

Molekulargenetische und physiologische Analysen von
Plastocyanin und Cytochrom c_x – Mutanten bei
Arabidopsis thaliana.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Martin Christian Weigel
aus Ratibor / Polen
- Leverkusen; 2006 -

Die vorliegende Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln,
in der Abteilung für
Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie
angefertigt.

Dissertation wurde eingereicht am:

01. Dezember 2005

Berichterstatter:

Prof. Dr. Francesco Salamini

Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der mündlichen Prüfung:

08. Februar 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung.....	6
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> als Modellorganismus	6
1.2. T-DNA Mutagenese.....	6
1.3. Transposons	7
1.4. Insertionsmutagenese.....	7
1.4.1. <i>Gene-Tagging</i>	8
1.4.2. T-DNA vermittelte Insertionsmutagenese	8
1.4.3. <i>En</i> -Transposon vermittelte Mutagenese	8
1.5. Chloroplasten	9
1.5.1. Plastidengenom.....	9
1.5.2. Proteintransfer.....	9
1.6. Photosynthese	11
1.6.1. Photochemische Reaktionen	12
1.6.2. Chlorophyll a – Fluoreszenz	13
1.6.3. Enzymatische Reaktionen der Photosynthese.....	16
1.6.5. Kopplungselemente der Photosynthese-Reaktionen.....	16
1.7. Cytochrom <i>b₆/f</i> -Komplex.....	17
1.7.1. Die Funktion des Cytochrom <i>b₆/f</i> -Komplexes.....	17
1.7.2. Aufbau des Cytochrom <i>b₆/f</i> -Komplexes	17
1.8. Photosystem I-Komplex	18
1.8.1. Die Funktion des Photosystem I	18
1.8.2. Aufbau des Photosystem I	18
1.8.3. Unterschiede im Aufbau des prokaryotischen und eukaryotischen Photosystem I	20
1.9. Plastocyanin und Cytochrom <i>c_x</i>	20
1.9.1. Plastocyanin	20
1.9.2. Cytochrom <i>c_x</i>	21
1.9.3. Plastocyanin als Elektronencarrier.....	22
1.9.4. Die Reduktion des Plastocyanins am Cytochrom <i>b₆/f</i> -Komplex	22
1.9.5. Die Oxidation des Plastocyanins am Photosystem I.....	23
1.10. Problemstellung	24
2. Ergebnisse.....	26
2.1. Charakterisierung der Plastocyanin-Mutanten.....	26
2.1.1. Die Plastocyanin-Gene aus <i>A. thaliana</i>	26
2.1.2. Identifikationen der Plastocyanin-Mutanten.....	28
2.1.3. Der Phänotyp der Plastocyanin-Mutanten	29
2.1.4. Wachstumsraten der Plastocyanin-Linien	31

2.1.5. Expressionsanalysen der Plastocyanin-Allele	31
2.1.6. Pigmentanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie	35
2.1.7. Zusammensetzung des Photosynthese-Apparates bei veränderten Plastocyanin-Konzentration.....	37
2.1.8. Spektroskopische Analysen an Plastocyanin-Linien	40
2.1.9. P ₇₀₀ -Oxidation der Plastocyanin-Mutanten und Überexprimierer	42
2.1.10. Kinetik der Fluoreszenzinduktion in den Doppelmutanten	43
2.1.11. Kinetiken der Cytochrom <i>f</i> Oxidation und der Photosystem I Reduktion.....	44
2.1.12. Wachstum der Plastocyanin-Mutanten auf Medien mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen	46
2.2. Charakterisierung der <i>atc_x</i> -Mutanten.....	48
2.2.1. Das <i>Atc_x</i> -Gen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
2.2.2. Cytochrom <i>c_x</i> - Mutanten, Expression und Phänotyp.....	51
2.2.3. Anti - Cytochrom <i>c_x</i> - Antikörper	54
2.2.4. Lokalisation des <i>Atc_x</i> - Genprodukts.....	55
2.3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Cytochrom <i>c₆</i> in <i>A. thaliana</i>	56
2.4. Untersuchung der mRNA-Expression in Plastocyanin und Cytochrom <i>c_x</i> -Mutanten...58	
3. Diskussion.....	61
3.1. Höhere Pflanzen ohne Plastocyanin	61
3.1.1. Stabilisierung der <i>En1</i> -Linien	61
3.1.2. <i>A. thaliana</i> ohne Plastocyanin	62
3.1.3. Pflanzen brauchen nur wenig Plastocyanin zum autotrophen Wachstum	62
3.2. Cytochrom <i>c_x</i> als Elektronencarrier	63
3.2.1. Abundanz der <i>Atc_x</i> -mRNA	64
3.2.2. Das Genprodukt von <i>Atc_x</i> ist im Thylakoidlumen der Chloroplasten lokalisiert ...64	
3.2.3. Bei höheren Pflanzen erfolgt keine kompensierende Regulation zwischen Cytochrom <i>c_x</i> und Plastocyanin.....	65
3.2.4. Kann Cytochrom <i>c_x</i> in vivo den lineare Elektronentransport aufrechterhalten?66	
3.2.5. Spekulationen über die Funktion des Cytochrom <i>c_x</i> -Proteins	67
3.3. Zwei Isoformen des Plastocyanins in <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
3.3.1. Quantifizierung der Plastocyaninmenge im Thylakoidlumen	70
3.3.2. Differenzielle Genexpression in den <i>pete1-1.1</i> und <i>pete2-1.1</i> Mutanten	70
3.3.3. Strukturelle Unterschiede zwischen den Isoformen der <i>PetE</i> -Genprodukte.	71
3.3.4. Physiologischer Zustand der Plastocyanin-Mutanten.....	75
3.3.5. Wachstum der Plastocyanin-Mutanten	78
4. Material und Methoden.....	80
4.1. Materialien	80
4.1.1. Chemikalien und Enzyme	80
4.1.2. Verwendete Kits	80
4.1.3. Puffer und Lösungen.....	80
4.1.4. Medien	83
4.1.5. Oligonukleotide in 5'-Orientierung und ihre Verwendung	85
4.1.6. Plasmide.....	86

4.2. Organismen	87
4.2.1. <i>Escherichia coli</i>	87
4.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	87
4.2.3. Pflanzen	87
4.3. Arbeiten mit Pflanzen	88
4.3.1. Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien	88
4.3.2. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	89
4.3.3. Charakterisierung der Mutanten	89
4.4. Molekularbiologische Arbeitstechniken	91
4.4.1. Isolation von Nukleinsäuren	91
4.4.2. Modifikation von Nukleinsäuren	93
4.4.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	94
4.4.4. Northern-Analysen	95
4.4.5. Polymerase-Kettenreaktion	95
4.4.6. Gateway [®] -Klonierung	98
4.4.7. Transformation von Bakterien via Elektroporation	98
4.4.8. Selektion von transformierten Bakterien	99
4.4.9. Extraktion und Quantifikation der Proteine	99
4.4.10. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	100
4.4.11. Coomassie-Färbung	102
4.4.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen	102
4.4.13. Antikörper gegen das <i>Atc_x</i> - Protein	103
4.4.14. Intrazelluläre Lokalisation des <i>Atc_x</i> -RFP Fusionsproteins	105
5. Verzeichnisse	106
5.1. Abkürzungsverzeichnis	106
5.2. Abbildungsverzeichnis	107
5.3. Tabellenverzeichnis	108
5.4. Literaturverzeichnis	109
6. Anhang	119
6.1. Nukleotidsequenzen	119
6.2. Aminosäuresequenzen	121
6.3. Alignments von Nukleotidsequenzen der <i>A. thaliana</i> Plastocyanin-Gene	122
6.4. Alignments der Plastocyanin-Proteine unterschiedlicher Spezies	122
6.5. Weitere spektroskopische Messungen	125
6.5.1. PAM-Messungen an Cytochrom <i>c_x</i> -Linien	125
6.5.2. PAM-Messungen an Plastocyanin-Linien	127
Eidesstattliche Erklärung und Veröffentlichungen	130
Danksagung	131
<i>Abstract</i> und Zusammenfassung	132

1. Einleitung

1.1. *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus

Arabidopsis thaliana (L.) HEYNH (Acker-Schmalwand) ist, auch wenn sie keine Nutzpflanze darstellt, ein beliebter Modellorganismus für molekularbiologische Untersuchungen der höheren Pflanzen (Redei 1975). Der kleine, zweikeimblättrige (dikotyle) Kreuzblüter zeigt viele Eigenschaften, die seine Wahl begründen. Die Pflanze ist diploid und besitzt ein sehr kleines Genom (125 Millionen Basenpaare), das auf fünf Chromosome verteilt ist. Im Vergleich enthält der hexaploide Weizen (*Triticum sativum*) etwa 15 Milliarden Basenpaare. *A. thaliana* zeichnet sich weiterhin durch eine kurze Generationszeit (8-10 Wochen) und hohe Nachkommenszahlen aus, die eine statistische Absicherung durchgeführter genetischer Experimente ermöglicht. Inzwischen wurde das *Arabidopsis* Genom von der internationalen „The Arabidopsis Genome Initiative“ (2000) vollständig sequenziert.

1.2. T-DNA Mutagenese

Agrobacterium tumefaciens wird in der Gentechnik zum vektorvermittelten Gentransfer eingesetzt.

Das *Agrobacterium* (Smith und Townsend 1907) ist ein gram-negatives Bodenbakterium aus der Gruppe der *Alpha-Purpurbakterien*. Zu dieser Bakteriengattung gehören 5 Arten (*A. radiobacter*, *tumefaciens*, *rhizogenes*, *rubi*, und *vitis*.), die sich vor allem in der Organisation ihrer Plasmide unterscheiden. Die natürliche Fähigkeit von Agrobakterien pflanzliche Zellen zu transformieren, ist potenziell bei allen dikotylen Pflanzen gegeben. Sie erfordert jedoch eine Wundreaktion der Wirtspflanze. Da die Wundreaktion mit vorübergehender Zellteilung im Wundkallus verbunden ist, kann die „fremde“ DNA unspezifisch ins Pflanzenzellgenom integrieren und ihre Gene exprimieren. Die sogenannte T-DNA (*Transfer DNA*) der *Agrobakterien* liegt auf einem DNA-Ring, dem Ti-Plasmid (*Tumor inducing Plasmid*). Verschiedene Gene, die auf der T-DNA liegen, sind jedoch für den Transfer selbst nicht erforderlich. Lediglich die DNA-Fragmente, die diese Gene begrenzen (Border- oder Randsequenzen) und einige Erbanlagen, die außerhalb der T-DNA in der so genannten Vir-Region (Virulenz) des Ti-Plasmids liegen, sind für den eigentlichen Transfer essenziell.

Im Jahr 1983 gelang es Zambryski *et al.* aus einem wildtypischen Plasmid pTiC58 (aus *A. tumefaciens*) die „Tumor-induzierenden“ Gene u.a. für Phytohormon-Synthese zu entfernen

und sie durch pBR322-Plasmid Sequenzen zu ersetzen. Die Integrationsfähigkeit der T-DNA in das Kerngenom der Pflanzen wurde damit nicht eingeschränkt. Von entscheidender Bedeutung für die Integration haben sich die fast identischen (linke und rechte) terminalen Wiederholungssequenzen (jeweils 25 bp lang) der T-DNA herausgestellt. Von diesen integriert mit einer hohen Genauigkeit die rechte Border als erste in die DNA des Wirtes (zeigt nur 1-2 bp lange Überhänge). Die Integration der linken Border erfolgt weniger exakt. Sie zeigte oft einen bis zu 100 bp – langen Verlust der T-DNA-Sequenz. In der Regel wird nur eine Kopie der „T-DNA Stammsequenz“ des Ti-Plasmids übertragen (De Block *et al.* 1983; Spielman *et al.* 1986). Es wurden jedoch auch mehrere Kopien und sogar Fragmente der Ti-Plasmide im Genom der Pflanzen beobachtet (Stachel *et al.* 1987).

1.3. Transposons

Genome vieler Organismen enthalten DNA-Anschnitte mit der Fähigkeit, ihre Position im Genom zu verändern. Diese kann durch Selbst-Ausschneiden (Excision) und die anschließende Integration an eine neue Stelle (*cut and paste*), oder durch Replikation mit anschließender Integration (*copy and paste*) erfolgen. Diese mobilen Elemente werden als Transposons bezeichnet. Transposons besitzen umgekehrte terminale Wiederholungssequenzen (*terminal inverted repeats*), die diejenige Region umrahmen, die für die Transposition notwendigen Proteine (Transposasen) kodiert. Die meisten pflanzlichen Transposon-Familien bestehen aus autonomen und nichtautonomen Elementen. Das autonome Element kodiert für eine Transposase und hat die Fähigkeit die Transposition des nichtautonomen Elements zu vermitteln. (Barker *et al.* 1984, Döring *et al.* 1984, Fedoroff *et al.* 1983, Hartings *et al.* 1991, Pereira *et al.* 1986).

1.4. Insertionsmutagenese

Mutanten ermöglichen die Untersuchung von Genfunktionen und Genregulation.

Im Prinzip soll bei einer Insertionsmutagenese die normale Funktion eines Gens durch eine stabile Integration fremder DNA (T-DNA oder Transposon) das entsprechende Gen ausgeschaltet werden. Das mutierte Allel kann sich dann in einem Phänotyp manifestieren. Welche Gene letztendlich von der Insertion betroffen werden, ist weitgehend nicht kontrollierbar, da sowohl die Integration des Transposons als auch der T-DNA relativ unspezifisch erfolgt. Von Topping *et al.* 1991 wurde festgestellt, dass diese

Integrationsereignisse meistens in aktives (transkribiertes) Chromatin erfolgen. Wie viele Kopien fremder DNA in das Zielgenom integriert werden, hängt vom biologischen Mutagen ab. So können Transposons über 50 Kopien im Wirtsgenom erreichen.

1.4.1. Gene-Tagging

Eine DNA mit bekannter Sequenz, die in ein Gen integriert und eine Mutation mit einem veränderten Phänotyp verursacht, markiert so das Gen (Walbot 1992). Man kann die bekannte Sequenz der integrierten DNA nutzen, um die angrenzenden unbekannt Genomabschnitte der Wirts-DNA zu isolieren. (Balcells *et al.* 1991).

1.4.2. T-DNA vermittelte Insertionsmutagenese

Die Ausschaltung eines endogenen Gens durch die Integration von T-DNA am entsprechenden Locus wurde oft gezeigt (Feldman *et al.* 1989, Errampalli *et al.* 1991, Behringer und Medford 1992) und zur Genisolation durch *gene-tagging* genutzt. Mit dieser Methode wurden bereits zahlreiche Gene isoliert.

1.4.3. *En*-Transposon vermittelte Mutagenese

Transposons konnten via *Agrobacterium* in viele dikotyle Pflanzen eingebracht werden. (Fitzmaurice *et al.* 1992). Solche Transposons können an neue Genomorte springen und ihre Kopienzahl vermehren. Das Transposon selbst zeigt keinen Phänotyp, kann aber durch Integration in Gene (die T-DNAs) deren Funktion verändern und so von Wildtyp abweichende Phänotypen hervorbringen. (Peterson 1953, 1986, 1987, 1993).

Verlässt ein Transposon seinen Integrationsort (Excision) kann es direkte Sequenzwiederholungen (*Footprints*) zurücklassen. Die Länge dieser *Footprint*-Sequenzen ist von der Familie des Transposons abhängig. Für *En/Spm* -Elemente finden sich häufig +3 bp *Footprints*. Befindet sich diese in einem Exon, kann der offene Leserahmen eines Gens unterbrochen werden. Dies kann zum Funktionsverlust führen. (Walbot 1992).

Eine Transposon-induzierte Mutation kann auf zwei Wegen stabilisiert werden: durch Excision-*Footprints*, oder durch Auskreuzen des autonomen Transposons (Aarts *et al.* 1995).

1.5. Chloroplasten

Bereits 1883 wurde von Schimper eine Hypothese zum Ursprung der Chloroplasten aufgestellt. Er postulierte damals eine Aufnahme und „Domestizierung“ eines photosynthesebetreibenden Einzellers in eine Ureuzyte. Heutzutage wird die „Endosymbiontentheorie“ (Gray 1992; Whatley 1993), wonach die Plastiden als Nachkommen von einem cyanobakteriellen Endosymbionten interpretiert wurden, allgemein anerkannt.

1.5.1. Plastidengenom

Die Folgen der Endosymbiose sind gekennzeichnet durch eine zum Teil drastische Reduzierung des Plastidengenoms und den Transfer genetischer Information in den Zellkern der Pflanzelle. Die Sequenzierung von Chloroplastengenomen (Ohyama *et al.* 1988) zeigte beträchtliche Ähnlichkeiten in Bezug auf die Struktur und Größe und auch die schon zuvor angenommene begrenzte Kapazität der Plastiden-DNA (bis zu 120 Proteine). Das Chloroplastengenom von *Arabidopsis thaliana* enthält etwa 90 Gene. In Gegensatz dazu enthalten Chloroplasten mehrere Tausend Proteine (Pesaresi *et al.* 2001), die fast ausschließlich kernkodiert sind. Die Expression der Kerngene, die für Chloroplastenproteine kodieren, wie auch die enge regulatorische Verschmelzung beider Genome unterliegen einer komplexen (von Licht u.a. Faktoren gesteuerten) Regulation (Mayfield *et al.* 1995; Link 1996).

1.5.2. Proteintransfer

Die kernkodierten Chloroplastenproteine enthalten N-terminale „Transitpeptid“-Aminosäuresequenzen, die den translationalen Import in die Plastiden ermöglichen (Cohen *et al.* 1995; Schnell 1995). Aufgrund der Struktur lassen sich die Transitpeptide in zwei Klassen unterteilen - einfache und zusammengesetzte Transitpeptide. Einfache Transitpeptide enthalten lediglich das Transportsignal für den Transport über die Hüllmembran der Chloroplasten in das Stroma. Proteine der Thylakoidmembran bzw. des -Lumens, weisen zusätzlich thylakoiddirigierende Sequenzen auf. Zusammengesetzte Transitpeptide bestehen aus einem stromadirigierenden und einem thylakoiddirigierenden Transportsignal. Nach dem Transport der Vorläuferproteine werden die Transitpeptide ganz oder teilweise abgespalten (Hagemann *et al.* 1986, James *et al.* 1989, Michl *et al.* 1994, Nielsen *et al.* 1994). Anhand einer systematischen Transitpeptidsequenz-Analyse wurde die Zahl der von Chloroplasten

importierten Proteine in *A. thaliana* auf etwa 3000 abgeschätzt (Abdallah *et al.* 2000; Pesaresi *et al.* 2001).

1.5.2.1. Proteintransfer über die Chloroplasten-Membranen

An dem Transport der Vorläuferproteine über oder in die Membran sind Translokase-Komplexe beteiligt. In der Hüllmembran der Chloroplasten wird der Transfer von TOC- und TIC-Komplexen geregelt (TOC = *Translocon at the Outer envelope of Chloroplasts*; TIC = *Translocon at the Inner envelope of Chloroplasts*). Im Stroma wird die stromadirigierende Sequenz durch die stromale Prozessierungspeptidase (SSP) abgespalten. Für den Weitertransport von Vorläuferproteinen in die Thylakoidmembran bzw. ins Thylakoidlumen sind bislang vier Transportwege identifiziert: Sec-abhängiger, Δ pH/TAT-abhängiger, SRP-abhängiger und spontaner Weg.

1.5.2.2. Sec- abhängiger Proteintransfer

An dem Sec-abhängigen Weg sind ein freier, stromaler Faktor - cpSecA und mehrere membrangebundene Proteine (u.a. cpSecY, cpSecE) beteiligt (Berghöfer *et al.* 1995; Laidler *et al.* 1995; Berghöfer und Klösigen 1996; Schuenemann *et al.* 1999). Diese Faktoren weisen Homologien zu den Bestandteilen des bakteriellen Sec-Systems auf. Als Transportsubstrate dieses Transportweges wurden beispielsweise Plastocyanin, die 33 kDa Untereinheit des Sauerstoff-entwickelnder Komplexes (OEC: *Oxygen Evolving Complex*) und PsaF identifiziert (Hulford *et al.* 1994; Karnachov *et al.* 1994; Robinson *et al.* 1994). Für den SecA-Transport wird ATP benötigt. Ein Protonengradient über der Thylakoidmembran ist für den Transportweg zwar nicht notwendig, jedoch förderlich (Mant *et al.* 1995).

1.5.2.3. Δ pH/TAT-abhängige Proteintransfer

Die Proteinkomponenten des pflanzlichen Δ pH/TAT-abhängigen Transportweg weisen Homologie zum bakteriellen TAT-System auf. Bei *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Proteine TatA, TatB, TatC und TatE für ein funktionelles TAT-Transportsystem notwendig sind. TatD dagegen, obwohl es in dem bakteriellen *tat*-Operon (*tatA*, *tatB*, *tatC*, *tatD*) liegt, wird für einen Proteintransport nicht benötigt (Sargent *et al.* 1998; Robinson 2000). Davon ausgehend konnten als homologe Bestandteile zum bakteriellen System in Pflanzen folgende

Genprodukte identifiziert werden: Tha4 (Homolog von TatA; Mori *et al.* 1999; Walker *et al.* 1999), Hcf106 (Homolog von TatB; Barkan *et al.* 1986; Settles *et al.* 1997) und cpTatC (Homolog von TatC; Mori *et al.* 2001).

Für den Transport von Proteinen über den ΔpH /TAT-Weg wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran benötigt (Cline *et al.* 1992; Klösgen *et al.* 1992). Eine Besonderheit dieses Transportweges ist die Fähigkeit zur Translokation gefalteter Proteine über die Membran (Santini *et al.* 2001; Marques *et al.* 2003, 2004).

1.5.2.4. SRP-abhängiger Proteintransfer

An dem SRP-abhängigen Weg sind die stromale Faktoren cpSRP54 und cpSRP43 (Schuenemann *et al.* 1998) und das Alb3-Protein (homolog zu bakteriellen YidC; Moore *et al.* 2000) beteiligt. Für den Transport der Vorläuferproteine über der Thylakoidmembran werden GTP und ein Protonengradient benötigt. Als Transportsubstrat wurden u.a. LHCP und CP24 identifiziert.

1.5.2.5. Der spontane Proteintransfer

Proteine, deren Transport auf dem spontanen Transportweg erfolgt, benötigen weder stromale Faktoren noch zusätzliche Energieäquivalente. Ebenso wird eine Beteiligung von Membran assoziierten Komplexen ausgeschlossen (Robinson *et al.* 1996). Auf diesem Weg wird beispielsweise die CF0II Untereinheit der ATPase, PsbW, PsbX und PsaK in die Thylakoidmembran integriert (Michl *et al.* 1994; Lorkovic *et al.* 1995; Kim *et al.* 1996; Mant *et al.* 2001).

1.6. Photosynthese

Die Photosynthese ist eine photochemische Reaktion, mit der Organismen Lichtenergie in chemische Energie umwandeln. Sie verschafft photosynthetischen Organismen eine, von organischen Stoffen unabhängige, Energiequelle (Autotrophie).

Bei höheren Pflanzen verläuft die Photosynthese in den Chloroplasten. Je nach Entwicklungszustand kann eine grüne Zelle bis zu fünfzig Chloroplasten aufweisen. An der Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie sind zwei eng aufeinander abgestimmte

Prozesse beteiligt. Diese werden als Licht-(photochemische-) und Dunkel-(enzymatische-) Reaktionen bezeichnet.

1.6.1. Photochemische Reaktionen

Pflanzen sind zur oxidativen Photosynthese befähigt und können Wasser als Elektronen- und Protonen-Quelle, unter Freisetzung von molekularem Sauerstoff, für die Photosynthese zu nutzen. Hierbei werden die von Pigmentkomplexen des Photosystems II absorbierten Photonen über eine resonanzfreie Energieübertragung (Exzitronentransfer) zum Reaktionszentrum (P_{680}) geleitet (Pullerits and Sundström; 1996). Das Standard-Redoxpotential des „Fallen“-Chlorophylls (Chlorophyll a - Pheophytin-Komplexes) wird erhöht und bedingt die Übertragung eines Elektrons (e^-) auf Ubichinon A. Die entstandene Elektronenlücke wird durch einen direkt mit dem Reaktionszentrum assoziierten wasserspaltenden Komplex (Mangan-Cluster) aufgefüllt (Ghanotakis and Yocum 1990; Debus 1992; Yachandra *et al.* 1996). Aus der Wasserspaltung stammende Protonen werden in das Lumen der Thylakoide abgegeben. Das vom Ubichinon A aufgenommene Elektron wird entlang eines fallenden Redoxpotentials über Ubichinon B, Plastochinon, Eisen-Schwefel-Cluster, dem Cytochrom b_6/f -Komplex und über Plastocyanin zum Photosystem I transportiert (Blankenship und Prince 1985), um das infolge von Lichtanregung oxidierte Photosystem I zu reduzieren (Abb. 1-1). An dieser e^- -Transportkette ist die Übertragung weiterer Protonen aus dem Chloroplasten-Stroma in das Lumen der Thylakoide gekoppelt.

Anschließend werden die Elektronen von Photosystem I über Eisen-Schwefel-Cluster, Ferredoxin und die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase auf NADPH übertragen (Karplus *et al.* 1991).

Der erzeugte Protonengradient zwischen dem Chloroplasten-Stroma (~pH 8) und dem Thylakoid-Lumen (~pH 5) wird zur ATP-Synthese durch den ATP-Synthase-Komplex genutzt (Mitchell 1979; Anron 1984; Boyer 1997; Noji *et al.* 1997; Junge and Engelbrecht 1997).

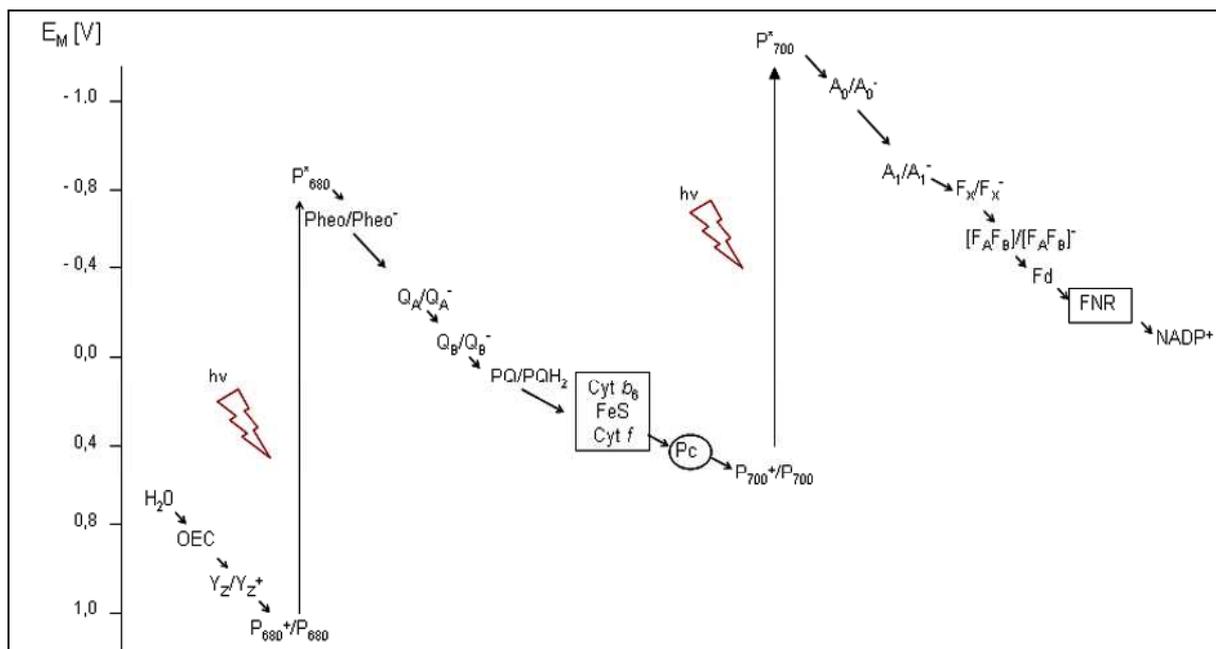


Abbildung 1-1: Z-Schema der Photosynthese.

Ein Modell des photosynthetischen Elektronentransports in den Chloroplasten. Die am Elektronentransfer beteiligte Kofaktoren sind nach ihrem Redoxpotenzial angeordnet. Dargestellt sind OEC: Der Sauerstoff-produzierende Apparat (*oxygen evolving system*); Y_z : redox-aktives Tyrosin; P_{680} : Chlorophyll a-Dimer des PSII-Reaktionszentrums; Pheo: Mg-freies Chlorophyll a - Phäophytin a; Q_A : Quencher A (Ubichinon A); Q_B : Quencher B (Ubichinon B); PQ: Plastochinon / PQH_2 : Plastotydochinon; Cyt b_6 ; FeS: $[Fe_2S_2]$ -Eisen-Schwefel-Cluster des Rieske-Proteins; Cyt f ; Pc: Plastocyanin; P_{700} : Chlorophyll a-Dimer des PSI-Reaktionszentrums; A_0 : primäre Elektronenakzeptor des PSI (das dritte Chl a-Paar des Elektronentransfersystems); A_1 : sekundäre Elektronenakzeptor des PSI (Phylochinon-Elektronenakzeptor); Fx: durch PsaA und PsaB gebundenes $[Fe_4S_4]$ -Cluster; ein intermediärer Elektronenakzeptor des PSI; $[F_A F_B]$: durch PsaC gebundene $[Fe_4S_4]$ -Cluster, terminale Elektronenakzeptoren des PSI; Fd: Ferredoxin; FNR: Ferredoxin-NADP⁺Oxidoreduktase.

1.6.2. Chlorophyll a – Fluoreszenz

Ein Teil der absorbierten Lichtenergie wird in Form von Wärme, Phosphoreszenz und Fluoreszenz abgegeben. Die Intensität der Chlorophyll-Fluoreszenz vergrößert sich, wenn die Energie nicht für den Elektronentransport aufgewendet wird. Eine Verringerung der Chlorophyll-Fluoreszenz kann hingegen beobachtet werden, wenn die Effizienz der Umwandlung in chemische Energie erhöht bzw. die Antennengröße verringert ist, oder wenn eine, nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ) erfolgt.

1.6.2.1. Photochemische und nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung.

Eine Verringerung des Fluoreszenzsignals wird als Fluoreszenzlöschung (Quenching) bezeichnet. Grundsätzlich lässt sich die Chlorophyll-Fluoreszenzlöschung in eine photochemische und eine nicht-photochemische Komponente unterteilen.

Die photochemische Chlorophyll-Fluoreszenzlöschung, qP, ist ein Maß für den Zustand der Elektronentransportkette (Büchel und Wilhelm, 1993). Bei vollständig oxidierten Kofaktor

Q_A d.h. wenn alle P_{680} -Reaktionszentren „offen sind“, ist das Fluoreszenzsignal minimal und $qP=1$. Während vollständiger Reduktion von Q_A , d.h. bei geschlossenen P_{680} -Reaktionszentren, ist das Fluoreszenzsignal maximal und $qP=0$.

Die nicht-photochemische Chlorophyll-Fluoreszenzlöschung (NPQ: *Non-Photochemical Quenching*) ist ein Mechanismus zur Eliminierung überschüssiger Anregungsenergie und ist von dem Redoxzustand des Kofaktors Q_A weitgehend unabhängig. Mit NPQ verbundene Prozesse haben keinen direkten Einfluss auf die Fluoreszenz, aber sie beeinflussen Prozesse die um die Anregungsenergie der Chlorophyll-Moleküle konkurrieren (Ting und Owens, 1993).

Als Bestandteile der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung (NPQ) werden drei Grundprozesse mit signifikant unterschiedlichen Relaxationszeiten unterschieden (Abb. 1-2., Müller *et al.* 2001).

Die *high-energy-state* Löschung (qE) ist die Hauptkomponente von NPQ. Sie dient der thermischen Dissipation der Anregungsenergie in den Photosystem II-Antennen und besitzt eine Relaxationszeit von 1-4 min. Bei einer Erniedrigung des pH-Wertes im Thylakoidlumen auf etwa $pH=5,8$ wird die Violaxanthindeepoxidase und damit der Xanthophyllzyklus, Zeaxanthin-Synthese und schließlich eine energielöschende Aggregation der Lichtsammelkomplexe des Photosystems II (LHCII-Antennen: *Light-Harvesting Complex*) aktiviert (Horton *et al.* 1996). Die überschüssige Anregungsenergie bzw. der Elektronendruck auf P_{680} verringert sich. Bei diesem Prozess wird das Protein PsbS infolge des niedrigen pH-Wertes auf der lumenalen Seite protoniert. Es erfährt eine Konformationsänderung und induziert NPQ-Mechanismen (Li *et al.* 2000, 2002).

Eine weitere Komponente der nicht-photochemischen Chlorophyll-Fluoreszenzlöschung stellt die *state transition* (qT) dar. Die Relaxationszeit von qT beträgt etwa 10-15 min. Der Redoxzustand des Plastochinon-Pools wird über Q_0 -Seite des Cytochrom b_6/f -Komplexes registriert und führt zur Aktivierung einer Kinase und damit zur Phosphorylierung der am Photosystem II (PSII) gebundener LHCII-Antennen. Die reversibel phosphorylierten Antennen dissoziieren von PSII-Komplex und assoziieren mit PSI (*state 1* -> *2*). Der Absorptionsquerschnitt von PSII und damit auch die Chlorophyll-Fluoreszenz verringern sich. Eine Umkehrung der *state transition* (*state 2* -> *1*) findet bei reduziertem Plastochinon-Pool. Die längste Relaxationszeit (0,5-1 h und länger) charakterisiert die photoinhibitorische Fluoreszenzlöschung (qI). Eine lang anhaltende Bestrahlung mit hohen Lichtintensitäten (über 1000 μE) bewirkt eine Schädigung des PSII-Komplexes am D1/D2-Dimer. Eine

Wiederherstellung der funktionellen Einheit erfordert eine Neusynthese und Reorganisation in dem PSII-Komplex.

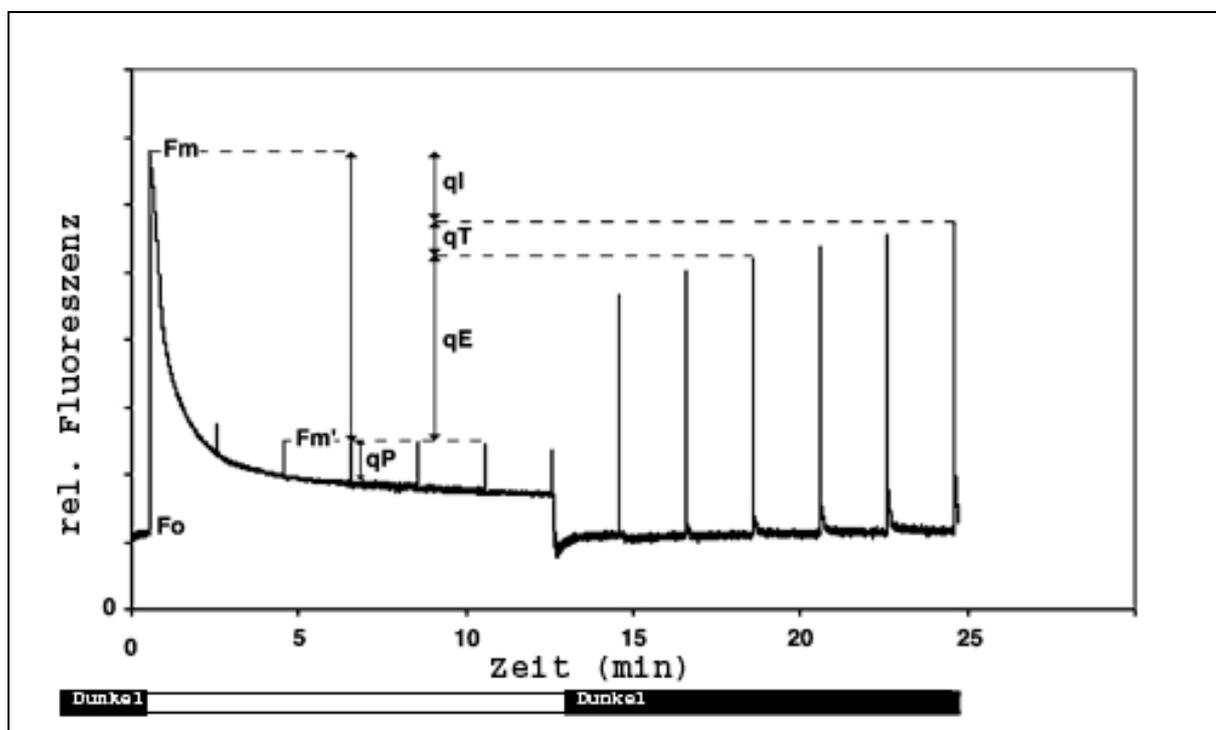


Abbildung 1-2: Eine PAM-Messung der Chlorophyllfluoreszenz an einem *Arabidopsis thaliana* Blatt. Mittels eines schwachen Messlicht (1-10 μE) wird die Minimal-Fluoreszenz aufgenommen (F_0). Mit einem saturierendem Blitz (etwa 3000 μE) wird die Lichtreaktion der Photosynthese gesättigt und die Fluoreszenz erreicht ein Maximum (F_M). Bei einer Illumination mit einem moderaten Übermaß an aktinischen Licht - etwa 750 μE (weiße Balken unter der Zeitachse; Wachstumslicht hat 130 μE), eine Kombination aus qP und NPQ löscht die Fluoreszenzausbeute. NPQ ($qE+qT+qI$) kann als Differenz zwischen F_M und der gemessenen maximalen Fluoreszenz nach einem saturierenden Lichtimpuls während Illumination (F_M') betrachtet werden. Nach dem Ausschalten des aktinischen Lichts erfolgt die Erholung von F_M' bereits innerhalb weniger Minuten. Sie reflektiert die Relaxion von qE als eine Komponente von NPQ . (Modifizierte Abbildung aus Müller *et al.* 2001).

1.6.2.2. Pulsamplituden modulierte Chlorophyll a - Fluoreszenzmessung bei Raumtemperatur

Von Schreiber *et al.* (1986) wurde eine Chlorophyll-Fluoreszenzmessung mittels „Puls Amplituden Modulation“ (PAM) entwickelt. Anwendung dieser Methode ermöglicht Aussagen über die Quantenausbeute (Φ_{II}) am Photosystem II. Die Quantenausbeute ist nach Genty *et al.* (1989) mit folgender Formel quantifizierbar: $\Phi_{II} = (F_M' - F_S) / F_M' = \Delta F / F_M'$. Die effektive Quantenausbeute (Φ_{II}) beschreibt den Quotienten aus der maximalen Fluoreszenz lichtadaptierter Pflanzen (F_M') abzüglich einer schwachen Hintergrundfluoreszenz (F_S) und der maximalen Fluoreszenz (F_M'). Diese, auf die maximale Fluoreszenz dunkeladaptierter Pflanzen (F_M) normierte Fluoreszenz der lichtadaptierter Pflanzen ($F_M' - F_S$) stellt ein gutes Maß für die Quantenausbeute der Gesamtphotosynthese (Björkman und Demming 1987) dar.

Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenzlöschung ermöglicht auch weitere, mehr differenzierte Aussagen zum physiologischen Zustand der Photosynthese. Nach Schreiber *et al.* (1986) reflektiert $qP = (F_M' - F_S) / (F_M' - F_0')$ den Oxidationszustand des Plastochinon-Pools und nach Park *et al.* (1996) ist der Redoxzustand des Plastochinon-Pools anschaulicher dargestellt mit $1 - qP$ (*excitation pressure on PSII*). Unter Lichtsättigung der Photosynthese, können Pflanzen die überschüssige Anregungsenergie dissipieren. Diese Induktion der Energiedissipation kann als nicht-photochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz gemessen werden. Eine unterschiedliche Berechnung des Effekts führt zu einer variierten Terminologie. So wird die nicht-photochemische Löschung nach Schreiber *et al.* (1986) und Genty *et al.* (1989) als $qN = 1 - (F_M' - F_0') / (F_M - F_0)$ bezeichnet.

1.6.3. Enzymatische Reaktionen der Photosynthese

Unter Verbrauch von Kohlendioxid, ATP und Reduktionsäquivalenten werden in einem zyklischen Prozess (Calvinzyklus) Kohlenhydrate synthetisiert (Bassham 1965).

Zunächst wird Kohlendioxid an einen aktivierten C₅-Zucker (Ribulose-1,5-bisphosphat) gebunden, wobei zwei C₃-Kohlenhydrate (3-Phosphoglycerate) entstehen. Diese Reaktion wird von der Ribulose-1,6-bisphosphat-carboxylase-oxidase (RubisCO) katalysiert (Andrews und Lorimer 1987).

Im weiteren Verlauf erfolgt unter Verbrauch von ATP und NADPH, die Synthese von Triosephosphaten, Fructose-1,6-bisphosphat, und die Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat. Ein Teil der Triosephosphate wird aus den Chloroplasten exportiert und dient zur Energieversorgung der Zelle (Flügge und Heldt 1991).

1.6.5. Kopplungselemente der Photosynthese-Reaktionen

Die Licht- und Dunkelreaktionen sind über die Kopplungselemente ATP/ADP und NADPH/NADP⁺ eng miteinander verbunden. Diese Kopplung erfordert die Abstimmung beider Prozesse für eine effiziente Umwandlung von Lichtenergie in biochemische Energie.

1.7. Cytochrom b_6/f -Komplex

1.7.1. Die Funktion des Cytochrom b_6/f -Komplexes

Das Cytochrom b_6/f -Komplex liegt frei verteilt über Grana und Stroma in der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Er übernimmt eine zentrale Stellung in der photochemischen Elektronentransportkette. Zum einen, als Plastochinol-Plastocyanin-Oxidoreduktase, verbindet es den linearen Elektronentransport zwischen Photosystem II und Photosystem I und zum anderen ist dieser Komplex am zyklischen Elektronentransport beteiligt, und bewerkstelligt Protonentranslokation von Stroma in den Lumen der Thylakoide. Zudem hat der Cytochrom b_6/f -Komplex eine regulatorische Funktion, als Sensor für den Redoxzustand des PQ-Pools (Allen. *et al.* 1995; Allen 2004) und als Signalgeber in Chloroplasten und Cyanobakterien (Keren und Ohad 1999; Murakami, und Fujita, 1993). Es wird angenommen, dass über den Cytochrom b_6/f -Komplex (Untereinheit IV; PetO) auch die Aktivierung der LHCII-Kinase und somit die reversible Phosphorylierung der Lichtsammelkomplexe während der *state Transitions* gesteuert wird (Zito *et al.* 1999; Vener *et al.* 1997; Hamel *et al.* 2000).

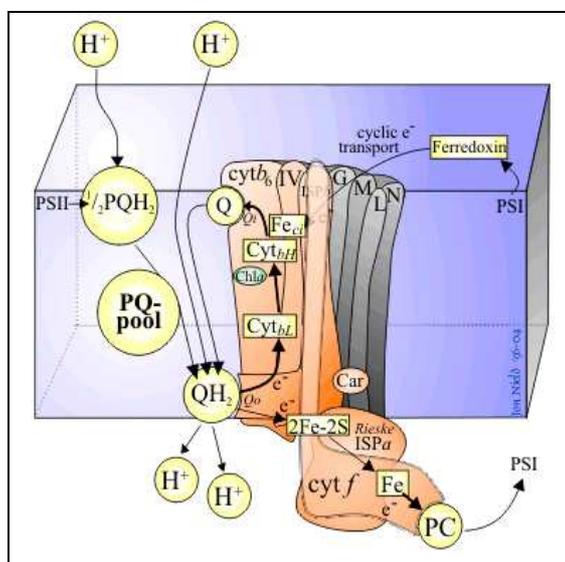


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Cytochrom b_6/f -Komplexes (links).

