Anregungsenergie kann nun als Teil der nicht photochemischen Fluoreszenz-Abnahme (NPQ) durch Zeaxanthin in thermische Energie umgesetzt werden. Der Nachweis für einen Zusammenhang zwischen dem Violaxanthin/Zeaxanthin-Zyklus und der NPQ gelang Niyogi et al., (1997) mit der Identifizierung von *Chlamydomonas reinhardtii* VDE-Mutanten durch Identifizierung in einem „Video imaging-Screening“ gegen ein verändertes NPQ. Dieser Teil des NPQ wird als energieabhängiger Mechanismus qE bezeichnet (Briantais et al., 1979). Die neben der kurzzeitige Fluoreszenz-Abnahme qE existierenden langzeitigen Fluoreszenz-Abnahme qI geht auf einen nicht näher identifizierten Effekt des Violaxanthin/Zeaxanthin-Zyklus innerhalb des PSII zurück (Niyogi et al., 1997, Färber et al., 1997, Müller et al., 2001). PSII wird durch anhaltenden Lichtstress selbst bei maximalem „Repair Cycle“ photoinhibiert (Laiska und Oja, 2000). Die Inhibition kann aber während einer anschließenden Dunkelphase wieder langsam relaxieren (Müller et al., 2001).

In Pflanzen mit einer hohen Zeaxanthin- und Antheraxanthin-Konzentration konnte ein steigendes qI detektiert werden (Demming-Adams et al., 1996), welches auf einen Zusammenhang mit dem Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus hinweist (Müller et al., 2001). Eine weitere Schutzfunktion von Zeaxanthin beinhaltet die Detoxifizierung von ROS, besonders Lipid-Peroxidation und hat somit eine Schutzfunktion gegen Photodegradierung (Schindler und Lichtenthaler, 1996).

2.4.3 Der „PSII-Repair-Cycle“ und die Photoinhibition

Bei Starklicht-bedingter vollständiger Reduktion des PQ-Pools kommt es neben der Induktion des Violaxanthin/Zeaxanthin-Zyklus (2.6.3) am PSII zu einer vermehrten ROS-Bildung und damit zur Degradierung des D1-Proteins (Mattoo et al., 1984). Das degradierte D1-Protein wird anschließend im „PSII-Repair-Cycle“ gegen ein neu synthetisiertes D1-Protein ausgetauscht (Kyle et al., 1984, Ohad et al., 1984). In einem ersten Schritt monomerisiert das dimere PSII (Barbato et al., 1992, Aro et al., 1993, Hankammer et al., 1997) und das assoziierte Lichtsammelantennen-Protein CP43 wird aus dem Verbund entlassen (Zhang et al., 2000). Das verbleibende Reaktionszentrum (RC) migriert durch einen bislang noch unbekanntem Mechanismus aus den Grana in die Stroma-Bereiche der Thylakoidmembran (Mattoo und Edelman, 1987, Kruse, 2001).

In dem Stroma wird die Komplex-Struktur des PSII gelockert, so dass das D1-Protein proteolytisch verdaut werden kann (Barbato et al., 1991). Im Anschluss bindet die psbA-mRNA mit ihren ribosomalen UE an den Komplex und D1 wird synthetisiert (van Wijk et al., 1997, Zhang et al., 2000). Das PSII reassembliert und migriert zurück in den Grana-Bereich, wo CP43 assoziiert (Zhang et al., 2000) und es zu seiner aktiven Form dimerisiert. Mit 30min pro D1-Protein ist die Umsatzrate des „PSII-Repair-Cycle“ die höchste für einen solchen Prozess in Pflanzen (Kruse et al., 2002). Ähnlich der LHCII-Protein-Phosphorylierung werden bei anhaltendem Starklicht durch den reduzierten Zustand des PQ-Pools ebenfalls Serin-/Threonin-Kinasen aktiviert (Schuster et al., 1986, Kruse, 2001), welche die PsbH, PsbB(CP43), PsbA(D1) und PsbD (D2) Proteine des PSII reversibel phosphorylieren (Ikeuchi et al., 1987, Marder et al., 1988, Michel et al., 1988, Race und Hind., 1996). Die Phosphorylierung der PSII-UE soll hierbei als Schutzfunktion für eine wiederholte sofortige Degradierung des D1-Proteins fungieren (Aro et al., 1993, Ebbert und Godde, 1994, Koivuniemi et al., 1995, Rintamäki et al., 1996, Kruse, 2001). In seiner phosphorylierten Form monomerisiert der stabilisierte PSII-Dimer nur langsam (Kruse et al., 1997). Erst bei abnehmender Kinase-Aktivitäten als Folge schwächerer Lichtstärken werden die PSII-Proteine dephosphoryliert (Rintamäki et al., 1996) und der PSII-Monomer kann in den stromalen Bereichen durch den „PSII-Repair-Cycle“ repariert werden (Baena-Gonzales et al., 1999).

2.4.4 Das Thioredoxin-System des Chloroplasten

Das Thioredoxin-System des Chloroplasten fungiert als Sensor für den Redox-Zustand von Ferredoxin (Buchanan, 1984). Während einer aktiven Photosynthese wird durch die photosynthetische Elektronentransportkette am PSI reduziertes Ferredoxin gebildet (2.4.1.4). Durch die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) (Holmgren et al., 1977, Wolosiuk und Buchanan, 1977) wird das Thioredoxin in seinem Disulfid-Zustand unter Aufnahme zweier Protonen durch das Fd_{red} zu seinem Sulfhydryl reduziert (Zusammenfassung, Buchanan 1980). Durch Übertragung der Elektronen und Protonen auf Disulfid-Gruppen von Zielenzymen werden diese durch Thioredoxin aktiviert/deaktiviert (Holmgren, 1985). Dieser Zustand hält solange an, wie durch die Photosynthese Ferredoxin reduziert und somit auch Thioredoxin in seinem Sulfhydryl-Zustand verbleibt.

Bei einem Abbruch der photosynthetischen Elektronentransportkette kehrt sich dieser Prozess um und die Protonen und Elektronen werden von dem Ziel-Enzym zurück auf das Thioredoxin und abschließend auf Sauerstoff unter Generierung von H_2O übertragen (Zusammenfassungen Buchanan, 1980, Scheibe, 1994, Schürmann und Jacquot, 2000).

In den Chloroplasten befinden sich sechs Thioredoxine von denen vier dem m-Typen und zwei dem f-Typen angehören (Buchanan et al., 1978). Die Ziel-Enzyme des Thioredoxin-Systems beinhalten Enzyme unterschiedlicher Stoffwechsel- und Regulationswege des Chloroplasten. Einer positiven Regulation unterliegen die CF1-UE der ATP-Synthase (2.4.1.5) (McKinney et al., 1978), die Phosphatribulokinase, die Seduheptulose-1,7-biphosphatase, die Fructose-1,6-biphosphatase (Nishizawa und Buchanan, 1981) und die Rubisco-Activase (Zhang und Portis Jr., 1999) des Calvin-Zyklus (Schürmann et al., 1976) (2.4.2), die NADP-Malatdehydrogenase des C4-Metabolismus (Scheibe und Anderson, 1981) und die Ferredoxin-Glutamat-Synthase der Stickstoff-Assimilation (Huppe und Turpin, 1994, Lichter und Häberlein, 1998).

Negativ werden die Glucose-6-phosphatdehydrogenase des Oxidativen-Pentose-Phosphat-Weges (2.4.2) (Scheibe und Anderson, 1981) reguliert. Ebenfalls werden Enzyme in anderen Regulationskaskaden beeinflusst wie z.B. die LHCII-Kinase der „State-Transition“ (2.5.5) (Martinsuo et al., 2003), die PTK der chloroplastidären Transkription (2.6.7) (Link, 2003) oder die Translation der psbA-RNA in *C. reinhardtii* (Danon und Mayfield, 1994). Neben Thioredoxin fungiert Glutathion, ebenfalls ein Dithiol als Regulator von Enzymaktivitäten. Durch die Glutathion-Reduktase wird Glutathion unter Oxidation von $NADPH+H^+$ zu seinem Sulfid GSH reduziert. GSH ist ein Reduktant in der Regeneration von Dehydroascorbat (2.6.6) und schützt Proteine vor irreversibler Oxidation ihrer Thiol-Gruppen (Noctor and Foyer, 1998). Weiterhin fungiert es als Donor in der Regeneration von Peroxoredoxinen und Glutaredoxinen (Zusammenfassung Dietz et al., 2003).

2.4.5 Die Antioxidantien des Chloroplasten

Als Endprodukt der Mehler-Reaktion und durch weitere, ungesteuerte Elektronenübertragungen generierte ROS (2.3.4) werden zur Detoxifizierung von verschiedenen Moleküle oxidiert und die Elektronen unter Synthese von Wasser auf Sauerstoff übertragen.

Die Peroxidase, die die meisten im Chloroplasten gebildeten ROS in Form von Wasserstoffperoxid detoxifiziert, ist die Ascorbat-Peroxidase. Sie ist in der Nähe des PSI thylakoidär, aber auch löslich in dem Stroma lokalisiert (Miyake und Asada, 1992, Ogawa et al., 1995, Jespersen et al., 1997). Das in der Mehler-Reaktion gebildete Superoxid kann durch die Superoxiddismutase in Wasserstoffperoxid umgesetzt werden (Asada, 1999) (2.3.4). Die Ascorbatperoxidase katalysiert nun die Reaktion des Wasserstoffperoxides mit Ascorbat, das unter Protonen-Aufnahme mit Ascorbat zu Monodehydroascorbat und Wasser reagiert (Shigeoka et al., 2002, Mallick und Mohn, 2000). Das gebildete Monodehydroascorbat reagiert zu Ascorbat und Dehydroascorbat und kann durch Fd_{red} , 2GSH und Glutaredoxin (Dietz et al., 2003) durch die Dehydroascorbat-Reduktase zu seiner Disulfid-Form und Ascorbat reagieren (Mallick und Mohn, 2000). Dieser Prozess wird auch der Wasser-Wasser-Zyklus genannt und hat neben dem durch die stromale Wasserbildung erhöhten Membranpotential (pseudo-zyklischer Elektronentransport) ebenfalls die Aufrechterhaltung der photosynthetischen Elektronentransportkette zur Folge (Asada, 1999).

Eine weitere Gruppe der Peroxidasen beinhaltet die Gluthation-Peroxidasen (Gpx) und die Thioredoxin-Peroxidasen oder Peroxiredoxine (Prx) (Chae et al., 1994). Beide Gruppen besitzen Mitglieder, welche in dem Chloroplasten lokalisiert sind (Baier und Dietz, 1997, Mullineaux et al., 1998, Horling et al., 2003), und die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette gegen oxidative Degradierung schützen (Mullineaux et al., 1998, Broin et al., 2002, König et al., 2002). Sie zeichnen sich durch eine breite Substrat-Spezifität aus, welche von Wasserstoffperoxid bishin zu Lipid-Hydroperoxide geht (Ursini et al., 1995, Beeor-Tzahar et al., 1995, König et al., 2002). Die enzymatische Effizienz zur Katalyse von Wasserstoffperoxid ist dabei im Vergleich zu der Ascorbat-Peroxidase eher gering (Dietz et al., 2003). Die enzymatische Reaktion beinhaltet die Oxidation des Hydroperoxid-Restes des Substrates mit einer anschließenden Dithiol-Bildung unter Abspaltung von Wasser. Das Dithiol kann nun in einer Folgereaktion zu seiner Sulfid-Form regeneriert werden. Dabei werden Prx durch Thioredoxine (Broin et al., 2002, König et al., 2002), Gpx (Rouhier et al., 2001) oder Cyclophilin (Lee et al., 2001) und Gpx wiederum durch Glutathion (Ursini et al., 1995) regeneriert.

Neben diesen Peroxidase-Reaktionen sind in den pflanzlichen Peroxisomen Peroxidase-Reaktionen wie die der Katalase lokalisiert (Igamberdiev und Lea, 2002, del Rio et al., 2002). Ebenfalls werden Lipid-Hydroperoxide durch α -Tocopherole detoxifiziert, die ebenfalls die Photosynthese unter Starklicht-Bedingungen schützt (Grasses et al., 2001, Porfirova et al., 2002).

2.4.6 Die Interaktionen von Chloroplasten und Mitochondrien

Ausgehend von dem System der Cyanobakterien, bei denen respiratorische und photosynthetische Elektronentransportkette teilweise im selben Kompartiment lokalisiert sind, wurde auch für Pflanzen und Algen eine enge Interaktion zwischen Chloroplast und Mitochondrium postuliert (Hoefnagel et al., 1998). Im Gegensatz zu den Cyanobakterien interagieren Chloroplasten und Mitochondrien als eukaryotische Endosymbionten über das Cytosol. Hierbei spielen Transport-Proteine eine entscheidende Rolle, die die Produkte von Photosynthese und Respirationen aktiv transportieren (Heber et al., 1982, Flügge, 1999). Für die in der Photosynthese gebildeten Reduktionäquivalente $\text{NADPH}+\text{H}^+$ existiert kein direktes Transportsystem (Scheibe, 1987). Durch Übertragung auf Kohlenwasserstoffe werden die Verbindungen von Antiportern indirekt in das Cytosol transportiert (Scheibe, 2004).

Eines dieser Systeme ist die Übertragung der Reduktionäquivalente durch die redox-regulierte Malat-NADP-Dehydrogenase (cMPDH) auf Oxalacetat. Die durch das Thioredoxin-System regulierte cMPDH synthetisiert nur bei einer hohen Fd_{red} -Konzentration Malat (Scheibe et al., 1986), welches dann durch den Malat/Oxalacetat-Antiporter in das Cytosol und anschließend in das Mitochondrium transportiert wird. Dort wird es durch die Malat-NAD-Dehydrogenase (mMDH) unter Generierung von $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu Oxalacetat oxidiert und die Elektronen des $\text{NADH}+\text{H}^+$ durch die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) direkt in den Ubiquinon-Pool der mitochondrialen Atmungskette transferiert (Fukushima et al., 1989, Soole und Menz, 1995). Bei starker Reduktion des UQ-Pools werden die Elektronen durch die alternative Oxidase als Schutz vor ROS-Bildung ohne Generierung eines Membranpotentials auf Sauerstoff übertragen (Bendall und Bonner, 1971, Hoefnagel und Wiskitch, 1998, Maxwell et al., 1999). Dieses System wird auch als „Malat-Ventil“ bezeichnet, welches das photosynthetische System gegen die Generierung von ROS als Folge eines Elektronen-Staus an der Akzeptorseite des PSI schützt (Zusammenfassung Scheibe, 2003).

Neben dem „Malat-Ventil“ fungiert das Dihydroxyaceton-Phosphat-(DHAP)/3Phospho-Glycerat (3PGA)-System als Energie-Austausch-System zwischen Chloroplast und Cytosol/Mitochondrium (Dry et al., 1987). In dem Calvin-Zyklus gebildetes 3PGA wird in dem Chloroplasten unter Verbrauch von zwei ATP und einem $\text{NADPH}+\text{H}^+$ zu DHAP umgesetzt, welches dann durch einen Phosphat-Translokator aktiv in das Cytosol transportiert wird. Dort wird wiederum DHAP unter Generierung von zwei ATP und einem $\text{NADH}+\text{H}^+$ oder einem $\text{NADPH}+\text{H}^+$ zu 3PGA umgesetzt und zurück in den Chloroplasten transportiert. Neben dem Transport von Reduktionsäquivalenten wird dieses System zu dem Transport von

ATP genutzt, da die ATP-Translokatoren des Chloroplasten nur vergleichbar geringe Aktivität haben (Heldt, 1969, Flüge und Heldt, 1991, Boschetti und Schmid, 1998). Das cytosolische $\text{NADPH} + \text{H}^+$ kann ebenfalls durch die externe mitochondriale NADPH-Dehydrogenase oxidiert werden (Michaleka et al., 2004) und die Elektronen direkt in den UQ-Pool der Respiration eingehen. DHAP kann aber auch im Cytosol zur Synthese von Sucrose und Malat genutzt werden. Malat wiederum kann enzymatisch zu Pyruvat umgesetzt werden, welches anschließend als Substrat für den Citrat Zyklus fungieren kann.

Der Transport des DHAP wird über die Phosphat-Translokatoren reguliert. Die Abnahme der cytosolischen ATP-Konzentration induziert den DHAP-Transport und den damit verbundenen indirekten ATP-Transport in das Cytosol. Bei hohen ATP-Konzentrationen verbleibt DHAP in dem Chloroplasten und wird zur Synthese von Stärke genutzt (Krömer, 1995).

Durch Austausch von Aminosäuren, wie dem Glutamat/Aspartat-Translokator, können ebenfalls indirekt Energieäquivalente zwischen Chloroplast und Mitochondrium ausgetauscht werden, die jedoch im Vergleich zu dem „Malat-Ventil“ nur über eine geringe Kapazität verfügen (Krömer, 1995).

Neben dem Einfluss des Chloroplasten auf die mitochondrielle Respiration wurde auch der gegenteilige Effekt identifiziert (Bennoun, 1982). Dieser als Chlororespiration bezeichnete Vorgang beschreibt einen bei Dunkelheit induzierten Elektronentransport in den oxidierten PQ-Pool. Ausgehend von durch Glykolyse und Krebs-Zyklus gebildete Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADH} + \text{H}^+$ wird Oxalacetat im Mitochondrium durch die mMDH zu Malat reduziert. Malat wird nun durch das Cytosol in die Stroma-Bereiche des Chloroplasten transportiert und dort durch eine nicht redox-regulierte Malat-NAD-Dehydrogenase (cMDH) zu Oxalacetat oxidiert (Berkemeyer et al., 1998).

Durch Sequenzierung der Plastiden-Genome (Shinozaki et al., 1986, Ohyama et al., 1986) konnte der für eine chloroplastidäre NAD-PQ-Dehydrogenase kodierende Bereich identifiziert werden. Der plastidäre Ndh-Komplex wurde durch Sazanov (et al., 1998a) aus Thylakoidmembranen isoliert und an der stromalen Oberfläche der Thylakoidmembran detektiert (Lennon et al., 2003). Neben der Hypothese einer möglichen Funktion in einem zyklischen Elektronentransport im Licht (Nixon, 1989, Mi et al., 1992, Kubicki, 1996, Burrow et al., 1998, Shikanai et al., 1998, Joet et al., 2001) wurde von Sazanov et al., (1998b) die Funktion einer Plastochinon-Reduktase während Dunkelheit postuliert. Eine anschließende Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff durch eine alternative Oxidase ähnlich der mitochondrialen AOX wurde lange vermutet.

Mit der in *Arabidopsis thaliana* identifizierten plastidären AOX, Immutans (Wu et al, 1999, Carol et al., 1999), konnte ein chloroplastidäres Protein mit hoher Homologie zur AOX identifiziert werden. Die Mutation des Gens führt zu einer Überreduzierung des PQ-Pools in Sektoren des Blattes und damit zu einer gestörten Pigmentbildung (Wu et al., 1999, Carol et al., 1999). Durch die überraschende Lokalisierung an der stromalen Seite des thylakoidären Stromas konnte nun eine mögliche Funktion postuliert werden (Lennon et al., 2003). Durch die stromale Übertragung der Elektronen von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf Plastoquinon und anschließender stromalen Reduktion von Sauerstoff zu H_2O würde so das Membranpotential in einer chloroplastidären Atmung, Chlororespiration, erhöht (Lennon et al., 2003).

2.4.7 Die redox-regulierte Gen-Expression des Chloroplasten

In Folge von veränderten Umwelteinflüssen kommt es während der Photosynthese zur Generation von ROS, Degradierung von Reaktionszentren-Proteinen und Austausch durch die redox-regulierte Genexpression. Die Gene, die einer schnellen Redox-Regulierung unterliegen, sind nach Allen (1993) auf dem Plastiden-Genom verblieben und werden so im Plastiden transkribiert und translatiert. Die Transkription dieser Gene unterliegt einer komplexen Regulation, die durch verschiedene Sensor-Elemente den Redox-Zustand des photosynthetischen Systems detektiert und durch Signal-Kaskaden und Regulatoren die Transkription reguliert.

Die Transkription des Chloroplasten wird durch die RNA-Polymerasen PEP-A und PEP-B katalysiert (Pfannschmidt und Link, 1994). PEP-A ist in dem Chloroplasten kodiert und unterliegt im Gegensatz zu PEP-B einer starken Redox-Regulation (Pfannschmidt und Link, 1997). Eine in Senf (*Sinapis alba*) identifizierte Plastiden-Transkriptionskinase, PTK, (Baginsky et al., 1997) phosphoryliert Sigma-Faktor-ähnliche Proteine des PEP-A-Komplexes und reguliert damit die Häufigkeit der Promotor-Bindungen an redox-regulierten Genen wie *psbA* (Baginsky et al., 1997). PTK selber unterliegt einer doppelten Regulierung: „in vitro“ konnte gezeigt werden, dass PTK bei Reduzierung durch Gluthation inaktiviert wird, dass aber dieser Effekt bei Phosphorylierung der PTK in das Gegenteil verkehrt wird (Ogrzewalla et al., 2002). Ausgehend von diesen Ergebnissen formulierte Link (2003) die Hypothese, dass PTK unter Starklicht-Bedingungen bei hohen GSH-Konzentrationen PEP-A schwach phosphoryliert und somit eine hohe Transkriptionsrate induziert, unter moderaten Lichtbedingungen es jedoch zu einer starken und somit hemmenden Phosphorylierung des Polymerase-Komplexes kommt.

Neben der Regulation der Gen-Expression auf transkriptionaler Ebene kommt es auch zu diversen posttranskriptionellen Redox-Regulationen (Danon und Mayfield, 1994). Die beiden Ebenen der Gen-Expression sind bei der Regulation oftmals nicht zu trennen, da Proteine sowohl bei der Transkription als auch bei der Bildung des Translations-Komplexes eine regulative Funktion erfüllen (Link, 2003). Bei diesen Antworten auf eine anhaltende Veränderung des Redox-Gleichgewichtes kommt es zur Anpassung der Stöchiometrie der Photosysteme (Pfannschmidt et al., 1999, Allen and Pfannschmidt, 2000, Pfannschmidt, 2003). In Lang-Zeit-Antworten (Stunden-Tage) ändert sich die Anzahl der Elektronentransport begrenzenden Photosysteme, so dass die Effektivität der Photosynthese erhöht wird (Chow, 1990). Nach Allen und Pfannschmidt, (2000) bedingt demnach der Redox-Zustand des PQ-Pools ebenfalls eine antiproportionale Regulation der *psbA* und *psaAB* Gen-Expression. In *C. reinhardtii* erfolgt die Redox-Regulation der *psbA*-Expression einmal durch alternatives „Splicing“ der m-RNA (Deshpande et al., 1997), auf der anderen Seite durch Bindung eines Protein-Komplexes an die 5'-untranslatierte Region (Trebitch et al., 2000). Dieser Komplex, der ebenfalls in *Arabidopsis thaliana* identifiziert wurde (Shen et al., 2001), unterliegt wie die PTK einer doppelten Regulation. Durch ein bislang nicht identifiziertes PQ-Pool-Signal wird der Komplex unter reduzierenden Bedingungen oxidiert (Trebitch et al., 2000). Der oxidierte Komplex kann nun durch Thioredoxin reduziert (2.6.5) und damit aktiviert werden. Als Folge einer vermehrten Lichteinstrahlung kommt es zu einem Anstieg der Translation des *psbA*-Transkriptes (Trebitch und Danon, 2001) und damit zur Steigerung des „PSII-Repair-Cycles“ (2.6.4). Neben einer Regulation durch den Redox-Zustand des PQ-Pools erfolgt im Dunkeln eine Inaktivierung der Binde-Aktivität des Komplexes durch eine ADP-abhängigen Kinase (Danon and Mayfield, 1994). Auch die Transkription von nukleären Genen chloroplastidär-lokalisierter Proteine unterliegen einer Redox-Regulation. Besonders die Transkriptions-Kontrolle der LHCII-Gene wurde eingehend untersucht. Bei Reduktion des PQ-Pools unter Starklicht-Bedingungen wird die Transkription der LHCII-Gene hoch reguliert und unter Schwachlicht-Bedingungen bei einem oxidierten PQ-Pool runter reguliert (Escoubas et al., 1995, Maxwell et al., 1995, Savard et al., 1996). Neben dieser Regulation unterliegen LHCII-Proteine ebenfalls einer circadianen Regulation und werden durch Translations-Faktoren (Mußnug et al., 2004) posttranskriptional reguliert.

2.5 Die Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen der DFG-Forschergruppe FOR 387 „Redoxsteuerung als zentrales Regulativ der Anpassung von Organismen mit oxygener Photosynthese“ Komponenten zu identifizieren, welche an der redox-regulierten Photoakklimationsprozessen beteiligt sind. Hierzu werden zwei verschiedene Ansätze, ein „forward genetics“- und ein „reverse genetics“-Ansatz verfolgt. Als Modellorganismus wird in beiden Versuchsansätzen *Arabidopsis thaliana* verwendet.

Die Grundlage des „forward genetics“-Ansatz ist ein von Kruse et al., (1999) entwickeltes „Screening“-Verfahren zur Identifizierung von *C. reinhardtii*-„State Transition“-Mutanten, das an die Bedingungen von höheren Pflanzen adaptiert wird. Aus einer *Arabidopsis thaliana*-Neutron-bombardment- und -EMS-Mutanten-Bank sollen Linien mit einer defekten „State Transition“ identifiziert werden. Mit Hilfe der *Arabidopsis thaliana*-Sequenzen der Ecotypen *Columbia* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) und *Landsberg erecta* (Jander et al., 2002) soll durch ein „mapping“-Verfahren mit AFLP-Markern die Mutation auf dem *Arabidopsis*-Genom lokalisiert werden (Alonso-Blanco und Korneef, 2000). Neben phänotypischen Untersuchungen soll auch die Auswirkungen der Mutation auf die chloroplastidäre Gen-Expression analysiert werden. Hierbei ist der Vergleich von redox-regulierter Transkription und Translation zur Analyse von beteiligten Regulationswegen von besonderem Interesse.

Der „reverse genetics“-Ansatz fokussiert auf der Identifizierung chloroplastidärer Serin-Threonin-Membrankinasen. In den redox-regulierten Prozessen der „State Transition“ (2.6.2), der Photoinhibition (2.6.3), sowie der chloroplastidären Genexpression (2.6.7) sind Serin-Threonin-Membrankinasen an Signalkaskaden und als Regulatoren beteiligt. Durch ein „in silico-Screening“ der *Arabidopsis thaliana*-Database (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002) soll aus den bereits annotierten Sequenzen Serin-Threonin-Kinasen identifiziert werden, die eine chloroplastidäre Transitsequenz und eine Membrandomäne enthalten. Eine dieser Kinasen soll in *Escherichia Coli* überexprimiert und ein Antiserum gegen das Enzym hergestellt werden. Mit dem Antikörper sollen Lokalisierungs-Experimente durchgeführt werden. *Arabidopsis thaliana*-T-DNA-Mutanten (Alonso et al., 2003) der ausgewählten Kinase sollen einer phänotypischen Charakterisierung zur Einordnung des von der Mutation betroffenen Signalweges unterzogen werden.

2.6 Der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*

Mit *Arabidopsis thaliana* wurde **der** Modellorganismus für molekularbiologische Arbeiten in höheren Pflanzen verwendet. Das kleine Genom (115-125 Mb) ist auf fünf Chromosomen verteilt (Laibach, 1907). Das *Arabidopsis thaliana*-Genom wurde als das erste Genom einer höheren Pflanze vollständig sequenziert (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) und annotiert (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002) und steht auf <http://www.arabidopsis.org> frei zur Verfügung. Dadurch wurde insbesondere die in dieser Arbeit verwendete Methode des „mappings“ (Alonso-Blanco und Korneef, 2000, Jander et al., 2002) erleichtert. *Arabidopsis thaliana* ist mit *Agrobacterium tumefaciens* leicht transformierbar und es stehen eine große Auswahl an Mutanten-Linien zur Verfügung (Alonso et al., 2003). Mit einer Zeit von 6 Wochen von dem Keimling bis zu den reifen Samen ist die Generationszeit von *Arabidopsis* im Vergleich zu anderen höheren Pflanzen kurz. Die Kultivierungsbedingungen von *Arabidopsis thaliana* sind standardisiert und es stehen neben mehreren Ecotypen auch verschiedene genetische Ressourcen wie „BAC-Libraries“, „Makroarrays/-chips“, „EST-Libraries“ zur Verfügung (Yamada et al., 2003). Proteinbiochemische Arbeitstechniken, welche in der Photosynthese-Forschung mit Spinat als Modellorganismus entwickelt wurden, sind ebenfalls mit nur leichten Abänderungen auf *Arabidopsis* übertragbar.

3. Material und Methoden

3.1 verwendete Organismen und Medien

3.1.1 *Escherichia coli*

E. coli wurde in LB-Medium (Sambrook et al., 1989) bei 37°C und 200rpm angezogen. Die angegebenen Stämme (s. 3.1.1.1) wurden bei 4°C auf LB+1,5% Agar-Platten aufbewahrt oder als Dauerkultur bei -80°C in 50% LB:50% Glycerin. Je nach vermittelter Antibiotika-Resistenz wurden die in (s. 3.1.1.2) angegebene Antibiotika-Konzentration zugegeben.

3.1.1.1 *E. coli*-Stämme

Stamm	Charakterisierung	Literatur	Beschreibung
DH5 α	nicht rekombinierbarer Stamm	Hanahan 1983	SupE44 Δ lac U169 hsdR1 recA1 endA1 gyr A96 thi-1 rel A1
BL21DE3 pLysS	nicht rekombinierbarer Expressionsstamm	Navagen TM	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm Δ (srl-recA) 306:Tn10 (DE3)pLysS

Tab.3.1 verwendete *E. coli*-Stämme mit ihren molekularbiologischen Eigenschaften

3.1.1.2 verwendeten Antibiotika

Zur Selektion gegen vermittelte Resistenzen wurden *E. coli*-Stämme in Nährmedien mit den verschiedenen Antibiotika angezogen.

Ampicillin	1% in H ₂ O
Kanamycin	0,5% in H ₂ O
Carbanicillin	1% in H ₂ O
Chloramphenicol	0,5% in Ethanol

3.1.2 *Arabidopsis thaliana*

3.1.2.1 *Arabidopsis thaliana*-Linien

Für die unterschiedlichen Versuchsansätze wurden verschiedene *Arabidopsis thaliana*-Linien genutzt.

Intern-Bez.	Charakterisierung	Salk-Nr.	Firma
Stmu1	State Transition NB-Mutante	-	Leehle Seeds™
Stmu2	State Transition NB-Mutante	-	Leehle Seeds™
Stmu10	State-Transition- EMS-Mutante,	-	Leehle Seeds™
Wt Col	Ecotyp Columbia Wt	-	Leehle Seeds™
Wt Ler	Ecotyp Landsberg erecta Wt	-	Leehle Seeds™
Stkm1	Kinase-T-DNA- Mutante	036654	Salk-Institut
Stkm2	Kinase-T-DNA- Mutante	044775	Salk-Institut

Tab. 3.2 Liste der verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Linien mit Angabe des Phänotyps, der Herkunft und der Registernummer

3.1.2.2 *Arabidopsis thaliana*-Medien

Zur Aussaat von *Arabidopsis thaliana*-Samen wurde Hoagland-Medium verwendet, welches z.T. mit 1,2 % Sucrose versetzt wurde. Die Samen wurden nach Aussaat für zwei Tage bei 4°C inkubiert und dann bei 20°C und 100µE (TLD36W/18 Blue, PAR (Philips, Niederlande)) kultiviert. Die angezogenen Pflanzen wurden anschließend in einem Humus zu Vermiculit Gemisch (3 zu 1) mit einem Wassergehalt von ca. 70% überführt.

3.1.2.2.1 Hoagland-Medium

Arabidopsis thaliana-Samen wurden auf Hoagland-Medium mit 0,8% Agar nach Somerville und Ogren, (1982) ausgebracht. Nach 2d Kälteinduktion (4°C) wurden die ausgebrachten Samen in 100µE aktinisches Licht überführt.

3.1.2.2.2 Sterilisation der *Arabidopsis thaliana* Samen

Für Kultivierung auf Sucrose enthaltenden Platten wurden die Samen mit 5% Na-Hypochlorid-Lösung sterilisiert.

3.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

3.2.1 Standard-Methoden

3.2.1.1 Plasmidisolierung

In Mikroorganismen inserierte extranukleäre DNA wurde mit der Methode der HB-Lyse nach Bimboil und Doly, (1979) oder mit dem „Plasmid-Isolation-Kit“ der Firma Peqlab™ isoliert.

3.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mit Hitze-stabiler DNA-Polymerase exponentiell vermehrt. Die Methode wurde nach Mullis et al., (1986) mit Taq- Polymerase der Firmen Qiagen™, Peqlab™ und Genecraft™ und der Pwo-Polymerase der Firmen Invitrogen™ und Peqlab™ durchgeführt. Je nach Anforderung des Versuchansatzes wurde der angegebene Standard-PCR-Ansatz und das Standard-PCR-Programm modifiziert.

Standard-PCR-Ansatz

1µl 10x Taq-Puffer (1mM Tris-HCl, pH8,3, 15mM MgCl, 5M KCl)

1µl dNTP`s (1,25mM)

2µl Primer je Forward and Reverse (50pM)

1µl Template-DNA (1-0,1 µg/µl)

1µl Taq-Polymerase (2,5U/µl)

4µl H₂O-bi.-dest.

Standard-PCR-Programm

1. 94°C 5min
2. 94°C 15sec
3. 60°C 30sec
4. 72°C 60sec
5. 72°C 5min

Die Programmpunkte 2-4 wurden 30-40 mal wiederholt.

3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

DNA wurde durch elektrischen Stromfluss in Agarose ihrer molekularen Masse nach aufgetrennt. Durch anschließende Interkalierung mit Ethidiumbromid und UV-Fluoreszenz-Anregung wurde die DNA dann im Gel detektiert. Die Methode wurde nach Sambrook et al., (1989) durchgeführt.

3.2.1.4 Restriktionsendonuklease-Verdau

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Erkennungssequenzen verdaut. Es wurden Enzyme der Firmen New England Biolabs™ und Amersham Pharmacia™ mit den zugehörigen Puffersystemen nach Vorschrift verwendet.

3.2.1.5 Ligation

Durch Restriktionsendonukleasen verdaute DNA wurde unter Verwendung der T4-Ligase mit den zugehörigen Puffersystemen der Firmen GeneCraft™ (Deutschland) und Novagen™ (USA) durch Ligation verbunden.

3.2.1.6 DNA Isolierung

Gesamt DNA wurde aus *Arabidopsis thaliana* mit zwei unterschiedlichen Methoden isoliert. Bei Isolationen hoher Stichprobenmengen wurde eine zeitlich kurze dafür im Ergebnis Salzreichere Methode verwendet (Pfannschmidt, 2001). Für andere Versuchsansätze wurde mit der DNA eine Isolierung mit dem Qiagen™ Plant Kit durchgeführt, welches zu einer niedrigeren Salzkonzentration führt.

3.2.1.6.1 Arabidopsis-DNA Isolierung nach Pfannschmidt (2001)

- frisches Blattmaterial ((1) ein großes Blatt, (2) ca. 20 Pflanzen mit Wurzeln) mit 500 µl Lysis-Puffer versetzen und (1) homogenisieren (2) im Mörser mit etwas Quarzsand homogenisieren (auf Eis sammeln).
- 5 min bei 37° C inkubieren
- 500 µl Phenol-Chloroform-IAA (25:24:1) zusetzen, sorgfältig und kräftig schütteln.
- 2 min bei 10.000x g zentrifugieren.
- Überstand sorgfältig abnehmen und in ein neues Eppi geben und gleiches Volumen an Isopropanol zusetzen. Mixen und 5 min bei RT fallen.
- 2 min bei 10.000x g zentrifugieren.
- Pellet (DNA und RNA)
- 1x mit 70 % Ethanol waschen (190 µl) mixen, 5 min inkubieren, kurz zentrifugieren und quantitativ dekantieren.
- Pellet für 2-3 min in Speed Vac trocknen, in etwa 20 µl 0,1 TE resuspendieren, 30 min auf Eis inkubieren, danach 10 min in 50 ° C inkubieren, vortexen und kurz zentrifugieren.

3.2.1.6.2 DNA-Isolierung nach Qiagen™ Plant Kit

Die DNA-Isolierung wurde nach dem Qiagen™ Plant Kit-Skript durchgeführt.

3.2.1.7 Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Abschnitten wurden durch die Firmen SeqLab™ (Deutschland) und IIT™ (Deutschland) durchgeführt.

3.2.1.8 RNA-Isolierungen

Kleinere Mengen RNA (bis 50µg) von wurden mit dem Reagenz Trizol™ (Roche, USA) isoliert. Größere Mengen RNA von *Arabidopsis thaliana* mit der Methodik nach Hudson und Anderson, (2001).

3.2.1.8.1 RNA-Isolierung mit Trizol™ (Invitrogen, USA)

Die Methode wurde wie im Trizol™-Skript beschrieben mit in flüssigem Stickstoff homogenisiertem Blattmaterial durchgeführt.

3.2.1.8.2 RNA-Isolierung nach Hudson and Anderson (2001)

- 10g Pflanzenmaterial mit flüssigem Stickstoff homogenisieren
- mit 25ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5mM EDTA) und 5ml 10% SDS versetzen, mehrfach invertieren
- bei 4000x g, RT für 10min pelletieren und Überstand dekantieren
- Überstand 1:1 mit Phenol versetzen, invertieren und bei 4000x g, RT für 5min zentrifugieren, obere Phase dekantieren
- zweifache Wiederholung des letzten Schrittes mit Phenol:Chloroform 1:1
- einmalige Wiederholung des letzten Schrittes mit Chloroform
- RNA ÜN mit 16ml 5M LiCl aus dem Überstand fällen, dann bei 6000x g, 4°C für 10min pelletieren
- RNA in 0,2MLiCl resuspendieren und mit 2,5fachem Volumen Ethanol ausfällen

3.2.1.9 Transformation von *Escherichia coli*

Durch Transformation wurde extra nukleäre DNA, Vektoren, in *E.coli* integriert. Dies wurde, bei salzreichen Ligationsansätzen, mit der CaCl₂-Methode oder mit Elektroporation durchgeführt.

3.2.1.9.1 CaCl₂-Methode

Für die CaCl₂-Methode (Dower et al., 1988) wurden kompetente *E.coli*-Zellen durch einen Hitzeschock (42°C) mit Vektor-DNA transformiert.

3.2.1.9.2 Elektroporation

Für Elektroporation wurden kompetente *E. coli*-Zellen verwendet, die dann durch eine hohe Spannung (2,5kV) transformiert wurden (Cohen et al., 1972).

3.2.2 Makroarray

Die verwendeten Makroarrays wurden von Kandlbinder et al., (2003) in Zusammenarbeit mit dem Genomforschungszentrum Bielefeld erstellt. cDNA aller chloroplastidären Genen und ORF wurden auf die Membranen gepunktet. RNA wurde nach der Trizol™ Methode isoliert und für die anschließende Markierung durch Reverse Transkription mit dem Dig™-System der Firma Roche (USA) verwendet. Die Makroarrays wurden mit der markierten cDNA hybridisiert und die Transkriptionsstärke mit dem Lumineszenz Farbstoff CSPD™ der Firma Roche (USA) als Lumineszenz-Emission auf Biolumineszenz-Filmen (Biomax, Amersham USA) aufgenommen. Die quantitative Auswertung der erhalten Bildpunkte auf den Filmen erfolgte mit der Aida Image Analyser 3.11™-Software.

3.2.2.1 DNase-Verdau

Zur Vermeidung von DNA-Kontaminationen wurde die mit Trizol™ erhaltene RNA einem DNase-Verdau unterzogen.

- 8 µl RNA (ca. 5µg)
- 1 µl 10x DNaseI Buffer
- 1 µl DNaseI, (Roche)
- 15 min RT durch Zugabe von 1 µl EDTA stoppen
- 65°C für 10 min
- 5 min in flüssigem Stickstoff frieren

3.2.2.2 Reverse Transkription mit DigTM Markierung

Die Reverse Transkription wurde mit M-MLV Reverse Transkriptase, RNaseH Minus der Firma Promega™ durchgeführt.

- 11µl DNase-Verdau
- 2µl Primer Stammlösung (1nM)
- Inkubation 70°C für 10min, in Eiswasser rasch abkühlen
- Zugabe von 16µl Mastermix bestehend aus:
 - 1,5µl dNTPs (je 10mM dATP, dCTP, dgTP), (5µl+5µl+5µl+35µl H₂O)
 - 1,0µl dTTP (3,9mM), (3,9µl +96,1µl H₂O)
 - 2,1µl Dig-dUTP (1nM)
 - 6,0µl 5x First Strand Buffer
 - 2,0µl 0,1 M DTT, (15,4 mg/ 1ml H₂O)
 - 1,5µl RNase-Inhibitor
 - 1,9µl H₂O
- Mischen, zentrifugieren und 2min bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 1µl (200U) Reverse Transkriptase, vorsichtig mischen
- Inkubation 37°C für 50min, Inaktivierung 70°C für 15min

3.2.2.3 Aufreinigung der cDNA mit dem QIAquick™ PCR Purification Kit

30 µl Sonde wurden wie in dem QIAquick™ PCR Purification Kit-Skript angegeben gereinigt und in 50µl H₂O eluiert.

3.2.2.4 Quantifizierung der erhaltenen cDNA

Um Proben auf dem Makroarray optimal vergleichen zu können, wurden die Konzentration der erhaltenen, markierten cDNA bestimmt.

- Sonde 1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 verdünnen, je 1 µl
- Dig-Kontroll-DNA, (Roche™) 1µl a 1.000 pg, 100 pg, 50 pg, 10 pg
- Auf Membran auftragen, quer vernetzen und UV-crosslinken
- (10x Maleinsäure-Puffer 1,0M Maleinsäure, 1,5M NaCl, pH 7,5 mit NaOH-Plätzchen)
- (10% Blockingreagenz in 1x Maleinsäurepuffer bei 60° C lösen, dann autoklavieren)
- Membran 2min mit Waschpuffer (1x Maleinsäurepuffer + 0,3 % Tween 20)
- 30min bei RT in Blockierungslsg. (1% Blockingreagenz in 1x Maleinsäurepuffer) inkubieren
- 30min bei RT in Antikörperlsg. (Blockierungslsg. + Anti-Dig-Fab-fragments 1:5.000=
- 2x 15min bei RT in Waschpuffer waschen
- 2 min in Detektionspuffer (100mM Tris-HCl, pH 9,5, 100mM NaCl) waschen
- mit 50ml Farbsubstratlsg. (Detektionspuffer + 200µl NBT + 100µl BCIP) entwickeln
- Spotintensität der Sonde mit Dig-Kontrolle vergleichen

3.2.2.5 Hybridisierung und Detektion des Makroarrays

Der Makroarray wurde mit der markierten cDNA hybridisiert und nachfolgend die Spot-Intensität detektiert.

- Microarray bei 42° C mit 6ml Dig Easy Hyb inkubieren
- 30-150ng Sonde 10min bei 100°C denaturieren, in Eiswasser rasch abkühlen
- Sonde zu 6ml Dig- Easy-Hyb™ der Firma Roche geben und ÜN bei 42°C inkubieren
- Gebrauchte Sonde auftauen und 10min bei 68°C denaturieren
- Sonde bei -20°C lagern
- Membran 2x 5min bei RT mit 2x Waschlsg. (2x SSC + 0,1% SDS) waschen
- Membran 2x 15min bei 42° C mit 1x Waschlsg. (1x SSC + 0,1% SDS) waschen
- Membran 1x 1min bei RT mit Waschpuffer waschen
- Membran 1x 30min bei RT in 5ml Blockierungslsg. inkubieren
- Membran 1x 30min bei RT in 5ml Antikörperlsg. Inkubieren
- Membran 2x 15min bei RT mit Waschpuffer waschen
- CSPD-Lsg.™ der Firma Roche auf RT bringen
- Membran 1x 2min bei RT mit Detektionspuffer waschen
- Membran auf gespanntes Foto Saran legen und 250µl CSPD auftropfen
- Mit Folie Luftblasen-frei bedecken und 5min bei RT inkubieren
- Membran 2min bei RT in Detektionspuffer waschen
- Membran auf eine mit Foto Saran bespannte Glascheibe legen
- Mit zweiter Folie Luftblasen- und Falten-frei abdecken
- Überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abstreifen und 10min bei 37°C inkubieren
- Film auflegen und 3-24h bei RT inkubieren

3.2.2.6 Film Entwicklung und Fixierung

Die emittierte Lichtenergie wurde mit Biolumineszenzfilmen (Biomax™ Amersham, USA) aufgenommen und durch Entwicklung und Fixierung der Filme sichtbar gemacht.

- Film ca. 3min in 1x Kodak-Röntgen Entwickler entwickeln
- Kurz in H₂O waschen
- Film ca. 3min in 1x Kodak-Röntgen Fixierer entwickeln, ÜN trocknen

3.2.2.7 Auswertung der erhaltenen Daten

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Aida Image Analyser 3.11™ anhand der folgenden Parameter ausgewertet.

- die Intensität der cDNA-Signale musste stärker als 120% des lokalen Hintergrundes sein
- die Werte der doppelten gespotteten cDNA Punkte durften nur um weniger als 50% variieren
- die Expression der Gene wurde in mindestens drei unabhängigen Experimente geprüft und wurden nur akzeptiert, wenn die erhaltenen Werte geringer als 30% von dem Durchschnitt abwichen

3.2.3 vergleichende RT-PCR

Die Proben für die Semiquantitative RT-PCR wurden wie im Makroarray Versuch (s. 1.2.2) beschrieben vorbereitet. Einer RNA-Isolierung (Trizol™, s. 3.2.1.8.1) folgte ein DNA-Verdau (s. 3.2.2.1) und eine reverse Transkription (s. 3.2.2.2). Die erhaltene cDNA wurde mit Standard actin Primern auf gleiche Konzentrationen eingestellt um dann Expressionsraten von Genen bei Wt/Mutanten-Vergleichen analysieren zu können. Die Semiquantitative RT-PCR wurde nach Kandlbinder et al., (2003) durchgeführt.

3.2.4 Northernblot

Für Northernblot-Analysen wurde RNA (s. 3.2.1.8) isoliert, in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die Expressionsraten der Gene mit dem Dig™-System der Firma Roche unter Verwendung einer Dig-markierten DNA-Sonde (s. 3.2.4.1) oder durch radioaktiven Nachweis mit einer radioaktiv markierten Sonde (s. 3.2.4.2) analysiert. Der Northern Blot wurde wie bei Sambroock et al., (1989) durchgeführt.

3.2.4.1 Sondenherstellung per PCR

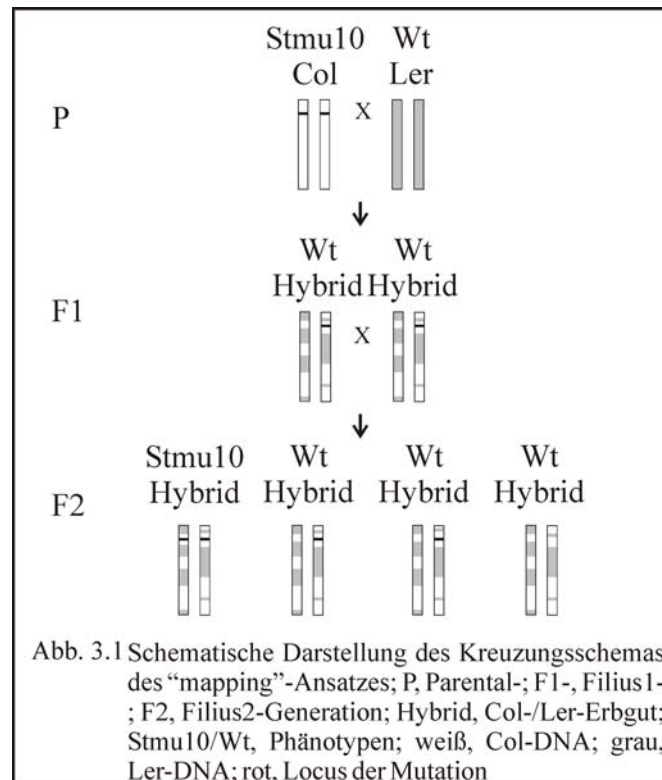
Die Sondenherstellung wird wie in (1.2.1.2) beschrieben durchgeführt. Der vorhandene dNTP-Mix wird durch einen Mix aus 1,5 µl dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dgTP), (5µl+5µl+5µl+35µl H₂O) + 1,0 µl dTTP (3,9 mM), (3,9 µl +96,1 µl H₂O) + 2,1 µl Dig-dUTP (1nM) ersetzt.

3.2.4.2 Sondenherstellung per Klenow-Enzym

10µl (0,1µg) der per PCR amplifizierten DNA wird bei 90° für 10min denaturiert, mit je 1µl Primern versetzt, 3µl dNTP Mix+ a) 2µl Dig dUTP's oder b) 2µl dCTP³² (3000µCi) und 1µl Klenow Enzym (1U) versetzt und für 45min bei 37°C inkubiert

3.2.5 „mapping“-Ansatz zur Identifikation des mutierten Locus

Zur Identifizierung des Locus der Mutation durch EMS-Mutagenese wurde ein „mapping“-Ansatz verwendet identifiziert (Alonso-Blanco und Korneef, 2000, Jander et al., 2002). Hierbei wurden ecotypische Sequenzunterschiede zwischen den *Arabidopsis thaliana*-Ecotypen *Columbia* und *Landsberg erecta* genutzt. Die Col-Mutante wurde mit dem Ler-Wt gekreuzt, durch Selbstbefruchtung in die F₂-Generation gebracht und die Stmu10-Phänotypen mit dem „State Transition-Screening“-Verfahren identifiziert. Die Erbinformation der Hybride bestand nun durch homologe Rekombination aus einem Col/Ler-Genom, das jedoch am Locus der aus Stmu10 stammenden Mutation Col-DNA war (Abb. 3.1).



Durch PCR mit den AFLP-Markern (Tab.3.3) wurde das Genom auf das Verhältnis zwischen Col-und Ler-DNA-Abschnitte hin untersucht und der Locus der Mutation eingegrenzt (Alonso-Blanco et al., 1998, Jander et al., 2002). Hierbei wurden Ecotyp spezifische Amplifikat-Größenunterschiede genutzt, da die Mutation aus einem Ecotyp Col-Individuum stammte. Durch eine Statistik mit ausreichend großer Stichprobenmenge (Anzahl der Col/Ler Stmu10-Hybride) wurde so die Mutation auf dem Chromosom eingegrenzt.