Der Komplex besteht aus den vier großen Untereinheiten (rötlich) Cyt b_6 , Untereinheit IV, Rieske und Cytochrom f sowie mehreren kleinen Untereinheiten (grau): petG, N, M, L. Aus dem Photosystem II (PSII) stammende Elektronen werden zunächst auf die, am PSII gebundenen Plastochinolmoleküle abgegeben. Zusätzlich nimmt Plastochinol zwei Protonen aus der Stroma auf und diffundiert in der Thylakoidmembran als Plastohydrochinon (PQH₂). Nach Anbindung des PQH₂ am Cytochrom b_6/f - Komplex werden die Protonen in das Thylakoidlumen abgegeben, das Plastochinol reoxidiert und die Elektronen auf direktem und indirektem Weg über Rieske und Cytochrom f auf das Plastocyanin (PC) geleitet. Die Abbildung stammt aus <http://www.bio.ic.ac.uk/research/nield/psIIimages/cytb6f.html>

1.7.2. Aufbau des Cytochrom b_6/f -Komplexes

Der Cytochrom b_6/f -Komplex (Abb. 1-3) besteht aus vier großen Untereinheiten: Cyt f ; Cyt b_6 , Untereinheit IV und dem Rieske -Protein (Kallas 1994). Die ersten drei Proteine sind von

den plastidären Genen *petA*, *petB* und *petD* kodiert. Das Rieske Protein (*PetC*) ist hingegen kernkodiert. Weiterhin sind mehrere kleine Untereinheiten, die Genprodukte der plastidär kodierten *petG*-, *petN*-, *petL*- und der kernkodierten *PetM*- und *PetO*-Genen integrale Thylakoidmembranproteine und mit dem Komplex assoziiert.

Die 33 kDa große Cyt *f*-Untereinheit besteht aus einer Transmembranhelix und einer großen luminalen Domäne. Sie enthält eine Häm-c prosthetische Gruppe und katalysiert den Elektronentransfer von [Fe₂S₂]-Zentrum des Rieske-Proteins auf das Cu-Zentrum des Plastocyanins (Gray 1992; Kuras und Wallman 1994). Die drei anderen großen Untereinheiten, Cytochrom *b*₆ (23 kDa; zwei Häm -b Gruppen; 1xChl a), die Untereinheit IV (17 kDa, keine prosthetische Gruppe) und das Rieske-Protein (20 kDa; Eisen-Schwefel-Zentrum) sind an der Anbindung von Plastochinol an den Komplex beteiligt (Cramer *et al.* 1996; Kuras und Wollman 1994; Budziszewski *et al.* 2001).

1.8. Photosystem I-Komplex

1.8.1. Die Funktion des Photosystem I

Aufgrund der enzymatischen Funktion kann man das Photosystem I (PSI) als lichtgetriebene Plastocyanin/(Cytochrom *c*₆) - Ferredoxin-Oxidoreduktase ansehen. Die Energieübertragung kann in drei Teile zerlegt werden: Absorption des Photons, Transfer der Anregungsenergie zum Reaktionszentrum (P₇₀₀), primäre Ladungstrennung und Stabilisierung der Ladungstrennung durch eine Reihe von weiteren Elektronentransferschritten. Photosystem I ist ein, in den äußeren granalen und stromalen Lamellen der Thylakoidmembran liegender Multiproteinkomplex. In Prokaryoten und Eukaryoten ist die Organisation und Struktur des PSI ähnlich. Der Konservierungsgrad lässt sich am besten am Arrangement der Chlorophyll a Moleküle im PSI-Kern veranschaulichen. So ist die Anzahl der Chlorophyll a (96 Chl a in *S. elongatus* im Vergleich zu 93 Chl a in *P. sativum*), ihre Position in den Komplex-Untereinheiten und ihre Orientierung zueinander für Cyanobakterien und höheren Pflanzen nahezu identisch (Jordan *et al.* 2001; Ben-Shem *et al.* 2003).

1.8.2. Aufbau des Photosystem I

In *Arabidopsis thaliana* besteht der PSI-Komplex (Abb. 1-4) aus 18 Untereinheiten. Plastidär kodierte Genprodukte sind die Untereinheiten *psaA*, *psaB*, *psaC*, *psaI-J*. Die kernkodierten

Genprodukte sind die Untereinheiten *PsaD* bis *PsaH* und *PsaK-O*. Alle genannten Untereinheiten wurden über "Funktionsverlust-Analysen" näher charakterisiert (Leister und Schneider 2003). Eine erhebliche Wachstumsreduktion wurde zum Einen in den Pflanzen mit ausgeschalteten, e^- transferierenden Untereinheiten beobachtet, zum Anderen in den *psaf* (wegen Stabilisierung der Plastocyanin-Anbindung), *psad* und *psae* Mutanten (wegen Ferredoxin-Anbindung).

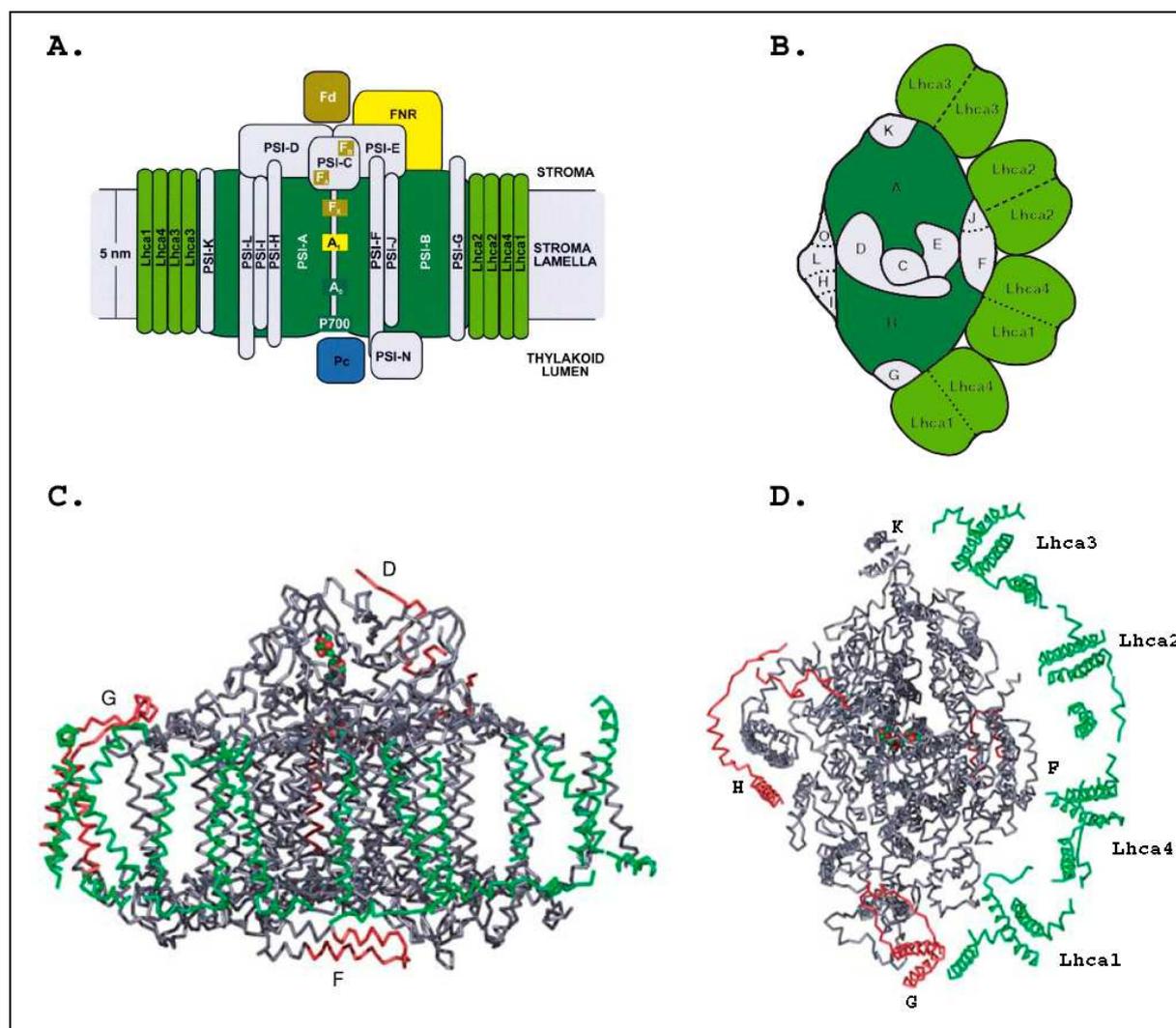


Abbildung 1-4: Modelle des Photosystem I-Komplexes in höheren Pflanzen. A. Eine schematische Darstellung des PSI-Komplexes. Seitenansicht nach Scheller *et al.* (2001). Die in Angiospermen nicht mehr existierende PsaM-Untereinheit wurde hier nicht dargestellt. B. PSI in Aufsicht auf die Thylakoidmembran (Jensen *et al.* 2003). Die Untereinheit PsaN liegt auf der lumenalen Seite, und ist nicht sichtbar in diesem Modell. C. und D. Ein Strukturmodell des PSI mit einer Auflösung von 4,4 Å (Ben-Shem *et al.* 2003). Dargestellt ist das C_α -Rückrad der Proteine. Die in Cyanobakterien nicht vorkommenden Elemente wurden rot dargestellt. Die konservierten Elemente sind grau dargestellt. Die drei $[Fe_4S_4]$ -Cluster wurden als rote und grüne Kugeln dargestellt. In C. wurden u.a. die *Helix-Loop-Helix* Domäne von PsaF und das N-terminale Ende von PsaD hervorgehoben.

Die Kofaktoren für den Elektronentransfer liegen gebunden in den Untereinheiten PsaA, PsaB, und PsaC. Die PsaA und PsaB-Proteine sind homolog zueinander und bilden ein

Heterodimer. Dieser Komplex bildet den primären Elektronendonator (P₇₀₀; Chl Dimer), mit dem Elektronenakzeptoren A₀ (Chl a); A₁ (Phyllochinon;) und dem F_x-[Fe₄S₄]-Cluster (Jordan *et al.* 2001; Scheller *et al.* 2001). Die übrigen, terminalen Elektronenakzeptoren F_A und F_B sind an der PsaC-Untereinheit gebunden. Ein Funktionsverlust in den PsaG, H, K, L, N und PsaO Untereinheiten führt demnach zu photoautotrophen und fertilen Mutanten.

Die vier weiteren 4 Untereinheiten des PSI-Komplexes, die Genprodukte kernkodierter *Lhca1* bis *Lhca4* Genprodukte binden Chlorophyll a und Chlorophyll b Moleküle und übernehmen die Funktion der Antennenkomplexe. Die Stöchiometrie der Antennenkomplexe ist veränderbar und abhängig von Lichtintensitäten, Entwicklungszustand der Pflanze und weiteren Faktoren (Bailey und Walters 2001).

1.8.3. Unterschiede im Aufbau des prokaryotischen und eukaryotischen Photosystem I

Der prokaryotische Komplex ist deutlich kleiner als der pflanzliche PSI-Komplex. Er enthält eine weitere, für Cyanobakterien spezifische Untereinheit (PsaX). Im Gegensatz dazu sind die Untereinheiten PsaG, H, N und O nur den Algen und höheren Pflanzen vorbehalten (Janson *et al.* 1996). Die Untereinheit PsaM gibt es nicht mehr bei Angiospermen. In Cyanobakterien wurde eine PsaL vermittelte Trimerisierung des Komplexes beobachtet. Das pflanzliche PSI wurde sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* nur als Monomer gefunden (Jordan *et al.* 2001; Ben-Shem *et al.* 2003).

1.9. Plastocyanin und Cytochrom c_x

1.9.1. Plastocyanin

Die Beteiligung von Kupfer an der Photosynthese wurde bereits 1939 vorgeschlagen (Greene *et al.* 1939; Neish 1939). Jedoch erst 1960 (Kato 1960a) wurde die Existenz eines löslichen Proteins festgestellt, das ohne Oxidase-Aktivität die Fähigkeit zur reversiblen Oxidation und Reduktion besitzt. In *Chlorella ellipsoidea* konnte gezeigt werden, dass je ein Molekül dieses Proteins pro 300 Chlorophyll-Moleküle bzw. pro photosynthetische Einheit vorkommt. Es wurde bei Licht schnell reduziert und besaß ein Redoxpotenzial von 370 mV. 1961 wurde es von Kato und Takamiya als Plastocyanin benannt. Ein Jahr später wurde das Protein auch aus höheren Pflanzen isoliert und charakterisiert (Kato *et al.* 1962). Als ein unmittelbarer

Elektronendonator zum P₇₀₀ wurde das Plastocyanin von Davenport (1965) vorgeschlagen und von Hippler *et al.* (1989) beschrieben.

1.9.2. Cytochrom *c*_x

Das Cytochrom *c*₆ wurde 1935 von Yakushiji in der Rotalge *Porphyra tenera* entdeckt und zunächst, wegen seines Absorptionsmaximum als Cyt *c*₅₅₂ bzw. *c*₅₅₃ benannt. Katoh (1960b; 1967) kristallisierte das Protein, bestimmte das Molekulargewicht (10 kDa) und das Redoxpotenzial (355 mV). Vor allem aber konnte er feststellen, dass in der Elektronentransportkette der Grünalge *Euglena* das Protein Cytochrom *c*₆ einen vollwertigen Ersatz für Plastocyanin darstellt.

Lange Zeit wurde das Cyt *c*₆ als ein Grünalgen-Äquivalent zum Cytochrom *f* höherer Pflanzen interpretiert. Erst Wood (1977, 1978) konnte zeigen, dass zum Einem sich das lösliche Cyt *c*₆ von dem membrangebundenen Cyt *f* unterscheidet und zum Anderen die Funktion eines direkten Elektronendonors zum P₇₀₀ (in Cyanobakterien und Grünalgen) übernehmen kann. In Organismen, die beide Proteine enthalten, ist die Abundanz dieser Proteine abhängig von der Kupferkonzentration im Medium reziprok reguliert (Bohner und Böger 1978). Es wurde postuliert, dass im Laufe der Evolution von Cyanobakterien zum höheren Pflanzen und unter Veränderung der erdatmosphärischen Bedingung die Funktion des Cytochrom *c*₆ von Plastocyanin ersetzt wurde. Daher nutzen nur noch Algen und Cyanobakterien alternativ beide Proteine als Elektronendonator zum PSI (Malkin und Niyogi 2000; De la Rosa *et al.* 2002) Weitere Studien zeigten jedoch, dass ein Cytochrom *c*₆-ähnliches Protein in höheren Pflanzen existiert (Wastl *et al.* 2002) und im Thylakoidlumen der *Arabidopsis thaliana* das Plastocyanin in photosynthetischen Elektronentransport ersetzen kann (Gupta *et al.* 2002).

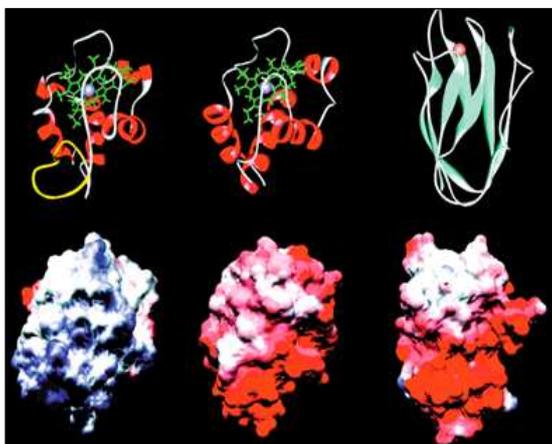


Abbildung 1-5: Vergleich der Tertiärstrukturstruktur und der Oberfläche von Cyt *c*₆ aus *A. thaliana* (links), Cyt *c*₆ aus *Monoraphidium* (in der Mitte) und Plastocyanin aus *A. thaliana* (rechts).

Die Hämgruppen in beiden Cytochrom *c*₆ - Isoformen wurden Grün mit zentralen Fe(III/II) dargestellt. Das Kupfer-Atom des Plastocyanins ist als rote Kugel abgebildet. Das Cyt *c*₆-Isoform aus *A. thaliana* enthält eine, für Eukaryoten spezifische Aminosäuresequenz (gelb). Die negativ und positiv geladenen Regionen auf der Oberfläche der Proteine (berechnet für 40 mM Salzkonzentration und pH=7) sind rot bzw. blau abgebildet. (Abbildung aus Molina-Heredia *et al.* 2003)

Dieses Cytochrom c_6 -ähnliche Protein höherer Pflanzen beinhaltet einen zusätzlichen *Loop* (zusätzliche Schleife) aus 12 Aminosäuren. Weiterhin sind in dieser Sequenz zwei Cysteine enthalten, die untereinander eine Disulfidbrücke ausbilden könnten. Neben strukturellen Unterschieden liegt auch das Redoxpotenzial von dem *A. thaliana* Cyt c_6 - Homologen bei 140 mV, daher wesentlich niedriger als das von Plastocyanin (etwa 370 mV) oder von Cyt c_6 der Algen (358 mV) (Abb. 1-5; Molina-Heredia *et al.* 2003). Unter diesen Umständen ist eine Oxidation von Cyt f (etwa 365 mV) durch das *Arabidopsis* Cyt c_6 fraglich. Die Redox-Eigenschaften des Proteins sind jedoch von dem Vorhandensein der Schleife unabhängig (Wastl *et al.* 2004).

1.9.3. Plastocyanin als Elektronencarrier.

Plastocyanin ist ein kleines (etwa 10 kDa), lösliches und in Thylakoidlumen frei bewegliche Elektronencarrier zwischen dem Cytochrom b_6/f -Komplex und Photosystem I (Abb. 1-1). Daher kann die Rolle von Plastocyanin als analog zum Cytochrom c der Mitochondrien betrachtet werden. Plastocyanin gehört zu der großen Familie der "*blue copper*" Proteine. Das aktive Zentrum des Proteins liegt geschützt in einer hydrophoben Umgebung, in der ein $\text{Cu}^{(II)}$ -Atom von vier Liganden ($_{37}\text{His}$ - $_{84}\text{Cys}$ - $_{87}\text{His}$ - $_{92}\text{Met}$) koordiniert wird (Abb. 1-6A). Durch anti-parallel angeordnete β -Stränge bekommt die hochkonservierte Tertiärstruktur des Proteins eine globuläre Fass-Form (Abb. 1-5).

1.9.4. Die Reduktion des Plastocyanins am Cytochrom b_6/f -Komplex

Die Reduktion des Plastocyanins erfolgt ausgehend von einer, in der Cyt f - Untereinheit kovalent gebundener [Häm- c / $\text{Fe}^{(III/II)}$] - Gruppe (Abb. 1-3). Von entscheidender Bedeutung für eine effektive Elektronenübertragung ist eine örtliche Nähe der aktiven Zentren zu einander. Für die Annäherung der beiden Edukte ist die Beschaffenheit der Proteinoberfläche wie auch das elektrostatische Feld der Moleküle entscheidend. Die Bindung des Cytochrom f und Plastocyanins zum [Cyt f -Pc]-Komplex erfolgt aufgrund der Anziehung der basischen Aminosäuren ($_{209}\text{Arg}$, $_{65}\text{Lys}$; $_{187}\text{Lys}$; $_{66}\text{Lys}$) des Cyt f und der saueren Aminosäureresten ($_{42}\text{Asp}$; $_{43}\text{Glu}$; $_{44}\text{Asp}$; $_{45}\text{Glu}$; $_{59}\text{Glu}$) des Plastocyanins, weiterhin sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der beiden Proteinen (Aminosäuren: 1;3;4;61-63; 156;160;161 des Cyt f und 12;35;36;40;83;85-90 des Plastocyanins) an der Stabilisierung der Bindung beteiligt (Abb. 1-6B; Pearson *et al.* 1996; De Rienzo *et al.* 2001; Musiani *et al.* 2005). Der

kürzeste Abstand zwischen beiden Proteinen beträgt 4,2 Å ($_{87}\text{His}^{\text{Pc}};_{1}\text{Try}^{\text{Cyt } f}$) (Abb. 1-6A), Die Angaben zum Abstand zwischen Cu und Fe bewegen sich, abhängig von der Bestimmungsart im Bereich zwischen 10,7 und 14 Å (Ubbink *et al.* 1998; Ullmann *et al.* 1997). Der Elektronenfluss dürfte daher über die Oberflächenladung der Proteine erfolgen (Musiani *et al.* 2005). Trotzdem verbleibt die Interaktion zwischen Cyt *f* und Plastocyanin sehr transient (als *simple collisions interactions*). Die Lebenszeit des e^- -übertragenden Komplexes beträgt etwa 100 μs (Ubbink, 2004). Die Reaktionsgeschwindigkeit folgt den Gesetzmäßigkeiten einer Reaktion erster Ordnung (Kannt *et al.* 1996; Modi *et al.* 1991).

1.9.5. Die Oxidation des Plastocyanins am Photosystem I

Die für diese Arbeit bedeutendsten Unterschiede im Aufbau der prokaryotischen und eukaryotischen PSI-Komplexe betreffen die Assoziation des Plastocyanins zum PS I.

Nur bei Algen und höheren Pflanzen stabilisiert eine N-terminale *Helix-Loop-Helix* Domäne der PsaF-Untereinheit (Abb. 1-4C) die Interaktion des Plastocyanins mit den luminalen Schleife der PsaA/B-Untereinheiten des PSI-Komplexes (Abb. 1-4A und 1-6C; Farah *et al.* 1995; Hippler *et al.* 1999; Haldrup *et al.* 2000). Sie sorgt für eine effiziente Bindung des Plastocyanins und eine Ausrichtung des Protein (und Cu) in einer Symmetrieachse zum P₇₀₀ und F_x-Gruppe. Beides resultiert in einer Reaktion zweiter Ordnung sowie in einer signifikant schnelleren Elektronenübertragung zum PSI im Vergleich zu Cyanobakterien (Hippler *et al.* 1996).

Wie schon für [Cyt *f*-Pc] Interaktionen beschrieben, ist auch für diese Interaktion die Beschaffenheit der Proteinoberfläche wie auch das elektrostatische Feld der Moleküle entscheidend für eine effektive Komplexbildung und Elektronenübertragung. Das gleiche saure Cluster des Plastocyanins, das auch an der Interaktionen mit Cyt *f* ($_{42}\text{Asp}$, $_{43}\text{Glu}$, $_{44}\text{Asp}$, $_{45}\text{Glu}$) beteiligt ist, interagiert mit dem basischen Cluster der PsaF-Untereinheit ($_{12}\text{Lys}$, $_{16}\text{Lys}$, $_{19}\text{Lys}$, $_{23}\text{Lys}$) (Hippler, 1996; Hope, 2000). Die hydrophobe Interaktion mit dem PsaA/PsaB-Dimer setzt jedoch einen vollständigen hydrophoben Bereich der Plastocyaninoberfläche voraus: zwischen $_{10}\text{Gly}$ und $_{90}\text{Ala}$ (bei Interaktion mit Cyt *f* sind es $_{87}\text{His}$ und $_{90}\text{Ala}$) (Haehnel, *et al.* 1994; Reichert *et al.* 1995). In *Arabidopsis thaliana* wurden die Folgen einer Defizienz von PsaF von Haldrup *et al.* 2000 beschrieben. Bei höheren Pflanzen ist die Untereinheit für das autotrophe Wachstum absolut notwendig. Im Gegensatz dazu waren die *Chlamydomonas reinhardtii* Δpsaf -Mutanten wildtypisch und wiesen keine Änderung der Elektronentransfer-Kinetik auf (Xu *et al.* 1994). Weiterhin scheint die in Cyanobakterien nicht vorhandene PsaN-

Untereinheit, die auf der Lumenseite liegt, ebenfalls notwendig für eine effiziente Interaktion zwischen Plastocyanin, PsaF und dem PsaA/PsaB-Dimer zu sein. In $\Delta psan$ -Mutanten wurde eine zweifache Abnahme in Elektronentransferrate beobachtet (Haldrup *et al.* 1999).

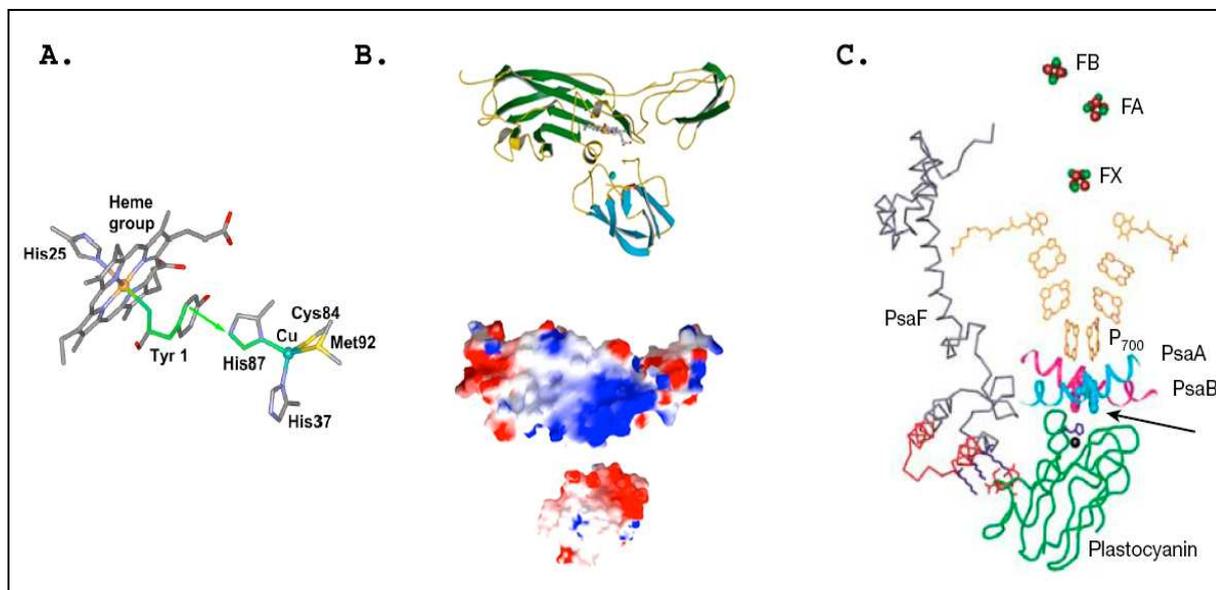


Abbildung 1-6: Interaktionen des Plastocyanins mit Cyt *f* und Photosystem I.

A. Schematische Darstellung des Elektronentransfers vom Eisen der Häm c-Gruppe (der Cyt *f*-Untereinheit) auf das Cu-Zentrum des Plastocyanins. B. Der Cyt *f*-Pc Komplex wurde als modelliertes Rückrad der Aminosäuresequenz dargestellt (grüne β -Faltblatt Stränge gehören zum Cyt *f*, blaue β -Faltblatt Stränge gehören zum Plastocyanin). Darunter wurde das Oberflächenpotenzial beider Partner separat dargestellt. Die Proteine sind um +/- 90° zu einander gedreht. In rot wurde eine negative und in blau positive Ladungsverteilung der Oberfläche dargestellt (modifiziert, aus Ben-Shem *et al.* 2003).

C. Die strukturelle Rekonstruktion eines Plastocyanin-PSI-Komplexes. Die Aminosäuren 18-47 der PsaF-Untereinheit (grau), die exklusiv in Eukaryoten vorkommen und eine *Helix-Loop-Helix* Domäne bilden, wurden in rot dargestellt. Ein Cluster aus vier negativ geladenen Aminosäuren (₄₂D₄₃E₄₄D₄₅E; in rot) auf der Oberfläche des Plastocyanins (grün) interagiert mit drei Lysin-Resten (blau) der PsaF Untereinheit. Hydrophobe, für die Interaktion notwendige Bereiche des PsaA/PsaB-Dimärs wurden in cyan und magenta dargestellt. An diesen sind die zwei, für den Elektronentransfer notwendige Tryptophane in Kugelform dargestellt. Das Cu-koordinierende Histidin ist in blau gezeigt.

1.10. Problemstellung

Der Arbeitsgruppe standen Mutanten für beide Plastocyanin-Gen Loci zur Verfügung. In beiden Fällen handelte es sich um Mutanten die mittels eines aktiven *En-1* Transposons getaggt wurden. Somatischen Reversionen des *En-1* Elements können jedoch die ursprüngliche Funktion des Gens wiederherstellen und die Ergebnisse physiologischer Analysen verfälschen. Die Stabilisierung der *pete1*-Mutante wurde bereits von C. Varotto und D. Leister (MPIZ Köln) durchgeführt. Zum Set der Mutanten gehörten aber auch Cytochrom *c_x*-defiziente, mittels T-DNA getaggte Linien, die von SIGnAL (*Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*) bezogen wurden.

Wichtigster Ansatzpunkt für diese Arbeit war die Stabilisierung der zweiten *pete*-Allele, die Herstellung einer Plastocyanin-defizienten Doppelmutante und eine molekularbiologische Charakterisierung der Cytochrom c_x -Mutanten.

Mittels dieser Mutanten sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Erfüllen die beiden Plastocyanin-Isoformen die gleiche Funktion bezüglich des Elektronentransports zum P_{700} ?
- Sind die Plastocyanin-Isoproteine die einzigen Elektronencarrier zwischen Cytochrom b_6/f -Komplex und Photosystem I?
- Welche Auswirkungen auf die Funktion und den Aufbau des Photosyntheseapparates hat die Abwesenheit der einzelnen und beider Plastocyanin-Isoproteine?
- Welche Auswirkungen auf die Regulation der Genexpression im Kern haben die Plastocyaninmutationen?

Im Hinblick auf kürzliche Publikationen zur Abundanz, Lokalisation und Funktion des Cytochrom c_6 -ähnlichen Proteins bei höheren Pflanzen von Gupta *et al.* (2002) bestand ein Bedarf zur Überprüfung folgender Aussagen:

- Ist das Cytochrom c_6 -ähnliche Protein bei *Arabidopsis thaliana* exprimiert?
- Ist das Genprodukt im Thylakoidlumen lokalisiert ?
- Transportiert das Genprodukt Elektronen zwischen dem Cytochrom b_6/f -Komplex und Photosystem I?

Im nahen Zusammenhang bestand außerdem die Frage ob das Cytochrom c_6 aus *Chlamydomonas reinhardtii* in, das Plastocyanin in *A. thaliana* funktionell ersetzen kann.

2. Ergebnisse

2.1. Charakterisierung der Plastocyanin-Mutanten

2.1.1. Die Plastocyanin-Gene aus *A. thaliana*

Höhere Pflanzen enthalten oft mehrere funktionelle Kopien hoch konservierter Plastocyanin-Genloci in ihren Genomen. In *A. thaliana* existieren zwei Loci für Plastocyanin: *PetE1* (AGI-Locus-Nummer: At1g76100) und *PetE2* (AGI-Locus-Nummer: At1g20340). Beide Gene liegen in einem Abstand von etwa 110,1 cM auf dem Chromosom I. Die Nukleotidsequenzen der Gene (Daten im Anhang), und ihre Peptidsequenzen, weisen hohe Homologie zueinander auf. Nach Abspaltung der Thylakoidlumen-dirigierenden Transitsequenz zeigen die *A. thaliana* *PetE*-Genprodukte eine Ähnlichkeit von 93% und eine Identität von 83%.

Biochemische Eigenschaften der *A. thaliana* *PetE* - Genprodukte wurden aus reifen Primärstrukturen der Proteine abgeleitet. So beträgt das geschätzte Molekulargewicht für *PetE1* 10,719 kDa und für *PetE2* 210,725 kDa. Die isoelektrischen Punkte liegen bei pI=4,36 für *PetE1* und pI=4,22 für *PetE2*.

Plastocyanin-Isoproteine höherer Pflanzen enthalten zwei saure Domänen (*southern patch* und *northern patch*) die an der Interaktion und Ausrichtung des Proteins an den Cyt *b₆/f*- und Photosystem I - Komplexen beteiligt sind (Abb. 2-1A, ausführliches Alignment im Anhang: Abb. 6-2). Bei dikotylen Pflanzen sind die Domänen (*southern patch*-₄₄DEDE und *northern patch*-₆₁EED) meist größer als bei den Monokotyledonen (₄₄DED und ₆₁EE).

<i>PetE1</i>	MAMEVLLGSD	DGSLAFVPS	FTVAKGEKIV	FKNNAGFP	PHN	VVFDEDEIPS	GVDASKI
<i>PetE2</i>	MAIEVLLGGG	DGSLAFIPND	FSIAKGEKIV	FKNNAGYP	PHN	VVFDEDEIPS	GVDVAKI
<i>S.o.</i>	--VEVLLGGD	DGSLAFVPS	FSVASGEEIV	FKNNAGFP	PHN	VVFDEDEIPS	GVDAAKI
<i>Syn.</i>	ANATVKMGSD	SGALVFEPST	VTIKAGEEVK	WVNNKLS	PHN	IVFDADGVPA	DT-AAKL
Kons.	..hpVhhGus	sGuLsF.Psp	holttGEclh	ahNNth.PHN		lVFDtDt1Pu	ss.suK1
<i>PetE1</i>	SMD E TALLNG	AGETYEVTLT	EPGSYGFY CA	PHQAGMVGK	LTVK		
<i>PetE2</i>	SMDE Q DLLNG	AGETYEVTLT	EPGTYSFY CA	PHQAGMVGK	VTVN		
<i>S.o.</i>	SMS E DLLNA	PGETYKVTTLT	EKGTYKFY CS	PHQAGMVGK	VTVN		
<i>Syn.</i>	SHKG--LLFA	AGESFTSTFT	EPGTYTY YCE	PHRGAGMVGK	VVVE		
Kons.	Shpt..LL.u	sGEoapsshT	E.GoYta Yct	PHpGAGMVGK	lsVp		

Abbildung 2-1A: Ein Vergleich der Primärstruktur der Plastocyanin-Proteine.

Unter Verwendung des ClustalW -Algorithmus wurden „reife“ Proteinsequenzen der Plastocyanine miteinander verglichen: *PetE1*, *PetE2* - aus *A. thaliana*, *S.o.*-Sequenz des Plastocyanins aus *Spinacia oleracea* (1ag6; NCBI; GI:3891757) und *Syn.*-Sequenz des Plastocyanin aus *Synechocystis Sp.*(1pcs; NCBI; GI:2781074). In der Konsensus-Sequenz (=:Kons.) sind die konservierten Aminosäuren groß geschrieben, mit kleinen Buchstaben und Zeichen wurden die Aminosäuren nach Eigenschaften beschrieben (o: alkoholisch; l: aliphatisch; .: beliebige; a: aromatisch; c: geladen; h: hydrophob; -: negativ; p: polar; +: positive; s: klein; u: sehr klein; t: turn-ähnliche). Das einkernige Cu-Zentrum wird von den blau markierten Aminosäuren gebildet. Die rot dargestellten Aminosäuren sind sauer und essenziell für Interaktionen des Plastocyanins mit PSI und dem Cyt *b₆/f*-Komplex.

Bezüglich dieser Domänen lässt sich bei *A. thaliana* eine Ausnahme beobachten. Die zweite saure Domäne (*northern patch*) ist bei den beiden Proteinisoformen unterschiedlich groß und insgesamt kleiner als bei anderen Dikotyledonen. Das *PetE2*-Genprodukt weist in dieser Domäne den Austausch einer Glutaminsäure ($_{62}E$) gegen das polare Glutamin ($_{62}Q$) auf. In der Domäne des *PetE1*-Genprodukts erfolgte sogar ein Austausch von zwei sauren Aminosäuren: $_{62}$ Glutaminsäure und $_{63}$ Asparaginsäure gegen polares $_{62}$ Threonin und kleines, hydrophobes $_{63}$ Alanin. Aufgrund dessen kann eine unterschiedliche Affinität von *PetE1* und *PetE2* zu den interagierenden Komplexen angenommen werden.

Zum Verständnis der Proteinfunktion ist eine Bestimmung der Tertiärstruktur und der Topologie der Proteinoberfläche von großer Bedeutung. Unter Verwendung kristallografischer 3D-Strukturen als Vorlagen von Spinat (1ag6; GI:3891757) und Cyanobakterium *Synechocystis* (1pcs; GI:2781074) wurde eine komparative Homologie-Modellierung der Aminosäuresequenzen beider *A. thaliana* Plastocyanine vorgenommen.

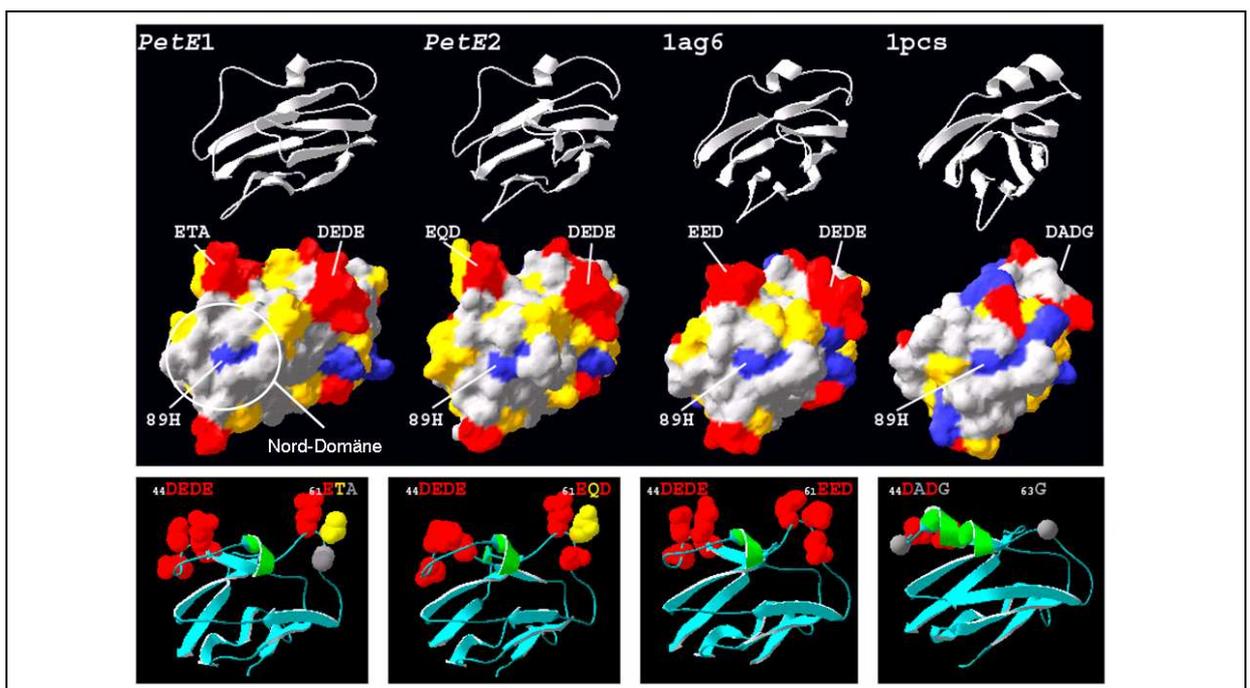


Abbildung 2-1B: Ein Vergleich der Tertiärstruktur und Oberflächenbeschaffenheit der Plastocyanine.

Mittels Homologie-Modellierung wurde eine Vorhersage der räumlichen Struktur beider *At.PetE*- Genprodukte getroffen und mit bekannten Strukturen der Plastocyanine aus *Spinacia oleracea*: 1ag6 (GI:3891757) und *Synechocystis sp.* PCC 6803: 1pcs (GI:2781074) verglichen. In der obersten Reihe wurde das Rückrad der Isoproteine verglichen. In der mittleren Reihe wurde die Oberflächenbeschaffenheit der Proteine dargestellt. Die Ansicht zeigt das Kupfer - koordinierende $_{89}$ Histidin, und die beiden sauren Domänen. In der untersten Reihe wurden die Plastocyaninstrukturen um 180° horizontal gedreht. Gezeigt ist Rückgrad der Proteine und die Aminosäurenreste der beiden sauren Domänen. Die farbliche Kennzeichnung klassifiziert die exponierten Aminosäuren nach den chemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten: grau: unpolar; blau: basisch; gelb: polar; rot: sauer. Die Positionsangaben der Aminosäuren beziehen sich auf das Alignment in der Abbildung 2-1A.

Die berechneten Tertiärstrukturen der Plastocyanine von *Arabidopsis* und *Spinacia* zeigen nur geringfügige Unterschiede in der Konformation des Rückgrads der Proteine. Auch die

modellierte, theoretische Oberflächenbeschaffenheit der Plastocyanine weist für *Arabidopsis* und *Spinacia* hohe Homologie auf (Abb. 2-1B). Daher ist die Konformation der Proteine wie auch die Topologie der apolaren PSI und Cyt *f* Bindungsdomänen und die Exposition und Ausrichtung der sauren Domänen zunächst sehr ähnlich. Zwei signifikante Unterschiede lassen sich dennoch feststellen. Erstens, der exponierte Umfang der zweiten sauren Domäne, des *northern patches* (*PetE1*₋₆₁ETA und *PetE2*₋₆₁EQD bzw. *Spinacia*₋₆₁EED) ist von *Spinacia* über *PetE2* zum *PetE1* zunehmend kleiner (Abb. 2-1B). Zweitens, im Gegensatz zum *PetE1*, *Spinacia*- Plastocyanin und anderen Plastocyaninen dikotyler Pflanzen enthält die hydrophobe P₇₀₀-Bindungsdomäne (Nord-Domäne) des *PetE2*-Isoproteins eine exponierte polare Aminosäure (₃₇Try). Bei höheren Pflanzen konnte diese Eigenschaft nur in *Hordeum vulgare* (Abb. 6-2) beobachtet werden.

2.1.2. Identifikationen der Plastocyanin-Mutanten

Die in dieser Arbeit analysierten Plastocyanin Mutanten-Linien stammen aus einer „Insertionsmutagenese“ mittels *En1*-Transposon. Sie wurden in der Arbeitsgruppe, mittels reverser Genetik (*reverse screen*) identifiziert und zur Verfügung gestellt. Die Insertion des *En1*- Transposons beim *PetE1*-Allel befindet sich, im codierenden Abschnitt des Gens, bei +198 bp relativ zum ATG. Das *PetE2*-Allel enthält eine Insertion des *En1*-Transposons im codierenden Abschnitt des Gens, bei +10 bp relativ zum ATG. Eine exakte Bestimmung der Integrationsstelle und der Orientierung des Transposons im Genom erfolgte mittels allelspezifischer PCR und Sequenzierung der Amplifikate.

Sowohl somatische wie auch germinale Aktivitäten des *En1*-Transposons wurden bei den beiden Loci beobachtet. Das Auftreten wildtypischer Allele in der Nachkommenschaft von homozygoten *pete*-Mutanten (germinale Reversionen) wurde auf etwa 6% ^{+/-} 2% geschätzt (Daten nicht gezeigt). Eine Stabilisierung der Mutantenlinien erfolgte mittels *Footprint*-Analysen. Für die *pete1-1* Mutante wurde eine germinale *En1*-Exzision mit gleichzeitiger Verschiebung des offenen Leserahmens (ORF) durch Deletion festgestellt. Die Deletion bei *pete1-1.1* beträgt 52 bp (Abb. 2-2A; Abb. 2-2B). Bei der *pete2-1* Allele wurden mehrere unabhängige germinale *En1*-Exzisionen mit einer ORF-Verschiebung festgestellt: *pete2-1.1* - *pete2-1.3* (Abb. 2-2A). Eine modifizierte Nukleotidsequenz in der *pete2-1.1*-Mutante bietet eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AlwI* (GGATC) und ermöglichte eine sichere

Bestimmung dieser Allele. Amplifikate aus *pete2-1.1*-spezifischen PCR-Reaktionen konnten mit diesem Enzym gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt werden (Abb. 2-2B).

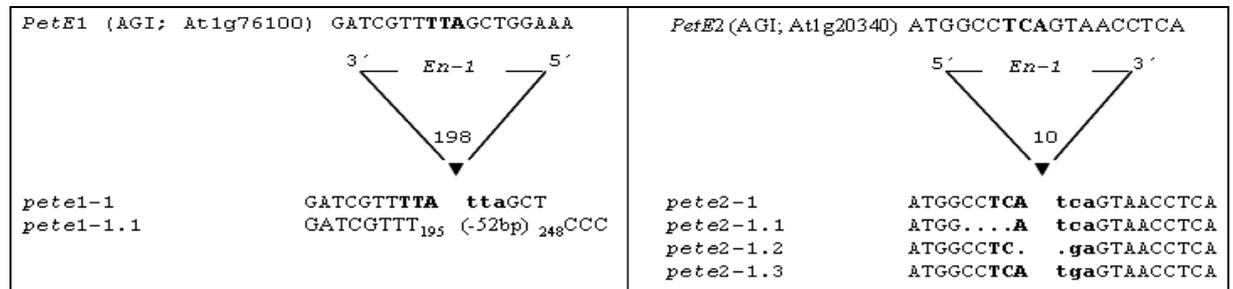


Abbildung 2-2A: Die Mutationen der *PeteE*-Loci.

Die Insertion und die Orientierung des *En1*-Transposons in dem Exon der *PeteE1* und *PeteE2*-Gene wurde mittels allelspezifischer PCR-Reaktionen festgestellt und durch Sequenzierung der Amplifikate bestätigt. Unter Verwendung von *Footprint*-Analysen wurden unabhängige germinale Exzisionen des *En1*-Transposons mit einer Verschiebung des ORF's identifiziert.

Aus der Kreuzung von *pete1-1.1* und *pete2-1.1* wurde eine Doppel-Mutante hergestellt. An 400 Einzelpflanzen der Nachkommenschaft folgender Genotypen: [*pete1-1.1/PeteE1* / *pete2-1.1*], [*pete1-1.1/pete2-1.1/PeteE2*], wurde die Co-Segregation des Genotyps [*pete1-1.1* / *pete2-1.1*] mit letalem Phänotyp überprüft (Abb. 2-2B).

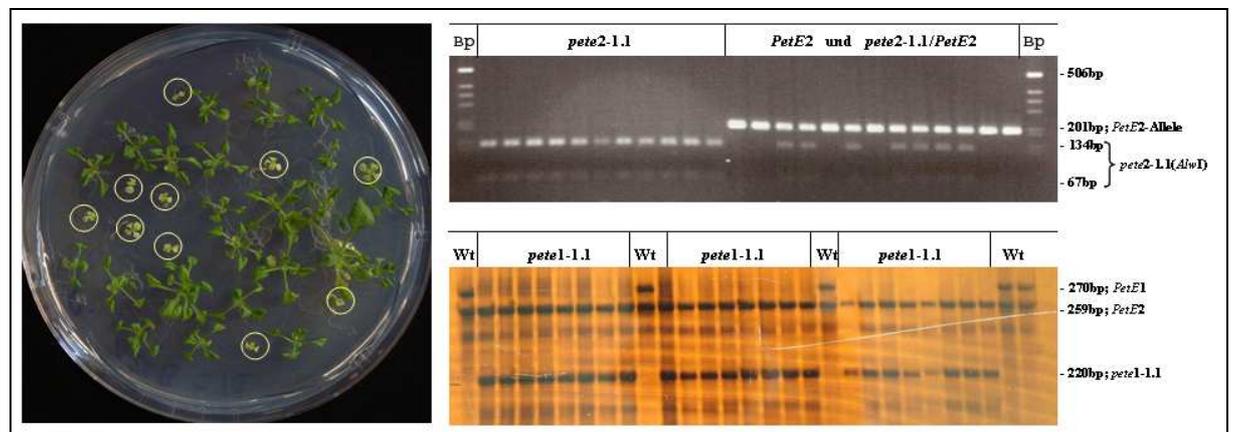


Abbildung 2-2B: Co-Segregations Analysen der Plastocyanin-Doppelmutante.

Links in der Abbildung: In Sterilkultur und auf 1,5% Saccharose segregiert die Nachkommenschaft einer [*pete1-1.1* / *pete2-1.1/PeteE2*]-Linie. Die Genotyp-Bestimmung erfolgte mittels PCR-Reaktionen. Rechts unten in der Abbildung: Für den *pete1-1.1*-Locus wurde ein degeneriertes Primer-Paar eingesetzt (dmWs/dR4as). Die Amplifikate wurden mittels 7% -igem PAA elektrophoretisch getrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Alle analysierten Pflanzen sind homozygot bezüglich der *pete1-1.1*-Allele (Wt: Wildtyp als Kontrolle). Rechts oben in der Abbildung: Für die Analyse der Segregation des *pete2-1.1/PeteE2*-Allele wurden 13sL/76as-Primer-Paar verwendet. Die Amplifikate wurden anschließend mit dem Enzym *AlwI* gespalten und in 2,7% Agarose elektrophoretisch getrennt. Die eingekreisten Pflanzen sind homozygot bezüglich der *pete2-1.1*-Allele hingegen die nicht eingekreisten, grünen Pflanzen sind heterozygot oder wildtypisch.

2.1.3. Der Phänotyp der Plastocyanin-Mutanten

Die stabilisierten Mutanten für die beiden Loci der Plastocyanin-Gene waren zum autotrophen Wachstum fähig. Sowohl unter Langtag- als auch unter Kurztag-Bedingungen zeigten die

Pflanzen keine Stresserscheinungen (Abb. 2-4). Die Doppel-Mutante [*pete1-1.1/pete2-1.1*] hingegen war unter autotrophen Bedingungen nicht lebensfähig (Abb. 2-4). Sie wurde daher in Sterilkultur, auf MS-Medium mit 1,5% Saccharose propagiert (Abb. 2-2). Auch unter diesen Bedingungen blieb der Wachstum der Doppelmutanten deutlich unter dem des Wildtyps, und die Pigmentierung war auffallend gelb. Unter UV-Illumination ließ sich eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Fluoreszenz beobachten (Abb. 2-3). Dieser *hcf-* (*high chlorophyll fluorescence*) Phänotyp ist ein Indiz für eine Störung der photosynthetischen Elektronentransportkette.



Abbildung 2-3: *hcf*-Phänotyp der *pete*-Doppelmutante.
a. Unter UV-Illumination lässt sich eine erhöhte Chlorophyll-Fluoreszenz (*hcf*: *high chlorophyll fluorescence*) der *pete*-Doppelmutante beobachten (b. Kontrolle unter Weißlicht). Die Pflanzen wurden auf MS-Medium mit 1,5% Saccharose propagiert.

Der Phänotyp der Doppelmutante konnte sowohl mit der *nativen* Nukleotidsequenz des *PetE2*-Locus, als auch mittels ektopischer Expression der *PetE1*- und *PetE2*-Gene (Abb. 2-4) komplementiert werden.



Abbildung 2-4: Wachstum der Plastocyanin-Linien.
Folgende Genotypen wurden dargestellt (von links): a. Wildtyp (Ökotyp: Columbia-0); b. *pete1-1.1*; c. *pete2-1.1*; d. 35SCaMV::*PetE1*::[*pete1-1.1/pete2-1.1*]; e. 35SCaMV::*PetE2*::[*pete1-1.1/pete2-1.1*]; f. keimende Wildtyp-Pflanze und g. keimende Doppel-Mutante [*pete1-1.1/pete2-1.1*].

Für die *native* Expression des Plastocyanins wurde ein genomischer Bereich von 1000 bp vor dem Start-Codon bis zum 500 bp hinter dem Stopp-Codon des *PetE2*-Locus in pP001VS-GW Vektor kloniert und via *Agrobacterium tumefaciens* in die Pflanzen transferiert.

Die ektopische cDNA-Expression der beidem Plastocyanine erfolgte aus der T-DNA des pJan33-Vektors, unter Kontrolle des 35SCaMV-Promotors und 35SCaMV-Terminators.

Die Nukleotidsequenzen der Transgene wurden mittels Sequenzierung aus den transformierten Pflanzen überprüft. Anschließend wurden mehrere unabhängige Linien für jede Komplementation analysiert.

2.1.4. Wachstumsraten der Plastocyanin-Linien

Sowohl unter Langtag- als auch unter Kurztag-Bedingungen propagierte Plastocyanin-Mutanten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Wachstumsfähigkeit (Tab. 2-4).

Tabelle 2-4: Bestimmungen der Blattflächen der Plastocyanin-Linien.

	Wildtyp	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV:: <i>PetE1</i>	35SCaMV:: <i>PetE2</i>
12 Tage	8 \pm 1	7 \pm 3	6 \pm 1	11 \pm 2	13 \pm 2
18 Tage	35 \pm 6	33 \pm 10	24 \pm 5	48 \pm 11	57 \pm 12
24 Tage	155 \pm 19	144 \pm 37	107 \pm 20	190 \pm 44	249 \pm 50
27 Tage	325 \pm 40	300 \pm 86	225 \pm 46	409 \pm 101	522 \pm 122

Für die vergleichende Bestimmung der Blattflächen-Zunahme [in mm²] wurden die Linien unter Kurztag-Bedingungen propagiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Bestimmung der Flächen erfolgte aus den Aufnahmen mittels VisiStore99b-Software.

Die Blattflächen der *pete2-1.1*-Mutanten waren um 27% kleiner als die der Wildtyp-Pflanzen. Im Gegensatz dazu wiesen beide Plastocyanin-Überexprimierer (35SCaMV::*PetE1* und 35SCaMV::*PetE2*) eine 31%ige bzw. 60%ige Zunahme der Blattoberfläche im Vergleich zum Wildtyp auf. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von acht Wochen blieb die Anzahl der Blätter in allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

2.1.5. Expressionsanalysen der Plastocyanin-Allele

Die Bestimmung der Transkriptmenge der Plastocyanin-Gene wurde mittels quantitativer RT-PCR und Northern-Analysen durchgeführt. Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen wurden zur Mittagszeit geerntet, die Gesamt-RNA präpariert und die cDNA hergestellt. Die Transkript-Abundanz der beider Plastocyanin-Gene unterscheidet sich bereits in Wildtyp (Abbildung 2-5A). Das experimentell bestimmte Verhältnis der beiden Transkripte liegt bei 13% \pm 3 (*PetE1*) zu 85% \pm 8 (*PetE2*). Diese Daten werden von Digitalen Northern - Datenbanken (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) gestützt (Tab. 2-5A.). Während der Entwicklung und in allen Organen der Pflanze liegt hier das Verhältnis der Transkripte bei 22% \pm 8 (*PetE1*) zu 78% \pm 6 (*PetE2*). Die Menge der *PetE1* mRNA in der *pete1-1* Mutante lag unter der Nachweisgrenze. In den *pete2-1* Mutanten wurden geringe Mengen der *PetE2*-mRNA

festgestellt. Ursächlich dafür könnten somatische Reversionen des Transposons sein. Die nahezu vollständige Abwesenheit des Transkripts eines Plastocyanin-Gens hat offensichtlich keinen Einfluß auf die Akkumulation des Transkripts des anderen Gens.

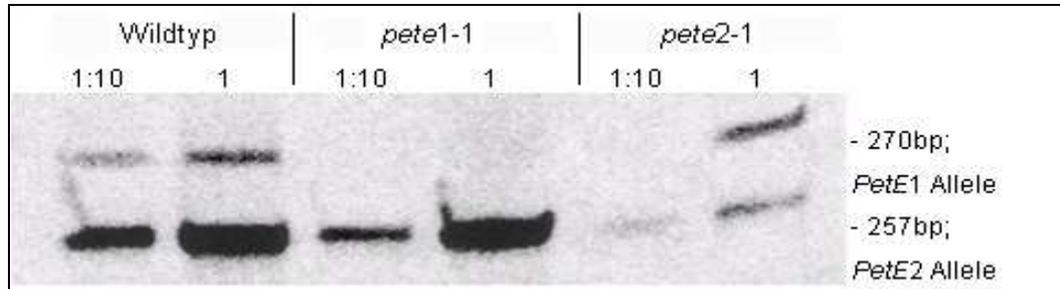


Abbildung 2-5A: Bestimmung der *PetE*-Transkriptmenge in *pete*-Mutanten.

In der *pete1-1.1* Mutante kann keine *PetE1*-mRNA festgestellt werden. Dagegen sind in der *pete2-1.1* Mutante etwa 20%+4 des *PetE2*-Transkripts nachweisbar. Die quantitative RT-PCR wurde mit ^{33}P -dATP markierten, degenerierten Primer-Paar (dMWs/d4as) durchgeführt. Dann wurden die Amplifikate in zwei Konzentrationen (1:10 und 1) im 4,5% PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Autoradiogramme wurden am Phosphorimager aufgenommen und mit Imagequant-Software (v5.1) quantifiziert.

In den stabilisierten Mutanten (*pete1-1.1* und *pete2-1.1*) wird erneut eine Akkumulation der Transkripte beobachtet, wobei die Menge der mRNA jedoch um etwa 10% im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist (Abb. 2-5B; Tab. 2-5A).

Tabelle 2-5A: Relative *PetE*-Transkriptmengen.

	QRT-PCR				Digitale Northern					
	En1-Linien		Stabilisiert		Organe in Wildtyp			Entwicklung in Wildtyp		
	Wt	<i>pete1-1</i>	<i>pete2-1</i>	<i>pete1-1.1/</i> <i>/pete2-1.1</i>	Keimlinge	Rosette	Wurzeln	1-5 Tage	6-24 Tage	25-44 Tage
<i>PetE1</i>	13 +/- 3	0 +/- 0	8 +/- 2	9 +/- 1	29	22	11	15	27	23
<i>PetE2</i>	85 +/- 8	84 +/- 3	15 +/- 4	66 +/- 3	71	78	89	85	73	77

Die Transkriptmengen der beiden *PetE*-Gene wurden prozentual zueinander gestellt. Die Angaben in den Mutanten beziehen sich auf die Abundanz der mRNA in Wildtyp.

Die Effizienz der ektopischen *PetE1* und *PetE2* Expression ($35\text{SCaMV}::\text{PetE1}::[\text{pete1-1.1}/\text{pete2-1.1}]$ und $35\text{SCaMV}::\text{PetE2}::[\text{pete1-1.1}/\text{pete2-1.1}]$) wurde mittels Northern-Analysen überprüft (Abb. 2-5C). Die Menge des *PetE1*-Transkripts lag bei 168 % +/- 15, und die des *PetE2*-Transkripts bei 230% +/- 31 im Vergleich zur gesamten Plastocyanin-mRNA des Wildtyps.

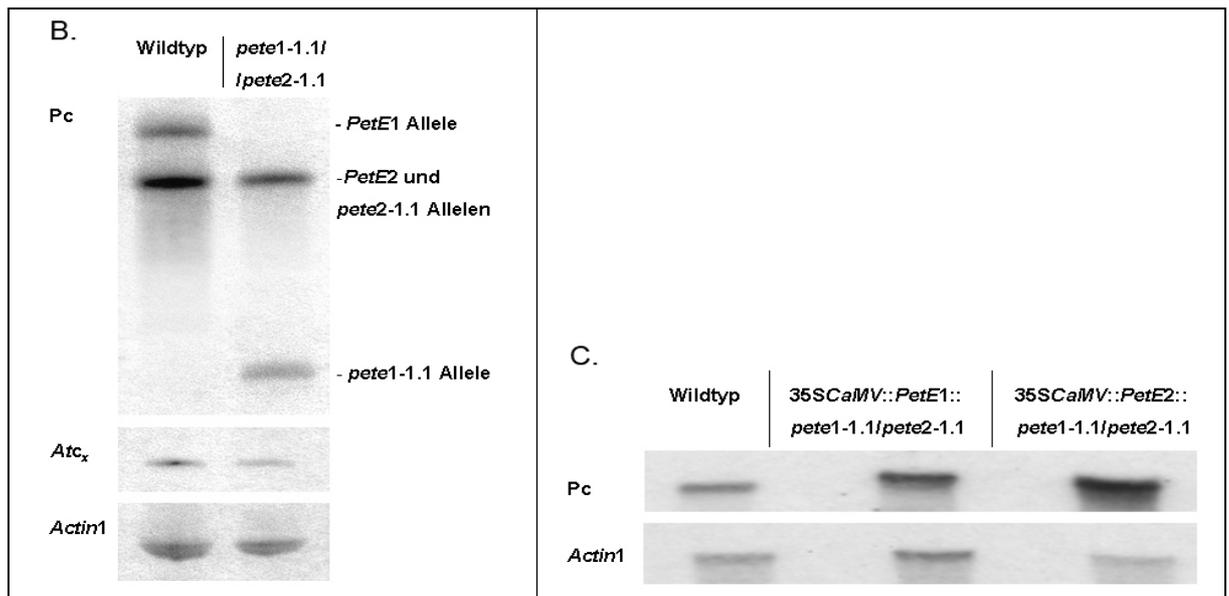


Abbildung 2-5B: Quantifizierung der *PetE*-Transkriptmenge in der Doppel-Mutante.

Aufgrund von *Frameshift*-Mutationen in der Doppel-Mutante [*pete1-1.1/pete2-1.1*] sind Transkripte beider *pete*-Allele nachweisbar. Die Menge der Transkripte ist jedoch reduziert. Die Bestimmung der *PetE*-Transkriptmenge (Pc) aus den Northern-Autoradiogrammen erfolgte mit Imagequant-Software (v5.1). Als Kontrolle wurden hier *Atc_x* (C6seq1s-4/2Cyt6as) und *Actin1* (acts/actas) Transkripte gezeigt.

Abbildung 2-5C: Quantifizierung der *PetE*-Transkriptmenge in *PetE*-Überexprimierer.

Bei beiden Überexprimierern ist die Abundanz des Plastocyanintranskripts gegenüber dem Wildtyp angehoben. Für die Northern-Analysen wurde jeweils 30µg Gesamt-RNA mit *PetE* spezifischer Sonde (dMWs/dR4as) stringent hybridisiert. Als Kontrolle wurde eine *Actin1*-Sonde hybridisiert.

Der Gehalt der *PetE* Genprodukte in der Doppelmutante wurde mit Western-Analysen bestimmt. Die *PetE*-Proteine wurden mit Antikörpern gegen das in *E. coli* exprimierte Plastocyanin aus *Spinacia oleracea* (Klößen, R.B; Martin-Luther Universität; Halle) detektiert. In der [*pete1-1.1/pete2-1.1*] Doppel-Mutante konnte kein Plastocyanin nachgewiesen werden (Abb.2-5D). Zur Kontrolle wurden weitere Analysen mit polyklonalen Antikörpern gegen die große Untereinheit von RubisCO (RbcL) und *Atc_x* (Cyt *c*₆) durchgeführt.

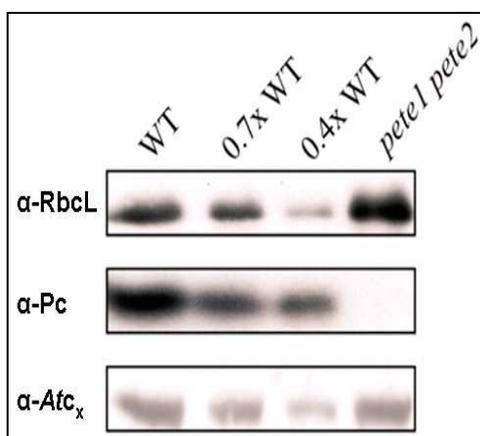


Abbildung 2-5D: Westernanalysen der Plastocyanin-Doppelmutante (links)

Mit SDS-PAGE wurden jeweils 40µg einer Gesamtein-Extraktion aus Wildtypen und aus Doppelmutanten aufgetrennt, auf eine Immobilon-P Membran transferiert und mit primären Antikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem *Enhanced Chemiluminescence Western Kit* (Amersham). In der Doppelmutante kann kein Plastocyanin (α -Pc) nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Antikörper gegen *Atc_x* (α -*Atc_x*) und gegen die große Untereinheit der RubisCO (α -RbcL) verwendet.

Eine Quantifizierung der *PetE* Genprodukte bei den Einzel-Mutanten gestaltete sich schwieriger. Die Ergebnisse der Westernanalysen waren nicht reproduzierbar (Abb. 2-5E), da mit jeder Hybridisierung mit α -Pc-Antikörpern wurde (auf der gleichen Membran) eine erhebliche Abnahme des *PetE2* Signals beobachtet. Nach vierfacher Verwendung des Antikörpers wurde nur noch das *PetE1*-Genprodukt detektiert und daher war keine exakte Quantifizierung der *PetE*- Isoformen möglich.

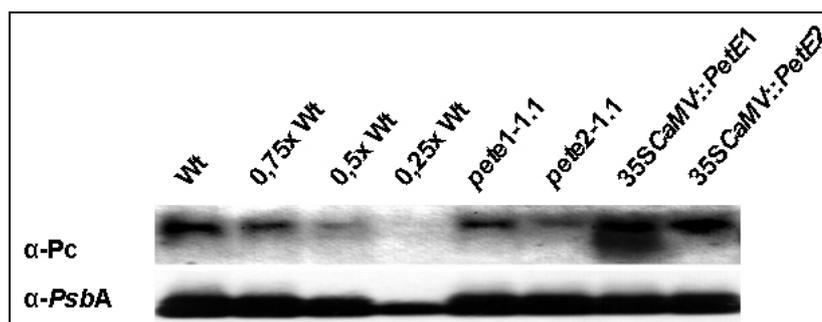


Abbildung 2-5E: Westernanalysen der Plastocyanin-Linien.

Bei einer SDS-PAGE wurde jeweils ein Proteinäquivalent von 50 μ g Chlorophyll a+b einer Thylakoiden-Extraktion aus Wildtypen und aus den Plastocyanin-Mutanten aufgetrennt, auf eine Immobilon-P^{sq} Membran transferiert und mit primären Antikörpern gegen Plastocyanin (α -Pc), und zur Kontrolle, gegen *PsbA* (α -*PsbA*), inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem *Enhanced Chemiluminescence Western Kit* (Amersham).

Um dennoch quantitative Aussagen zu treffen, war es notwendig IEF/SDS-PAGEs mit Westernanalysen zu kombinieren.

Es wurden Proteine des Thylakoidlumen extrahiert, durch IEF/SDS-PAGE aufgetrennt, und dann zum einem auf eine Immobilon-P^{sq} Membran transferiert und immunologisch analysiert, zum anderen mit *Coomassie-Colloidal* G250 gefärbt. Anhand des Vergleichs von Western-Analysen mit der Lage der gefärbten Proteine im Gel wurden die Spots der Plastocyanine identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mit den *Coomassie* - gefärbten PAA-Gelen und die Ergebnisse sind in der Tabelle 2-5F und in der Abbildung 2-5F zusammengefasst.

Tabelle 2-5F: Quantitative Bestimmung der Menge des Gesamtplastocyanins in den Pc-Linien.

	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV::PetE1	35SCaMV::PetE2
Gesamt-Plastocyanin	100 \pm 4	70 \pm 5	23 \pm 1	129 \pm 8	111 \pm 19
<i>Im Bereich:</i>					
<i>pl</i> 4,0	-	14 \pm 3	-	-	-
<i>pl</i> 4,3-4,4	69 \pm 4	33 \pm 3	8 \pm 1	44 \pm 4	-
<i>pl</i> 4,65-4,8	31 \pm 4	23 \pm 2	15 \pm 0	86 \pm 7	111 \pm 16

Die Angaben zum Plastocyanin-Gehalt erfolgten in Prozent des Gesamt-Plastocyanins des Wildtyps. Die Migrationsbereiche des Plastocyanins im Isoelektrischen Punkt wurden in drei Gruppen zusammengefasst: *pl*4; 4,3-4,4; 4,65-4,8. Auch hier beziehen sich die prozentualen Angaben auf die Menge des Gesamt-Plastocyanins im Wildtyp. Für die Quantifizierung von CBB-G250 gefärbter PAA-Gele wurde die Software ImageQuant v5.1 verwendet.

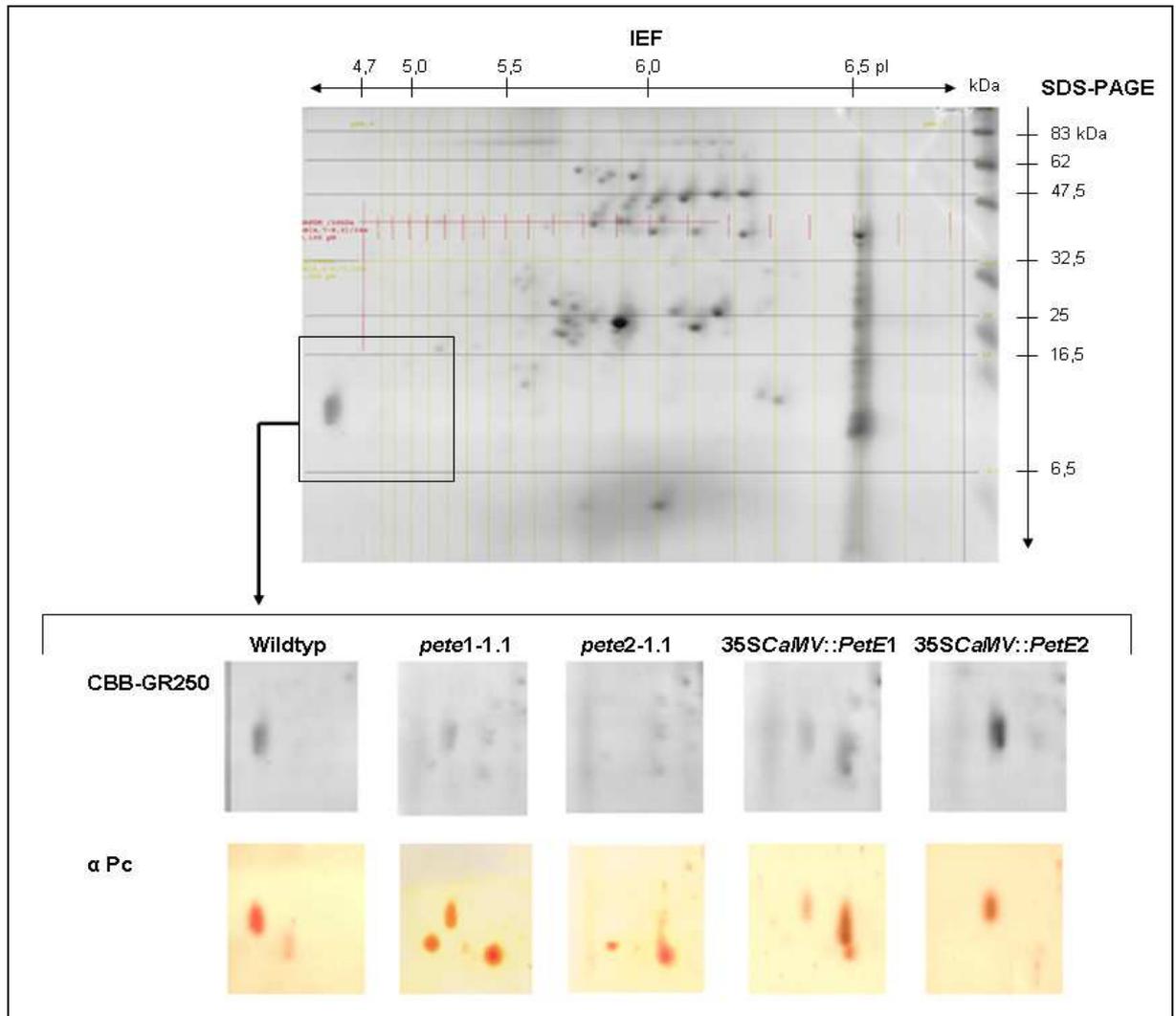


Abbildung 2-5F: IEF/SDS-Page und immunologische Detektion der Plastocyanin-Isoproteine.

Für den Wildtyp ist die Auftrennung von Proteinen im Bereich 4-7 pI / 83-5 kDa dargestellt. Aus Platzgründen wurde die Darstellung der Auftrennung in den Mutanten auf den Bereich pH 4-5,2 und 20-6,5 kDa reduziert. Eine Kalibrierung der Gele erfolgte unter Verwendung von carbamyltierten GAPDH-Protein (rote Markierung, 36kDa; pI [4,7-8,3] mit 0,105 pH/Spot) und CA-Protein (gelbe Markierung; 30kDa; pI [4,8-6,7] mit 0,095 pH/Spot) sowie Molekulargewichtsmarker (graue Linien; P7708S von NE Biolabs). Jeweils 250 μ g und 150 μ g Thylakoidlumen-Extrakte wurden im immobilisierenden pH-Gradienten (pH4-7) für 36145Vhrs fokussiert und anschließend in 14,5% PAA denaturierend aufgetrennt. Gele mit 250 μ g Thylakoidlumen-Proteine wurden mit *Colloidal-Coomassie* (CBB-G250) detektiert. Eine weitere Präparation luminaler Proteine der entsprechenden Genotypen wurde ebenfalls mittels IEF/SDS-Page getrennt, jedoch anschließend auf eine Immobilon-PSq Membran transferiert und mit anti-Plastocyanin (α -Pc) Antikörpern immunologisch analysiert. Nach einer Überlagerung der Bilder konnten die Plastocyanin-Spots identifiziert werden.

2.1.6. Pigmentanalyse mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Zur Feinanalyse der Pigmente der Plastocyanin-Mutanten wurde die r-HPLC (*reverse-phase high-performance liquid chromatography*) eingesetzt. Die Extraktion der Pigmente erfolgte mit 80% Aceton. In der Tabelle 2-6A sind die Pigmentkonzentrationen der Extrakte aus Wildtyppflanzen und der Plastocyanin-Doppelmutante aufgeführt. Die Tabelle 2-6B beinhaltet die Pigmentkonzentrationen der *pete1-1.1*, *pete2-1.1* Mutanten und der Plastocyanin-Überexprimierer. Eine getrennte Betrachtung der Pigmentdaten begründet sich

in unterschiedlichen Bedingungen, unter den die Pflanzen propagiert wurden: die Doppelmutante in Sterilkultur; alle anderen Genotypen unter Gewächshausbedingungen.

Tabelle 2-6A: Pigmentgehalt der Doppel-Mutante.

	Wildtyp	<i>pete1-1.1/ /pete2-1.1</i>	relativer Pigment- Gehalt der Mutante in [%] zum Wt
Chl a/b	2,71 ^{+/-} 0,06	2,5 ^{+/-} 0,17	-
*Chl (a+b)	*1756 ^{+/-} 128	*35 ^{+/-} 13	2
Lutein	151 ^{+/-} 5	379 ^{+/-} 24	5
β-Car	46 ^{+/-} 9	46 ^{+/-} 8	2
Nx	40 ^{+/-} 2	69 ^{+/-} 7	3
Vx	30 ^{+/-} 1	49 ^{+/-} 6	4
VAZ	31 ^{+/-} 1	67 ^{+/-} 6	4

Die Zusammensetzung der Pigmente von Wildtyp (n=5) und [*pete1-1.1/pete2-1.1*] Doppel-Mutanten (n=5) wurden mittels r-HPLC bestimmt. Die Pflanzen wurden für 6 Wochen in Sterilkultur auf 1,5% Saccharose propagiert. Das *Gesamt-Chlorophyllgehalt wurde in nmol Chl (a+b)*g⁻¹ des Frischgewichts angegeben. Die Angaben zu allen anderen Pigmenten (Lutein, β-Car: β-Carotenoid; Nx: Neoxanthin; Vx: Violaxanthin) erfolgten in mmol pro mol Chl (a+b). VAZ ist die Summe der Xanthophyllzyklus -Pigmente (Violaxanthin + Zeaxanthin + Antheraxanthin)

Pflanzen die kein Plastocyanin produzieren [*pete1-1.1/pete2-1.1*], sind nicht mehr in der Lage einen funktionsfähigen Photosynthese-Apparat aufzubauen. Der Gesamt-Chlorophyllgehalt dieser Mutanten beträgt nur noch 2% der Wildtyppflanzen. Aufgrund einer Verschiebung im Verhältnis der Chlorophylle (a und b) zueinander und des hohen Lutein-Gehalts kann eine erhöhte Abundanz der Lichtsammelkomplexe gegenüber den Reaktionszentren der Photosysteme angenommen werden. Außerdem, wie man an der verstärkten Anreicherung der Pigmente des Xanthophyllzyklus (VAZ) sehen kann, leidet die Doppelmutante unter photooxidativen Stress.

In der Plastocyanin-Einzelmutante: *pete2-1.1* und dem *PetE2*-Überexprimierer können signifikante Unterschiede im Chlorophyllgehalt pro Frischgewicht beobachtet werden. Die Ursachen der Veränderungen gegenüber dem Wildtyp scheinen in beiden Genotypen jedoch unterschiedlicher Natur zu sein. In der *pete2-1.1*-Mutante lässt sich die 20%ige Reduktion der Chlorophyllkonzentration auf die Reduktion des gesamten Photosynthese-Apparates zurückführen (Tab. 2-7B). Die 16%ige Abnahme der Chlorophyll-Konzentration beim *PetE2*-Überexprimierer könnte das Resultat des stärkeren Wachstums der Pflanzen zu sein, denn eine signifikante Veränderung in der Zusammensetzung des Photosynthese-Apparates wurde bei diesen Genotyp nicht festgestellt. Ansonsten unterscheiden sich die Plastocyanin-Einzelmutanten in ihrer Pigmentkomposition nur geringfügig von dem Wildtyp. In keiner der Mutanten konnte eine Erhöhung des Xanthophyllzyklus-Pools (VAZ) beobachtet werden, daher scheint keine der Genotypen unter Langtagbedingungen an (photo-) oxidativen Stress zu leiden.

Tabelle 2-6B: Pigmentgehalt der Plastocyanin Linien.

	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV::PetE1	35SCaMV::PetE2
Chl a/b	2,96 \pm 0,07	3 \pm 0,03	3,07 \pm 0,03	2,83 \pm 0,02	3 \pm 0,06
*Chl (a+b)	*1507 \pm 89	*1574 \pm 81	*1214 \pm 32	*1499 \pm 18	*1269 \pm 89
[%] zum Wt	100 \pm 6	104 \pm 5	80 \pm 2	99 \pm 1	84 \pm 6
Lutein	135 \pm 3	135 \pm 4	128 \pm 4	147 \pm 5	136 \pm 4
β -Car	74 \pm 3	73 \pm 5	73 \pm 5	79 \pm 4	75 \pm 18
Nx	33 \pm 2	32 \pm 2	32 \pm 1	32 \pm 1	33 \pm 1
Vx	16 \pm 4	16 \pm 3	20 \pm 6	23 \pm 5	19 \pm 6
Ax	7 \pm 1	8 \pm 2	7 \pm 2	5 \pm 2	5 \pm 2
Zx	8 \pm 5	7 \pm 2	6 \pm 5	3 \pm 2	6 \pm 5
VAZ	31 \pm 1	32 \pm 1	32 \pm 2	30 \pm 2	31 \pm 1

Die Zusammensetzung der Pigmente von Wildtyp (n=5) und Mutanten (je n=5) wurden mittels r-HPLC bestimmt. Die Pflanzen wurden für 8 Wochen unter Langtagbedingungen propagiert. Das *Gesamt-Chlorophyllgehalt wurde in nmol Chl (a+b)*g⁻¹ des Frischgewichts angegeben. Die Angaben zu allen anderen Pigmenten (Lutein, β -Car: β -Carotenoid; Nx: Neoxanthin; Vx: Violaxanthin; Ax: Antheraxanthin) erfolgten in mmol pro mol Chl (a+b). VAZ ist die Summe der Xantophylzyklus-Pigmente (Violaxanthin + Zeaxanthin + Antheraxanthin)

2.1.7. Zusammensetzung des Photosynthese-Apparates bei veränderten Plastocyanin-Konzentration

Für die folgenden Untersuchungen wurde die Plastocyanin-Doppelmutante in Sterilkultur, die Einzelmutanten und Überexprimierer auf Erde, unter Langtagbedingungen propagiert. Wegen unterschiedlicher Wachstumsbedingungen wurden die folgenden Analysen für beide Typen getrennt durchgeführt. Wichtige Hinweise zur Zusammensetzung des Photosynthese-Apparates liefert eine Auftrennung der Proteinkomplexe der Thylakoidmembran durch native 2D-Gelelektrophorese. Mittels eines nichtionischen Tensids *n*-DM (*n*-dodecyl- β -D maltosid) werden nahezu vollständige Komplexe aus der Thylakoidmembran herausgelöst und in Lithium-Dodecylsulfat-Puffer einer "nativen-" bzw. "green-" PAGE entsprechend ihrer Molekulargewichte gelelektrophoretisch aufgetrennt.

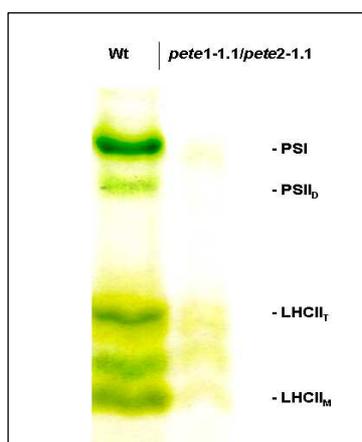


Abbildung 2-7A: "green"-PAGE der Thylakoidmembran – Proteinkomplexe der Plastocyanin Doppel-Mutante und des Wildtyps (links).

Die Thylakoidmembran- Proteinkomplexe aus 10mg Pflanzenmaterial (ein Äquivalent von etwa 20 μ g Chl a+b des Wt: Wildtyps) wurden mit *n*-DM aus der Thylakoidmembran herausgelöst und in einer nicht denaturierenden LDS-PAGE aufgetrennt. Ersichtlich wird eine nahezu vollständige Reduktion des Photosynthese-Apparates: (PSI: Photosystem I, PSII_D: Photosystem II- Dimer, LHCII_T: Lichtsammelkomplexe des PSII - Trimere und LHCII_M: Lichtsammelkomplexe des PSII - Monomere) in der [*pete1-1.1/pete2-1.1*] Doppelmutante. Die Reduktion der Reaktionszentren beider Photosysteme ist stärker fortgeschritten als die Reduktion der Lichtsammelkomplexe.

Nach erfolgreicher Auftrennung der Thylakoidmembran-Proteinkomplexe wird eine 98%ige Reduktion des Photosynthese-Apparates in der Plastocyanin-Doppelmutante deutlich (Abb. 2-

7A). Die Reaktionszentren der Photosysteme sind zudem stärker reduziert als die Lichtsammelkomplexe. Es war nicht möglich die "green"-Gele der Doppel-Mutante (Abb. 2-7A) mittels einer SDS-PAGE weiter zu analysieren, denn die Protein-Mengen der einzelnen Signale lagen unter der Nachweisgrenze. (Daten nicht gezeigt).

Bei den Einzelmutanten und Überexprimierer wurden die Effekte der veränderten Plastocyanin-Konzentration und struktureller Unterschiede zwischen den beiden *PetE*-Isoformen auf die Komposition des Photosynthese-Apparates zum einen mittels zweidimensionaler LDS/SDS-PAGE (Abb.2-7B) und zum anderen immunologisch (Abb. 2-7C) überprüft. Eine detaillierte quantitative Auswertung ist in der Tabelle 2-7B zusammengefasst.

In der *pete1-1.1*-Mutante wurde eine etwa 10%ige Reduktion der Photosystem II-Abundanz und etwa 15%ige Reduktion der ATP-Synthase im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Die Veränderungen in der *pete2-1.1*-Mutante folgen dem gleichen Trend, zeigen jedoch eine stärkere Ausprägung. Der PSI-Komplex ist hier um etwa 20%, PSII um etwa 30% und die Abundanz der ATP-Synthase sogar um 60% reduziert.

Tabelle 2-7B: Quantitative Bestimmung der Thylakoidmembranproteine in Plastocyanin Linien.

	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV:: <i>PetE1</i>	35SCaMV:: <i>PetE2</i>
LHCI	99 ^{+/-}1.4	80 ^{+/-}1.6	87 ^{+/-}1.4	97 ^{+/-}1.5
PSI	95 ^{+/-}1.2	77 ^{+/-}1.5	113 ^{+/-}1.3	103 ^{+/-}1.2
PSI-A/B _{Dimere}	96 ^{+/-} 1.2	78 ^{+/-} 1.5	117 ^{+/-} 1.4	102 ^{+/-} 1.3
PSI-A/B _{Monomere}	97 ^{+/-} 1.3	82 ^{+/-} 1.4	115 ^{+/-} 1.4	104 ^{+/-} 1.2
PsaD und PsaF	96 ^{+/-} 1.2	80 ^{+/-} 1.3	122 ^{+/-} 1.4	103 ^{+/-} 1.3
PsaC; PsaH	97 ^{+/-} 1.8	81 ^{+/-} 1.6	128 ^{+/-} 1.2	104 ^{+/-} 1.1
Lhcll_{Trimere}	89 ^{+/-}1.1	68 ^{+/-}1.8	92 ^{+/-}1.15	99 ^{+/-}1.4
PSII	90 ^{+/-}1.3	76 ^{+/-}1.7	104 ^{+/-}1.5	109 ^{+/-}1.8
PSII-D1/D2; CP34/CP47	84 ^{+/-} 1.1	65 ^{+/-} 1.1	102 ^{+/-} 1.2	110 ^{+/-} 1.4
OEC	89 ^{+/-} 1.1	69 ^{+/-} 1.4	117 ^{+/-} 1.2	98 ^{+/-} 1.4
Cyt <i>b₆/f</i>	98 ^{+/-}1.1	99 ^{+/-}1.5	100 ^{+/-}1.8	97 ^{+/-}1.4
ATPase	85 ^{+/-}1.3	38 ^{+/-}1.7	79 ^{+/-}1.2	93 ^{+/-}1.1

Die angegebenen Werte sind relativ (in Prozent der Wildtyp-Proteinmenge). Die fett gedruckten Zahlen zeigen Durchschnittsmengen immunologisch detektierter Proteine (Abb. 2-7C): **LHCI** (Lhca1; Lhca2; Lhca3); **PSI** (PsaC; PsaD; PsaE; PsaF; PsaG; PsaH; PsaK); **LHCII_{Trimere}** (Lhcb1; Lhcb2); **PSII** (Lhcb3; Lhcb5; PsbA; PsbS); **Cyt *b₆/f*** (Cyt *b₆*; Cyt *f*); **ATPase** (AtpB). Die nicht fett gedruckten, kursiven Werte wurden mittels Quantifizierung von Proteinen aus CBB-R250 gefärbten LDS/SDS-Gelen (Abb. 2-7B) ermittelt.

Von den beiden überexprimierenden Linien zeigt nur die 35SCaMV::*PetE1*- Linie eine signifikant veränderte Komposition des Photosynthese-Apparates. Bei dieser Linie liegt die Abundanz des Photosystems I etwa 15% höher, dafür aber ist die Abundanz der ATP-Synthase 21% niedriger als in Wildtyppflanzen.

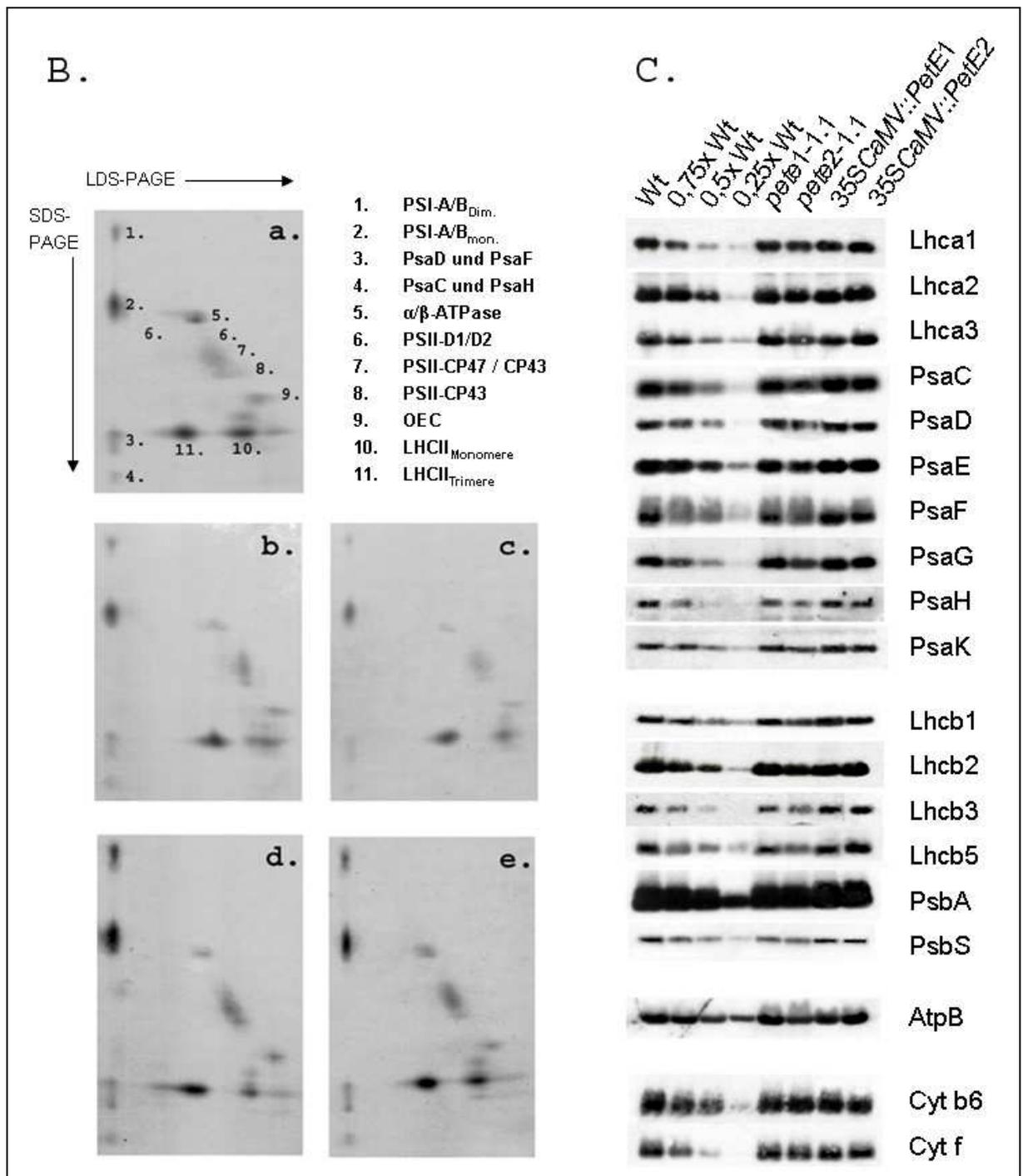


Abbildung 2-7B: Die Komposition der Thylakoidmembran-Proteinkomplexe in LDS/SDS-PAGE.