Chr.	Marker	Forward-Primer	Reverse-Primer	St.
I	F21M12	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG	60
	AtSo392	GTTGATCGCAGCTTGATAAGC	TTGGAGTTAGACACGGATCTG	60
	nga280	GGCTCCATAAAAAGTGCACC	CTGATCTCACGGACAATAGTGC	60
	nga111	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG	TGTTTTTTAGGACAAATGGCG	60
II	F7E22	AAGGTTGGAATATGTTGAGG	AGACTCATTCTGGACTATAC	60
	F19G14	CATGAAAGACTTTGACCTAC	TCACACCATTGTTCTTGTC	60
III	M1	CAAGAAAAACCGAATTCACG	AGAACTAGAATTTCCATGTC	60
	M2	AAATAGACCCACGAAGTCG	GAGAGAAAGAGAGATGACG	60
IV	SDC4.1	TGGAGTTGCCATCTGTTGAC	ATCCTTCTCGCTCTCCTGTG	306
	nga8	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC	GAGGGCAAATCTTTATTTCCGG	306
	SDC4.2	TCGTTAGCCGTGAAAAACAG	GAAAAAGAAAACCTTTGAGCCTCT	306
	F10M23	AGACAAATCCGCTCGACAGTC	AAGAACTCCAGACCTTCAGAG	306
	nga1107	GCGAAAAAACAAAAAATCCA	CGACGAATCGACAGAATTTAGG	60
V	nga249	GGATCCTACTGTAAAATCCC	TACCGTCAATTTTCATCGCC	60
	nga139	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG	AGAGCTACCAGATCCGATGG	60
	MBK5	GAGCATTTACAGAGACG	ATCACTGTTGTTTACCATTA	60

Tab. 3.3 Tabellarische Darstellung der verwendeten AFLP-Marker und ihrer Primer-Sequenzen; St, Größe der getesteten Col/Ler-Stmu10- Hybrid-Population

3.2.6 ECFP-Klonierung und Protoplastentransformation

Für Lokalisationsuntersuchungen wurde die Transitsequenz der Arginase2 At4g08870 aus *Arabidopsis thaliana* mit einem ECF-Protein C-terminal markiert. Durch Transformation des erhaltenen Konstruktes in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten und anschließende Fluoreszenzmikroskopie konnte das Protein durch seine Fluoreszenz im Mikroskop lokalisiert werden (Reichel et al., 1996).

3.2.6.1 Klonierung der At4g08870-Transitsequenz in pECFP

Die Transitsequenz wurde mit Primern, welche eine HindIII-Restriktionsendonuklease-Verdauungsstelle für eine Klonierung in pECFP-2 (Seidel et al., 2004) enthielten durch PCR (s. 3.2.1.2) amplifiziert. Das erhaltene Amplifikat und der pECFP-Vektor wurden mit HindIII verdaut (s. 3.2.6.1), legiert (s. 3.2.1.5) und in *E.Coli*-DH5 α transformiert (s. 3.2.1.9.1). Die erhaltenen Vektoren wurden isoliert (s. 3.2.1.1), sequenziert (s. 3.2.1.7) und für die folgende Protoplasten-Transformation verwendet.

Aminosäuresequenz der Arginase2 mit *Transitsequenz* und **zusätzlicher, klonierter Sequenz**

MWKIGQRGVPYFQRLIAAPFTTLRSLPTSLVETGQNRVIDASLTLIRERAKLKGELVRLIGG
AKATTALLGVPLGHNSSFLEGPALAPPHVREAIWCGSTNSTTEEGKELKDPVLSVGDIPV
 QEIREMGVDDDRMLKVVSESVKLVMEEEPLRPLVIGGDHSISYPVVRVAVSEKLGGPVDILHL
 DAHPDIYDRFEGNYYSHASSFARIMEGGYARRLLQVGIRSINKEGREQGKRFVGEQYEMRTF
 SKDRQMLENLKLGEGVKGVYISIDVDCLDPGFAHGVSHPFPGGLSFRDVLNHLNHLQGDIVG
 ADVVEYNPQRDTADDMTAMVAAKFVRELAAKMSK

Amplifizierung der Transitsequenz enthaltenen At4g08870-Sequenz mit HindIII-Restriktionsendonuklease-Verdauungsstellen enthaltenen Primern

ECFP Forward-Primer

GGATCCTGTGGAAGATTGGGCAGAG

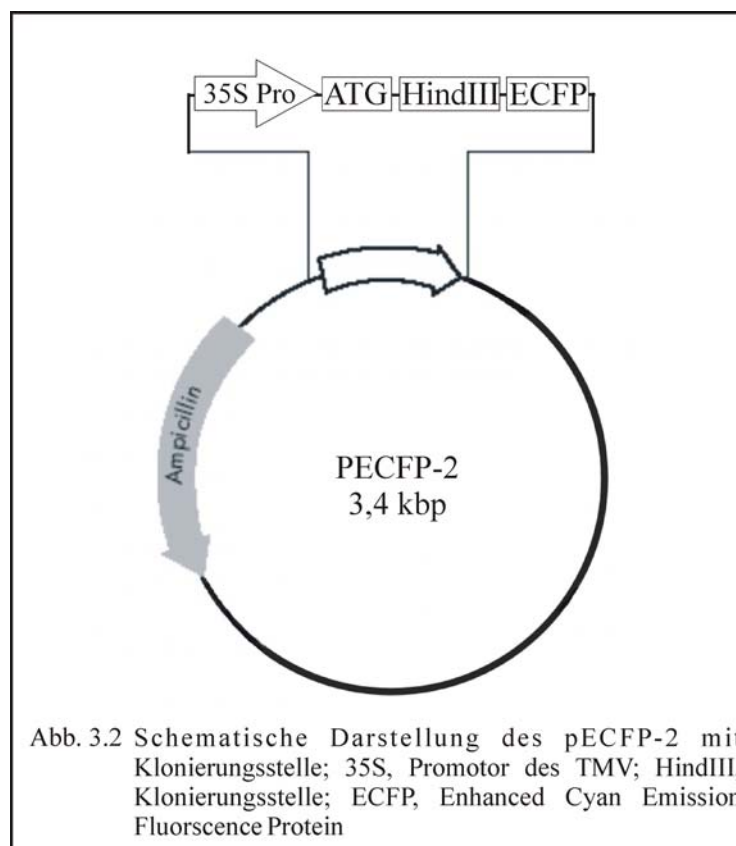
atgtggaagattgggcagagaggagttccctat
ttccagagact
cattgctgcgccgttcacgaccttgcggtccttgccaacttctttgggtcgagaca
gggcaga
accgtgtcattgatgcttcgttaactctcatccgtgaaagggcaaaactcaaaggagagtta
gtgcgactcataggaggagcaaaagctacaacagctcttcttggagtaccacttggtcacia
ctcttcttttcttgaaggcccagccttggctcctcctcatgtaa

CCTTGGCTCCTCCTCATGTAATGGATCC

GGATCCATTACATGAGGAGGAGCCAAGG

ECFP Reverse-Primer

Das Amplifikat wurde nach HindIII-Verdauung in pECFP ligiert und unter Kontrolle des 35S Promoters des Tabak Mosaik Virus expremiert (Abb. 3.2).



3.2.6.2 Protoplastentransformation

Die Protoplasten wurden nach einer Methode von Seidel et al., (2004) aus einer Woche alten *Arabidopsis thaliana* Blätter durch Verdauung der Zellwand mit Cellulasen isoliert. Die Isolierten Protoplasten wurden anschließend mit dem pECFP-At4g08870-Vektor durch PEG transformiert (Seidel et al., 2004). Die erhaltenen transformierten Protoplasten wurden mit einem Axioskop2™ (Zeiss, Deutschland) mit Filtern von 450nm-490nm und 575nm-625nm analysiert.

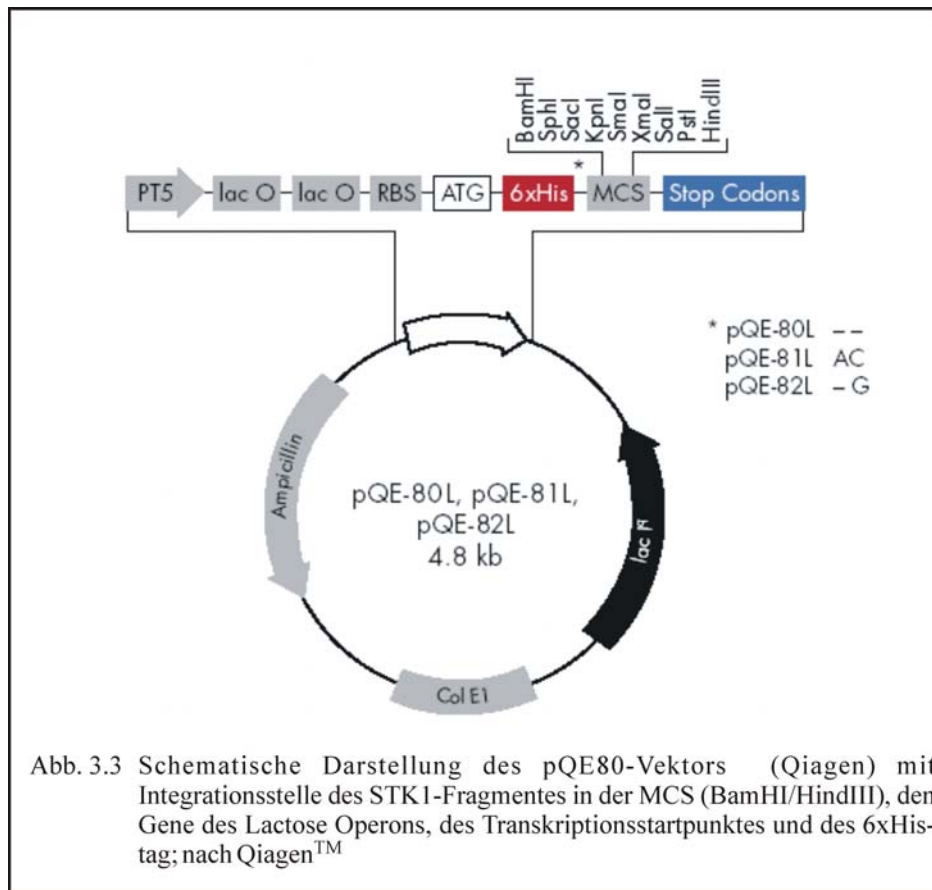
- 20 Blätter (2-3g Blattmaterial) in Streifen quer zur Mittelrippe schneiden, nicht breiter als 1mm
- Streifen in eine Petrischale (Ø 90mm) mit 20ml Enzyme Solution 1,5% CellulaseR10, 0,4% Macerozyme, 0,4M Mannitol, 20mM KCl, 20mM MES pH5,7, 0,1% BSA FraktionV
- 3min Vakuum infiltrieren, 90min 40rpm schütteln, 1min über 80rpm schütteln
- Protoplasten durch Nylonnetz filtrieren, 3min bei 110x g zentrifugieren
- Pellet in 10ml W5-Lösung 154mM NaCl, 125mM CaCl₂, 5mM KCl, 2mM MES pH5,7, 0,4M Mannitol waschen
- in 10ml W5-Lösung resuspendieren, 30min auf Eis inkubieren
- 1min bei 110x g zentrifugieren, Pellet in 5ml MMG-Lösung 0,4M Mannitol, 15mM MgCl₂, 4mM MES pH5,7 resuspendieren
- 40µg Plasmid-DNA in 20µl sterilem Wasser, 120µl PEG-Lösung und 100µl Protoplastensuspension in Petrischale(Ø60mm) vorlegen
- DNA langsam in die Protoplastensuspension pipettieren, dabei verteilen
- PEG-Lösung zugeben, 30s-vorsichtig mit der Pipettenspitze mischen
- 15min inkubieren, 0,5ml W5-Lösung zugeben
- 15min inkubieren, 1,0ml W5-Lösung zugeben
- 15min inkubieren, 2,0ml W5-Lösung zugeben
- 15min inkubieren, 4,0ml W5-Lösung zugeben
- 24-30h bei 25°C inkubieren, Überstand bis auf 0,5ml abnehmen
- Protoplasten abnehmen und auf Objektträger geben
- Protoplasten mit dem Fluoreszenzmikroskop analysieren

3.2.7 Klonierung und Überexpression des STK1-Fragmentes

Ein für ein C-terminales STK1-Fragment kodierender Bereich wurde mit Restriktionsendonuklease-Verdauungsstellen enthaltenen Primern amplifiziert und anschließend in das pQE80™ Vektor-System der Firma Qiagen (USA) kloniert. Die unter der Kontrolle des Lac-Operon stehende Expression des Proteins wurde durch Zugabe von IPTG induziert und das Protein als 6xHis-tag durch Nickel-Säulenchromatographie aufgereinigt. Das gereinigte Protein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens an die Firma Pineda™ weitergegeben.

3.2.7.1 Klonierung des STK1 Fragmentes in pQE80

Zur Überexpression und anschließender Antikörperherstellung wurde ein C-terminales Epitop der STK1 in den pQE40 kloniert (Abb. 3.5). Hierzu wurde das Fragment mit Primern amplifiziert, welche eine BamHI- und HindIII-Restriktionsendonuklease-Verdauungsstellen enthielten. Nach erfolgreicher PCR (s. 3.2.1.2) wurde sowohl das Amplifikat als auch pQE40 mit den Restriktionsendonukleasen (s. 3.2.1.4) verdaut, legiert (s. 3.2.1.5) und in DH5 α transformiert (s. 3.2.1.9.1). Der entstandene Vektor enthielt nun das STK1-Fragment welches unter der Kontrolle des T7-Promotors mit einem N-Terminalem 6xHis-tag expremiert werden konnte. Nach Isolation (s. 3.2.1.1), Sequenzierung (s. 3.2.1.7) und Transformation (s. 3.2.1.9.2) in den *E.Coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS konnte das Protein durch Ni-Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Das eluierte Protein wurde mit Westernblot-Analysen (s. 3.3.5) auf seine Reinheit kontrolliert (The QIAexpressionist™, Qiagen, USA). Mit dem gereinigten Protein wurde von der Firma Pineda™ ein Kaninchen zur Anti-STK1-Serum Herstellung immunisiert.



Aminosäuresequenz von STK1 mit dem C-terminalem Epitop:

MSTAPSPGTTTPSPSPSPPTNSTTTTTPPPAASSPPPTTTPSSPPSPSTNSTSPPSSPLPP
 SLPPSPPGSLTPPLPQSPSPAPITPSPSPPTTPSNRSPSPSPNQGPNTPSGSTPRTPSNT
 KPSPSDSSDGLSTGVVVGIAIGGVAILVILTLLICLLCKKKRRRRHDDEAAYVPPPPSGP
 KAGGPYGGQQYQWQQNASRPSDNHVVTSLPPPKPPSPPRKPPPPPPPAFMSSSGSDYSD
 LPVLPPSPGLVLGFSKSTFTYEELSRATNGFSEANLLQGGFGYVHKGILPSGKEVAVKQL
 KAGSGQGEREFQAEVEIISRVRHRLVSLIGYCMAGVQRLLVYEFVNNNLEFHLHGKGRPT
 MEWSTRLKIALGSAKGLSYLHEDCNPKIIHRDIKASNILIDFKFEAKVADEFGLAKIASDTNT
 HVSTRVMGTFGYLAPEYAASGKLTSEKSDVFSFGVLLLELITGRRPVDANNVYVDDSLVDWAR
 PLLNRASEEGDFEGLADSKMGNEYDREEMARMVACAAACVRHSARRRPRMSQIVRALEGNVS
LSDLNEGMRPGHSNVYSSYGGSTDYDTSQYNDDMIKFRKMALGTQEYGGTTGEYSNPTS DYGL
YPSGSSSEGOATREMEMGKIKKTGQGYSGPSL

Amplifizierung der Epitop kodierenden Sequenz mit Restriktionsendonuklease-Verdauungstellen enthaltenen Primern:

BamHI

Forward-Primer

atcggatccCGAGCATCTGAGGAAGGAG

**CGAGCATCTGAGGAAGGAGATTTTGAGGGTTTGGCTGATTCAAAGATGGGTAA
TGAGTATGACAGAGAGGAGATGGCTCGCATGGTTGCTTGCCTGCGGCTTGTGTTCCGATT
CAGCTCGCCGCAGACCTCGCATGAGCCAGATAGTACGGGCGTTAGAAGGAAATGTATCGCTG
TCTGATCTTAACGAAGGGATGAGACCGGGTCACAGCAACGTATACAGCTCATATGGAGGAAG
CACAGACTATGACACGAGCCAATACAACGACGACATGATAAAGTTTAGGAAAATGGCTCTTG
GAACTCAAGAATACGGCACAACCGGCGAGTACAGTAATCCAACCAGTGACTACGGACTGTAC
CCGTCTGGTTCAAGCAGTGAAGGTCAAGCCACACGAGAAA**

GGTCAAGCCACACGAGAAAaagcttcat

Reverse-Primer

HindIII

3.2.7.2 Überexpression des STK1-Fragmentes

Mit den in den Expressionsstamm Bl21(De3)pLysS transformierten Klonen wurde das STK1-Epitop als N-terminale His-tag_{protein} überexprimiert. Die Expression wurde auf Grundlage des pQE-Skriptes (QiagenTM-USA) durchgeführt.

- Kultur bei einer o.D._{600nm} 0,5 mit 1mM IPTG bei 37°C für 2h induzieren
- Lysis Buffer, 50 mM NaH₂ PO₄ pH 8.0; 10 mM Imidiazole, 300mM NaCl, 1mM Benzonase, 20 pM Pefabloc
- Pellet einer 50 ml Kultur in 10 ml Lysis-Buffer resuspendieren und bei 4° C 2x bei maximalem Druck in der French Press lysieren
- DNA 30 min bei 4° C verdauen und anschließen 10 min bei 20 000xg zentrifugieren.
- Überstand+ Matrix (Ni-NTA Agaros, QiagenTM) ÜN invertieren
- Washingbuffer 50 mM NaH₂ PO₄ pH 8.0; 20 mM Imidiazole, 300mM NaCl
3x waschen mit je 50 ml Washingbuffer
- Elutionsbuffer 50 mM NaH₂ PO₄ pH 8.0; 250 mM Imidiazole, 300mM NaCl
Elution mit Elutionspuffer in Schritten von 1 ml

3.3 Proteinbiochemische Arbeitstechniken

3.3.1 Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration

Zur Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration wurden aufgereinigte *Arabidopsis*-Chloroplasten oder Thylakoide 1:50 mit Aceton gemischt, die Schwebstoffe pelettiert und die Absorption der gelösten Chlorophylle im Spektral-Photometer (Perkin Elmer Lambda 3, UV/VIS Spectrometer) bestimmt. Die Absorption des Chlorophyll a entspricht hierbei der Wellenlänge von 663nm, die des Chlorophyll b von 645nm. Der gesamt Chlorophyllgehalt wurde nach Arnon (1959) mit der Formel:

$$[\text{chl } a] \text{ (mg/ml)} = [(A_{663} \times 0,0127) - (0,00269 \times A_{645})] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$[\text{chl } b] \text{ (mg/ml)} = [(A_{645} \times 0,0229) - (0,00468 \times A_{663})] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$[\text{gesamt Chl}] \text{ (mg/ml)} = [\text{chl } a] + [\text{chl } b]$$

bestimmt.

3.3.2 SDS PAGE

Durch Denaturierung von Proteinen mit Natrium-(Sodium)-Dodecyl-Sulfat (SDS) wird die Quartär- und Tertiär-Struktur von Proteinen denaturiert, so dass die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können. Die Gelelektrophorese wurde mit dem Mini-Protean-System (BioRad™) durchgeführt. Die Proben wurden 1:1 in denaturierendem Probenpuffer (160mM Tris HCl, pH 6,8, 4mM EDTA, 0,8M Sucrose, 5% Glycerol, 25mM DTE) aufgenommen und anschließend im Polyacrylamidgel (Laemmli, 1970) aufgetrennt

Für Gesamtproteinanalysen wurde die aufgetrennten Proteine entweder mit Silber-Färbung (s. 3.3.3) oder mit Coomassie Blue-Färbung (s. 3.3.4) markiert.

Für weitergehende Immunologische Analysen wurden die Proteine per Elektrobplot auf eine Nitrocellulose-Membran überführt (s. 3.3.5) und anschließend mit Antikörpern /-seren markiert (s. 3.3.6).

3.3.3 Silber Färbung

Die aufgetrennten Proteine wurden nach Kruse et al., (1997) mit Silber-Oxid angefärbt.

3.3.4 Coomassie Blue Färbung

Die Gele wurden über Nacht mit Coomassie Blue Färbelösung (0,025% Coomassie R, 0,025% Coomassie G, 10% Ethanol, 7% Essigsäure) angefärbt und anschließend die Gele mit Entfärber (15% Essigsäure, 20% Methanol) entfärbt. Das in den Proteinen verbleibende Coomassie Blue färbte diese blau.

3.3.5 Westernblot

Der Westernblot wurde nach Burnett (1981) mit Abwandlungen als Elektrobplot durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden bei einer Spannung von 95 V für 30min in einer Mini-Elektrobplot-Kammer (BioRad™) auf eine Nitrocellulosemembran (Protean BA 85 Cellulosenitrat, 0,45µm, Schleicher und Schüll™) übertragen.

3.3.6 Immunologische Detektion

Die Immunologische Detektion wurde nach Turner (1983) mit dem Alkalinen-Phosphatase (AP)-Detektionssystem der Firma Roche (USA) durchgeführt. Die Proteine wurden mit den in Tab. 3.4 angegebenen Antikörpern / -seren markiert. Anschließend folgte die Bindung eines zweiten, Biotin konjugierten Antikörper an den ersten Antikörper. Durch abschließende Bindung der Alkalinen Phosphatase konnte durch enzymatischen Umsatz einer Färbelösung die Antikörperbindung visualisiert werden.

Antikörper/-serum	Antigen	Antikörper aus	Eingesetzte Verdünnung	Absättigung der Membran	Herkunft
Anti-Phosphothreonin	Phosphothreonin	Kaninchen	1:1250	3% BSA	Zytomed™
Anti-LHCII	LHCII	Kaninchen	1:1000	10% Milchpulver	A.G. Jansson, Uni. Umeå, Schweden
Anti-D1	D1	Kaninchen	1:1000	10% Milchpulver	A.G. Pistorius Uni. Bielefeld Deutschland
Anti-NdhI	NdhI	Kaninchen	1:2500	10% Milchpulver	A.G. Nixon I.C. London England
Anti-PsaA/B	PsaA/B	Kaninchen	1:1000	10% Milchpulver	A.G. Scheller Uni. Kopenhagen Dänemark
Anti-Cytb ₆	Cytb ₆	Kaninchen	1:2000	10% Milchpulver	A.G. Wollmann I.B.P.C. Paris Frankreich
Anti-Nad9	KomplexI	Kaninchen	1:1000	3% BSA	J.M. Grienenberger I.B.M.P. Strasburg Frankreich
Anti-AOX	AOX	Kaninchen	1:1000	3% BSA	S. Merchant U.C. Los Angeles USY
Anti-His	6xHis-tag	Maus	1:2500	3% BSA	Novagen™

Tab. 3.4 Tabellarische Darstellung der verwendeten Antikörper mit Ursprungsorganismus und Quelle; eingesetzte Verdünnung, verwendete Konzentration des Antikörpers zur Immunreaktion bei Westernblot-Immunodetektion; Absättigung der Membran, verwendete Blockierungsreagenz zur Vermeidung von Kreuzreaktionen

3.3.7 Chloroplastenisolierung

Die Chloroplasten werden durch Homogenisierung aus den Mesophyllzellen der Blätter gelöst und durch Filtrierung von Schwebstoffen getrennt. Die Methode wurde bei 4°C zur Vermeidung von proteolytischen Degradierungen durchgeführt.

Homogenisierungspuffer

Sorbitol 0,33 M
HEPES KOH pH 8 50 mM
MgCl₂ 1mM
Na-EDTA 2 mM

- Blattmaterial in Homogenisierungspuffer homogenisieren und zweimal durch zwei Lagen Filterpapier (Miracloth 1R, Calbiochem, Canada) filtrieren
- bei 1500x g pelletieren, Überstand dekantieren
- Überstand bei 10000x g zentrifugieren.
- Pellet vorsichtig in Homogenisierungspuffer resuspendieren

3.3.8 Die Isolierung von Chloroplasten nach Baginsky

Die Chloroplasten wurden nach Baginsky (persönliche Kommunikation) aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. Die Methode wurde bei 4°C zur Vermeidung von proteolytischen Degradierungen durchgeführt. Mit dieser Methode werden Chloroplasten ohne mitochondriale Kontaminationen isoliert (Baginsky, persönliche Kommunikation).

Homogenisierungspuffer

Sorbitol 0,45 M
MgCl₂ 2.5 M
HEPES 50 mM
Mit KOH auf pH 7,5 einstellen.

Isolierungspuffer

Sorbitol	0,33 M
MgCl ₂	2,5 mM
HEPES	50 mM

Mit KOH auf pH 7,5 einstellen.

Percoll-Lösung

Percoll	100 ml
Ficoll	1 g
PEG8000	3 g

Percoll-Stufengradient

- 60 % Percoll-Lösung in Isolations Puffer
- 30 % Percoll-Lösung in Isolations Puffer
- 10 % Percoll-Lösung in Isolations Puffer

- Blattmaterial in Homogenisierungspuffer homogenisieren und zweimal durch zwei Lagen Filterpapier (Miracloth 1R, Calbiochem, Canada) filtrieren.
- 5 min mit 1500x g bei 4°C zentrifugieren, Überstand dekantieren
- Überstand 20 min mit 4000x g bei 4°C zentrifugieren
- Pellet in Homogenisierungspuffer resuspendieren, auf den Percoll-Stufengradient laden
- 20 min mit 8000x g bei 4°C zentrifugieren, intakten Chloroplasten vorsichtig dekantieren
- Chloroplasten zweimal 20 min bei 8000x g in Isolierungspuffer
- die Isolierung mit dem Percoll-Stufengradient dreimal wiederholen

3.3.9 Isolierung von Thylakoidmembranen zur „in vito“-Phosphorylierung

Mit der Methode werden in einem ersten Schritt Chloroplasten isoliert, die anschließend durch MgCl_2 mit einem osmotischen Schock degradiert werden. Die Kinasen werden durch Zugabe von externem ATP mit ihrem Substrat versorgt. Die Methode kann auch mit radioaktiven ^{32}ATP nach Kruse et al., (1997) durchgeführt werden. Die Methode wurde bei 4°C zur Vermeidung von proteolytischen Degradierungen durchgeführt.

Homogenisierungspuffer

Succrose	0,3 M
Tris-HCl (pH 7,8)	50 mM
NaCl	20 mM
MgCl_2	5 mM

Thylakoid-Puffer

Tricine-KOH pH 7,8	10 mM
NaCl	150 mM

Phosphorylierungspuffer

Succrose	100 mM
HEPES-KOH pH 8	50 mM
MgCl_2	10 mM
NaF	200 μM

- Blattmaterial in Homogenisierungspuffer homogenisieren und zweimal durch zwei Lagen Filterpapier (Miracloth 1R, Calbiochem, Canada) filtrieren
- 3500x g, 1 min zentrifugieren
- Pellet in Thlakoid-Puffer resuspendieren, bei 35.000x g 5 min zentrifugieren
- Thylakoidmembranen in Phosphorylierungspuffer resuspendieren
- Chlorophyll-Konzentration auf 0,2 mg/ml einstellen
- ATP in einer Konzentration von 20mM hinzugeben
- Proben belichten
- Proben entnehmen und Phosphatase durch 20mM NaF hemmen
- Proben mit 10.000x g pelletieren und analysieren

3.3.10 Der Arginaseaktivitäts-Assay

Die Arginaseaktivität von *Arabidopsis thaliana*-Zellsuspensionen wurde über die Bildung von Ornithin mit L-Arginin als Substrat nach Pistorius et al., (1989) bestimmt.

- 2,8µl 20mM L-Arginin-HCl pH9,0, 67mM Tricine-NaOH pH9,0, 0,01mM MgCl₂, 10U Urease (Roche, USA) + 200µl in 100mM HEPES pH8,0; 100mM Sucrose, 10mM MgCl₂ homogenisierte *Arabidopsis thaliana*-Blätter eines Proteingehaltes von 10mg/ml
- 2h bei 30°C inkubieren
- Reaktion mit 100µl 2M H₂SO₄ stoppen
- gefällte Proteine mit 15min 4000x g pelletieren
- 500 µl Überstand + 55°C heißen 500µl 140,33mM Ninhydrin (2,2-Dihydroxyindan-1,3-dion), 11,66mM Hydrindantin, 2,4M H₃PO₄, 66% (v/v) Essigsäure + 750 µl Essigsäure
- 30min bei 100°C inkubieren
- 10min bei RT inkubieren
- 1,5ml Essigsäure zugeben
- Extinktion bei 515nm im Spektralphotometer (Perkin Elmer™, England) bestimmen
- Konzentrationsbestimmung gegen Ornithin-Eichgerade von 20-120nM

3.3.11 MALDI (Matrix unterstützte Laserdesorption)

Mit der Methode des MALDI kann die Masse von Molekülen detektiert werden. Durch Ionisierung von Probe können diese in einem elektrischen Feld anhand der Massen und Ladungen der Moleküle analysiert werden. Da die Fähigkeit zur Analyse großer Moleküle begrenzt ist, werden Proteine durch die Protease Trypsin zu Peptiden verdaut. Die Eppendorfgläser werden zur Vermeidung von Verunreinigungen 3x mit 0,1% TFA, 60% Acetonitril gewaschen

Trypsinlösung

14 µl 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat

1 µl Trypsinstammlösung (PROMEGA™, modifiziert Trypsin)

- Proteinspots aus dem SDS-Page mit 250µl 50 % Acetonitril versetzen
- 5 min inkubiert, Überstand dekantieren und verwerfen.
- Proteinspots mit 250µl 50 % Acetonitril +10 mM Ammoniumhydrogencarbonat versetzen
- 30 min bei RT und 150 rpm schütteln
- Überstand quantitativ dekantieren und verwerfen
- Proteinspot trocknen und mit 15µl Trypsinlösung versetzen, 5min inkubieren
- mit 20µl Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und 24h bei 37°C inkubieren

Die Proben wurden in Zusammenarbeit mit dem Genomforschungszentrum Bielefeld mit der Methode des MALDI analysiert.

3.4 Physiologische Arbeitstechniken

3.4.1 Lichtbedingungen von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana wurde für die unterschiedlichen Versuchsansätze in den jeweils optimalen Wachstumsbedingungen angezogen bzw. an die optimalen Lichtbedingungen adaptiert.

- Normallicht-Bedingungen, 100 μ E Weißlicht; Langtag 16h Licht; Kurztag 8h Licht, Licht 22°C, Dunkelheit 18°C
- Kurzzeit Starklicht-Bedingungen, 1300 μ E Weißlicht, 25°C
- Langzeit Starklicht-Bedingungen, 700 μ E Weißlicht, 25°C
- Langzeit Wechsellicht-Bedingungen, 5min 100 μ E Weißlicht, 5min 10 μ E Weißlicht, 22°C
- State 1-Bedingungen, 20min 700nm 100 μ E Licht, 22°C
- State 2-Bedingungen, 20min 620nm 100 μ E Licht, 22°C

3.4.2 Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen

Bei Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen wurde die Fluoreszenz der Chlorophyll a und b-Proteine der Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette nach Licht-Anregung detektiert.

3.4.2.1 Raum-Temperatur-Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen

Mit der RT-Chlorophyll Fluoreszenz Messung wurde Fluoreszenz der PSII-LHCII-Chlorophyll a und b-Proteine detektiert. Die Emission der Fluoreszenz gibt Aufschluss über verschiedene Parameter des photosynthetischen Systems.

3.4.2.1.1 „Video Imaging-Screening“ nach Borgstaedt et al., (2000)

Durch Adaptation des photosynthetischen Systems an den State1- und State2-Zustand wurden durch Migration der mobilen LHCII-Proteine unterschiedliche PSII-LHCII-Fluoreszenz-Quantitäten emittiert. Diese wurden als Fluoreszenz-Aufnahmen mit dem FluorocamTM-System (Fluoreszenz-Instruments, Tschechien) detektiert und durch Vergleich beider Zustände Mutationen als gleichbleibende Fluoreszenz detektiert.

- die Pflanzen im Vierblatt-Stadium an State1-Bedingungen adaptiert
- PSII-LHCII-Chlorophylle mit State2-Bedingungen angeregen und mit der Funktion „Snapshot“ der FluorcamTM-Software ein Bild der Chlorophyll-Fluoreszenz aufnehmen
- Schritt nach 20minütigen State2-Adaptation wiederholen
- Bilder mit der CorelPhotopaintTM-Software bearbeiten
- State1-Bild durch State2-Bild dividiert
- erhaltenes Bild invertieren und mit „Anpassen“ und „Tonkurve“ so bearbeiten, dass der Wt-Phänotyp klar als hell weiße Pflanzen zu erkennen ist
- das State1-Bild ebenso bearbeiten, invertiert und zu dem Divisionsbild addieren
- Mutanten als dunkle Pflanzen im Vergleich zu hellen Wt-Pflanzen identifizieren

3.4.2.1.2 „State Transition“-Messung nach Lunde et al., (2000)

Durch Adaptation des photosynthetischen Systems an den State2-Zustand und zusätzliche Inkubation mit State1-Licht wurde die Migration der mobilen LHCII-Proteine als Fluoreszenz-Zunahme detektiert. Die gestiegene variable Fluoreszenz der beiden Zustände, gleichbedeutend der an PSII angelagerten LHCII-Proteine, wurde hierbei in Vergleich gezogen. Die Methode wurde nach Lunde et al., (2000) mit dem PAMTM-System (Walz, Deutschland) durchgeführt.

- Blätter mit 1000 μ E Puls inkubieren und den F_m -Wert detektieren
- mit 100 μ E 480nm Licht Pflanzen 20min an State2-Bedingungen adaptieren, Fluoreszenz detektieren
- 20min State1-Licht zuschalten, Fluoreszenz detektieren
- mit 1000 μ E Puls F_m' -Wert detektieren
- State1-Licht abschalten und wiederum Chlorophyllfluoreszenz bei State2-Bedingungen detektieren

3.4.2.1.3 Messung der Fluoreszenz-Parameter der Chlorophyll-Fluoreszenz

Die Fluoreszenzparameter wurden mit dem Fluorocam-System (Instruments, Tschechien) und dem PAMTM-System (Walz, Deutschland) aufgenommen. F_0 wurde als Hintergrundfluoreszenz der PSII-LHCII bei Schwachlicht (10 μ E) definiert. Anschließend folgte ein Starklicht Impuls (1000 μ E) der sämtliche Photosysteme anregte und durch vollständige Reduktion von Q_B die maximale Fluoreszenz emittieren liess. Die stetige Fluoreszenz wurde durch Inkubation mit 100 μ E 620nm-Licht induziert. Die variable Fluoreszenz F_v berechnete sich daher nach Hipkins und Baker, (1986) als $F_v = F_m - F_0$. Per Division durch F_m konnte der relative Elektronentransport des PSII ermittelt werden. Die photosynthetischen Effektivität des PSII, Φ_{PSII} und der Reduktionszustand des PQ-Pools, 1-qP, wurde nach der Methode von Andersson et al., (1997) mit den Formel $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$ und $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ detektiert. Die Reduktion des PQ-Pools bei einem Wechsel von Licht zu Dunkelheit wurde nach Harris und Heber, (1993) detektiert.

3.4.2.1.4 Messung der nicht photosynthetischen Fluoreszenz-Abnahme (NPQ)

Die nicht photosynthetische Fluoreszenz-Abnahme wurde mit dem Fluoro™Cam-System (Fluoreszenz-Instruments, Tschechien) detektiert. Hierbei wurde das NPQ-Standard-Programm der verwendeten Software genutzt. Nach Messung der Hintergrund-Fluoreszenz F_0 wurde die maximale Fluoreszenz F_m mit einem 1000 μ E-Starklicht-Puls induziert. Durch Belichtung mit 100 μ E aktinischem Licht wurde nun der Elektronentransport dauerhaft induziert und die folgenden maximalen Fluoreszenzen F_m' durch wiederholte 1000 μ E-Starklicht Pulse aufgenommen. Über die Abnahme der F_m' im Vergleich zur maximalen Fluoreszenz F_m wurde NPQ nach Elrad et al., (2001) ermittelt.

3.4.2.2 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie (mit dem LS50-B, Perkin Elmer Großbritannien)

Durch Messungen im Tieftemperatur-Bereich kann auch die aufgrund ihrer Freiheitsgrade bei RT hauptsächlich als thermische Energie freigesetzte Anregungsenergie des PSI als Chlorophyllfluoreszenz detektiert werden.

- Blätter wurden an State1 und State2 Lichtbedingungen adaptiert
- Blätter wurden schnell in einem Puffer aus HEPES pH8,0, 1mM MgCl₂, 5% (v/v) Glycerin homogenisiert
- die erhaltene Lösung mit einer Chlorophyll-Konzentration kleiner 5 μ g/ml wurde dann abrupt in flüssigem Stickstoff gefroren
- das 77K Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektrum wurde bei einer Anregungswellenlänge von 480nm und einem Emissionsfilter von 515nm in einem Emissionsbereich von 650-800nm detektiert

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur Identifizierung von Komponenten redox-regulierter Photoakklimationsprozesse verwendet.

Hierbei wurde mit dem ersten Ansatz der Prozess der „State Transition“ analysiert. Die Regulation dieses Prozesses ist nur teilweise aufgeklärt. Neben dem Ausgleich der Lichtenergie-Versorgung der Photosysteme bei suboptimalen Lichtbedingungen (Allen und Pfanschmidt, 2001), wird die „State Transition“ durch den Redox-Zustand des PQ-Pools auch von anderen Prozessen beeinflusst. Durch die Regulation des NADPH+H⁺ zu ATP-Verhältnisses, über den Wechsel von zyklischem zu linearem Elektronentransport, unterliegt dieser Prozess einer Vielzahl von chloroplastidären aber auch mitochondriellen Kontrollen (Wollman, 2001). Die genauen Mechanismen und Einflüsse der Regulation-Kaskaden sind bislang noch unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es, Regulationskaskaden-Komponenten von Photoakklimationsprozessen in *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren (s. 2.5).

Zur Umsetzung dieser Zielsetzung wurde ein „forward genetics“-Ansatz gewählt. Es wurde ein „Screening“-Verfahren zur Identifizierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einer defekten „State Transition“ entwickelt. Der Defekt der „State Transition“ wurde bei den identifizierten Mutanten mit 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emission-Spektroskopie analysiert. Die „State Transition“-Mutante Stmu10 wurde mit einem „mapping“-Verfahren genotypisch charakterisiert. Parallel zur genotypischen Charakterisierung wurde die Mutante auch einer eingehenden phänotypischen Charakterisierung unterzogen. Im Anschluss an die Identifizierung des mutierten Locus wurde das deletierte Gen charakterisiert und Funktions- / Lokalisations-Analysen durchgeführt.

In dem zweiten Ansatz wurde eine potentiell chloroplastidäre Serin-Threonin-Membrankinase identifiziert und analysiert. Der Mechanismus der Phosphorylierungen von Serin-/Threonin-Resten als Induktoren von Photoakklimationsprozessen wurde bei verschiedenen photosynthetischen Proteinen identifiziert (Kruse et al., 2002, Aro und Ohad, 2003). Neben der Phosphorylierung der LHCII-Proteine (Allen et al., 1981) und der Cytb₆f-UE PetO (Hamel et al., 2000) während der Induktion des Prozesses der „State Transition“ wird auch die Photoinhibition (Schuster et al. 1986) durch diesen Mechanismus reguliert. Die beteiligten Serin-Threonin-Kinasen sind bis auf wenige Ausnahmen (stt7, Depege et al., 2003, TAK, Snyder und Kohorn, 1999) unbekannt.

Zur Identifizierung von Komponenten dieser Signalkaskaden wurde ein „reverse genetics“-Ansatz durchgeführt. Mit einem strukturierten „in silico-Screening“ der *Arabidopsis*-Datenbank, TAIR (Garcia-Hernandez et al., 2002), wurden potentiell chloroplastidäre Serin-Threonin-Membran-Kinasen identifiziert. Von einer dieser Kinasen, STK1, wurde in *E-coli* ein Epitop expremiert und dieses gegen Kaninchen immunisiert. Mit dem erhaltenen Antiserum wurden erste Lokalisierungs-Studien durchgeführt. Parallel dazu wurden STK1-T-DNA-Mutanten „in silico“ identifiziert und phänotypisch charakterisiert.

4.1 Die Identifizierung von „State Transition“-Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

4.1.1 Entwicklung eines „State Transition-Screening“-Verfahrens in *Arabidopsis thaliana*

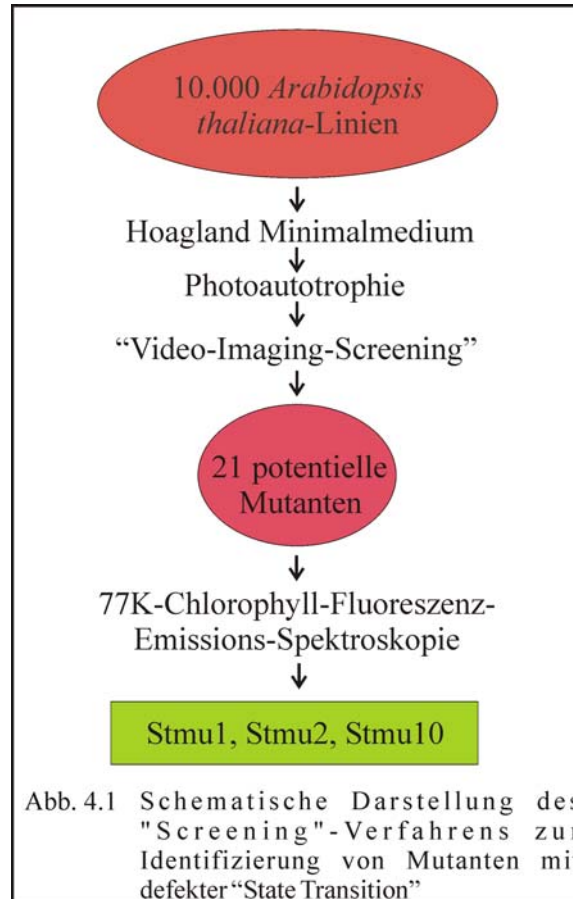
Durch Mutation von Genen, deren Produkte an dem Prozess der „State Transition“ beteiligt sind, sollten neue Erkenntnisse über Regulation und Funktion dieses Photoakklimationsprozesses gewonnen werden. Zur Identifizierung dieser Mutanten wurden EMS- und „Neutron bombardment“-*Arabidopsis thaliana*-Linien verwendet. Der Prozess der „State Transition“ gilt als eine „Fein-Regulation“ der Lichtenergie-Versorgung, aber nicht als essentiell für die Photosynthese (Lunde et al., 2003). Daher wurden die Pflanzen auf Hoagland-Minimalmedium (s. 3.1.2.2.1) angezogen, um in einem ersten „Screening“-Schritt auf Photoautotrophie zu selektieren.

In Anlehnung an ein von Kruse et al., (1999) entwickeltes „Video Imaging-Screening“-Verfahren für *Chlamydomonas reinhardtii*-Zufalls-„Knock Out“-Mutanten wurde in dieser Arbeit ein „Screening“-Verfahren für „State Transition“-Mutanten in *Arabidopsis thaliana* entwickelt.

Die *Arabidopsis thaliana*-Mutanten-Linien wurden in ihrem Vier-Blatt-Stadium dem „Video-Imaging“-Screening unterzogen (s. 3.4.2.1.1). Die Pflanzen wurden 20min mit State1-Licht (700nm, 20 μ E) inkubiert und zur Aufnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz kurz mit State2-Licht (620nm, 100 μ E) belichtet. Durch die State1-Belichtung waren die mobilen LHCII-Proteine mit dem PSII assoziiert und eine starke PSII-LHCII-Fluoreszenz konnte detektiert werden. Bei der nachfolgenden 20minütigen Belichtung mit State2-Licht migrierten Teile der mobilen LHCII-Proteine zu PSI. Die Aufnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz war daher schwächer als die unter State1-Bedingungen.

Die zu identifizierenden „State Transition“-Mutanten sollten durch die defekte LHCII-Migration nur einen sehr geringen Fluoreszenz-Unterschied zwischen State1 und State2 besitzen. Der Fluoreszenz-Unterschied wurde in einer anschließenden Bildbearbeitung mit der Bildbearbeitungs-Software Corel Photopaint™ analysiert. Die erhaltenen Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit der Formel $(\text{State1}:\text{State2})-\text{State1}$ bearbeitet (Kruse et al., 1999). Durch Division der Fluoreszenz-Aufnahmen wurde ein Differenz-Spektrum der Fluoreszenz-Zustände berechnet. Nach anschließender Subtraktion des State1-Zustandes von dem Differenz-Spektrum wurde die relative Fluoreszenz-Abnahme der Individuen identifiziert. Potentielle „State Transition“-Mutanten konnten durch ihre nicht abnehmende Fluoreszenz identifiziert werden.

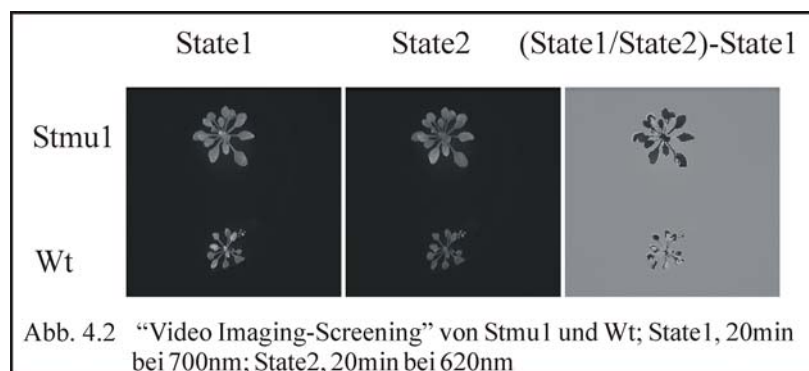
Bei dem verwendeten „Screening“-Verfahren wurden teilweise auch Mutanten mit stark erhöhter Fluoreszenz unter State1- und State2-Bedingungen identifiziert, deren gestörte Fluoreszenz-Abnahme nicht auf einen Defekt der „State Transition“ zurückging. Mit der 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie wurden daher Spektren der potentiellen Mutanten unter State1- und State2-Bedingungen aufgenommen und die Migration der LHCII-Proteine als Fluoreszenz Zu-/Abnahme an den Photosystemen detektiert.



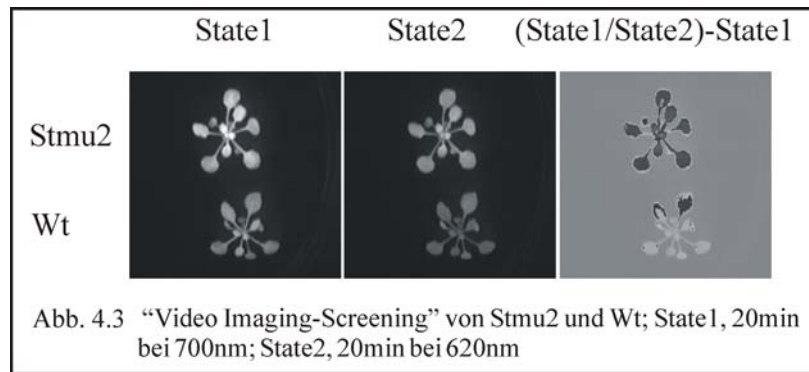
Es wurden ca. 10.000 *Arabidopsis thaliana* „Neutron bombardment“- und EMS-Mutanten auf den Phänotypen eines „State Transition“-Defektes analysiert. Nach photoautotropher Anzucht und „Video Imaging-Screening“-Verfahren wurden 21 Individuen mit dem Phänotyp einer potentiellen „State Transition“-Mutante identifiziert (Abb. 4.1). Die erhaltenen Mutanten wurden kultiviert und der Phänotyp nachfolgend mit 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie überprüft. Von den 21 Mutanten des „Video Imaging-Screening“ konnten daraufhin drei als „State Transition“-Mutanten verifiziert werden. Die identifizierten „State Transition“-Mutanten wurden als Stmu1, Stmu2 und Stmu10 bezeichnet.

4.1.2 Identifizierung der „State Transition“-Mutanten

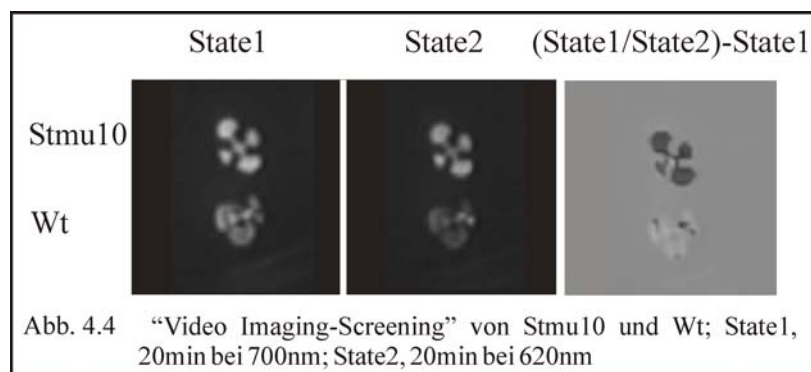
Ca.10.000 *Arabidopsis thaliana* Mutanten-Linien wurden dem „Screening“-Verfahren unterzogen (Abb. 4.1). Die Individuen wurden mit Hoagland-Minimalmedium auf Photoautotrophie selektiert. In dem anschließenden „Video Imaging-Screening“ wurden 21 Individuen als potentielle „State Transition“-Mutanten identifiziert. Das Screening der drei „State Transition“-Mutanten Stmu1, Stmu2 und Stmu10 wurde nachfolgend beispielhaft dargestellt.



Die „State Transition“-Mutante Stmu1 zeigte unter State1- und State2-Bedingungen eine vergleichsweise schwache Fluoreszenz (Abb. 4.2). Die Fluoreszenz-Abnahme ist im Vergleich zu dem Wt gestört. Stmu1 konnte in dem Ergebnis-Spektrum (Abb. 4.2) als potentielle „State Transition“-Mutante identifiziert werden.



Die „State Transition“-Mutante Stmu2 zeigte unter State1- und State2-Bedingungen eine stetig erhöhte Fluoreszenz (Abb. 4.3). Bei der Mutante konnte bei dem Übergang von State1 zu State2 eine Fluoreszenz-Abnahme detektiert werden. Diese Abnahme ist im Vergleich zu der des Wt aber geringer, so dass Stmu2 in dem Ergebnis-Spektrum (Abb. 4.3) als potentielle „State Transition“-Mutante identifiziert werden konnte.

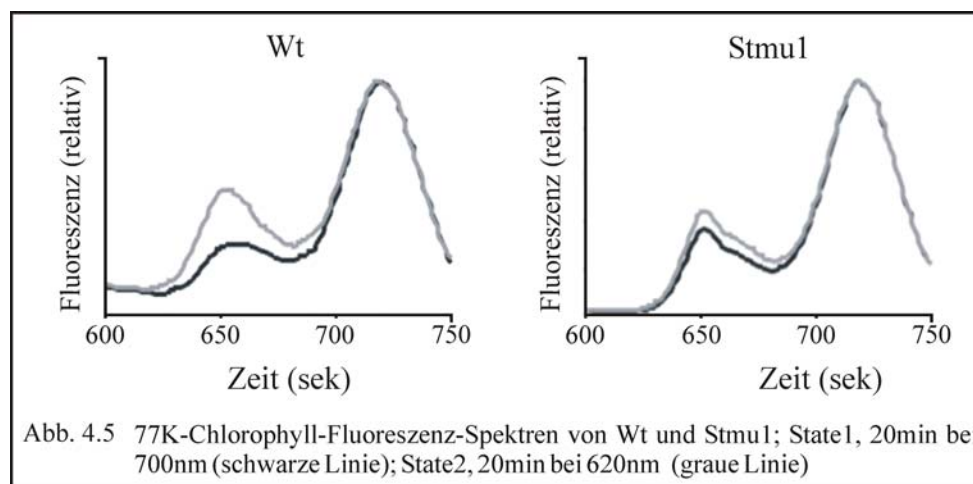


Die „State Transition“-Mutante Stmu10 zeigte unter State1-Bedingungen eine vergleichsweise geringe Erhöhung der Fluoreszenz (Abb. 4.4). Diese nahm in Folge des Überganges zu State2-Bedingungen nicht ab (Abb. 4.4). Durch die andauernd erhöhte Fluoreszenz konnte Stmu10 in dem Ergebnis-Spektrum (Abb. 4.4) eindeutig als potentielle „State Transition“-Mutante identifiziert werden.

4.1.3 Verifizierung der „State Transition“-Mutanten

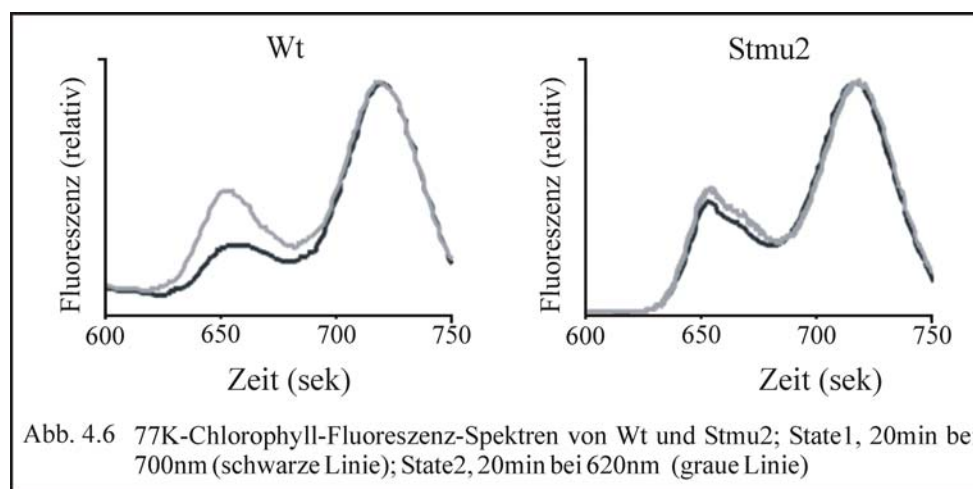
Die Abnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz kann neben der „State Transition“ auch durch die anderen Parameter der nicht photochemischen Fluoreszenz-Abnahme, q_E und q_I , hervorgerufen werden (Müller et al., 2001). Daher wurden neben „State Transition“-Mutanten mit dem verwendeten „Video-Imaging-Screening“-Verfahren auch z.T. Mutanten mit anderen NPQ-Mutationen identifiziert. Mit der Methode der 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie (s. 3.4.2.2) konnte neben der Abnahme der PSII-LHCII-Fluoreszenz auch die Zunahme der PSI-LHCII-Fluoreszenz, bei einem Wechsel von State1- zu State2-Bedingungen, detektiert werden (Emlyn-Jones et al., 1999, Kruse et al., 1999, Fleischmann et al., 1999, Lunde et al., 2000).

Mit dieser Methode wurden die im „Video-Imaging-Screening“ identifizierten 21 potentiellen „State Transition“-Mutante analysiert. Von den Mutanten wurden Spektren in den State1- und State2-Zuständen aufgenommen und mit Wt-Kontrollen verglichen. Das Emissions-Spektrum-Maximum des PSII-LHCII bei 685nm nahm dabei durch die LHCII-Migration bei dem Übergang von State1 zu State2 ab. Das Fluoreszenz-Maximum des PSI mit den assoziierten LHCI und LHCII bei 735nm nahm entsprechend zu. Der Phänotyp einer „State Transition“-Mutante konnte daher durch ein identisches Spektrum bei State1- und State2-Bedingungen verifiziert werden. Von den mit „Video-Imaging“ identifizierten 21 potentiellen Mutanten erfüllten die Mutanten Stmu1, Stmu2 und Stmu10 dieses Kriterium.



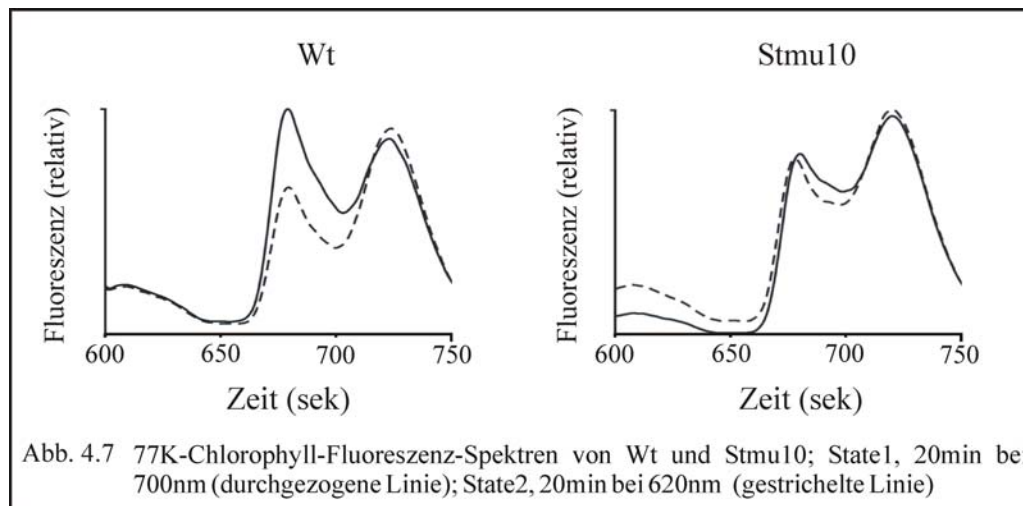
Die auf das PSI-Maximum bei 735nm normierten 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektren von Wt und Stmu1 zeigten deutliche Unterschiede.

Bei State2-Bedingungen zeigte der Wt bei 685nm ein niedrigeres PSII-LHCII Fluoreszenz-Maximum, das sich in Folge der Migration der mobilen LHCII-Proteine zu PSII bei State1-Bedingungen deutlich erhöhte (Abb. 4.5). Die „State Transition“-Mutante *Stmu1* zeigte dagegen einen unterschiedlichen Kurvenverlauf. Bei State2-Bedingungen war die PSII-LHCII-Fluoreszenz im Vergleich zu der des Wts deutlich erhöht (Abb. 4.5). Das Maximum bei 685nm nahm bei dem State1-Zustand nur geringfügig zu (Abb. 4.5). Dieses weist auf eine defekte Migration der mobilen LHCII-Proteine zwischen den Photosystemen hin und bestätigt den mit dem „Video Imaging-Screening“ identifizierten Phänotypen einer „State Transition“-Mutante.



Die auf das PSI-Maximum bei 735nm normierten 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektren von Wt und *Stmu2* zeigten deutliche Unterschiede. Bei State2-Bedingungen zeigte der Wt bei 685nm eine niedrige PSII-LHCII Fluoreszenz, die sich in Folge der Migration der mobilen LHCII-Proteine zu PSII bei State1-Bedingungen deutlich erhöhte (Abb. 4.6). Die „State Transition“-Mutante *Stmu2* dagegen zeigte einen unterschiedlichen Kurvenverlauf und bei State2-Bedingungen ein deutlich erhöhte PSII-LHCII-Fluoreszenz (Abb. 4.6). Diese nahm bei dem State1-Zustand nur geringfügig zu. Das Fluoreszenz-Maximum des PSII-LHCII bei 685nm war bei State1-Bedingungen im Vergleich zu dem Wt gleich.

Die nur geringfügige Zunahme der PSII-LHCII-Fluoreszenz (Abb. 4.6) weist auf eine defekte Migration der mobilen LHCII-Proteine zwischen den Photosystemen hin und bestätigt den mit dem „Video Imaging-Screening“ identifizierten Phänotypen „State Transition“-Mutante.



Die 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektren von Wt und Stmu10 zeigten deutliche Unterschiede. Bei State2-Bedingungen zeigte der Wt bei 685nm ein niedriges PSII-LHCII-Fluoreszenz-Maximum, das sich in Folge der Migration der mobilen LHCII-Proteine zu PSII bei State1-Bedingungen deutlich erhöhte (Abb. 4.7). Das Fluoreszenz-Maximum des PSI-LHCI-LHCII bei 735nm nahm dagegen deutlich ab (Abb. 4.7).

Die „State Transition“-Mutante Stmu10 dagegen zeigte bei State2-Bedingungen ein deutlich erhöhtes PSII-LHCII-Fluoreszenz-Maximum, das bei dem State1-Zustand nur geringfügig zu nahm. Das PSI-LHCI-LHCII-Fluoreszenz-Maximum der Mutante nahm bei State2-Bedingungen nur geringfügig zu State1-Bedingungen zu (Abb. 4.7). Es war bei beiden Zuständen deutlich gegenüber dem PSII-LHCII-Fluoreszenz-Maximum erhöht (Abb. 4.7). Der State1-Zustand und State2-Zustand von Stmu10 glichen dem State2-Zustand des Wt (Abb. 4.7).

Die nur geringfügige Zunahme der PSII-LHCII-Fluoreszenz (Abb. 4.7) weist auf eine defekte Migration der LHCII zwischen den Photosystemen hin und bestätigt den mit dem „Video Imaging-Screening“ identifizierten Phänotypen einer „State Transition“-Mutante.

4.1.4 Die Analyse der Stabilität der Mutation

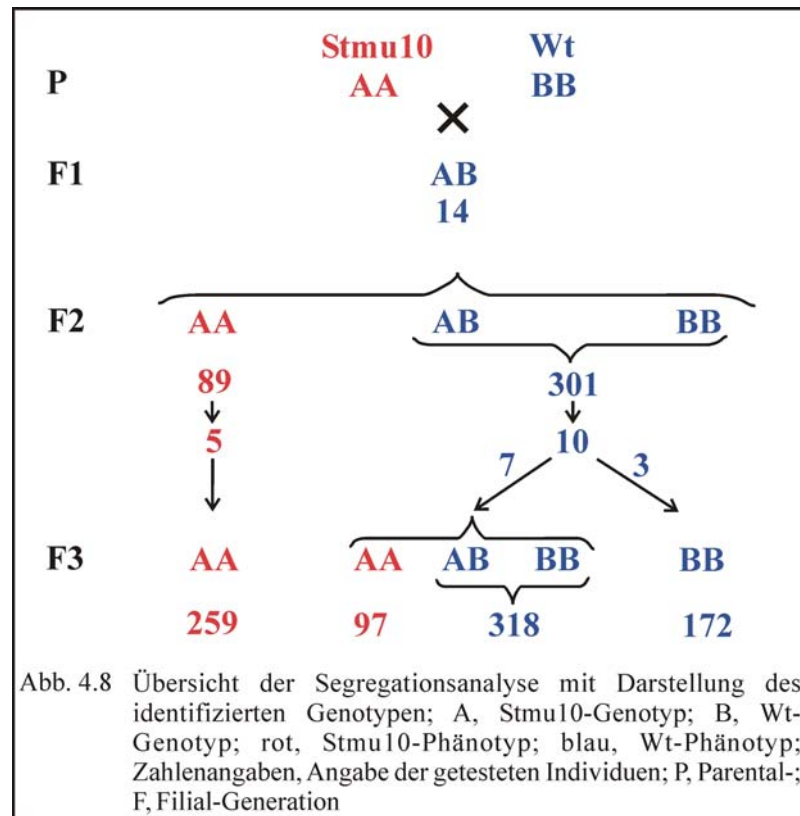
Zur Kultivierung einer stabilen Mutanten-Linie wurden die drei Mutanten Stmu1, Stmu2 und Stmu10 durch Selbstbefruchtung vermehrt. Die Filial-Generationen der Mutanten wurden mit dem „Video-Imaging“-Screening analysiert. Bei den „Neutron bombardment“-Mutanten Stmu1 und Stmu2 konnte weder in der F1- noch in der F2-Generation der Phänotyp einer „State Transition“-Mutante reproduziert werden. Die Mutationen in Stmu1 und Stmu2 erwiesen sich als instabil. Die Mutation der „State Transition“-Mutante Stmu10 erwies sich auch in den folgenden Generationen (F4) als stabil. Daher wurde Stmu10 phänotypisch und genotypisch charakterisiert.

4.1.5 Die genotypische Charakterisierung von Stmu10

Als Grundlage der genotypischen Charakterisierung von Stmu10 wurde die Segregation des Phänotyps analysiert. Durch die Identifizierung des homozygot rezessiven Erbganges der „State Transition“-Mutation in Stmu10 konnte der Locus der Mutation mit der „mapping“-Analyse auf dem *Arabidopsis thaliana*-Genom eingegrenzt werden. Mit anschließenden vergleichenden RT-PCR- und Northern-Blot-Analysen konnte das deletierte Gen identifiziert werden.

4.1.5.1 Segregationsanalysen

Die Segregationsanalysen wurden zur Identifikation der Vererbung des Stmu10-Phänotyps durchgeführt. Hierbei wurde Stmu10 mit dem eigenen Ecotyp *Columbia* gekreuzt und die Aufspaltung der Stmu10-Phänotypen in den F1-, F2- und F3-Generationen durch das „Video Imaging-Screening“ analysiert.

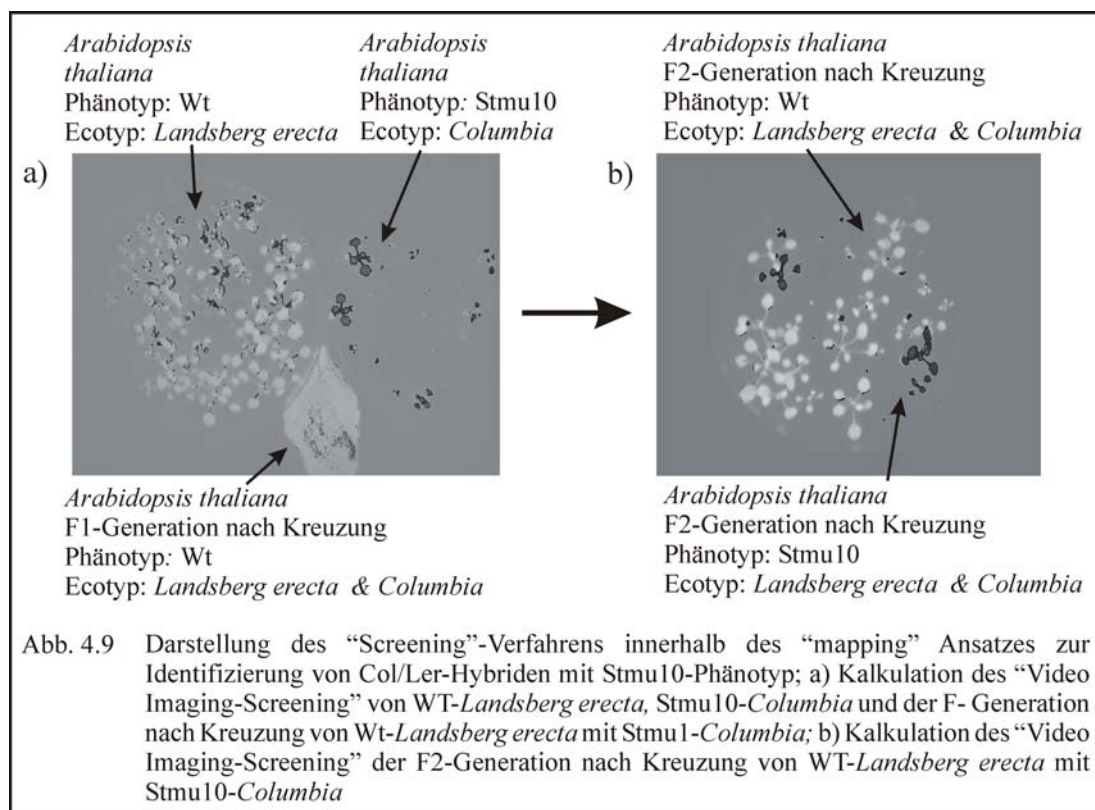


Nach Kreuzung der Parental-Generation wurden 14 Linien der F1-Generation mit Wt-Phänotyp durch Selbstbefruchtung in ihre F2-Generation überführt und anschließend 390 F2-Individuen auf ihren Phänotyp untersucht. Es konnten 301 Wt-Phänotypen und 89 Stmu10-Phänotypen identifiziert werden, welches einem Wt zu Stmu10-Verhältnis von 1 zu 3,4 entspricht (Abb. 4.8). Anschließend wurden jeweils 10 Wt- und 5 Stmu10-F2-Phänotypen durch Selbstbefruchtung in ihre F3-Generation überführt und jeweils 60 Samen einer jeden Linie durch das „Video Imaging-Screening“ analysiert. Als Ergebnis konnten bei drei der 10 F2-Wt-Linien nur Wt-Phänotypen identifiziert werden. Bei den anderen 7 Wt ergab sich eine Aufspaltung in Wt- und Stmu10-Phänotyp im Verhältnis von 1 zu 3,3 (Abb. 4.8). Für die 5 getesteten Stmu10-Phänotyp-Linien konnten in der F3-Generation ausschließlich Stmu10-Phänotypen identifiziert werden (Abb. 4.8).

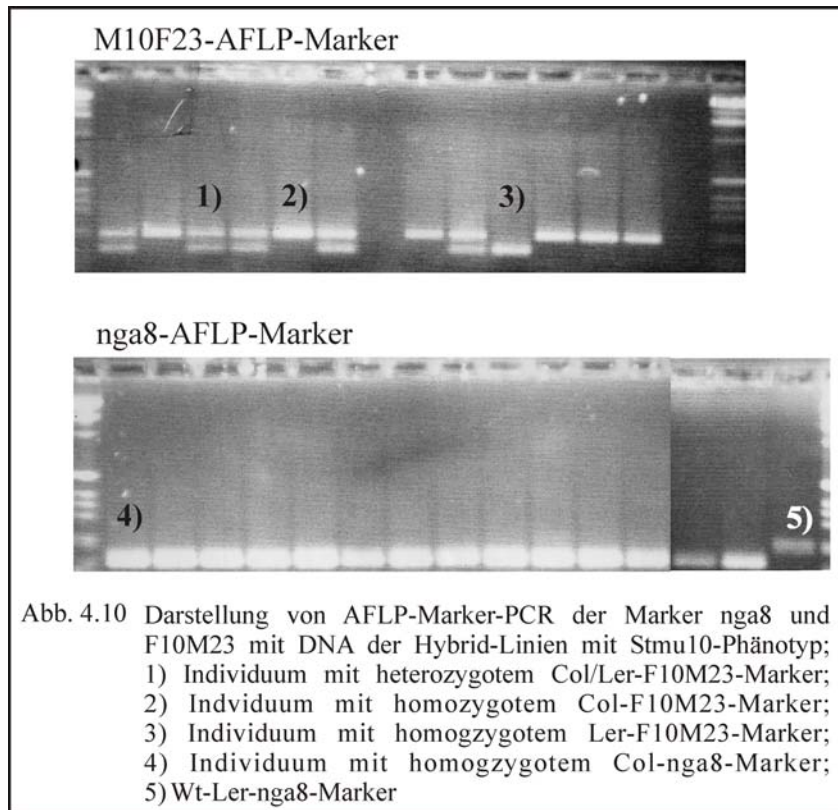
Die Aufspaltung des Stmu10-Phänotyps hielt sich streng an das 1. und 2. Mendelsche Gesetz. Damit wurde die Mutation als Auslöser eines homozygot-rezessiven Erbganges identifiziert. Zur Bestimmung des Locus konnte daher der „mapping“-Ansatz verwendet werden.

4.1.5.2 Die „mapping“-Analyse des Locus

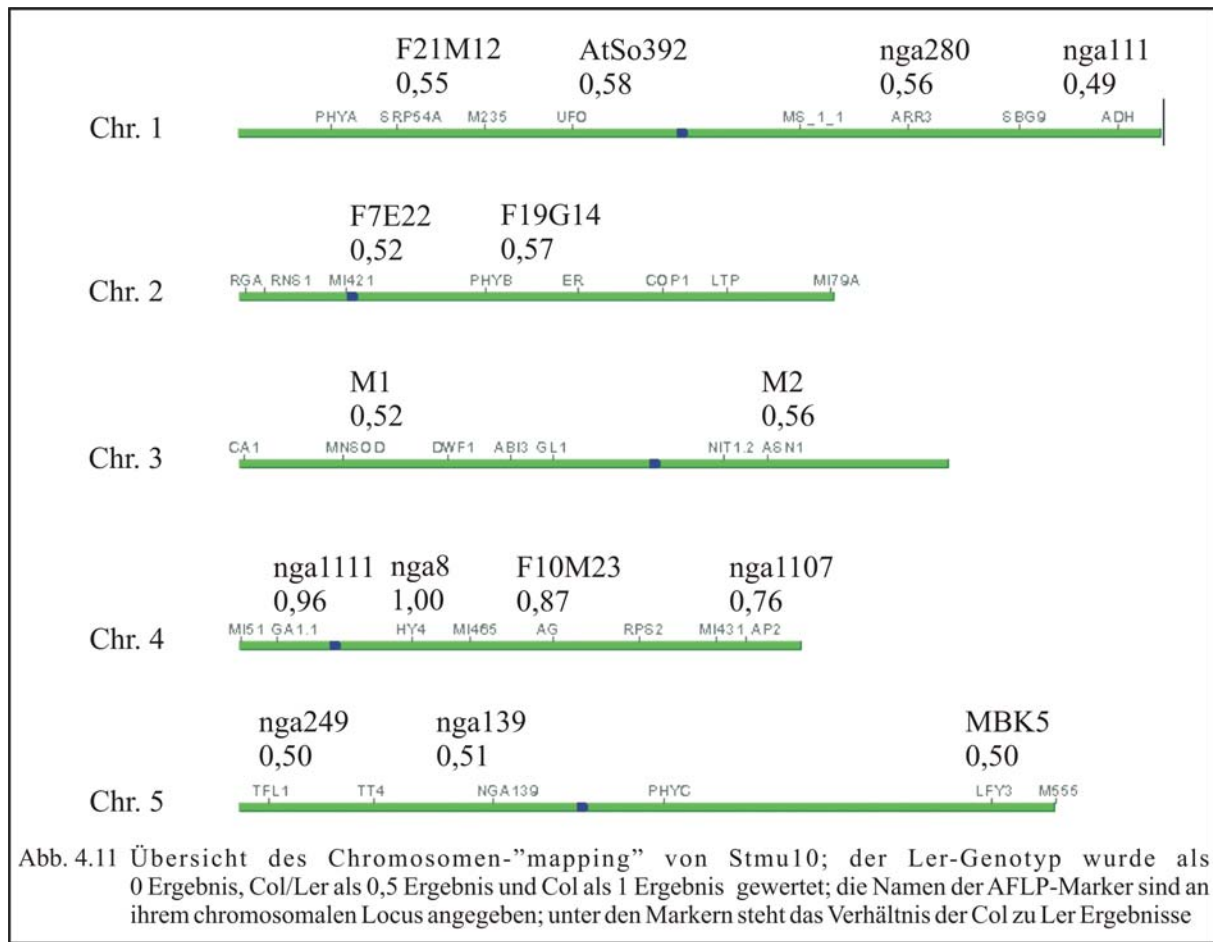
Der Locus der Mutation wurde mit einer „mapping“-Analyse eingegrenzt (Alonso-Blanco und Korneef, 2000, Jander et al., 2002) (s. 3.2.5). Hierzu wurde die Ecotyp *Columbia*-Mutante mit einem Ecotyp *Landsberg erecta*-Wt gekreuzt und durch Selbstbefruchtung in die F₂-Generation überführt. Die erhaltene F₂-Col/Ler-Hybrid-Generation wurde mit dem „Video Imaging-Screening“ auf den *Stmu10*-Phänotyp analysiert (Abb. 4.9). Die F₂-Hybride mit *Stmu10*-Phänotyp enthielten an dem Locus der Mutation Ecotyp Col-DNA, so dass mit AFLP-Markern die Mutation auf dem *Arabidopsis thaliana*-Genom eingegrenzt werden konnte (Alonso-Blanco et al., 1998).



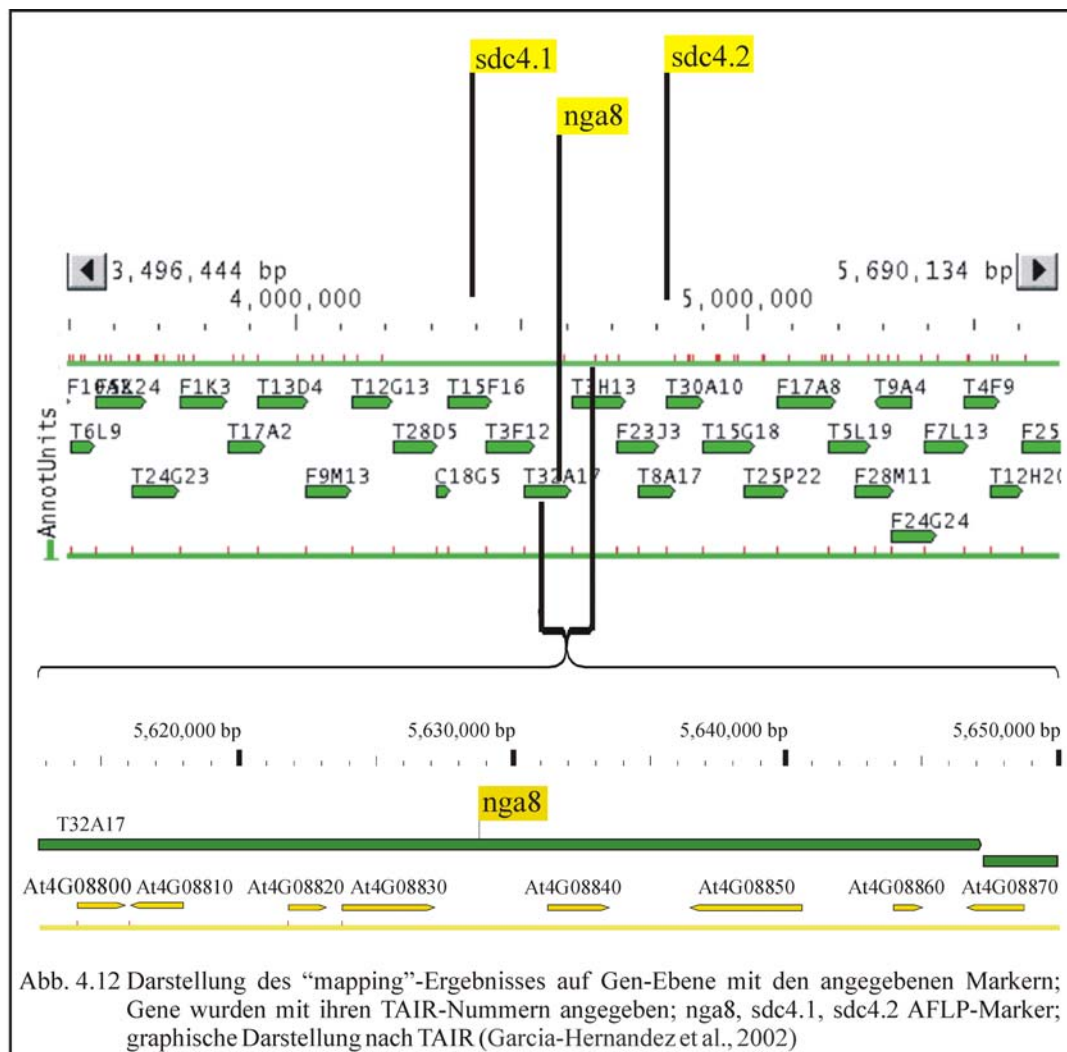
Aus der Hybrid-F₂-Generation wurden von 1506 Individuen 306 mit einem *Stmu10*-Phänotyp identifiziert (Abb. 4.9). Mit den identifizierten Pflanzen wurden DNA-Extraktionen durchgeführt (s. 3.2.1.6.1) und diese anschließend für AFLP-Marker-PCR verwendet (Alonso-Blanco et al., 1998) (Abb. 4.10).



Mit 60 identifizierten Stmu10-Phänotypen wurde in einem ersten Schritt mit 15 AFLP-Markern (Abb. 3.3) die Mutation auf den Chromosomen des *Arabidopsis thaliana*-Genoms lokalisiert (Alonso-Blanco et al., 1998). Bei den 900 durchgeführten PCRs konnte eindeutig zwischen den drei Genotypen (Abb. 4.10) homozygot Col, homozygot Ler und heterozygot Col/Ler unterschieden werden.



Als Ergebnis konnte auf dem oberen Arm des Chromosoms 4 eindeutig ein zu dem Ecotyp Col verschobenes Verhältnis detektiert werden (Abb. 4.11). Da bei dem AFLP-Marker nga8 bei den 60 Individuen kein Ler- oder Hybrid-Genotyp detektiert werden konnte, wurde in einem nächsten Schritt mit der Cereon™-Ecotyp *Landsberg erecta*-Datenbank (Jander et al., 2002) weitere AFLP-Marker zur Eingrenzung des mutierten Locus konstruiert. Mit den gewählten Marker, sdc4.1 und sdc4.2, sollte identifiziert werden, ob der Locus der Mutation auf dem Chromosom über oder unter dem nga8-Marker lokalisiert war. Die anschließende PCR-Analyse wurde mit den 306 Stmu10-Phänotypen der Col/Ler-F2-Hybrid-Generation durchgeführt.

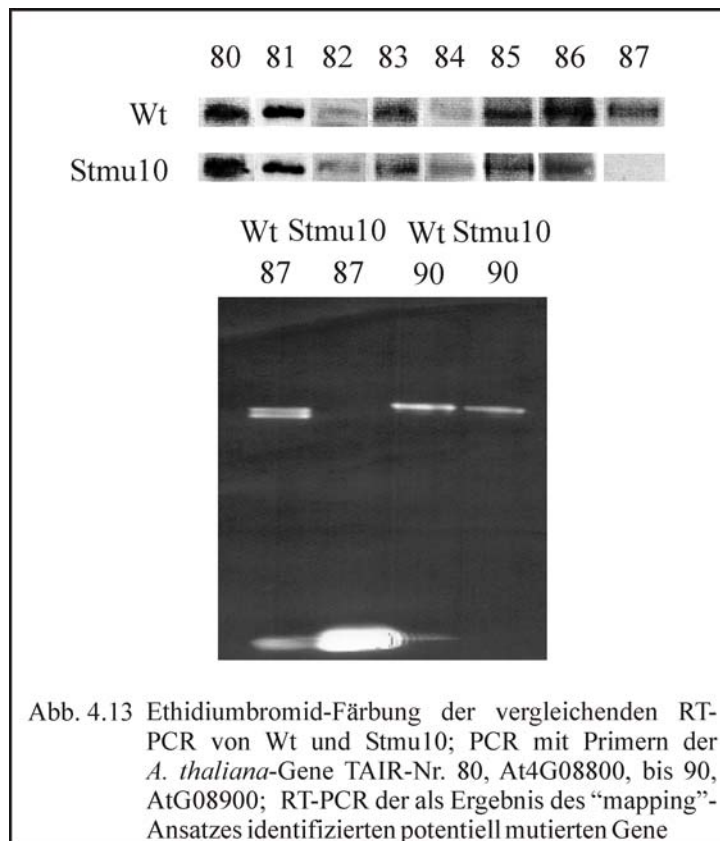


Nach Durchführung der AFLP-Marker-Analyse wurde bei dem Marker sdc4.1 ein Col zu Ler Verhältnis von 0,97, bei nga8 von 1 und bei sdc4.2 von 0,99 identifiziert. Von 308 analysierten Hybriden wurden nur zwei mit einem nga8-Ler-Locus detektiert. Die Mutanten wurden, wie 48 nga8-Col-Individuen, durch Selbstbefruchtung in die F3-Generation nach Kreuzung überführt. Bei der „Video Imaging“-Analyse der nga8-Ler-Individuen konnte in der F3-Generation nach Kreuzung nur der Wt-Phänotyp und bei den 48 nga8-Col-Individuen nur „State Transition“-Mutanten identifiziert werden. Der Fehler des „Video Imaging-Screening“-Verfahrens war daher 0,98%.

Durch die AFLP-Analysen konnte die Mutation auf 1cM und, bei Hypothese einer Gauß-Verteilung der NB-Mutationen, innerhalb eines Bereiches von 50.000bp um den nga8-Marker lokalisieren werden (Abb. 4.12). Aufgrund der statistischen Verteilung hatte eine Lokalisierung der Mutation in Richtung des sdc4.1-Markers eine niedrigere Wahrscheinlichkeit als in Richtung des sdc4.2-Markers.

4.1.5.3 Die Identifizierung des deletierten Gens durch RT-PCR

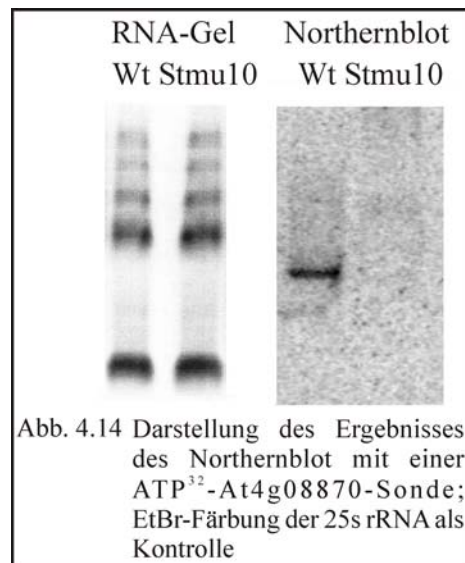
Die Expression der, in dem Bereich um den nga8-Marker lokalisierten Gene (Abb. 4.13), wurde anschließend analysiert. Dies wurde mit der Methode der vergleichenden RT-PCR durchgeführt (s. 3.2.3). RNA von Wt und Mutante wurde extrahiert und revers transkribiert. Die Menge der cDNA wurde mit aktin-PCR normalisiert und die Expression der Gene At4G0880-At4G08870 vergleichend analysiert.



Die Expression der Gene von Wt und Mutante (Abb. 4.13) zeigten bis auf das At4G08870 keine Unterschiede. Das Transkript von At4G08870 konnte mit der Methode der RT-PCR in Stmu10 nicht detektiert werden.

4.1.5.4 Die Northernblot-Analysen von At4G08870

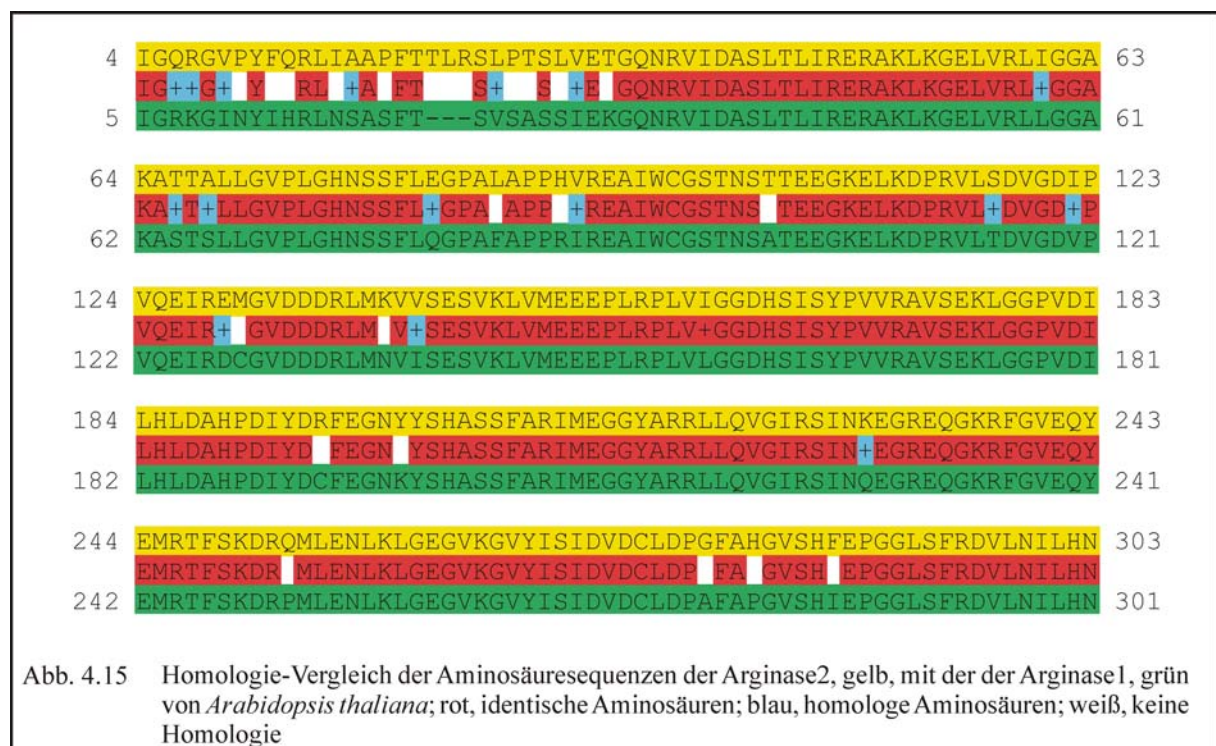
Das Transkript des *Arabidopsis thaliana*-Gens At4G08870 konnte mit der Methode der RT-PCR in der Mutante nicht detektiert werden. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde eine Northernblot-Analyse durchgeführt (s. 3.2.4). RNA von Wt und Mutante wurde aufgetrennt, geblottet und die Transkript-Menge mit einer radioaktiven, At4G08870-spezifischen Sonde detektiert.



Das At4g08870-Transkript des Wt konnte eindeutig detektiert werden (Abb. 4.14). Bei Stmu10 konnte kein At4g08870-Transkript detektiert werden (Abb. 4.14). Da gleiche RNA-Mengen analysiert wurden (Abb. 4.14) konnte mit der Methode der Northernblot-Analyse das Ergebnis der RT-PCR bestätigt werden. Die Transkription des *Arabidopsis thaliana*-Gens At4G08870 in der „State Transition“-Mutante Stmu10 ist defekt (Abb. 4.14).

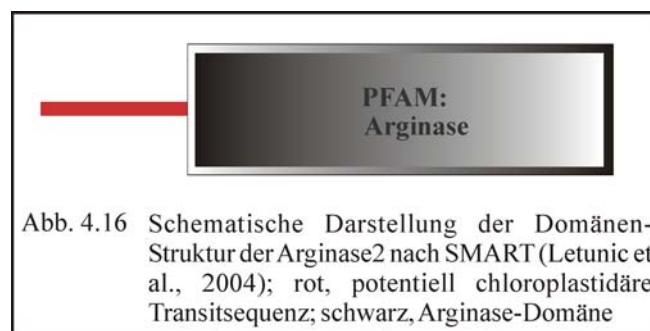
4.1.5.5 „in silico“-Analyse von At4g08870

Die Transkription des *Arabidopsis thaliana*-Gens At4g08870 wurde als möglicher Auslöser des Stmu10-Phänotyps identifiziert. Durch die Annotierung der *Arabidopsis thaliana*-Datenbank (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002), konnten eine erste Charakterisierung des Gens vorgenommen werden. Durch „in silico“-Analysen konnte At4g08870 als ein Gen von 1066bp identifiziert werden, welches für eine potentielle Arginase in *Arabidopsis thaliana* kodiert. Mit Transitsequenz besitzt die Arginase ein berechnetes Molekulargewicht von 37980,44Da, ohne von 34219,98Da. Durch ihre, mit dem Programm BLAST™ (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ermittelte, hohe Homologie zu den TypII-Arginasen des Menschen (e-Rate e^{-79}) wurde das Genprodukt von At4g08870 als Arginase2 benannt.



In *Arabidopsis thaliana* existieren zwei Gene, die potentiell für Arginasen kodieren. Das zweite Gen, At4G08900 kodiert für ein Protein, welches als Arginase1 bezeichnet wird und eine Homologie von 86% zur Arginase2 besitzt (Abb. 4.15). Die Transitsequenzen der Arginasen (53%) haben im Vergleich zu den Arginasen-Domänen (95%) eine geringere Homologie.

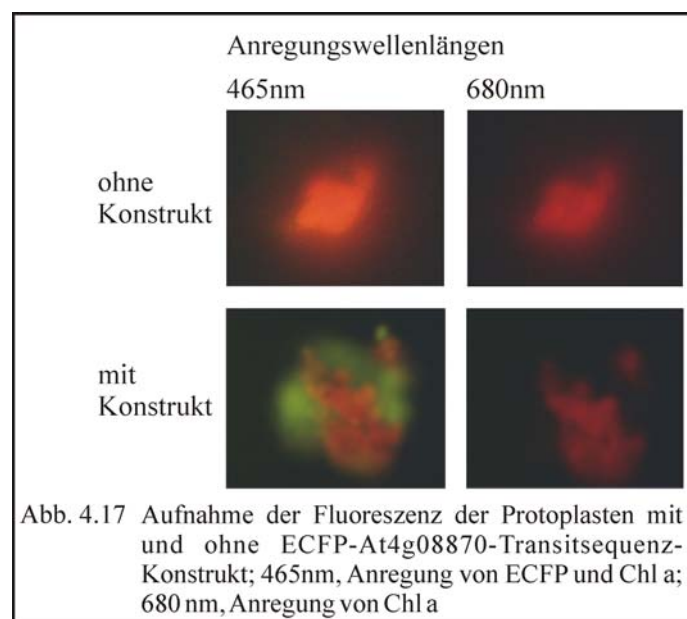
Mit dem Programm SMART™ (Letunic et al., 2004) wurden weitere Charakterisierungen der Arginase1 durchgeführt. Das Programm nutzt dabei das Programm Pfam™ (Bateman et al., 2004) und verglich die Domänen der Arginase1 mit Domänen von Proteinen deren Funktion bekannt war. Mit dem Programm SMART™ (Letunic et al., 2004) wurde daraus ein schematischer Aufbau der Domänen-Struktur mit Angabe deren Wahrscheinlichkeit erstellt. Mit dem Programm TargetP™ (Emanuelsson et al., 2000) wurde die Transitsequenz und die Lokalisierung der Arginase2 analysiert. Das Programm verglich die charakteristischen Aminosäure-Sequenzen der Transitsequenz mit schon lokalisierten Proteinen und gab eine Wahrscheinlichkeit der Lokalisierung an.



Die Arginase-Domäne der Arginase2 wurde mit dem SMART™ (Letunic et al., 2004) eindeutig identifiziert. Sie konnte als 280 Aminosäuren lange Sequenz mit einer e-Rate von $7,2e^{-122}$ eindeutig erkannt werden (Abb. 4.16). Die 34 Aminosäuren lange Transitsequenz der Arginase2 wurde von TargetP™ (Emanuelsson et al., 2000) mit einer Wahrscheinlichkeit von 72% mitochondriell und mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% chloroplastidär lokalisiert. Die Transitsequenz der Arginase1 dagegen wurde nach TargetP™ (Emanuelsson et al., 2000) mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% in dem Mitochondrium lokalisiert.

4.1.5.6 Die Lokalisierung der Arginase2

Die Lokalisierung der Arginase2 war nach Vorhersage von TargetP™ (Emanuelsson et al., 2000) mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% chloroplastidär und 72% mitochondriell. Dies führte zur Fragestellung, in welchem der beiden Zellorganellen die Arginase2 lokalisiert war. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein ECFP-Ansatz gewählt (s. 3.2.6). Dabei wurde die für die 34 Aminosäuren lange Transitsequenz kodierende Gensequenz zwischen den 35S-Promotor des TMV und der für das ECFP kodierenden Sequenz kloniert (Reichel et al., 1996). Der Vektor wurde in *E.coli* vermehrt und anschließend *Arabidopsis-thaliana*-Protoplasten transformiert. Unter Kontrolle des starken 35S-Promotors wurde das Transitsequenz-ECFP-Konstrukt in den Protoplasten exprimiert. Der Lokalisierung des Proteins wurde durch Anregung des ECFP im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.



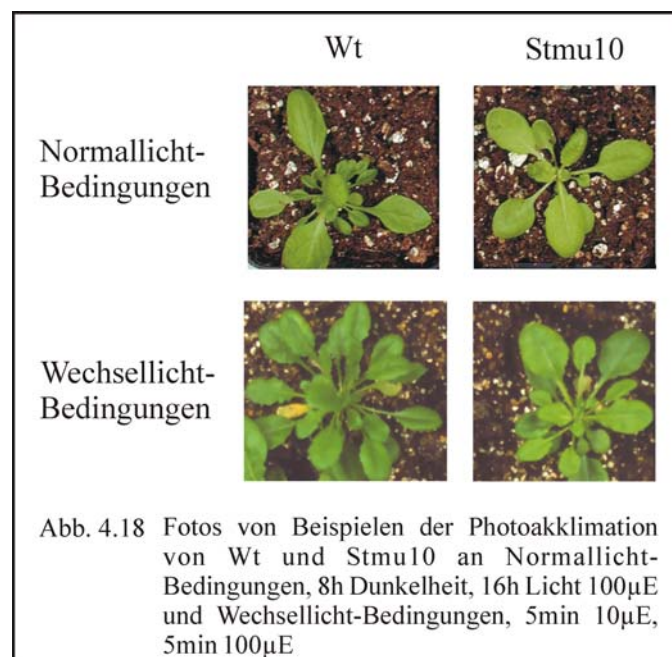
Bei einer Extinktions-Wellenlänge von 680nm wurde die Fluoreszenz des PSII angeregt. Da diese in den Chloroplasten lokalisiert sind, entspricht die rote Fluoreszenz bei 680nm der chloroplastidären Lokalisation. Bei einer Extinktionswellenlänge von 465nm werden ECFP und PSII angeregt. Im Vergleich zur nicht transformierten Kontrolle kann in dem transformierten Protoplasten eine deutliche grüne Emissionsfluoreszenz des ECFP detektiert werden (Abb. 4.17). Diese Fluoreszenz ist eindeutig nicht in dem Chloroplasten lokalisiert, da diese weiterhin eine rote Fluoreszenz emittieren (Abb. 4.17). Das erzielte Ergebnis schliesst somit eine Lokalisierung der Arginase2 in dem Chloroplasten aus.

4.1.6 Die phänotypische Charakterisierung von Stmu10

Neben der Identifikation des mutierten Locus wurde die „State Transition“-Mutante Stmu10 eingehend phänotypisch charakterisiert. Hierzu wurden verschiedene Photoakklimationsprozesse induziert und physiologische Parameter vergleichend analysiert. Interessanterweise löste die Mutation in dem mitochondriell lokalisierten Protein einen Defekt in der redox-regulierten Kurzzeitlicht-Akklimation aus (State Transitions). Daher stand die Untersuchung der Mutante auf mögliche defekte der Lichnanpassung im Zentrum des Interesses.

4.1.6.1 Das veränderte Wachstum von Stmu10 bei Wechsellicht-Bedingungen

Bei Kultivierung unter Normallicht-Bedingungen konnte bei der Mutante kein Wachstumsunterschied detektiert werden (Abb. 4.17). Daher wurde die Mutante Lichtbedingungen ausgesetzt, die den Photoakklimationsprozess der „State Transition“ induzierte. Stmu10 und Wt wurden vergleichend in Wechsellicht-Bedingungen (5min 10 μ E, 5min 100 μ E) kultiviert (Lunde et al., 2003). Dieser Wechsel induzierte den stetigen Wechsel von State1 zu State2 und somit den Prozess der „State Transition“.



Die bei Normallicht-Bedingungen kultivierten Mutanten zeigten im Vergleich zu dem Wt keine Wachstumsunterschiede. Der in dem „Screening“-Verfahren detektierte Fluoreszenz-Unterschied beeinflusste die Vitalität der Pflanzen nicht sichtbar (Abb. 4.18). In Wechsellicht kultivierte Mutanten zeigten dagegen einen eindeutigen Phänotyp. Das Wachstum der Mutante war im Vergleich zu dem des Wt eindeutig geringer (Abb. 4.18). Bei Stmu10 konnte eine Verringerung der Fähigkeit der Photoakklimation an wechselnde Lichtbedingungen detektiert werden.

4.1.6.2 Die Quantifizierung der „State Transition“ (nach Lunde et al., 2000)

Die Deletion der „State Transition“ wurde mit dem Verfahren nach Lunde et al., (2000) quantifiziert (s. 3.4.2.1.2). Dabei wurde die Chlorophyll-Fluoreszenz mit der Pam™ (WALZ, Deutschland) detektiert. Nach einer Inkubation mit State2-Licht (20min, 480nm, 100μE) wurde zusätzlich für 20min State1-Licht (700nm, 20μE) zugefügt und die Fluoreszenz während dieses Zeitraums detektiert. Mit den während der Übergangsphasen detektierten Werten wird der relative Fluoreszenz-Wechsel, F_r , berechnet. Dieser entspricht nach Lunde et al., (2000), als $F_r = (F_{II'} - F_{II}) / (F_I - F_I)$, der Migration der mobilen LHCII-Proteine zwischen den Photosystemen.