Dargestellt sind a. Wildtyp; b. *pete1-1.1*; c. *pete2-1.1*; d. 35SCaMV::*PetE1*; f. 35SCaMV::*PetE2*. Thylakoidmembranen (ein Äquivalent von 20µg Chl a+b) wurden mit *n*-DM behandelt. Die herausgelösten Proteinkomplexe wurden zunächst in einer, nicht denaturierenden LDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. In der zweiten, denaturierenden Dimension (SDS-PAGE) erfolgte eine Trennung der Proteinkomplexe entsprechend ihres Molekulargewichts. Die Detektion der Proteine erfolgte mit CBB-R250 - Farbstoff.

Abbildung 2-7C: Die Komposition der Proteinkomplexe in den Thylakoidmembranen in Western-Analysen.

Thylakoidmembranproteine (ein Äquivalent von 5µg Chl a+b) wurden mit SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt, auf eine Immobilon-P transferiert und immunologisch detektiert.

2.1.8. Spektroskopische Analysen an Plastocyanin-Linien

Durch Untersuchung der Chlorophyllfluoreszenz können Aussagen über den Status und Störungen des Photosynthese-Apparates der Plastocyanin-Mutanten gemacht werden. Mit dem PAM101-Fluorometer wurden 8 Wochen alte Pflanzen aus Sterilkulturen analysiert. Hierbei wurden folgende Parameter erfasst: die Effizienz der photochemischen Reaktion des PSII (F_v/F_m); die effektive Quantenausbeute des PSII (Φ_{II}); der Redoxzustand des primären Elektronenakzeptors Q_A von PSII: (1-qP; *excitation pressure on PS II*).

Tabelle 2-8A: Spektroskopische Analysen der Plastocyanin-Linien.

	F_{vm}	Φ_{II}	1-qP
35SCaMV::PetE1	0,82 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01
35SCaMV::PetE2	0,82 \pm 0,01	0,76 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01
Wt	0,82 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02
<i>pete1-1.1 / pete1-1.1</i> und <i>PetE2 / PetE2</i>	0,82 \pm 0,01	0,75 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01
<i>pete1-1.1 / PetE1</i> und <i>pete2-1.1 / PetE2</i>	0,83 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02
<i>pete1-1.1 / pete1-1.1</i> und <i>pete2-1.1 / PetE2</i>	0,83 \pm 0,01	0,71 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
<i>PetE1 / PetE1</i> und <i>pete2-1.1 / pete2-1.1</i>	0,83 \pm 0,01	0,71 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03
<i>pete1-1.1 / PetE1</i> und <i>pete2-1.1 / pete2-1.1</i>	0,82 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02
<i>pete1-1.1 / pete1-1.1</i> und <i>pete2-1.1 / pete2-1.1</i>	0,54 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01	0,94 \pm 0,01

In Sterilkultur propagierte, acht Wochen alte Pflanzen wurden mit PAM101 (60 μ E aktinisches Licht; 800 ms/2500 μ E saturierende Lichtimpuls) analysiert.

Die effektive Quantenausbeute des PSII (Φ_{II}) und der Redoxzustand von Q_A bei einer Illumination von 60 μ E weisen auf die Abhängigkeit der Photosyntheseleistung von der Menge des Plastocyanins hin. Eine signifikante Beeinträchtigung der Photosynthese wird jedoch erst ab etwa 88%iger Reduktion der Plastocyaninmenge beobachtet (*PetE1/pete1-1.1/pete2-1.1* Mutante). In Abwesenheit von Plastocyanin wie in der [*pete1-1.1/pete2-1.1*]-Mutante, kann nur noch F_v/F_m ermittelt werden ($F_v/F_m=0,54$). Dies ist ein Hinweis darauf, dass nur geringe Mengen des Photosystem II Komplexes vorliegen. Ein effektiver Elektronentransport kann in der Doppelmutante jedoch nicht mehr stattfinden.

Die effektive Quantenausbeute des PSII-Systems wurde zudem in Abhängigkeit von der Stärke des aktinischen Lichts gemessen. Die Messungen erfolgten im Bereich von 60 bis zu 1200 μ E. Bei der *pete2-1.1* Mutante wurde eine starke Abnahme der Quantenausbeute beobachtet. Im Gegensatz dazu weisen die *pete1-1.1*-Mutante eine Zunahme und Überexprimierer 35SCaMV::PetE1_[pete1-1.1/pete2-1.1] eine Abnahme der effektiven Quantenausbeute des PSII auf (Abb. 2-8). Die höchsten Werte wurden stets beim 35SCaMV::PetE2_[pete1-1.1/pete2-1.1] Überexprimierer gemessen.

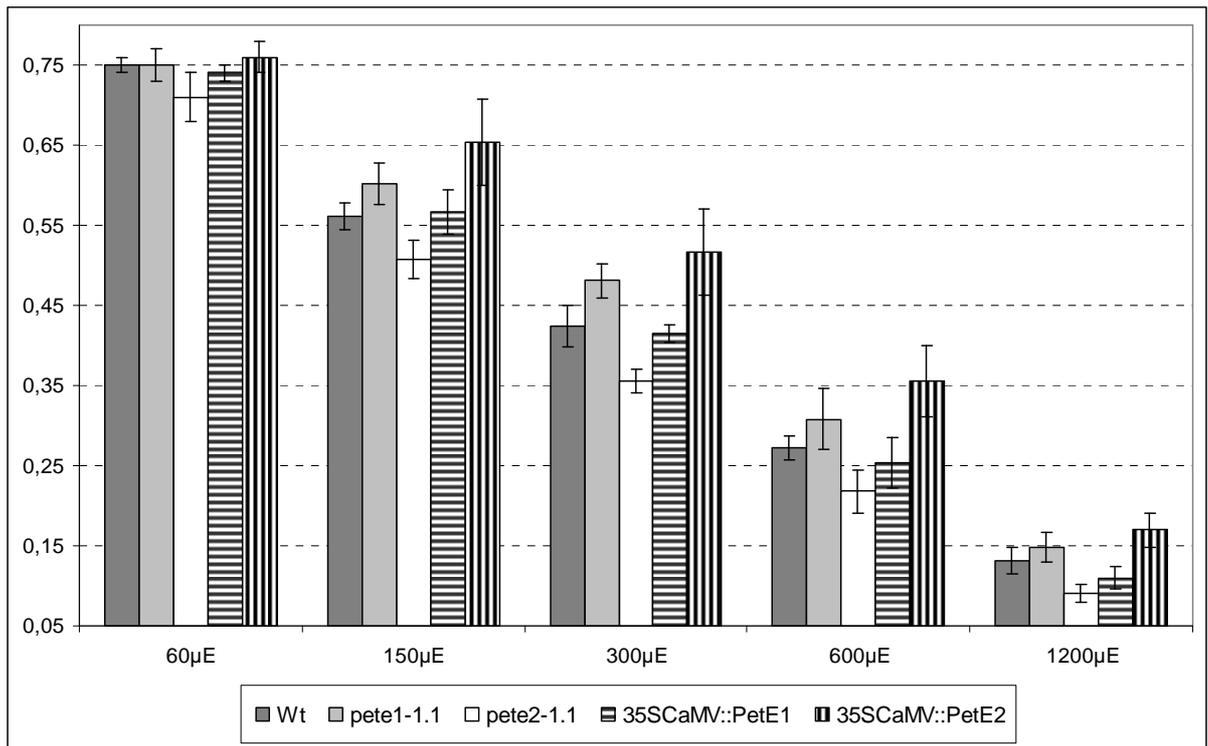


Abbildung 2-8: Messung der effektiven Quantenausbeute des PSII (Φ_{II}) in Abhängigkeit von aktinischen Lichtstärke. Eine grafische Darstellung der Daten aus der Tab. 6-8B (im Anhang).

Wie man jedoch in Abbildung 2-8 sehen kann, liegen die Unterschiede zwischen den Mutanten oft innerhalb der Standardabweichung. Auch mittels vielfacher Wiederholung der Messungen und konnte das Problem der hohen Standardabweichung der Messwerte nicht gelöst werden. In allen Messreihen waren jedoch die beschriebenen Tendenzen reproduzierbar (Beispiel: Tab. 6-8C; Anhang).

Neben der photosynthetischen Energielöschung (qP) spielt auch die nicht-photochemische Energielöschung (NPQ) eine bedeutende Rolle für die physiologische Gesamtleistung der Pflanzen. Die einzelnen Bestandteile der NPQ: die *state transition* (qT); Photoinhibition (qI) und die Wärmedissipation (qE) wurden spektroskopisch aufgelöst. In keiner der Plastocyanin - Einzelmutanten konnte eine signifikante Veränderung des qT (Tab. 6-5) oder qI (Tab. 6-6) beobachtet werden. Die Effekte der Wärmedissipation (qE) der Plastocyanin-Mutanten machten sich in wesentlichen unter niedrigen Lichtintensitäten bemerkbar (Tab. 2-8D). Bei einer Illumination mit 150 μ E konnte eine signifikant höhere Wärmedissipation in der *pete1-1.1*- Mutanten und *35SCaMV::PetE2* Überexprimierern beobachtet werden. Hingegen, in der *pete2-1.1* Mutante ließen sich signifikant schwächere Wärmedissipation beobachten. Mit

steigender Lichtintensität wurden die relativen Unterschiede zwischen den Mutanten jedoch geringer (ausführliche Angaben befinden sich im Anhang, Tab. 6-6).

Tabelle 2-8D: Die Wärmedissipation (qE) der Plastocyanin-Mutanten und Überexprimierer.

qE	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV::PetE1	35SCaMV::PetE2
150µE	0,55 ^{+/-} 0,14	0,65 ^{+/-} 0,14	0,14 ^{+/-} 0,11	0,67 ^{+/-} 0,1	1,03 ^{+/-} 0,05
300µE	1,02 ^{+/-} 0,18	1,12 ^{+/-} 0,14	1,12 ^{+/-} 0,14	1,37 ^{+/-} 0,09	1,24 ^{+/-} 0,39
600µE	1,61 ^{+/-} 0,14	1,59 ^{+/-} 0,2	1,53 ^{+/-} 0,19	2,04 ^{+/-} 0,28	1,64 ^{+/-} 0,23
1200µE	2,22 ^{+/-} 0,15	2,49 ^{+/-} 0,31	2,33 ^{+/-} 0,29	3,1 ^{+/-} 0,39	2,43 ^{+/-} 0,3

Die Ermittlung der Wärmedissipation erfolgte mit einem PAM101-Instrument bei Raumtemperatur.

2.1.9. P₇₀₀-Oxidation der Plastocyanin-Mutanten und Überexprimierer

Aus Messungen des Reduktionszustands von P₇₀₀ (in *steady-state* Situation) lassen sich Rückschlüsse über den Redoxzustand der Elektronentransportkette ziehen. Im Dunkeln ist das P700 reduziert und unter Belichtung mit fernrotem Licht vollständig oxidiert. Im aktinischen Licht stellt sich ein intermediärer Oxidations- bzw. Reduktions-Zustand ein. Die Licht-Abhängigkeit des Übergangszustands gibt Aufschluss über die Effizienz des Elektronentransports zwischen den beiden Photosystemen. Die relativen Oxidationswerte (in % oxid. P₇₀₀) wurden mit dem PSI Gehalt der Genotypen normalisiert und in der Abbildung 2-9 und Tabelle 6-9 zusammengefasst.

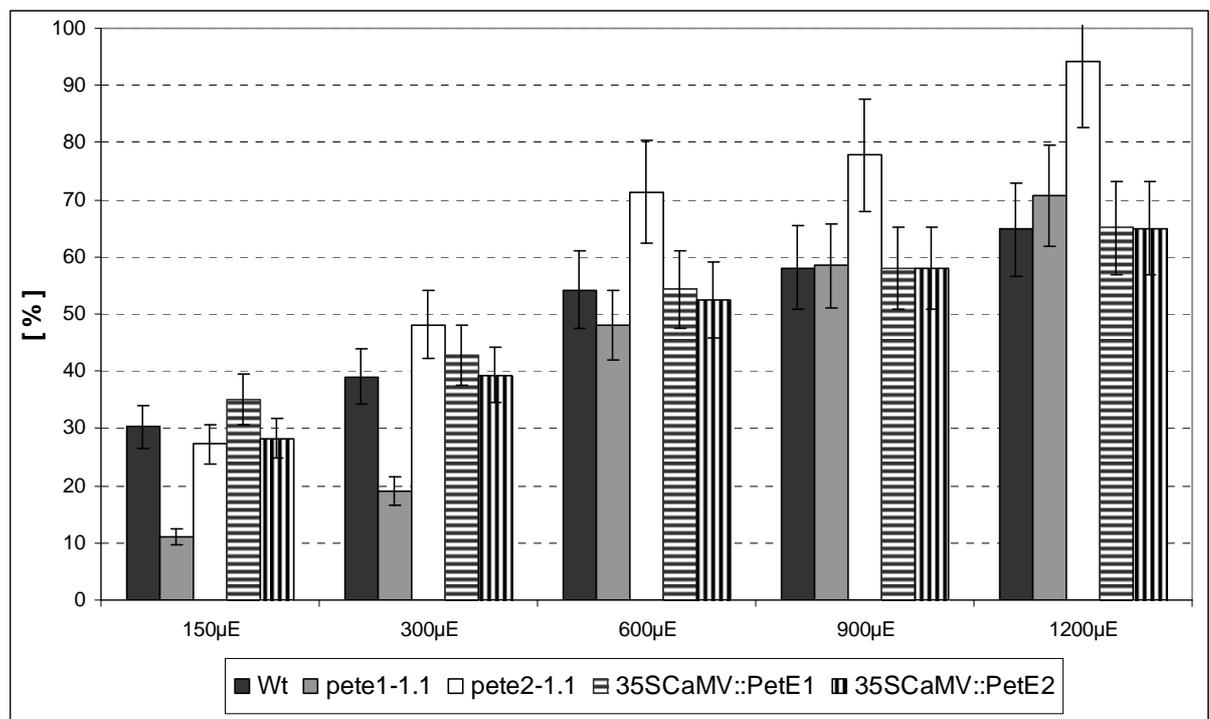


Abbildung 2-9: Relativer Oxidationszustand von P₇₀₀ unter unterschiedlichen Lichtintensitäten. Eine grafische Darstellung der Daten aus der Tab. 6-9 (im Anhang).

Eine, von der Plastocyanin-Abundanz abhängige Veränderung des *steady-state* Redoxzustands der P₇₀₀-Reaktionszentren im Vergleich zum Wildtyp wurde nur unter einer starken aktinischen Illumination in den defizienten Plastocyanin-Mutanten festgestellt. Wie man in der Abbildung 2-9 sehen kann führte die erhöhte Menge des Plastocyanins in den 35SCaMV::*PetE*-Überexprimierer nicht zu einer schnelleren Reduktion der P₇₀₀-Reaktionszentren. In der *pete2-1.1*-Mutante, mit einer sehr niedrigen Konzentration des Plastocyanins konnte eine signifikante Zunahme der Oxidation der P₇₀₀-Reaktionszentren ab einer aktinischen Illumination mit 300 µE beobachtet werden. Mit steigender Intensität der Illumination vergrößerte sich die Differenz zum Wildtyp von 10% bis auf etwa 30% (bei 1200 µE). In der *pete1-1.1*-Mutante wurde hingegen eine einsetzende Oxidationszunahme der P₇₀₀-Reaktionszentren gegenüber dem Wildtyp erst bei Illumination von 1200µE beobachtet. Der Grad der P₇₀₀-Oxidation ist unter diesen Bedingungen etwa proportional zur mRNA-Abundanz des Plastocyanins in den beiden *pete*-Mutanten.

Bis zu einer Lichteinstrahlung von etwa 600 µE konnte in der *pete1-1.1*-Mutante eine, von der Plastocyanin-Abundanz unabhängige Veränderung der *steady-state* Situation im Redoxzustand der P₇₀₀-Reaktionszentren festgestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp führte die Abwesenheit des *PetE1*-Genprodukts zu einem hoch reduzierten Zustand der P₇₀₀-Reaktionszentren. Eine gegenteilige Tendenz kann in dem 35SCaMV::*PetE1*-Überexprimierer beobachtet werden. Offenbar trägt die Abwesenheit des *PetE1*-Genprodukts zu einer höheren Effizienz des Elektronentransports zwischen beiden Photosystemen bei.

2.1.10. Kinetik der Fluoreszenzinduktion in den Doppelmutanten

In Fluoreszenz-Induktions-Experimenten wird die Änderung der Fluoreszenzausbeute beim Schließen der Reaktionszentren der Photosysteme gemessen. Die zeitaufgelöste Änderung der relativen Chlorophyll-Fluoreszenz liefert Informationen über den Zustand der Elektronentransportkette.

Dunkeladaptierte Pflanzen, sowohl der Wildtypen, als auch Plastocyanin Doppel-Mutanten wurden einem roten, gesättigten Lichtimpuls ausgesetzt. Die Änderung der resultierenden Fluoreszenz wurde 20 Sekunden lang aufgenommen. Zur Kontrolle wurden Wildtyp-Pflanzen mit 10 µM DCMU behandelt und dann analysiert (Abb. 2-10).

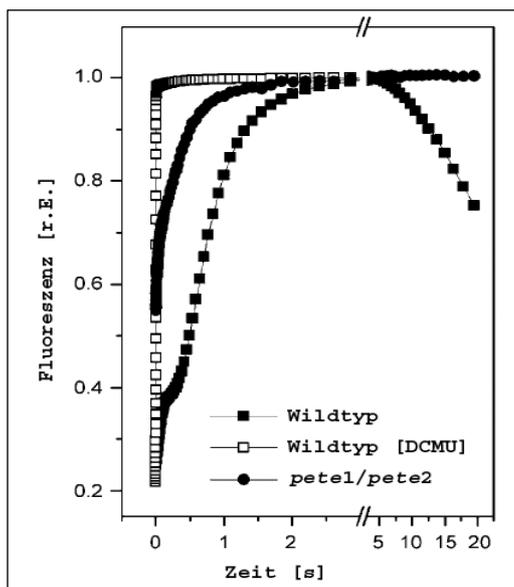


Abbildung 2-10: Kinetik der Fluoreszenz-Induktion der Plastocyanin Doppel-Mutante.

Dunkeladaptierte Pflanzen aus Sterilkulturen (Wildtyp und *pete1/pete2*: [*pete1-1.1/pete2-1.1*] Doppel-Mutanten) wurden einem roten saturierenden Lichtimpuls (680nm; 50 Photonen/Photosystem/s) ausgesetzt. Die Fluoreszenz wurde in relativen Einheiten [r.E.] über einen Zeitraum von 25s dem Blitz aufgenommen. Zur Kontrolle erfolgte eine Vakuum-Infiltration des Wildtyps mit 10 μ M DCMU. Die Messungen wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit Fabrice Rappaport (IBPC; France).

Die Inkubation von Blattmaterial mit DCMU führt zur Blockade der Elektronentransportkette am Q_A . Infolge dessen wird nach dem sättigenden Lichtblitz ein sofortiger Anstieg der Fluoreszenz auf einen Maximalwert beobachtet, auf dem die Fluoreszenz bis zur Beendigung der Messung verbleibt. Eine ungehemmte Elektronentransportkette (Wt) zeigt nur zum Beginn eine schnelle Zunahme der Fluoreszenz (bis auf etwa 0,38 relative Fluoreszenzeinheiten). Im weiteren Verlauf ist eine verlangsamte Fluoreszenzzunahme, erniedrigt durch die Aktivierung der NPQ-Mechanismen und der Aktivierung des Calvin-Zyklus, im Vergleich zu DCMU behandelten Blättern zu beobachten. Nach etwa drei Sekunden wird die maximale Fluoreszenz erreicht. Mit zunehmender Aktivität des Calvinzyklus- und der NPQ-Mechanismen erfolgt bereits nach fünf Sekunden eine rasche Abnahme der relativen Fluoreszenz. Die Kinetik der Chlorophyllfluoreszenz der [*pete1-1.1/pete2-1.1*] Doppel-Mutante verhält sich ähnlich wie bei Pflanzen mit blockiertem Elektronentransport. Die maximale Fluoreszenz wurde hier viel schneller erreicht als im unbehandelten Wildtyp. Aufgrund der Unfähigkeit der Pflanzen zur Nutzung der Lichtenergie bleibt diese maximale Fluoreszenz bis zum Ende der Messung bestehen.

2.1.11. Kinetiken der Cytochrom *f* Oxidation und der Photosystem I Reduktion

Neben der im Kap. 2.1.5 beschriebenen Methoden zur Bestimmung der Plastocyanin-Konzentration wurden hierfür Kinetikstudien der Cyt *f* -Oxidation und der PSI Reduktion

durchgeführt. Eine Änderung des Cyt *f* - Oxidationszustands lässt sich über die Änderung der Absorption bei 554 nm zu 545 nm (mit einer Basislinie bei 573 nm) verfolgen. Die zeitlich aufgelösten Änderungen der Absorption wurden in der Abb. 2-11A grafisch dargestellt.

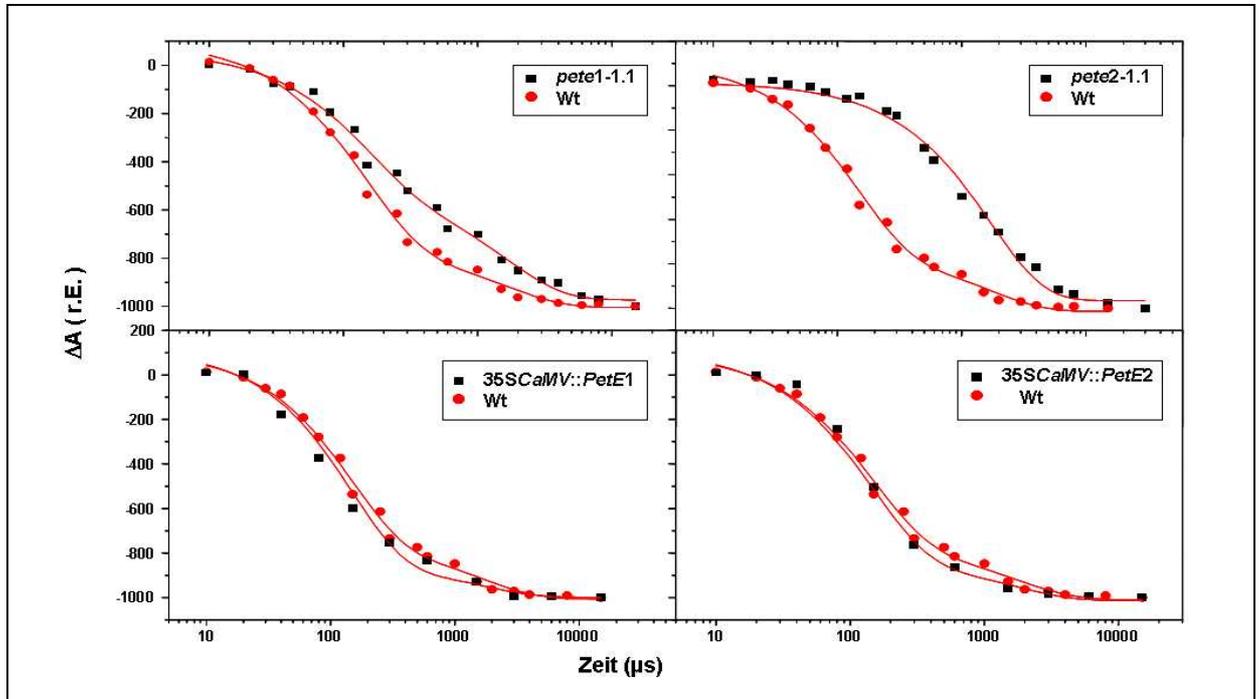


Abbildung 2-11A: Hochauflösende Absorptions-Messungen der Cyt *f* Oxidationskinetik.

Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen propagiert und im Alter von 8 Wochen analysiert. Die Kinetik der Cyt *f* - Oxidation wurde für die Plastocyanin-Mutanten (schwarze Kästchen) im Vergleich zum Wildtyp (rote Kästchen) aufgenommen. Vermessen wurde die Änderung der Absorption bei 554 nm zu Basislinie (554 und 545 nm). Diese Messungen wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit Fabrice Rappaport (IBPC; France).

Bei diesen Messungen zeigten beide Plastocyanin-defiziente Mutanten (*pete1-1.1* und *pete2-1.1*) eine verlangsamte Oxidation der Cyt *f* - Untereinheit. Dagegen, konnte man eine geringfügig schnellere Cyt *f* - Oxidation bei den beiden Überexprimierern (*35SCaMV::PetE1*; *35SCaMV::PetE2*) beobachten. Die PSI-Reduktion wurde über eine Änderung der Absorption beim Übergang von P_{700}^+ nach P_{700} bei 826 nm bestimmt. Da eine Anregung des PSI nur bis max. 760 nm beobachtet wurde, kann das Messlicht mit Wellenlängen größer 800 nm keine Ladungstrennung mehr verursachen. Die quantitative Bestimmung der Plastocyanin-Abundanz über den P_{700}^+ zu P_{700} Übergang wurde in der Abb. 2-11B der Cyt *f* - Oxidation gegenüber gestellt. Die *pete2-1.1* und die *35SCaMV::PetE1* Pflanzen zeigen eine Übereinstimmung in der Oxidation des Cytochrom b_6/f -Komplexes relativ zu der Reduktion des PSI-Komplexes. In der *pete2-1.1* Mutante kann daher eine sehr niedrige Abundanz des Plastocyanins angenommen werden. Im *35SCaMV::PetE1* Überexprimierer sollte sie leicht das Niveau des Wildtyps übersteigern. Die beiden anderen Genotypen weisen eine Diskrepanz zwischen der Cyt *f* - Oxidation und dem PSI - Redoxzustand. Auf den *pete1-1.1*

und *35SCaMV::PetE2* Pflanzen lag die, über PSI-Redoxzustand bestimmte Plastocyaninmenge deutlich über der Abundanz des Wildtyps. Die Ergebnisse beider Messmethoden weisen deutlich auf die Unterschiede in der Interaktion beider Plastocyanin-Isoproteine mit den Cytochrom *b₆/f*- und Photosystem I-Komplexen hin (Abb. 2.11B). Die Kinetik der Cytochrom *f* Oxidation entspricht in wesentlichen der mittels IEF/SDS-Page (Kap. 2.1.5) ermittelten Plastocyanin-Abundanz in den *pete*-Mutanten. Hingegen, ein Überschuss an Plastocyanin in den *35SCaMV::PetE*-Mutanten trägt nicht mehr zu einer schnelleren Oxidation der Cytochrom *f*-Untereinheit bei. Die Ergebnisse der P_{700+}/P_{700} -Messungen folgen den bereits in Kapitel 2.1.9 vorgestellten Daten des *steady-state* P_{700} -Redoxzustands bei 300 μ E. Eine Ausnahme bildet hier die *35SCaMV::PetE2*-Linie. Das, über den P_{700+}/P_{700} -Übergang bestimmte Äquivalent der der Plastocyanin-Abundanz ist in ihr wesentlich größer als die relative P_{700} -Redoxsituation im Gleichgewichtszustand (Abb. 2-9).

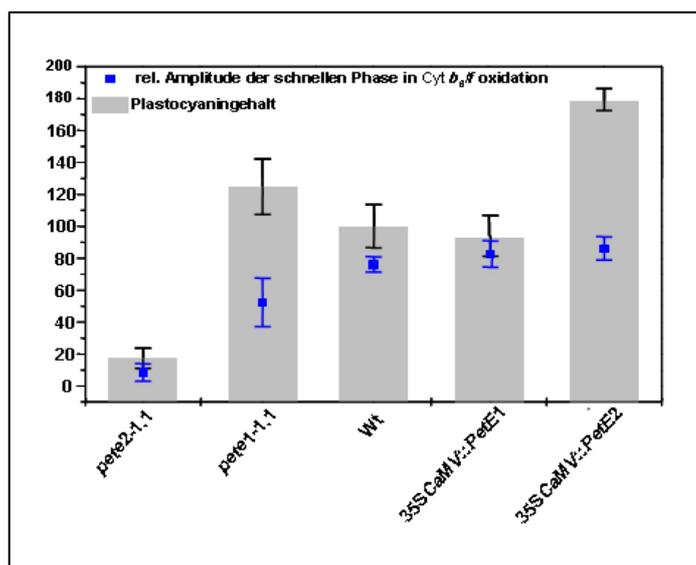


Abbildung 2-11B: Ein Vergleich der Cyt *f* Oxidationskinetik zum Plastocyanin-Gehalt der Plastocyanin-Mutanten. Die relative Amplitude (in % des Wildtyps) der schnellen Phase der Cyt *f*-Oxidation (blau) wurde dem, über P_{700+}/P_{700} Redoxübergang (in % des Wildtyps) bestimmten Plastocyanin-Gehalt (grau) gegenüber gestellt. Diese Messungen wurden durchgeführt in Zusammenarbeit mit Fabrice Rappaport (IBPC; France).

2.1.12. Wachstum der Plastocyanin-Mutanten auf Medien mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen

Wegen seiner Toxizität muss in Zellen und Geweben die Konzentrationen des Mikroelements Kupfer in einem sehr engen Rahmen kontrolliert sein. Daher müssen die Aufnahme, Chelatierung und Speicherung exakt reguliert erfolgen. In Pflanzen wird der Hauptanteil des Kupfers in Plastocyanin gespeichert. Die Akkumulation der Plastocyanin-mRNA ist jedoch von der Konzentration des Cu^{2+} im Medium unabhängig (Merchant und Bogorad 1986a). Aufgrund einer proteolytischen Kontrolle wird auch die Abundanz des Apo-Plastocyanins in

Chloroplasten niedrig gehalten (Merchant und Bogorad 1986b). Nachfolgend sollte geprüft werden, wieweit sich toxische und limitierende Kupferkonzentrationen in Medium auf das Wachstum der Plastocyanin-Mutanten auswirken. Die Mutanten wurden in Sterilkultur, auf MS-Medium mit Cu^{2+} (von $0\mu\text{M}$ bis $100\mu\text{M}$) für 11 Wochen propagiert.

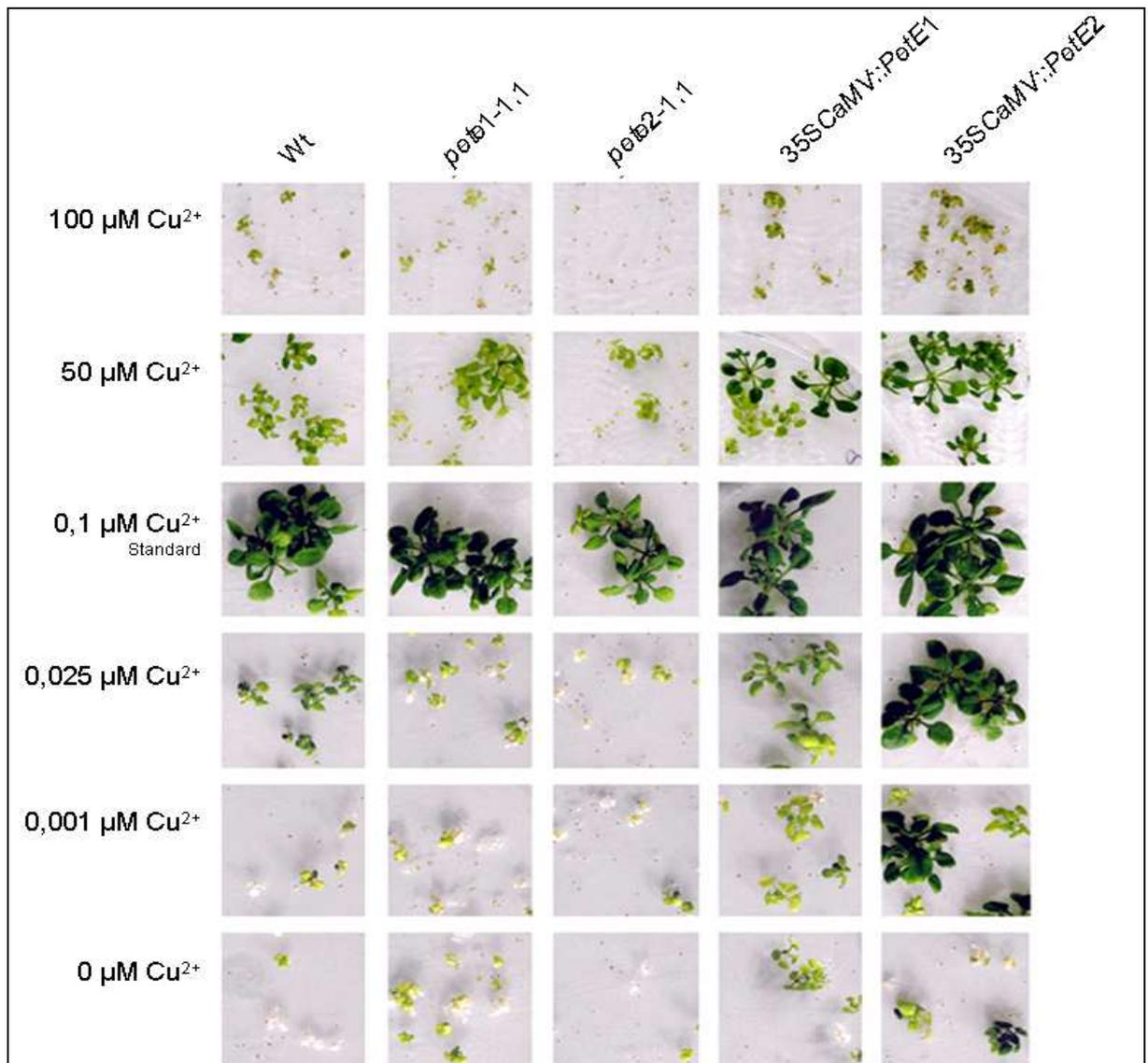


Abbildung 2-12: Wachstum der Plastocyanin-Mutanten auf Medium mit veränderter Kupferkonzentrationen. Die Mutanten wurden für 11 Wochen, in Sterilkultur auf zuckerfreiem MS-Medium propagiert. Das Mikroelement Kupfer wurde als $\text{CuSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dem Medium zugefügt.

Die Fähigkeit der Pflanzen flexibel auf veränderte Kupferkonzentrationen im Medium zu reagieren wird signifikant von der Akkumulation des Plastocyanins bestimmt (Abb. 2-5A; 2-5C). Eine eingeschränkte Expression des Plastocyanins in den *pete*-Mutanten verhindert sowohl eine ausreichende Entgiftung toxischer Cu^{2+} -Mengen wie auch effiziente Speicherung und Nutzung des Metalls unter limitierenden Bedingungen. Die Wachstumsfähigkeit der

pete2-1.1 Mutante wurde sowohl unter toxischen als auch unter limitierenden Cu^{2+} Konzentrationen deutlich inhibiert (Abb. 2-12). Das Wachstum der *pete1-1.1* Mutante wurde dagegen nur unter limitierenden Cu^{2+} Konzentrationen beeinträchtigt. Unter toxischen Bedingungen wurde kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet. Die Überexpression des Plastocyanins ermöglicht den *35SCaMV::PetE*-Linien in einem weitaus größeren Umfang auf veränderte Kupferkonzentration zu reagieren. Beide Überexprimierer, wuchsen daher unter den beiden Grenzbedingungen besser als die Wildtyp-Pflanzen.

2.2. Charakterisierung der *atc_x*-Mutanten

2.2.1. Das *Atc_x*-Gen aus *Arabidopsis thaliana*

Das Cytochrom *c_x* Gen (*Atc_x*; AGI-Locus-Nummer: At5g45041) liegt auf dem Chromosom 5, BAC: K21C13 bei 72071-73356. Der regulatorische Bereich des Gens ist kurz. So beträgt der Abstand zwischen der 3'UTR des benachbarten At5g45050 Gens und der 5'UTR des *Atc_x*-Gens gerade 66 Nukleinsäuren. In diesem Bereich ließen sich wenige konservierte Promotor-Domänen feststellen. Zum einen sind es mehrere Licht-Antwort-Elemente (LERs; *Light-Responsive Elements*) wie die I-Boxen; GAG-Motiv; GA-Motiv und CMA1-Motiv, zum anderen zwei "Amylase-Boxen"(Abb. 2-13A).

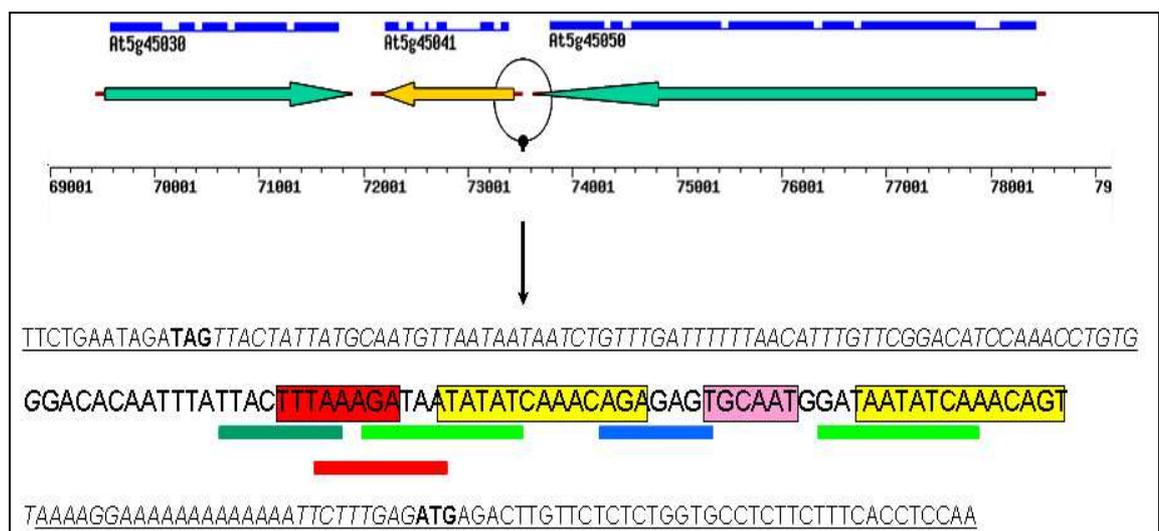


Abbildung 2-13A: Das regulatorische Bereich des *Atc_x*-Gens.

Das *Atc_x*-Gen (gelbes Pfeil; At5g45041) liegt in *Bac*:K21C13 auf dem Chromosom 5. Auffällig ist ein geringer Abstand (66bp; in großer Schrift dargestellt) zwischen den UTR Bereichen (kursiv) der Gene. In der möglichen Promotorregion liegen nur wenig konservierte Domänen wie: Amylase-Box (gelbe Markierung); CAAT-Box (lila Markierung); TATA-Box (rote Markierung); Chs-CMA1-Domäne (dunkelgrüne Balken); GA-Motiv (rotes Balken); GAG-Motiv (blaues Balken); I-Box (hellgrünes Balken). Die Bestimmung der Domänen erfolgte mittels PlantCare-Online Server (<http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE/>)

Der Aufbau dieses Promotorbereiches kann dahingehend interpretiert werden, dass generell eine schwache, jedoch im Licht- und in der Keimung induzierte Genaktivität zu erwarten ist. Weiterhin kann anhand eines "digitalen Northern" (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) eine experimentell ermittelte, schwache Abundanz der *Atc_x* mRNA bestätigt werden (Abb. 2-13B; Abb. 2-14B).

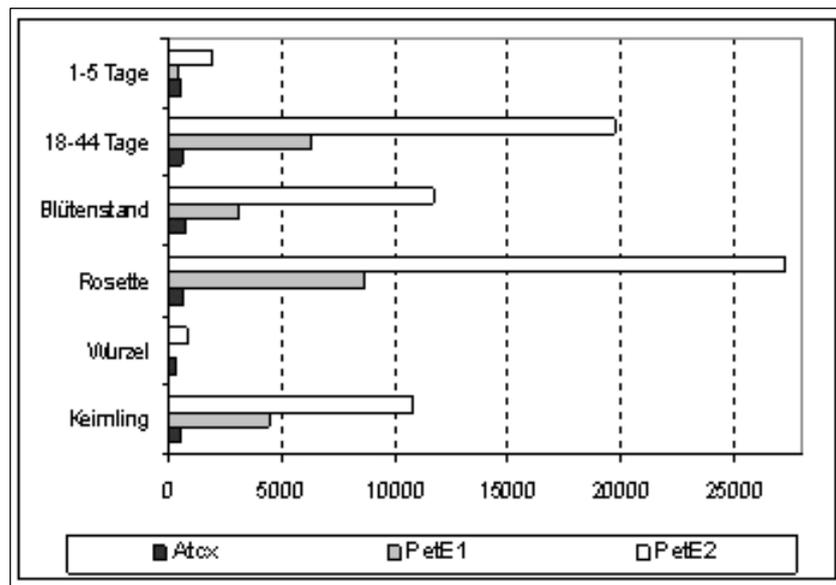


Abbildung 2-13B: Die *Atc_x* mRNA-Akkumulation ermittelt mittels Genevestigator. Die Abundanz des *Atc_x*-Transkripts (schwarze Boxen) während der Entwicklungsphasen (1-5 Tage; 18-44 Tage) und in verschiedenen Pflanzenorganen von *Arabidopsis thaliana* wurden mit Transkriptmengen der beiden Plastocyanin-Gene (*PetE1*, graue Boxen; und *PetE2*, weiße Boxen) verglichen.

Die Aminosäureabfolge des *Atc_x*-Proteins zeichnet sich durch hohe Homologie zu anderen Cytochrom *c₆* Familienvertretern der höheren und niederen Pflanzen aus (Abb. 2-13C). Bei höheren Pflanzen enthalten die Cytochrom *c₆*-ähnliche Proteine eine zusätzliche, hochkonservierte Sequenz von 12 Aminosäuren. In dieser sind zwei Cysteine enthalten, die untereinander eine Disulfidbrücke bilden könnten (Abb. 2-13D). In Cyanobakterien existierten zwar mehrere Loci für das Cytochrom *c₆*, keines davon enthält jedoch ein zusätzliches *Loop*.

Wegen der neuen Domäne und der ungeklärten Funktion des Cyt *c₆*-Homologen wurde eine Benennung des Proteins als Cytochrom *c_x* vorgeschlagen (Weigel *et al.* 2003).

Nachdem das Genom der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html>) sequenziert wurde, stand fest, dass diese Form des Cytochroms auch bei Grünalgen vorkommt. Aufgrund phylogenetischer Zugehörigkeit,

schlägt Wastl *et al.* (2004) eine erneute Umbenennung des Proteins in Cyt c_x vor. In dieser Arbeit verbleibt jedoch die Bezeichnung des Proteins als Cytochrom c_x bestehen.