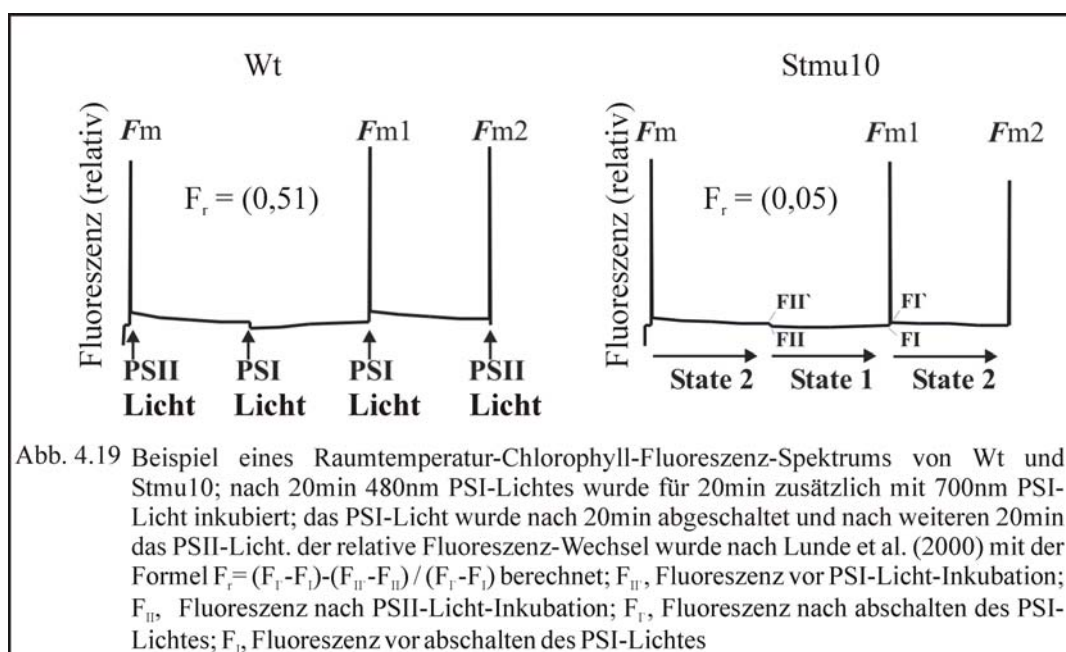
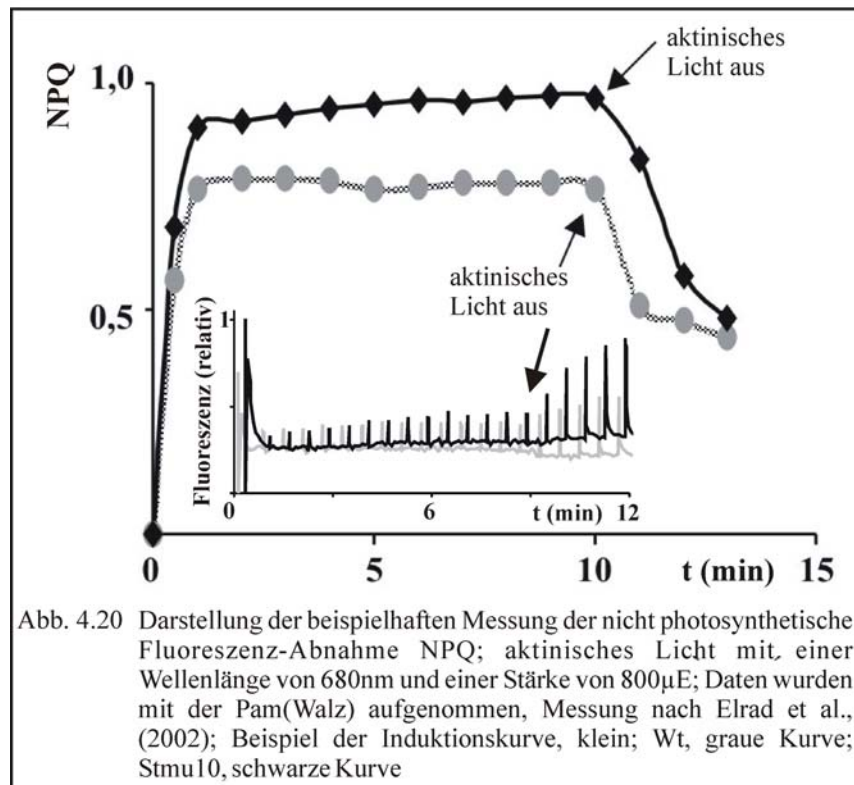


Abb. 4.19 Beispiel eines Raumtemperatur-Chlorophyll-Fluoreszenz-Spektrums von Wt und Stmu10; nach 20min 480nm PSI-Lichtes wurde für 20min zusätzlich mit 700nm PSI-Licht inkubiert; das PSI-Licht wurde nach 20min abgeschaltet und nach weiteren 20min das PSII-Licht. der relative Fluoreszenz-Wechsel wurde nach Lunde et al. (2000) mit der Formel $F_r = (F_{II'} - F_{II}) / (F_I - F_I)$ berechnet; F_{II} , Fluoreszenz vor PSI-Licht-Inkubation; $F_{II'}$, Fluoreszenz nach PSII-Licht-Inkubation; F_I , Fluoreszenz nach abschalten des PSI-Lichtes; F_I' , Fluoreszenz vor abschalten des PSI-Lichtes

Die während der State1-Phase nicht zunehmende Chlorophyll-Fluoreszenz der Mutante zeigte eindeutig die gestörte Migration der mobilen LHCII-Proteine von PSI zu PSII (Abb. 4.19). Die Berechnung des relativen Fluoreszenz-Wechsels geht auf die Formel $F_r = (F_T - F_I) - (F_{II} - F_{II}) / (F_T - F_I)$ zurück (Lunde et al., 2003). Die Anzahl der mit PSII assoziierten LHCII entsprechen am Ende der State1-Phase dem Term $(F_T - F_I)$ und am Ende der State2-Phase dem Term $(F_{II} - F_{II})$. Durch Division mit $(F_T - F_I)$ kann der relative Fluoreszenz-Wechsel als Maß der „State Transition“ berechnet werden (Abb. 4.19). Der niedrige relative Fluoreszenz-Wechsel, F_r , der Mutante von 0,05 im Vergleich zu dem des Wt 0,51 bestätigt den Defekt der Migration der mobilen LHCII-Proteine. Im Vergleich zu dem Wt besitzt die Mutante eine „State Transition“-Aktivität von 9,8%.

4.1.6.3 Die Messung der nicht-photosynthetischen Fluoreszenz-Abnahme (NPQ)

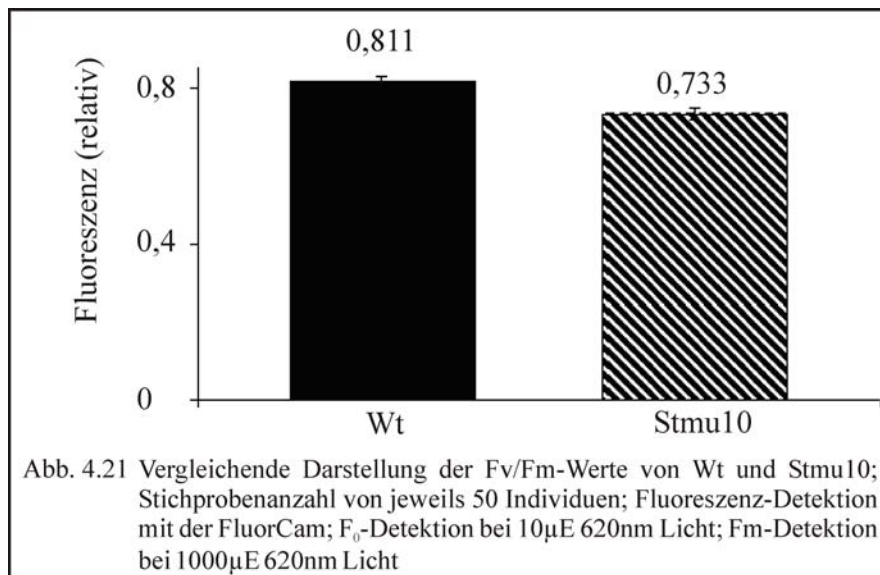
Neben der „State Transition“ kommt es als Folge von veränderten Lichtbedingungen zur Induktion von weiteren Photoakklimationsprozessen. Die Gesamtheit dieser Prozesse wird durch die nicht photosynthetische Fluoreszenz-Abnahme (NPQ) beschrieben. Diese besteht aus der „State Transition“ q_T , dem Energie abhängigen Teil q_E und dem photoinhibitorischen Anteil q_I (Müller et al., 2001). Mutationen der dem Violaxanthin/Zeaxanthin-Zyklus zugeordneten q_E und q_I äußern sich in einem unterschiedlichen Kurvenverlauf der Fluoreszenz-Abnahme im Vergleich zu dem Wt. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde nach Elrad et al., (2001) mit der Formel $(F_m - F_m') / F_m'$ berechnet (s. 3.2.1.4).



Der Kurvenverlauf der nicht photosynthetischen Fluoreszenz-Abnahme NPQ der Mutante zeigt eine im Vergleich zu dem Wt deutlich erhöhte Amplitude. Der anschließende Abfall der Kurven verläuft auf unterschiedlichen Niveaus zwischen Wt und Mutante gleich (Abb. 4.20). Der Kurvenverlauf von qE-/ qI-Mutanten zeigt nach Elrad et al., (2001) deutliche Unterschiede zu dem der Stmu10. Der Kurvenverlauf von Stmu10 zeigte bereits nach Induktion des aktinischen Lichtes einen Abfall des NPQ auf das Niveau des Wt nach Ausschalten des aktinischen Lichtes (Abb. 4.20). Die erhöhte Amplitude der Mutante ergibt sich aus einem im Vergleich zu dem Wt deutlich erhöhtem Fm (Abb. 4.20). Dieses spiegelt sich auch in dem durchschnittlichen NPQ-Wert der Mutante wieder. Dieser war mit $0,427 \pm 0,073$, $n=20$, um 23% gegenüber dem Wert des Wt von $0,553 \pm 0,045$ erhöht. Stmu10 hat keinen Defekt in der Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus-abhängigen Fluoreszenz-Abnahme qE und qI.

4.1.6.4 Der relative Elektronentransport des PSII, F_v/F_m

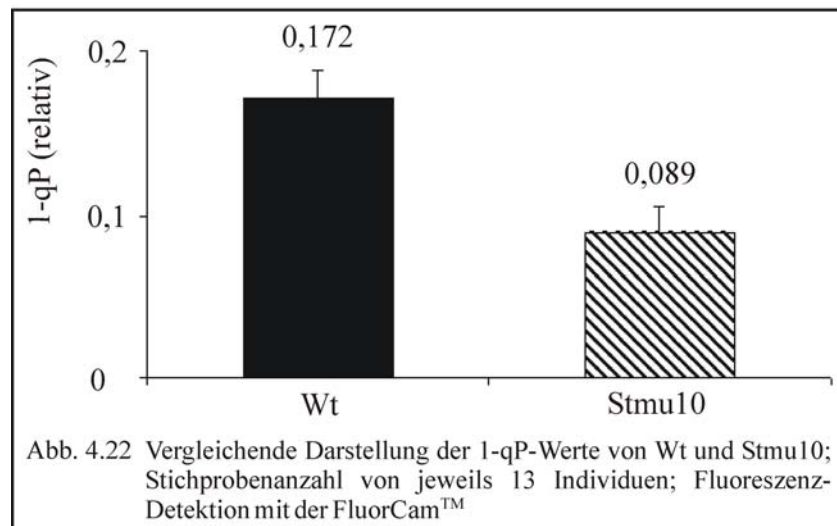
Der F_v/F_m -Wert wird nach Hipkins und Baker, (1986) mit der Formel $F_m - F_0 / F_m$ berechnet (s. 3.4.2.1.3). Nach 5minütiger Dunkel-Adaptation wurde die Grundfluoreszenz F_0 des PSII induziert. Diese ist proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Einheiten und dem Zustand des Elektronentransportes des PSII. Bei einer Störung der Elektronentransportkette erhöht sich die Grund-Fluoreszenz des PSII. Zur Berechnung von F_v wird diese von der Anzahl der fluoreszierenden Einheiten, repräsentiert durch maximale Fluoreszenz F_m , subtrahiert. Durch die anschließende Division durch die maximale Fluoreszenz F_m ergibt sich ein, von der Anzahl der PSII-LHCII unabhängiger, relativer Wert. Der F_v/F_m -Wert spiegelt somit das relative Maß des Elektronentransportes des PSII wieder.



Der F_v/F_m -Wert der Mutante lag mit $0,733 \pm 0,015$ um 10% unterhalb dem des Wts von $0,811 \pm 0,013$ (Abb. 4.21). Der Elektronentransport des PSII ist daher um 10% gegenüber dem des Wt reduziert. Diese Reduktion kann die Mutante aber kompensieren, da die Vitalität der Mutante bei Normallicht-Bedingungen nicht von der des Wts abweicht (Abb. 4.18).

4.1.6.5 Der Reduktions-Zustand des PQ-Pools 1-qP

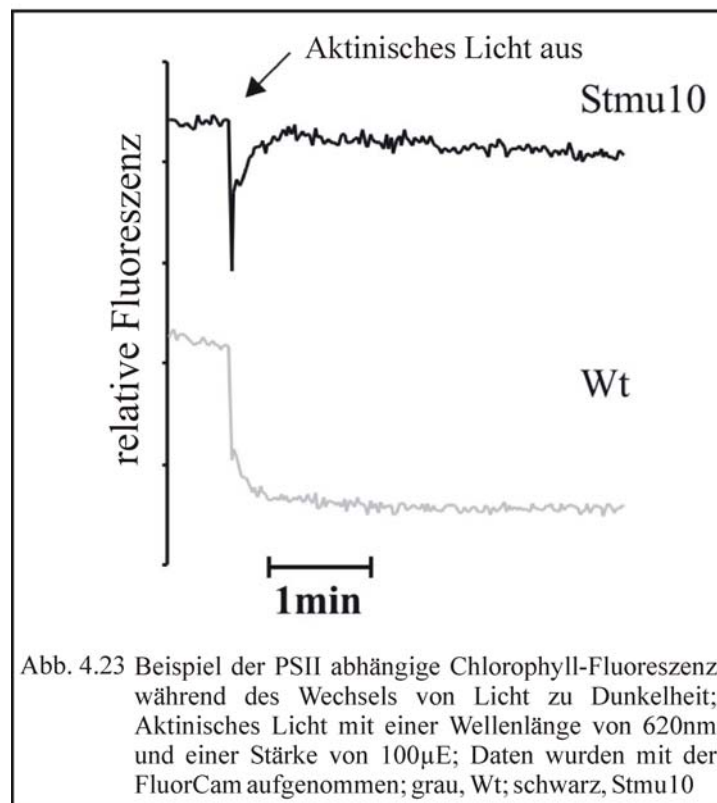
Das Ergebnis einer dauerhaft erhöhten Fluoreszenz des PSI-LHCI-LHCII der 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie (Abb. 4.8) ließ eine dauerhafte Assoziation von Teilen der mobilen LHCII-Proteine am PSI vermuten. Dieser State2-Zustand könnte durch einen dauerhaft reduzierten PQ-Pool in Stmu10 induziert worden sein. Auch der in Stmu10 um 10% verminderte Elektronentransport des PSII, F_v/F_m (s. 4.1.6.4) könnte durch eine verminderte Elektronenübertragung des PSII in den reduzierten PQ-Pool induziert worden sein. Daher wurde mit der FluorCam™ der Reduktions-Zustand des PQ-Pools, 1-qP mit der Formel $1-qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ nach Andersson et al., 1997 detektiert (s. 3.4.2.1.3).



Die 1-qP-Werte des Wt und der Mutante unterschieden sich deutlich. Die Mutante hatte mit einem Wert von $0,089 \pm 0,017$ einen um 51% niedrigeren 1-qP-Wert als der Wt mit $0,172 \pm 0,014$ (Abb. 4.21). Der PQ-Pool der Mutante war damit im Vergleich zu dem Wt in einem reduzierten Zustand. Dieses unterstützt die Vermutung eines, durch ein verschobenes Redox-Verhältnis ausgelösten, „State Transition“-Mutanten-Phänotyps.

4.1.6.6 Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz während des Wechsels von Licht zu Dunkelheit

Der PQ-Pool der Mutante verblieb während der Licht-Phase in einem dauerhaft reduzierten Zustand (s. 4.1.6.5). Da bei der Mutante nach Dunkel-Adaptation ein deutlich erniedrigtes F_v/F_m detektiert wurde (s. 4.1.6.6), ergab sich die Fragestellung, ob die Fluoreszenz der Mutante auch bei Übergang in eine Dunkelphase erhöht war. Der Abfall der Fluoreszenz nach Übergang von einer Licht- in eine Dunkelphase ist proportional der Oxidation des im Licht reduzierten PQ-Pools. Zur Messung dieses Parameters wurde die Fluoreszenz von Wt und Stmu10 im aktinischen Licht detektiert (Heber und Harris, 1993). Nach einer Minute wurde das aktinische Licht ausgeschaltet und die Fluoreszenz mit 0,1sekündigen Lichtimpulsen alle 5s induziert.

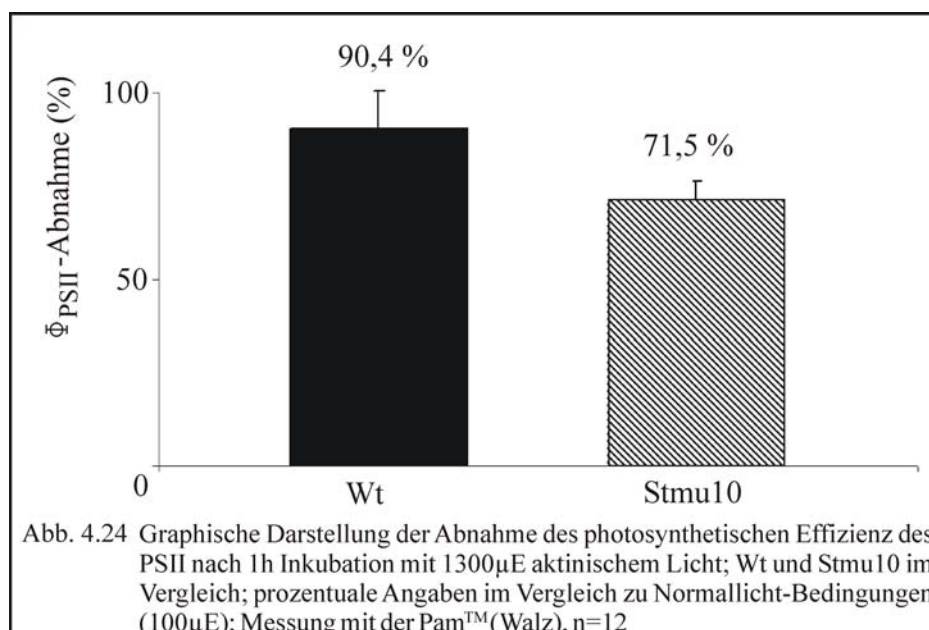


Im Vergleich zu dem Wt fiel die Fluoreszenz der Mutante nur kurz und nicht auf das gleiche Niveau des Wts ab (Abb. 4.22). In Stmu10 stieg die Fluoreszenz anschließend wieder abrupt auf annähernd das Niveau vor Induktion der Dunkelphase an. Der PQ-Pool der Mutante oxidierte nur kurz und re-reduzierte anschließend nach Induktion der Dunkelphase. In dem Prozess der Chlororespiration soll der PQ-Pool bei Dunkelheit über einem alternativen Elektronentransport reduziert werden.

Als einer der potentiellen Reduktanten wird $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ vermutet, dass durch den plastidären Ndh-Komplex den PQ-Pool reduziert (Nixon, 2000, Mi et al., 1992, Burrow et al., 1998, Shikanai et al., 1998, Joet et al., 2001, Lennon et al., 2003). Durch stromale Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch die plastidäre alternative Oxidase Immutans soll so das Membranpotential der Thylakoidmembran erhöht und ATP durch die ATP-Synthase synthetisiert werden (Lennon et al., 2003). Der bei Dunkelheit reduzierte PQ-Pool lässt eine Steigerung der ATP-Synthase bei Dunkelheit durch einen pseudozyklischen Elektronentransport vermuten.

4.1.6.7 Die Starklicht-Versuche mit *Stmu10*

Neben der Aktivierung des Violaxanthin-/Zeaxanthin-Zyklus kommt es in Folge von Starklicht-Bedingungen zur Aktivierung der Photoakklimationsprozesse der Photoinhibition und des „PSII Repair Cycle“ (Barber und Andersson, 1992). Der Prozess der Photoinhibition unterliegt, wie der Prozess der „State Transition“, einer Redox-Regulation (Aro et al., 1993). Daher wurden die Auswirkungen erhöhter Lichteinstrahlung auf *Stmu10* und *Wt* untersucht. Die Pflanzen wurden 1h mit Starklicht ($1300\mu\text{E}$) inkubiert und anschließend für 2h in Dunkelheit belassen (Aro et al., 1994). Die photosynthetische Effizienz des PSII wurde während dieser Phasen mit der FluoCam™ nach Anderson et al., (1997) mit der Formel $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s) / F_m'$ detektiert.

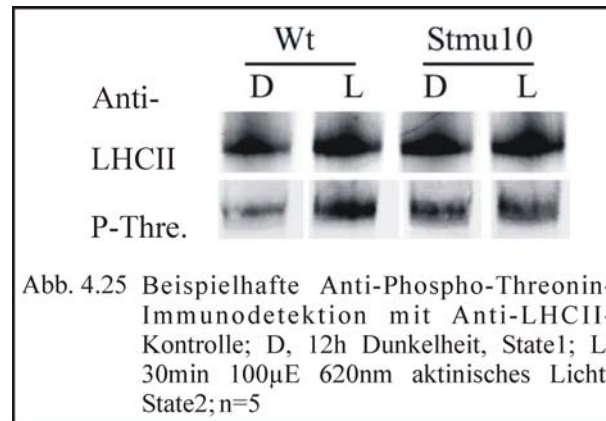


Die photosynthetische Effizienz des Elektronentransportes des PSII war, wie der relative Elektronentransport des PSII, F_v/F_m (4.1.6.4), bei Inkubation mit Normallicht-Bedingungen ($100\mu E$) in der Mutante mit $0,65\pm 0,04$ deutlich niedriger als in dem Wt $0,80\pm 0,02$.

Nach 1h Inkubation mit $1300\mu E$ aktinischem Licht wurde in Wt und Mutante die Effizienz des PSII deutlich gehemmt (Abb. 4.2.4). Sie fiel in der Mutante auf $0,46\pm 0,06$ und in dem Wt auf $0,72\pm 0,3$. Die Mutante reagierte damit auf die Starklicht-Inkubation mit einem Abfall des Elektronentransportes auf 71,5% des Zustandes vor Inkubation. Der Abfall des Wt auf 90,4% war dagegen deutlich geringer (Abb. 4.23). Der Abfall der Effizienz des PSII ist proportional zur Anzahl der inaktivierten PSII. Die Mutante besitzt demnach eine um 19% niedrigere Starklicht-Toleranz als der Wt (Abb. 4.23). In der nachfolgenden Dunkel-Phase erholten sich Mutante und Wt wieder vollständig. Eine Auswirkung der Mutation auf den Prozess des „PSII Repair Cycle“ war daher nicht zu detektieren. Bei einer 3h Inkubation mit Starklicht reagierte die Mutante im Gegensatz zu dem Wt mit einem letalen Phänotyp.

4.1.6.8 Die „in vivo“-LHCII-Phosphorylierung von *Stmu10*

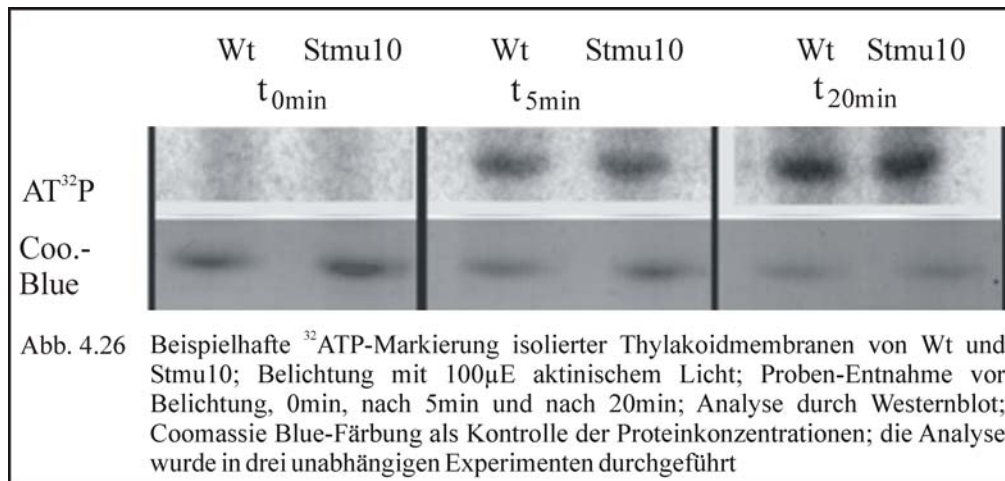
Die LHCII-Kinase wird als Folge der Reduktion des PQ-Pools aktiviert und phosphoryliert Serin-/Threoninereste der mobilen LHCII-Proteine, die dann zu PSI migrieren und dort assoziieren (Allen et al., 1981). Durch den oxidierten Redox-Zustand des PQ-Pools bei Dunkelheit kommt es zur Inaktivierung der LHCII-Kinase. Die LHCII-Proteine sind mehrheitlich in ihrem dephosphorylierten Zustand und mit dem PSII assoziiert. Da der PQ-Pool der Mutante in der Dunkelphase ebenfalls reduziert war (4.1.6.5), wurde der Phosphorylierungszustand von Wt und *Stmu10* bei Licht und Dunkelheit „in vivo“ bestimmt. Nach Induktion beider Zustände wurden Chloroplasten-Präparate (s. 3.3.7) mit Anti-Phospho-Threonin-Immunodetektion (s. 3.3.6) analysiert.



Der Wt zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen dem Grad der LHCII-Phosphorylierung bei Dunkelheit und bei Licht. Bei Dunkelheit waren die LHCII-Proteine mehrheitlich dephosphoryliert. Nach Induktion der LHCII-Kinase-Kaskade im Licht phosphorylierten diese (Abb. 4.23). Die Mutante dagegen zeigte ein deutlich verändertes Phosphorylierungsverhalten. In beiden Zuständen waren die LHCII-Proteine dauerhaft phosphoryliert (Abb. 4.23). Der phosphorylierte Zustand der LHCII-Proteine bei Dunkelheit lässt auf eine dauerhafte Induktion der LHCII-Kinase-Kaskade als Folge eines stetig reduzierten PQ-Pools schließen. Er kann aber auch die Folge eines direkten Einflusses der Mutation auf die LHCII-Kinase-Kaskade sein.

4.1.6.9 Die "in vitro" LHCII-Phosphorylierung von *Stmu10*

Um einen direkten Einfluss der Mutation auf den Phosphorylierungszustand der Mutante auszuschließen, wurden „in vitro“ LHCII-Phosphorylierungsexperimente durchgeführt (Kruse et al., 1997) (3.3.9). Von Wt und *Stmu10* wurden Thylakoid-Präparate erstellt und diese für zwei Stunden an Dunkelheit adaptiert. Durch anschließende Belichtung wurde die LHCII-Kinase-Kaskade induziert. Von dem induzierten Dunkel-Zustand aus wurden die Thylakoid-Proben nach Zugabe von 32 ATP belichtet. Die Kinetik und der Phosphorylierungs-Grad der LHCII-Proteine von Wt und Mutante wurden als Strahlungsstärke des integrierten 32 P detektiert (Abb. 4.26).



Die Strahlungs-Stärke der LHCII-Proteine nahm nach Licht-Induktion deutlich zu (Abb. 4.26). Die Licht-Induktion bewirkte eindeutig bei Stmu10 und Wt die Induktion der Kinase-Kaskade. Ein Unterschied zwischen der Kinetik und dem Grad der Phosphorylierung der LHCII-Proteine war zwischen Wt und Mutante nicht zu detektieren (Abb. 4.26). Die Signalkaskade der LHCII-Kinase war in der Mutante nicht direkt betroffen. Die dauerhafte „in vivo“-Phosphorylierung der LHCII-Proteine der Mutante (Abb. 4.25) war daher die Folge des dauerhaft reduzierten PQ-Pools (s. 4.1.6.5, 4.1.6.6).

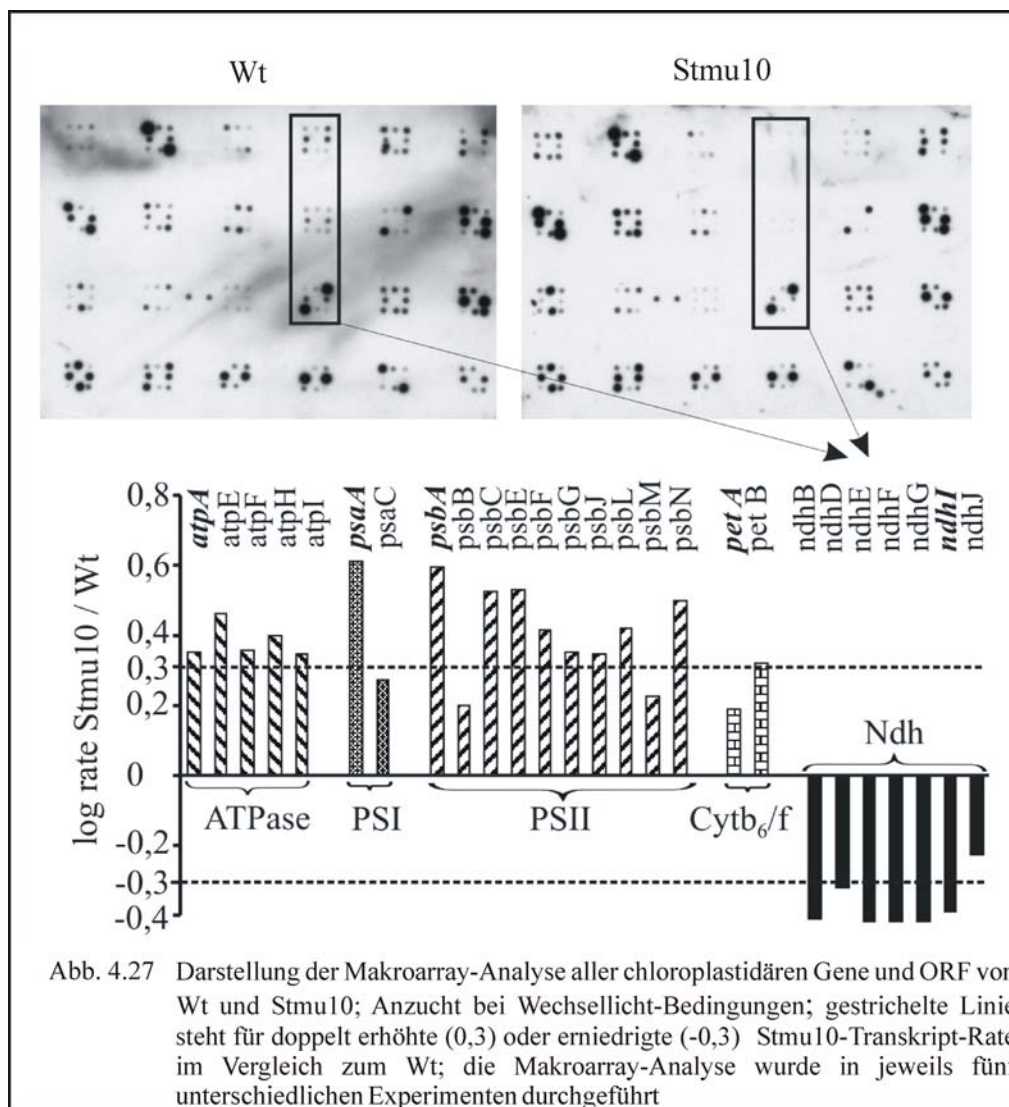
4.1.6.10 Die Expressions-Analysen chloroplastidärer Gene

Dauerhafte Veränderungen des Redox-Zustandes des PQ-Pools lösen transkriptionelle- und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen aus (Pfannschmidt und Allen, 1999). Diese haben eine Veränderung der Stöchiometrie der Komplexe der Elektronentransport-Kette zur Folge. Der in der Mutante veränderte Redox-Zustand des PQ-Pools kann daher Auslöser einer veränderten Regulation photosynthetischer Komponenten sein.

Als Folge dieser Fragestellung wurde die Expression photosynthetischer Komponenten von Stmu10 und Wt verglichen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dietz, Kandlbinder, Universität Bielefeld, wurde ein Makroarray mit allen Chloroplasten-kodierten Genen und ORF verwendet (Kandlbinder et al., 2003) (s. 3.2.2). Zur Identifizierung der veränderten Expression wurden vergleichende Analysen mit unter Wechsellicht angezogenen Pflanzen durchgeführt. Die im Makroarray identifizierten Unterschiede zwischen Wt und Stmu10 wurden anschließend mit vergleichender RT-PCR überprüft. Da es durch posttranskriptionelle Modifikationen ein unterschiedliches Transkript-zu-Protein-Verhältnis geben kann, wurden mit immunologischen Western-Blot-Analysen die Proteinmengen der entsprechenden Genprodukte vergleichend analysiert.

4.1.6.10.1 Die Makroarray-Analyse chloroplastidärer Gene

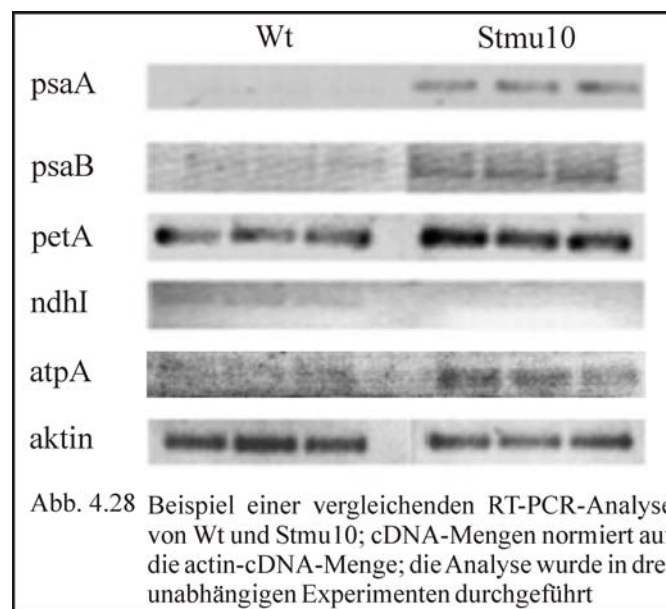
Der verwendete Makroarray enthielt sämtliche chloroplastidären Gene und ORF (Kandlbinder et al., 2004). Gesamt-RNA von Wt und Stmu10 wurde isoliert und mit dem DigTM-System (Roche) durch reverse Transkription markiert. Die Menge der markierten cDNA entsprach der Transkriptmenge der chloroplastidären Gene. In fünf unterschiedlichen Experimenten wurde der Makroarray mit der markierten cDNA hybridisiert und die Transkription der chloroplastidären Gene vergleichend analysiert. Die Ergebnisse wurden akzeptiert, wenn das Signal höher als 20% des lokalen Hintergrundes war, um weniger als 50% variierte und um weniger als 30% von dem Durchschnitt aller Experimente abwich.



Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine eindeutige transkriptionelle Regulation der chloroplastidären Gene als Folge der Mutation in *Stmu10*. Von der Regulation sind ganze Komplexgruppen betroffen. Die chloroplastidären Gene der ATP-Synthase, des PSI und des PSII waren signifikant hoch reguliert (Abb. 4.27). Die des *Cytb₆/f*-Komplexes wiesen nur eine geringe Regulation auf (Abb. 4.27). Die Transkripte des chloroplastidären NDH-Komplexes unterlagen dagegen einer negativen Regulation. Die Transkriptmengen der Gene *ndhB*, *ndhD*, *ndhE*, *ndhF*, *ndhG* und *ndhI* waren um mehr als die Hälfte im Vergleich zu dem Wt reduziert (Abb. 4.27).

4.1.6.10.2 Die vergleichende RT-PCR-Analysen chloroplastidärer Gene

Die erhaltenen Makroarray-Daten wurden mit der Methode der vergleichenden RT-PCR verifiziert (s. 3.2.3). RNA von Wt und Mutante wurde extrahiert und revers transkribiert. Die Menge der cDNA wurde mit aktin-PCR normalisiert und die Transkripte der Gene in der logarithmischen Amplifikationsphase analysiert. Beispielhaft für die regulierten Komplexe wurden die Transkriptraten der Genr einer essentiellen Untereinheit analysiert.

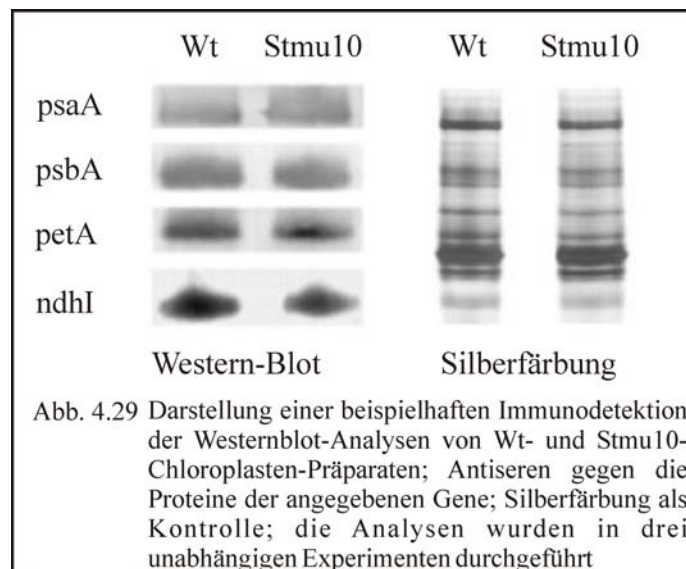


Die Expression der PSI-UE *psaA*, der PSII-UE *psbA* und der ATP-Synthase-UE *atpA* unterlagen in der Mutante einer positiven Regulation (Abb. 4.28). Die Expression der *Cytb₆/f*-UE *petA* zeigte keine Veränderung und die des chloroplastidären Ndh-Komplexes, *ndhI* eine Verringerung der Transkriptraten (Abb. 4.28).

Die mit RT-PCR erhaltenen Ergebnisse stimmten mit denen der Makroarray-Analyse überein (Abb. 4.27).

4.1.6.10.3 Die Westernblot-Analysen chloroplastidärer Komplex-UE

Die Regulation der Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette wurde auf Transkript-Ebene mit Makroarray und vergleichenden RT-PCR analysiert. Durch posttranskriptionale Modifikationen kann die Menge der Transkripte von den der Proteine abweichen (Pfannschmidt et al., 2001). Daher wurden Wt- und Stmu10-Chloroplasten-Präparate aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen Antiseren analysiert. Es wurden Antiseren gegen die Proteine der mit RT-PCR analysierten Gene verwendet



Die unterschiedliche Regulation der Transkription von Wt und Mutante wich von der vergleichenden Western-Blot-Analyse deutlich ab. Die auf transkriptionaler Ebene positiv regulierten Gene *psaA*, *psbA* zeigten wie *petA* in ihren Proteinmengen keine Unterschiede (Abb. 4.29). Die Mutation hat daher keine Auswirkung auf die Stöchiometrie der primären Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette.

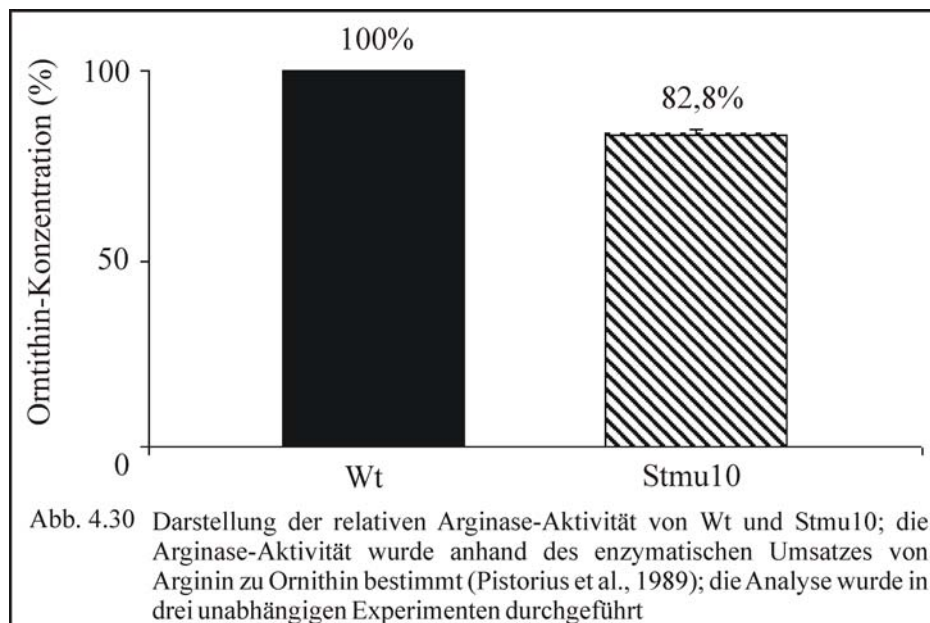
Die unterschiedliche transkriptionale Regulation des chloroplastidären NDH-Komplex-Gens *ndhI* (Abb. 4.26, 4.27) dagegen bestätigte sich auch auf Ebene der Translation. *Stmu10* zeigte im Vergleich zu dem Wt eine deutlich geringere *NdhI*-Menge als der Wt (Abb. 4.29). Da *NdhI* eine essentielle UE des chloroplastidären NDH-Komplexes ist, kann eine Reduktion der Anzahl an *Ndh*-Komplexen in der Mutante als gesichert angesehen werden.

4.1.7 Die Funktion und Regulation von Arginasen in *Arabidopsis thaliana*

In dem Genom von *Arabidopsis thaliana* kodieren zwei Gene für Arginasen (TAIR, Garcia-Hernandez et al., 2002). Da die Funktion der Arginase2 nicht analysiert war, wurden vergleichende Analysen beider Arginasen durchgeführt (Pistorius et al., 1989). Die Bestimmung der Aktivität der Arginasen wurde mit dem Umsatz von Arginin zu Harnstoff und Ornithin detektiert. Analysen zur transkriptionellen Regulation der Arginasen wurden mit der Methode der vergleichenden RT-PCR durchgeführt.

4.1.7.1 Die Arginase-Aktivitätsbestimmung

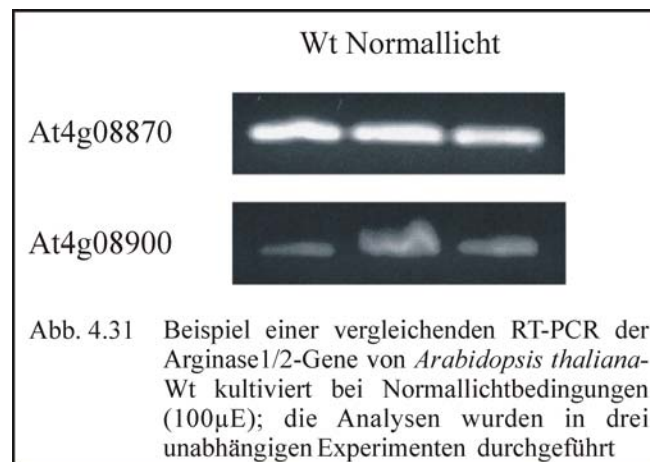
Die Mutation in Stmu10 hatte die Deletion des Arginase2-Gens zur Folge (s. 4.1.5.3, 4.1.5.4). Da in *Arabidopsis thaliana* zwei Gene für Arginasen existieren (TAIR, Garcia-Hernandez et al., 2002), wurde die Auswirkung der Deletion auf die gesamte Arginase-Aktivität in Stmu10 vergleichend zu dem Wt analysiert. Arginasen katalysieren als Komponenten des Harnstoff-Zyklus die Reaktion von Arginin zu Harnstoff und Ornithin. Daher wurde die Ornithin-Konzentration in Zellextrakten analysiert (Pistorius et al., 1989) (s. 3.3.10).



Die Arginase-Aktivität der Mutante war im Vergleich zu der des Wt deutlich erniedrigt. In der Mutante konnte mit $0,70 \pm 0,01 \mu\text{gOrnithin}/\mu\text{gProteine}$ eine um 17,2% niedrigere Ornithin-Konzentration gegenüber der des Wt von $0,84 \pm 0,01 \mu\text{gOrnithin}/\mu\text{gProteine}$ detektiert werden (Abb. 4.30). Die Mutation der Arginase2 hat in der Mutante eine Verringerung der Arginase-Aktivität zur Folge, die durch die Arginase1 nicht vollständig kompensiert werden kann.

4.1.7.2 Die Transkriptionsraten von Arginase1 und Arginase2

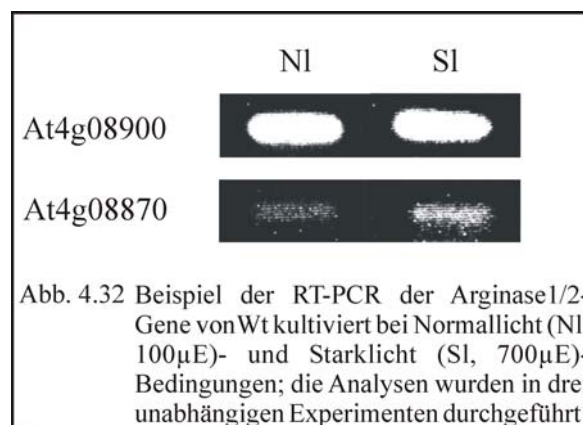
Die identifizierte Abnahme der Arginase-Aktivität der Mutante von 17,2% (Abb. 4.30) ließ auf ein unterschiedliches Expressionsverhältnis beider Arginasen schließen. Dieses konnte durch die hohe Homologie zwischen der Arginase1 und der Arginase2 (s. 4.1.5.5) nicht mit einem polyklonalen Antiserum analysiert werden, da dieses nicht zwischen den beiden Arginasen als Antigene unterscheiden konnte. Daher wurde diese Hypothese auf transkriptionaler Ebene mit vergleichender RT-PCR der beiden Arginase-Gene At4G08870 und At4G08900 analysiert (s. 3.2.3). RNA des Wt wurde revers transkribiert und mit PCR beide Arginase-Amplifikate vergleichend detektiert. Die Menge der amplifizierten cDNA war dabei proportional zur Transkriptmenge beider Arginasen.



Die RT-PCR beider Gene zeigen eine deutlich unterschiedliche Konzentration (Abb. 4.31). Das Gen der Arginase1, At4g08900, wird deutlich stärker als das der Arginase2, At4g08870, transkribiert (Abb. 4.31). Die niedrige Expression der Arginase2 im Vergleich zu der der Arginase1 unterstützt die Annahme einer anteilig geringeren Arginase-Aktivität der Arginase2 an der Gesamt-Arginase-Aktivität in *Arabidopsis thaliana* (s. 4.1.7.1).

4.1.7.3 Die Veränderungen der Arginasen-Expressionsraten bei Starklicht

Die Gene der Arginase1 und der Arginase2 wurden unterschiedlich stark expremiert (s. 4.1.7.2). Die beiden Arginasen besitzen eine Homologie von 86%, wobei die Homologie der Transitsequenzen 52% und die der Arginase-Domänen 95% beträgt (s. 4.1.5.5). Die unterschiedlichen Transkriptraten (Abb. 4.31), Aktivitäten (Abb. 4.30) sowie Transitsequenzen (Abb. 4.14) lassen auf eine unterschiedliche Regulation beider Arginasen schließen. Bei *Stmu10* konnte unter Starklicht-Bedingungen ein Abfall der photosynthetischen Effizienz des PSII, Φ_{PSII} , detektiert werden (s. 4.1.6.7), der mit 29% deutlich unter dem des Wt lag und nach 3h letal war. Durch diesen starken Abfall wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der Mutation der Arginase2 und dem Starklicht-Phänotyp postuliert. Daher wurden mit beiden Arginasen bei Normallicht- und Starklicht-Bedingungen vergleichende RT-PCR-Analysen durchgeführt.



Die Transkriptraten der Arginase-Gene wiesen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zuständen auf (Abb. 4.31). Die Transkriptrate der Arginase1 war wiederum deutlich gegenüber der der Arginase2 erhöht (Abb. 4.31). Bei Starklicht-Bedingungen erhöhte sich die Transkriptrate der Arginase2 im Vergleich zu Normallicht-Bedingungen (Abb. 4.31). Die Transkripte der Arginase2 unterliegen bei einem Wechsel von Normallicht zu Starklicht einer positiven Regulation. Dies unterstützt die Annahme einer Regulation der Arginase2-Transkription und -Aktivität während einer Starklicht-Adaptation.

4.1.7.4 Die Western-Blot Analysen mitochondrieller Komplex-UE

Bei Stmu10 konnte eine im Vergleich zu dem Wt veränderte Arginase-Aktivität detektiert werden (4.1.7.1). Da beide Arginasen mitochondriell lokalisiert waren (s. 4.1.5.5, 4.1.5.6), wurde eine Auswirkung der veränderten Arginase-Aktivität auf den mitochondrialen Stoffwechsel postuliert. Von Carol et al., (2003) wurden in *C. reinhardtii* Mutanten der mitochondrialen Respiration als „State Transition“-Mutanten identifiziert. Die identifizierten Mutanten waren in dem KomplexI der mitochondrialen Respiration gestört.

Daher wurde die Proteinmenge der KomplexI-UE-Nad9 mit Western-Blot und Immunodetektion analysiert. Die Auswirkung einer potentiell gestörten Respiration auf die Expression der mitochondrialen Alternativen Oxidase wurde ebenfalls mit einem Antiserum analysiert.

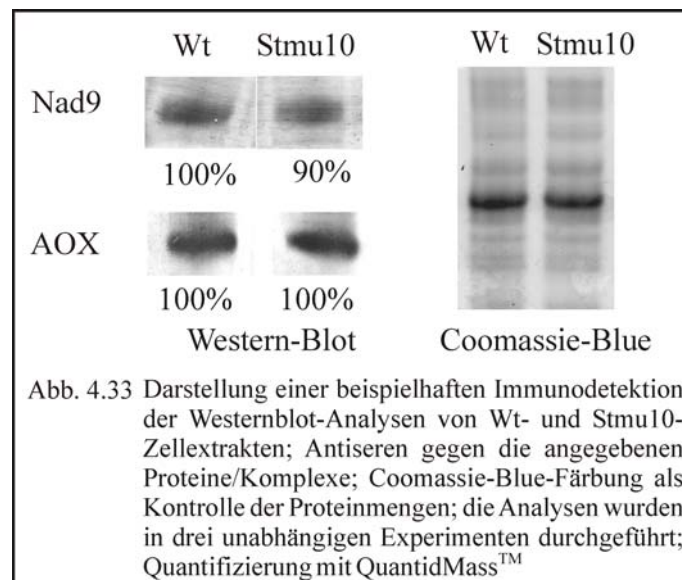


Abb. 4.33 Darstellung einer beispielhaften Immunodetektion der Westernblot-Analysen von Wt- und Stmu10-Zellextrakten; Antiseren gegen die angegebenen Proteine/Komplexe; Coomassie-Blue-Färbung als Kontrolle der Proteinmengen; die Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt; Quantifizierung mit QuantidMass™

Die Proteinmenge der KomplexI-UE-Nad9 wies in Wt und Mutante einen Unterschied auf (Abb. 4.33). Durch Quantifizierung mit dem Programm QuantidMass™ konnte eine Reduktion der Proteinmenge der KomplexI-UE nad9 um 9% gegenüber der des Wt detektiert werden. Die Proteinmengen der Proben von Wt und Stmu10 unterschieden sich dabei nicht (Abb. 4.33, Coomassie-Blue). Die Deletion der Arginase2 hat eine Verringerung der Proteinmenge der KomplexI-UE-Nad9, nicht aber der der Alternativen Oxidase, AOX (Abb. 4.33) zur Folge.

4.2 Die Serin-/Threonin-Kinase STK1

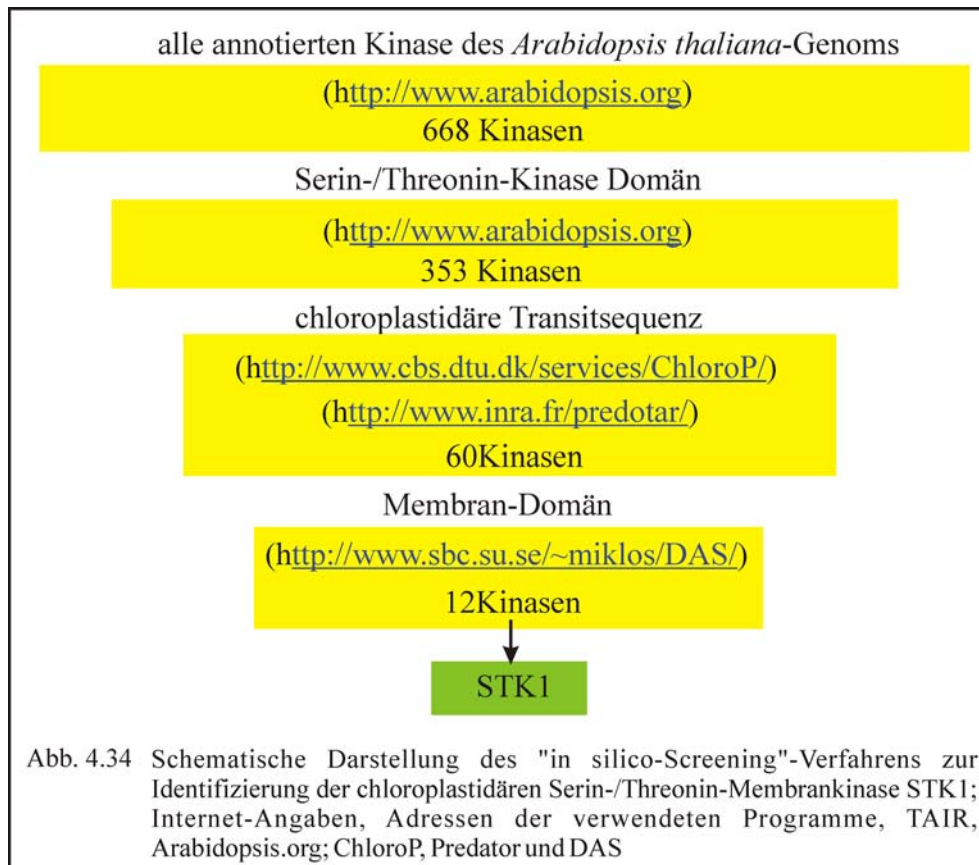
Ein Prinzip der redox-regulierten Signaltransduktion ist die Phosphorylierung von Serin/Threonin-Resten beteiligter Proteine (Aro und Ohad, 2003). Dabei werden in dem Photoakklimationsprozess, der „State Transition“, LHCII-Proteine (Benett, 1977, Alfonzo, 1977, Benett, 1979, Allen et al., 1981) und dem der Photoinhibition die PSII-UE D1/D2, CP43 und PsbH (Ikeuchi et al., 1987, Marder et al., 1988, Michel et al., 1988) phosphoryliert. Die an diesen Prozessen beteiligten Kinasen wurden als mit der Thylakoidmembran assoziiert lokalisiert (Alfonzo, 1977, Benett, 1977). Da mit den bislang verwendeten molekularbiologischen Ansätzen bis auf die, an der „State Transition“ beteiligten, TAK (Snyder und Kohorn, 1999) und stt7 (Depege et al., 2003) keine dieser Kinasen identifiziert werden konnten, wurde in dieser Arbeit ein „in silico-Screening“-Ansatz verwendet.

Durch die Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) wurde die Möglichkeit zur gezielten Identifizierung von Serin-/Threonin-Kinasen eröffnet. Die Arabidopsis-Sequenz wurde annotiert und die Ergebnisse in der Arabidopsis-Database (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002) veröffentlicht.

4.2.1 „In Silico Screening“ von STK1

4.2.1.1 Das „Screening“ der Arabidopsis-Database (TAIR)

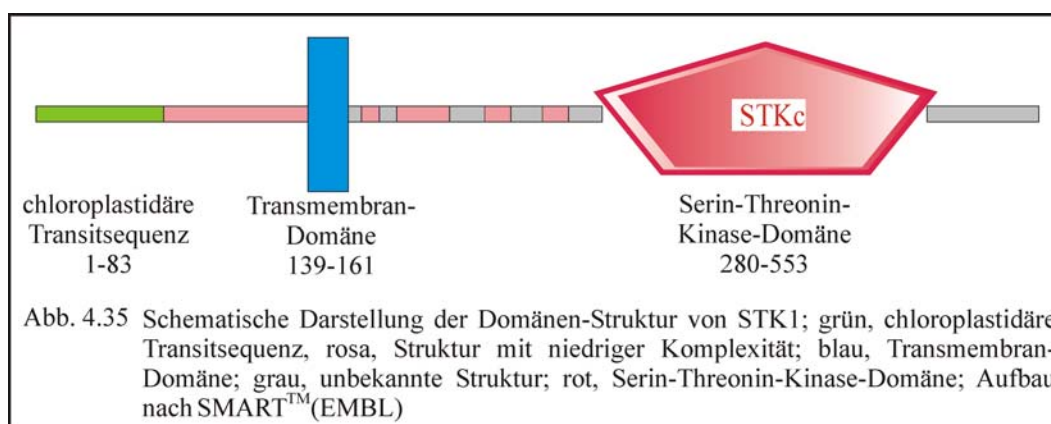
Die veröffentlichte und annotierte Sequenz der *Arabidopsis*-Database (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002) wurde in einem „in silico“-Screening auf potentielle Mitglieder photosynthetischer Signaltransduktionskaskaden untersucht.



Aus den ca. 25.000 Genen des *Arabidopsis thaliana*-Genoms wurden durch die TAIR (Garcia-Hernandez, 2002) 668 mit einer potentiellen Kinase-Domäne identifiziert (Abb. 4.34). Durch die Annotation der *Arabidopsis*-Database (TAIR, Garcia-Hernandez, 2002) konnten diese anschließend auf eine Serin-Threonin-Kinase-Domäne selektiert werden (Abb. 4.34). Mit den Programmen ChloroP™ (Emanuelsson et al., 1999) und Predator 0.5™ (<http://www.inra.fr/predotar/>) wurden die 353 Serin-Threonin-Kinasen auf die Existenz einer chloroplastidären Transitsequenz analysiert (Abb. 4.34). Die Programme verglichen potentielle Transitsequenzen mit Sequenzen chloroplastidär lokalisierter Proteine. In einem abschließenden Schritt wurden die verbleibenden 60 Kinasen mit dem Programm DAS™ (Cserzo et al., 1997) auf eine Membrandomäne untersucht (Abb. 4.34). Das Programm analysierte die Ladungen der Aminosäuren der Proteine und unterschied zwischen hydrophilen und hydrophoben, potentiellen Membrandomänen-Bereichen. Das „Screening“-Verfahren ergab 12 potentiell chloroplastidäre Serin-Threonin-Membran-Kinase (Abb. 4.30). Die Kinase STK1 wurde durch die, mit ChloroP™ (Emanuelsson et al., 1999) auf 86% bestimmte, höchste Wahrscheinlichkeit für eine chloroplastidäre Lokalisation ausgewählt.

4.2.1.2 Die potentielle Serin-Threonin-Kinase STK1

STK1 wird von dem *Arabidopsis thaliana*-Gen At3g24550 kodiert. Die Sequenz der Kinase ist nach Annotation der TAIR (Garcia-Hernandez, 2002) 2997bp groß und beinhaltet acht Intron- und sieben Exon-Bereiche. Die cDNA von STK1 besitzt eine Größe von 1956bp und kodiert für 652 Aminosäuren. Die Kinase besitzt nach PetidMass™ (Wilkins et al., 1997) ein Molekulargewicht mit Transitsequenz von ca. 69kDa und ohne Transitsequenz von ca. 58kDa. Mit dem Programm SMART™ (Letunic et al., 2004) wurde die Domänen-Struktur der STK1 analysiert und schematisch dargestellt (Abb. 4.35).

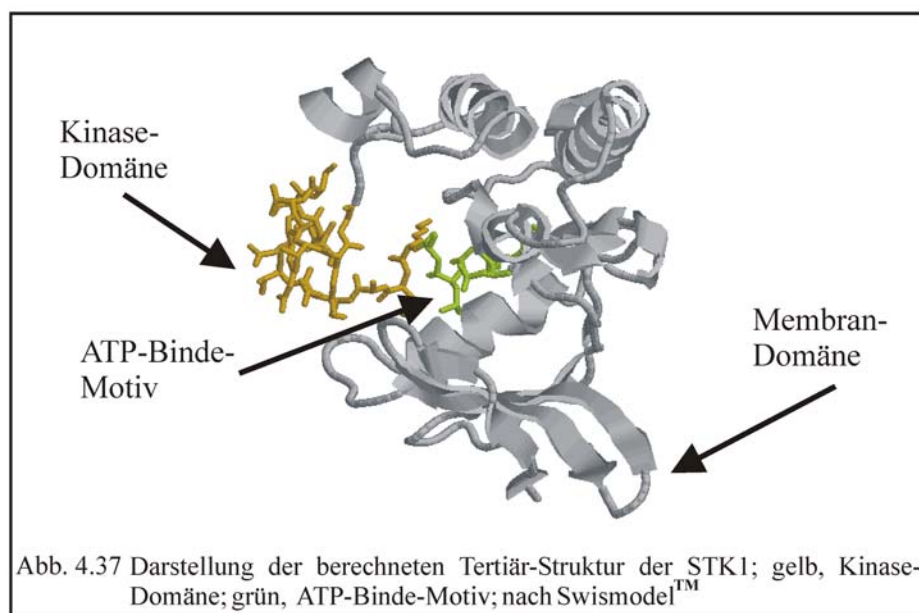


Die mit SMART™ (Letunic et al., 2004) identifizierte Domänen-Struktur (Abb. 4.35) wurde anschließend auf die Aminosäure-Sequenz von STK1 übertragen (Abb. 4.36).

MSTAPSPGTT	PSPSPSPPT	NSTTTTTPPA	ASSPPPTTTP	SSPPSPSTN	STSPPPSSPL	60
PPSLPPPSPP	GSLTPPLPQP	SPSAPITPSP	PSPTTPSNPR	SPPSPNQGP	NTPSGSTPRT	120
PSNTKPSPPS	DSSDGLSTGV	VVGIAIGGVA	ILVILTLCICL	LCKKKRRRRH	DDEAAYVPP	180
PPPSGPKAGG	PYGGQQYWQ	QQNASRPSDN	HVVTSLPPPK	PPSPPRKPPP	PPPPAFMSS	240
SGGSDYSDLP	VLPPSPGLV	LGFSKSTFTY	EELSRATNGF	SEANLLGQGG	FGYVHKGILP	300
SGKEVAVKQL	KAGSGQGERE	FQAEVEIISR	VHHRHLVSLI	GYCMAGVQRL	LVYEFVPNNN	360
LEFHLHGKGR	PTMEWSTRLK	IALGSAKGLS	YLHEDCNPKI	IHRDIKASNI	LIDFKFEAKV	420
ADFGLAKIAS	DTNTHVSTRV	MGTFGYLAPE	YAASGKLTEK	SDVFSFGVVL	LELITGRRPV	480
DANNVYVDDS	LVDWARPLLN	RASEEGDFEG	LADSKMGNEY	DREEMARMVA	CAAACVRHSA	540
RRRPRMSQIV	RALEGNVSL	DLNEGMRPGH	SNVYSSYGG	TDYDTSQYND	DMIKFRKMAL	600
GTQEYGTTE	YSNPTSDYGL	YPSGSSSEGO	ATREMEMGKI	KKTGQGYSGP	SL	652

Abb. 4.36 Darstellung der Aminosäuresequenz der Serin-Threonin-Kinase STK1; gelb unterlegt, potentielle Transitsequenz; rot, potentielle Verdauungsstelle; blau, potentielle Kinase-Domäne; grün unterlegt, potentielle Membran-Domäne; violett unterlegt, potentielles Aktiveszentrum

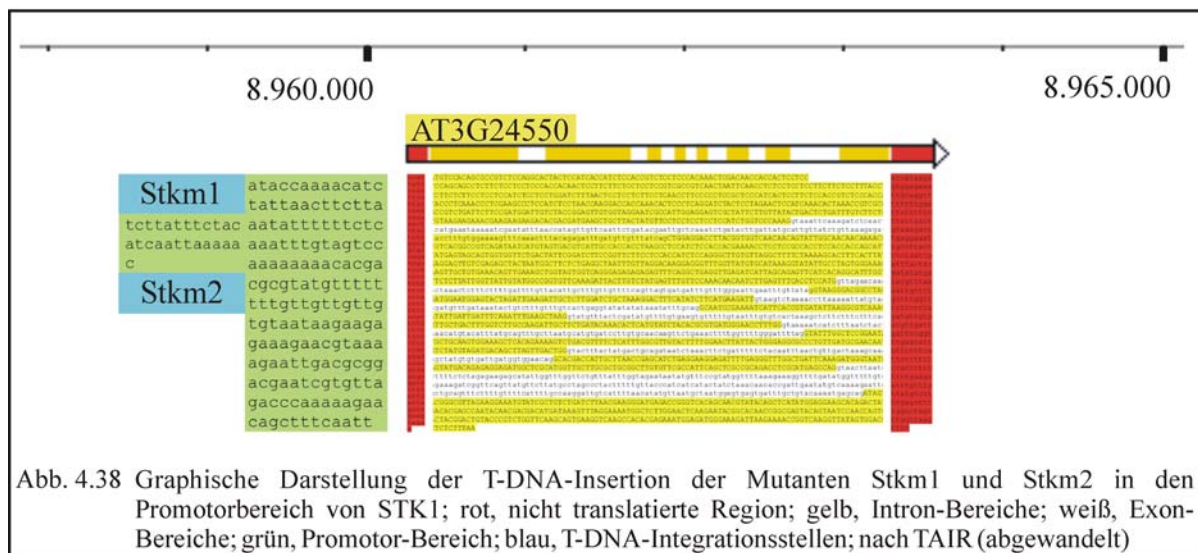
Die Transitsequenz der Kinase umfasst 83 Aminosäuren und lokalisiert STK1 nach ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) mit einer Wahrscheinlichkeit von 86% chloroplastidär (Abb. 4.36). Sie wird potentiell an der proteolytischen Verdauungsstelle, „SA“, bei dem Import in den Chloroplasten abgespalten (Abb. 4.36). Die potentielle Membrandomäne ist 22 Aminosäure groß und 56 Aminosäuren von dem N-Terminus des maturen Proteins lokalisiert (Abb. 4.36). Die Serin-Threonin-Kinase-Domäne umfasst 273 Aminosäuren und enthält das aktive Zentrum (Abb. 4.36). Dieses bindet Serin-/Threoninreste der Substrate und überträgt mit seinem ATP-Bindemotiv die Phosphatgruppe. Mit dem Programm Swiss-Model™ (Schwede et al., 2003) wurde die Tertiär-Struktur der STK1 berechnet (Abb. 3.7). Als Grundlage dieser Struktur verwendet das Programm Serin-Threonin-Membran-Kinasen, deren Struktur mit Röntgenstruktur-Analyse bereits analysiert wurde.



In der berechneten Tertiär-Struktur kann deutlich die Domänen-Struktur der Kinase identifiziert werden. Die Kinase-Domäne der STK1 bildet eine Tasche, in die sich das Substrat einlagern kann (Abb. 4.37). Am Grund dieser Tasche befindet sich das ATP-Bindemotiv, das die Phosphatgruppe auf das Substrat überträgt (Abb. 4.37). Die N-Terminale Membrandomäne bildet eine Faltenblatt-Struktur aus, die STK1 in der Membran verankert (Abb. 4.37). STK1 ist nach der berechneten Struktur eine chloroplastidäre Serin-Threonin-Membran-Kinase.

4.2.2 Mutanten-Analysen von STK1

Zur Identifizierung einer potentiellen Funktion in der Photoakklimation wurden STK1-T-DNA-Mutanten analysiert. Die T-DNA-Mutanten wurden „in silico“ mit dem „Signal-T-DNA-ExpressTM“ (Alonso et al., 2003) identifiziert und von dem „ABRC-Stock-CenterTM“ erhalten. Bei den erhaltenen Mutanten handelt es sich um mit *Agrobacterium tumefaciens* transformierte *Arabidopsis thaliana* Ecotyp *Columbia*-Linien (Baulcombe et al., 1986). Durch Amplifikation mit Genspezifischen und T-DNA-spezifischen Primern mit anschließender Sequenzierung konnte der T-DNA-Integrationsstelle identifiziert werden. Mit dem „Signal-T-DNA-ExpressTM“ (Alonso et al., 2003) wurden die Mutanten, die in dem STK1-Gen At3g24550 inserierten, identifiziert.



Die T-DNA inserierte bei der Mutante Stkm1 168bp und bei der Mutante Stkm2 191bp vor dem nicht translatierten Bereich des STK1-Gens (Abb. 4.38). Die T-DNA-Integrationsstelle beider Mutanten lag 25bp voneinander entfernt (Abb. 4.38). Da die Mutante Stkm2 erst zu einem späteren Zeitpunkt von dem „ABRC-Stock-CenterTM“ (Alonso et al., 2003) bezogen werden konnte, wurde mit der Mutante Stkm1 und nachfolgend Stkm2 erste phänotypische Untersuchungen durchgeführt.

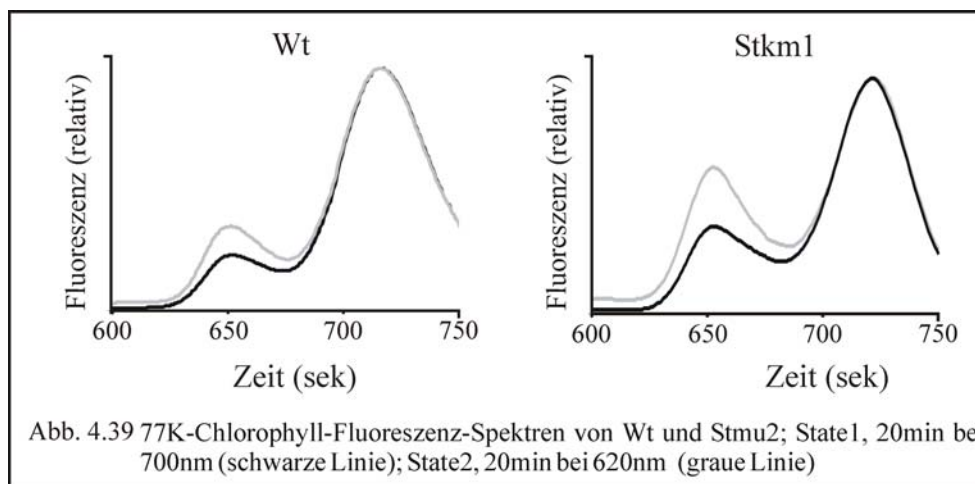
4.2.3 Charakterisierung der Stkm-Phänotypen

Das Wachstum der Mutanten Stkm1 und Stkm2 unter Normallicht-Bedingungen (100 μ E aktinisches Licht) unterschied sich nicht von dem des Wt. Auch der relative Elektronentransport des PSII, Fv/Fm unterschied sich mit $0,814 \pm 0,016$ nicht signifikant von dem des Wt, $0,823 \pm 0,013$. Die photosynthetische Elektronentransportkette der Mutante war bei Normallicht-Bedingungen nicht gestört.

Chloroplastidäre Serin-/Threonin-Membrankinasen sind an Signal-Kaskaden von Photoakklimationsprozessen beteiligt (Kruse, 2001, Aro und Ohad, 2003). Eine Mutation innerhalb einer Signalkaskade könnte die Photoakklimation der Pflanze stören. Daher wurde die Mutante Stkm1 auf einen potentiellen Defekt der „State Transition“ und des „PSII-Repair-Cycle“ analysiert.

4.2.3.1 Die Analyse der „State Transition“ von Stkm1

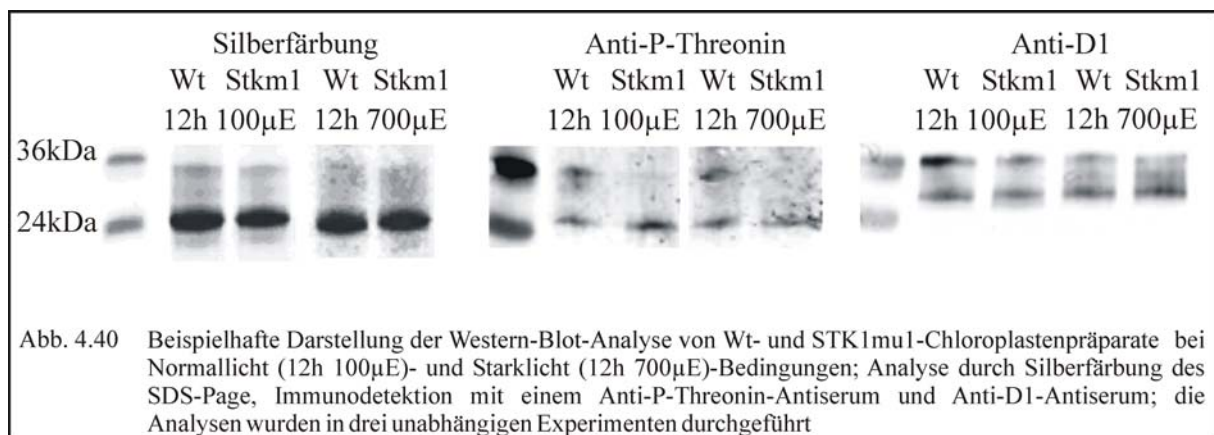
Der Photoakklimationsprozess der „State Transition“ wurde mit der Methode der 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie analysiert (s. 3.4.2.2). Wt- und Stkm1-Pflanzen wurden an State1-(20min, 700nm, 40 μ E) und State2-(20min, 620nm, 100 μ E) Bedingungen adaptiert und die Spektren analysiert.



Die PSI normierten 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektren von Wt und Stkm1 zeigten keine Unterschiede. Bei State2-Bedingungen zeigten Wt und Mutante bei 685nm ein niedrigeres PSII-LHCII Fluoreszenz-Maximum (Abb. 4.39). Durch Migration der mobilen LHCII zu PSII unter State1-Bedingungen erhöhte sich die PSII-LHCII-Fluoreszenz deutlich (Abb. 4.36). Bei Stkm1 konnte kein Defekt der „State Transition“ identifiziert werden.

4.2.3.2 Die Untersuchung der *Stkm1-D1*-, „in vivo“-Phosphorylierung

Der Photoakklimationsprozess der Photoinhibition wird durch Phosphorylierung von PSII-UE induziert (Schuster et al., 1986, Zusammenfassung Kruse, 2001). Eine Mutation innerhalb der PSII-Kinase-Kaskade könnte eine Störung der Phosphorylierung der PSII-Proteine induzieren. Die Phosphorylierung der PSII-UE wird durch Starklicht-Bedingungen induziert (Schuster et al., 1986). Daher wurde in Zusammenarbeit mit Sascha Räker, von Wt und Mutante, vor und nach Belichtung Chloroplasten isoliert und die Proteine mit der Methode des Western-Blottes analysiert. Die Pflanzen wurden für 12h mit 100 μ E und 700 μ E aktinischem Licht inkubiert und anschließend Chloroplasten-Präparate isoliert. Beispielhaft für die PSII-Phosphorylierung wurde die Phosphorylierung der D1-/D2-Protein-Bande (ca.38kDa) sowie als Kontrolle die der LHCII-Bande (ca.24kDa) analysiert.



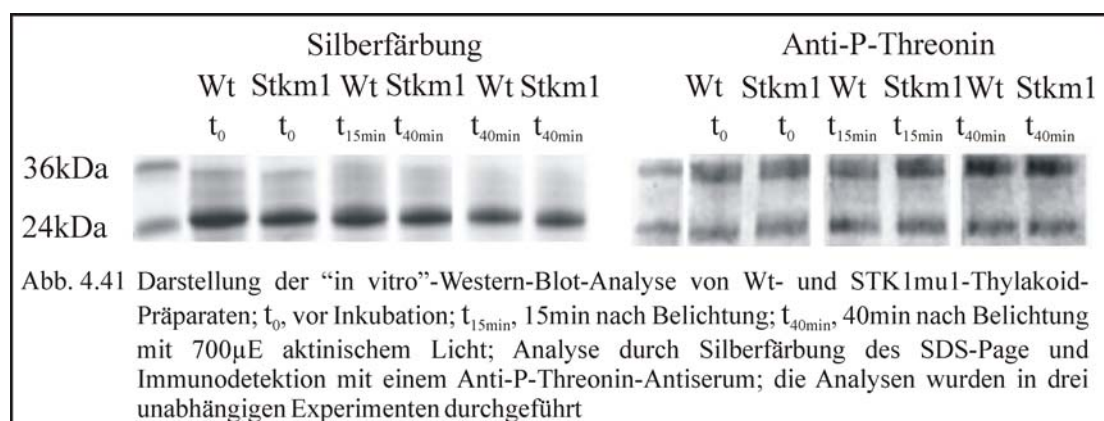
Die Mutation der STK1 in *Stkm1* hat weder auf die „State Transition“ (s. 4.2.3.1) noch auf die LHCII-Kinase-Kaskade (Abb. 4.40) einen Einfluss.

Der Prozess der Photoinhibition wurde durch die Mutation beeinflusst. Die Phosphorylierung der D1-/D2-Bande von *Stkm1* und Wt zeigten deutliche Unterschiede. Im Gegensatz zu dem Wt konnte in der Mutante keine Phosphorylierung der D1-/D2-Bande detektiert werden (Abb. 4.40, Anti-P-Threonin). Die Proteinmengen der analysierten Proben (Abb. 4.40, Silberfärbung), sowie die des D1-Proteins (Abb. 4.40, Anti-D1) unterschieden sich dabei nicht zwischen Wt und *Stkm1*. Die Bande des Anti-D1-Blottes zwischen der 36kDa- und der 24kDa-Bande entspricht dabei dem Degradationsprodukt des D1-Proteins (Abb. 4.40, Anti-D1) (Kruse et al., 1997). Das D1-/D2-Protein wird „in vivo“ nicht phosphoryliert (Abb. 4.40).

4.2.3.3 Die Untersuchung der *Stkm1-D1*-, „in vitro“-Phosphorylierung

Die „in vivo“ Phosphorylierung der D1-/D2-Proteine von *Stkm1* war im Vergleich zu dem Wt gestört (s. 4.2.3.2). Dies konnte sowohl bei Normallicht als auch bei Starklicht-Bedingungen detektiert werden (Abb. 4.40). Daher wurde eine Involvierung der STK1 in der Aktivierung der PSII-Kinase-Kaskade postuliert. Die „in vivo“ Hemmung der D1-/D2-Phosphorylierung konnte durch eine direkte Beteiligung der STK1 an der PSII-Kinase-Kaskade hervorgerufen werden. STK1 wäre somit eine Kinase innerhalb der PSII-Kinase-Kaskade mit dem D1-/D2-Protein als Endsubstrat. Die veränderte D1-/D2-Phosphorylierung könnte aber auch durch einen indirekten Effekt mit einer Beeinflussung der PSII-Kinase-Kaskade hervorgerufen werden. STK1 wäre dabei Mitglied einer Signalkaskade, welche einen regulativen Einfluss auf die D1-/D2-Kinase hätte, und deren Mutation in *Stkm1* die Hemmung der D1-/D2-Phosphorylierung auslöste.

Zur Analyse einer direkt oder indirekt Beteiligung der STK1 an der D1-Kinase-Kaskade wurden in Zusammenarbeit mit Sascha Räker „in vitro“-Phosphorylierungsanalysen mit Wt- und *Stkm1*-Thylakoiden durchgeführt (3.3.9). Durch Zugabe von ATP als Substrat wurde die Phosphorylierung der PSII-Proteine durch die PSII-Kinase „in vitro“ ermöglicht. Die PSII-Kinase-Kaskade wurde durch Belichtung mit photoinhibitorischem Starklicht ($700\mu\text{E}$) induziert. Es wurden vor Belichtung, 15min nach und 40min nach Belichtung mit $700\mu\text{E}$ aktinischem Licht Proben entnommen und mit der Methode des Western-Blottes und Anti-P-Threonin-Immunodetektion analysiert.



Bei der Phosphorylierung der D1-/D2-Proteine auf der Höhe der 36kDa Marker-Bande konnte in der Analyse keine Unterschiede zwischen Wt und *Stkm1* detektiert werden (Abb. 4.41).

Die D1-/D2-Proteine waren aber bereits zu dem Zeitpunkt t_0 der Probenentnahme in Wt und Mutante phosphoryliert (Abb. 4.41). Die Phosphorylierung der D1-/D2-Proteine wurde daher bei dem „in vitro“-Versuchsansatz nicht als Folge der Starklicht-Inkubation (Schuster et al., 1986) sondern durch ATP induziert. Die Zunahme der Phosphorylierung der D1-/D2-Proteine bei den Probenentnahmen nach 15min und 40min war daher kein Starklicht-Effekt (Schuster et al., 1986) sondern ein Zeit-Effekt (Abb. 4.41). Die Mutation der STK1 in Stkm1 bewirkte eine Hemmung der D1-/D2-Phosphorylierung, die jedoch nicht durch eine direkte Deletion der D1-/D2-Kinase hervorgerufen wurde.

4.2.3.4 Die Untersuchung des Stkm1-Phänotyps bei Starklicht-Bedingungen

Die Mutation der STK1 in der Mutante zeigte den Phänotyp einer gehemmten Phosphorylierung der D1-/D2-Proteine „in vivo“ (4.2.3.2). Durch die Phosphorylierung der PSII-Proteine wird der Photoakklimationsprozess der Pflanze an Starklicht-Bedingungen, die Photoinhibition induziert. Durch Phosphorylierung der PSII-UE schützt sich die Pflanze unter Starklicht-Bedingungen vor einer Erhöhung des „PSII-Repair-Cycle“ mit anschließender sofortiger Degradierung der synthetisierten D1-Proteine durch gebildete ROS (Rintamäki et al., 1996, Kruse et al., 1997). Da bei den STK1-Mutanten unter Normallicht-Bedingungen keine physiologischen Unterschiede im Vergleich zu dem Wt detektiert werden konnten (4.2.3), wurden die Pflanzen vergleichend mit Starklicht (12h Dunkelheit, 12h 700 μ E aktinisches Licht) inkubiert.

4.2.3.4.1 Die Starklicht-Adaptation der Mutante Stkm1

Die Mutante Stkm1 wurde im Vergleich mit dem Wt 20Tage an 700 μ E Starklicht adaptiert. Die Pflanzen wurden gegen eine Erhitzung mit einem Luftstrom gekühlt. Die Temperatur überschritt dabei 25°C nicht.



Der Phänotyp der Mutante Stkm1 unterschied sich deutlich von dem des Wt. Nach 20tägiger Starklicht-Inkubation war die Mutante schon deutlich in der Phase der Seneszenz (Abb. 4.42) Im Gegensatz zu dem Wt reicherte sie große Mengen an Anthocyane ein (Abb. 4.42). Die Mutation der STK1 bedingt daher eine geringere Toleranz gegen dauerhafte Starklicht-Bedingungen.

4.2.3.4.2 Die Starklicht-Adaptation der Mutante Stkm2

Die Starklicht-Adaptation der Mutante Stkm2 wurde analog zu der der Mutante Stkm1 durchgeführt. Die Mutante wurde vergleichend für 20Tage in einem Tag-/Nacht-Rhythmus von je 12h mit 700 μ E aktinischem Licht inkubiert. Zur Kontrolle wurde von Wt und Stkm2 Pflanzen bei gleicher circadianer Rhythmik unter Normallicht-Bedingungen (100 μ E aktinischem Licht) kultiviert.

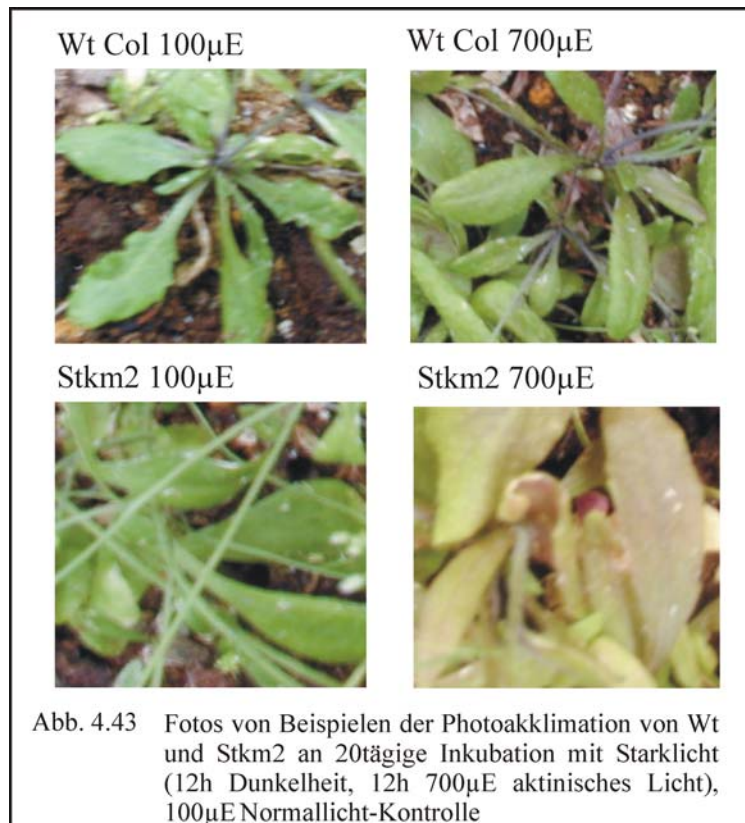
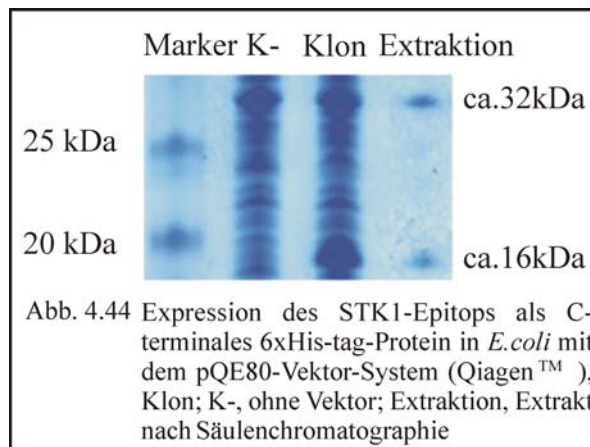


Abb. 4.43 Fotos von Beispielen der Photoakklimation von Wt und Stkm2 an 20tägige Inkubation mit Starklicht (12h Dunkelheit, 12h 700μE aktinisches Licht), 100μE Normallicht-Kontrolle

Die Stkm2-Pflanzen, die unter Normallicht-Bedingungen kultiviert wurden, unterschieden sich nicht von dem Wt (Abb. 4.43). Auch der Wt nach 20tägiger Starklicht-Adaptation zeigte nur geringe Anthocyan-Einlagerungen (Abb. 4.43). Die STK1-Mutante Stkm2 hingegen zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen Starklicht- und Schwachlicht-Bedingungen. Bei Starklicht blichen die Chlorophylle der Mutante aus und es lagerten sich Anthocyane ein (Abb. 4.43). Die Mutante Stkm2 zeigte den gleichen Phänotyp (Abb. 4.43) wie die Mutante Stkm1 (Abb. 4.42) einer im Vergleich zu dem Wt geringeren Toleranz an Starklicht-Bedingungen.

4.2.4 Die Expression von STK1 in *E.coli*

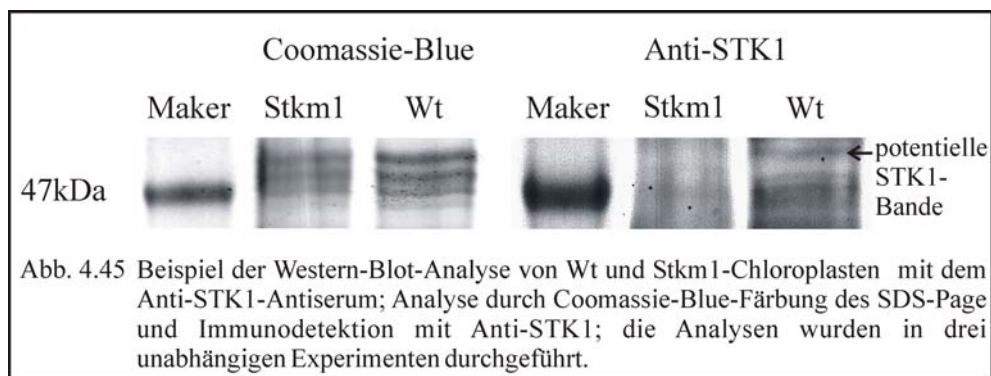
Die Lokalisation der „in silico“ identifizierten potentiell chloroplastidären STK1 sollte durch Immuno-Lokalisationsstudien analysiert werden. In einem ersten Schritt wurde daher ein Epitop der Kinase in *E.coli* expremiert und mit dem Protein ein Kaninchen immunisiert. Die cDNA von STK1 wurde amplifiziert, sequenziert und in *E.coli* kloniert. Die Sequenz der klonierten cDNA war zu 100% mit der annotierten cDNA der *Arabidopsis*-Database (Tair, Garcia-Hernandez, 2002) homolog. STK1 wurde komplett mit 6xHis-tag-Protein in *E.coli* kloniert und expremiert. Das expremierte Protein wurde aber in *E.coli* degradiert und konnte daher nicht effektiv gereinigt werden. Daher wurde die Expression von STK1 auf ein, für eine Immunisierung ausreichendes Epitop, beschränkt. Das identifizierte C-terminale Epitop wurde für die Expression als 6xHis-tag-Protein ausgewählt. Das in *E.coli* expremierte Fusionsprotein besaß nach PeptidMass™ (Wilkins et al., 1997) eine Größe von 16,4kDa.



Das expremierte Protein konnte eindeutig auf einer Höhe von ca. 16kDa im SDS-Page-Coomassie-Blue identifiziert werden (Abb. 4.44). Während der säulenchromatographischen Reinigung des Proteins wurde ein zweites Protein von ca. 30kDa identifiziert, welches auf eine Aggregation des Epitops als Dimer schließen ließ (Abb. 4.44). Die Immunisierung des expremierten Epitops gegen Kaninchen wurde von der Firma Pineda™ (Deutschland) durchgeführt. Das erhaltene Antiserum wurde für Lokalisations- und Expressionsanalysen verwendet.

4.2.5 Die STK1-Antiserum-Analysen

Das Antiserum der Firma Pineda™ gegen STK1 wurde in Zusammenarbeit mit Sascha Räker für erste immunologische Analysen verwendet. Von *Arabidopsis thaliana*-Wt und Stkm1 wurden nach Baginsky, (persönliche Kommunikation) Chloroplasten-Präparate isoliert (s. 3.3.8). Mit dieser Methode wurden durch mehrere Dichte-Gradienten-Zentrifugationen reine Chloroplasten-Präparate isoliert, die keine mitochondriellen Kontaminationen mehr enthielten. Diese Wt- und Stkm1-Chloroplasten-Präparate wurden mit Western-Blot und Anti-STK1-Immunisteuerung vergleichend analysiert.



Die Westernblot-Analyse mit dem STK1-Antiserum ergab zwischen Wt und Mutante einen Unterschied. Mit dem Antiserum konnte bei dem Wt eine potentielle STK1-Bande detektiert werden (Abb. 4.45). Das Molekulargewicht des detektierten Antigens entsprach dem des mit PeptideMass™ (Wilkins et al., 1997) kalkulierten Molekulargewicht der STK1 ohne Transitsequenz von ca. 58kDa (Abb. 4.54). Das Ergebnis war aufgrund des hohen Hintergrundes des STK1-Antiserums aber nicht eindeutig. Daher wurde das SDS-Page auf Höhe der detektierten Antigen-Bande für eine MALDI-Analyse verwendet.

4.2.6 Die MALDI-Analyse des detektierten Antigens

Das SDS-Page der mit dem STK1-Antiserum detektierten Antigen-Bande wurde mit der Methode der Massenspektrometrie analysiert (s. 3.3.11). Das SDS-Page wurde auf der entsprechenden Lauffront ausgeschnitten, die Proteine eluiert und tryptisch verdaut. Anschließend wurden die erhaltenen Peptide mit der Methode des MALDI im elektromagnetischen Feld analysiert. Mit den von Wt und Stkm1 erhaltenen Molekulargewicht-Daten der Peptide wurden mit dem Programm BLAST™ (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) von NCBI (USA) Homologie-Vergleiche mit *Arabidopsis thaliana*-Proteinen durchgeführt.

1	MSTAPSPGTT	PSPSPSPPT	NSTTTTTPPA	ASSPPPTTTP	SSPPPSPSTN
51	STSPPPSSPL	PPSLPPPSPP	GSLTPPLPQP	SPSAPITPSP	PSPTTPSNPR
101	SPPSPNQGP	NTPSGSTPRT	PSNTKPSPPS	DSSDGLSTGV	VVGIAIGGVA
151	ILVILTLCI	LCKKKRRRRH	DDEAAYVPP	PPPSGPKAGG	PYGGQQQYWQ
201	QQNASRPSDN	HVVTSLPPPK	PPSPPRKPPP	PPPPAFMSS	SGGSDYSDLP
251	VLPPSPGLV	LGFSK STFTY	EELSR ATNGF	SEANLLGQGG	FGYVHK GILP
301	SGKEVAVKQL	KAGSGQGER E	FQAEVEIISR	VHHRHLVSLI	GYCMAGVQRL
351	LVYEFVPNNN	LEFHLHGKGR	PTMEWSTRLK	IALGSAKGLS	YLHEDCNPKI
401	IHRDIKASNI	LIDFKFEAKV	ADFGLAKIAS	DTNTHVSTRV	MGTFGYLAPE
451	YAASGKLTEK	SDVFSFGVVL	LELITGR RPV	DANNVYVDDS	LVDWARPLLN
501	RASEEGDFEG	LADSKMGNEY	DREEMARMVA	CAAACVRHSA	RRRPRMSQIV
551	RALEGNVSL	DLNEGMRPGH	SNVYSSYGGS	TDYDTSQYND	DMIKFRKMAL
601	GTQEYGTGTE	YSNPTSDYGL	YPSGSSSEGQ	ATREMEMGKI	KKTGQGYSGP
651	SL				

Abb. 4.46 Darstellung des Wt-Ergebnisse der Maldi-Analyse; grau, Aminosäure-Sequenz von STK1; rot, Peptide, deren MW den mit Maldi identifizierten MW zugeordnet wurden

Das Ergebnis der MALDI-Analyse von Wt und Stkm1 unterschied sich deutlich. Drei aus dem Wt isolierte und detektierte Peptide konnten mit dem Programm BLAST™ (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) der tryptisch-verdauten Aminosäure-Sequenz der Kinase STK1 zugeordnet werden (Abb. 4.46). In der STK1-Mutante konnte dagegen keine Peptide identifiziert werden, deren Masse einem potentiellen STK1-Fragment zugeordnet werden konnte. Das Ergebnis der STK1-Antiserum- und Maldi-Analyse unterstützt die „in silico“-Analysen einer potentiell chloroplastidären Lokalisation der Serin-/Threonin-Kinase STK1 (s. 4.2.1.2).

5. Diskussion

5.1 Die „State Transition“ als redox-regulierter Photoakklimationsprozess

Im Rahmen der DFG-Forschergruppe FOR 387 sollten Komponenten redox-regulierter Photoakklimationsprozesse identifiziert werden. Hierzu wurden in dieser Arbeit zwei Versuchsansätze verwendet.

In dem ersten, „forward genetics“-Ansatz wurde der Photoakklimationsprozess der „State Transition“ durch Mutanten analysiert.

Der Photoakklimationsprozess der „State Transition“ wird durch den Redox-Zustand des PQ-Pools reguliert (Allen et al., 1981, Allen und Pfannschmidt, 2001, Kruse, 2001, Wollmann, 2001). Dieser aktiviert im reduzierten Zustand eine Kinase-Kaskade, die LHCII-Proteine phosphoryliert und eine Migration von PSII zu PSI induziert (Allen et al., 1981). Neben einer Redox-Regulierung durch den PQ-Pool unterliegt die „State Transition“ unter Starklicht-Bedingungen einer weiteren Redox-Regulierung durch das Thioredoxin-System (Rintamäki et al., 2000, Martinsuo et al., 2003). Das Thioredoxin-System des Chloroplasten fungiert als Sensor des Redox-Zustandes von Ferredoxin, dem Endprodukt der photosynthetischen Elektronentransportkette (Buchanan, 1984). Durch Starklicht werden der Elektronentransport und die Reduktion von Ferredoxin gesteigert. Durch die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase wird Thioredoxin durch das gebildete Fd_{red} zu seinem Sulhydryl reduziert (Holmgren et al., 1977, Wolosiuk und Buchanan, 1977) und reduziert wiederum Disulfid-Brücken der „State Transition“ induzierenden LHCII-Kinase/n (Rintamäki et al., 2000, Martinsuo et al., 2003).

Der Anteil der „State Transition“ an der Anpassung von Organismen an wechselnde Umweltbedingungen ist für Organismen unterschiedlich.

In der Grünalge *C. reinhardtii* konnte eine Migration von bis zu 85% der LHCII-Proteine detektiert werden (Delosme et al., 1996). Auch konnten direkte Auswirkungen der Respiration auf die „State Transition“ analysiert werden (Cardol et al., 2003). Diese Auswirkungen sind Anpassungsmechanismen des Organismus an ein verändertes ATP zu NAD(P)H-Verhältnis (Wollman, 2001). Das Verhältnis reguliert in *C. reinhardtii* durch Reduktion bzw. Oxidation des PQ-Pools das Verhältnis zwischen zyklischem und linearem Elektronentransport (Vallon et al., 1991; Delosme et al., 1996 Finazzi et al., 1999, Zusammenfassung Wollman, 2001). Die Komponenten, die neben der photosynthetischen Elektronentransportkette Auswirkungen auf das Redox-Gleichgewicht des PQ-Pools haben, sind noch nicht eindeutig identifiziert.

Eine potentielle Reduktion durch die chloroplastidäre Ndh-Dehydrogenase (Mi et al., 1992, Kubicki, 1996, Burrow et al., 1998, Shikanai et al., 1998, Joet et al., 2001) und eine Oxidation durch die plastidäre alternative Oxidase Immutans (Carol et al., 1999, Wu et al., 1999, Lennon et al., 2003) werden diskutiert (Hoefnagel et al., 1998, Nixon, 2000, Peltier und Cournac, 2002). In *C. reinhardtii* konnte bei Reduktion des PQ-Pools zusätzlich eine Übertragung der Elektronen auf Protonen und damit die Synthese von molekularem Wasserstoff detektiert werden (Antal et al., 2003). In der „State Transition“-Mutante *Stm6* ist diese Synthese im Vergleich zu dem Wt deutlich erhöht (Kruse, unveröffentlicht).

In höheren Pflanzen ist der Anteil der „State Transition“ an der Photoakklimation noch unklar. Der Anteil der mobilen LHCII-Proteinen ist mit 15-20% geringer (Allen, 1992) als bei *C. reinhardtii*. Auch die Funktion der „State Transition“ als Regulator des Verhältnisses von zyklischem zu linearem Elektronentransport (Vallon et al., 1991, Delosme et al., 1996, Finazzi et al., 1999, Wollman, 2001) konnte für Pflanzen noch nicht bestätigt werden. Havaux, (1992) konnte bei einem Wechsel von State1- zu State2-Bedingungen in *Pisum sativa* keinen Anstieg des zyklischen im Vergleich zu dem linearen Elektronentransport detektieren.

Der Prozess der „State Transition“ in höheren Pflanzen wurde wegen seiner zweifachen Redox-Regulation durch den PQ-Pool (Allen et al., 1981) und das Thioredoxin-System (Rintamäki et al., 2000, Martinsuo et al., 2003) zur Aufklärung von redox-regulierten Photoakklimationsprozessen verwendet.

5.2 Das verwendete „State Transition-Screening“-Verfahren

Zur Isolation von „State Transition“-Mutanten existierten bereits zu Beginn dieser Arbeit verschiedene „Screening“-Methoden. In *C. reinhardtii* (Kruse et al., 1999, Fleischmann et al., 1999) sowie in *Synechocystis PCC6803* (Emlyn-Jones et al., 1999) wurden „Screening“-Verfahren entwickelt, die auf der Detektion der Chlorophyll-Fluoreszenz bei State1- und State2-Bedingungen beruhten. Mit dieser Methode wurden erfolgreich „State Transition“-Mutanten isoliert und charakterisiert (Kruse et al., 1999, Fleischmann et al., 1999, Emlyn-Jones et al., 1999). Der Prozess der „State Transition“ weicht in *C. reinhardtii* und *Synechocystis PCC6803* von seiner Quantität (Allen, 1992, Delosme et al., 1996) und Bedeutung für die Regulation des Elektronentransportes (Vallon et al., 1991, Havaux, 1992) von dem höheren Pflanzen ab.