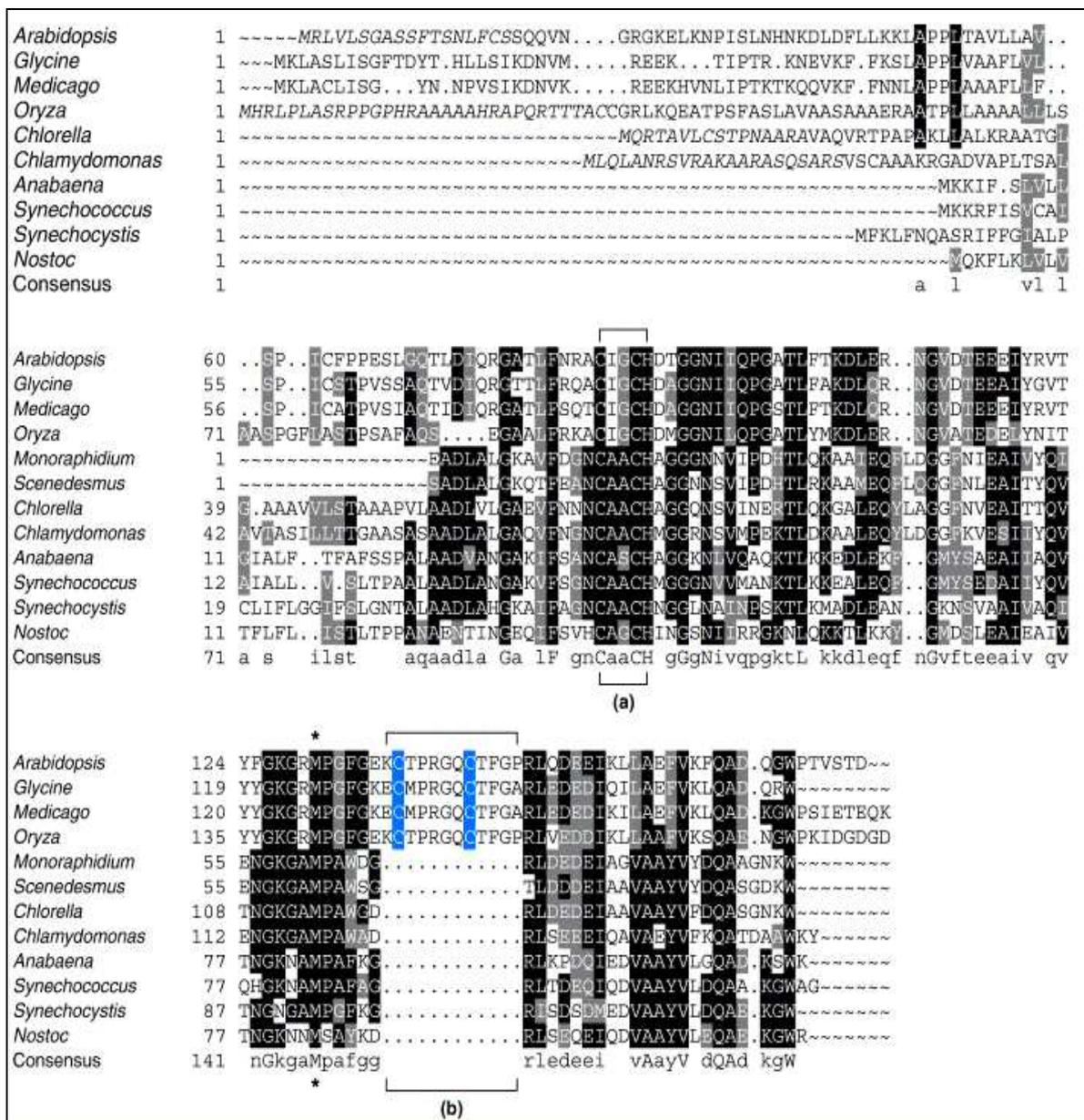


Abbildung 2-13C: Ein Vergleich der Primärstruktur der Cytochrom c_x - ähnlicher Proteine. Unter Verwendung von PILEUP und GCG-Softwarepakete wurden Aminosäuresequenzen der Cytochrom c_x - ähnlichen Proteine aus folgenden Organismen verglichen: höhere Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, At5g45041; *Oryza sativa*, GI:27817894; *Glycine max*, GI:9439965; *Medicago truncatula*, GI:11610049), Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*, GI:2144284; *Monoraphidium braunii*, GI:479935; *Chlorella vulgaris*, GI:30578151; *Scenedesmus obliquus*, GI:7430460) und Cyanobakterien (*Anabaena variabilis*, GI:20141074; *Nostoc* sp. (Stamm PCC 7120), GI:27734243; *Synechocystis* sp. (Stamm PCC 6803), GI:538865; *Synechococcus elongatus*, GI:25014058). Innerhalb des Vergleichs wurde eine Konsensussequenz dargestellt: In großen Buchstaben sind die hoch konservierten Aminosäuren dargestellt und die kleinen Buchstaben repräsentieren ähnliche Aminosäuren. Besonders gekennzeichnet wurden: die Häm - bindende Domäne (a) und das Eisen stabilisierendes Methionin (Sternchen). Die Sequenzen höherer Pflanzen enthalten eine zusätzliche 12 Aminosäuren große Schleife (b) mit zwei Cysteinen (in blau). Die, mittels TargetP-Programm vorhergesagten Chloroplasten - transit peptide - Sequenzen, wurden kursiv dargestellt (Weigel *et al.* 2003).

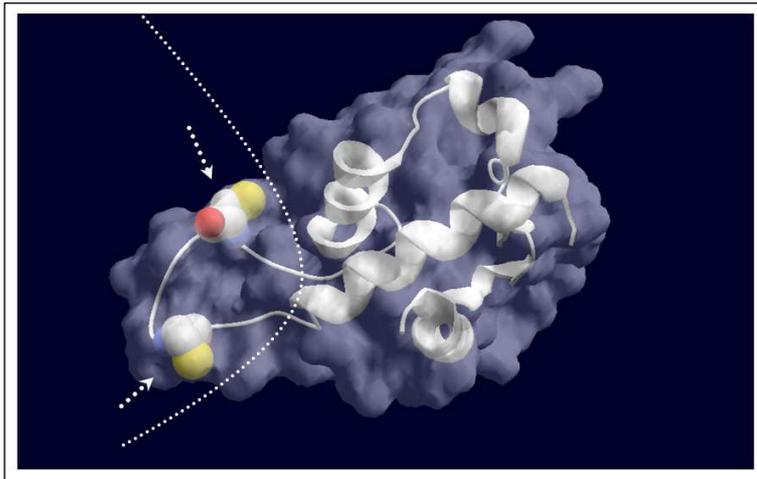


Abbildung 2-13D: Vorhergesagte Tertiärstruktur des Atc_x (links). Die für die höheren Pflanzen spezifische zusätzliche Schleife liegt vor der gepunkteten Linie. Die beiden Cysteine der Schleife wurden mit Pfeilen markiert. Diese Struktur wurde mittels homologer Modellierung erstellt und in SPDBV-Software V3.7 visualisiert.

2.2.2. Cytochrom c_x - Mutanten, Expression und Phänotyp

Für die Funktionsanalysen des Cytochrom c_x -Genprodukts wurden zwei atc_x -Mutanten vom SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (Torrey Mesa Research Institut, San Diego, USA) bezogen. Bei beiden Mutanten wurde das Atc_x -Gen durch eine 5,2 kbp große T-DNA Insertion des Vektors *pROK2* unterbrochen. Das atc_x -1 Allel (Salk_011266) enthält die Insertion im ersten Exon des Gens, bei +16bp relativ zum Start-Codon. Die linke Grenze der T-DNA ist in Richtung des Stopp-Codons orientiert (ATG..._{126bp}[rb-T-DNA-lb]_{127bp}...TAG). Das atc_x -2 Allel (Salk_060643) enthält die Insertion im ersten Intron des Gens, bei +126bp relativ zum Start-Codon. Die linke Grenze der T-DNA ist in Richtung des Stopp-Codons orientiert (ATG..._{16bp}[rb-T-DNA-lb]_{17bp}...TAG). Die Bestimmung des Genotyps in diesen Mutanten erfolgte mit allelspezifischen PCR-Reaktionen (Abb. 2-14A; a.-c.). Die Produkte der PCR-Reaktionen wurden sequenziert und auf Homologie zu *pROK2* und Atc_x -Gen geprüft. In beiden Mutanten-Allelen (atc_x -1 und atc_x -2) konnte kein Transkript des Atc_x -Gens festgestellt werden (Abb. 2-14A; d.-f.).

Eine der grundlegenden Fragestellungen dieser Arbeit, ob das Atc_x -Genprodukt die Funktion von Plastocyanin in höheren Pflanzen ersetzen kann, erforderte die Herstellung von Linien mit ektopischer Überexpression des Atc_x -Gens in Plastocyanin-Doppelmutanten (*pete1-1.1/pete1-1.1* / *pete2-1.1/pete2-1.1*). Eine Komplementation des Phänotyps, daher die Wiederherstellung der photoautotrophen Lebensfähigkeit bei solchen Linien würde auf die Funktion des Cytochrom c_x als einen Elektronencarrier zwischen Cyt b_6/f und PSI-Komplex bestätigen. Der Phänotyp der Plastocyanin-Doppelmutante würde sich lediglich mit einer schwachen Abundanz des Atc_x -Transkripts in *A. thaliana* begründen.

Zur Herstellung der Linien wurde die cDNA des *Atc_x*-Gens unter die Kontrolle von 35S*CaMV*-Promotors gebracht und via T-DNA des pJAN33-Vektors im Genom der [*PetE1/pete1-1.1* / *pete2-1.1/pete2-1.1*] - und [*pete1-1.1/pete1-1.1* / *PetE2/pete2-1.1*]-Linien inseriert.

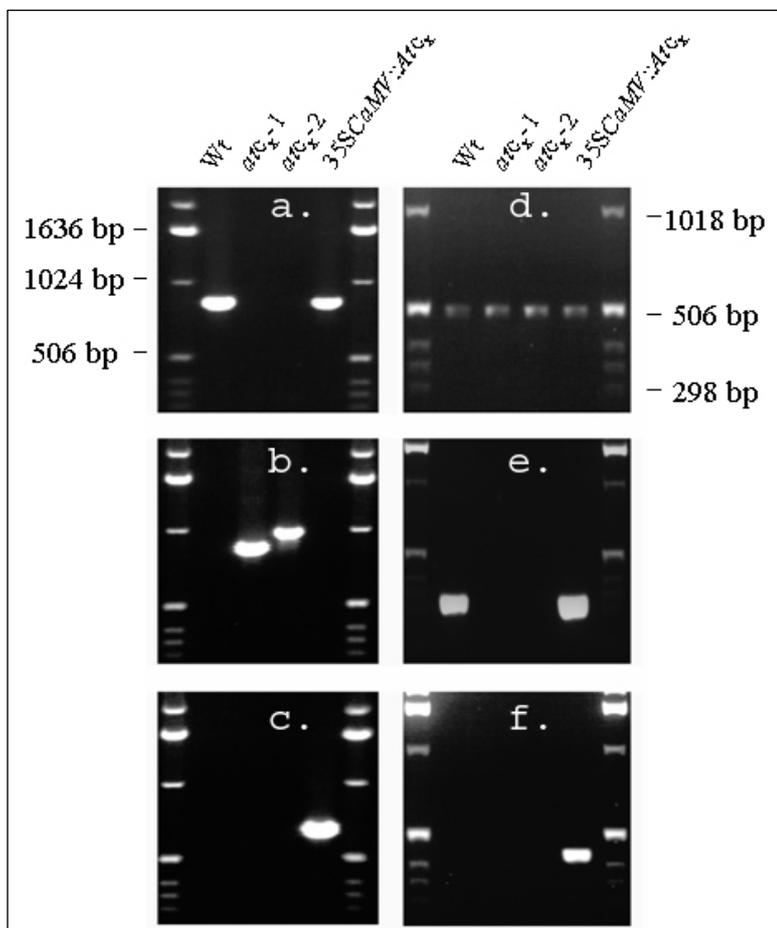


Abbildung 2-14A: PCR und RT-PCR Analysen an Cytochrom *c_x*-Linien (links). Es wurden Proben des Wt: Wildtyps, *atc_x-1* (Salk_011266); *atc_x-2* (Salk_060643), und 35S*CaMV*::*Atc_x*-Überexprimierer analysiert. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte aus genomischer DNA: (a.) Wildtypische Allele (C6seq1s-4/2Cyt6as) (b.) p*ROK2* T-DNA Insertion (Lbb1-160/2Cyt6as) und (c.) p*JAN33* T-DNA Insertion (pJan19s/2Cyt6as). Die Anwesenheit *Atc_x*-Transkripts in den oben aufgeführten Linien wurde mittels RT-PCR geprüft. (d.) *Actin1*-Amplifikation zur Kontrolle der cDNA (acts/actas), (e.) Transkript des *Atc_x*-Gens (C6seq1s-4/2Cyt6as) und (f.) 35S*CaMV*::*Atc_x* vermittelte Transkript (pJan19s/2Cyt6as). Die Amplifikate wurden auf 1,5% (für a.-c.) bzw. 2,5% (d.-f.) Agarose elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid detektiert.

Die transformierten Linien wurden in Sterilkultur propagiert und selektiert. Die Abundanz des *Atc_x*-Transkripts wurde mittels Northern-Analysen geprüft. Wie in der Abbildung 2-14B deutlich wird, ist eine Akkumulation des *Atc_x*-Transkripts in den 35S*CaMV*::*Atc_x*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dieses Ergebnis wird von Western-Analysen (siehe Abbildung 2-17B) bestätigt. Die cDNA des Transkripts wurde sequenziert und auf Ihre Korrektheit überprüft. Vier unabhängige 35S*CaMV*::*Atc_x*::[*PetE1/pete1-1.1/pete2-1.1*]-Linien und vier unabhängige 35S*CaMV*::*Atc_x*::[*pete1-1.1/PetE2/pete2-1.1*]-Linien wurden auf das Vorkommen von photoautotrophen Plastocyanin Doppel-Mutationen untersucht. Für jede Linie wurden 50-80 Pflanzen mittels PCR-Reaktionen getestet. Es wurde keine autotrophe Plastocyanin Doppel-Mutante gefunden. Das Cytochrom *c_x* kann also in *A. thaliana* die Funktion des Plastocyanins nicht übernehmen. Dies ist auch dann nicht möglich, wenn das

Protein ektopisch überexprimiert wird. Die Frage nach möglichen Zusammenhang zwischen dem Cytochrom c_x Protein und der Leistung der Photosynthese sollte durch Untersuchung der *atc_x*- und *35SCaMV::Atc_x* - Mutanten (wildtypische Hintergrund) eingegangen werden.

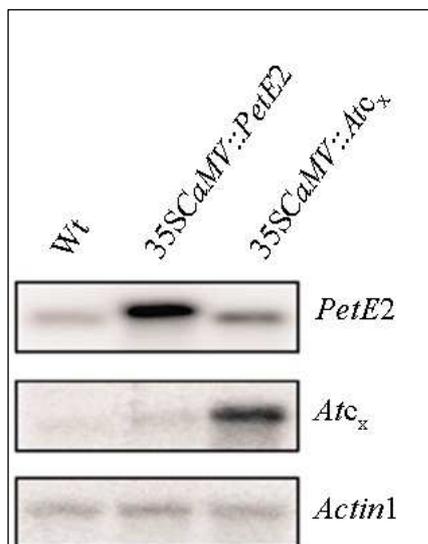


Abbildung 2-14B: Northern-Analysen an *35SCaMV::Atc_x* Linien (links).

In *35SCaMV::Atc_x*-Mutanten ist die Akkumulation des Transkripts gegenüber dem Wt: Wildtyp deutlich erhöht. Zum Vergleich wurde die Akkumulation des Plastocyanintranskripts in *35SCaMV::PetE2* Pflanzen dargestellt. Für die Northern-Analysen wurde jeweils 30 μg Gesamt-RNA mit *Atc_x* spezifischer Sonde (C6seq1s/2Cyt6as; amplifiziert aus cDNA) stringent hybridisiert. Als Kontrollen wurde *Actin1*-Sonde (acts/actas; amplifiziert aus cDNA) und *PetE* spezifische Sonde (dMWs/dR4as) hybridisiert.

Unter Langtagbedingungen propagierte *atc_x*- und *35SCaMV::Atc_x* Linien zeigten jedoch keine signifikanten Veränderungen in messbaren Photosynthese relevanten Parametern. Dazu gehörten die Bestimmung der Pigmentkomposition (analysiert mittels HPLC; Daten nicht gezeigt) und spektroskopisch messbaren Charakteristiken der Chlorophyll-Fluoreszenz (F_v/F_m ; Φ_{II} ; 1-qP; qN; qT; qP; qN hier als qI und qE gemessen; Daten im Anhang). Auch Photoinhibition-Analysen, bei denen Blattscheiben der Pflanzen einer kontinuierlichen Lichtillumination von 2000 μE (für 6 Stunden; bei Raumtemperatur) ausgesetzt wurden zeigen, keine Unterschiede in der Effizienz photochemischer Reaktion des PSII (F_v/F_m) der Mutanten verglichen mit Wildtyp-Pflanzen (Daten im Anhang). Dennoch äußerte sich die Überexpression des *Atc_x*-Gens im Wachstumsverhalten. Wie in der Tabelle 2-15 dargestellt, charakterisieren sich diese Linien durch eine verstärkte Zunahme der Blattoberflächen.

Tabelle 2-15: Bestimmung der Blattflächen der Cytochrom c_x -Linien.

Alter	Wt	<i>atc_x</i>	<i>35SCaMV::Atc_x</i>
12 Tage	8 +-1	7 +-1	12 +-3
18 Tage	35 +-6	33 +-6	58 +-10
24 Tage	155 +-19	147 +-21	262 +-54
27 Tage	325 +-40	302 +-48	558 +-75

Für die vergleichende Bestimmung der Blattflächen-Zunahme (in mm^2) wurden die Mutanten unter Langtagbedingungen propagiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Die Bestimmung der Flächen erfolgte mit der Software: VisiStore99b.

Bereits nach 25 Tagen erreichen die *35SCaMV::Atc_x*-Pflanzen die doppelte Blattoberfläche (Abb. 2-15 a. bis c.) im Vergleich zum Wildtyp-Pflanzen. Nach einer zwei wöchigen Illumination der Mutanten mit etwa 2000 μ E (16 Stunden pro Tag) lässt sich eine, signifikant höhere Resistenz der *35SCaMV::Atc_x* - Linien gegenüber der destruktiven Lichteinwirkung feststellen (Abb. 2-15 d. bis f.).

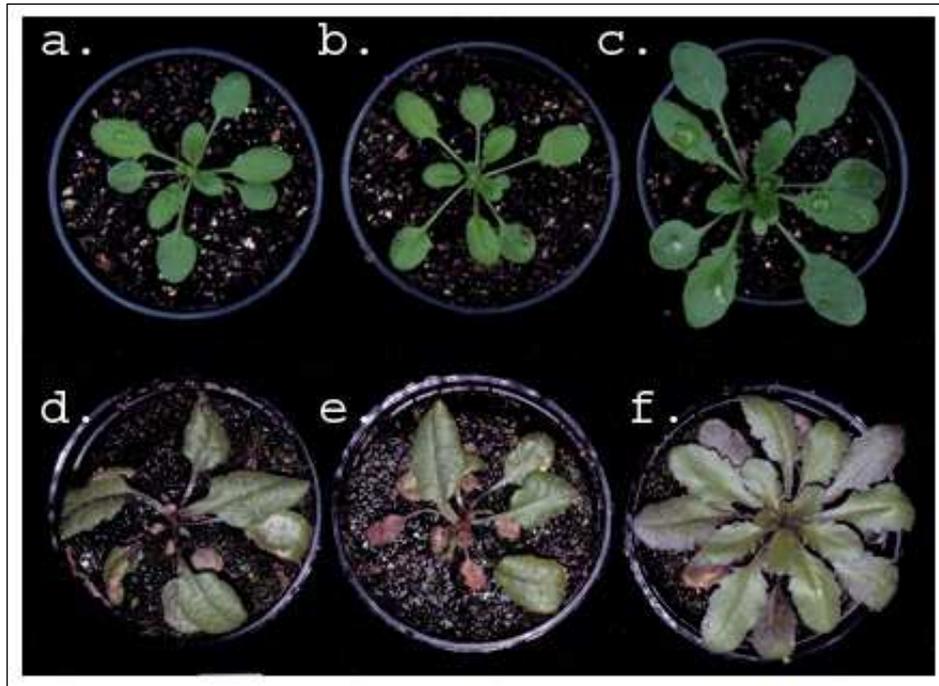
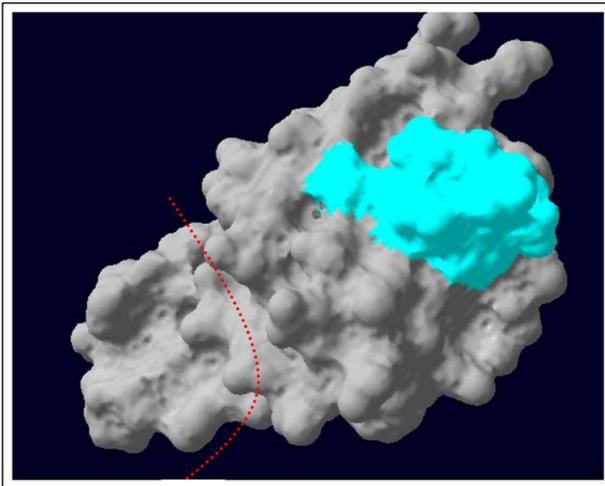


Abbildung 2-15: Wachstum der Cytochrom c_x -Linien.

In der oberen Reihe dargestellte Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen (mit etwa 150 μ E) für 6 Wochen popagiert: Wildtyp-Pflanzen (a.), atc_x -Mutanten (b.) und *35SCaMV::Atc_x*-Überexprimierer (c.). Der Phänotyp der atc_x -Mutanten ist hier von den Wildtyp-Pflanzen nicht unterscheidbar. Hingegen, die *35SCaMV::Atc_x* Überexprimierer bildet deutlich größere Blätter aus als Wildtyp-Pflanzen. In der unteren Reihe dargestellte Pflanzen wurden nach der vierten Entwicklungswoche für zwei Wochen unter dauerhafte Lichtstressbedingungen (2000 μ E; 16h pro Tag) gestellt. Sowohl die Wildtyp-Pflanzen (d.) wie auch die atc_x -Mutanten (e.) leiden rasch aufgrund der destruktiven Lichteinwirkung und Hitze. Die *35SCaMV::Atc_x*-Überexprimierer überdauern diesen Zustand.

2.2.3. Anti - Cytochrom c_x - Antikörper

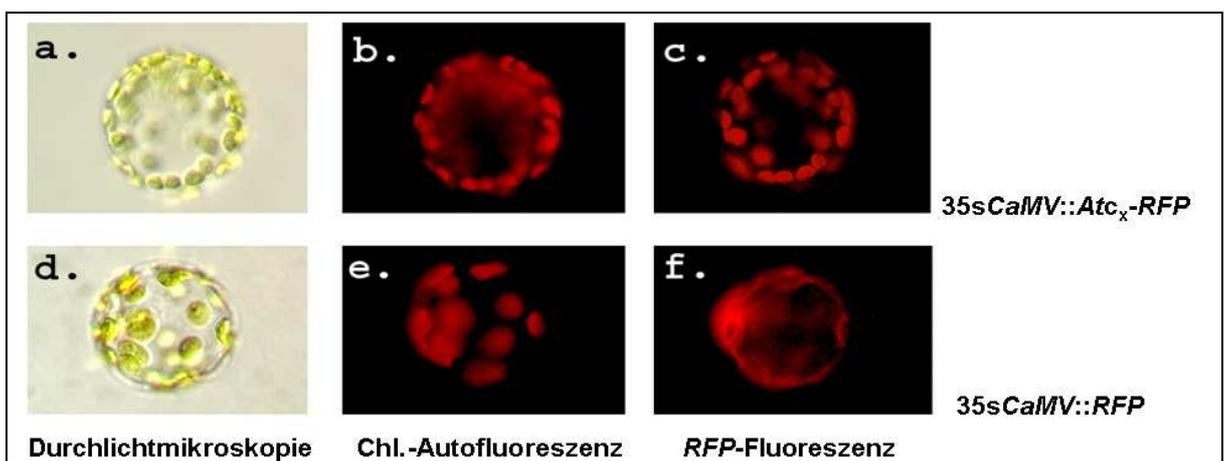
Um das Atc_x Genprodukt eindeutig nachweisen zu können, wurden Antikörper gegen das Protein auf unterschiedliche Weise hergestellt und die Resultate der Western-Analysen miteinander verglichen. Zum einen wurde das reife Protein C-Terminal mit 6xHistidin-Peptid fusioniert, in *E. coli* exprimiert (Daten nicht gezeigt), aufgereinigt und zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet. Zum anderen wurden Kaninchen mit einem synthetischen Peptid (C-₁₆₂KFQADQGWPTVS-Amid) immunisiert (Abb. 2-16). Monospezifische Antikörper wurden mittels Affinitätschromatographie gegen das reife Atc_x -Protein gewonnen. Beide Antikörper erkennen das reife, in *E.coli* exprimierte Protein (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 2-16: *Atc_x*-Epitop.

Die Auswahl des *Atc_x*-spezifischen Epitops (KFQADQGWPTVS) erfolgte mitunter Anhand einer vorhergesagten Tertiärstruktur des reifen *Atc_x*-Proteins. Dargestellt wurde die Exposition des Epitops (hellblau) auf der Proteinoberfläche. Mit einer rotgepunkteten Linie wurde die, für höhere Pflanzen spezifische Schleife markiert.

2.2.4. Lokalisation des *Atc_x* - Genprodukts

Die Lokalisation des *Atc_x*-Genprodukts wurde bereits von Gupta *et al.* 2002 beschrieben. Die nachfolgenden Analysen stellten daher eine unabhängige Überprüfung der Lokalisation dar. Zunächst wurde das *Atc_x*-Protein C-Terminal mit einem *dsRFP*-Protein fusioniert und unter der Kontrolle eines 2x35S*CaMV*-Promotors gestellt. In einer transienten Transformation von Tabakprotoplasten wurden positive Signale des *Atc_x*-*dsRFP* Proteins in den Chloroplasten beobachtet (Abb. 2-17A).

Abbildung 2-17A: Transiente Protoplastentransformation mit einem *Atc_x*-*RFP* Fusionsprotein.

Tabakprotoplasten wurden mit einem 35S*CaMV*::*Atc_x*-*RFP* Konstrukt transient transformiert (a.-c.). Die Akkumulation des *Atc_x*-Proteins erfolgt in den Chloroplasten (c.). Dagegen, verbleibt freies *RFP*-Protein in Zytoplasma und akkumuliert sich im Zellkern (d.-f.).

Anschließend erfolgte eine immunologische Lokalisationsbestimmung des Proteins in *A. thaliana* Pflanzen. Dafür wurden beide Linien (*atc_x* und 35S*CaMV*::*Atc_x*) und Wildtypen 10

Tage unter Langtagbedingungen propagiert und die Thylakoidlumen-Proteine präpariert. Die Detektion des Atc_x -Proteins erfolgte anhand von Westernanalysen. Hieraus bestätigt sich die luminaire Lokalisation des Atc_x -Proteins (Abb. 2-17B).

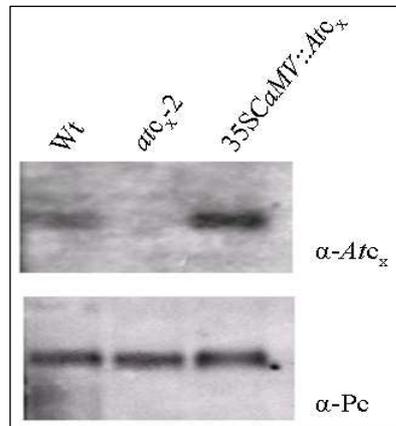


Abbildung 2-17B: Immunologische Detektion von Atc_x -Protein in Thylakoidlumen-Fraktion (links).

17 μ g Thylakoidlumen - Proteine wurden Gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Immobilon-P^{sq} Membran transferiert. Anschließend wurde das Atc_x -Protein immunologisch detektiert. Zur Kontrolle erfolgte eine immunologische Detektion des Plastocyanins

2.3. *Chlamydomonas reinhardtii* Cytochrom c_6 in *A. thaliana*.

Das Cytochrom c_x in *A. thaliana* kann nicht die Funktion des Plastocyanins übernehmen. Jedoch werden in niederen Pflanzen die Elektronen von Cytochrom b_6/f -Komplex zum P₇₀₀ des Photosystem I auch von dem homologen des Atc_x , dem Cytochrom c_6 transportiert.

Nachfolgend sollte geprüft werden ob das reife Cytochrom c_6 der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* den Elektronentransport zwischen den beiden Komplexen auch bei höheren Pflanzen (*A. thaliana*) bewirken kann.

Für diese Fragestellung wurde ein chimäres Konstrukt hergestellt. Das Transitpeptid des *PetE2*-Gens (At1g20340; Sec-abhängige Weg; Proteinfragment: ₁M-₆₈A; nach Peltier *et al.* 2002), das für den Transport des Proteins in das Thylakoidlumen verantwortlich ist, wurde mit dem reifen Peptid des Cytochrom c_6 (Cyt-552; GI:167407; Proteinfragment:₅₉A-₁₄₈Y; Merchant *et al.* 1987) aus *C. reinhardtii* fusioniert (*AtPetE2tp-ChCyt c₆mp*).

Dieses Konstrukt wurde unter die Kontrolle des (2x) 35SCaMV-Promotors und 35SCaMV-Terminators des pJAN33-Vektors gebracht (35SCaMV::*AtPetE2tp-ChCyt c₆mp*). Via *Agrobacterium tumefaciens* und Ti-Plasmids wurde dieses Konstrukt ins Genom von *Arabidopsis* Plastocyanin Doppel-Mutanten integriert. Bei der Transformation wurden zwei Genotypen transformiert, wobei jeweils ein *PetE* Loci homozygote Mutation aufwies und das andere eine Wildtypallele ([*PetE1/pete1-1.1/pete2-1.1*] bzw. [*pete1-1.1/PetE2/pete2-1.1*]).

Aus der Nachkommenschaft wurden mehrere unabhängige Transformanten selektiert. Das chimäre Gen wurde aus der genomischen DNA der Transformanten sequenziert, die Aktivität des Gens wurde mittels RT-PCR überprüft (Abb. 2-18a).

Die Akkumulation der mRNA wurde anhand von Northern-Analysen (Abb. 2-18b) mittels *ChlCyt c₆*-spezifischer Sonde bestimmt. Zur Überprüfung der richtigen Lokalisation des reifen *ChlCyt c₆*-Proteins wurden Western-Analysen der Thylakoidlumen-Proteine mit Anti-*ChlCyt c₆*-Antikörpern durchgeführt (Abb. 2-18c). Das Genprodukt des *C. reinhardtii* Cytochrom *c₆* wurde in Thylakoidlumen der *A. thaliana* Chloroplasten akkumuliert.

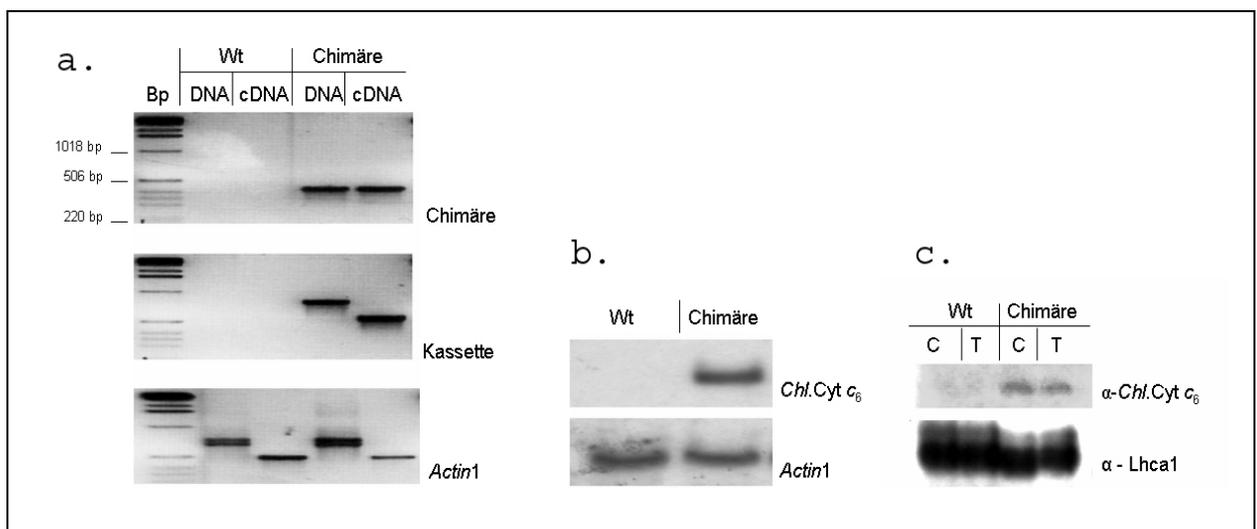


Abbildung 2-18: PCR, RT-PCR und Northern-Analysen an chimären *A. thaliana* Pflanzen.

(a.) Via pJAN33 T-DNA wurde ein chimäres Cytochrom *c₆* Konstrukt (35SCaMV::AtPetE2tp-*ChCyt c₆*mp) in die Plastocyanin Doppel-Mutanten integriert. Die Integration wurde mittels PCR-Reaktionen aus genomischer DNA für die Chimäre (*PetE2s-7/Chlas-414/444*) und für die Kasette (pJan19s/Chlas-414/444) überprüft. Die Aktivität des chimären Gens wurde aus cDNA der Transformanten überprüft. (b.) Die Überprüfung der Akkumulation des chimären Transkripts erfolgte in Northern-Analysen mit *ChlCyt c₆*-Spezifischer Sonde (Chls-4/Chlas-414/444). In allen Fällen wurden Analysen des *Actin1*-Gens (*acts/actas*) zur Kontrolle verwendet. (c.) Immunologische Detektion von *ChlCyt c₆* Chloroplastenproteine (C) und Thylakoidlumen-Proteine (T) wurden aus Wildtyp-Pflanzen und transgenen *A. thaliana* Pflanzen ((35SCaMV::AtPetE2tp-*ChCyt c₆*mp) isoliert. 30µg der Proteine wurde für Westernanalysen eingesetzt. Sowohl in Chloroplastenfraktion, als auch in der Thylakoidfraktion, wurde das *Chlamydomonas reinhardtii* Cytochrom *c₆* Protein detektiert (α -*Chl.Cyt c₆*). Zur Kontrolle erfolgte eine immunologische Detektion des Lhca1-Proteins (α -Lhca1).

Die Nachkommenschaft von jeweils fünf unabhängigen Insertionslinien (pro transformierten Genotyp) wurde auf mögliche autotrophe homozygote Doppel-Mutanten untersucht. Bis zu 50 Einzelpflanzen pro Linie (Insgesamt etwa 410 Pflanzen) wurden mittels PCR-Analysen getestet, jedoch wurde keine Doppelmutante identifiziert (Abb. 2-19).

Folglich kann auch das Cytochrom *c₆* aus *Chlamydomonas reinhardtii* den Defekt im Elektronentransport in der Plastocyanin-Doppelmutante nicht kompensieren.



Abbildung 2-19: Selektion einer Plastocyanin-Doppelmutante die als chimäre *Chl.Cyt c₆* exprimiert. [*pete1-1.1/PetE1/pete2-1.1*] und [*pete1-1.1/pete2-1.1/PetE2*]-Linien wurden mit dem Cytochrom *c₆* aus *Chlamydomonas reinhardtii* (*AtPetE2tp-ChCyt c₆mp*) transformiert. Bereits während der Selektion der transformierten Pflanzen (MS1-Medium mit $75\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Kanamycin) ließen sich transformierte homozygote Plastocyanin Doppel-Mutanten (rote Pfeil) erkennen, die nicht autotroph lebensfähig sind. Mit gelben Pfeilen wurden weitere transformierte und segregierende Nachkommen der Plastocyanin Doppelmutante markiert. Mit dem schwarzen Pfeil wurden Pflanzen markiert, die nicht transformiert wurden und daher auf Kanamycin nicht lebensfähig sind.

2.4. Untersuchung der mRNA-Expression in Plastocyanin und Cytochrom *c_x*-Mutanten.

Zur Untersuchung von Transkripten werden überwiegend Northern- oder quantitative RT-PCR-Analysen verwendet. Die klassischen Methoden werden jedoch immer mehr durch die mRNA-Microarray-Technologie ergänzt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine große Anzahl an Genen mit einer Probe parallel untersucht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Microarray Filter mit 3292 GSTs, die überwiegend kernkodierte Chloroplastenproteine eingesetzt, um die Auswirkung der Mutationen in den Plastocyanin- und Cytochrom *c_x* - Genen auf die Genexpression zu untersuchen. Sollte das Cytochrom *c_x* die gleiche Funktion wie Plastocyanin ausüben, dann würde man ein ähnliches Muster der differentiellen Genexpression in den *pete*- und *atc_x*-Mutanten erwarten.

Wie anhand der Abbildung 2-20a ersichtlich ist, sind bei der Plastocyanin-Doppelmutante die an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligten Gene überwiegend schwach und die an der Dunkelreaktion der Photosynthese beteiligten Gene überwiegend stärker als in Wildtyp exprimiert. Mit Ausnahme der Proteinbiosynthese ist die Genaktivität in alle anderen Genklassen überwiegend reprimiert. Das Muster der differentiellen Genexpression in der Doppelmutante spiegelt ihre heterotrophe Lebensweise, die sich in der Unfähigkeit der Pflanzen zum lichtbetriebenen Elektronentransport begründet, wider.

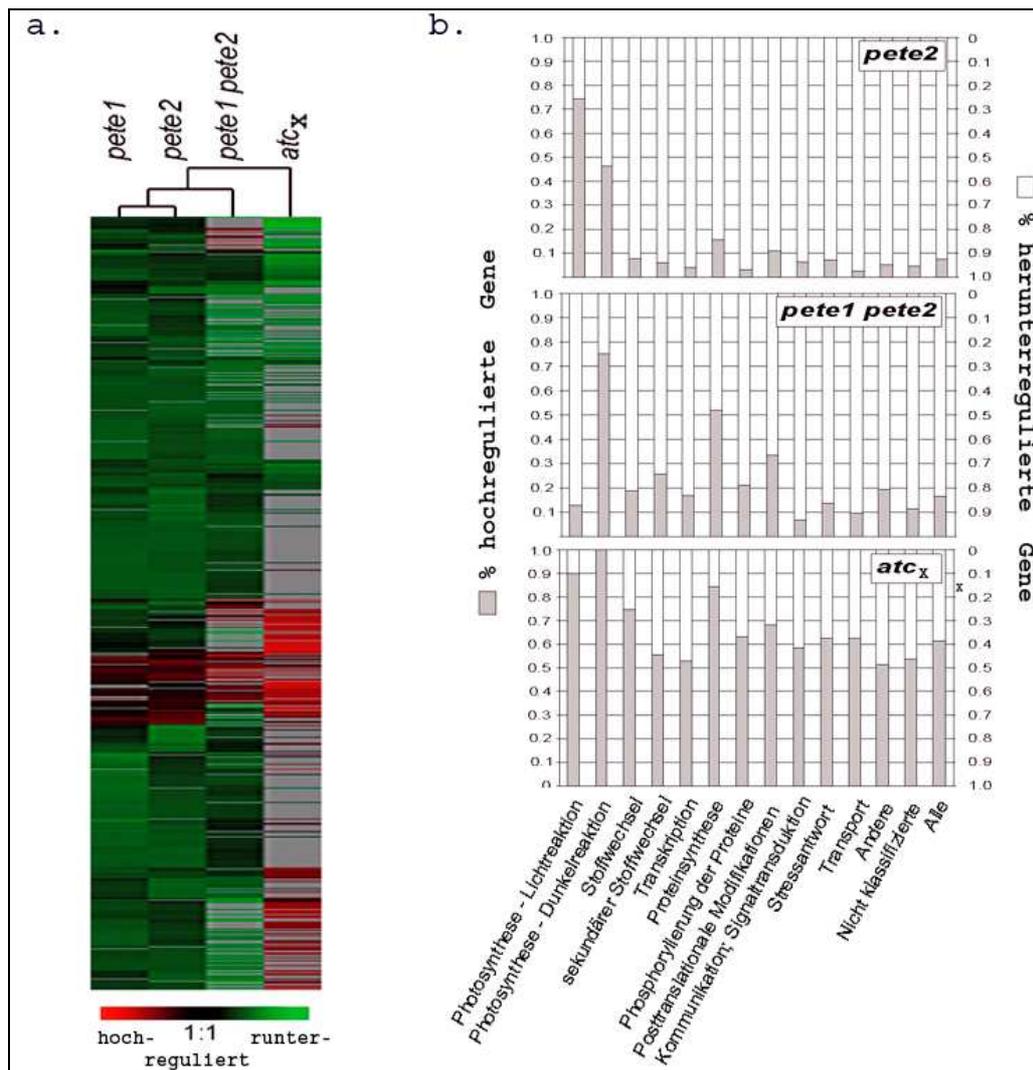


Abbildung 2-20: Differenzielle Transkriptregulation kernkodierter Chloroplastenproteine (a.) Differenzielle Transkriptregulation in den beiden Plastocyanin-Mutanten (*pete1*-1.1; *pete2*-1.1), in der Plastocyanin Doppelmutante [*pete1*-1.1/*pete2*-1.1] und der Cytochrom c_x -Mutante (*atc_x*-1). Dargestellt wurde eine hierarchische Gruppierung von 745 Genen, die eine signifikant differenzielle Expression in allen vier Genotypen aufweisen. Das Cladogram wurde nach dem Grad der vergleichbarer Regulation des Transkriptoms in den Mutanten erstellt. Die farbliche Darstellung zeigt die Richtung und Stärke der Regulation: grün steht für eine Erniedrigung und rot für Erhöhung der Transkriptmenge. Nicht signifikant regulierte Gene sind grau markiert.

(b.) Differenziell regulierte Gene wurden in elf funktionelle Gruppen zusammengefasst. Auf die Darstellung der *pete1*-1.1 Mutante wurde verzichtet, da die Unterschiede zur *pete2*-1.1 sehr gering sind. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit A. Biehl und E. Richly (MPIZ-Köln) durchgeführt.

Die *pete1*-1.1 und *pete2*-1.1 Mutanten zeigen ein sehr ähnliches mRNA Regulationsmuster. In beiden Mutanten ist die differenzielle Genexpression in allen funktionellen Gruppen (Abb. 2-20b) nahezu identisch. Die mRNA-Abundanz der direkt an der Lichtreaktion der Photosynthese involvierten Gene ist höher als im Wildtyp. Hingegen ist die Aktivität der Gene in allen anderen funktionellen Gruppen überwiegend reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Mit Ausnahme der, an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligten Gene charakterisiert sich die *atc_x*-Mutante durch eine - gegenüber den beiden Plastocyanin-

Einzelmutanten entgegengesetzt gerichtete - Genregulation. Daher sind die Gene der Dunkelreaktion der Photosynthese und der Proteinbiosynthese in ihrer Abundanz signifikant erhöht. In allen anderen Genklassen lässt sich eine ausgeglichene Regulation der differentiellen Genexpression beobachten, mit circa der gleichen Anzahl hochregulierter Gene wie herunterregulierter Gene.

Vom besonderen Interesse ist oftmals die Kenntnis der Regulation stressinduzierter Gene. Die mRNA der *Elip*-Genfamilie (*Early Light Inducible Proteins*) werden unter Lichtstressbedingungen von etwa 2000 μE , wie auch bei Störungen der Signaltransduktion zwischen dem Zellkern und dem Chloroplasten rasch und stark akkumuliert.

In diesem sehr speziellen Fall lässt sich jedoch eine gleich gerichtete und nahezu gleich intensive Regulation des *Elip2.1* Stressindikator-Gens sowohl in den beiden *pete*-Mutanten wie auch in der *atc_x*-Mutante beobachten. Wie in der Abb. 2-21 zu sehen ist, zeigen Mutanten mit beeinträchtigtem Elektronentransport zum PSI (*psa*-, *psa*h2-, *pete*, *psad*1-Mutanten), wie auch Mutanten mit gestörter Zellkern-Chloroplast Kommunikation (*gun*; *chaos*) eine deutlich verstärkte Akkumulation des *Elip2.1*-Transkripts. Die höchste Akkumulation des Transkripts kann bei den beiden *pete*-Mutanten beobachtet werden. In der *atc_x*-Mutante ist die Abundanz der *Elip*-mRNA zwar etwas niedriger als in den *pete*-Mutanten, jedoch stärker als in anderen PSI-Mutanten.