Daher wurde parallel zu der von Kruse et al., (1999, 2002) durchgeführten Charakterisierung von *C. reinhardtii*-„State Transition“-Mutanten in dieser Arbeit ein „Screening“-Verfahren für *Arabidopsis thaliana*-„State Transition“-Mutanten entwickelt (Borgstaedt et al., 2001).

Der in dieser Arbeit verwendete „forward genetics“-Ansatz beruhte auf einem „Screening“-Verfahren“ zur Identifizierung von „State Transition“ Mutaten aus *Arabidopsis thaliana*-EMS- und-„Neutron bombardment“-Linien. In ersten Versuchen wurde das von Kruse et al., (1999) genutzte Verfahren direkt auf *Arabidopsis thaliana* angewendet und erwies sich als ineffektiv. Daher wurden die Versuchsbedingungen an die spezifischen Bedingungen höherer Pflanzen angepasst. Im Gegensatz zu Kruse et al., (1999) wurde das FluoroCam™ -System (Fluoreszenz-Instruments, Tschechien) verwendet. Dieses System gewährleistete eine gleichmäßige Belichtung der Individuen mit 620nm State2-Licht und 700nm State1-Licht. Die Belichtungszeiten zur Adaptation an die „State Transition“-Zustände wurde gegenüber den von Kruse et al., (1999) für *C. reinhardtii* verwendeten 5min auf 20min für *Arabidopsis thaliana* ausgedehnt. Die Adaptation des „Video Imaging“-Verfahrens an *Arabidopsis thaliana* gewährleistete die erfolgreiche Identifizierung von „State Transition“-Mutanten.

Mit dem entwickelten „Video Imaging-Screening“-Verfahren wurden 21 potentielle „State Transition“-Mutanten aus einer Population von 10.000 *Arabidopsis thaliana*-EMS- und „Neutron bombardment“-Linien identifiziert.

Die Mutanten wurden anschließend mit der Methode der 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie auf den Phänotyp einer „State Transition“-Mutante analysiert. Mit dieser Methode kann die Migration der mobilen LHCII-Proteine als Ab-/Zunahme der Fluoreszenz der Photosysteme detektiert werden.

Durch eine zu hohe Dichte der Photosysteme wird bei dieser Methode die Emission der PSII-LHCII-Chlorophyll-Fluoreszenz von den PSI-LHCI-LHCII-Komplexen reabsorbiert. Zur Prävention dieser Fehlerquelle wird die Dichte der Photosysteme, gemessen als Chlorophyll-Konzentration nach Arnon (1959), auf 5µg/ml konzentriert. Mit dieser Methode sind Messungen von aquatischen Organismen wie *C. reinhardtii* und *Synechocystis PCC6803* gegenüber höheren Pflanzen unproblematisch, da dort die Organismen auf eine Chlorophyll-Konzentration von 5µg/ml konzentriert und dann mit Lichtinkubation an die „State Transition“-Zustände adaptiert werden können.

Messungen mit höheren Pflanzen sind dagegen problematisch, da nach Adaptation die Photosysteme für Messungen isoliert werden müssen. Zur Vermeidung potentieller Fehlerquellen wurde daher eine neue Methode der Isolierung entwickelt.

Arabidopsis thaliana-Wt und potentielle „State Transition“-Mutanten wurden an beide „State Transition“-Zustände adaptiert, umgehend homogenisiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Geschwindigkeit dieses Prozesses war dabei für die Qualität der Proben und Spektren ausschlaggebend. Durch nachträgliche Messung der Chlorophyll-Konzentration der Proben wurden Proben mit einer Chlorophyll-Konzentration über 5µg/ml verworfen.

Mit dieser Methode konnten aus den mit dem „Video-Imaging“-Screening identifizierten 21 Mutanten drei mit einer defekten „State Transition“ identifiziert werden. Bei dem verwendeten „Video Imaging“-Screening-Verfahren wurden 18 Mutanten als „State Transition“-Mutanten identifiziert, die eine intakte „State Transition“ besaßen. Bei diesen handelte es sich jedoch nicht nur um Wt. Es wurden auch Mutanten mit einer andauernd erhöhten Fluoreszenz identifiziert, die die Abnahme der Fluoreszenz durch den Prozess der „State Transition“ überlagerte. Bei diesen Mutationen konnten es sich potentiell um Defekte des q_E und q_I gehandelt haben, da auch diese Chlorophyll-Fluoreszenz-Abnahmen bei einem Übergang von State2 zu State1 anteilig induziert werden.

Diese fehlerhafte Identifizierung hätte mit einer Änderung der „State Transition“-Adaptation verhindert werden können:

Durch eine erste Adaptation an State1-Bedingungen wären die mobilen LHCII-Proteine zu PSI migriert und eine geringe Chlorophyll-Fluoreszenz wäre detektierbar gewesen. Durch anschließende Adaptation an State2-Bedingungen wären die mobilen LHCII-Proteine zu PSII migriert und ein Anstieg der Chlorophyll-Fluoreszenz hätte detektiert werden können. Dieser Anstieg der Fluoreszenz, gegenüber dem Abfall von State2- zu State1-Bedingungen, hätte ursächlich nur durch den Prozess der „State Transition“ ausgelöst werden können.

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten „State Transition“-Screening-Verfahren konnten aus den 10.000 analysierten *Arabidopsis thaliana*-Mutanten-Linien drei „State Transition“-Mutanten, Stmu1, Stmu2 und Stmu10 identifiziert werden

Das in dieser Arbeit verwendete „Screening“-Verfahren unterschied sich von anderen Verfahren, mit denen in *Arabidopsis thaliana* „State Transition“-Mutanten identifiziert wurden.

Mit zwei verschiedenen „reverse genetics“-Ansätzen konnten in *Arabidopsis thaliana* „State Transition“-Mutanten identifiziert werden. Naver et al., (1999) verwendeten einen „antisense“-Ansatz zur Hemmung von Komplex-UE des PSI.

Bei den *Arabidopsis thaliana*-Linien, bei denen die PSI-UE-PsaH und -PsaL gehemmt waren, konnte der Phänotyp einer „State Transition“-Mutante detektiert werden (Lunde et al., 2001). Der Phänotyp geht hierbei auf das Fehlen der PsaH-UE zurück.

Andersson et al., (2003) verwendeten einen ähnlichen Ansatz. Durch „antisense“-Hemmung der Lhcb1/2-Proteine wurde die Expression der nach Jackowski und Pielucha (2001) identifizierten mobilen LHCII-Proteine unterdrückt. Die Linie zeigte daher den Phänotyp einer „State Transition“-Mutante, wobei das Fehlen der Lhcb1/2-Proteine durch einen Anstieg der Expression anderer Chlorophylla/b bindenden Proteine annähernd kompensiert wurde (Andersson et al., 2003).

Mit einem „forward genetics“-Ansatz konnte ebenfalls eine „State Transition“-Mutante in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Varotto et al., (2000a) verwendeten einen Ansatz zur Identifizierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit Mutationen innerhalb der Photosynthese. Das „Screening“-Verfahren basierte auf der Messung einer Beeinträchtigung der photosynthetischen Elektronentransportkette durch Detektion des Fluoreszenz-Parameters der photosynthetischen Effizienz des PSII, Φ_{PSII} (Anderson et al., 1997). Von bisher 200.000 *Arabidopsis thaliana*-T-DNA-Mutanten zeigten 67 den Phänotyp eines abweichenden Φ_{PSII} (www.mpiz-koeln.mpg.de/~richly/GST-array.html). Mit diesem „Screening“-Verfahren wurde eine Mutante mit einer Mutation des psae1-1-Gens identifiziert. Diese Mutante hat geringere Mengen der PSI-UE PsaE, PsaC, PsaD, PsaH, PsaL (Varotto et al., 2002). Durch das Fehlen von Teilen der LHCII-Protein-Bindestelle des PSI, PsaH, (Lunde et al., 2001) zeigte diese Mutante ebenfalls den Phänotyp einer „State Transition“-Mutante (Varotto et al., 2002).

5.3 Die „State Transition“-Mutante Stmu10

5.3.1 Die Segregation der „State Transition“-Mutante Stmu10

Bei *Arabidopsis thaliana* handelt es sich im Gegensatz zu *C. reinhardtii* um einen diploiden Organismus. Daher wurden für das „State Transition-Screening“-Verfahren die F2-Generation mutagenisierter-Samen verwendet. In diesen Linien konnte der in der Parental-Generation heterozygote Genotyp einen homozygot-rezessiven Phänotyp auslösen.

Die drei Mutanten Stmu1, Stmu2 und Stmu10 wurden durch Selbstbefruchtung zur Ausbildung einer stabilen Linie vermehrt. Dabei erwies sich die Mutation in den „Neutron bombardment“-Mutanten Stmu1 und Stmu2 als instabil.

Der Phänotyp einer „State Transition“-Mutante konnte weder in der F1, noch in der F2-Generation nach Selbstbefruchtung detektiert werden. Ein Zusammenhang zwischen der Instabilität der Mutation und der Methode der Mutagenese ist daher möglich. Die mutagene Wirkung von „Neutron bombardment“ ist im Vergleich zu der EMS-Mutagenese variabler und noch unbekannt. Durch EMS werden Punktmutation durch Austausch der Basen G-C zu A-T induziert (Haughn and Somerville, 1987). Der Phänotyp der „State Transition“-Mutante *Stmu10* war dagegen stabil.

Zur Analyse der Segregation (s. 5.1.5.1) wurde *Stmu10* mit dem Wt-Columbia gekreuzt und in den nachfolgenden Generationen die Aufspaltung des Phänotypen analysiert. Der Phänotyp der Mutation spaltete sich in der F1-Generation nicht, in der F2-Generation 1 zu 3,4 und in der F3-Generation 1 zu 3,3 auf. Dies entsprach annähernd dem Verhältnis einer Aufspaltung nach dem 1. und 2. Mendelschem Gesetz eines rezessiven Phänotyps. Der Genotyp der Mutation lag daher in *Stmu10* homozygot vor und das erfolgreiche „Screening“ der Mutante wurde erst durch die Verwendung der F2-Generation mutagenisierter *Arabidopsis thaliana*-Linien ermöglicht.

5.3.2 Die Identifizierung des mutierten Locus

Im Gegensatz zu dem „forward genetics“-Ansatz von Varotto et al., (2000a) wurden in dieser Arbeit *Arabidopsis thaliana*-Linien analysiert, deren Mutation durch mutagene Substanzen induziert wurde.

Daher wurde zur Identifizierung des mutierten Locus die Methode der „mapping“-Analyse (Alonso-Blanco und Korneef, 2000, Jander et al., 2002) verwendet. Durch Kreuzung des *Stmu10*-Ecotyps *Columbia* mit dem Wt-Ecotyp *Landsberg erecta* wurden Hybrid-Linien erzeugt, bei denen der *Stmu10*-Phänotyp nach dem 2. Mendelschen Gesetz in der F2-Generation detektierbar war. Diese identifizierten *Stmu10*-Col-Ler-Hybride waren am Locus der ursprünglich aus *Stmu10*-Col stammenden Mutation homozygot *Columbia*. Durch Anwendung des „Video-Imaging-Screening“-Verfahrens wurde die *Stmu10*-Col-Ler-Hybride aus der F2-Hybrid-Generation isoliert und durch AFLP-Marker-PCR analysiert. Bei der für *Stmu10* verwendeten „mapping“-Analyse konnte mit dem Marker *nga8* aus den isolierten 308 *Stmu10*-Col-Ler-Hybride lediglich zwei Individuen mit einem Col/Ler-Locus identifiziert werden. Bei einer anschließenden Analyse der F3-Generation der beiden Individuen erwies sich der Phänotyp jedoch als fehlerhaft.

Von den, mit dem „Video Imaging“-Screening identifizierten *Stmu10-Col-Ler*-Hybriden, wurden ebenfalls durch Selbstbefruchtung stichprobenartig 20 Linien der F3-Generation analysiert. Je 50 Individuen dieser 20 Linien wurden mit dem „Video Imaging-Screening“ analysiert und zeigten den *Stmu10*-Phänotyp.

Durch den im „Video-Imaging“ klar zu identifizierenden *Stmu10*-Phänotyp der *Col-Ler*-Hybride konnte der Locus der Mutation durch AFLP-PCR auf 50.000bp eingegrenzt werden (Abb. 4.12). Die potentiell mutierten Gene wurden mit der Methode der vergleichenden RT-PCR analysiert (s. 4.1.5.3). Die cDNA des Gens *At4G08870* konnte mit dieser Methode in der Mutante nicht identifiziert werden und wurde daher mit der Methode des Northern-Blottes vergleichend analysiert. Auch mit der Methode des Northern-Blottes konnte im Gegensatz zu dem Wt in *Stmu10* kein Transkript des Gens *At4G08870* identifiziert werden (s. 4.1.5.4). Die Transkription des Gens *At4G08870* ist in *Stmu10* deletiert und mit großer Wahrscheinlichkeit Auslöser des Phänotyps einer „State Transition“-Mutante.

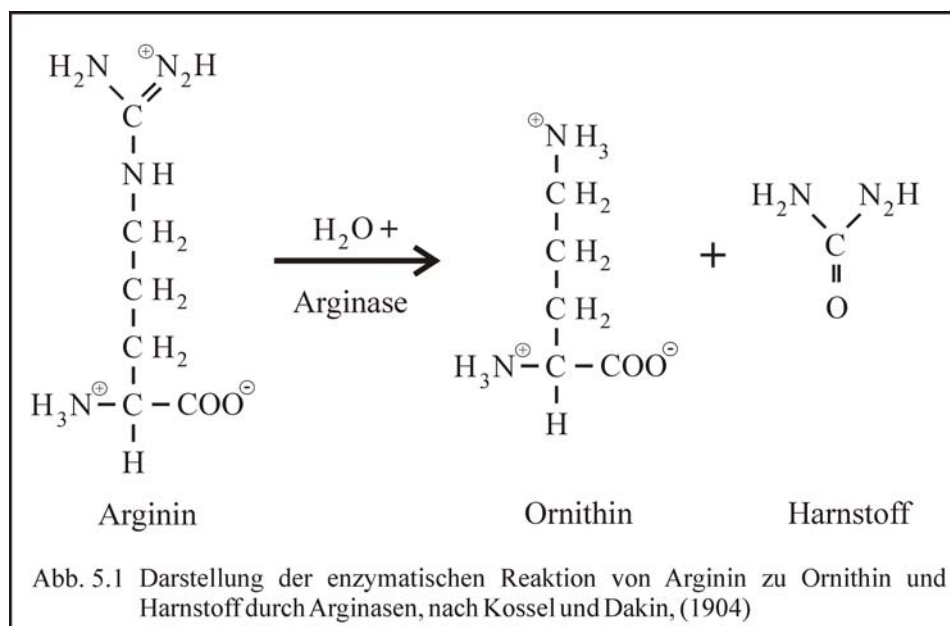
Der genaue Locus der Mutation könnte durch Sequenzierung des *At4G08870*-Gens identifiziert werden. Der zu sequenzierende Bereich würde bei *At4G08870* mit Promotorbereich ca. 6000bp umfassen, der überlappend amplifiziert, kloniert und sequenziert werden müsste. Ebenfalls könnte die Methode des „Tilling“ verwendet werden (McCallum et al., 2000). Durch Hybridisierung von Mutanten- und Wt-DNA kommt es bei Punkt-Mutationen zur Ausbildung von hetero-duplex Strukturen (McCallum et al., 2000). Diese werden mit der CEL1-Endonuklease verdaut und können anschließend im Vergleich zum Wt als unterschiedliche Banden im DNA-Page analysiert werden (Colbert et al., 2001). Zu dem Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit stand diese Technik noch nicht zur Verfügung.

Die Identifizierung von T-DNA-Mutanten des *At4G08870*-Gens würde ebenfalls zu einer weiteren Charakterisierung der Mutation führen. Durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation werden *Arabidopsis thaliana* mit Plasmid-DNA mutiert. Der Locus der Mutation kann durch PCR mit Gen- und T-DNA-Flanken-Primern identifiziert werden (McKinney et al., 1995). Durch Standardisierung dieser Methode konnten die Insertionen mehrere tausend T-DNA-Mutanten lokalisiert werden. Die Mutanten und die erhaltenen Daten können „in silico“ mit dem SignalT-DNAExpress™ analysiert werden (Alonso et al., 2003). Von den Genen *At4G08800*-*At4G08860* wurden T-DNA-Mutanten phänotypisch analysiert. In keiner der Mutanten konnte ein Defekt der „State Transition“ identifiziert werden. Es konnte keine T-DNA-Linien mit einer Insertion innerhalb des *At4g08870*-Gens identifiziert werden. Mutanten einer T-DNA-Integrationsstelle hinter der 3'-nicht-translatierten Region des *At4g08870*-Gens wurden identifiziert.

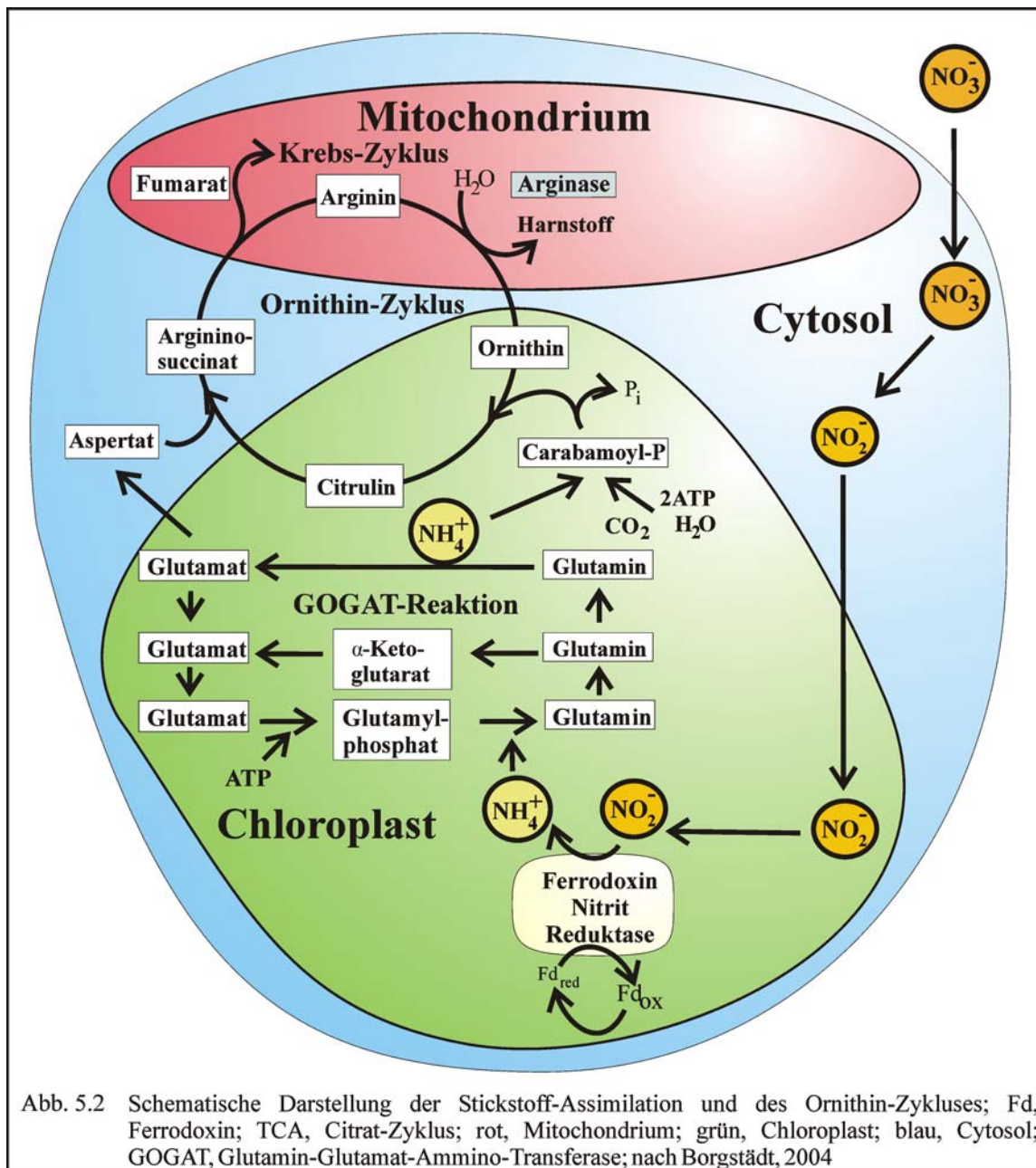
Bei diesen Linien war das At4g08870-Transkript nicht deletiert und sie zeigten keinen Stmu10-Phänotypen. Die Deletion von Genen durch EMS-Mutagenese unterliegt einer Zufallsverteilung (Anderson, 1995), wohingegen die Deletion von Genen durch T-DNA-Insertion auf bestimmte Insertionsbereiche beschränkt ist (Rosso et al., 2003). Eine Identifizierung der „State Transition“-Mutante Stmu10 in T-DNA-Mutanten-Linien gilt daher als unwahrscheinlich. Eine abschließende Klärung des Locus der Mutation könnte nur durch Komplementation der Mutante mit dem At4G08870-Gen erreicht werden. Auch eine phänotypische Analyse der Mutante Stmu10 kann das identifizierte Ergebnis einer Mutation des At4G08870-Gens unterstützen.

5.3.3 Die Auswirkungen der Deletion der Arginase2-Transkription in Stmu10

Das Gen At4g08870 von *Arabidopsis thaliana* kodiert nach Analysen durch Homologie-Vergleiche für eine potentielle Arginase (s. 4.1.5.5). Arginasen sind Enzyme, die eine Reaktion von Arginin zu Ornithin und Harnstoff katalysieren (Kossel und Dakin, 1904) (Abb. 5.1). Diese Reaktion wird in dem Mn^{2+} -bindenden reaktiven Zentrum katalysiert. Die Mn^{2+} -bindenden Aminosäuren sind in Arginasen verschiedener Organismen stark konserviert (Peozich et al., 1998).



Arginasen sind Schlüsselenzyme des Ornithin-Zyklus, in dem Aminosäuren abgebaut und die Amino-Gruppen in Form einer Guanidin-Gruppe von Arginin abgespalten werden (Abb. 5.1). Durch diesen Prozess wird Ornithin und Harnstoff, ein relativ kleines, neutrales, wasserlösliches Molekül, synthetisiert. Im Gegensatz zu Ammonium beeinflusst es nicht den intrazellulären pH-Wert. Durch enzymatische Reaktion mit der mitochondrialen Ornithin-Aminotransferase kann Glutamat synthetisiert werden (Taylor and Stewart, 1981), das wiederum durch Transaminierung als α -Ketoglutarat oder Succinat in den Krebs-Zyklus eingehen kann. Ornithin kann aber auch aktiv aus dem Mitochondrium in das Cytosol und anschließend den Chloroplasten transportiert werden. Dort kann es dann mit Carbamoyl-Phosphat zur Citrullin-Synthese oder zur Prolin-Synthese verwendet werden (Abb. 5.2).



Die Enzyme des Ornithin-Zyklus haben in Pflanzen verschiedene Wirkungsorte (Taylor und Stewart, 1981) (Abb. 5.2). Die N-Acetylorithin-Glutamat-Acetyltransferase, die Ornithin-Carbamoyl-Transferase und die Carbamoylphosphat-Synthetase sind in den Chloroplasten, die Argininosuccinat-Lyase dagegen im Cytosol lokalisiert (Taylor und Stewart, 1981) (Abb. 5.2). Die katabolischen Enzyme Arginase und Ornithin-Transferase sind in den Mitochondrien lokalisiert (Taylor and Stewart, 1981, Boutin, 1982, Goldraij und Polacco, 2000) (Abb. 5.2). Das in dem Ornithin-Zyklus durch die Ornithin-Carbamoyl-Transferase umgesetzte Carbamoyl-Phosphat wird durch die Carbamoyl-Synthetase synthetisiert. Für diesen endogenen Prozess werden die Moleküle Ammonium, ATP, Wasser und Kohlendioxid verwendet (Abb. 5.2). Für die Synthese von Ammonium wird in den Blättern das in der Photosynthese gebildete reduzierte Ferredoxin als Elektronendonator verwendet. Durch Reduktion von Nitrit wird durch die Ferredoxin-Nitrit-Reduktase Ammonium synthetisiert (Abb. 5.2). Das gebildete Ammonium wird in der GOGAT-Reaktion auf Glutamat übertragen (Abb. 5.2). Glutamat wiederum bildet neben Arginin den Stickstoff-Speicher der Pflanze und wird in weiteren Reaktionen zur Synthese verschiedener Aminosäuren verwendet.

Das in dem Chloroplasten synthetisierte Citrullin wird in das Cytosol transportiert und dort mit Aspartat und ATP zu Argininosuccinat umgesetzt (Abb. 5.2). Dieses wird wiederum unter Abspaltung von Fumarat durch die Argininosuccinat-Lyase zur Synthese von Arginin verwendet (Abb. 5.2). Das cytosolische Arginin wird aktiv in die Mitochondrien transportiert (Goldraij und Polacco, 1999, Hoyos et al., 2003) und vervollständigt so den Ornithin-Zyklus (Abb. 5.2).

Neben der in dieser Arbeit identifizierten Arginase2 wurde in *Arabidopsis thaliana* von Krumpelmann et al., (1995) eine weitere Arginase, Arginase1, identifiziert. Die Transitsequenzen beider Arginasen sind zu 53% homolog und werden durch TargetP (Emanuelsson et al., 1999) mitochondriell lokalisiert. Die Lokalisation der Arginase2 in den Mitochondrien konnte in dieser Arbeit durch den verwendeten GFP-Versuchsansatz bestätigt werden (s. 4.1.5.6). Eine mitochondrielle Lokalisation für Arginasen in höheren Pflanzen konnte ebenfalls von Taylor and Stewart, (1981), Boutin, (1982) und Goldraij und Polacco, (2000) detektiert werden. Die Arginase-Domänen der *Arabidopsis thaliana*-Arginase1 und -Arginase2 haben eine Homologie von 95% (s. 4.1.5.5).

Die Funktion der Arginase2 innerhalb des Ornithin-Zyklus wurde in Stmu10 durch Messung von Ornithin analysiert (Pistorius et al., 1989).

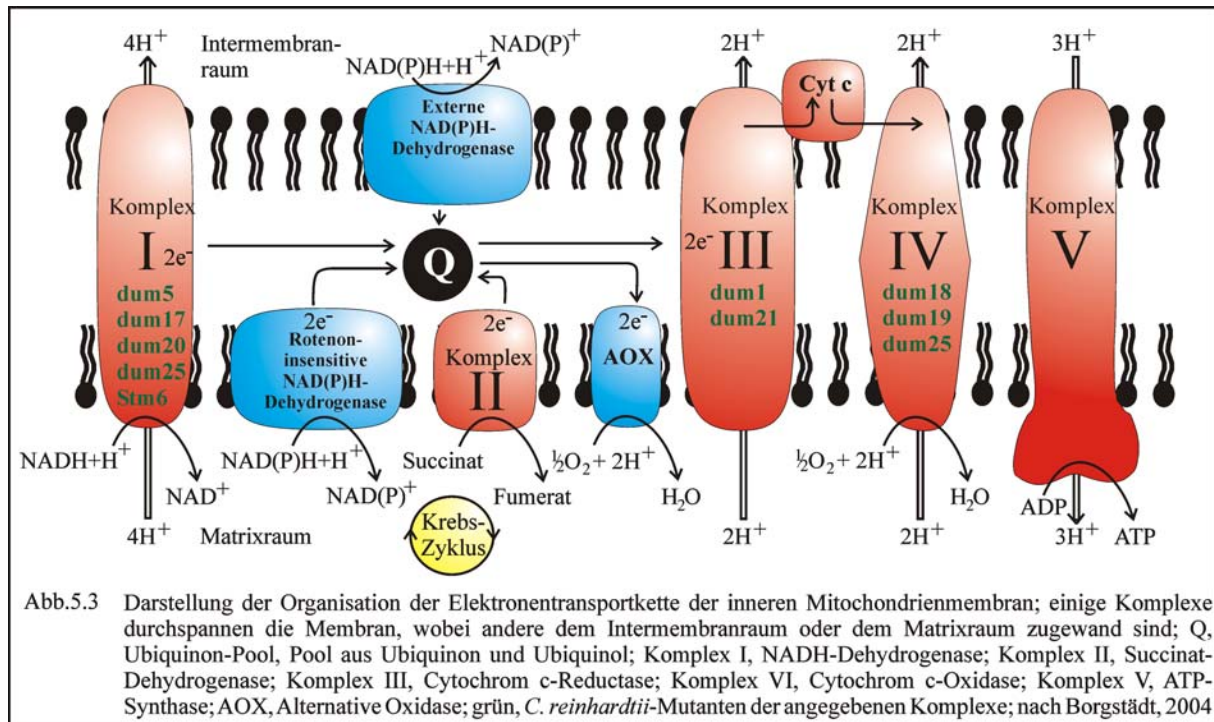
In der Mutante konnte eine Reduktion der Arginase-Aktivität um 25% detektiert werden (s. 4.1.7.1). Diese Reduktion lässt auf eine Arginase-Aktivität der Arginase2 in *Arabidopsis thaliana* schließen. Auch für die Arginase1 konnte eine Arginase-Aktivität in *Arabidopsis thaliana* detektiert werden. Die cDNA der Arginase1 wurde erfolgreich zur Komplementation einer *Saccharomyces cerevisia*-Arginase-Mutante verwendet (Krumpelmann et al., 1995).

Die Arginase-Aktivität von 75% kann daher in *Stmu10* auf die Aktivität der Arginase1 zurückgehen. Dies wird auch durch das Ergebnis einer deutlich erhöhten Expression des Arginase2-Transkriptes gegenüber dem Arginase1-Transkriptes unterstützt (s. 4.1.7.2). Durch Veränderungen des Umweltfaktors Licht durch Adaptation von *Arabidopsis thaliana* an Starklicht-Bedingungen kommt es zu einer Erhöhung der Arginase2-Transkription gegenüber der des Arginase1-Transkriptes (s. 4.1.7.3). Beide Arginasen in *Arabidopsis thaliana* setzen Arginin zu Ornithin und Harnstoff um, unterliegen aber einer unterschiedlichen Expression und Transkriptionsregulation.

Im Gegensatz zur Arginase1 hat die Arginase2 an der Arginase-Aktivität des Organismus einen geringeren Anteil. Die Arginase2 könnte daher eine regulatorische Funktion in der Anpassung der Arginase-Aktivität an veränderte Umweltbedingungen haben. Diese Funktion wäre aber nicht in allen Pflanzen vorhanden, da nach Datenbank-Recherchen in keinem anderen photosynthetisch aktiven Organismus eine zweite Arginase zu identifizieren ist.

Die Mutation der Arginase2 bewirkt in *Arabidopsis thaliana* eine Reduktion der Arginase-Aktivität (s. 4.1.7.1). Diese Einschränkung hat Auswirkungen auf verschiedene Stoffwechselwege und auf die mitochondriale Respiration.

Die Menge an KomplexI der mitochondrialen Respiration, die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase ist in *Stmu10* im Vergleich zu dem Wt um ca. 10% reduziert (s. 4.1.7.4). Eine Reduktion der KomplexI-Aktivität hat die Reduktion der mitochondrialen ATP-Synthese und die Erhöhung der chloroplastidären ATP-Synthese zur Folge (Mullineaux und Allen, 1986, Bulte et al., 1990) (Abb. 5.3).

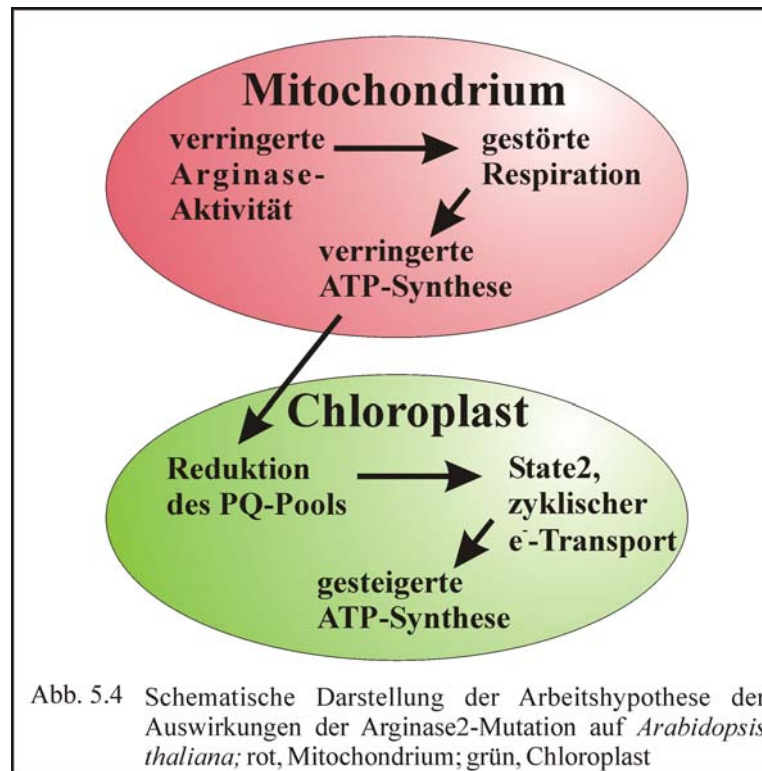


Cardol et al., (2003) und Schönfeld et al., (2004) identifizierten in *C. reinhardtii* ähnliche Phänotypen. Die Mutation des Komplex I, dum5, 17, (Cardol et al., 2002) dum 20, 25 (Remacle et al., 2001), des Komplex III, dum21, 1 (Remacle et al., 2001) und des Komplex IV dum18, 19 (Colin et al., 1995), sowie die Doppel-Mutationen der Komplexe I, III, dum22 und der Komplex I, IV, dum19+25 (Remacle et al., 2001) lösten in den Mutanten die Störung der mitochondrialen Respiration und damit der oxidativen Phosphorylierung aus (Cardol et al., 2003) (Abb. 5.3). Schönfeld et al., (2004) mutierten in der *C. reinhardtii*-„State Transition“-Mutante Stm6 den mitochondrialen Transkriptionsfaktor Moc1, der die Transkription der Komplex I-UE Cox1 reguliert. Die Mutation löste ebenfalls eine Reduktion der mitochondrialen ATP-Synthase und eine dauerhafte Reduktion des PQ-Pools aus (Schönfeld et al., 2004) (Abb. 5.3). Die Mutationen der mitochondrialen Respiration hatten die Hemmung des Prozesses der „State Transition“ durch eine dauerhafte Reduktion des PQ-Pools zur Folge (Cardol et al., 2003, Schönfeld et al., 2004). Den gleichen Effekt konnten Mullineaux und Allen, (1986) in *Synechococcus 6301*, sowie Bulte et al., (1990) in *C. reinhardtii* durch Hemmung der mitochondrialen Elektronentransportkette mit Entkopplern und Inhibitoren detektieren.

Auch in Stmu10 konnte eine dauerhafte Reduktion des PQ-Pools detektiert werden (s. 4.1.6.5, 4.1.6.6). Dieses wurde auf der Grundlage von Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen mit der Formel $qP = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ berechnet (Anderson et al., 1997).

Dieses wird auch durch die Phosphorylierungs-Analysen unterstützt. Nach Allen et al., (1981) führt die Reduktion des PQ-Pools zur Induktion der LHCII-Kinase-Kaskade und zur Phosphorylierung der LHCII-Proteine. Eine dauerhafte Reduktion des PQ-Pools würde daher zur stetigen Phosphorylierung der LHCII-Proteine führen. Die „in vivo“-Phosphorylierungsanalysen der Mutante bei State1-Bedingungen unterstützen daher die Vermutung eines dauerhaft reduzierten PQ-Pools. Während in dem Wt die LHCII-Proteine dephosphoryliert wurden, blieben die LHCII-Proteine in der Mutante in einem phosphorylierten Zustand (s. 4.1.6.8). Durch „in vitro“-Phosphorylierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von ATP die Kinetik der Phosphorylierung der LHCII-Protein von Wt- und Stmu10-Chloroplasten gleich war (s. 4.1.6.9). Die dauerhafte Induktion der LHCII-Kinase-Kaskade war daher in Stmu10 nicht die Folge einer direkten Mutation sondern der Effekt eines reduzierten PQ-Pools.

Die Hemmung der mitochondrialen Respiration und damit der Auslöser für den „State Transition“-Phänotyp geht ursächlich auf die Deletion der Arginase2-Transkription zurück (Abb. 5.4). Arginasen setzen als Komponenten des Ornithin-Zyklus Arginin zu Harnstoff und Ornithin um, das wiederum durch Transaminierung zu Succinat und α -Ketoglutarat reagiert. Diese Moleküle gehen ebenfalls wie das, in dem Ornithin-Zyklus synthetisierte Fumerat, in den Krebs-Zyklus ein. Eine verringerte Arginase-Aktivität als eines der Schlüssel-Enzyme des Ornithin-Zyklus hätte damit die Verringerung der Aktivität sämtlicher anderer beteiligter Enzyme zur Folge. Dadurch würden auch die Konzentrationen von Succinat, Fumerat und α -Ketoglutarat von der Reduktion betroffen sein. Diese Reduktion hätte eine Verringerung der mitochondrialen NADH-Synthese durch den Krebs-Zyklus und damit eine geringere KomplexI- und KomplexII-Aktivität zur Folge. Die Verringerung der mitochondrialen Respiration würde damit in Stmu10 eine Reduktion der mitochondrialen ATP-Synthese führen (Abb. 5.3, 5.4).



Die Reduktion der mitochondrialen ATP-Synthese wird durch eine Induktion des zyklischen Elektronentransportes (Finazzi, 1999, 2000, 2001, Wollman, 2001) und Steigerung der chloroplastidäre ATP-Synthese ausgeglichen (Allen und Mullineaux, 1986, Bulte et al., 1990). Dieser Prozess wird durch die Reduktion des PQ-Pools induziert (Abb. 5.4). Dieser könnte durch den chloroplastidären Ndh-Komplex, aber auch durch die Fd-Plastoquinon-Reduktase reduziert werden (Hoefnagel et al., 1998, Nixon, 2000, Peltier und Cournac, 2002, Lennon et al., 2003). Der Mangel an durch den Citrat-Zyklus gewonnenen Reduktionsäquivalenten, der durch die Respiration zu einem Mangel an ATP wird, könnte in Stmu10 zur Steigerung der chloroplastidären ATP-Synthese führen (Bulte al., 1990, Zusammenfassung Hoefnagel et al., 1998) (Abb. 5.4).

Mit dem verwendeten „State Transition-Screening“-Verfahren konnte Stmu10 als „State Transition“-Mutante identifiziert werden. Der Grad des Defektes konnte jedoch mit der Methode des „Video Imaging“ und der 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie nicht analysiert werden. Lunde et al., (2000) identifizierten den Grad des „State Transition“-Defektes mit der Messung der relativen Chlorophyll-Fluoreszenz-Zunahme bei einem Wechsel von State2- zu State1-Bedingungen.

Der relative Fluoreszenz-Wechsel der *Arabidopsis thaliana*-„State Transition“-Mutanten PsbH war um 82% (Lunde et al., 2000) und der psae1-1-Mutante um 93% (Pesaresi et al., 2002) im Vergleich zu dem Wt reduziert. Bei der LHCb2-12-Mutante konnte im Vergleich zu dem Wt kein relativer Fluoreszenz-Wechsel detektiert werden (Andersson et al., 2003).

Die Mutation in Stmu10 löste nicht eine vollständige Deletion der „State Transition“, sondern eine Reduktion des relativen Fluoreszenz-Wechsels auf 90% des Wt-Niveaus aus (4.1.6.2). Dies wird auch durch das Ergebnis der 77K-Chlorophyll-Emissions-Spektroskopie bestätigt. Die PSI-Fluoreszenz der Mutante ist dauerhaft erhöht, nimmt aber bei dem Übergang zu State1 geringfügig ab (Abb. 4.8). Bei Adaptation an Wechsellicht-Bedingungen (12h 10 μ E, 12h 100 μ E aktinisches Licht) zeigte Stmu10 den Phänotypen eines deutlich verlangsamten Wachstums. Diesen Phänotyp konnten Lunde et al., (2003) bei der PsbH-Mutante nicht detektieren. Die Störung der „State Transition“ in Stmu10 geht jedoch nicht auf eine strukturelle Mutation, sondern auf eine Veränderung des Redox-Zustandes des PQ-Pools zurück.

5.3.4 Die Regulation der chloroplastidären Gen-Expression in Stmu10

Mit einem chloroplastidären Makroarray, der alle chloroplastidären Gene und ORF enthielt (Kandlbinder et al., 2003), wurde die Transkription chloroplastidärer Gene als Auswirkung des dauerhaft reduzierten PQ-Pools im Vergleich zu dem Wt analysiert (s. 4.1.6.10.1). Die mit diesem Makroarray (Kandlbinder et al., 2003) erhaltenen Daten erwiesen sich als äußerst zuverlässig, da die Ergebnisse mit der Methode der RT-PCR beispielhaft bestätigt werden konnten (s. 4.1.6.10.2). Die erhaltenen Daten wurden mit RNA von Wt- und Stmu10-Individuen analysiert, die an Wechsellicht-Bedingungen adaptiert wurden. Dieser Zustand wurde gewählt, da bei Normallicht-Bedingungen keine Wachstums-Unterschiede zwischen Wt und Stmu10 zu detektieren waren (s. 4.1.6.1). Wechsellicht-Bedingungen induzierten in der Mutante den Phänotyp eines geringeren Wachstums (Abb. 4.18), der auf eine geringere Transkription und Translation von chloroplastidären Genen im Vergleich zu dem Wt schließen ließ. Die Störung der „State Transition“ bewirkte eine im Vergleich zu dem Wt veränderte Regulation der chloroplastidären Gene des PSI, PSII, der ATP-Synthase und des Ndh-Komplexes. Die Transkript-Mengen der chloroplastidären Gene des PSI, des PSII und der ATP-Synthase waren gegenüber dem Wt erhöht, die des chloroplastidären Ndh-Komplexes erniedrigt (Abb. 4.27).

Die Erhöhung der Transkript-Mengen der Gene des PSI, des PSII und der ATP-Synthase, sowie die Verringerung der Ndh-Komplex-Transkripte könnte die regulatorische Folge eines dauerhaft reduzierten PQ-Pools sein. Durch Sigma-Faktor ähnliche Proteine wird die Regulation ganzer chloroplastidärer Gen-Gruppen gesteuert (Link, 2003). Diese Regulation der Transkriptmengen könnte ein präventiver Mechanismus sein. Die dauerhafte Reduktion des PQ-Pools wird auch durch Starklicht-Bedingungen induziert. Als Antwort auf diese Bedingungen kommt es zu einer Steigerung der Transkript-Raten der Gene der Photosysteme (Link, 2003). Diese werden dann, wie in dem „PSII-Repair-Cycle“ (Kruse, 2001), zu einem Anstieg der Neusynthese der Proteine verwendet. Eine anhaltende Reduktion des PQ-Pools könnte daher dem Redox-Regulationssystem der Transkription einen Zustand der Anpassung an extremen Umweltbedingungen implizieren.

Die Protein-Mengen des PSI, PSII und des Cytb₆/f-Komplexes waren in *Stmu10* nicht von einer Regulation betroffen (s. 4.1.6.10.3). Western-Blot-Analysen anderer „State Transition“-Mutante zeigten ähnliche Ergebnisse. Andersson et al., (2003) konnten zeigen, dass in *Arabidopsis thaliana*-Lhcb1/2-Antisense-Pflanzen bei Hemmung der Expression der mobilen LHCII-Proteine der PSII-Gehalt im Vergleich zu dem Wt unverändert blieb. Bei der *PsbH*-Mutante wurde von Lunde et al., (2003) gezeigt, dass die Translation des PSI trotz Mutation der LHCII-Bindestelle von einer Regulation unbeeinflusst war. Pesaresi et al., (2002) konnten gleiches detektieren. Die Deletion des *psae1-1*-Gens in *Arabidopsis thaliana* bewirkte eine Verringerung der *PsbH*-Proteinmenge, die den Phänotyp der gestörten „State Transition“ auslöste. Von dieser Regulation waren jedoch nicht die essentiellen UE PsaA/B des PSI und PetD des Cytb₆/f-Komplexes betroffen (Pesaresi et al., 2002).

Die *Chlamydomonas*-Mutanten der mitochondrialen Respiration zeigten ebenfalls keine Veränderungen im Vergleich zu dem Wt. Das Chlorophyll a zu b-Verhältnis der Mutanten blieb mit einem Durchschnitt von 2,5 unverändert und auch die Konzentrationen des P700 (PSI), des Cytb₅₅₉ (PSII) und des Cytf (Cytb₆/f-Komplex) änderten sich nicht (Cardol et al., 2003).

Die Störung der „State Transition“ scheint daher keinen Einfluss auf die Stöchiometrie der Komplexe der primären photosynthetischen Elektronentransportkette zu haben. Die potentiell als Anpassung auf eine dauerhafte Reduktion des PQ-Pools in der Mutante erhöhte Transkription der Gene des PSI und des PSII beeinflusste nicht deren Proteinmengen. Die Proteinmenge der ATP-Synthase konnte aus Mangel an einem spezifischen Antiserum nicht signifikant detektiert werden.

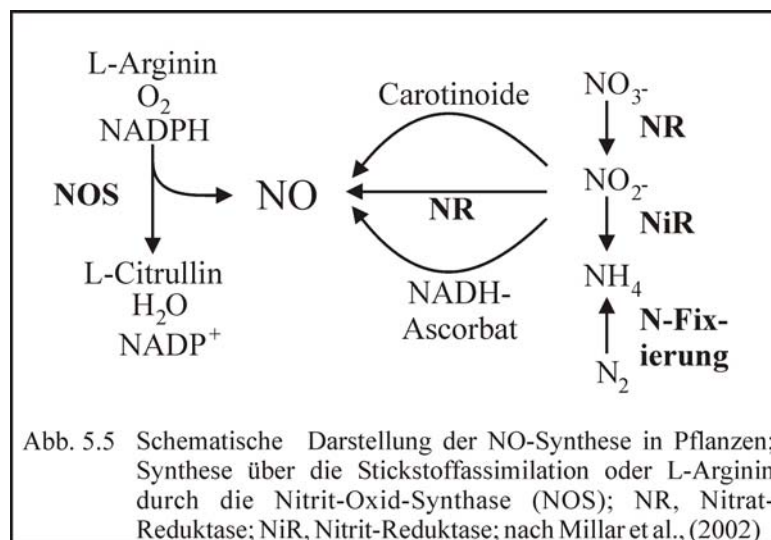
Da bei einer niedrigen mitochondrialen ATP-Konzentration durch die Hemmung der Respiration die chloroplastidäre ATP-Synthase erhöht wird, könnte die Proteinmenge der ATP-Synthase einer positiven Regulation unterliegen.

Die Proteinmenge des plastidären Ndh-Komplexes war die einzige Komplex-UE, deren Transkript- und Proteinmenge einer negativen Regulation unterlagen. Nach Hoefnagel et al., (1998) und Nixon, (2003) würde eine dauerhaft Reduktion des PQ-Pools zu einer positiven Regulation des Ndh-Komplexes führen. Diese hätte, wie in *Stmu10* detektiert (s. 4.1.6.6), eine Reduktion des PQ-Pools durch stromales NAD(P)H zur Folge und würde nach Nixon, (2000) in dem Prozess der Chlororespiration auch bei Dunkelheit den PQ-Pool reduzieren.

Durch Alternative Reduktion von Protonen durch die plastidäre Alternative Oxidase, *Immutans*, könnte so auch bei Dunkelheit ein Protonen-Gradient induziert und ATP synthetisiert werden (Lennon et al., 2003). In der Mutante ist die Transkript- und Proteinmenge des Ndh-Komplexes als Folge von Wechsellicht-Bedingungen im Vergleich zu dem *Wt* erniedrigt. Wechsellicht-Bedingungen könnten zusätzlich das durch die Mutation veränderten Redox-Gleichgewicht stören. Dieser Zustand könnte daher in *Stmu10* eine Verringerung des bei Normallicht-Bedingungen ablaufenden pseudozyklischen Elektronentransportes über den Ndh-Komplex induzieren. Die negative Regulation des Ndh-Komplexes wäre damit eine Schutzfunktion der Mutante vor ROS-Synthese als Anpassung an Wechsellicht-Bedingungen. Zur genauen Aufklärung dieser Zusammenhänge könnten weitergehende Transkriptions- und Translations-Analysen bei Normallicht- und Starklicht-Bedingungen führen. Ebenfalls könnten durch direkte Analysen des Redox-Zustandes des PQ-Pools mit der Methode der Redox-Titration ein Einblick in die Regulation der Transkription als Folge der Mutation gewonnen werden.

5.3.5 Die potentiell gesteigerte NO-Synthese in Stmu10

Nitrit-Oxid, NO, hat neben seiner Eigenschaft als degradierendes Radikal die Funktion eines Signal-Moleküls in Pflanzen (Yamasaki, 2000). Pflanzen können Nitrit-Oxid auf mehrere Arten bilden.



Durch gesteigerte Nitrit-Akkumulation wird in dem Cytosol durch die Nitrat-Reduktase in einer Nebenreaktion NO synthetisiert (Churchill und Klepper, 1979, Dean und Harper, 1986, Yamasaki und Sakihama, 2001, Yamamoto et al., 2003) (Abb. 5.5). Nitrit kann aber auch in dem Chloroplasten mit Ascorbat als Reduktanten (Evans and Mc Auliffe, 1956) oder durch Katalyse von Carotinoiden zu NO reduziert werden (Cooney et al., 1994) (Abb. 5.5).

Eine Synthese aus Arginin durch die Nitrit-Oxid-Synthase (NOS) wird ebenfalls diskutiert (Abb. 5.5). NOS-Aktivität konnte erstmals in *Mucuna hassjoo*, (Ninnemann und Maier, 1996) identifiziert werden. Durch Messung der Umwandlung von radioaktivem L-Arginin zu L-Citrullin konnte auch in *Arabidopsis thaliana* NOS-Aktivität detektiert werden (Delledonne et al., 1998). Bei dieser Reaktion wird L-Arginin mit O₂ und NADPH zu L-Citrullin umgewandelt und NO sowie H₂O synthetisiert (Abb. 5.5). Es konnte aber bisher in Pflanzen noch keine NOS isoliert oder kloniert werden (Yamasaki, 2000, Garcia-Mata und Lamattina, 2003).