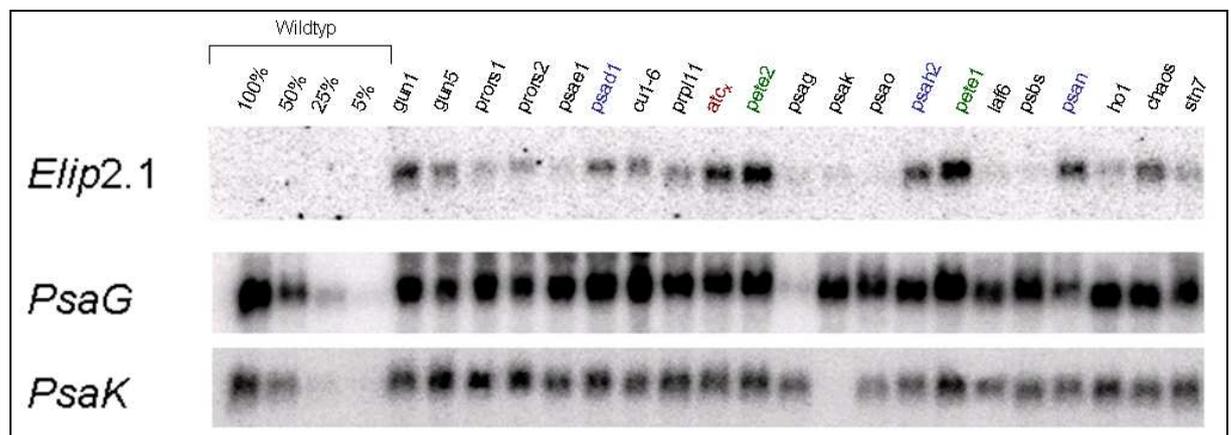


Abbildung 2-21: Northern-Analysen an Photosynthese-Mutanten.

21 Photosynthese-Mutanten (5.-25.) wurden in Sterilkultur (MS-Medium, 0,5% Saccharose) unter Langtagbedingungen und 70 μE Licht bei 24°C für 6 Wochen propagiert. 30 μg Gesamt-mRNA der Pflanzen wurden für Northern-Analysen eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit cDNA-Amplifikaten folgender Gene: *Elip2.1* (At4g14690); *PsaG* (At1g55670); *PsaK* (At1g30380)

3. Diskussion

Innerhalb dieser Arbeit wurden molekularbiologische und physiologische Untersuchungen an Plastocyanin und Cytochrom c_x Mutanten durchgeführt.

Der Schwerpunkt der Arbeit galt zunächst der Frage, ob in höheren Pflanzen die Genprodukte der *PetE*-Gene und des *Atc_x*-Gens die gleiche Funktion erfüllen. Des Weiteren sollte die Funktion der Proteine näher untersucht werden.

3.1. Höhere Pflanzen ohne Plastocyanin

3.1.1. Stabilisierung der *En1*-Linien

Zur Beginn dieser Arbeit standen *En1*-Insertionslinien für beide Plastocyanin-Gene bei *A. thaliana* zur Verfügung. In diesen Linien wurden somatische Reversionen des Transposons beobachtet, die zur partiellen Akkumulationen des Genprodukts in der Pflanze führten (Kap. 1.4.3; 2.1.2) und daher die Ergebnisse physiologischer Analysen verfälschten.

Zur Stabilisierung der Mutationsereignisse war es notwendig, nach germinalen Exzisions-Ereignissen zu suchen bei denen der offene Leserahmen der beiden *PetE*-Gene unterbrochen ist, was meistens zum vollständigen Funktionsverlust der Gene führt. Mittels Selektionen germinaler *Footprint*-Revertanten in den *pete1* und *pete2* Allelen wurden solche *Loss-of-Function* Mutationen isoliert (Abb. 2-2A). Eine, 52bp große Deletion der *pete1*-1.1 Linie konnte mittels geeigneter PCR-Reaktionen eindeutig identifiziert werden (Abb. 2-2B.c). Hingegen zeigen alle stabilisierten *pete2*-Mutanten nur schwer nachweisbare, 1 bis 2bp große Deletionen auf. Eine der veränderten Nukleotidsequenzen in der *pete2*-1.1 Linie führte zu einer neuen Schnittstelle für die *AlwI*-Endonuclease, und ermöglichte eine zuverlässige Identifikation des mutierten Allels (Abb. 2-B.b.).

Als Folge der *Footprints* wurde die Transkript-Abundanz für die beiden *PetE*-Genen bis auf 90% der wildtypischen Expression wieder hergestellt (Tab. 2-5A). Die Proteinbiosynthese wird jedoch vorzeitig durch ein Stopp-Codon terminiert so dass kein funktionelles Plastocyanin entsteht (Abb. 2-5D). Die erfolgreiche Stabilisierung der *pete*-Mutationen war die Voraussetzung für weitere Untersuchungen.

Die Stabilisierung der Mutanten ließ jedoch ein Problem offen. Die Linien enthalten weiterhin andere Kopien des *En1*-Transposons. Eine zufällige Markierung weiterer kernkodierter und für die Funktion der Photosynthese notwendiger Gene konnte daher nicht prinzipiell

ausgeschlossen werden. Um den Einfluss möglicher anderer Mutationsereignisse auf die physiologische Analysen zu verringern, wurden die Analysen mehrfach, an unterschiedlicher Nachkommenschaft der Mutanten und über einen langen Zeitraum wiederholt. Letztlich spiegelte sich die Aktivität des *En1*-Transposons nur noch in erhöhter Standardabweichung durchgeführter Analysen, ohne jedoch die grundsätzlichen Aussagen zu verfälschen.

3.1.2. *A. thaliana* ohne Plastocyanin

Ein wichtiges Werkzeug zur Funktionsaufklärung pflanzlicher Gene stellen vollständige Gendefekt-Mutanten (*Loss-of-Function* Mutanten) dar. Mit der Herstellung einer *pete*-Doppelmutante wurde eine Plastocyanin *Loss-of-Function* Linie erzeugt. Anhand von Co-Segregationsanalysen wurde sichergestellt, dass der letale Phänotyp nicht auf weitere Mutationsereignisse oder sekundäre Effekte zurück zu führen ist.

Mit dieser Linie konnte gezeigt werden, dass beide Allele der *PetE*-Gene in *A. thaliana* funktionell sind, eine redundante Aufgabe erfüllen und dass der Elektronentransport zwischen Cyt *b₆/f* und PSI- Komplexen in höheren Pflanzen nur von Plastocyanin getragen wird. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte die Doppelmutante eine ideale Basis zur Herstellung weiterer Mutanten (35SCaMV::*PetE1*; 35SCaMV::*PetE2*; 35SCaMV::*Atc_x* und *AtPetE2tp-ChCyt_cmp*) in einem Plastocyanin-Null-Hintergrund dar.

Der Phänotyp der Plastocyanin-Doppelmutante kann durchaus mit den Phänotypen der *petc*-Mutante (Rieske Protein; Maiwald *et al.* 2003) oder der *psad*-Doppelmutante (Ihnatowicz *et al.* 2004) verglichen werden. Alle diese Pflanzen haben die Fähigkeit zur photosynthetischen Nutzung der Lichtenergie verloren. Das Überleben und Propagieren der Pflanzen kann nur unter heterotrophen Bedingungen erfolgen. Ihr Photosynthese-Apparat wird nur noch rudimentär ausgebildet (Abb. 2-7) und die absorbierte, jedoch nicht genutzte, Lichtenergie überwiegend als Fluoreszenz an die Umgebung abgestrahlt (Abb. 2-3; Abb. 2-10). Unter heterotrophen Bedingungen verbleiben die Pflanzen sehr klein, gelblich und leiden unter photo-oxidativen Stresserscheinungen (Abb. 2-2B.a).

3.1.3. Pflanzen brauchen nur wenig Plastocyanin zum autotrophen Wachstum

Gupta *et al.* 2000 nutzten eine RNA-Interferenz (RNAi) Technik, um die Akkumulation der *PetE*-Transkripte in *A. thaliana* zu unterbinden. Eine erfolgreiche Unterdrückung der *PetE*-

Genfunktionen wurde hierbei mit Northern und Westernanalysen belegt. Erst nach zusätzlichem *Knock-out* des *Atc_x*-Gens in den *PetE*-RNAi-Linien wurden die Pflanzen nicht mehr zu einer photoautotrophen Entwicklung fähig. Folgerichtig, sollte das *Atc_x*-Genprodukt die Funktion des Plastocyanins übernehmen. Die [*pete1-1.1/pete2-1.1*]-Doppelmutanten belegen jedoch, dass unter Normalbedingungen das *Atc_x*-Genprodukt allein das autotrophe Überleben der Pflanzen nicht sichern kann.

Eine mögliche Missinterpretation der RNAi Experimente von Gupta *et al.* (2002) könnte in der fälschlichen Annahme begründet sein, dass eine vollständige Unterdrückung der Plastocyanin-Akkumulation erreicht wurde. Wie spätere physiologische Analysen offenbarten, könnten bereits geringste Mengen des Plastocyanins ausreichend sein, um die Funktionalität des Photosynthese-Apparates aufrecht zu erhalten. Ein gutes Beispiel bietet hier die [*pete1-1.1/PetE1/pete2-1.1*]-Linie. In dieser Linie wurde eine Abundanz des Plastocyanintranskripts von etwa 4% und die Protein-Akkumulation auf 6-12% des Wildtyps gefunden. Dennoch sind unter Langtagbedingungen wachsende Pflanzen grün, erreichen etwa 50% der Wildtyp-Größe und die gemessene Quantenausbeute am Photosystems II (Φ_{II}) in diesen Linien (in Sterilkultur) liegt bei 0,59 (Tab. 2-8A). Entsprechend kann die Abundanz des Genprodukts in den von Gupta *et al.* (2002) verwendeten RNAi-Linien unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden liegen.

Die hohe Effizienz des kleinen Elektronencarriers - Plastocyanin wurde bereits mehrfach beobachtet und entfacht immer wieder neue Diskussionen. Einer der Erklärungsversuche diskutiert die Möglichkeit einer zweidimensionalen (zur Thylakoidmembran assoziierten) Diffusion des Proteins und daraus resultierende, höhere Interaktionsraten mit membrangebundenen Proteinen wie auch die Existenz eines kleinen "lokalen" Plastocyanin-Reservoirs mit höheren Fluktuationsraten (*turnover*) und weniger beanspruchten "großen" Plastocyanin-Reservoir (Musiani *et al.* 2005). Im Zusammenhang mit der hohen Effizienz des zyklischen Elektronentransports postulierten Joliot P. und Joliot A. (2002) sogar die Existenz von Superkomplexen bestehend aus [Cytochrom *b₆/f*::Plastocyanin::PSI::Ferredoxin].

3.2. Cytochrom *c_x* als Elektronencarrier

Die offensichtliche Divergenz zwischen der Publikation von Gupta *et al.* (2000) und den Beobachtungen dieser Arbeit legte eine Überprüfung weiterer grundlegender Aussagen zur Abundanz und Lokalisation des Genprodukts von *Atc_x* nahe.

3.2.1. Abundanz der *Atc_x*-mRNA

Von einem quantitativen Elektronentransporter würde man zunächst eine signifikante Präsenz sowohl auf dem mRNA - wie auch auf dem Protein -Niveau erwartet. Für das Cytochrom *c_x* sind diese Annahmen jedoch nicht zutreffend.

In Wildtyp-Pflanzen (*A. thaliana*; Ecotyp: Columbia 0), die unter Normalbedingungen propagiert wurden, lässt sich die mRNA des Gens nur mittels hochsensitiver Methoden wie RT-PCR (Abb. 2-14A) oder des *Affymetrix GeneChips*® nachweisen. Dirigiert von einem, nur 66bp kurzen Promotor (Abb. 2-13A) bleibt die mRNA-Abundanz in allen Organen und über alle Entwicklungsstadien der Pflanze hinweg auf einem niedrigen Niveau (Abb. 2-13B). Die wenigen konservierten Licht-Antwort-Elemente des Promoters sind scheinbar nicht ausreichend um eine, lichtinduzierte Anhebung der Expression zu bewirken. Dennoch wird die *Atc_x*-Transkriptmenge in *A. thaliana* unter Bedingungen wie stark erhöhter CO₂-Partialdruck, Seneszenz und UV-A-Lichtstress signifikant stärker akkumuliert (digitale Northern; Genevestigator; Daten nicht gezeigt). Aufgrund des rudimentären Promotors des *Atc_x*-Gens erscheint eine selektive Regulation des Gens eher unwahrscheinlich, vielmehr dürften die erwähnten äußeren Reize über weitere *Enhancer*-Elemente die *Atc_x*- Expression verstärken. Mittels Sequenzierung der *Atc_x*-cDNA gelang es die Richtigkeit der annotierten Genstruktur zu bestätigen.

3.2.2. Das Genprodukt von *Atc_x* ist im Thylakoidlumen der Chloroplasten lokalisiert

Nicht unbegründete Zweifel an der, von Gupta gezeigten Lokalisation des Proteins im Thylakoidlumen wurden unter anderen von Wastl *et al.* (2004) geäußert. Denn auch in früheren Proteom-Analysen konnte das Cyt *c₆* weder in *A. thaliana* (Peltier *et al.* 2002; Schubert *et al.* 2002) noch bei anderen höheren Pflanzen (Schubert *et al.* 2002) nachgewiesen werden.

In einer transienten Transformation von Tabakprotoplasten mittels eines *Atc_x::dsRFP* - Fusionsproteins wurde zunächst der Transport des Proteins in die Chloroplasten bestätigt (Abb. 2-17A). Das hier verwendete Konstrukt unterlag jedoch der Kontrolle eines starken, zweifachen 35S*CaMV*-Promotors und zielt darauf ab möglichst viel Protein entstehen zu lassen. Es ist daher durchaus möglich, dass unter physiologischen Bedingungen der Transport des Proteins in die Chloroplasten nicht gleich effizient erfolgt oder überhaupt stattfindet.

Aufgrund dessen wurde die Lokalisation des Proteins mittels immunologischer Analysen verifiziert. Hierfür wurden polyklonale Anti *Atc_x*-Antikörper in zwei unabhängigen Verfahren

hergestellt, monospezifisch aufgereinigt und dann ausgiebig bezüglich der Sensitivität und Spezifität getestet. Die trotz Aufreinigung verbleibende, unspezifische Interaktion der Antikörper mit einem Thylakoidmembranprotein (PsbS) wurde mittels Affinitätschromatografie und massenspektroskopischen Analysen bestimmt und als tolerierbar angesehen.

Beide Anti *Atc_x* Antikörper detektierten eindeutig das wildtypische *Atc_x*-Genprodukt in Chloroplasten und in den Thylakoidlumen-Proteinfraktionen der *A. thaliana* -Pflanzen (Abb. 2-17B). Die Konzentration des *Atc_x*-Proteins im Lumen der Thylakoide konnte jedoch nicht eindeutig bestimmt werden. In Rosettenblättern von *A. thaliana* (Ecotyp: Columbia 0; Langtagbedingungen) wird die *Atc_x* - Abundanz mit etwa zwei Größenordnungen niedriger geschätzt als die Gesamtkonzentration der Plastocyanine.

Aufgrund der niedrigen Präsenz des Proteins in Chloroplasten und der strukturellen Verwandtschaft zu dem mitochondrialen Elektronencarrier zwischen dem Komplex III und IV, dem Cytochrom *c* wurde auch die Akkumulation des *Atc_x*-Genprodukts in Mitochondrien diskutiert. Jedoch wurden weder in transienten Transformationen von Tabakprotoplasten mit dem *Atc_x-dsRFP* Fusionsprotein, noch in immunologischen Analysen an mitochondrialen Proteinfraktionen, Hinweise für eine dortige Proteinakkumulation festgestellt (Daten nicht gezeigt). Entsprechend ließ sich die von Gupta *et al.* (2002) publizierte luminale Lokalisation bestätigen.

3.2.3. Bei höheren Pflanzen erfolgt keine kompensierende Regulation zwischen Cytochrom *c_x* und Plastocyanin

Wesentlicher als die Feststellung der geringen Präsenz des *Atc_x*-Genprodukts ist die Beobachtung, dass sowohl in der Abwesenheit (Abb. 2-5B; 2-5D), wie auch bei einer erhöhten Abundanz des Plastocyanins (Abb. 2-14B), die Abundanz des *Atc_x*-Genprodukts unverändert bleibt. Auch die Abundanz des Plastocyanins ist unabhängig Veränderungen in der *Atc_x*- Konzentrationen (Abb. 2-17B). Eine ausgleichende Regulation der Transkript und Protein-Abundanz zwischen Cytochrom *c₆* und Plastocyanin, wie sie bei einigen Algen beobachtet wurde (Bohner und Böger, 1978), scheint es bei *Arabidopsis* nicht zu geben.

3.2.4. Kann Cytochrom c_x in vivo den lineare Elektronentransport aufrechterhalten?

Wie bereits im Kapitel 3.2.1 erwähnt, kann es unter dem Einfluss bestimmter äußerer Reize zur erhöhten Akkumulation der Atc_x -mRNA in *A. thaliana* kommen.

Es ist bekannt, dass das zu dem Atc_x - homologe Cyt c_6 bei Algen die Funktion des Plastocyanins übernehmen kann. Daher war es theoretisch vorstellbar, dass der letale Phänotyp der Plastocyanin-Doppelmutante auf eine eingeschränkte Expression des Atc_x -Genprodukts zurückgeführt werden kann. Außerdem könnte ein Verlust der Elektronentransportfähigkeit (zwischen Cyt b_6/f und PSI) des Atc_x -Proteins ursächlich für den beobachteten Phänotyp der Plastocyanin-Doppelmutante sein.

Eine natürliche, z.B. mittels UV-Stress stimulierte Anregung der Atc_x -Expression in den Plastocyanin-Doppelmutanten war nicht nur aus technischen Gründen kaum reproduzierbar durchführbar. Um dennoch den Einfluss der Atc_x -Expression auf den Phänotyp der Plastocyanin-Doppelmutante zu untersuchen, wurde dieses Gen unter die Kontrolle eines starken, zweifachen 35S*CaMV*-Promotors gestellt und in Plastocyanin defizienten Doppelmutanten über exprimiert (Abb. 2-14C). Anschließend wurde eine große Anzahl unabhängiger positiver Transformanten analysiert. In keiner dieser Linien wurde eine photoautotrophe Plastocyanin-Doppelmutante gefunden. Folglich ist die Insuffizienz des Cytochrom c_x als Elektronentransporter und Plastocyanin-Substitut von der Konzentration des Proteins unabhängig.

Diese Beobachtung wird von Studien von Molina-Heredia *et. al.* (2003) (Kap. 1.9.2) unterstützt. Hierbei wurde gezeigt, dass Atc_x -Genprodukt ein mittleres Redoxpotenzial von 140 mV hat und dieses Redoxpotenzial reicht nicht aus um Cyt f zu oxidieren. Auch bei der blitzinduzierten Reduktion des Photosystem I erwies sich das Atc_x -Protein etwa 100x ineffizienter als Plastocyanin.

Offenbar gibt es noch weitere als die von Molina-Heredia beschriebenen Gründe für die Inkompatibilität des Cytochrom c_x zu den Komponenten der linearen Elektronentransportkette. Denn, würde sich die Inkompatibilität nur in der veränderten Oberflächenbeschaffenheit des Cytochrom c_x Proteins begründen, so müsste das "ursprüngliche" Cytochrom c_6 der niederen Pflanzen die Funktion des fehlenden Plastocyanins in den Plastocyanin-Doppelmutanten übernehmen.

Auch diese Möglichkeit wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht. Das Cytochrom c_6 aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde mit der Thylakoidlumen dirigierenden Aminosäuresequenz des *PetE2*-Gens N-terminal fusioniert und unter der Kontrolle eines 2x 35S*CaMV*-Promotors in Plastocyanin-Mutanten exprimiert. Mittels immunologischer

Analysen wurde eine Akkumulation des *Chlamydomonas* Cytochrom c_6 im Thylakoidlumen der *A. thaliana* Pflanzen nachgewiesen (Abb. 1-18C). Eine Komplementation des letalen Phänotyps der Plastocyanin-Doppelmutante konnte jedoch niemals beobachtet werden (Abb. 2-19).

Welche Veränderungen an Cytochrom b_6/f -Komplex oder am Photosystem I sind für den Verlust der Kompatibilität der Cytochrom c -Proteine in höheren Pflanzen verantwortlich? Oder sind die Cytochrom c - Proteine in vivo einfach nur nicht ausreichend effizient für den Erhalt des linearen Elektronentransports und damit für die Deckung des Energiebedarfs der höheren Pflanzen ?

3.2.5. Spekulationen über die Funktion des Cytochrom c_x -Proteins

Eine grundlegende Frage drängt sich in den Vordergrund: was bewirkte den Funktionsverlust des Cyt c_x bezüglich PSI-Reduktion? Bereits 2001 postulierte Miguel De la Rosa *et al.* eine evolutionäre Substitution der Cytochrom c_6 Funktion zugunsten des Plastocyanins. Seine Begründung stützte sich erdgeschichtlich auf die zunehmend schlechtere Bioverfügbarkeit des Eisens gegenüber dem Kupfer während des Überganges von einer reduzierenden zu einer oxidierenden Atmosphäre. Mit der abnehmenden Verfügbarkeit des Eisens bestand sicherlich ein evolutives Druck zur Funktionsoptimierung des Cu-Proteins, Plastocyanins. Der eisenhaltige Elektronencarrier Cytochrom c_6 wurde funktionell redundant und konnte andere Funktionen entwickeln bzw. ausbauen. Mit der Zeit ging dann die Kompatibilität zu seinem ursprünglichen Akzeptor verloren.

Viel interessanter erscheint jedoch die Frage welche neue Funktion das Cytochrom c_x übernommen hat. Ausgiebige spektroskopische Analysen an den *Atc_x*-Mutanten (Anhang 6.5.1) lassen keine signifikanten Veränderungen der photosynthetischen Lichtreaktion und der nicht-photochemischen Energielöschung erkennen. Daher lässt sich eine direkte und quantitative Beteiligung des Proteins an der Synthese biochemischer Energieäquivalente ausschließen. Es gibt jedoch Hinweise, die auf eine regulatorische Funktion des Proteins deuten:

Die neue, eukaryotische Isoform des Cytochrom c_6 -Proteins, Cytochrom c_x enthält einen charakteristischen *Loop* (Abb. 2-13C; 2-13D) mit zwei gut exponierten Thiolresten (R-SH). Wird eine energetisch günstige Konformation des Proteins angenommen, dann liegen die

beiden Thiol-Gruppen von einander abgewendet (eine Annahme, der theoretische 3D-Modelle zugrunde liegen Abb. 2-13D). Jedoch ist es gut vorstellbar, dass in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Häm-c Gruppe eine Änderung der Proteinkonformation verursacht wird, und die beiden -SH -Gruppen in eine proximale Nähe zueinander gebracht werden. Von diesem "aktivierten Zustand" ausgehend, könnte das Protein als ein Signalübermittler wirken, wie es beispielsweise für das Ferredoxin/Thioredox-System (Besse und Buchanan 1997) beschrieben wurde. Denkbar ist auch eine Funktion als ein luminaler Radikalfänger. Denn, die 2[R-SH]-Gruppen können von freien reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) leicht oxidiert werden.

Mutanten mit Überexpression des *Atc_x*-Genprodukts charakterisieren sich durch höhere Wachstumsrate und erhöhte "Licht/Hitze-Resistenz" (Abb. 2-15).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch keine Anhaltspunkte ermittelt, die diese Eigenschaften erklären. Weder die Leistung des Photosynthese-Apparates noch photoprotektive Mechanismen unterscheiden diese Linien von Wildtyp-Pflanzen (Anhang 6.5.1).

Daher kann der Fokus auf das antagonistische Gibberellin/[ABA; Ethylen] - Gleichgewicht gerichtet werden. Denn einen Hinweis darauf hin offenbart die Größenzunahme der Pflanzen, die nicht über Zellteilungsrate sondern über die Zellgröße erfolgt. Auch die "Licht/Hitze-Resistenz" der *Atc_x*- überexprimierender Pflanzen deuten auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zur Gunsten der Gibberellinsäure hin. Zur Grundfunktionen der Gibberelline gehört das Erhöhen der mechanischen Extensibilität der Zellen, sowie die Stressrelaxation der Pflanzen (Metraux 1995; Potter und Fry 1994; Smith *et al.* 1996). Ethylen hingegen fördert die Seneszenz (Hensel *et al.* 1993; Grbic und Bleecker 1995). Weiterhin hemmt ABA die Gibberellinsäure-induzierte Enzyme, fördert eine Ethylen-unabhängige Blattseneszenz und reguliert die Schließung der Spaltöffnungen, (Nooden und Leopold 1988; Zacarias und Raid 1990). In der Summe der Faktoren spiegelt sich dann womöglich die scheinbar höhere Vitalität der Pflanzen der *Atc_x*- überexprimierender Pflanzen wieder.

Aber welche Stellung nimmt das *Atc_x*-Protein in der phytohormonellen Signaltransduktion und welche physiologischen Prozesse verbinden dieses Thylakoidlumen-Protein mit Regulation der Phytohormone? Einige Antworten würden weitere Analysen der physiologischen Wirksamkeit der Phytohormone an den *Atc_x*-Mutanten versprechen.

Ein weiteres Hinweis scheint die Involvierung des *Atc_x*-Genprodukts in einer vom Redoxzustand des Photosynthese-Apparates abhängigen Signaltransduktion zu bekräftigen.

Wie in der Abb. 2-21 zu sehen ist sind in allen für den Elektronentransfer relevanten PSI-Mutanten die mRNA des Gens *Elip1.2* verstärkt akkumuliert. Die höchste Abundanz dieser mRNA erfolgt in den beiden *pete*-, dann in *psan*- und *psad1*-Mutanten. Mit abnehmender Relevanz für die "Einspeisung" der Elektronen zum PSI (wie in *psag*-, *psao*-, *psak*-, und *psbs*-Mutanten) senkt sich die Akkumulation der *Elip*-mRNA. Erst in den Mutanten, die ein Defekt im "Plastid-zum-Kern" - Signalweg aufweisen (wie *gun1*; *gun5*; *chaos*), erfolgt eine stärkere Akkumulation der *Elip*-mRNA. In dieser Arbeit wurde mehrmals betont, das *Atc_x*-Genprodukt wohl unfähig sei, einen quantitativen Elektronentransfer zum PSI zu betreiben. Die Abundanz der *Elip*-mRNA in dieser Mutante ist jedoch nahezu so hoch wie in den beiden Plastocyanin-Mutanten und weist auf die Induktion eines starken, vom Thylakoidlumen ausgehenden Signals hin.

Zusammenfassend, es erscheint unwahrscheinlich, dass im Laufe der Evolution das Cytochrom *c_x* einfach nur seine Funktion als Elektronentransporter verlor. Womöglich entwickelte sich das Protein eher zum einen Redoxsensor/Effektor der höheren Pflanzen und könnte unter den Phytohormon-Haushalt oder einen qP und NPQ - unabhängigen, photoprotektiven Schutzmechanismus beeinflussen.

3.3. Zwei Isoformen des Plastocyanins in *Arabidopsis thaliana*

Die Fähigkeit der Pflanzen zu einer oxidativen Photosynthese ist weitgehend an einen, im Aufbau und Funktion konservierten Photosynthese-Apparat gebunden. Die Grundstruktur der Plastocyanine, wie auch die der Cytochrom *b_{6/f}*- und Photosystem I-Komplexe verblieb im ganzen Pflanzenreich nahezu unverändert.

In *A. thaliana* existieren zwei Genkopien für das Plastocyanin. Beide Gene sind hoch homolog zueinander, werden exprimiert und erfüllen die gleiche Funktion. Die Regulation der Genexpression beider Isoproteine scheint voneinander unabhängig zu sein. Daher führt eine Minderung der mRNA-Abundanz einer Isoform nicht zur Veränderung der Genexpression des zweiten Isoproteins. Konform mit der Abundanz der *PetE2*-mRNA in nahezu allen Entwicklungsphasen der Pflanzen ist das *PetE2* Protein mehrfach stärker vertreten als das *PetE1*-Genprodukt. Erwartungsgemäß sollten die Resultate der physiologischen Analysen einen Dosis-Effekt folgen, doch dies scheint nicht immer der Fall zu sein.

3.3.1. Quantifizierung der Plastocyaninmenge im Thylakoidlumen

Bevor man die nachstehenden physiologischen Analysen bewertet, sollte grundlegend die Menge der Plastocyanin-Proteine in den analysierten Linien betrachtet werden. Wie in der Tabelle 2-5F dargestellt, wurde das *PetE1*-Isoprotein in der *pete2-1.1* Mutante mit etwa 23% des Wildtyps und in den *35SCaMV::PetE1*- Linie mit etwa 129% bestimmt. Das *PetE2*-Isoprotein wurde in der *pete1-1.1* Mutante mit etwa 70% des Wildtyps und in der *35SCaMV::PetE2*- Linie mit 110% bestimmt. Hierbei sollte jedoch berücksichtigt werden dass der Import der Plastocyanin-Proteine ins Thylakoidlumen über den SecA- abhängigen Weg (Peltier *et al.* 2002) erfolgt. Die Effektivität des Protein-Translokationssystems wird daher nicht nur von der *transit peptide* Sequenz der Proteine, sondern auch von der ATP-Verfügbarkeit in Chloroplasten bestimmt. In Abhängigkeit vom individuellen physiologischen Zustand der Pflanzen kann die Abundanz des reifen Plastocyanins in Thylakoidlumen stärkeren Schwankungen unterliegen und zu einer relativ hohen Standardabweichung bei physiologischen Analysen beitragen.

3.3.2. Differenzielle Genexpression in den *pete1-1.1* und *pete2-1.1* Mutanten

Die Beobachtung, dass Veränderungen im Redox-Status der photosynthetischen Elektronentransportkette eine differenzielle Genexpression veranlassen können, ist nicht neu und wurde bereits vielfach beschrieben (Pfannschmidt 2003; Fey *et al.* 2005). In den *pete1-1.1* und *pete2-1.1* Mutanten wurden Veränderungen im Expressionsmuster kernkodierter Chloroplastenproteine mittels mRNA-*Micro-Array*-Technik untersucht. In beiden Mutanten sind Gene der Lichtreaktion der Photosynthese gleichermaßen in ihrer Expression angehoben. Hingegen weisen alle anderen untersuchten Genklassen eine deutliche Herabregulierung der Genaktivität auf.

Die beobachtete differenzielle Genexpression ist nicht von der mRNA-Abundanz der beiden *PetE*-Gene (Tab. 2-5A) abhängig. Die Mutationen in den *PetE*-Genen basieren auf Deletionen in der Nukleotidsequenz mit einer Verschiebung des offenen Leserahmens. Das Mutationsereignis verhindert daher die Synthese des richtigen Proteins jedoch nicht die Akkumulation der mutierten mRNA. In der *pete1-1.1*-Mutante scheint die differenzielle Genregulation auch nicht von dem Redox-Status der photosynthetischen Elektronentransportkette abhängig zu sein, denn obwohl das Fehlen des Isoproteins im Status der Cyt *f* Oxidation messbar ist (Abb. 2-11A) ist die effektive Quantenausbeute am PSII nicht negativ beeinträchtigt (Tab. 2-8A). Man kann vermuten, dass allein Veränderungen in der

Konzentration der Plastocyanin-Proteine registriert werden und eine Art Kompensationsreaktion einleiten, wobei die Regulationsereignisse einem Dosis-Effekts zu folgen scheinen. Bemerkenswert ist die Stärke der regulatorischen Aktivität, die sich weder in den *petc2*-Mutanten (Maiwald *et al.* 2003) noch in den *psad1* Mutanten (Ihnatowicz *et al.* 2004) in dieser Form beobachten lässt.

Ein weiteres Indiz weist noch expliziter auf die regulatorische Funktion der Plastocyanins hin. Für viele Photosynthese-Mutanten wurde die Expressionsstärke eines Genes aus der "*Elip*"-Familie bestimmt. Somit kann die Expression dieses Genes als Indikator für Lichtstressbedingungen gewertet werden. Erwartungsgemäß weisen Mutanten mit stark beeinträchtigter Leistung des Photosynthese-Apparates z.B. *psad1*- oder *psan*- eine hohe Abundanz der *Elip*-mRNA auf, wogegen in den Mutanten *atc_x*-; *pete1-1.1*, *psae*-, *psag*-, *psak*-, *psao* keine oder nur schwache Aktivität des *Elip*-Gens erwartet wird. Wie in der Abb.2-20c ersichtlich, ist die stärkste Akkumulation der *Elip*-mRNA jedoch in den beiden Plastocyanin-Mutanten zu beobachten. Gleichermäßen überraschend erscheint die Aktivität des *Elip*-Gens in der *atc_x*-Mutante. Eine mögliche Erklärung für diese Phänomene wäre die Annahme, dass die Abundanz der e⁻-Donorproteine zum PSI und nicht die Minderung des Elektronentransports sehr sensibel registriert wird und in eine Hochregulation der für die Lichtreaktion der Photosynthese relevanten Gene resultiert.

Wie bereits im Kapitel 1.7.1 beschrieben, wird dem Cytochrom *b₆/f*-Komplex zusammen mit dem Plastochinon-Pool eine grundregulatorische Funktion zugeschrieben. Jedoch aufgrund der veränderten Kompatibilität des *Atc_x*- Proteins zu den Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette sollte man einen anderen, weiteren Sensor für die Quantität der *PetE* und *Atc_x*-Genprodukte in Betracht ziehen.

3.3.3. Strukturelle Unterschiede zwischen den Isoformen der *PetE*-Genprodukte.

Neben der Verfügbarkeit des Plastocyanins, könnten zusätzlich strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Plastocyanin-Isoformen einen Einfluss auf den Redoxzustand der Elektronentransportkette ausüben. Mittels spektroskopischer Analysen war es möglich den Oxidationsstatus der Cytochrom *f*- und P₇₀₀ Untereinheiten zu bestimmen. In einem Vergleich der Messergebnisse mit der Plastocyanin-Abundanz in den einzelnen Mutanten lässt sich eine signifikant unterschiedliche Aktivität des Plastocyanins gegenüber den beiden Reaktionspartnern beobachten. Der Status der Cytochrom *f* Oxidation folgt dem Plastocyanin-Gehalt der einzelnen Mutanten (Abb. 2-11A) und genügt daher den Anforderungen einer

Reaktion erster Ordnung. Weder die transiente Interaktion noch der Elektronentransfer zwischen den beiden Edukten ist von den strukturellen Unterschieden der *PetE*-Genprodukte messbar beeinträchtigt.

Die Effektivität des Elektronentransfers über P_{700} -Reaktionszentrum weist auf einen komplexen Mechanismus hin.

Für die Übertragung eines Elektrons vom Kupfer eines reduzierten Plastocyanins auf und über das P_{700} -Reaktionszentrum des Photosystems I sind zunächst eine ausgerichtete und stabile Interaktion beider Edukte und eine lichtgetriebene Anregung des P_{700} erforderlich. Nach dem Elektronentransfer löst sich das oxidierte Plastocyanin von dem Photosystem I und gibt die Bindestelle für ein weiteres reduziertes Plastocyanin frei.

In Einzel-Blitz-Messungen (Daten nicht gezeigt; gemessen in Zusammenarbeit mit Fabrice Rappaport; IBPC; Paris) der P_{700}^+ , Reduktion konnte gezeigt werden, dass die strukturellen Unterschiede zwischen den Plastocyanin-Isoformen weder einen signifikanten Einfluss auf die Anbindung des reduzierten Plastocyanins, noch auf die Effektivität des Elektronentransfers zum P_{700}^+ aufweisen. Unter kontinuierlicher Illumination der Plastocyanin-Mutanten mit nicht sättigenden Lichtintensitäten (150 bis 300 μE) stellt sich in den *pete1-1.1* Mutanten ein signifikant schwächer und in den *35SCaMV::PetE1* ein stärker oxidiertes P_{700} -Gleichgewichtszustand ein (Abb. 2-9.). Die erwarteten Messresultate, daher die Feststellung eines, gegenüber dem Wildtyp erhöhten P_{700} -Oxidationszustandes in den beiden defizienten Plastocyanin-Mutanten (*pete1-1.1* und *pete2-1.1*) wird erst während einer sättigenden Illumination von 900 bis 1500 μE beobachtet. Wie bereits im Kapitel 1.9.5 beschrieben, ist die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen dem Plastocyanin und dem Photosystem I von der Konzentration beider Edukte abhängig und wird als eine Reaktion zweiter Ordnung betrachtet. Anscheinend erfolgt die Dissoziation des oxidierten $[\text{PetE}2^+ P_{700}]$ Komplexes wesentlich effektiver als die Dissoziation des $[\text{PetE}1^+ P_{700}]$ Komplexes. Bei Illumination der Mutanten mit niedrigen Lichtintensitäten wirkt sich daher die Anzahl der frei werdenden Plastocyanin-Bindestellen am Photosystem I stärker aus als die, unter diesen Bedingungen ohnehin im Überschuss vorhandene Menge des reduzierten Plastocyanins.

Frühere theoretische Arbeiten von Drepper *et al.* (1996) zur Elektronenübertragung zwischen Plastocyanin und Photosystem I postulieren eine Einschränkung der Elektronentransport-Kinetik zwischen dem Cytochrom b_6/f -Komplex und Photosystem I durch höhere Stabilität der $[\text{Plastocyanin}^+ P_{700}]$ -Komplexe. Studien von Finazzi *et al.* (2005) an Photosystem I-Mutanten in *Chlamydomonas reinhardtii* belegten diese Kausalität mit experimentellen

Nachweisen. Offenbar sind strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen des Plastocyanins in *A. thaliana* für die unterschiedliche Stabilität der [PetE⁺ P₇₀₀] Komplexe verantwortlich.

Beim Plastocyanin höherer Pflanzen sind drei große Domänen an der Interaktion mit Photosystem I beteiligt. Zwei davon, der *southern patch* und die Nord-Domäne sind direkt bei der Komplexbildung involviert. Die Funktion der dritten Interaktions-Domäne, des *northern patches*, ist nicht eindeutig geklärt.

Die Komplexbildung zwischen Plastocyanin und Photosystem I verläuft in zwei Schritten. Zunächst erfolgt, bedingt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der *southern patch* (44DEDE) und der α -Helix (12K;16K;19K;23K) Schleife der PsaF-Untereinheit, eine Fixierung und Ausrichtung des Plastocyanins auf das P₇₀₀ Reaktionszentrum hin. Der *southern patch* ist in beiden PetE-Isoformen identisch beschaffen und ausgerichtet, und sollte daher weder den Elektronenfluss noch die Stabilität der Komplexe in keiner Weise beeinflussen. Diese Feststellung wird von den Ergebnissen der schnellen Kinetik in Ein-Blitz-Messungen der P₇₀₀ Reduktion bestätigt.

Der zweite Schritt der Komplexbildung erfolgt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen zwischen der flachen Nord-Domäne des Plastocyanins (Abb. 2-1B) und den lumenalen i/j-Seitenketten der PsaA/PsaB Untereinheiten. Die Nord-Domänen beider Plastocyanine in *A. thaliana* unterscheiden sich nur bezüglich einer exponierten Aminosäure voneinander. An der Stelle des hydrophoben ³⁷Phenylalanins in der PetE1-Domäne befindet sich ein hydrophiles ³⁷Tyrosin in der PetE2-Domäne. Die Fixierung des Plastocyanins mittels der PsaF-Untereinheit sollte jedoch keine sterischen Effekte entstehen lassen. Reichert *et al.* (1995) berichtet von Substitutionen kleiner Aminosäuren der Nord-Domäne (⁹²Ala; ¹²Gly) mit weitaus voluminöseren Leucin ohne die Komplexentstehung zu verhindern. Die Reduktion des P₇₀₀⁺ Reaktionszentrums sollte daher bei beiden PetE-Isoformen etwa gleich schnell ablaufen. Auch diese Annahme wird von den Ergebnissen der schnellen Kinetik der P₇₀₀ Reduktion bestätigt.

In der PetE2-Domäne kann aber ein anderer Effekt eine wesentliche Rolle spielen. Die unmittelbare Nähe einer Hydroxy-Gruppe des ³⁷Tyrosins zum dem ⁸⁹His-Kupferliganden könnte einen stabilisierenden Einfluß auf das positiv geladene Kupferatom des oxidierten Plastocyanins ausüben und damit die Dissoziation des [PetE⁺ P₇₀₀]-Komplexes begünstigen. Folglich stünde das Reaktionszentrum des Photosystem I schneller für eine erneute Reduktion zur Verfügung.

Ein vergleichbarer Effekt könnte in der zweiten negativ geladenen Domäne der Plastocyanine eine Rolle spielen. Die detaillierteste Charakterisierung des *northern patches* (₆₁EED; aus Spinat-Plastocyanin) wurde von Hippler *et al.* (1996) beschrieben. Die Substitutionen der sauren Aminosäuren im *northern patch* führen zur Erniedrigung des mittleren Redoxpotenzials des Plastocyanins. Eine E₆₁Q-Substitution verursacht eine Reduzierung des Redoxpotenzials um +9 mV und die Substitution der vollständiger Domäne führt zu einer Reduktion von etwa 20 mV. Bei einem Unterschied der Redoxpotenziale zwischen dem Plastocyanin und P₇₀₀ von 55-65 mV ist es erstaunlich dass die Kinetik des Elektronentransfers in keiner Weise negativ beeinträchtigt wurde. Hippler verweist auf die mögliche stabilisierende Wirkung des *northern patches* auf die oxidierte Form des Plastocyanins.

In den beiden PetE-Proteinen der *A. thaliana* ist die Beschaffenheit dieser Domäne unterschiedlich (Abb. 3-1). Zwei negativ geladene Aminosäuren können im *northern patches* des PetE2-Isoproteins festgestellt werden. Das PetE1-Isoprotein enthält hingegen nur eine negativ geladene ₆₁Glutaminsäure. Wenn also die negative Ladung des *northern patches* einen stabilisierenden Einfluss auf das oxidierte Kupferatom haben sollte, dann kann man auch hier, für das oxidierte PetE2-Plastocyanin eine erleichterte Dissoziation und eine schnellere erneute Reduktion am Photosystem I annehmen.

In der Struktur der beiden *A. thaliana* Plastocyanine lassen sich zwei wesentliche Unterschiede festlegen, die einen Einfluss auf die Effektivität des Elektronentransports zwischen Cytochrom *b₆/f*-Komplex und Photosystem I haben können. In beiden Fällen bestimmen die Unterschiede die Stabilität des oxidierten Kupferatoms und somit auch die Stabilität des am Photosystem I gebundenen oxidierten Plastocyanins. Da beide Veränderungen die erleichterte Dissoziation für das PetE2-Plastocyanin begünstigen bzw. für das PetE1-Plastocyanin erschweren, kann eine signifikante Diskrepanz im Redoxverhalten des Photosystems I in den einzelnen Plastocyanin-Mutanten entstehen. In der Zukunft sollte der Zusammenhang zwischen den hier aufgeführten strukturellen Unterschieden und dem Oxidationszustand von P₇₀₀ unter kontinuierlicher Lichteinstrahlung in *A. thaliana* geprüft werden.

Bezogen auf diese Merkmale nimmt *Arabidopsis thaliana* eine Sonderstellung unter den höheren Pflanzen ein. Obwohl viele höhere Pflanzen mehrere Kopien für das Plastocyanin-Gen in ihrem Genom enthalten sind die Nord-Domäne und das *northern patch* weitgehend konserviert und innerhalb einer Spezies überwiegend gleich. Das Auftreten einer hydrophilen

Aminosäure, Tyrosin in der ansonsten hydrophoben Nord-Domäne des Plastocyanins wurde (unter höheren Pflanzen) nur in der *Arabidopsis* PetE2-Isoform und in allen Plastocyaninen der *Hordeum vulgare* festgestellt. Auch die Reduzierung des *northern patches* bis auf nur eine negativ geladene Aminosäure lässt sich nur in dem PetE1-Protein beobachten (Abb. 6-2.). Die innerhalb dieser Arbeit hergestellten Mutanten bieten daher die einzigartige Möglichkeit, das Charakteristikum des *northern patch* in Plastocyanin zu untersuchen und das Model der Plastocyanin-Photosystem I Interaktionen in höheren Pflanzen zu verfeinern.