Das synthetisierte NO fungiert als Radikal und Signalmolekül. In Mitochondrien hemmt es durch Kompetetion an der O₂-Bindestelle der Cytochrom c-Oxidase (KomplexIV) die oxidative Phosphorylierung (Brown und Cooper, 1994). Die Alternative-Oxidase ist jedoch von der Hemmung nicht betroffen (Millar und Day, 1996).

Eine potentielle Funktion der alternativen Oxidase soll der Schutz des UQ-Pools vor dauerhafter Reduktion und damit einhergehender ROS-Synthese bei NO-Hemmung der Cytochrome c-Oxidase sein (Millar und Day, 1996, Yamasaki et al., 2001).

Neben der Hemmung der mitochondrialen Respiration wird durch NO auch die Photosynthese beeinflusst (Zusammenfassung Yamasaki, 2000). Wildt et al., (1997) konnten in verschiedenen Spezies eine Verbindung zwischen lichtabhängiger NO-Synthese und abnehmender CO₂-Fixierung detektieren. Shimazaki et al., (1992) detektierten in Kidney-Bohnen eine mit NO-Synthese einhergehende Chlorophyll-Degradierung. Diese sollte durch die Stimulation der ROS-Synthese am PSI hervorgerufen werden (Shimazaki et al., 1992). Neben einer direkten NO-Degradation kommt es durch Reaktion mit Superoxid zur Bildung von Peroxynitrit, ebenfalls einem starken Zellgift (Arteel et al., 1999). Bei Reaktion von Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid kann es zudem zur Bildung von Singlet-Sauerstoff, dem durch seine stark radikalen Eigenschaften stärksten ROS kommen (Di Mascio et al., 1996).

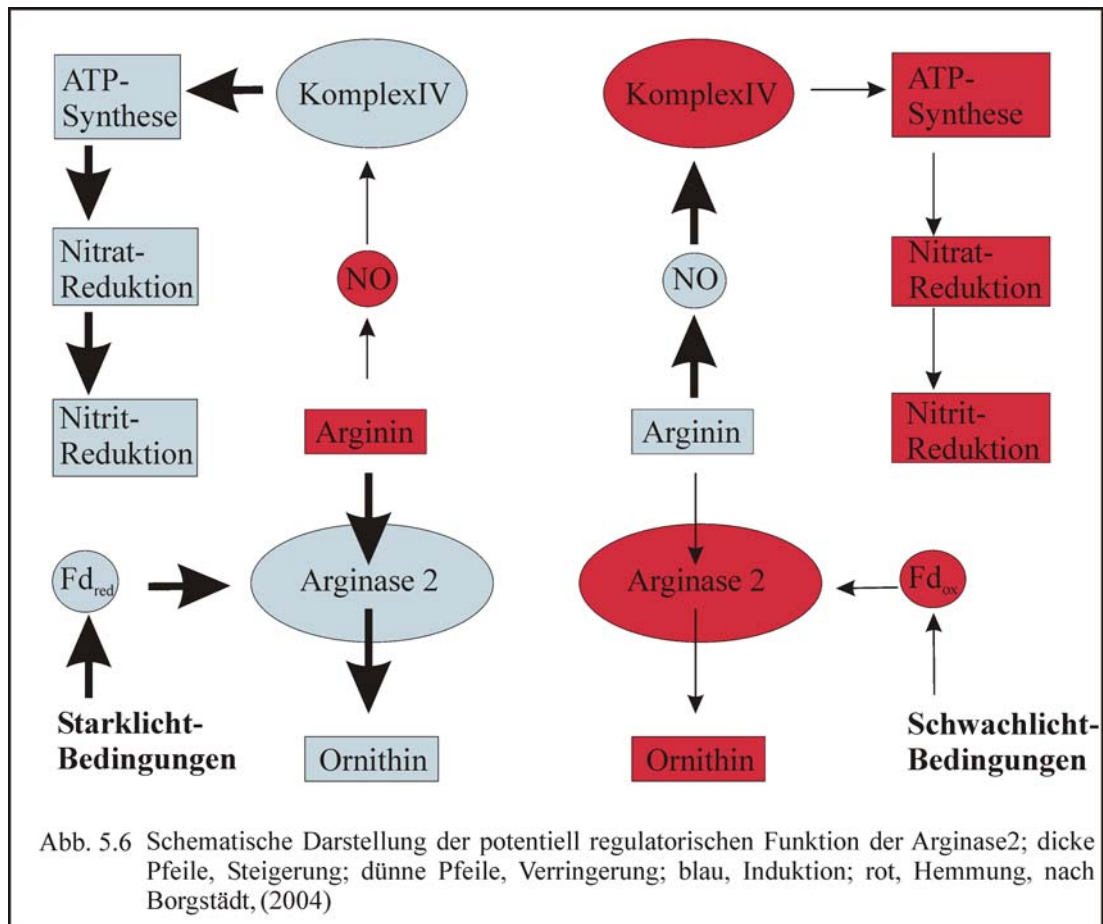
In *Stmu10* kommt es als Folge der Mutation zu einer Verringerung der Ornithin-Konzentration (s. 4.1.7.1) und damit zur Erhöhung der Arginin-Konzentration. Eine Erhöhung der Arginin-Konzentration könnte nach Yamasaki, (2000) zur Steigerung der NO-Synthese durch eine potentielle NOS führen. Durch die Verringerung der Ornithin-Zyklus-Aktivität könnte es aber auch in dem Chloroplasten zu einer Hemmung der Nitrit-Reduktion kommen (Abb. 5.3). Hohe Nitrit-Konzentrationen hemmen im Cytosol die Nitrat-Reduktase und induziert so die Bildung von NO (Churchill und Klepper, 1979, Dean und Harper, 1986, Yamasaki und Sakihama, 2001, Yamamoto et al., 2003). Dieses führt zu einer Hemmung des KomplexIV und damit der ATP-Synthese (Abb. 5.4). Mit diesem Mechanismus wird die Stickstoff-Assimilation durch Hemmung der mitochondrialen ATP-Synthese reguliert (Yamasaki, 2000).

Die durch die Mutation der *Arginase2* induzierte Erhöhung der NO-Konzentration hätte in *Stmu10* die Verringerung der mitochondrialen Respiration und dadurch die Steigerung der chloroplastidären ATP-Synthese zur Folge (Allen und Mullineaux, 1986, Bulte et al., 1990). Durch dauerhafte Reduktion des PQ-Pools könnte in der Mutante der zyklische Elektronentransport und der Phänotyp einer defekten „State Transition“ induziert werden (Allen und Mullineaux, 1986, Bulte et al., 1990, Cardol et al., 2003, Schönfeld et al., 2004) (Abb. 5.4).

Bei Starklicht-Bedingungen kommt es zur Reduktion des PQ-Pools und zur Induktion eines alternativen Elektronentransportes über das „Malat-Shuttle“-System in das Mitochondrium (Scheibe, 2004). Die Reduktionsäquivalenten in Form von NAD(P)H werden durch die Komplexe der Respiration auf Ubiquinon übertragen und dann zur Prävention vor ROS-Synthese durch die mitochondriale alternative Oxidase, AOX, unter Synthese von Wasser auf Sauerstoff transferiert (Hoefnagel et al., 1998, Scheibe, 2004). In *Arabidopsis thaliana*-Wt konnte bei diesen Bedingungen ein Anstieg der Arginase2-Transkription detektiert werden (s. 4.1.7.3). Würde dieser Anstieg zu einer Steigerung der Arginase2-Aktivität führen, würde durch Umwandlung von Arginin zu Ornithin die NO-Synthese gehemmt. Dieses hätte eine Stabilisierung der KomplexVI-Aktivität und den Erhalt der oxidativen Phosphorylierung zur Folge.

In der Mutante, in der diese Funktion als Folge der Mutation defekt ist, könnte es bei einer vollständigen Reduktion des PQ-Pools zu einer Erhöhung der NO-Synthese und damit einhergehenden Hemmung der Respiration kommen. Durch Nitritoxiden und ROS könnte es überdies zu einer Hemmung der Photosynthese kommen (Yamasaki, 2000).

In *Stmu10* konnte bei Starklicht-Bedingungen eine radikale Abnahme der photosynthetischen Effizienz gegenüber dem Wt detektiert werden (s. 4.1.6.7). Eine dreistündige Inkubation mit 1300 μ E-Starklicht führte in *Stmu10* zu einem letalen Phänotyp. Der Violaxanthin/Zeaxanthin-Zyklus (s. 4.1.6.3) und der „PSII-Repair Cycle“ (s. 4.1.6.7), war in der Mutante jedoch nicht gestört. Die um 21% reduzierte photosynthetische Aktivität des Mutante könnte daher durch eine gesteigerte ROS- und Nitritoxid-Synthese hervorgerufen worden sein (s. 4.1.6.7).



Die erhaltenen Ergebnisse wurden in einer Arbeitshypothese zusammengefasst. Die Arginase1 wäre in einem Modell die Komponente des Ornithin-Zykluses, die konstitutiv aktiv ist. Die Arginase2 hätte dagegen eine regulatorische Funktion, die durch Veränderungen von Umweltbedingungen wie Starklicht-Bedingungen induziert würde (Abb. 5.6). Starklicht-Bedingungen hätten eine Reduktion von Ferredoxin und eine Steigerung der Nitrit-Reduktion zur Folge (Abb. 5.6). Durch ein bisher nicht identifiziertes Signal würde die Expression und Aktivität der Arginase2 gesteigert und damit die NO-Synthese gehemmt (Abb. 5.6). Dies hätte eine Verringerung der NO-Bindung am KomplexIV der Respiration und eine Steigerung der ATP-Synthese zur Folge. Durch eine Steigerung der ATP-Konzentration würde ebenfalls die Reduktion von Nitrat zu Nitrit gesteigert und damit die Nitrit-Reduktion mit seinem Substrat versorgt (Abb. 5.6).

Bei Schwachlicht-Bedingungen würde sich dieser Prozess umkehren. In Folge eines Mangels an reduziertem Ferredoxin zur Nitrit-Reduktion durch die Nitrit-Reduktase könnte es zu einer Anreicherung von Nitrit kommen (Yamasaki, 2000). Zur Prävention dieses Zustandes könnte die Arginase2-Aktivität gehemmt und damit die NO-Synthese erhöht werden (Abb. 5.6).

Durch Zunahme der NO-Synthese würde es zu einer Abnahme der mitochondrialen ATP-Synthese und damit zu einer Hemmung der Nitrat-Reduktion kommen (Yamasaki, 2000) (Abb. 5.6). Durch diese negative Regulation würde die Anreicherung von Nitrit im Cytosol verhindert.

Zur Aufklärung einer potentiell regulativen Funktion der Arginase2 könnten Transkriptionsanalysen mitochondrialer Gene sowie der Arginase1 und der Arginase2 führen. Diese sollten, aufgrund der Erfahrungen der chloroplastidären Expressions-Analysen, mit vergleichenden Western-Blot-Analysen verbunden werden. Durch Induktion verschiedener Redox-Zustände im Vergleich zwischen Stmu10 und Wt könnte ein Regulationsschema erstellt werden. Neben diesen Analysen sollte der Redox-Zustand des UQ-Pools mit der Methode der Redox-Titration bei verschiedenen Umweltbedingungen (Starklicht, Schwachlicht) in Wt und Mutante vergleichend analysiert werden. Dadurch könnte eine potentielle Regulationskaskade mit der Arginase2 als NO-Regulator zwischen UQ- und PQ-Pool identifiziert werden. Eine Expression der Arginase2 unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors könnte ebenfalls zur Aufklärung einer potentiellen NO-Regulation durch die Arginase2 führen.

5.4 chloroplastidäre Serin-Threonin-Membran-Kinase

Eine Vielzahl von redox-regulierten Prozessen wird durch den Redox-Zustand der Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette gesteuert. Der Redox-Zustand des PQ-Pools und des Ferredoxins sind dabei im Zentrum der Redox-Regulation (Kruse, 2001, Aro und Ohad, 2003). Die Redox-Zustände werden durch Sensoren analysiert und die Komponenten der Photosynthese durch Modifikation reguliert (Dietz et al., 2003). Bei den kurzzeitigen Photoakklimationsprozessen der Photoinhibition und der „State Transition“ werden ausgehend von einem reduzierten PQ-Pool membrangebundene Serin-Threonin-Kinasen aktiviert, die LHCII-Proteine und PSII-Proteine phosphorylieren (Bennett, 1979, 1991; Schuster et al., 1986, Zusammenfassung, Kruse, 2001, Wollman, 2001, Aro und Ohad, 2003).

Diese Prozesse sind Schutzmechanismen zur Aufrechterhaltung der photosynthetischen Elektronentransportkette und damit der Vermeidung der ROS-Synthese. Der Prozess der „State Transition“ wird durch einen reduzierten PQ-Pool induziert, der mit Aktivierung einer Signal-Kaskade LHCII-Proteine durch eine membrangebundenen Serin-Threonin-Kinase phosphoryliert und so den Prozess der „State Transition“ induziert (Bonaventura und Myers, 1969; Murata, 1969, Allen et al., 1981, Telfer et al., 1983, Gal et al., 1997, Depege et al., 2003). Snyders und Kohorn, (1999) konnten thylakoidäre Serin-Threonin-Kinasen identifizieren, die LHCII-Proteine phosphorylierten, deren Substratspezifität aber noch ungeklärt ist. Eine Auswirkung von TAK-Antisense-Mutanten auf den Prozess der „State Transition“ konnte dagegen noch nicht detektiert werden (Borgstädt, unveröffentlicht). Depege et al., (2003) konnten in *C. reinhardtii* eine thylakoidäre Serin-Threonin-Membrankinase, *stt7*, identifizieren, deren Deletion den Phänotypen einer „State Transition“-Mutante auslöste. Diese Kinase phosphoryliert ein spezifisches LHCII-Protein, P11 (Depege et al., 2003). Die Phosphorylierung von LHCII-Proteinen umfasst die LHCII-Protein-Familien Lhcb1 und Lhcb2, welche wiederum je nach Organismus aus verschiedenen Isoformen bestehen. Die genaue Anzahl der phosphorylierten Proteine ist, wie die der LHCII-Serin-Threonin-Kinasen, noch unbekannt.

Auch der Prozess der Photoinhibition wird durch den Redox-Zustand des PQ-Pools reguliert. Bei einer, als Folge von Starklicht-Bedingungen vollständigen Reduktion des PQ-Pools, wird die reversible Phosphorylierung von N-terminalen Serin-/Threonin-Resten der PSII-Proteine PsbH, PsbB (CP43), PsbA (D1) und PsbD (D2) induziert (Ikeuchi et al., 1987; Marder et al., 1988, Michel et al., 1988, Race und Hind., 1996). Die Rolle dieser Phosphorylierung ist noch unklar, doch konnte eine Beeinflussung der Umsatzrate des „PSII Repair Cycles“ festgestellt werden (Barbato et al., 1992; Barber und Andersson, 1992; Aro et al., 1993; Rintamäki et al., 1996; Kruse et al., 1997). Daher wurde für Phosphorylierung eine regulative Funktion des „PSII-Repair-Cycle“ postuliert (Rintamäki et al., 1996, Kruse et al., 1997, Zusammenfassung Kruse, 2001, Aro und Ohad, 2003). Die diesen Prozess induzierenden chloroplastidären Serin-Threonin-Membrankinasen konnten noch nicht identifiziert werden.

Der Prozess der „State Transition“, sowie der Prozess der Photoinhibition sind kurzzeitige Photoakklimationsprozesse und haben vergleichbare Regulationsmechanismen (Kruse et al., 2001). Nur eine der beteiligten thylakoidären Serin-Threonin-Membrankinasen, *stt7*, konnte bislang eindeutig identifiziert werden. Daher wurde in dieser Arbeit ein Ansatz zur Identifizierung von chloroplastidären Serin-Threonin-Membrankinasen in *Arabidopsis thaliana* gewählt.

5.5 Das verwendete „in silico-Screening“-Verfahren

Das verwendete „Screening“-Verfahren basierte auf einer strukturierten Datenbank-Analyse des *Arabidopsis thaliana*-Genoms zur „in silico“-Identifizierung von potentiellen chloroplastidären Serin-Threonin-Membrankinasen (s. 4.2.1.1).

Durch die Sequenzierung des *Arabidopsis thaliana*-Genoms (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) stand die annotierte Sequenz in der TAIR-Datenbank (Garcia-Hernandez, 2002) zur Verfügung. Diese wurde unter Verwendung eines strukturierten „Screening“-Verfahrens nach potentiell chloroplastidären Serin-Threonin-Membrankinasen untersucht (s. 4.2.1.1). Die dabei verwendeten Programme nutzten durch Homologie-Vergleiche experimentelle Daten physiologisch charakterisierter Proteine (Cserzo et al., 1997, Emanuelsson et al., 1999, Bateman et al., 2003, Letunic et al., 2004). Mit dieser Methode konnten zwölf potentielle chloroplastidäre Serin-Threonin-Membrankinase identifiziert werden (Abb. 4.34). Das Screening-Verfahren beschränkte sich jedoch auf Kinasen, deren Transitsequenz eindeutig von den Programmen ChloroP™ (Emanuelsson et al., 1999) und Predator™ (<http://www.inra.fr/predotar/>) identifiziert wurden.

Chloroplastidäre Serin-Threonin-Membrankinasen, die mit anderen Importmechanismen, wie dem Vesikeltransport (Vothknecht und Soll, 2003) in den Chloroplasten transportiert wurden, wurden mit diesem Verfahren nicht berücksichtigt.

Die dabei identifizierte Kinase STK1 zeigte alle vorgegebenen Voraussetzungen. Die Transitsequenz lokalisierte sie „in silico“ eindeutig in den Chloroplasten. Die Serin-Threonin-Kinase-Domäne wurde ebenfalls eindeutig mit dem Programm SMART™ (Letunic et al., 2004) erkannt. Es konnte ebenfalls mit dem Programm DAS™ (Cserzo et al., 1997) eindeutig eine C-terminale Membrandomäne identifiziert werden, die eine potentielle Verankerung in der Thylakoidmembran ermöglichte.

Dieser Ansatz unterschied sich eindeutig von den Ansätzen, mit denen die TAK- und stt7-Kinasen identifiziert wurden.

Fleischmann et al., (1999) verwendeten den „forward genetics“-Ansatz eines „State Transition-Screening“-Verfahrens zur Identifizierung von nukleären Zufalls-„knock out“-Mutanten in *C. reinhardtii*. Bei der mit dieser Methode identifizierten Mutante stt7 konnte die Deletion einer thylakoidären Serin-Threonin-Membrankinase identifiziert werden, die zur Dephosphorylierung des LHCII-Proteins P11 führte (Depege et al., 2003).

Smith und Kohorn, (1991) verwendeten dagegen einen anderen Ansatz. Durch ein Hefe-System identifizierten sie cDNAs, die für Protein-Kinasen kodierten, die Lhcb-Proteine als Endsubstrat akzeptierten. Durch diese Methoden konnten sie thylakoidäre Serin-Threonin-Kinasen (TAKs) identifizieren (Snyder und Kohorn, 1999).

5.6 Die Auswirkungen einer STK1-Mutation

Mit dem „Signal-T-DNA-Express™“ (Alonso et al., 2003) wurden STK1-Mutanten mit einer Integration der T-DNA in dem Promotorbereich des für die STK1 kodierenden Bereiches, At3g24550, identifiziert (Abb. 4.38). Diese Mutanten, Stkm1 und Stkm2, wurden physiologisch charakterisiert. Da die T-DNA-Integration die Kinase-Aktivität der STK1 hemmen sollte, wurden Phosphorylierungsexperimente im Vergleich zu dem Wt durchgeführt. Dabei konnten „in vivo“ deutliche Unterschiede zum Wt detektiert werden. Die Phosphorylierung der D1/D2-Proteine der Mutante Stk1 war unter Normallicht (100µE) und Starklicht-Bedingungen (700µE) deutlich gegenüber denen des Wt reduziert (s. 4.2.3.2). Die Detektion der Phosphorylierung der Proteine CP43 und PsbH war zur Vermeidung eines erhöhten Hintergrundes mit dieser Methode nicht möglich.

Die Reduktion der Phosphorylierung konnte durch eine direkte Mutation der PSII-Kinase oder durch einen indirekten, adaptiven Effekt hervorgerufen werden. Daher wurden „in vitro“-Phosphorylierungsexperimente mit Thylakoidmembranen durchgeführt (s. 4.2.3.3). Das Ergebnis zeigte eine Phosphorylierung der D1/D2-Proteine, die in *Stkm1* von Kinetik und Phosphorylierungsgrad mit dem *Wt* übereinstimmte (Abb. 4.41). Die Phosphorylierung der D1/D2-Proteine wurde aber bereits durch Zugabe von ATP zum Zeitpunkt t_0 induziert, das, unter den gewählten „in vitro“-Bedingungen, auf eine redox-unabhängige Phosphorylierung schließen lässt (Abb. 4.41). Die Phosphorylierungsfähigkeit der D1/D2-Proteine in der Mutante wurde daher nicht beeinflusst. Durch Kompensation der STK1-Mutation könnten „in vitro“ potentiell andere Kinasen die D1/D2-Proteine phosphorylieren. Die Funktion der STK1 innerhalb der D1/D2-Phosphorylierungskaskade ist daher unklar.

Die Mutation der STK1 hemmte das Wachstum der Mutanten unter Normallicht-Bedingungen nicht (Abb. 4.43). Auch die photosynthetischen Parameter des Elektronentransportes des PSII, F_v/F_m , sowie die „State Transition“, waren nicht von der Mutation betroffen (s. 4.2.4). Dies konnten auch Zhang et al., (2002) in *Glycine max* detektieren. Clark-Elektronen-Analyse der PSII-Aktivität, sowie F_v/F_m -Analysen von Proben mit D1/D2-Proteine im phosphorylierten und dephosphorylierten Zustand zeigten keine Unterschiede (Zhang et al., 2002).

Die Phosphorylierung der PSII-Proteine beeinflusst nach Rintamäki et al., (1996) und Kruse et al., (1997) die Umsatz-Raten des „PSII-Repair-Cycles“ und schützt so das PSII vor einer dauerhafter D1-Synthese und –Degradierung bei Starklichtbedingungen (Zusammenfassung Kruse, 2001, Aro und Ohad, 2003). Durch Phosphorylierung der PSII-UE kommt es zu einer Hemmung der Dimer zu Monomer Konversion (Kruse et al., 1997). Diese Konversion gilt als entscheidender Schritt in dem Prozess des „PSII Repair Cycle“ und reguliert die Integration der synthetisierten D1-Proteine, die Umsatzrate des PSII (Kruse et al., 1997, 2001).

Da für die Phosphorylierung der PSII-Proteine ein stabilisierender Effekt bei Starklicht-Bedingungen postuliert wurde (Rintamäki et al., 1996, Kruse et al., 1997), wurden vergleichende Starklicht-Analysen durchgeführt. Kurzzeitige Starklicht-Bedingungen (1h, 1300 μ E) führten jedoch zu keinen Unterschieden des Elektronentransportes des PSII, F_v/F_m (s. 4.2.4). Bei Induktion von kurzzeitigen Starklicht-Bedingungen konnte die Mutante den Verlust der Schutzfunktion der Photoinhibition noch kompensieren. Dieses könnte durch eine Erhöhung des „PSII-Repair-Cycles“ geschehen. Der energetische Verlust, resultierend aus der erhöhten Umsatzrate des PSII, ist bei dieser kurzzeitigen Anpassung der Mutante nicht zu detektieren.

Daher wurden die Mutanten *Stkm1* und *Stkm2* an 700 μ E Starklicht-Bedingungen adaptiert. Beide Mutanten zeigten in der vergleichenden Analyse zum Wt nach drei Wochen Starklicht-Adaptation den Phänotyp einer einsetzenden Seneszenz. Die Blätter der Mutanten lagerten große Mengen Anthocyane ein. Anthocyane gehören zu der Gruppe der Carotinoiden und werden bei andauernden Starklicht-Bedingungen synthetisiert. Durch Umwandlung von Lichtenergie zu thermischen Energie schützen sie die Photosynthese vor hohen Lichtquantitäten und damit vor der Synthese von ROS.

Im Gegensatz zu der kurzzeitigen Anpassung konnte die Mutante den anhaltenden energetischen Verlust, durch eine gegenüber dem Wt erhöhte Umsatzrate des „PSII Repair Cycles“, nicht kompensieren. Als Folge der hohen Lichtenergien und einer zunehmenden Degradierung der D1-Proteine durch ROS wurde die Anthocyan-Synthese gesteigert.

Zur experimentellen Analyse der Arbeitshypothese der STK1-Funktion könnte die Umsatzraten der D1-Synthese in Wt und STK1-Mutanten nach Kruse et al., (1997) detektiert werden. Eine Analyse der Transkriptionsraten der D1-Proteine, sowie eine Beeinflussung der Translation in den Mutanten, würden ebenfalls Hinweise auf die Funktion der STK1 geben. Weitergehende genotypische Analysen als abschließender Beweis der At3g24550-Deletion sollten ebenfalls durchgeführt werden. Durch den annähernd identischen Locus der T-DNA-Integration (Abb. 4.38) und der Ausbildung des gleichen Phänotyps einer Seneszenz bei andauernden Starklicht-Bedingungen (s. 4.2.3.4.1, 4.2.3.4.2), ist jedoch ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Genotyp der T-DNA-Integration und dem Phänotyp gegeben. Auf eine Komplementation des Genotyps könnte daher verzichtet werden.

5.7 Erste Lokalisationsstudien der STK1

Mit den Programmen ChloroPTM (Emanuelsson et al., 1999) und PredatorTM (<http://www.inra.fr/predotar/>) konnte eine Transitsequenz in der Aminosäure-Sequenz der STK1 identifiziert werden, die die Kinase mit einer Wahrscheinlichkeit von 86% chloroplastidär lokalisiert (s. 4.2.1.2). Die Transitsequenz der STK1 besteht dabei, analog zu den Transitpeptiden anderer chloroplastidärer Proteine aus einem hohen Anteil an Hydroxy-Aminosäuren, wie Serin und Threonin (38%) und einem niedrigen Anteil an geladenen Aminosäuren, wie Arginin (0%) (de Bour und Weisbeek, 1991) (Abb. 4.36).

Mit der Transitsequenz werden chloroplastidäre Proteine an dem, in der äußeren Envelop-Membran lokalisierten Toc-Komplex gebunden und unter ATP- und GDP-Verbrauch in den Intermembranraum und anschließend, durch den Tic-Komplex, in das Stroma transportiert (Fulgosi und Soll, 2001). Nach Pesaresi et al., (2001) sind die Proteine von ca. 3100 in dem Nukleus kodierter Gene chloroplastidär lokalisiert.

Zur Verifizierung der „in silico“-Lokalisierungsergebnisse wurde die STK1 in *E.coli* expremiert gegen Kaninchen immunisiert und anschließend mit Western-Blot-Analysen lokalisiert (s. 4.2.5). Die Expression der STK1 erwies sich dabei als problematisch. In einem ersten Ansatz wurde das vollständige Protein in *E. coli* expremiert. Das rekombinante Protein konnte jedoch nur als His-tag-Fragment detektiert werden. Die Expression des Konstruktes konnte durch RT-PCR-Analysen nachgewiesen werden. Das expremierte Protein wurde daher in *E. coli* durch Proteasen verdaut.

In einem zweiten Ansatz wurde ein 16,4 kDa großes His-tag-Epitop in *E. coli* expremiert und durch Ni-Säulen-Chromatographie gereinigt. Die Immunisierung des gereinigten Proteins wurde bei der Firma Pineda™ (Deutschland) in Auftrag gegeben.

Für die Lokalisierungsstudien wurden Chloroplasten mit einer Methode nach Baginsky, (persönliche Kommunikation) isoliert. Die Methode beruht auf einer dreifachen Reinigung durch einen Percoll-Gradienten zur Vermeidung von mitochondriellen Kontaminationen. Nach Verwendung dieser Methode konnten keine Kontaminationen mehr detektiert werden. Die isolierten Chloroplasten wurden mit der Methode der Western-Blot-Analyse und anschließender Anti-STK1-Serum-Immunodetektion analysiert (s. 4.2.5). Vergleichende Analysen von Wt und Stkm1-Mutante ergaben nur undeutliche Unterschiede (Abb. 4.45). Eine Bande bei einem Molekulargewicht ähnlich des muren STK1-Proteins von ca. 58kDa konnte in dem Wt, im Gegensatz zu der Mutante, identifiziert werden (Abb. 4.45). Durch die schlechte Qualität des Antiserums konnten keine genaueren Analysen durchgeführt werden. Bei Analysen der Null-Seren, der für die Immunisierung vorgesehenen Kaninchen, zeigten sich ebenfalls hohe Hintergründe. Durch die hohe Reinheit des STK1-Epitops können die hohen Hintergründe der Immunodetektionen auf einer erhöhten Antigen-Synthese des verwendeten Kaninchens zurückgeführt werden. Durch den hohen Hintergrund konnte die Lokalisierung mit dieser Methode nicht als gesichert angesehen werden.

Daher wurden die Proteine der, bei Immunodetektion zwischen Wt und Stkm1 unterschiedlichen 58kDa-Bande, aus dem SDS-Page isoliert, tryptisch verdaut und mit der Methode der Massenspektrometrie, Maldi, analysiert (s. 4.2.6). Dabei konnten in dem Wt STK1-Fragmente identifiziert werden, die in der Stkm1-Mutante nicht zu detektieren waren (Abb. 4.46). Die Detektion der STK1-Fragmente in den Chloroplasten des *Arabidopsis thaliana*-Wts ist ein Hinweis auf eine chloroplastidäre „in vivo“-Lokalisation der STK1.

Der endgültige Beweis für eine chloroplastidäre Lokalisation der STK1 konnte mit diesem Ergebnis noch nicht erbracht werden. Durch Säulenchromatographie des Anti-STK1-Serums mit einer STK1-Epitop-Säule könnte das Serum gereinigt und im Anschluss erneut für Western-Blot-Analysen verwendet werden. Zur Identifikation der Lokalisation könnte ebenfalls ein, wie bei der Lokalisation der Arginase2 genutzter, ECFP-Versuchsansatz verwendet werden (s. 4.1.5.6). Durch genaue Lokalisationsstudien des ECFP-STK1-Konstruktes im Laser-Fluoreszenz-Mikroskop könnte überdies eine potentiell thylakoidäre Assoziation identifiziert werden.

5.8 Die verwendeten Ansätze zur Identifikation von Photoakklimationskomponenten

Der „forward genetics“-Ansatz zur Identifikation von Komponenten redox-regulierter Signalkaskaden durch „State Transition“-Mutanten erwies sich in dieser Arbeit als nicht erfolgreich (s. 4.1). Mit einem ähnlichen Ansatz konnte dagegen Depege et al., (2003) in *Chlamydomonas reinhardtii* eine der redox-regulierten LHCII-Kinasen identifizieren.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten „Screening“-Methode konnte aber mit der Deletion der Arginase2 ein Protein identifiziert werden, das direkt oder indirekt einen Einfluss auf den Redox-Zustand des PQ-Pools ausübt. Die regulative Einflussnahme der mitochondrialen Respiration auf den Prozess der „State Transition“ in Mutanten konnte vorher erst durch Cardol et al., (2003) und Schönfeld et al., (2004) in *C. reinhardtii* identifiziert werden. Die Regulation der Arginase2-Transkription und die damit einhergehende potentielle Regulation der mitochondrialen Respiration sind Hinweise auf ein bisher unbekanntes Regulationsprinzip in höheren Pflanzen.

Der „reverse genetics“-Ansatz zur Identifizierung von chloroplastidären Serin-Threonin-Membrankinasen, die Mitglieder einer Signalkaskade eines Photoakklimationsprozesses seien sollten, erwies sich als erfolgreich (s. 4.2). Mit STK1 konnte eine Kinase identifiziert werden, deren Mutation eine Hemmung der D1/D2-Phosphorylierung, und bei dauerhaftem Starklicht, die Einlagerung von Anthocyanen und Seneszenz induziert. Erste Versuche durch Immunodetektionsanalysen konnten die „in silico“ Lokalisation der Kinase unterstützen. Mit STK1 könnte ein Mitglied der PSII-Kinase-Kaskade oder eine der PSII-Kinase identifiziert worden sein.

6. Literaturverzeichnis

- Allen, J.F. (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinon redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* **291**:25-29.
- Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1098**(3):275-335.
- Allen, J.F. (1993) Redox control of transcription: sensor, response regulators, activators and repressors. *FEBS Lett.* **332**:203-207.
- Allen, J.F.; Pfannschmidt, T. (2000) Balancing the two photosystems: electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Phil. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* **1402**:1351-1359.
- Allen, J.F.; Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* **6**(7):317-26.
- Allen, J.F. (2003a) The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**(1429):19-37; discussion 37-38.
- Allen, J.F. (2003b) Botany. State transitions--a question of balance. *Science* **299**(5612): 1530-1532.
- Alonso-Blanco, C.; Koornneef, M. (2000) Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci.* **5**(1):22-29.
- Alonso-Blanco, C.; Peeters, A.J.; Koornneef, M.; Lister, C.; Dean, C.; van den Bosch, N.; Pot, J.; Kuiper, M.T. (1998) Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J.* **14**(2):259-71.
- Alonso, J.M.; Stepanova, A.N.; Leisse, T.J.; Kim, C.J.; Chen, H.; Shinn, P.; Stevenson, D.K.; Zimmerman, J.; Barajas, P.; Cheuk, R.; Gadrinab, C.; Heller, C.; Jeske, A.; Koesema, E.; Meyers, C.C.; Parker, H.; Prednis, L.; Ansari, Y.; Choy, N.; Deen, H.; Geralt, M.; Hazari, N.; Hom, E.; Karnes, M.; Mulholland, C.; Ndubaku, R.; Schmidt, I.; Guzman, P.; Aguilar-Henonin, L.; Schmid, M.; Weigel, D.; Carter, D.E.; Marchand, T.; Risseuw, E.; Brogden, D.; Zeko, A.; Crosby, W.L.; Berry, C.C.; Ecker, J.R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**:653-657.
- Anderson, J.M.; Chow, W.S. (2002) Structural and functional dynamics of plant photosystem II. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**(1426): 1421-30; discussion 1469-70.
- Anderson, P. (1995) Mutagenesis. *Methods Cell Biol.* **48**:31-58.
- Anderson, J.M.; Price, G.D.; Chow, W.S.; Hope, A.B.; Badger, M.R. (1997) Reduced levels of Cytochrome bf complex in transgenic tobacco leads to a marked photochemical reduction of the plastoquinone pool, without significant change in acclimation or irradiance. *Photosynth. Res.* **53**:215-227.
- Andersson, J.; Wentworth, M.; Walters, R.G.; Howard, C.A.; Ruban, A.V.; Horton, P.; Jansson, S. (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II – effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J.* **35**(3):350-361.

- Arnon, D.I.; Whatley, F.R.; Allen, M.B. (1959) Photosynthesis by isolated chloroplasts. VIII. Photosynthetic phosphorylation and the generation of assimilatory power. *Biochim. Biophys. Acta.* **32(1)**:47-57.
- Aro E.M.; Virgin, I.; Andersson, B. (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**:113-134.
- Aro, E.M.; McCaffery, S.; Anderson, J.M. (1994) Recovery from Photoinhibition in Peas (*Pisum sativum* L.) Acclimated to Varying Growth Irradiances (Role of D1 Protein Turnover). *Plant Physiol.* **104(3)**:1033-1041.
- Aro, E.M.; Ohad, I. (2003) Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation. *Antioxid. Redox Signal.* **5(1)**:55-67.
- Arteel, G.E.; Briviba, K.; Sies, H. (1999) Function of thioredoxin reductase as a peroxynitrite reductase using selenocystine or ebselen. *Chem. Res. Toxicol.* **12(3)**:264-269.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**:601-639.
- Avron, M. (1978) Energy transduction in photosynthesis. *FEBS Let.* **96**:225-232.
- Badger, M.R.; von Caemmerer, S.; Ruuska, S.; Nakano, H. (2000) Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **1402**:1433-1446.
- Baena-Gonzalez, E.; Barbato, R.; Aro, E.M. (1999) Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta* **208**:196-204.
- Baginsky, S.; Tiller, K.; Link, G. (1997) Transcription factor phosphorylation by a protein kinase from mustard (*Sinapsis alba*). *Plant Mol. Biol.* **24**:181-189.
- Baier, M.; Dietz, K.J. (1999) The costs and benefits of oxygen for photosynthesizing plant cells. *Prog. Bot.* **60**:282-314.
- Baier, M.; Dietz, K.J. (1999) Protective function of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin in photosynthesis: evidence from transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **119**:1407-1414.
- Barbato, R.; Friso, G.; Giardi, M.T.; Rigoni, F.; Giacometti, G.M. (1991) Breakdown of the photosystem II reaction center D1 protein under photoinhibitory conditions: identification and localization of the C-terminal degradation products. *Biochem.* **30(42)**:10220-10226.
- Barbato, R.; Friso, G.; Rigoni, F.; Dalla, V.F.; Giacometti, G.M. (1992) Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids. *J. Cell Biol.* **119**:325-335.
- Barber, J. (1982) Interactions between photosystem I and II. *Biochem. Soc. Trans.* **10(5)**:331-334.
- Barber, J. (1986) Surface electrical charges and protein phosphorylation. In Staehlin, L.A.; Arntzen, C.J. (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology; Photosynthesis III*. Springer-Verlag, Berlin, Germany:653-664.
- Barber, J. (2003) Photosystem II: the engine of life. *Q. Rev. Biophys.* **36(1)**:71-89.

- Barber, J.; Andersson, B. (1992) Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17**(2):61-66.
- Bateman, A.; Coin, L.; Durbin, R.; Finn, R.D.; Hollich, V.; Griffiths-Jones, S.; Khanna, A.; Marshall, M.; Moxon, S.; Sonnhammer, E.L.; Studholme, D.J.; Yeats, C.; Eddy, S.R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **1**(32) :138-141.
- Baulcombe, D.C.; Saunders, G.R.; Bevan, M.W.; Mayo, M.A. Harrison, B.D. (1986) Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**, 446–449.
- Baurain, D.; Dinant, M.; Coosemans, N. ; Matagne R.F. (2003) Regulation of the alternative oxidase Aox1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the Aox1 promoter. *Plant Physiol.* **131**:1418–1430.
- Bonner, W.D.; Bendall, D.S. (1968) Reversed electron transport in mitochondria from the spadix of *Arum maculatum*. *Biochem. J.* **109**(3):47.
- Beeor-Tzahar, T.; Ben-Hayyim, G.; Holland, D.; Faltin, Z.; Eshdat, Y. (1995) A stress-associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Lett.* **366**(2-3):151-155.
- Benett, J (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Nature* **169**:344-346.
- Benett, J (1979) The protein kinase of thylakoid membranes is light dependent. *FEBS Lett.* **103**:342-344.
- Bennoun, P. (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**:4352-4256.
- Berkemeyer, M.; Scheibe, R.; Ocheretina, O. (1998) A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Biol. Chem.* **273**(43):27927-27933.
- Berry S. (2003) Endosymbiosis and the design of eukaryotic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1606**(1-3):57-72.
- Boekma, E.J.; Hankamer, B.; Bald, D.; Kruip, J. Nield, J. Barber, J.; Rögner, M. (1995) Supramolekular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:175-179.
- Bonaventura, C.; Myers, J. (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **189**: 366-386
- Boutin, J.P. (1982) Purification, properties and subunit structure of arginase from Iris bulbs. *Eur. J. Biochem.* **127**:237-243.
- Briantais, J.M.; Vernotte, C.; Picaud, M.; Krause, G.H. (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **548**:128-138.
- Broin, M.; Cuine, S.; Eymery, F.; Rey, P. (2002) The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* **14**:1417-1432.
- Brown, G.C.; Cooper, C.E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* **356**(2-3):295-8.

- Buchanan, B.B.; Schürmann, P.; Kalberer, P.P. (1971) Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **246**:5952-5959.
- Buchanan, B.B.; Wolosiuk, R.A.; Crawford, N.A.; Yee, B.C. (1978) Evidence for three thioredoxins in leaves. *Plant Physiol.* **61**:38S.
- Buchanan, B.B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **31**:341-374.
- Buchanan, B.B. (1984) The ferredoxin/thioredoxin system: a key element in the regulatory function of light in photosynthesis. *Bioscience.* **34(6)**:378-83.
- Bulte, L.; Gans, P.; Rebeille, F.; Wollman, F.A. (1990) ATP control on state transitions in vivo in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1020**:72-80.
- Burrows, P.A.; Sazanov, L.A.; Svab, Z.; Maliga, P.; Nixon, P. (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* **17**:868-876.
- Byrdin, M.; Jordan, P.; Krauss, N.; Fromme, P.; Stehlik, D.; Schlodder, E. (2002) Light harvesting in photosystem I: modeling based on the 2.5-A structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*. *Biophys. J.* **83(1)**:433-457.
- Cardol, P.; Gloire, G.; Havaux, M.; Remacle, C.; Matagne, R.; Franck, F. (2003) Photosynthesis and State Transitions in Mitochondrial Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Affected in Respiration. *Plant Physiol.* **133**:2010-2020.
- Carol, P.; Stevenson, D.; Bisanz, C.; Breitenbach, J.; Sandmann, G.; Mache, R.; Coupland, G.; Kuntz, M. (1999) Mutations in the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* **11(1)**:57-68.
- Cserzo, M.; Wallin, E.; Simon, I.; von Heijne, G.; Elofsson, A. (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method; *Prot. Eng.* **10(6)**:673-676.
- Chow, W.S.; Melis, A.; Anderson, J.M. (1990) Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87(19)**:7502-6.
- Churchill, K.A.; Klepper, L.A. (1979) Effects of ametryn (2-(ethyl-amino)-4-(isopropyl-amino)-6-(methylthio)-s-triazine) on nitrate reductase activity and nitrite content of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pestic. Biochem. Phys.* **12**: 156-162.
- Colbert, T.; Till, B.J.; Tompa, R.; Reynolds, S.; Steine, M.N.; Yeung, A.T.; McCallum, C.M.; Comai, L.; Henikoff, S. (2001) High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* **126**:480-484.
- Cooney, R.V.; Harwood, P.J.; Custer, L.J.; Franke, A.A. (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ. Health Perspect.* **102(5)**:460-462.
- Colin, M.; Dorthu, M.P.; Duby, F.; Remacle, C.; Dinant, M.; Wolwertz, M.R.; Duyckaerts, C.; Sluse, F.; Matagne, R.F. (1995) Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and the apocytochrome *b* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **249**:179-184.

- Corpas, F.J.; Barroso, J.B.; del Rio, L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* **6(4)**:145-50.
- Crofts, A.R.; Meinhardt, S.W.; Jones, K.R.; Snozzi, M. (1983) The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: a modified Q-cycle mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **723**:202-218.
- Danon, A.; Mayfield, S.P. (1994) Light-regulated translation of the chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* **266**:1717-1719.
- Dean, J.V.; Harper, J.E. (1986) Nitric-Oxide and Nitrous-Oxide Production by Soybean and Winged Bean During the *in vivo* Nitrate Reductase Assay. *Plant Physiol.* **82(3)**:718-723.
- de Boer, A.D.; Weisbeek, P.J. (1991) Chloroplast protein topogenesis, sorting and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**:221-253.
- Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R.A.; Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*. **394(6693)**:585-588.
- Delosome, R.; Olive, J.; Wollman, F.A. (1996) Changes in light energy distribution upon state transitions: an *in vivo* photoacoustic study of wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas rheinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1273**:150-158.
- del Rio, L.A.; Corpas, F.J.; Sandalio, L.M.; Palma, J.M.; Barroso, J.B. (2003) Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. **55(2)**:71-81.
- Demmig-Adams, B.; Adams III, W.W.; Barker, D.H.; Logan, B.A.; Bowling, D.R.; Verhoeven, A.S. (1996). Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant* **98**: 254–264.
- Depege, N.; Bellafiore, S.; Rochaix, J.D. (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* **299(5612)**:1572-1575.
- Deshpande, N.N.; Bao, Y.; Herrin, D.L. (1997) Evidence for light/redox-regulated splicing of psbA pre-RNAs in *Chlamydomonas* chloroplasts. *RNA*. **3(1)**:37-48.
- Dietz, K.J. (2003) PLANT PEROXIREDOXINS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **54**:93-107.
- Dietz, K.J.; Link, G.; Pistorius, K.E.; Scheibe, R. (2003) Redox Regulation in Oxygenic Photosynthesis. *Prog. in Bot.* **63**:207-245.
- DiMascio, P.; Briviba, K.; Bechara, E.J.H.; Medeiros, M.H.; Sies, H. (1996) Reaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide to produce singlet molecular oxygen (1 ϕ g). *Meth. Enzymol.* **269**:395-400.
- Douce, R., Neuburger, M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2(3)**:214-222.
- Douce, R., Neuburger, M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2(3)**:214-222.

Downum, K.R.; Rosenthal, G.A.; Cohen, W.S. (1983) *Plant Physiol.* **73**:965-968.

Dry, I.B.; Dimitriadis, E.; Ward, A.D.; Wiskich, J.T. (1987) The photorespiratory hydrogen shuttle. Synthesis of phthalonic acid and its use in the characterization of the malate/aspartate shuttle in pea (*Pisum sativum*) leaf mitochondria. *Biochem. J.* **245**(3):669-675.

Ebbert, V.; Godde, D. (1994) Regulation of thylakoid protein phosphorylation in intact chloroplasts by the activity of kinases and phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**:335-346.

Elstner, E.F.; Frommeyer, D. (1979) Analysis of different mechanisms of photosynthetic oxygen reduction. *Biochim. Biophys. Acta* **325**:182-188.

Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Prot. Sci.* **8**: 978-984.

Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005-1016.

Emlyn-Jones, D.; Ashby, M.K.; Mullineaux, C.W. (1999) A gene required for the regulation of photosynthetic light harvesting in the cyanobacterium *Synechocystis 6803*. *Mol. Microbiol.* **33**(5):1050-1058.

Escoubas, J.; Lomas, M.; LaRoche, J.; Falkowski, P.G. (1995) Light Intensity Regulation of *cab* Gene Transcription is Signaled by the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**(22):10237-10241.

Evans, H.J.; McAuliffe, C. 1956 Identification of NO, N₂O, and N₂ as products of the nonenzymatic reduction of nitrite by ascorbate or reduced diphosphopyridine nucleotide. In: *Inorganic nitrogen metabolism* (ed. W. D. McElroy & B. Glass):189-197.

Färber, A.; Young, A.J.; Ruban, A.V.; Horton, P.; Jahns, P. (1997) The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching. *Plant Physiol.* **115**:1609-1618.

Ferreira, N.K.; Iverson, T.M.; Maghlaoui, K.; Barber, J.; Iwata, S. (2004) Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Scienceexpress* **10.1126**:1-13.

Finazzi, G.; Furia, A.; Barbagallo, R.P.; Forti, G. (1999) State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **1413**(3):117-129.

Finazzi, G.; Zito, F.; Barbagallo, R. P.; Wollman, F.A. (2001) Contrasted Effects of Inhibitors of Cytochrome *b₆* Complex on State Transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **276**(13):9770-9774.

Finazzi, G.; Barbagallo, R.P.; Bergo, E.; Barbato, R.; Forti, G. (2001) Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 and State 2: damages to the photosynthetic apparatus under linear and cyclic electron flow. *J. Biol. Chem.* **276**(25):22251-22257.

Finazzi, G.; Rappaport, F.; Furia, A.; Fleischmann, M.; Rochaix, J.D.; Zito, F.; Forti, G. (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Rep.* **3**(3): 280-285.

- Fleischmann, M.M.; Ravanel, S.; Delosme, R.; Olive, J.; Zito, F.; Wollman, F.A. Rochaix, J.D. (1999) Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlomydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J. Biol. Chem.* **271**:30987-30994.
- Flügge, U.; Heldt, H.W. (1991) Metabolite Translocators of the Chloroplast Envelope *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**:129-144.
- Flügge, U.I. (1999) Phosphate Translocators in Plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**:27-45.
- Fork, D.C.; Satoh, K. (1986) The control by state transitions of the distribution of excitation energy in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **37**:335-361.
- Forsberg, J.; Rosenquist, M.; Fraysse, L.; Allen, J.F. (2001) Redox signalling in chloroplasts and mitochondria: genomic and biochemical evidence for two-component regulatory systems in bioenergetic organelles. *Biochem. Soc. Trans.* **29(Pt 4)**:403-407.
- Fromme, P.; Melkozernov, A.; Jordan, P.; Krauss N. (2003) Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Lett.* **555(1)**: 40-44.
- Fucci, L.; Oliver, C.N.; Coon, M.J.; Stadtman, E.R. (1983) Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**:1521-1525.
- Fukushima, T.; Decker, R.V.; Anderson, W.M.; Spivey, H.O. (1989) Substrate channeling of NADH and binding of dehydrogenases to complex I. *J. Biol. Chem.* **264(28)**:16483-16488.
- Fulgosi, H.; Soll, J. (2001) A gateway to chloroplasts-protein translocation and beyond. *J. Plant Physiol.* **158**:273-284.
- Gal, A.; Zer, H.; Ohad, I. (1997) Redox-controlled thylakoid phosphorylation. News and views. *Physiol. Plant.* **100**:869-885.
- Garcia-Hernandez, M.; Berardini, T.Z.; Chen, G.; Crist, D.; Doyle, A.; Huala, E.; Knee, E.; Lambrecht, M.; Miller, N.; Mueller, L.A.; Mundodi, S.; Reiser, L.; Rhee, S.Y.; Scholl, R.; Tacklind, J.; Weems, D.C.; Wu, Y.; Xu, I.; Yoo, D.; Yoon, J.; Zhang, P. (2002) TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct. Integr. Genomics.* **2(6)**:239-253.
- Garcia-Mata, C.; Lamattina, L. (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure - is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci.* **8(1)**:20-26.
- Godinot, C.; Di Pietro, A. (1986) Structure and function of the ATPase-ATP synthase complex of mitochondria as compared to chloroplasts and bacteria. *Biochimie* **68(3)**:367-374.
- Goldraij, A.; Polacco, J.C. (2000) Arginine degradation by arginase in mitochondria of soybean seedling cotyledons. *Planta* **210(4)**:652-658.
- Grasses, T.; Grimm, B.; Koroleva, O.; Jahns, P. (2001) Loss of alpha-tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta* **213(4)**:620-628.