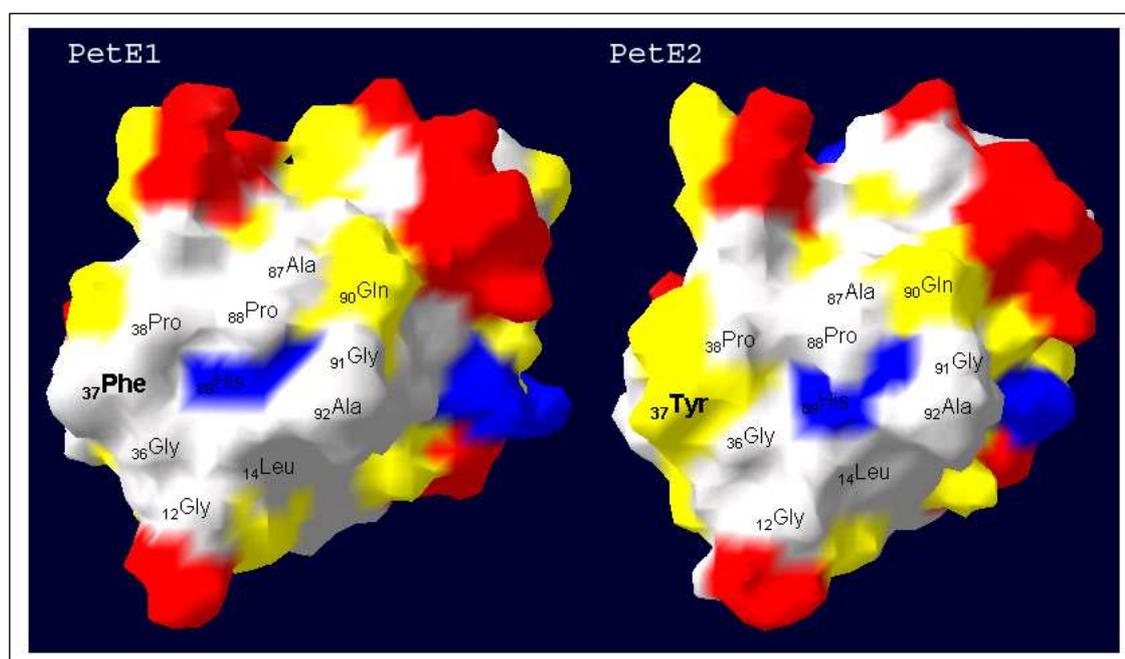


Abbildung 3-1: Ein Vergleich der hydrophoben Nord-Domänen der *A. thaliana* PetE1 und PetE2-Plastocyanine. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf den Vergleich der Aminosäuresequenzen in der Abb.2-1A. Die farbliche Kennzeichnung klassifiziert die exponierten Aminosäuren nach den chemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten: grau=unpolar; blau=basisch; gelb=polar; rot=sauer.

3.3.4. Physiologischer Zustand der Plastocyanin-Mutanten

Beide Effekte, die Verfügbarkeit des Plastocyanins und die strukturellen Unterschiede zwischen den *PetE*-Isoformen prägen den Phänotyp der Plastocyanin-Mutanten. Das Zusammenspiel dieser beiden Faktoren spiegelt sich im Aufbau des Photosynthese-Apparates wieder (Abb. 2-7B) und kann in Messungen der effektiven Quantenausbeute am Photosystem II (Φ_{II}) verfolgt werden (Abb. 2-8). Die Auswirkung der strukturellen Unterschiede sollten jedoch unbedingt als ein additiver Effekt und im Kontext der Proteinkonzentrationen in den jeweiligen Mutanten betrachtet werden.

Eine Erniedrigung der Plastocyanin-Abundanz im Pflanzen führt zunächst zur Verkleinerung des Photosynthese-Apparates (Tab. 2-7B) und spiegelt sich in der zunehmend schwächer effektiven Quantenausbeute am Photosystem II wieder (Tab. 6-8B und C.). Die Reduktion der Photosysteme erfolgt jedoch nicht gleichmäßig. Die Abnahme des Photosystems II erfolgt weitaus stärker als die Abnahme der Photosystem I-Komplexes. Aufgrund der inäqualen Reduktion beider Komplexe werden zunächst die Energieverteilung und der Elektronendruck auf die einzelnen Komponenten der Elektronentransportkette ausbalanciert. Das Gleichgewicht zwischen den Photosystemen mindert die Anfälligkeit der Mutanten gegenüber destruktiver Lichteinstrahlung und verhindert weiterreichende Folgen der sonst eingetretenen Photoinhibition.

Wegen der verringerter Effektivität des linearen Elektronentransports könnte auch die Aufrechterhaltung des Protonengradienten über der Thylakoidmembran für die Plastocyanin-Mutanten ein weiteres Problem darstellen. Unzureichende Ansäuerung des Thylakoidlumens würde nicht nur die ATP Produktion beeinträchtigen, sondern zusätzlich die Entstehung destruktiver *reactive oxygen species* (ROS) nicht früh und schnell genug unterbinden. Erst bei einer pH- Erniedrigung auf mind. 5,8 erfolgt die Aktivierung des Xanthophyllzyklus und Konformationsänderungen im LHCII (Munekage *et al.* 2001). Die überschüssige Anregungsenergie der Pigmente wird dann in Form von Wärme dissipiert und kann als ein Bestandteil der nicht-photochemischer Löschung (qE) der Chlorophyllfluoreszenz bestimmt werden. In den *pete*-Mutanten erfolgt eine entsprechende Kompensation der Thylakoidlumen-Ansäuerung wahrscheinlich über eine Verringerung der Abundanz der ATP-Synthase (Tab. 2-7B).

Die Folgen der Kompensation treffen die beiden Mutanten zunächst unterschiedlich. In der *pete1-1.1* Mutante ist die Wärmedissipation bereits unter 150 μE aktinischer Illumination stärker als in Wildtyp (Tab. 2-8D) und weist auf eine, vergleichsweise übermäßige Reduktion der ATP-Synthase-Abundanz hin. Die *pete2-1.1* Mutante stellt den anderen Grenzfall dar. Bei einer Illumination von 150 μE liegt die Wärmedissipation deutlich unter dem Wildtypwerten und weist damit auf eine später einsetzende Ansäuerung des Thylakoidlumens hin. In beiden Fällen verringert sich, mit zunehmender Stärke der Illumination, die Differenz der qE Werte und erreicht rasch wildtypische Größenordnung.

Die Differenzen zwischen den *pete*-Mutanten - im Hinblick auf die NPQ-Komponente - scheinen allein durch die Disproportionierung zwischen der Effektivität des linearen Elektronentransports und der ATP-Synthase abhängigen Regulation des transthylakoiden Protonengradienten zu sein. Im Endeffekt reagieren die beiden Mutanten zwar unterschiedlich

schnell, jedoch gleich effektiv auf den einsetzenden Lichtstress. In keiner der *pete*-Mutanten wurde jedoch eine signifikante Veränderungen in der Carotinoid-Komposition des Xanthophyllzyklus-Pigmente (Tab. 2-6B) bzw. in der Konzentration der ROS-Spezies zum Wildtyp festgestellt. Die ROS-Bestimmung erfolgte mittels histologischer Färbung mit DAB (Diaminobenzidin) und NBT (Nitroblautetrozolium) (die Daten wurden nicht gezeigt).

Weiterhin ließ sich in Linien mit erhöhter Plastocyanin-Abundanz keine signifikante Zunahme der Komponenten des Photosynthese-Apparates im Vergleich zum Wildtyp feststellen. Exemplarisch dafür kann die *35SCaMV::PetE2* Linie betrachtet werden. Obwohl sie die höchste Akkumulation der *PetE*-mRNA und des Genprodukts aufweist, verbleibt der Aufbau des Photosynthese-Apparates nahezu unverändert wildtypisch. Aus diesem Blickwinkel betrachtet, lassen sich die beobachtete Disproportionierung im Aufbau des Photosynthese-Apparates in der *35SCaMV::PetE1*-Linie (Tab. 2-7B) und die Ergebnisse der Φ_{II} -Messungen (Tab. 2-8B) am beiden ektopischen Plastocyanin-Mutanten nicht nur mit einer erhöhten Abundanz des Plastocyanins erklären: In der *35SCaMV::PetE1*-Überexprimierer kann eine 15%-ige Steigerung der Photosystem I-Konzentration beobachtet werden. Aber in einer Reaktion zweiter Ordnung unter nicht-limitierender Plastocyanin-Abundanz sollte die Konzentrationszunahme des zweiten Edukts (PSII) in einer höheren Effektivität des linearen Elektronentransports münden. Die ermittelten Werte deuten jedoch auf das Gegenteil hin, denn die effektive Quantenausbeute am PSII bleibt tendenziell deutlich unter dem Wildtypniveau (Abb. 2-8).

Ähnlich unwirklich scheint der Sachverhalt in der stärksten ektopischen Mutante zu sein. In der *35SCaMV::PetE2*-Linie liegen die Φ_{II} -Messwerte signifikant höher als im Wildtyp oder in den *35SCaMV::PetE1*-Linien. Ohne gleichzeitiger Erhöhung der Photosystem I-Abundanz kann jedoch die Effektivität des linearen Elektronentransports nicht gesteigert werden. Eine Erklärung für den scheinbaren Widerspruch könnte in den bereits diskutierten strukturellen Unterschieden zwischen den beiden Plastocyanin-Isoformen liegen. Diesem Modell folgend, sollte eine schnellere Komplexauflösung zwischen oxidiertem PetE2 und Photosystem I zunächst für relativ mehr freie Bindestellen am P_{700} pro Zeiteinheit sorgen. In den *pete1-1.1* und *35SCaMV::PetE2*-Mutanten kann dieser Effekt mit einer Erhöhung des limitierenden Edukts (Photosystem I) gleich gestellt werden und trägt zur Steigerung der Effektivität des linearen Elektronentransports bei. Das oxidierte PetE1-Genprodukt verlangsamt hingegen einen effizienten Plastocyaninumsatz am P_{700} . In der *pete2-1.1*-Mutante dürfte dieser Effekt kaum eine Rolle spielen, denn hier wirkt sich schon die Konzentration des Plastocyanins limitierend auf die Geschwindigkeit der Reaktion aus. Hingegen sollte in der

35SCaMV::*PetE1*-Linie die Anzahl der freien Bindestellen am P₇₀₀ unter kontinuierlichen Illumination zunehmend schwinden und die Effektivität des linearen Elektronentransports deutlich drosseln. Die Zunahme in der Photosystem I-Abundanz könnte dann als eine Art Kompensationsreaktion auf die unzureichende Anzahl der freien P₇₀₀ Bindestellen betrachtet werden.

3.3.5. Wachstum der Plastocyanin-Mutanten

In dem Entwicklungspotenzial der Pflanzen spiegeln sich ihr physiologische Zustand und ihre Fähigkeit, dynamisch auf die sich fortlaufend verändernde Umwelteinflüsse zu reagieren.

Aus früheren Studien an den *psad1* und *psaf*- Mutanten (Ihnatowicz *et al.* 2004; Haldrup *et al.* 2000) wissen wir, dass eine Einschränkung des photosynthetischen Elektronenflusses über das Photosystem I zu einer signifikanten Minderung der Wachstumsraten und verringerter Fertilität der Pflanzen führt. Bei den Plastocyanin-Mutanten kann die gleiche Tendenz in der *pete2-1.1* Mutante beobachtet werden. Das Ausschalten der stärkeren und vermeidlich auch effizienteren Plastocyanin-Allele verlangsamt den linearen Elektronentransport und mündet in einer 27%igen Wachstumsreduktion der Pflanzen.

Die Entwicklung der *pete1-1.1* Mutante verläuft ebenfalls um 8% langsamer als bei Wildtyppflanzen. Diese Beobachtung ist insofern überraschend, als dass hier nur das schwache und vermeidlich insuffiziente *PetE1*-Allel ausgeschaltet wurde. Analog zu dem *knock out* der „schwachen“ *PsaD2*-Genkopie (Ihnatowicz *et al.* 2004) sollte die schwache Minderung der Plastocyanin-Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Mutanten nehmen. Zum anderen, weisen die Messungen der effektiven Quantenausbeute am PSII auf eine höhere Leistungsfähigkeit des linearen Elektronentransports hin. Es scheint, als ob die geringfügige Reduktion der Plastocyanin-Abundanz einen übermäßigen Schutzmechanismus auslösen würde und langfristig die effektivere Nutzung der Lichtenergie behindert. Die Hinweise, die zu dieser Annahme führen, stützen sich auf die bereits diskutierte differenzielle Genexpression, die Disproportionierung im Aufbau des Photosynthese-Apparates und der Tendenz zu einer hypersensitiven Wärmedissipation.

Beim Wachstum der 35SCaMV::*PetE1*-Linien wurde eine 30%ige Zunahme der Biomasse, verglichen mit Wildtyppflanzen, beobachtet. Aufgrund einer tendenziell schwächeren Effektivität des linearen Elektronentransports deutet die starke Entwicklung der Linien auf eine langfristige Kompensation der *PetE1*-Insuffizienz hin. Es kann nur vermutet werden,

dass neben der erhöhten Photosystem I-Abundanz noch weitere, nicht charakterisierte Faktoren zu der Vitalität dieser Mutanten beitragen.

In der *35SCaMV::PetE2* Linie kann das Ergebnis einer hohen Plastocyanin-Abundanz und einer vermeidlich kürzeren Aufenthaltsdauer des oxidierten Plastocyanins am Photosystem I beobachtet werden. Der resultierende verbesserte Umsatz des Plastocyanins am P₇₀₀ mündet in einer effektiveren Umwandlung der Lichtenergie und in einer 60%iger Zunahme der Biomasse verglichen mit Wildtyppflanzen. Die Gesamtvitalität der Mutanten profitiert zusätzlich von einem ungestörten Gleichgewicht zwischen den einzelnen Komponenten der linearen Elektronentransportkette (Tab. 2-6B; Tab. 2-7B). Weitere Studien an der *35SCaMV::PetE2*-Überexprimierer wie auch an der Feineinstellung der Plastocyaninstruktur könnten daher neue Perspektiven auf Steigerung der Erträge in den dikotylen Nutzpflanzen aufzeigen.

4. Material und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Fluka (Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Riedel-de-Haen (Hannover) oder Sigma (Steinheim) bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien wurden von Roth (Karlsruhe), Merck und Duchefa (Niederlande) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth), NEB (Frankfurt/Main) und Promega (USA) bezogen. $^{32}\text{P}_{\alpha}$ -dCTP; und $^{33}\text{P}_{\gamma}$ - dATP wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

4.1.2. Verwendete Kits

Carbamylyte Calibration Kit for 2D Electrophoresis	Amersham
Chemiluminescence Western -Blotting Kit	Amersham
Easy Vektor System I, pGEM-T	Promega
Gateway-System [®]	Invitrogen
High Pure PCR Product Purifikation Kit	Roche
pET Directional TOPO [®] Expression Kit	Invitrogen
QIAexpressionist	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
SuperScript Preamplification System	GibcoBRL

4.1.3. Puffer und Lösungen

7%-PAA 150ml: 72g Harnstoff; 26,1ml 40% (19:1) Acrylamid-Bisacrylamid; 15ml 10xTBE

Acrylamid (48/1,5): 48% (w/v) Acrylamid; 1,5% (w/v) Bisacrylamid

Antibinder: 5% v/v Dimethyldichlorosilan (Sigma) in Chloroform

Binder: 5ml Et-OH abs.; 15µl Eisessig; 25µl β-Methacryloxypropyl-Trimethoxysilan

BPB-A-Marker: 100mM EDTA; 0,2% (w/v) BPB; 50% (v/v) Glycerin

BPB-P-Marker (PAA-Gele): 98% (v/v) Formamid; 10mM EDTA pH8; 0,05% (w/v) BPB; 0,05% (w/v) Xylene Cyanalblau

C- Fixiererlösung: 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol

C-GR-Lösung-A: 2% (w/v) ortho-Phosphorsäure (85% H₃PO₄); 17% (w/v) Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄; 34% (v/v) Methanol

C-R250-Farbstoffreagenz: 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol

DEPC-SDW: 0,1% v/v Diethylpyrocarbonat –Lösung

DNA-Extraktionspuffer: 200mM Tris-HCl pH7,5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0,5% (w/v) SDS

Elutions-Puffer: 10mM Tris-HCl pH9; 50mM KCl; 0,1% Triton X-100

Ethidiumbromid-Lösung: 10mg*ml⁻¹; (Sigma)

Heringssperma-DNA: 50mM,

Ig-Elutions-Puffer: 0,1M Glycin/HCl pH 2,8

Ig-NaP_i: 0,1M Na₂HPO₄; 0,1M NaH₂PO₄ (soll pH 7,4)

Ig-N-Lösung 100x: 2%(w/v) NaN₃

Ig-PBS 10x: 1,37M NaCl; 14,7mM KH₂PO₄; 78,1mM Na₂HPO₄; 26,8mM KCl

I-IEF-Puffer: 5M Harnstoff; 2M Thioharnstoff; 4%(w/v) Chaps; 20mM DTT; 0,5%(v/v) Ampholyte; 0,002%(w/v) BPB

Lsg 0: 1,25M Tris-HCl; 125mM MgCl₂, pH 8,0

Lsg A: 1ml Lösung 0; 18µl 2-Mercaptoethanol; je 5µl dADP/dTTP/dGTP; 100mM, neutralisiert,

Lsg B: 2M HEPES, pH6,6 mit 4M NaOH, filtriert, autoklaviert

Lsg C: Hexadesoxyribonucleotide (Pharmacia PL No, 2166, pd(N)₆ gelöst in TE

MEN-Lösung 10x: 200mM MOPS; 50mM NaCl; 10mM EDTA, pH 7

M-Lsg 1: 50mM Glucose; 25mM Tris-HCl pH 8; 10mM EDTA

M-Lsg 2: 200mM NaOH; 1% SDS

M-Lsg 3: 3M Natriumacetat pH 4,8

N-12%-PAA 15ml : 3,75ml Acrylamid (48/1,5); 3ml 50%(v/v) Glycerol; 1,5ml N-Tris/Glycin-Puffer; 6,75ml SDW; 10µl TEMED; 50µl 10%(w/v) APS

N-4%-PAA 15ml: 1,25ml Acrylamid (48/1,5); 3ml 50%(v/v) Glycerol; 1,5ml N-Tris/Glycin-Puffer; 9,25ml SDW; 10µl TEMED; 50µl 10%(w/v) APS

N-DM-Stammlösung: 10%(w/v) n-dodecyl-β-D maltosid in N-TS-Puffer

N-Hybridisierungslösung: 7%SDS; 250mM Na₂HPO₄, pH 7

NiNTA-Elutionspuffer: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 220mM Imidazole ; pH8(eingestellt mit NaOH)

NiNTA-Lysispuffer: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 40mM Imidazole ; pH8(eingestellt mit NaOH); 0,1% (w/v) Lysozyme

NiNTA-Washpuffer: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 60mM Imidazole ; pH8(eingestellt mit NaOH)

N-Lower-Running-Puffer 10x: 120mM Tris; 960mM Glycine

N-Sealing-PAA 10ml: 2,5ml Acrylamid (48/1,5); 2ml 50%(v/v) Glycerol; 1ml N-Tris/Glycin-Puffer; 4,5ml SDW; 10µl TEMED; 50µl 10%(w/v) APS

N-Stacking-PAA 10ml: 0,73ml Acrylamid (48/1,5); 1ml N-Tris/Glycin-Puffer; 2ml 50%(v/v) Glycerol; 6,25ml SDW; 10µl TEMED; 40µl 10%(w/v) APS;

N-Tris/Glycin-Puffer: 120mM Tris; 480mM Glycine

N-Upper-Running-Puffer 10x: 120mM Tris; 960mM Glycine; 1% LDS

N-Wasch-Puffer I: 0,1%(w/v) SDS; 2x SSPE, pH 7

N-Wasch-Puffer II (10)x: 2%(w/v) SDS; 10mM Na₂EDTA*H₂O; 50mM NaH₂PO₄*H₂O; pH7

OLB-Puffer 5x: 100µl Lsg A + 250µl Lsg B + 150µl Lsg C

PCI: Phenol (TAE-gesättigt)/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (v/v/v)

PT- Enzymlösungen: 1,5%(w/v) Cellulase R10 (Duchefa, C8001); 0,5g Macerozym R10 (Sevra, 28302) in K3-0,4M Medium; pH 5,6-5,7

PT-MaMg-Puffer: 8,2%(w/v) Mannitol; 0,3%(w/v) MgCl₂*6H₂O; 0,1%(w/v) MES; pH5,6 (eingestellt mit KOH); steril filtriert

PT-PEG4000: 2,4%(w/v) Ca(NO₃)₂*4H₂O; 7,3%(w/v) Mannitol; 40%(w/v) PEG4000; 0,1%(w/v) MES; pH 7,9 (eingestellt mit KOH); 10min autoklaviert

PT-Vitamin-Stock: 11,2%(w/v) Gamberg`s Vitamine (Sigma; G-2519); 0,2%(w/v) Glycin

PT-W5: 0,9%(w/v) NaCl; 3,68%(w/v) CaCl₂*2H₂O; 0,08%(w/v) KCl; 0,18%(w/v) Glucose; pH 5,8 (eingestellt mit HCl)

S-Entwickler: 30g NaOH; 995ml SDW; 5ml 37% Formaldehyd

S-Färber: 0,02% AgNO₃ in S-Fixierer

S-Fixierer: 315ml 96% Et-OH; 15ml Eisessig; 670ml SDW

SSC 20x: 3M NaCl; 300mM Tri-Natriumcitrat, pH 7

SSPE 20x: 3,6M NaCl; 200mM Natriumphosphatpuffer pH 7,7; 20mM EDTA

Sterilisationslösung: 10ml 12-14% v/v NaOCl; 40ml SDW; 0,5ml 20% w/v SDS

TAE-Puffer 50x: (50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer): 2M Tris, pH 8; 1M Na-Acetat: 50mM EDTA

TBE 10x: 1M Tris-HCl; 1M Borsäure; 20mM EDTA, pH 8,3,

TBS 10x: 100mM Tris pH8 ; 1,5M NaCl

TI-T1-Puffer: 0,5% (w/v) Magermilch; 400mM Sorbitol; 100mM Tricin/KOH pH 7,8; TI-Proteaseinhibitoren

TI-F2-Puffer: 25mM HEPES/KOH pH 7,5; 10mM EDTA

TI-Proteaseinhibitoren: 100mM PMSF; 100mM Benzamidine; 500mM Aminocarpoic Säure

TI-TS-Puffer: 50% (v/v) Glycin; 10mM HEPES/KOH pH 7,5; 1mM EDTA

TTBS : 1xTBS ; 0,1% (v/v) Tween 20

W-10%-PAA 25ml: 5,21ml Acrylamid (48/1,5); 6,21ml 3M Tris-HCl pH 8,45; 1,25g Sucrose; 10,63ml SDW; 25µl TEMED; 50µl 10%(w/v) APS

W-13%-PAA 50ml: 13,54ml Acrylamid (48/1,5); 12,42ml 3M Tris-HCl pH 8,45; 5,63g Sucrose; auf 50ml SDW; 50µl TEMED; 100µl 10%(w/v) APS

W-16%-PAA 25ml: 8,33ml Acrylamid (48/1,5); 6,21ml 3M Tris-HCl pH 8,45; 4,38g Sucrose; 5,63ml SDW; 15µl TEMED; 20µl 10%(w/v) APS

W-Blocking-Puffer: 5% (w/v) Magermilch in 1xTTBS oder 3% BSA in 1xTTBS

W-Loading-Puffer: 12M Harnstoff; 500mM Tris-HCl pH 6,8; 10% (v/v) Glycerol; 10% (w/v) SDS; 5%(v/v) β-ME; 0,05% (w/v) BPB

W-Lower-Running-Puffer 5x: 1 M Tris-HCl pH 8,9

W-Sealing-PAA 10ml: 3,3ml Acrylamid (48/1,5); 2,5ml 3M Tris-HCl pH 8,45; 4,2ml SDW; 10µl TEMED; 70µl 10%(w/v) APS

W-Stacking-PAA 10ml: 0,83ml Acrylamid (48/1,5); 2,5ml 3M Tris-HCl pH 8,45; 6,69ml SDW; 10µl TEMED;
70µl 10%(w/v) APS

W-Stripping-Puffer: 100mM β-ME; 2% (w/v) SDS; 62,5mM Tris-HCl pH 6,7

W-Transfer-Puffer: 180mM Glycin; 25mM Tris; 20% Met-OH

W-Upper-Running-Puffer 5x: 500mM Tris-HCl; 500mM Tricin; 0,5% (w/v) SDS; 5mM EDTA pH 8

Z6-Puffer: 6M Guanidiniumchlorid; 20mM MES; 20mM EDTA; frisch mit 50mM β-Mercaptoethanol

4.1.4. Medien

4.1.4.1. Medien für die Anzucht von *E. coli*

SOC-Medium:

2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄;
20 mM Glucose; pH 7,0

Luria-Bertani (LB) Medium:

1% (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1,0 % NaCl (w/v), pH 7,2

Falls nötig wurden dem LB-Medium folgende Zusätze zugegeben:

- 1,5% (w/v) Agar für LB-Agarplatten
- 0,005% (w/v) X-Gal und 0,4 mM IPTG für Blau/Weiß - Selektion

4.1.4.1. Medien für die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

YEB-Medium :

0,1 % Hefeextrakt; 0,5 % Fleischextrakt; 0,5 % Trypton; 0,5 % Saccharose; 2 mM MgSO₄, pH 7,2

für YEB-Agarplatten wurde dem YEB-Medium 1,5% (w/v) Agar zugegeben

4.1.4.2. Medien für die Pflanzenaufzucht in Sterilkulturen:

MS1/Saccharose-Medium:

4,3g MS-Salz mit Vitaminen (Murashige and Skoog basal salt Mixtur, Sigma), pH 5,7-5,8; 0,8% (w/v) Agar,
auf 1L mit SDW. Falls nötig wurden dem MS-Medium folgende Zusätze zugegeben:

1% (w/v) Saccharose; Selektionsmarker und Fungizide

ΔCu²⁺MS-Medien:

Für die Zubereitung des Mediums wurde HPLC-Wasser verwendet.

Makroelemente (je 200x Stammlösungen, autoklaviert):

250 mM KNO₃, 300 mM Ca(NO₃)₂, 150 mM MgSO₄, 100 mM KH₂PO₄

Mikroelemente (je 1000x Stammlösungen, autoklaviert):

50 mM H₃BO₃; 2 mM ZnSO₄; 75 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄; 50 mM KCl; 72 mM Fe-EDTA; 10 mM MnSO₄; 100 mM Na₂O₃Si; 0,5 g*l⁻¹ MES.

Vitamine: 0,1 g Myo-Inositol, 0,5 g Nikotinsäure, 0,5 g Pyridoxin-HCl, 0,1 g Thiamin-HCl

pH mit Phosphorsäure auf 5,3-5,4 eingestellt

0,8% (w/v) Agar

Das Mikroelement Cu²⁺ wurde in folgenden Konzentrationen angewendet:

{0; 0,01; 0,025; 0,05; **0,1**; 1; 10; 50; 100; 200} μM CuSO₄. Das Medium ohne Kupfer wurde durch Zugabe von Cuprizon (Cu²⁺-spezifischer Chelator; Sigma) hergestellt.

4.1.4.3. Medien für die Protoplastentransformation; K3-0,4M Medium

0,1%(w/v) Macro-salt Mixture Gamborg's B5 Media von Duchefa (M0304); 0,046%(w/v) CaCl₂*2H₂O; 0,1%(w/v) Micro-salt Mixtur M&S Media von Duchefa (M0301); 0,001%(v/v) PT-Vitamin-Stock; 0,025%(w/v) Xylose; 13,7%(w/v) Saccharose; pH5,8 (eingestellt mit KOH); 550-590Os eingestellt mit Saccharose; steril filtriert.

4.1.4.4. Antibiotika und Fungizide

Antibiotika und Fungizide wurden bei Bedarf in folgenden Konzentrationen [in mg*l⁻¹ Kulturmedium] eingesetzt :

Tabelle 4-1: Antibiotika und Fungizide.

Stoff	Stockkonzentration	Einsatz in Medium
Ampicillin	100mg*ml ⁻¹ in SDW	100 mg*l ⁻¹ (<i>E. coli</i>)
Kanamycin	50mg*ml ⁻¹ in SDW	25 mg*l ⁻¹ (<i>E. coli</i> ; <i>A. tumefaciens</i>); 75mg*l ⁻¹ (<i>A. thaliana</i>)
Chloramphenicol	100mg*ml ⁻¹ in SDW	50 mg*l ⁻¹ (<i>E. coli</i>)
Rifampicin	100mg*ml ⁻¹ in DMSO	50 mg*l ⁻¹ (<i>A. tumefaciens</i>)
Claforan (Cefotaxim)	100mg*ml ⁻¹ in SDW	500 mg*l ⁻¹ (<i>A. thaliana</i>)
Nystantin	10mg*ml ⁻¹ in DMSO	6-15 mg*l ⁻¹ (<i>A. thaliana</i>)

4.1.1.5 Phytohormone für *N. tabacum*

Tabelle 4-2: Phytohormone.

Stoff	Stockkonzentration	in Medium
1-Naphthyllessigsäure (NAA)	1mg*ml ⁻¹ in Ethanol	1 mg*l ⁻¹
6-Furfurzlamino-purin (Kin)	0,1mg*ml ⁻¹ in Ethanol	0,2 mg*l ⁻¹
6-benzylaminopurin (BAP)	1mg*ml ⁻¹ in Ethanol	0,5 mg*l ⁻¹

4.1.5. Oligonukleotide in 5'-Orientierung und ihre Verwendung

für Klonierung des *Atc_x*-Proteins mit dem pTOPO[®]-System

Cy-Topo2s-1/211: (CACCATGCAGACTTTGGATATACAGAGAGGA)

Cy-Topoas-322/525: (GTCCGTAGATACAGTTGGCCAGCCTTGGT)

PetE1 und *PetE2* spezifische Primer für den Nachweis der Deletion in *pete1.1*, für semiquantitative RT-PCR an beiden *PetE*-Genen und für die Herstellung *PetE* spezifischer Sonden.

dMWs-30/30:(MATCCCWTCTTTACACGGCCT; dR4as-300/288:(CACRATCTTCTCTCCTTTAGC)

PetE2 spezifische Primer für den Nachweis des Baseaustausches und Deletion in der *pete2.1* Mutanten-Linie:

Pc2-139sL:(GAGTTTGCTTTTAGAGCCATCCATTGT); Pc2-75as:(GGATGATTTGATGGTTGAGGCTTTA)

PetE2 Footprint - Analysen:

Pc2-139s:(GAGTTTGCTTTTAGAGCCATCC); Pc2-94as-42as:(GAAAGATGGGATTGCAACGGT)

für Gateway[®]-Klonierung der *PetE2* kodierenden Nukleotidsequenz:

Pc2s-cd-attB1:(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGCCTCAGTAACCTCAGCCACCGTTG)

Pc2as-cd-attB2:(GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTTAACGGTGACTTTACCG)

für Gateway[®]-Klonierung der *PetE1* kodierenden Nukleotidsequenz:

Pc1s-cd-attB1:(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGCCGCAATTACATCAGCTACCGTCA)

Pc1as-cd-attB2: (GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACTTGACGGTGAGTTTCCCA)

für Gateway[®]-Klonierung der *PetE2* Nukleotidsequenz mit nativen Promoter und 3'-regulatorischen Region:

g-997attB1-pc2s:(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCGGTACGGACTGACCAGATATCTG)

g+396attB2pc2as:(GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGTGATTGAGATAATTTGGTCAATC)

für Gateway[®]-Klonierung der *Atc_x* kodierenden Nukleotidsequenz:

CytC6s-cd-attB1:(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGACTTGTCTCTCTGGTGC)

CytC6as-cd-attB2:(GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTCCGTAGATACAGTTGGCCAG)

für die Herstellung chimärer *PetE2-Chl Cyt c₆* Konstrukte

Pc2s-cd-attB1:(GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGCCTCAGTAACCTCAGCCACCGTTG)

Pc2-Chc6as-204/228:(CTGGGCGCCGAGAGCGAGGTCAGCTGCCATGGCGTTTCCGGCCAAAGC)

ChlC6s-175:(GCTGACCTCGCTCTCGGCGCCCA)

Chlc6as-attB2-477:(GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTACTTCCAGGCGGCA)

für Analysen chimärer *PetE2-Chl Cyt c₆* Konstrukte

PetE2s-7:(TCAGTAACCTCAGCCACCGTTG)

zur Herstellung einer *Chl Cyt c₆* spezifischen Northern-Sonde

Chls-4:(CTTCAGTTGGCGAACCGTAGCGTG)

zur Herstellung einer *ChlCyt c₆* spezifischen Northern-Sonde und für Analysen chimärer *PetE2-Chl Cyt c₆* Konstrukte

Chlas-414/444:(GAACACGTACTCCGCCACAGCCTGG)

für Analysen an *atc_{x1}* und *atc_{x2}*-Mutanten

C6seq1s-4:(AGACTTGTCTCTCTGGTGCCT); 2Cyt6as: (ACCTTTCGAGGTCTTTTGTGAAAAGC)

Lbb1-160:(GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT)

für Analysen der pJan33-Konstrukte

pJan19s(-248s):(GATAAGCTTCTCCTCCTCTGCT); pJan2086as:(AGAGACTGGTGATTTTTCGGGA)

für Kontrolle der qRT-PCR Reaktionen: *Actin1* (At2g37620)

acts: (tgcgacaatggaactggaatg); actas: (ggatagcatgtggaagtgcatacc)

für Klonierung des *Atc_x*-Gens in den RFP-Vektor (pGJ1425) über eine *NcoI*-Schnittstelle

Atc_x-RFP-*NcoI*-s:(ATTCCATGGATGAGACTTGTTCCTCTCTGGT)

Atc_x-RFP-*NcoI*-as:(TATCCATGGTGTCCGTAGATACAGTTGGCCAGCCT)

für weitere Northern-Sonden

Elip2s: TGACTACACGCAACATCAGAAACAC; Elip2as: CATCGCAAACCGACCGTCCATAGCT

PsaGs: ATCTCATTCATGGCCTTCGTCCCCT; PsaGas: AAGAAGCTTGGGTCGTATCCATTGCT

PsaKs: AGCACTATGATGACTACATGCCTCA; PsaKas: ACTCCTACACCGATGATATGACCAA

4.1.6. Plasmide

- pGEM-T** für Klonierungen von PCR -Produkten
 Charakteristika: f1 ori, *ColE1* ori, *lacZ*, MCS, Amp^R, T7- und SP6-Promoter (Promega, Mannheim, Germany)
- pDONOR201** für Klonierung von PCR - Produkten über sequenzspezifische DNA-Rekombinationen, zur Herstellung von pEntry - Plasmiden.
 Charakteristika: T2 und T1 Terminatoren, *attP1*, *ccdB*-Gen Cm^R, *attP2*, Kan^R, pUC ori (Gateway-System[®], Invitrogen, Carlsbad, USA)
- pP001-VS** binäre Plasmid zur Herstellung von nativen Expressionsplasmiden
 Charakteristika: ORI, MCS, RB, pVS1, LB; Amp^R, PAT; pAA
- pP001VS-GW** binäres *Gateway*[®] *destination Vector* zur Herstellung von nativen Expressions-Plasmiden über sequenzspezifische DNA-Rekombinationen
 Charakteristika: ori, MCS, *attR1*, RB, pVS1, *attR2*, LB; Amp^R, PAT; pAA, Gateway[®] Kassette (FrameA) mit *ccdB*-Gen, Cm^R
- pJAN33** binäres *Gateway*[®] *destination Vector* zur Herstellung von Expressionsplasmiden über sequenzspezifische DNA-Rekombinationen.
 Charakteristika: 2x35SCaMV, *attR1*, WRYKY33-Intron, Cm^R, *ccdB* Gen, *attR2*, 35STerminator, RB, OriV, bla, *ColE1*ori, LB, OcsT Kan^R, nosP
- pGJ1425** für C-terminale -*dsRED* Fusionen mit *Atc_x* und transiente Transformationen von Tabak Protoplasten.
 Charakteristika: 2x35SCaMV, MCS, gjRFP, 35SpA, Amp^R, (Jach, G. *et al.* 2001)
- pET101/D-TOPO[®]** für C-terminale (-His)₆ Fusion mit *Atc_x* und für Proteinexpression in *E.coli*
 Charakteristika: T7 Promoter, lac operator (*lacO*), Ribosome Binding Site (RBS), TOPO[®] cloning site (directional), V5 epitope, Polyhistidine (-His)₆ region, T7 transcription termination, Amp^R, pBR322 origin, ROP, *lacI* (Invitrogen, Carlsbad, USA)

4.2. Organismen

4.2.1. *Escherichia coli*

- Stamm DH5 α für Klonierungsarbeiten
Genotyp: F- ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-,mk+) *phoA supE44 λ -thi gyrA96 relA1* (Hanahan, 1983)
- Stamm JM109 für Klonierungsarbeiten
Genotyp : *recA1 end A1 thi gyrA96 hsdR17 supE44 λ -relA1 Δ (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacq Δ M15]* (Yanish-Perron *et al.* 1985)
- Stamm TOP10 für Klonierungsarbeiten und Proteinüberexpression.
E.coli Stamm ohne T7-RNA-Polymerase-Gen, gegen potentiell toxischer Wirkung der Protein-Überexpression auf die Wirtszelle. Genotyp: F- *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* (Invitrogen,Carlsbad, USA)
- Stamm BL21 Star (DE3)
für Proteinüberexpression in *E.coli*
Das T7-RNA-Polymerase-Gen liegt unter lacUV5-Kontrolle und durch Zugabe von IPTG kann es induziert werden. Genotyp: F- *ompT hsdSB* (rB-mB-) *gal dcm rne131* (DE3); (Invitrogen,Carlsbad, USA).
- Stamm DB3.1TM zur Transformation mit den Gateway[®]-kompatiblen Ausgangsvektoren.
Die *gyrA462* Mutation macht diesen Stamm resistent gegen das Produkt des *ccdB*-Gens.
Genotyp: [F- *gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20*(rB-, mB-) *supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Smr) *xyl5 Δ leu mtl1]* (Invitrogen,Carlsbad, USA).

4.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

- Stamm GV3101 (C58C1)
für Transformation von *Arabidopsis thaliana*
Rif^R; (Loake GJ *et al.*, 1988) und mit dem Ti-Plasmid pMP90RK Gm^R Kan^R (Koncz *et al.* 1990) als Helferplasmid.

4.2.3. Pflanzen

Für alle Arbeiten wurde der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet. Die *Arabidopsis thaliana* Linien, die eine *En1*-Transposon Insertion aufwiesen, wurden von Claudio Varotto und Fabio Schiavon (MPIZ-Köln); mittels reverser Genetik identifiziert und zur Verfügung gestellt. Die *Arabidopsis thaliana* Linien, die eine T-DNA Insertion aufwiesen, wurden vom SIGnAL Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (Torrey Mesa Research

Institut, San Diego, USA) bezogen. Zur funktionellen Komplementation der *A. thaliana* - Mutanten entstanden im Laufe dieser Arbeit weitere Linien.

Tabelle 5-3: Verwendete *A. thaliana* Linien.

Linie	Transgen	Genetischer Hintergrund	Anwendung
<i>pete1</i>	<i>En1</i> -Transposon	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>pete2</i>	<i>En1</i> -Transposon	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>pete1-1.1</i>	<i>Footprint; Frameshift</i>	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>pete2-1.1</i>	<i>Footprint; Frameshift</i>	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>pete2-1.2</i>	<i>Footprint; Frameshift</i>	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>pete2-1.3</i>	<i>Footprints</i>	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>atc_x-1</i>	T-DNA; Salk_011266	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>atc_x-2</i>	T-DNA; Salk_060643	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i>
<i>pete1-1.1/pete2-1.1</i>	<i>Footprints</i>	Wt (Columbia 0)	<i>Knock-out</i> funktionelle
native <i>PetE2</i>	pP001VS-GW:: <i>[PetE2]</i> gDNA	<i>pete1-1.1/pete2-1.1</i>	Komplementation funktionelle
35SCaMV:: <i>PetE1</i> *	pJAN33:: <i>[PetE1]</i> cDNA	<i>pete1-1.1/pete2-1.1</i>	Komplementation funktionelle
35SCaMV:: <i>PetE2</i> *	pJAN33:: <i>[PetE2]</i> cDNA	<i>pete1-1.1/pete2-1.1</i>	Komplementation funktionelle
35SCaMV:: <i>Atc_x</i> *	pJAN33:: <i>[Atc_x]</i> cDNA	Wt (Columbia 0)	Komplementation funktionelle
35SCaMV:: <i>PetE2-ChCyt c₆</i>	pJAN33:: <i>[PetE2-ChCyt c₆]</i> cDNA	<i>pete1-1.1/pete2-1.1</i>	Komplementation

4.3. Arbeiten mit Pflanzen

4.3.1. Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* Linien

4.3.1.1. Gewächshausbedingungen

Samen wurden vor dem Auslegen für 2-3 Tage bei 4°C stratifiziert. Die Kultivierung erfolgte im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen (8 h Licht mit mind. 100µmol Photonen*s⁻¹*m⁻² und 21°C) oder Langtagbedingungen (16 h Licht mit mind. 100µmol Photonen*s⁻¹*m⁻² und 21°C). Zur Vermeidung von Kreuzbestäubung wurden die Pflanzen vor dem Beginn der generativen Periode mit Aracontrichtern versehen. Zur Abreifung wurden die Pflanzen 14 Tage nach Bildung der Schotten nicht gewässert. Die Saatgutlagerung erfolgte bei 4°C. Mittels pP001VS-GW - Vektor transformierte Linien wurden jeweils nach einer und zwei Wochen mit 0,1% v/v BASTA selektiert.

4.3.1.2. Sterilkulturen

Im Gewächshaus nicht lebensfähige Mutanten wurden in Sterilkulturen aufgezogen.

Zur Sterilisation wurden die Samen in 70% v/v Ethanol für 1min und danach in frischer NaOCl -Lösung für 10min gewaschen. Anschließend wurden sie 3x mit SDW abgespült und dann auf MS/Saccharose-Medium ausgelegt und unter Langtagbedingungen in einer Kulturkammer aufgezogen.

Mittels pJAN33-Vektor transformierte Pflanzen wurden auf MS-Medium ohne Zucker mit $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Kanamycin selektiert, nach 3-4 Wochen ins Gewächshaus auf die Erde transferiert und unter Langtagbedingungen propagiert.

4.3.2. Transformation von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Die Transformationen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen erfolgte nach Clough and Bent (1998) mit der *floral dip*-Methode. Die Aufzucht der für die Transformation vorbestimmten Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen. Die Blütenbildung wurde durch Langtagbedingungen induziert. Die Transformation der Blüte (Dipping der Blüten) erfolgte durch Eintauchen der Blüte in eine *A. tumefaciens* Suspension mit 5 % (w/v) Saccharose und 0,0005% Silwet L-77.

4.3.3. Charakterisierung der Mutanten

4.3.3.1. Chlorophyllextraktionen und Pigmentanalysen

Für die Pigmentbestimmungen wurde 0,1g Blattmaterial aus jungen Pflanzen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde gemörsert, in 1ml 80%-igen v/v Na_2CO_3 -gesättigten Aceton aufgenommen und 20min bei 4°C inkubiert. Ein Aliquot des Ansatzes wurde 15min bei 4°C mit 16000g zentrifugiert um den Großteil der Proteine zu pelletieren.

Der Überstand wurde über $0,2\ \mu\text{m}$ Membranfilter gefiltert und anschließend mittels *reversed-phase* HPLC (nach Färber *et al.* 1997) analysiert. Das Prinzip besteht darin, die verschiedenen Pigmente über eine RP-Säule (*reversed phase*) nach ihrer Hydrophobität aufzutrennen und gleichzeitig ein Elutionsprofil per Absorption aufzunehmen. Nach entsprechender Eichung der Apparatur kann für jedes Pigment aus der aufgenommenen Kurve durch Integration der *Peaks* eine Konzentration in der Probe abgeleitet werden.

Für eine schnelle Chlorophyll (a+b) Bestimmung wurde die Methode nach Porra *et al.* (1989) verwendet. Hierfür wurde der Überstand 1:10 verdünnt und die Absorptionen bei 663,6nm und 646,6nm im Spektralfotometer gemessen. Um Aussagen über die Messqualität treffen zu können wurde ein Vollspektrum im Bereich von 300nm bis 800nm aufgenommen. Die

Chlorophyllkonzentration und das Verhältnis von Chl a zu Chl b wurde gemäß folgender Gleichung bestimmt: Chl a ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) $= (12,25 \times A^{663.6\text{nm}} - 2,55 \times A^{646.6\text{nm}})$; Chl b ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) $= (20,31 \times A^{646.6\text{nm}} - 4,91 \times A^{663.6\text{nm}})$; Chl a+b ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) $= (17,76 \times A^{646.6\text{nm}} + 7,43 \times A^{663.6\text{nm}})$.