- Green, B.R.; Dunford D.G. (1996) The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:685-714.
- Greene, E.A.; Codomo, C.A.; Taylor, N.E.; Henikoff, J.G.; Till, B.J.; Reynolds, S.H.; Enns, L.C.; Burtner, C.; Johnson, J.E.; Odden, A.R.; Comai, L.; Henikoff, S. (2003) Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics*. **164**(2):731-40.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**:1-85.
- Hamel, P.; Olive, J.; Pierre, Y.; Wollman, F.A.; de Vitry, C. (2000) A new subunit of cytochrome b6f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J. Biol. Chem.* **275**(22):17072-9.
- Hankamer, B. Boekema, E.J.; Barber, J. (1997) Structure and membrane organization of Photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:641-671.
- Hankamer, B.; Morris, E.; Nield, J.; Carne, A.; Barber, J. (2001) Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Lett.* **504**(3):142-151.
- Haldrup, A.; Jensen, P.E.; Lunde, C.; Scheller, H.V. (2001) Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* **6**(7):301-5.
- Harris, G.C.; Heber, U. (1993) Effects of Anaerobiosis on Chlorophyll Fluorescence Yield in Spinach (*Spinacia celeracea*) Leaf Discs. *Plant Physiol.* **101**(4):1169-1173
- Haughn, G.; Somerville, C.G. (1987) Selection for herbicide resistance at the whole-plant level, In: *Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry* :98–107.
- Havaux, M. (1992) Stress tolerance of Photosystem II in vivo. Antagonistic effects of water, heat and photoinhibition stresses. *Plant Physiol.* **100**: 424–432.
- Heber, U.; Takahama, U.; Neimanis, S.; Shimizu-Takahama, M. 1982 Transport as the basis of the Kok effect. Levels of some photosynthetic intermediates and activation of light-regulated enzymes during photosyntheses of chloroplasts and green leaf protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **679**:287-299.
- Heldt, H.W.; Pfaff, E. (1969) Adenine nucleotide translocation in mitochondria. Quantitative evaluation of the correlation between the phosphorylation of endogenous and exogenous ADP in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **10**(3):494-500.
- Hervas M, Navarro JA, De La Rosa MA. (2003) Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Acc. Chem. Res.* **36**(10):798-805.
- Hill, R (1937) Oxygen produced by isolated chloroplasts. *Nature* **139**:881-882.
- Hipkins, M.F.; Baker N.R. (1986) Photosynthesis energy transduction. *Practical Approach Series* 7:88-92.
- Hoefnagel, M.H.N.; Atkin, O.K.; Wiskich, J.T. (1998) Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochem. Biophys. Acta* **1366**:235-255.
- Hoefnagel, M.H.; Wiskich, J.T. (1998) Activation of the plant alternative oxidase by high reduction levels of the Q-pool and pyruvate. *Arch Biochem Biophys.* **355**(2):262-270.

- Holmgren, A.; Buchanan, B.B.; Wolosiuk, R.A. (1977) Photosynthetic regulatory protein from rabbit liver is identical with thioredoxin. FEBS Lett. **82**:351-354.
- Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. Annu. Rev. Biochem. **54**:237-271.
- Hope, A.B. (2000) Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. Biochim. Biophys. Acta **1456(1)**:5-26.
- Horling, F.; König, J.; Dietz, K.J. (2003) Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. Plant Physiol. Biochem. **40**:491-499.
- Hou, C.X.; Rintamaki, E.; Aro, E.M. (2003) Ascorbate-mediated LHCII protein phosphorylation--LHCII kinase regulation in light and in darkness. Biochem. **42(19)**:5828-5836.
- Hoyos, M.E.; Palmieri, L.; Wertin, T.; Arrigoni, R.; Polacco, J.C.; Palmieri, F. (2003) Identification of a mitochondrial transporter for basic amino acids in *Arabidopsis thaliana* by functional reconstitution into liposomes and complementation in yeast. Plant J. **33**:1027-1035.
- Hudson, A.; Anderson, M. (2001) *Arabidopsis thaliana* RNA Extraction. Protocols of the Arabidopsis Information Resource (TAIR), (www.arabidopsis.org).
- Huppe, H.C.; Turpin, D.H. (1994) Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **45**:577-607.
- Igamberdiev, A.U.; Lea, P.J. (2002) The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. Phytochemistry **60(7)**:651-74.
- Ikegami, I.; Itoh, S.; Iwaki, M. (2000) Selective extraction of antenna chlorophylls, carotenoids and quinones from photosystem I reaction center. Plant Cell. Physiol **41(10)**:1085-1095.
- Ikeuchi, M.; Plumley, F.G.; Inoue, Y.; Schmidt, G.W. (1987) Phosphorylation of photosystem II components , CP43 apoprotein, D1, D2 and 10-11 kilodalton protein in chloroplast and mitochondria in *Chlamydomonas*. Kluwer, Dordrecht :569-596.
- Ivanov, B.; Khorobrykh, S. (2004) Participation of Photosynthetic Electron Transport in Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species. Antioxidants and Redox Signaling **5(1)**:43-53.
- Jackowski, G.; Kacprzak, K.; Jansson, S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII). Biochim. Biophys. Acta **1504**:340-345.
- Jackowski, G.; Pielucha, K. (2001) Heterogeneity of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII) at the level of trimeric subunits. J. Photochem. Photobiol. **64**:45-54.
- Jander, G.; Norris, S.R.; Rounsley, S.D.; Bush, D.F.; Levin, I.M.; Last, R.L. (2002) *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. Plant Physiol. **129(2)**:440-450.

- Jensen, P.E.; Gilpin, M.; Knoetzel, J.; Scheller, H.V. (2000) The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* **275(32)**:24701-24708.
- Jespersen, H.M.; Kjaersgard, IV.; Ostergaard, L.; Welinder, K.G. (1997) From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem. J.* **326(Pt 2)**:305-10.
- Joe, T.; Cournac, L.; Horvath, E.V.; Medgyesy, P.; Peltier G. (2001) Increased Sensitivity of Photosynthesis to Antimycin A Induced by Inactivation of the Chloroplast *ndhB* Gene. Evidence for a Participation of the NADH-Dehydrogenase Complex to Cyclic Electron Flow around Photosystem I. *Plant Physiol.* **125**:1919-1929.
- Jordan, P.; Fromme, P.; Witt, H.T.; Klukas, O.; Saenger, W.; Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411(6840)**:909-17.
- Kandlbinder, A.; Finkemeier, I.; Wormuth, D.; Hanitzsch, M.; Dietz, K.J. (2004) The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **120(1)**:63-73.
- Kluge, C.; Lahr, J.; Hanitzsch, M.; Bolte, S.; Gollmack, D.; Dietz, K.J. (2003) New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **35(4)**:377-388.
- König, J.; Baier, M.; Horling, F.; Kahmann, U.; Harris, G.; Schurmann, P.; Dietz, K.J. (2002) The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99(8)**:5738-43.
- Koivuniemi, A.; Aro, E.M.; Andersson, B. (1995) Degradation of the D1- and D2-proteins of the photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochem.* **34**:16022-16029.
- Kossel, A.; Dakin, H.D. (1904) Über die Arginase. *Z. Physiol. Chemie* **41**:321-331.
- Kramer, D.M.; Sacksteder, C.A.; Cruz, J.A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosyn. Res.* **60(2)**:151-163.
- Krömer, S. (1995) Respiration During Photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 45-70.
- Kruger, N.J.; von Schwaen, A. (2003) The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**:236-246.
- Krumpelman, P.M.; Freyermuth, S.K.; Cannon, J.F.; Fink, G.R.; Polacco, J.C. (1995) Nucleotide sequence of *Arabidopsis thaliana* arginase expressed in yeast. *Plant Physiol.* **107(4)**:1479-80.
- Kruse, O.; Zheleva, D.; Barber, J. (1997) Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: implication for the regulation of the turnover of D1 protein. *FEBS Lett.* **408(3)**:276-280.
- Kruse, O.; Nixon, P.J.; Schmid, G.H.; Mullineaux, C.W. (1999) Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging. *Photosynth. Res.* **61**:43-51.
- Kruse, O. (2001) Light-induced short-term adaptation mechanisms under redox control in the PSII-LHCII supercomplex: LHCII state transitions and PSII repair cycle. *Naturwissenschaften* **88**:284-292.

- Kruse, O.; Borgstädt, R.; Mussgnug, J.H.; Schönfeld, C. (2002) Structural and functional aspects of phosphatidyl glycerol binding and covalent modification by reversible phosphorylation in the LHC II-PS II supercomplex. *Recent Res. Devel. Plant Physiol.* **3**:211-225.
- Krysan, P.J.; Young, J.C.; Sussman, M.R. (1999) T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis Plant Cell **11**:2283–2290.
- Kühlbrandt, W.; Wang, D.N.; Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**:614-21.
- Kyle, D.J.; Ohad, I. Arntzen, C.J. (1984) Membrane protein damage and repair; selective loss of a quinone protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:4070-4074.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Laiska, A.; Oja, V. (2000) Alteration of photosystem II properties with non-photochemical excitation quenching. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **355**:1405-1418.
- Larsson, U.K.; Anderson, J.M.; Andersson, B. (1987) Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. *Biochim. Biophys. Acta* **894**:69-75.
- Lee, S.P.; Hwang, Y.S.; Kim, Y.J.; Kwon, K.S.; Kim, H.J.; Kim, K.; Chae, H.Z. (2001) Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* **276(32)**:29826-29832.
- Leister, D. (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet.* **(1)**:47-56.
- Lennon, A.M.; Prommeenate, P.; Nixon, P.J. (2003) Expression and orientation of the putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta* **218(2)**: 254-260.
- Letunic, I.; Copley, R.R.; Schmidt, S.; Ciccarelli, F.D.; Doerks, T.; Schultz, J.; Ponting, C.P.; Bork, P. (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res.* **1;32** Dat. is. D142-4.
- Li, X.P.; Björkman, O.; Shih, C.; Grossman, A.R.; Rosenquist, M.; Jansson, S.; Niyogi, K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **126**:213-222.
- Lichter, A.; Häberlein, I. (1998) A light –dependent redox signal participates in the regulation of ammonia fixation in Chloroplasts of higher plants-Ferredoxin:glutamate synthase is a thioredoxin-dependent enzyme. *J. Plant Physiol.* **153**:83-90.
- Lim, Y.S.; Cha, M.K.; Kim, H.K.; Uhm, T.B.; Park, J.W.; Kim, K.; Kim, I.H. (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**:273-280.
- Liu, Y.G.; Shirano, Y.; Fukaki, H.; Yanai, Y.; Tasaka, M.; Tabata, S.; Shibata, D. (1999) Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96(11)**:6535-6540.
- Link, G. (2003) Redox Regulation of Chloroplast Transcription. *Antiox. Redox Signal.* **5(1)**:79-87.

- Lunde, C.; Jensen, P.E.; Haldrup, A.; Knoetzel, J.; Scheller, H.V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408 (6812)**: 613 – 615
- Mallick, N.; Mohn, F.H. (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.* **157**:183-193.
- Marder, J.B.; Telfer, A.; Barber, J. (1988) The D1 polypeptide subunit of photosystem I reaction centre has a phosphorylation site at its amino-terminus. *Biochem. Biophys. Acta* **932**:362-365.
- Martinsuo, P.; Pursiheimo, S.; Aro, E.M.; Rintamaki, E.(2003) Dithiol oxidant and disulfide reductant dynamically regulate the phosphorylation of light-harvesting complex II proteins in thylakoid membranes. *Plant Physiol.* **133(1)**: 37-46.
- Mattoo A.K.; Hoffman-Falk, H.; Marder, J.B.; Edelman, M. (1984) Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**:1380-1384.
- Mattoo, A.K.; Edelman, M. (1987) Intramembrane translocation and posttranslational palmitoylation of the chloroplast 32-kDa herbicide-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**:1497-1501.
- Maxwell, D.P.; Laudénbach, D.E.; Huner, N. (1995) Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and *cab* mRNA Abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **109(3)**:787-795.
- Maxwell, D.P.; Wang, Y.; McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96(14)**:8271-8276.
- McCallum, C. M.; Comai, L.; Greene, E.A.; Henikoff, S (2000) Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* **18**:455–457.
- Mccarty, R.E. (1992) A PLANT BIOCHEMIST'S VIEW OF H⁺-ATPases AND ATP SYNTHASES. *J. Exp. Biol.* **172(Pt 1)**:431-441.
- McKinney, D.W.; Buchanan, B.B.; Wolosiuk, R.A. (1978) Activation of Chloroplast ATPase by Reduced Thioredoxin. *Phytochemistry* **17**:794-795.
- McKinney, E.C.; Ali, N.; Traut, A.; Feldmann, K.A., Belostotsky, D.A.; McDowell, J.M.; Meagher, R.B. (1995). Sequence based identification of T-DNA insertion mutations in *Arabidopsis* Actin mutants act2-1 and act4-1. *Plant J.* **8**:613–622.
- Mehler, A.H. (1951) Studies on the reaction of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**:65-77.
- Menke, V. (1960) Das allgemeine Bauprinzip des Lamellarsystems der Chloroplasten. *Experientia* **16**:537-538.
- Mereschkowsky, C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. *Biol. Centralbl.* **25**:593-604.
- Mi, H.; Endo, T.; Schreiber, U.; Ogawa, T.; Asada, K (1992) Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* **33**:1233-1237.

- Michalecka, A.M.; Agius, S.C.; Moller, I.M.; Rasmusson, A.G. (2004) Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant J.* **37(3)**:415-425.
- Michel, H.P.; Hunt, D.F., Shabarkowitz, J.; Benett, J. (1988) Tandem mass spectroscopy reveals that three photosystem II proteins of spinach chloroplasts contain N-acetyl-O-phosphothreonine at their NH₂-termini. *J. Biol. Chem.* **263**:1123-1130.
- Michel, H.; Deisenhofer, J. (1988) Relevance of the photosynthetic reaction center of purple bacteria to the structure of Photosystem II. *Biochem.* **27**:1-7.
- Millar, A.H.; Day, D.A. (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* **398(2-3)**:155-158.
- Millar, H.; Day, D.A.; Mathieu, C. (2002) Nitric Oxide in Plants. *Advances in Photosynthesis and Respiration* **12(12)**:193-204.
- Millenaar, F.F.; Lambers, H. (2003) The Alternative Oxidase: on vivo Regulation and Function. *Plant Biol.* **5(1)**:1-102.
- Misra, H.P.; Fridovich, I. (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.* **246**:68886-6890.
- Mitchell P (1975) A chemiosmotic molecular mechanism of the cytochrome bc₁ complex in the respiratory chain: proton motive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* **56**:1-6.
- Miyake, C.; Asada, K. (1992) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **33**:541-553.
- Moss, D.A.; Bendall, D.S. (1984) Cyclic electron transport in chloroplasts: the Q-cycle and the site of action of antimycin. *Biochim. Biophys. Acta* **767**: 389-395.
- Murata, N. (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim. Biophys. Acta* **172**: 242-251
- Müller, P.; Li, X.P.; Niyogi, K.K. (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* **125**:1558-1566.
- Mullineaux, C.W. (2001) How do cyanobacteria sense and respond to light? *Mol. Microbiol.* **41(5)**:965-71.
- Mullineaux, C.W.; Allen, J.F. (1986) The state 2 transition in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 can be driven by respiratory electron flow into the plastoquinone pool. *FEBS Lett.* **205**: 155-160.
- Mullineaux, P.M.; Karpinski, S.; Jimenez, A.; Cleary, S.P.; Robinson, C.; Creissen, G.P. (1998) Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant J.* **13(3)**:375-379.
- Naqvi, K. (1980) The mechanism of singlet-singlet excitation energy transfer from carotenoids to chlorophyll. *Photochem. Photobiol.* **31**:523-524.
- Naver, H.; Haldrup, A.; Scheller, H.V. (1999) Cosuppression of photosystem I subunit PSI-H in *Arabidopsis thaliana*. Efficient electron transfer and stability of photosystem I is dependent upon the PSI-H subunit. *J. Biol. Chem.* **274(16)**:10784-10789.

- Noctor, G.; Foyer, C.H. (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:249-279.
- Nugent, J.H.; Rich, A.M., Evans, M.C. (2001) Photosynthetic water oxidation: towards a mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1503(1-2)**:138-146.
- Ninnemann, H.; Maier, J. (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photocondiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* **64(2)**:393-398.
- Nishizawa AN, Buchanan BB. (1981) Enzyme regulation in C4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.* **256(12)**:6119-26.
- Nixon PJ. (2000) Chlororespiration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355(1402)**:1541-7.
- Niyogi, K.K.; Björkman, O.; Grossman, A.R. (1997) Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* **9**:1369-1380.
- Ogawa, K.; Kanmatsu, S.; Kakabe, K.; Asada, K. (1995) Attachment of CuZn-superoxide dismutase to the thylakoid membranes at the site of supeoxide generation (PS I) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* **36**:565-573.
- Ogrzewalla, K.; Piotrowski, M.; Reinbothe, S.; Link, G. (2002) The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *Eur. J. Biochem.* **269(13)**:3329-3337.
- Ohad, I.; Kyle, D.J.; Arntzen, C.J. (1984) Membrane protein damage and repair, removal and replacement of inactivated 32kDa polypeptide in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* **99**:481-485.
- Ohyama, K.; Fukuzawa, H.; Kohchi, T.; Shirai, H.; Sano, T.; Sano, S.; Umesono, K.; Shiki, Y.; Takeuchi, M.; Chang, Z.; Aota, S.; Inokuchi, H.; Ozeki, H. (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**:572-574.
- Padmasree, K.; Padmavathi, L.; Raghavendra, A.S. (2002) Essentiality of mitochondrial oxidative metabolism for photosynthesis: optimization of carbon assimilation and protection against photoinhibition. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **37(2)**:71-119.
- Peltier, G.; Cournac, L. (2002) Chlororespiration *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**:523–550.
- Perozich, J.; Hempel, J.; Morris Jr., S.M. (1998) Roles of conserved residues in the arginase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1382**:23-37.
- Pesaresi, P.; Varotto, C.; Richly, E.; Kurth, J.; Salamini, F.; Leister, D. (2001) Functional genomics of Arabidopsis photosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* **39**:285-294.
- Pesaresi, P.; Lunde, C.; Jahns, P.; Tarantino, D.; Meurer, J.; Varotto, C.; Hirtz, R.D.; Soave, C.; Scheller, H.V.; Salamini, F.; Leister, D. (2002) A stable LHCII-PSI aggregate and suppression of photosynthetic state transitions in the psae1-1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **215(6)**:940-948.

- Pfannschmidt, T.; Link, G. (1994) Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol. Biol.* **25**:69-81.
- Pfannschmidt, T.; Link, G. (1997) The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol. Gen. Genet.* **257**:35-44.
- Pfannschmidt, T. (2001) persönliche Kommunikation, Universität Jena.
- Pfannschmidt, T.; Nilsson, A.; Tullberg, A.; Link, G.; Allen, J.F. (1999) Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life.* **48(3)**:271-276.
- Pfannschmidt, T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Sci.* **8(1)**:33-41.
- Pistorius, E.K.; Kertsch, R.; Faby, S.; (1989) Investigations about various possible functions of the L-amino acid oxidase in the cyanobacterium *anacystis nidulans*. *Z. Naturforsch.* **44**:370-377.
- Poolman, M.G.; Fell, A.A.; Raines C.A. (2003) Elementary modes analysis of photosynthate metabolism in the chloroplast stroma. *Eur. J. Biochem.* **270**:430-439
- Popov, V.N.; Purvis, A.C.; Skulachev, V.P.; Wagner, A.M. (2001) Stress-induced changes in ubiquinone concentration and alternative oxidase in plant mitochondria. *Biosci. Rep.* **21(3)**:369-379.
- Porfirova, S.; Bergmuller, E.; Tropf, S.; Lemke, R.; Dormann, P. (2002) Isolation of an Arabidopsis mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99(19)**:12495-12500.
- Race, H.L.; Hind, G. (1996) A protein kinase in the core of photosystem II. *Biochem.* **35**:13006–13010.
- Raven JA, Allen JF. (2003) Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants? *Genome Biol.* **4(3)**:209
- Reichel, C.; Mathur, J.; Eckes, P.; Langenkemper, K.; Koncz, C.; Schell, J.; Reiss, B.; Maas, C. (1996) Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:5888-5893.
- Remacle, C.; Duby, F.; Cardol, P.; Matagne, R.F. (2001) Mutations inactivating mitochondrial genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Soc Trans.* **29(4)**:442-446.
- Rintamäki, E.; Martinsuo, P.; Pursiheimo, S. Aro, E.M. (1995) Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem-II centers: dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1. *J. Biol. Chem.* **271**:14870-14875.
- Rintamäki, E.; Salo, R.; Koivuniemi, A.; Aro, E.M. (1996) Protein phosphorylation and magnesium status regulate the degradation of D1 reaction centre protein of Photosystem II. *Plant Science* **115**:175-182.
- Rintamäki, E.; Salonen, M.; Suoranta, U.M.; Carlberg, I.; Andersson, B.; Aro, E.M. (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation in vivo. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* **272(48)**:30476-30482.

- Rintamaki, E.; Martinsuo, P.; Pursiheimo, S.; Aro, E.M. (2000) Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97(21)**:11644-11649.
- Robinson, J.M.; Gibbs, M. (1982) Hydrogen peroxide synthesis in isolated spinach chloroplasts lamellae. *Plant Physiol.* **70**: 1249-1254.
- Rögner, M.; Boekma, E.J.; Barber, J. (1995) How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion *Trends Biochem. Sci.* **21**:44-49.
- Rouhier, N.; Gelhaye, E.; Sautiere, P.E.; Brun, A.; Laurent, P.; Tagu, D.; Gerard, J.; de Fay, E.; Meyer, Y.; Jacquot, J.P. (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as proton donor. *Plant Physiol.* **127**:1299-1309.
- Rosso, M.G.; Li, Y.; Strizhov, N.; Reiss, B.; Dekker, K.; Weisshaar, B. (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53(1-2)**:247-59.
- Sabbert, D.; Engelbrecht, S.; Junge, W. (1996) Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* **381(6583)**:623-625.
- Sacksteder, C.A.; Kanazawa, A.; Jacoby, M.E., Kramer, D.M. (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: A proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97(26)**:14283-14288.
- Sambrook, J.; Fritsch E.F.; Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press:1-3.
- Savard, F.; Richard, C.; Guertin, M. (1996) The *Chlamydomonas reinhardtii* LI818 gene represents a distant relative of the cabI/II genes that is regulated during the cell cycle and in response to illumination. *Plant Mol. Biol.* **32(3)**:461-73.
- Sazanov, L.A.; Burrows, P.A.; Nixon, P.J. (1998a) The plastid ndh genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95(3)**:1319-1324.
- Sazanov, L.A.; Burrows, P.A.; Nixon, P.J. (1998b) The Chloroplast Ndh complex mediates the dark reduction of the plastoquinone pool in response to heat stress in tobacco leaves. *FEBS Lett.* **429**:115-118.
- Scheibe, R.; Anderson, L.E. (1981) Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* **636**:58-64.
- Scheibe, R.; Fickenscher, K.; Ashton, A.R. (1986) Studies on the mechanism of the reductive activation of NADP-malate dehydrogenase by thioredoxin and low molecular weight thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **870**, 191-197.
- Scheibe, R. (1987) NADP-malate dehydrogenase in C3-plants: Regulation and role of a light-activated enzyme. *Physiol. Plant.* **71**, 393-400.

- Scheibe, R.; Kampfenkel, K.; Wessels, R.; Tripier, D. (1991) Primary structure and analysis of the location of the regulatory disulfide bond of pea chloroplast NADP-malate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1076(1)**: 1-8.
- Scheibe, R. (1994) Lichtregulation von Chloroplastenenzymen. *Naturwiss.* **81(10)**:443-448.
- Scheibe, R. (2004) Malate valves to balance cellular energy supply. *Physiol. Plant.* **120(1)**:21-26.
- Schleiff, E.; Soll, J. (2000) Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* **211**:449-456.
- Schindler, C.; Lichtenthaler, H.K. (1996) Photosynthetic CO₂-assimilation, chlorophyll fluorescence and zeaxanthin accumulation in field grown maple trees in the course of a sunny and a cloudy day. *J. Plant Physiol.* **148**:399-412.
- Schmid, G.H.; Gaffron, H. (1967) Light metabolism and chloroplast structure in chlorophyll-deficient tobacco mutants. *J. Gen. Physiol.* **50(3)**:563-82.
- Schürmann, P.; Wolosiuk, R.A.; Breazeale, V.D.; Buchanan, B.B. (1976) Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO₂ assimilation in the chloroplasts. *Nature* **263**:257-258.
- Schürmann, P.; Jacquot, J.P. (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**:371-400.
- Schraudner, M.; Langebartels, C.; Sandermann, H. (1997) Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol. Plant* **100**:274-280.
- Schuster, G.; Dewit, M.; Staehlin, L.A.; Ohad, I. (1986) Transient inactivation of the thylakoid photosystem II light-harvesting protein kinase and concomitant changes in intramembrane particle sizes during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **103**:71-80.
- Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nuc. Acids Res.* **31**:3381-3385.
- Seidel, T.; Kluge, C.; Hanitzsch, M.; Roß, J.; Sauer, M.; Dietz, K.-J.; Gollack, D. (2004). Colocalization and FRET-analysis of subunits a and c of the vacuolar H⁺-ATPase in living plant cells. *Journal of Biotechnology*, submitted.
- Senior, A.E.; Nadanaciva, S.; Weber, J. (2002) The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1553(3)**:188-211.
- Shen Y, Danon A, Christopher DA. (2001) RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast psbA mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant Cell Physiol.* **42(10)**:1071-1078.
- Shigeoka, S.; Ishikawa, T.; Tamoi, M.; Miyagawa, Y.; Takeda, T.; Yabuta, Y.; Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* **53(372)**:1305-1319.
- Shimazaki, K.I.; Yu, S.W.; Sakaki, T.; Tanaka, K. (1992) Differences between spinach and kidney bean plants in terms of sensitivity to fumigation with NO₂. *Plant Cell Physiol.* **33**:267-273.

- Shinozaki, K.; Ohme, M.; Tanaka, M.; Wakasugi, T.; Hayashida, N.; Matsubayashi, T.; Zaita, N.; Chunwongse, J.; Obokata, J.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Ohto, C.; Torazawa, K.; Meng, B.Y.; Sugita, M.; Deno H.; Kamogashira, T.; Yamada, K.; Kusuda, J.; Takaiwa, F.; Kato, A.; Tohdoh, N.; Shimada, H.; Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**:2043-2049.
- Shikanai, T.; Endo, T.; Hashimoto, T.; Yamada, Y.; Asada, K.; Yokota, A. (1998) Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**:9705-9709.
- Silverstein, T.; Cheng, L.; Allen, J.F. (1993) Chloroplast thylakoid protein phosphatase reactions are redox-independent and kinetically heterogeneous. *FEBS Lett.* **334**(1):101-5
- Smith, P.J.; Peterson, S.; Masters, V.M.; Wydrzynski, T.; Styring, S.; Krausz, E.; Pace, R.J. (2002) Magneto-optical measurements of the pigments in fully active photosystem II core complexes from plants. *Biochemistry.* **41**(6):1981-1989.
- Snyders, S.; Kohorn, B.D. (1999) TAKs, Thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J. Biol. Chem.* **274**: 9137-9140
- Soll, J (2002) Protein import into chloroplasts. *Curr. Opin. Plant Biol.* **(5)**6:529-535.
- Somerville, C.R.; Ogren, W.L. (1982) Isolation of photorespiration mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Methods in Chloroplast Biology*:129-138.
- Soole, K.L.; Menz, R.I. (1995) Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**(4):397-406.
- Spangfort, M.; Andersson, B. (1989) Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II – isolation and biochemical characterisation. *Biochim. Biophys. Acta* **977**:163-170.
- Stadtman, E.R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**:1220-1224.
- Steffen, R.; Christen, G.; Renger, G. (2001) Time-resolved monitoring of flash-induced changes of fluorescence quantum yield and decay of delayed light emission in oxygen-evolving photosynthetic organisms. *Biochem.* **40**(1):173-180.
- Stewart, A.A.; Taylor, G.R. (1981) Tissue and Subcellular Localization of Enzymes of Arginine Metabolism in *Pisum Sativum*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **101**(4):1281-1289.
- Stroebel, D.; Choquet, Y.; Popot, J.L.; Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* **426**(6965) 413-418.
- Taylor, A.A.; Stewart, G.R. (1981) Tissue and Subcellular Localization of Enzymes of Arginine Metabolism in *Pisum Sativum*. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **101**(4):1281-1289.
- Wright, L.C.; Brady, C.J.; Hinde, R.W. (1981) *Photochem.* **20**:2641-2645.
- Telfer, A.; Allen, J.F.; Barber, J.; Bennett, J. (1983) Thylakoid protein phosphorylation during state1-state2 transitions in osmotically shocked pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **722**: 176-181
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815.

Trebitsh, T.; Danon, A. (2001) Translation of chloroplast psbA mRNA is regulated by signals initiated by both photosystems II and I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98(21)**:12289-12294.

Trebitsh, T.; Levitan, A.; Sofer, A.; Danon, A. (2000) Translation of chloroplast psbA mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Mol Cell Biol.* **20(4)**:1116-11123.

Trebst, A. (1986) The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystemII in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* **41c**:240-245.

Ursini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohe, R.; Aumann, K.D.; Roveri, A.; Schomburg, D.; Flohe, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol.* **252**:38-53.

Vallon, O.; Bulte, L.; Dainese, P.; Olive, J.; Bassi, R.; Wollman, F.A. (1991) Lateral redistribution of cytochrome b6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88(18)**:8262-8266.

van Thor, J.J.; Mullineaux, C.W.; Matthijs, H.C.P.; Hellingwerf, K.J. (1998) Light Harvesting and State Transition in Cyanobacteria. *Bot. Acta* **111**:430-443.

van Wijk, K.J.; Roobol-Boza, M.; Kettunen, R.; Andersson, B.; Aro, E.M. (1997) Synthesis and assembly of the D1 protein into photosystem II: processing of the C-terminus and identification of the initial assembly partners and complexes during photosystem II repair. *Biochem.* **36(20)**:6178-6186.

Varotto, C.; Pesaresi, P.; Maiwald, D.; Kurth, J.; Salamini, F.; Leister, D. (2000a) Identification of photosynthetic mutants of *Arabidopsis* by automatic screening for altered effective quantum yield of photosystem II. *Photosynthetica* **38**:497-504.

Varotto, C.; Pesaresi, P.; Meurer, J.; Oelmüller, R.; Steiner-Lange, S.; Salamini, F.; Leister, D. (2000b) Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene psaE1 affects photosynthesis and impairs growth. *Plant J.* **22**:115-124

Varotto, C.; Pesaresi, P.; Jahns, P.; Leßnick, A.; Tizzano, M.; Schiavon, F.; Salamini, F.; Leister, D. (2002) Single and double knockouts of the genes for photosystem I subunits G, K, and H of *Arabidopsis*. Effects on photosystem I composition, photosynthetic electron flow, and state transitions. *Plant Physiol.* **129**:616-624.

Vener, A.V.; Van Kan, P.J.; Gal, A.; Andersson, B. Ohad, I. (1995) Activation/deactivation cycle of redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. Role of plastoquinol bound to the reduced cytochrome bf complex. *J. Biol. Chem.* **270**:25225-25232.

Vener, A.V.; Van Kan, P.J.; Rich, P.R.; Ohad, I.; Andersson, B (1997) Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:1585-1590.

Verhoeven, A.S.; Adams III, W.W.; Demmig-Adams, B.; Croce, R.; Bassi, R. (1999) Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in vinca major *Plant Physiol.* **120(3)**:727-738.

Vothknecht, U.C.; Soll, J. (2003) Entstehung und Entwicklung des Chloroplasten als photosynthetisches Organell. *Zellbiol. aktuell* **29(2)**:33-36.

- Weber, A.; Flügge, U.I. (2002) Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *J. Exp. Bot.* **53(370)**:865-874.
- Wildt, J., Kley, D.; Rockel, A.; Segschneider, H.J. 1997. Emission of NO from higher plant species. *J. Geophys. Res.* **102**:5919–5927.
- Wilkins, M.R.; Lindskog, I.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.C.; Hochstrasser, D.F.; Appel, R.D. (1997) Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS - a World-Wide Web accessible tool. *Electropho.* **18(3-4)**:403-408.
- Wingler, A.; Lea, P.J.; Quick, W.P.; Leegood, R.C. (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* **355**:1517-1529.
- Wise, R.R. (1995) Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth. Res.* **45**:79-97.
- Wollman, F.A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **20(14)**:3623-3630.
- Wollman, F.A.; Lemaire, C. (1988) Studies on kinase-controlled state transitions in photosystem II and b6 f mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **933**:85–94.
- Wolosiuk, R.A.; Buchanan, B.B. (1977) Thioredoxin and Glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* **266**:565-567.
- Wu, D. ; Wright, D.A., ; Wetzel, C. ; Voytas, D.F. ; Rodermel, S. (1999) The IMMUTANS variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell.* **11(1)**:43-55.
- Wydrzynski, T.; Angström, J.; Vänngard, T (1989) H₂O₂ formation by photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **973**:23-28.
- Yamada, H.; Lim, J.; Dale, J.M.; Chen, H.; Shinn, P.; Palm, C.J.; Soutwick, A.M.; Wu, H.C.; Kim, C.; Nguyen, M.; Pham, P.; Cheuk, R.; Karlin-Newmann, G.; Liu, S.X.; Lam, B.; Sakano, H.; Wu, T.; Yu, G.; Miranda, M.; Quach, H.L.; Tripp, M.; Chang, C.H.; Lee, J.M.; Toriumi, M.; Chan, M.M.H.; Tang, C.C.; Onodera, C.S.; Deng, J.M.; Akiyama, K.; Ansari, Y.; Arakawa, T.; Banh, J.; Banno, F.; Bowser, L.; Brooks, S.; Carninci, P.; Chao, Q.; Choy, N.; Enju, A.; Goldsmith, A.D.; Gurjal, M.; Hansen, N.F.; Hayashizaki, Y.; C.Johnson-Hopson,; V.W. Hsuan,; K.Iida,; M. Karnes,; S.Khan,; E.Koesema,; J.Ishida,; Jiang, P.X.; Jones, T.; Kawai, J.; Kamiya, A.; Meyers, C.; Nakajima, M.; Narusaka, M.; Seki, M.; Sakurai, T.; Satou, M.; Tamse, R.; Vaysberg, M.; Wallender, E.K.; Wong, C.; Yamamura, Y.; Yuan, S.; Shinozaki, K.; Davis, R.W.; Theologis, A.; Ecker, J.R. (2003) Empirical Analysis of Transcriptional Activity in the *Arabidopsis* Genome. *Science* **302**:842-846.
- Yamamoto, A.; Katou, S.; Yoshioka, H.; Doke, N.; Kawakita, K. (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals *J Gen Plant Pathol* (2003) **69**:218–229.
- Yamasaki, H. (2000) Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **355(1402)**:1477-88.

- Yamasaki, H.; Sakihama, Y. (2000) Simultaneous production of Nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *invitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. FEBS Lett. **468**, 89-92.
- Yamasaki, H.; Shimoji, H.; Ohshiro, Y.; Sakihama, Y. (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. Nitric Oxide **5(3)**:261-70.
- Yruela, I.; Pueyo, J.J.; Alonso, P.J.; Picorel, R. (1996) Photoinhibition of Photosystem II from higher plants: effect of copper inhibition. J. Biol. Chem. **271**:27408-27415.
- Yu, L.; Zhao, J.; Mühlenhoff, U.; Bryant, D.A.; Golbeck, J.H (1993) Psae is required for in vivo cyclic electron flow around PS I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC 7002. Plant Physiol. **103**:171-180.
- Zhang, N. ; Portis, A.R.Jr. (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. Proc. Natl. Acad. Sci. **96(16)**:9438-43.
- Zhang, L.; Paakkari, V.; Van Wijk, K.J.; Aro, E.M. (2000) Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: Regulation of translational elongation, insertion, and assembly into Photosystem II. Plant Cell **12**:1769:1781.
- Zhang, H.B.; Cai, S.Q.; Xu, D.Q. (2002) D1 protein phosphorylation/dephosphorylation alone has no effect on the electron transport activity of photosystem II in soybean leaves. Plant Sci. **162**:507-511.
- Zito, F.; Finazzi, G.; Delosme, R.; Nitschke, P.; Picot, D.; Wollmann, F.A. (1999) The Qo site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase. EMBO J. **18**:2961-2969.
- Zouni, A.; Witt, H.T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauss, N.; Saenger, W. ; Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8Å resolution. Nature **409**:739-743.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	volumenbezogenes Massenprozent
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplifizierte Ecotyp spezifische Größenunterschiede
Amp.	Ampicillin
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
ADP	Adenosindiphosphat
AOX	Alternative Oxidase
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP- Synthase
BCIP	5- Bromo- 4- Chloro- 3- Indolylphosphat
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	copy DNA
Chl	Chlorophyll
cM	centi Morgan
CO ₂	Kohlendioxid
Col	Arabidopsis thaliana Ecotyp Columbia
C. reinhardtii	Chlamydomonas reinhardtii
Cytb ₆ f- Komplex	Cytochrom b ₆ f- Komplex
DCBQ	2,6- Dichloro-p- Benzoquinone
DCMIB	2,5-Dibromo-3-Methyl-6-Isopropyl-1,4-Benzoquinone
DCMU	3-(3,4- Dichlorophenyl)- 1,1- dimethylharnstoff
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	„Expressed sequence Tag“
Fd	Ferredoxin
GOGAT	Glutamin-Glutamat-Ammino-Transferase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure
HS	„High salt“, Minimalmedium
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kalilauge
LB	Luria Bertani
Ler	Arabidopsis thaliana Ecotyp Landsberg erecta
LHC	„Light harvesting complex“, Lichtsammelkomplex

M	Marker
MES	2-Morpholinoethan-sulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mt	„Mating type“, Geschlecht
mRNA	messenger RNA
Na ₃ - Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid- Adenin- Dinucleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumcarbonat
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblau- Tetrazoliumsalz
NO	Nitrit Oxid
NOS	Nitrit Oxid Synthase
NPQ	Nicht photochemisches Quenchen
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD _{600/750}	Optische Dichte bei 600 bzw. 750nm Anregungswellenlänge
OxPP	Oxidativer Pentose Phosphat Weg
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
pAOX	plastidäre Alternative Oxidase
PCR	„Polymerase chain reaction“, Polymerase- Kettenreaktion
PQ	Plastochinon
PQH ₂	Plastochinol
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	„Reactive oxygen species“, Reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse transkribiert
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stmu	„State transition“- Mutante
STK	Serin/Threonin-Kinase
Stkm	Serin/Threonin-Kinase-Mutante
Tab.	Tabelle
Tris	Trichloressigsäure
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslatierte Region
UQ	Ubiquinon
UV	Ultraviolett
Wt	Wildtyp

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.:	Darstellung:
2.1	Schematische Darstellung der pflanzlichen Mesophyllzelle mit ihren Organellen und Kompartimenten
2.2	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines <i>Arabidopsis thaliana</i> -Chloroplasten
2.3	Schematische Darstellung der Thylakoidmembran
2.4	Schematische Darstellung der thylakoidären Elektronentransportkette
2.5	Schematisch Darstellung des PSI
2.6	Schematisch Darstellung des Cytb ₆ f-Komplexes
2.7	Schematisch Darstellung des PSII
2.8	Schematisch Darstellung der ATP-Synthase
2.9	Schematische Darstellung der „State Transition“
3.1	Schematische Darstellung des Kreuzungsschemas des „mapping“-Ansatzes
3.2	Schematische Darstellung des pECFP-Vektors (Qiagen™)
3.3	Schematische Darstellung des pQE80L-Vektors (Qiagen™)
4.1	Schematische Darstellung des „State Transition-Screening“-Verfahrens
4.2	„Video.Imaging-Screening“ der Mutante Stmu1
4.3	„Video.Imaging-Screening“ der Mutante Stmu2
4.4	„Video.Imaging-Screening“ der Mutante Stmu10
4.5	77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektrum der Mutante Stmu1
4.6	77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektrum der Mutante Stmu2
4.7	77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektrum der Mutante Stmu10
4.8	Übersicht der Segregationsanalys der Mutante Stmu10
4.9	Darstellung des „Screeningverfahrens“ der „mapping“-Analyse der Mutante Stmu10
4.10	Darstellung von beispielhaften AFLP-Marker-PCRs
4.11	Übersicht des Chromosomen-„mappings“ der Stmu10-Mutation
4.12	Darstellung des „mapping“-Ergebnisses der Stmu10-Mutation
4.13	Darstellung der RT-PCR von Wt und Stmu10 der potentiell mutierten Gene
4.14	Northern-Blot-Analyse des At4G08870-Gens von Wt und Stmu10
4.15	Darstellung des Homologie-Verleiches von Arginase1 und Arginase2
4.16	Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Arginase2 nach SMART™
4.17	Fluoreszenz-Aufnahmen von Protoplasten mit und ohne At4G08870-ECFP-Konstrukt
4.18	Fotos von Wt und Stmu10 adaptiert an Normallicht- und Wechsellicht-Bedingungen
4.19	Darstellung der Messung des relativen Fluoreszenz-Wechsels von Wt und Stmu10
4.20	Darstellung der Messung des NPQ von Wt und Stmu10
4.21	Vergleichende Darstellung der Fv/Fm-Werte von Wt und Mutante
4.22	Vergleichende Darstellung der 1-qP-Werte von Wt und Stmu10
4.23	Darstellung der Chlorophyll-Fluoreszenz von Wt und Stmu10 bei einem Wechsel von Licht zu Dunkelheit

- 4.24 Vergleichende Darstellung der relativen Abnahme der photosynthetischen Effizienz von Wt und Stmu10
- 4.25 Anti-Phospho-Threonin-Immunodetektion von Wt und Stmu10
- 4.26 ³²ATP-Markierung von Wt und Stmu10-Thylakoiden
- 4.27 Darstellung der chloroplastidären Makroarray-Analyse von Wt und Stmu10
- 4.28 Darstellung der vergleichenden RT-PCR-Analyse von chloroplastidären Genen
- 4.29 Darstellung der Western-Blot-Analyse chloroplastidärer Proteine
- 4.30 Darstellung der relativen Arginase-Aktivität von Wt und Stmu10
- 4.31 Darstellung der vergleichenden RT-PCR von At4G08870 und At4G08900
- 4.32 Darstellung der vergleichenden RT-PCR von At4G08870 und At4G0890 nach Starklicht-Inkubation
- 4.33 Vergleichende Western-Blot-Analyse mitochondrieller Proteine
- 4.34 Schematische Darstellung des „in silico-Screening“-Verfahrens
- 4.35 Schematische Darstellung der Domänen-Struktur der STK1 nach SMART™
- 4.36 Darstellung der Aminosäuresequenz der STK1 mit den identifizierten Domänen
- 4.37 Darstellung der Tertiär-Struktur der STK1 nach Swismodel™
- 4.38 Darstellung der T-DNA-Insertionsstellen der Mutanten Stkm1 und Stkm2
- 4.39 77K-Chlorophyll-Fluoreszenz-Emissions-Spektrum der Mutante Stkm1
- 4.40 Darstellung der „in vivo“-Phosphorylierungsexperimente von Wt und Stkm1
- 4.41 Darstellung der „in vitro“-Phosphorylierungsexperimente von Wt und Stkm1 Messung
- 4.42 Fotos von Wt und Stkm1 adaptiert langzeitige Starklicht-Bedingungen
- 4.43 Fotos von Wt und Stkm1 adaptiert Normallicht- und langzeitige Starklicht-Bedingungen
- 4.44 Darstellung des Ergebnisses der Expression des STK1-Epitops in *E.coli*
- 4.45 Darstellung der Western-Blot Analyse mit dem STK1-Antiserum von Wt und Stkm1
- 4.46 Darstellung der Maldi-Analyse des in Wt detektierten Antigens des STK1-Antiserums
- 5.1 Schematische Darstellung der katalytischen Eigenschaft einer Arginase
- 5.2 Schematische Darstellung des Ornithin-Zyklus und der Stickstoff-Assimilation in Pflanzen
- 5.3 Schematische Darstellung der mitochondrialen Respiration und der *C. reinhardtii* Respirationmutanten
- 5.4 Schematische Darstellung der möglichen Auswirkungen der Arginase2-Mutation in Stmu10
- 5.5 Schematische Darstellung der potentiell regulatorischen Funktion der Arginase2

7.3 Tabellen

Tab.:	Inhalt:
3.1	In dieser Arbeit verwendete Zell- Kulturen von <i>E. coli</i>
3.2	In dieser Arbeit verwendete Zell <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien
3.3	In dieser Arbeit verwendete AFLP-Marker
3.4	In dieser Arbeit verwendete Antiseren und Antikörper

7.4 verwendete Primer

RT81F	CGAGGCGAAAATCGGTAATA
RT81R	TGCAAAGGCGACACTCTATG
RT82F	TCACCATAGGGAAGAGGTG
RT81R	TCAACCCTCCATTTTCGTTTC
RT83F	CTTGAATTTGGCGAATGGAT
RT83R	CCAACAACCTCCCAACAAC
RT84F	CTGGTGATTTGAGACACG
RT84R	TCGACAACCCAGTTGATCTTT
RT85F	AAGGCAGTGGAGATAGAGAGCA
RT85R	CGATCATCGGAGCAATCATA
RT86F	TTCATTCTACAAACGGATGCT
RT86R	ATGACGCGGAAACGACAT
RT87F	ATGTCATCAGCGGTATCACG
RT87R	TCTTGATGCACATCCGATA
RT90F	TTCGTGAAAGGGCAAACTC
RT90R	GCATAGCCACCTTCCATGAT
RtActinF	TACAACGAGCTTCGTGTTGC
RTActinR	GGACAACGGAATCTCTCAGC
RTpsaAF	GATCTAATCCGCCACGAAAA
RTpsaAR	CAGGTGGTTTGGCCAATAGT
RTpsbAF	GAAAATCAATGGCCAAAAT
RTpsbAR	TTACCCAATCTGGGAAGCTG
RTpetAF	GCTTTGAATGTGGGAGCTGT
RTpetAR	CCAAATCCACCCACATTAGG
RTatpAF	TTCGATTGATCCGGGTA
RTatpAR	ATGGGTGACGGTTTGATGAT
RTndhIF	ATGCCTACTCTCAAACCTTTTTG
RTndhIR	TTCTTCACGTCCCGGATTAC

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben:

Herrn PD Dr. Olaf Kruse für die intensive Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit, sowie immerwährende Diskussionsbereitschaft und Ideenreichtum bei verzwickten Problemen,

Frau Christine Schönfeldt und Herrn Jan Mussnug für praktische Hilfen im Laboralltag, engagierte Diskussionen und Spaß im Labor,

Herrn Sascha Räker für die gute Zusammenarbeit im und außerhalb des Labors,

Herrn Prof. Dr. Schmid für die Betreuung der Anfangsphase dieser Arbeit und vielen hilfreichen und aufmunternden Kommentaren,

Frau Prof. Dr. Staiger für die Unterstützung dieser Arbeit,

Frau Prof. Elfriede Pistorius und ihrer Arbeitsgruppe für die freundliche Zusammenarbeit,

Herrn Prof. Dr. Dietz und dem Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie insbesondere Frau PD Dr. Margarete Baier und Frau Dr. Andrea Kandlbinder für die Hilfen im Laboralltag,

Herrn Dr. Uwe Kahmann für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen,

Herrn Dr. Conrad W. Mullineaux, University College London, für die Hilfe bei den ersten Fluoreszenz- Messungen,

Herrn Dr. Peter J. Nixon, Imperial College London, für die Unterstützung während meines Aufenthaltes in London,

der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Karsten Niehaus, insbesondere Herrn Holger Densow für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit,

Herrn PD Dr. Thomas Pfannschmidt für die Unterstützung bei der Kultivierung und Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*,

meiner Freundin Maren Bruns für Korrekturen an der Arbeit,

meinen Eltern für alles.

Veröffentlichungen

Borgstädt, R.; Kruse, O. (2001) Identification and characterisation of *State Transitions* mutants in *Arabidopsis thaliana* in: Proceedings of the International Photosynthesis Meeting Brisbane, PS2001 Proceedings, 12th International Congress on Photosynthesis: S3-008.

Burda, K.; Kruk, J.; Borgstädt, R.; Stanek, J.; Strzalka, K.; Schmid, G.H. Kruse, O. (2003) Mössbauer studies of the non-heme iron and cytochrome b559 in a *Chlamydomonas reinhardtii* PSI⁻ mutant and their interactions with α -tocopherol quinone FEBS Lett. **535**, 159-165.

Kruse, O.; Borgstädt, R.; Mussgnug, J.; Schönfeld, C. (2002) Structural and functional aspects of phosphatidyl glycerol binding and covalent modification by reversible phosphorylation in the LHCII-PSII supercomplex. Recent Res. Devel. Plant Physiol. **3**:211-225.

Schoenfeld, C.; Borgstaedt, R.; Wobbe, L.; Kienast, A.; Nixon, P.J.; Kruse, O. (2004) Mitochondrial transcription factor Mocl is important for coordinating photosynthesis and respiration in plant cells (Wird zur Veröffentlichung eingereicht).

Borgstaedt, R.; Kandlbinder, A.; Baier, M.; Dietz, K.-J.; Kruse, O. (2004) A mitochondrial type II arginase is essential for functional light acclimation in *Arabidopsis thaliana* (Wird zur Veröffentlichung eingereicht).

Wagner, R.; Vida, F.; Borgstädt, R.; Kruse, O.; Pfannschmidt, T. (2004) Screening for *Arabidopsis thaliana* Mutants Deficient in the Acclimatory Long-term Response to Varying Light Qualities Using Chlorophyll Fluorescence Imaging (Wird zur Veröffentlichung eingereicht).

Lebenslauf

Name Rüdiger Borgstädt
Geburtsdatum 19. Juni 1972
Geburtsort Melle
Nationalität Deutsch

Schulbildung

1978- 1982 Grundschule Bardüttingdorf/Wallenbrück
1983- 1991 Ev. Gymnasium Werther, Abschluss: Abitur
1991-1992 Höhere Handelsschule für Abiturienten, Friedrich-List-Schule Herford

Studium

Okt. 1993- 2000 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld
1992- 1995 Grundstudium, Vordiplom in den Fächern Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Genetik, Chemie und Physik
1995- 1998 Hauptstudium
1997 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, Mikrobiologie, Genetik und Physik
1998 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zellphysiologie, Universität Bielefeld.
Thema: Optimierung der Expression von Cytb₅₅₉ in *E. coli*
Betreuer: PD Dr. Olaf Kruse (Universität Bielefeld)
Februar 2000 Ausstellung des Diploms
Seit Jan. 2000 Promotion an der Universität Bielefeld
Lehrstuhl: molekulare Zellphysiologie
Betreuer: Dr. O. Kruse (PD)

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und nur aufgeführte Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle ganz oder annähernd aus der Literatur entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Titels vorgelegt.

Bielefeld, 14. April 2004