4.3.3.2. Bestimmung von Blattoberflächen

Die Bestimmung der Blattoberflächen der Pflanzen erfolgte computergestützt entsprechend nach einer von Leister *et al.* (1999) beschriebenen Methode. Hierbei wurde ein Bild der Pflanzen mit einer Videokamera in Aufsicht aufgenommen und das Bild digitalisiert. Anschließend wurde das Programm VisiStore99A zur Bestimmung der Blattflächen verwendet.

4.3.3.3. Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen

Die Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen erfolgten *in vivo* an einzelnen Blättern von 20-25 Tage alten *A. thaliana* Pflanzen.

Die Puls Amplituden Modulierte (PAM)-Messungen der Chlorophyll a Fluoreszenz wurden mittels PAM-Fluorometer 101/103 (Walz), nach Schreiber *et al.* (1986) durchgeführt. Die Durchführung der Messungen entspricht weitgehend der Beschreibung von Varotto *et al.* (2000). Für die Bestimmung der maximalen Fluoreszenz (F_m) und des Verhältnis $(F_m - F_0) \cdot (F_m)^{-1} = F_v \cdot (F_m)^{-1}$ wurde ein weißes Lichtimpuls von 800ms mit $3000\mu\text{E}$ verwendet. Eine 15 minütige aktinische Beleuchtung mit $60\mu\text{E}$ wurde verwendet um den Elektronentransport zwischen beiden Photosystemen zu ermöglichen, bevor folgende Parameter gemessen wurden: die effektive Quantenausbeute von PSII $\{\Phi_{II}\}$, die photochemische Löschung $\{qP = (F_m' - F_t) \cdot (F_m' - F_0')^{-1}\}$ wie auch die nicht-photochemische Löschung $\{qN = 1 - (F_m' - F_0') \cdot (F_m - F_0)^{-1}\}$. Die Migrations-Messungen der mobilen LHCII-Proteine zwischen beiden Photosystemen *State Transition* wurden nach 30 minütiger Adaptation der Pflanzen in der Dunkelheit gemessen. Die F_m Bestimmung erfolgte mit einem sättigenden Weißlicht-Blitz von 800ms und $3000\mu\text{E}$. Anschließend wurden die Pflanzen für 20 min einer Blaulicht Illumination ($80\mu\text{E}$; Schott KL-1500; Filter: BW39; Walz) ausgesetzt und die maximale Fluoreszenz in *State-2*: F_{m2} gemessen. Der *State-1* wurde mit 20 minütiger Illumination mit einer Infrarot Lichtquelle (102-Fr; Walz) induziert und die maximale Fluoreszenz F_{m1} gemessen. qT wurde nach Jensen *et al.* (2000) bestimmt: $qT = (F_{m1} - F_{m2}) \cdot (F_{m2})^{-1}$.

4.4. Molekularbiologische Arbeitstechniken

4.4.1. Isolation von Nukleinsäuren

4.4.1.1. Präparation pflanzlicher DNA

Für PCR-Reaktionen erfolgte die DNA-Präparation modifiziert nach Edwards *et al.* (1991). Zwei junge Blätter wurden geerntet, in 2ml Eppendorfgefäß mit drei Metallkugeln (0,3cm Durchmesser) überführt, im fl. Stickstoff eingefroren und anschließend homogenisiert. Dann wurden 400µl DNA-Extraktionspuffer eingesetzt. Das Extrakt wurde 10min bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 16000g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 300µl PCI versetzt, im Eppendorfgefäß 2min invertiert, und anschließend zentrifugiert (5min, Raumtemperatur, 16000g). Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase präzipitiert.

4.4.1.2. Fällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung gelöster Nukleinsäuren wurde 0,7x Vol. Isopropanol zugegeben, der Ansatz gemischt und die Proben bei -20°C für 30min inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation (30min, 4°C, 16000g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 50µl 70%-igen Ethanol gewaschen, sedimentiert (10min, 4°C, 16000g), für 15min bei 37°C getrocknet und anschließend in 50µl SDW mit 10µg*ml⁻¹ RNaseA aufgenommen. Die Qualität der isolierten DNA wurde mittels 1%-iger Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Resuspendierte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus salzfreien Lösungen wurde die Nukleinsäure-Lösung mit 0,1xVol. 3 M Na-Acetatlösung (pH 6,5) und mit 2,5x Vol. Ethanol versetzt, mehrmals geschüttelt und 10min bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15min, 16000g) wurde das Pellet zwei Mal mit 50µl 70% Ethanol gewaschen, in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 30µl SDW resuspendiert.

Alternativ wurde die Fällung 30min bei -20°C mit 0,8xVol. Isopropanol und 1/10xVol. 3M Na-Acetat pH5,2 durchgeführt.

4.4.1.3. Präparation von *A. thaliana* RNA

Präparation: 0,05-0,1g Blatt-Material wurde in fl. N₂ eingefroren, homogenisiert, mit 1ml Z6-Puffer versetzt und dann zentrifugiert (10min, 4°C, 16000g). Der Überstand wurde mit 1xVol. PCI versetzt, mehrmals invertiert, und wieder zentrifugiert (10min, 4°C, 16000g). Die

wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und die Nukleinsäuren mit 0,7xVol. Ethanol und 0,05xVol. Essigsäure über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (40min, 4°C, 16000g) wurde das Pellet mit 1ml 3M Na-Acetat pH4,9 und dann mit 70%Et-OH gewaschen. Nach den Trocknen in einer Vakuum-Zentrifuge wurde das Pellet in 50µl 0,1%-igem DEPC-Wasser resuspendiert.

Die Kontrolle der RNA-Präparationen erfolgte mittels 1,5%-iger denaturierender Agarose-Gel-Elektrophorese.

Alternativ wurde die RNA-Präparation mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) gemäß Protokoll durchgeführt.

4.4.1.4. Präparation von Plasmid DNA

Die Plasmidpräparation nach Birnboim & Doly (1997) basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Für die Plasmid-Minipräparation wurden 1,5ml einer *E. coli* über Nacht - Kultur für 30s (Raumtemperatur, 16000g) zentrifugiert, der Überstand gründlich abgenommen und das Pellet in 150µl M-Lsg 1 resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300µl M-Lsg 2 wurde das Eppendorfgefäß 6x invertiert und das Lysat mit 225µl M-Lsg 3 neutralisiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10min, 4°C, 16000g), der Überstand mit 500µl PCI ausgeschüttelt und wieder 10min bei 16000g und 4°C zentrifugiert. Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase präzipitiert. Das Pellet wurde in 20µl SDW mit 10µg/ml RNaseA resuspendiert und für 15min bei 37° inkubiert.

Für große Plasmidmengen wurde die Plasmidpräparation mit dem *Qia-Midiprep Kit* (Qiagen) gemäß Protokoll durchgeführt.

4.4.1.5. Aufreinigung von Nukleinsäuren für Sequenzanalysen

Mittels PCR amplifizierte PCR-Fragmente wurden mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* aufgereinigt. Die DNA-Moleküle ab 100bp-Größe werden hierbei an eine Silica-Oberfläche in Minisäulen spezifisch gebunden und mit 50µl SDW eluiert.

4.4.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA und RNA-Konzentration wurden spektralfotometrisch über die Absorption bei 260nm quantifiziert. Hierbei wurden folgende Konzentrationsverhältnisse angenommen:

$1A_{260} \approx 50\mu\text{g/ml dsDNA}$; $1A_{260} \approx 40\mu\text{g/ml ssDNA}$ und $1A_{260} \approx 33\mu\text{g/ml RNA}$

Für die qualitative Beurteilung der Präparation wurde weiterhin das Verhältniss A^{260}/A^{280} bestimmt. Das Absorptionsverhältnis (A^{260nm}/A^{280nm}) sollte um 1,8 liegen. Bei Quotient unterhalb von 1,65 wurde ein zusätzlicher PCI - Waschschrift mit anschließender Fällung durchgeführt. Zusätzlich wurden Nukleinsäuren näherungsweise auf Agarose- und Polyacrylamid-Gelen quantifiziert. Als Konzentrationsmarker wurde Lambda-DNA aufgetragen.

4.4.2. Modifikation von Nukleinsäuren

4.4.2.1. Restriktionshydrolysen

Für Restriktionen von Plasmid-DNA wurden Typ II - Restriktionsendonucleasen in einer Konzentration von 2U/ μ g DNA eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 1-2h bei 37°C. Anschließend wurde die Hydrolyse durch eine Hitzeinaktivierung des Enzyms (5min bei 65°C) beendet.

4.4.2.2. Ligationen

Für Ligationen wurde T4-DNA-Ligase verwendet, welche die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden der dsDNA - Stränge katalysiert. Bei der Klonierung von PCR-Amplifikaten in den pGEM-T-Vektor wurde das Easy Vector System I von Promega verwendet. Die Ligationen wurden entsprechend dem Protokoll durchgeführt.

4.4.2.3. Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Die cDNA - Sondenmarkierung für Northern - Analysen erfolgte nach Feinberg *et al.* (1983): 100ng des PCR-Produkts wurden auf 12 μ l eingeeengt, bei 95°C für 10min denaturiert und auf Eis inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 4 μ l OLB-Puffer, 3 μ l 32 P $_{\alpha}$ -dCTP (3000Ci/mmol) und 1U Klenow-DNA-Polymerase. Die Probe wurde für 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufreinigung der Sonde erfolgte mittels einer 2ml-Sephadex Gr-50 Säule.

Für quantitative RT-PCR Reaktionen wurden jeweils 250 pmol des *antisense* Primers mit 20 μ Ci 33 P $_{\gamma}$ -dATP markiert. Die Reaktionen verliefen unter Verwendung von 1U PNK(T4)-

Polynukleotidkinase für 1h bei 37°C. Anschließend wurde die Probe für 5min bei 80°C denaturiert und auf Eis gelagert.

4.4.3. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden Agarose- und Polyacrylamidgele verwendet (Rickwood *et al.* 1990).

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 200bp-14kbp erfolgte mit 0,8-2,5%-igen (w/v) Agarosegelen in 1xTAE-Puffer mit $2\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid-Lösung. Die Proben wurden vor der Auftrennung mit 10x BPB-A-Marker versetzt. Die Elektrophorese erfolgt für 1-5h bei konstanter Spannung (70V). Zur Detektion der aufgetrennten Fragmente wurde ein UV-Transluminator (280-320nm) verwendet.

Die Auftrennung von RNA-Molekülen erfolgte mittels denaturierender Agarose Gelelektrophorese. Der Agaroseansatz bestand aus: 1,5% (w/v) Agarose, 16% (v/v) Formaldehyd, 1xMEN in 0,1%-igem DEPC-Wasser. Zur Probenvorbereitung wurden 30-50 μg RNA in 40 μl 0,1%-igem DEPC-Wasser gelöst, dann mit 40 μl Formamid, 12 μl Formaldehyd und 8 μl 10xMEN-Puffer versetzt und für 30min bei 64°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5,5 μl 10xBPB-Ladungspuffer sowie 0,5 μl $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die Elektrophorese erfolgt für 1-3h bei konstanter Spannung zwischen (70V) in 1xMEN-Lösung. Die RNA-Detektion erfolgte wie bei nativen DNA-Agarosegelen.

Denaturierende Polyacrylamid – Gele.

Für kurze DNA-Fragmente (50-400bp) wurde eine 7%-ige Polyacrylamid-(PAA)-Elektrophorese durchgeführt. Die verwendeten Glasplatten wurden jeweils mit Binder und Antibinder vorbehandelt. Zu 150ml PAA - Gellösung wurden 700 μl 10% w/v APS sowie 100 μl -TEMED zugegeben. 5 μl der Proben wurden 1:1 mit denaturierendem BPB-P-Marker versetzt, 5min bei 95°C denaturiert und danach auf Eis gestellt. Nach Auftrag der Proben erfolgte der Gellauf für 5-6h in 0,5xTBE-Puffer bei konstanten 58W.

Die Detektion aufgetrennter Fragmente erfolgte mittels Silberfärbung. Für die Färbung wurden das Gel in folgenden Lösungen inkubiert: S-Fixierer (3min), S-Färber (5min), SDW (1min), Leitungswasser (2min), S-Entwickler (5-20min) und S-Fixierer (5min).

Die silbergefärbten PCR-Amplifikate wurden aus dem PAA-Gel herausgeschnitten, in Elutions-Puffer aufgekocht (für 10min bei 96°C) und 0,5-1µl der Probe für eine Reamplifikation verwendet.

4.4.4. Northern-Analysen

Für den Transfer von Nukleinsäuren vom Agarose-Gel auf die Nylonmembran (Blotten) wurde ein Kapillarblot mit 20xSSC durchgeführt. Nach 16-stündigen Transfer wurden die Nukleinsäuren auf der Nylonmembran im UV-Crosslinker fixiert. RNA-DNA Hybridisierungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) unter stringenten Bedingungen durchgeführt.

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für 9-24h in 25ml N-Hybridisierungslösung mit 100µl denaturierter Heringssperma-DNA bei 65°C.

Die jeweils genspezifischen Sonden wurden aus cDNA amplifiziert und mit ³²P_α-dCTP radioaktiv markiert. Für die Hybridisierung wurden 100ng radioaktiv markierter cDNA-Sonde und 40µl denaturierte Heringssperma-DNA zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 65°C. Die Membran wurde anschließend 3x15min bei 65°C in N-Wasch-Puffer und für 10 min bei Raumtemperatur in 500ml N-RT-Puffer unter Schütteln inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Exposition auf einem Röntgenfilm (Kodak). Für die Quantifizierung der Signale wurde die Software: ImageQuant5.1 (für NT; Molecular Dynamics; 1999) verwendet.

4.4.5. Polymerase-Kettenreaktion

4.4.5.1. Standard PCR-Reaktionen

Es wurden unterschiedliche Variationen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988) angewendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze war wie folgt: 1-50ng eingesetztes DNA-Template, PCR-Puffer (10mM Tris-HCl, pH8.3; 1.5mM MgCl₂; 50mM KCl), 0.2mM dNTP Mix, je 0.5µM sense- und antisense- Oligonukleotide, 0.02U/µl *Taq-Polymerase*. Die PCR-Reaktionen wurden im PCR-T3-Thermocycler durchgeführt. Das verwendete Standard-Programm war: 1xDenaturierung bei 98°C für 2-4min, 30x {Denaturierung bei 94°C für 15-30s; Annealing bei 55-64°C für 30-45s; Elongation bei 68-72°C für 1 bis 3min}, Elongation bei 68-72°C für 3min.

4.4.5.2. Footprint Analysen

Verlässt ein *En1*-Transposon seinen Integrationsort (Excision) kann es direkte Sequenzwiederholungen (*Footprints*) zurücklassen. Befindet sich diese in einem Exon, kann der offene Leserahmen eines Gens unterbrochen werden. Dies kann zum germinalen Funktionsverlust des Gens und damit zur Stabilisierung der Mutanten-Linie führen (Walbot 1992; Aarts *et al.* 1995).

Die Detektion solcher Ereignisse in der *pete2*-Mutanten wurden mittels PCR-Reaktionen durchgeführt. Mit *PetE2* - spezifischen Oligonukleotiden (Pc2-139s und Pc2-94as-42as), die auf beiden Seiten um die Insertion binden, wurde ein 181bp langes DNA-Fragment amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf 7%-PAA aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert. Banden, die sich in der Größe zum Wildtyp unterscheiden, wurden aus dem Gel isoliert, wieder amplifiziert und anschließend sequenziert. Anhand der Nachkommenschaft der analysierten Linien wurde anschließend festgestellt, ob es sich um eine germinale Excision handelte.

4.4.5.3. Die Herstellung eines chimären "*A. thaliana* *PetE2*-*Chlamydomonas* Cytochrom *c*₆ " Konstrukts.

Um *At.PetE2*- und *Ch. Cyt c₆* -Genfragmente mit Hilfe von PCR Reaktionen zu fusionieren wurde die PCR-Fusions-Technik angewendet. Diese Methode macht es möglich, DNA-Moleküle an definierten Stellen miteinander zu verknüpfen, ohne die DNA mit Restriktionsenzymen oder DNA-Ligasen behandeln zu müssen. Die zu fusionierenden *At.PetE2* und *Chl. Cyt c₆* Genfragmente wurden zunächst in getrennten Reaktionsschritten amplifiziert, wobei die Konstruktion der Primer die anschließende Fusion der beiden Gene bestimmt. Für *PetE2*-Amplifikation wurden die Primer: Pc2s-cd-attB1 und Pc2-Chc6as-204/228 verwendet und für *Chl. Cyt c₆* die Primer: ChlC6s-175 und Chlc6as-attB2-477.

Das Ende des Pc2-Chc6as-204/228 Primer enthielt eine komplementäre Sequenz zur *Chl. Cyt c₆*-Genfragment. Für die zweite PCR-Reaktionen wurden dann je 0,5µl der vorgehenden PCR-Reaktionen eingesetzt. Hier wurden folgende Primer verwendet: Pc2s-cd-attB1 und Chlc6as-attB2-477. Anschließend wurde das PCR-Produkt über das Gateway[®]-System in den Vektor pJAN33 kloniert.

4.4.5.4. *cDNA Erststrangsynthese, RT-PCR*

Die Erststrang-Synthese wurde mit dem *SuperScript II Kit* (GibcoBRL) entsprechend Protokoll durchgeführt. Hierbei wird die Erststrang-Synthese durch die *MLLV-Reverse-Transkriptase* (*SuperScriptII-Polymerase*) katalysiert. Für die Synthese wurden 500ng Gesamt-RNA $0.5\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ oligo-dT₁₆₋₁₈-Primer eingesetzt. Für RT-PCR Amplifikationen wurden 0,5 μl des Erststrangs eingesetzt.

Semiquantitative PCR-Reaktionen (qRT-PCR) erfolgten unter Verwendung von ³³P γ -dATP markierten *sense*-Oligonukleotiden. Die Anzahl der PCR-Zyklen wurde hierbei auf 14-18 reduziert. Unter Verwendung des Kodak phosphoimager screens und Typhoon 8600 phosphoimager scanner (Molecular Dynamics) wurden anschließend Autoradiografie angefertigt. Für die Quantifizierung der Signale wurde die Software: ImageQuant5.1 (für NT; Molecular Dynamics; 1999) verwendet.

4.4.5.5. *Sequenzierung und Sequenzanalysen*

DNA-Sequenzierungen wurden bei der Service-Gruppe "ADIS" (Automatische DNA Isolierung und Sequenzierung / Zentrale Analytik des MPIZ-Köln) durchgeführt.

Für die Analyse der Sequenzdaten wurden folgende Programme verwendet: GCG-Programme Version 10.0-UNIX, January 1999; Madison, Wisc. (Devereux *et al.*, 1984) ; CLUSTAL-W V. 1.7 (Thompson *et al.*, 1994);

Die Vorhersagen der kompartimentspezifischer Targetingsequenzen erfolgte mit online verfügbaren Programmen: TargetP V1.01 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emanuelsson *et al.* 2000); ChloroP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>); SignalP V3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Die Genvorhersagen erfolgen mit: GeneFIND (<http://www-nbrf.georgetown.edu/gfserver/genefind.html>) und The New GENSCAN Web Server (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)

Für Homologievergleiche von Nukleotid- und primären Aminosäuresequenzen wurden folgende Datenbanken genutzt: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und MIPS (<http://mips.gsf.de>). Für "comparative protein modelling": Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>); 3D-JIGSAW V 2.0 (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>). Für Visualisierung von 3D-Proteinstrukturen: DeepView/Swiss-PdbViewer (V3.7; SP5; <http://www.expasy.org/spdbv>). Für FASTA - algorithmus: Tair; (<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/fasta/nph-TAIRfasta.pl>)

4.4.6. Gateway®-Klonierung

Die Gateway® Klonierung (Invitrogen) ermöglicht eine Klonierung ohne Verwendung von Restriktionsenzymen und DNA-Ligasen. Die Gateway® Technologie basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda. Sequenzspezifisch wird von diesem Phagen die eigene DNA ins Wirtsgenom integriert und kann auch wieder herausgeschnitten werden. Die dafür notwendigen *Clonasen* wurden zu einem Klonierungssystem zusammengestellt, mit dem beliebige DNA-Fragmente zunächst in Plasmide kloniert, diese dient als Ausgangspunkt für weitere Rekombinationsreaktionen. Zunächst wird ein Gen amplifiziert, indem *attB*-Rekombinationssequenzen sowohl am 5'- als auch am 3'Ende angehängt werden. Das PCR Produkt wird mit einem pDONOR-Vektor und dem *Clonase*®-Enzymmix versetzt. Anschließend erfolgt die Selektion auf Kanamycin. In dieser Arbeit wurde das *Gateway*® *Klonierung Kit* von Invitrogen verwendet. Die Klonierungsarbeiten wurden nach der Empfehlung des Herstellers durchgeführt. Als Donor -Vektor wurde pDONOR201 verwendet. pJAN33 wurde als ein Entry-Vektor für ektopischen Genexpression (mit zweifachem 35S*CaMV*-Promoter), pP001VS-GW Entry-Vektor zur Expression der Gene unter ihren nativen Promoter. Der pP001VS-GW Vektor entstand in Rahmen dieser Arbeit durch Linearisierung des pP001VS-Vektors mit *Bam*HI und Insertion einer amplifizierten Gateway® Kasette (*attR1*, *ccdB*, *Cm*^R, *attR2*; in FrameA).

4.4.7. Transformation von Bakterien via Elektroporation

50µl kompetente *E.coli* bzw. *A. tumefaciens* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 5µl (50-100ng) Plasmid-DNA in eine Elektroküvette (4mm Elektrodenabstand) überführt und durch einen Stromstoß transformiert (125µF, 200 Ohm, 1,7kV).

Für *E.coli* wurde der Transformationsansatz in 950µl SOC-Medium 1h bei 37°C und 150rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15s bei 5000g pelletiert und auf Agar-Platten mit Selektionsmarker ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Für *A. tumefaciens* wurde der Transformationsansatz in 950µl YEB-Medium 3h bei 28°C und 220rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15s bei 5000g pelletiert und auf YEB-Platten mit Selektionsmarkern ausgestrichen. Die Platten wurden dann 3-4 Tage bei 28°C inkubiert.

4.4.8. Selektion von transformierten Bakterien

E. coli: Für die Selektion von transformierten *E. coli* Bakterien wurde festes bzw. flüssiges LB-Medium mit jeweils $100\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ampicillin oder $25\text{-}50\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Kanamycin oder $25\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Chloramphenicol angewendet.

Bei Verwendung von pGEM-T System (Promega) wurde festes LB-Medium mit Ampicillin und X-Gal/IPTG für Blau/Weiß-Selektion angewendet (nach Dannenberg *et al.* 1981).

Flüssiges LB-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 190 rpm inkubiert. Für die Langzeitlagerung wurden 0,5ml einer Übernachtskultur mit 50%-igen v/v Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

A. tumefaciens: Für die Selektion von transformierten Agrobakterien wurde das YEB-Medium mit $100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Carbenicillin, $25\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Kanamycin und $100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Rifampicin verwendet. Auf festem YEB-Medium wurden die Agrobakterien etwa 3-4 Tage bei 28°C inkubiert. Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR verifiziert. 5ml flüssiges YEB-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 3Tage bei 28°C am Schüttler mit 220 rpm inkubiert.

4.4.9. Extraktion und Quantifikation der Proteine

4.4.9.1. Proteinextraktionen

Für alle Proteinextraktionen wurden Blätter von 5-Wochen alten Pflanzen geerntet. Das Abernten der Blätter erfolgte zur Mittagszeit, immer zügig und bei 4°C . So wurden Thylakoidproteine für immunologische Analysen und LDS/SDS-PAGE's nach Bassi *et al.* (1985) präpariert. Für diese Präparationen wurden folgende Lösungen verwendet: TI-T1-Puffer; TI-Proteaseinhibitoren; TI-F2-Puffer und TI-TS-Puffer. Über den Gesamtgehalt der Chlorophylle (bestimmt nach Porra *et al.* 1998) wurde die Thylakoidmembran-Menge für jede Probe eingestellt.

Die Lumen-Proteine für IEF/SDS-Analysen wurden entsprechend Kieselbach *et al.* (1998) gewonnen. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden mittels Bradford-Reagenz bestimmt.

4.4.9.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Technik beruht darauf, dass das Absorptionsmaximum von *Coomassie Brilliant Blue* G-250 in sauren Lösungen abhängig von der Proteinkonzentration von 465 auf 595 nm verschoben wird [Bradford, 1976]. Zur Durchführung der Methoden nach Bradford wurde der BioRad Protein Assay verwendet. Dabei wurden zu 10 µl Proteinlösung auf 1 ml 1:5 verdünnte Farblösung gegeben. Nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 596nm gemessen. Parallel zu den Proben werden zur Erstellung einer Eichgerade Standards mit definierten Proteinkonzentrationen (50, 100, 200, 300, 400 µg BSA/ml) gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben kann anhand der Eichgerade ermittelt werden.

4.4.10. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

4.4.10.1 Denaturierende SDS-PAGE

Zur Auftrennung von denaturierten Proteinen wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) benutzt. Das Prinzip lehnt sich an die Methode von Laemmli (1970) ; Schagger and von Jagow (1987) an. Die denaturierende PAGE trennt Proteine nach ihrer Größe auf. Das Dodecylsulfat des Laufpuffers (W-Upper-Running-Puffer; W-Lower-Running-Puffer) lagert sich als Detergens an die einzelnen Proben-Moleküle an und überdeckt mit seiner negativen Ladung die Eigenladungen der Proteine. Diese wandern in einem elektrischen Feld zur Anode. 5µg-50µg Proben wurden mit $\frac{1}{2}$ Volumen W-Loading-Puffer versetzt, gekocht (5min bei 96°C), für 30sek bei 2000g zentrifugiert und aufgetragen. Bei den Gelen handelte sich um 10-16%-ige Gradientengele, die mittels eines Gradientenmischers in einem Gelgießblock gegossen wurden. Der Gellauf erfolgte im Sammelgel (W-Stacking-PAA) bei 80 V, im Trenngel (W-10%-PAA und W-16%-PAA; abgedichtet mit W-Sealing-PAA) bei 120-180 V.

4.5.10.2. 2D LDS/SDS Elektrophorese

Die Herstellung der "ersten Dimension" d. h. einer *Green Native Page*, erfolgte modifiziert nach Peter and Thornber, (1991).

Die Proteinkomplexe der Thylakoidmembran (Äquivalent von 25µg Chl a+b; in T1-TS-Puffer) wurden nicht denaturiert. Lediglich mit n-dodecyl-β-D maltosid (2% in Probe; N-DM-Stammlösung) versetzt, wurden die Proteinkomplexe aus den Thylakoidmembranen schonend

herausgelöst. Dann wurden die Proben für 1min bei 2000g zentrifugiert und auf einen 4-12%-PAA Gradientengel geladen. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei 4°C in LDS haltigem Puffer (N-Upper-Running-Puffer; N-Lower-Running-Puffer). Der Gellauf im Sammelgel (N-Stacking-PAA) verlief bei 40 V und im Trenngel (Gradientengel aus N-4%-PAA und N-12%-PAA; abgedichtet mit N-Sealing-PAA) bei 80-100V.

Die aufgetretenen Spuren wurden herausgeschnitten und die Streifen im denaturierenden SDS-Puffer (2% (w/v) SDS, 6M Harnstoff) für 45min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proteine der Proteinkomplexe mittels 10-14% SDS-PAGE aufgetrennt.

4.5.10.3. IEF in immobilisierten pH-Gradienten

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden immobilisierte pH-Gradienten im Bereich pH 4-7 (Amersham Biosciences) verwendet. Die getrockneten Streifen (18 cm Länge) wurden in einer Rehydratisierkammer mit 300 µl I-IEF-Puffer zurückgequollen. Um während des Quellvorganges die Verdunstung von Wasser zu unterbinden, wurden die Streifen mit CoverFluid überschichtet. Als Reduktionsmittel wurde Dithiothreitol verwendet, welches jedoch als schwache Säure während der Fokussierung in Richtung Anode wandert. Im basischen Bereich tritt daher eine Verarmung an Reduktionsmittel auf, und in einer unscharfen Fokussierung resultiert. Da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich im sauren pH-Bereich 3-6 gearbeitet wurde, ist dieser Effekt vernachlässigt worden. Der Probenauftrag erfolgte mit aufgesetzten *Sample Cups* in I-IEF-Puffer. Die aufgetragene Proteinmenge unterscheidet sich jedoch nach der weiteren Verarbeitung des Gels.

Für spätere "Coomassie Colloidal Färbung" der SDS-PAGE und anschließender Quantifizierung wurden 250µg (50µl in I-IEF-Puffer) lumenale Proteine beladen. Für immunologische Proteindetektion aus der SDS-PAGE wurden nur 150µg (50µl in I-IEF-Puffer) lumenaler Proteine beladen.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte im *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System* (Amersham Biosciences). Die IEF - Streifen wurden mit der sauren Seite zur Anode in die Apparatur gelegt und die Elektroden aufgesetzt, wobei an beiden Enden ein feuchtes Elektrodenpapier zwischen IEF - Streifen und Platinelektrode gelegt wurde. Nach Aufsetzen des *Sample Cups* und Probenauftrag wurden die Streifen mit CoverFluid überschichtet. Die Fokussierung wurde mit 50µA je Strip und bei 20°C durchgeführt. Die Fokussierung erfolgte unter folgenden Bedingungen: S1 (500V-1h-Snh); S2 (1000V-2h-Gradient); S3(8000V-3h-Gradient); S4 (8000V-2h40min-Snh). Die gesamte Fokussierung der Proteine betrug 36145Vhrs. Für die Kalibration der Gele wurden der *pI-Carbamylite Calibration Kit*

(Amersham Biosciences) und der Größenmarker NEB-P7708S (New England BioLabs) verwendet.

Für den Transfer in die zweite Dimension, die SDS-PAGE, wurden die IPG-Streifen nach der isoelektrischen Fokussierung in zwei Schritten äquilibriert. Um elektroosmotische Effekte beim Proteintransfer zu verhindern und den gelösten Zustand der Probe zu verstärken, enthielten die Äquilibrationlösungen 50mM Tris-HCl pH6,8; 6M Harnstoff; 30%(v/v) Glycerol; 2% SDS. Im ersten Äquilibrationsschritt wurde dem Puffer zusätzlich 1%(w/v) DTT zugesetzt, im zweiten Äquilibrationsschritt 260 mM Iodacetamid und etwas Bromphenolblau zur Markierung des Fortschritts der Elektrophorese. Beide Schritte wurden für 15 min in einer Äquilibrationkassette unter leichtem Schütteln für 15 min durchgeführt. Nach der Äquilibration wurde die restliche Lösung von den Streifen mit SDW abgespült und die Streifen hochkant für jeweils 1,5 min auf jeder Seite auf feuchtes Whatmanpapier gestellt. Anschließend wurden die Streifen auf die PAA-Gele (W-13%-PAA) transferiert und mit 50°C warmer 0,5% -iger Agaroselösung in W-Upper-Running-Puffer überschichtet. Für den Gellauf wurden die gleichen Puffer wie bei der denaturierenden SDS-PAGE verwendet. Die Auftrennung wurde abgebrochen, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreichte.

4.4.11. Coomassie-Färbung

SDS-Pages mit 100-1000ng des Proteins je Bande wurden mit *Coomassie Brilliant Blue R-250* gefärbt. Die Gele wurden über Nacht in C-R250-Farbstoffreagenz geschwenkt und mit C-Fixiererlösung entfärbt, bis die Banden sichtbar wurden.

Für 2D-Gele (mit etwa 50-500ng Protein je Spot) wurde *Colloidal Coomassie Brilliant Blue GR-250* Färbung eingesetzt. Die 2D-Gele wurden über Nacht mit 50% Ethanol und 2% ortho-Phosphorsäure fixiert, 3x mit SDW gewaschen, für 1h in C-GR-Lösung inkubiert und dann für 3-4 Tage in die Färbelösung mit $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ CBB-GR250 Farbstoffs gegeben. Der Hintergrund wurde mit SDW entfärbt. Nach der Färbung wurden die Gele in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

4.4.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Eine immunologische Charakterisierung der in der SDS und IEF/SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde durch den so genannten Western-Blot ermöglicht. Dazu wurden die Thylakoidproteine (ein Äquivalent von 5µg Chl a+b) nach der Elektrophorese mittels "wet-

blot"-Verfahren auf eine Immobilon-P^{SQ} Membran (Millipore, Eschborn, Germany) überführt. Dieser Protein-Transfer erfolgte innerhalb von 8-16h im W-Transfer-Puffer bei 300V. Dann wurden die Membranen für 8h und bei 4°C im W-Blocking-Puffer geblockt und anschließend mit {PSI, PSII, ATPase-, und Cyt *b₆f*-Komplex} spezifischen Antikörpern für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mehrfach in 1xTTBS gewaschen. Der erster Antikörper bindet an ein bestimmtes Epitop auf der Membran. Mit Hilfe des zweiten Antikörpers, an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, kann diese Bindung durch Chemilumineszenz gut nachgewiesen werden. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Farbstoffes Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und somit die vom angeregtem Luminol ausgehende Lichtemission. Die sekundären Antikörper, wie auch Detektionslösungen entstammen dem Enhanced *Chemiluminescence Western-Blotting Kit* (Amersham, Buckinghamshire, England). Die Signale wurden auf einem Röntgenfilm aufgenommen und mit dem Programm: ImageQuant5.1 quantifiziert. Nach erfolgreicher Analyse wurden die Antikörper von der Membranen entfernt (*stripping*). Die Membranen wurden dann für Kontrollhybridisierungen wieder verwendet. Das *stripping* erfolgte, indem die Membran zuerst für 20min bei 50°C im W-Stripping-Puffer und dann mehrfach mit W-Blocking-Puffer gewaschen wurde.

4.4.13. Antikörper gegen das *Atc_x* - Protein

4.4.13.1. Herstellung der Antikörper gegen das *Atc_x* - Protein

Die Antikörper gegen das *Atc_x* wurden auf zwei voneinander unabhängigen Wegen hergestellt. Zum einen wurde das Protein (At5g54041; 71Q bis 175D) im pET101/D-TOPO[®]-Vektor C-Terminal mit einem (-His)₆-Tag fusioniert und anschließend in *E.coli* Stamm BL21 Star (DE3) exprimiert. Hier wurde das *Champion pET Directional TOPO[®] Expression Kit* verwendet. Das fusionierte Protein konnte unter nativen Bedingungen über Affinitätschromatografie an einer Nickel-NTA-Chelatagarosesäule aufgereinigt werden. Für diese Aufreinigung wurde das Ni-NTA *Spin Kit / QIAexpressionist* (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Hierbei wurden die Konzentrationen von Imidazol der Puffer modifiziert (beachte: NiNTA- Lysispuffer; -Washpuffer und -Elutionspuffer).

Die Immunisierung, Aufzucht und Ausblutung von zwei Kaninchen wurde von der Firma Pineda-Antikörper-Service (Berlin; <http://www.pineda-abservice.de>) übernommen.

Zum Anderen wurden Antikörper gegen das *Atc_x*-Protein aus einer Epitop-Vorhersage gewonnen. Die Aminosäuresequenz wurden mittels Protein-Homologie-Modelling mit

bekannten X-Ray und nD-NMR Strukturen verglichen und dann mehrere 3D-Strukturen des Proteins vorhergesagt. Genutzt wurden folgende Online-Server: Swiss-Model und 3D-JIGSAW V 2.0. Die Bewertung der möglichen 3D-Strukturen (pdb-Files) erfolgte nach einer Energieminimierung und der Überprüfung mittels Ramachandran-Plot in DeepView/Swiss-PdbViewer. Anhand der ausgewählten Struktur wurde ein gut exponierter Bereich des Proteins als Epitop ausgewählt. Dieses Epitop wurde dann mittels FASTA-Algorithmus auf möglichst geringe Homologie mit anderen *A. thaliana* Proteinen untersucht.

Die Synthese des Epitops (C₋₁₆₂KFQADQGWPTVS-Amid x TFA; mit 80% HPLC-Reinheit), wie auch die Immunisierung, Aufzucht und Ausblutung von zwei Kaninchen wurde von der Firma Biosyntan (Biogenes GmbH; 13125 Berlin; biosyn@mdc-berlin.de) übernommen.

4.4.13.2. Präparation gereinigter Immunoglobuline (IgG)

Die Isolierung der IgGs aus Antiseren erfolgte durch Affinitätschromatografie unter Verwendung von Protein-A-Sepharose. Jeweils 5 ml Antiserum wurden mit jeweils 10 ml Ig-NaP_i (Auftragspuffer) verdünnt und durch einen Sterilfilter (0,2 µm) filtriert. Das Antiserum wurde auf eine 1 ml-Protein-A-Sepharose Säule (HiTrap, Amersham Pharmacia), die zuvor mit 10 Säulenvolumen Ig-NaP_i äquilibriert worden war, aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen Ig-NaP_i gewaschen. Die Elution der gebundenen IgGs erfolgte mit Ig-Elutions-Puffer. Es wurden 1 ml-Fraktionen in Eppendorfgläsern gesammelt, in die jeweils 100 µl 1M Tris-HCl, pH 8,0 vorgelegt waren, um eine sofortige Neutralisation des sauren Antikörpereluats zu erreichen. Nach Umpufferung zum Ig-PBS-Puffer (Centricon; 30kDa-cut off,) wurden die IgGs abschließend in einer Endkonzentration von 10 bis 50 mg*ml⁻¹ aliquotiert und mit Ig-N-Lösung konserviert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.4.13.3. Affinitätschromatografie zur Aufreinigung von Antikörpern aus IgG-Fraktion

Die Aufreinigung spezifischer Antikörper aus der gesamt IgG-Fraktion erfolgte über eine 1 ml HiTrap NHS-aktivierte Säule (Amersham Biosciences), die zur kovalenten Bindung von Proteinen mit primären Aminogruppen verwendet wird. Im ersten Schritt wurde das aufgereinigte *Atc_x*-Protein (1 mg*ml⁻¹), N-Terminal an die Säule gebunden. Die IgG-Fraktion wurde mit 0,5 ml*min⁻¹ über die Säule geleitet, so dass spezifische Antikörper an das Peptid binden konnten. Anschließend wurden diese von der Säule eluiert.

Die Säule wurde, bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,5 ml*min⁻¹, mit 5x Säulenvolumen an 1 mM HCl gewaschen und anschließend das in Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl; pH 8,3) gelöste *Atc_x*-Protein mittels einer Spritze auf die Säule

aufgebracht. Zur Bindung des Proteins an die Säule folgte eine Inkubation von 90 min bei 4 °C. Ungebundene Proteinreste wurden mit der Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml*min⁻¹ mit 4x Säulenvolumen an Kopplungspuffer ausgewaschen. Dann wurde die Säule mit 5x Säulenvolumen Blockpuffer (0,5 M Ethanolamin; 0,5 M NaCl; pH 8,3), 5x Säulenvolumen Waschpuffer (0,1 M Na-Azetat; 0,5 M NaCl; pH 4,0) und wieder 5x Säulenvolumen Blockpuffer gespült und mit Blockpuffer für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert, um verbleibende reaktive Gruppen zu blocken. Dann wurde die Säule mit 10x Säulenvolumen PBS gespült und die zu reinigende IgG-Fraktion mit einer Laufgeschwindigkeit von 0,2 ml*min⁻¹ aufgetragen. Vor der Elution wurde die Säule mit 10x Säulenvolumen PBS gespült. Anschließend wurden die *Atc_x*- spezifischen IgG`s mit 4x Säulenvolumen an Elutionspuffer (0,1 M Glycin; 0,15 M NaCl; pH 2,8) von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte in Fraktionen von je 250µl in 25µl 1M Tris-HCl pH 8,0 um die Fraktion direkt zu neutralisieren. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels Bradford bestimmt.

4.4.14. Intrazelluläre Lokalisation des *Atc_x*-RFP Fusionsproteins

Das rot fluoreszierendes Protein (RFP) wurde verwendet um die interzelluläre Lokalisation des *Atc_x*-Proteins zu bestimmen (nach Jach *et al.* 2001). Das RFP-Gen ist ein Teil eines pflanzlichen Expressionsvektors (pGJ1425) und unterliegt der Kontrolle eines zweifachen 35S*CaMV*-Promoters. Das *Atc_x*-Protein wurde 5'- mit dem RFP-Gen fusioniert. Dieses Konstrukt wurde zur Transformation von Protoplasten verwendet. Die Mesophyll-Protoplasten wurden nach Negrutiu *et al.* (1987) aus 6-Wochen alten *Nicotiana tabacum* Petit Havana SR1 (Maliga *et al.* 1975) isoliert. Es wurden folgende Lösungen und Medien verwendet: PT-PEG4000, PT-Enzymlösungen, PT-MaMg-Puffer, PT-Vitamin-Stock, PT-W5, K3-0,4M Medium wie auch die in der Tabelle 4-2 aufgeführten Phytohormone.

Für die transiente Genexpressionsanalysen wurden 10µg Plasmid-DNA auf 3,3x10⁵ frisch isolierter Protoplasten mittels PEG-Transformation übertragen. Zu der Protoplastensuspension wurde 5µM Auxin und 1µM Cytokinin zugefügt. Anschließend wurde Suspension für zwei Tage bei 26°C in der Dunkelheit inkubiert. Die Analyse der Protoplasten erfolgte auf dem Zeiss Axiophoto Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit dem Filterset der Firma AF Analysetechnik (Tübingen, Germany). Die Bilder wurden mit einer Hitachi-CCD Kamera und "DISKUS software package" aufgenommen.

5. Verzeichnisse

5.1. Abkürzungsverzeichnis

-(His) ₆	Hexahistidin (6xHis) Fusion	Kan ^R	Kanamycin Resistenz
μE	μmol Photonen*s ⁻¹ *m ⁻²	kBp	Kilobasenpaare
3'-Ende	Hydroxyl-Ende der DNA	kDa	Kilodalton
³² P	Phosphor-Isotop mit 32 Nukleonen	LB	Linke T-DNA Border
³³ P	Phosphor-Isotop mit 33 Nukleonen	LDS	Lithium Dodecyl Sulfat
5'-Ende	Phosphat-Ende der DNA	LHC	Lichtsammelkomplex (<i>Light Harvesting Complex</i>)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lsg.	Lösung
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	M	Mol (mol*1 ⁻¹)
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative</i>	MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
Amp ^R	Ampicillin Resistenz	MES	2-(4-morpholinyl) ethanesulfonic acid
APS	Ammoniumpersulfat	MOPS	3-(4-morpholinyl) 1-propanesulfonic acid
Atc _x	Wildtypallele des Cytochrome c _x Gens (AGI; At5g45041)	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
atc _{x-n}	homozygote Mutation in Cytochrome c _x Gen; n: Linie; [atc _x (-n)/atc _x (-n)]	MW	Molekulargewicht (<i>Molecular Weight</i>)
ATP	Adenosintriphosphat	<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
BAC	künstliches bakterielles Chromosom (<i>Bac. Artificial Chromosome</i>)	NaP _i	Natriumphosphat
<i>bla</i>	β-Lactamase	NCBI	<i>Nat. Center for Biotechnology Information</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	n-DM	n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid
Bp	Basenpaare	Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (<i>nickel nitrilotriacetic acid</i>)
BPB	Bromphenolblau	OD	Optische Dichte
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	OEC	<i>Oxygen Evolving Complex</i>
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>	ORF	offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
Carb ^R	Carbenicillin Resistenz	P ₆₈₀	Reaktionszentrum von PSII
cDNA	<i>complementary DNA</i>	P ₇₀₀	Reaktionszentrum von PS I
Chl	Chlorophyll	PAA	Polyacrylamid
Ci	Curie	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Cm ^R	Chloramphenicol Resistenz	PAM	Puls Amplituden Modulation
cTP	Chloroplasten-Transitpeptid	Pc	Plastocyanin
Cyt <i>b₆f</i>	Cytochrom <i>b₆f</i> Komplex	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Cyt <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>	PEG	Polyethylenglykol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	<i>Pet</i>	Gene die am photosynthetischen Elektronentransport beteiligt sind
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff	<i>PetE1</i>	Wildtypallele des Plastocyanin 1 Gens (AGI; At1g76100)
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	<i>pete1</i> (-n)	homozygote Mutation in Plastocyanin 1; n : Linie; [<i>pete1</i> (-n)/ <i>pete1</i> (-n)]
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	<i>PetE1/pete1</i> (-n)	Heterozygote <i>pete1</i> (-n) Mutante
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>pete1</i> (-n)/ <i>pete2</i> (-n)	Plastocyanin-Doppelmutante: [<i>pete1</i> (-n)/ <i>pete1</i> (-n) / <i>pete2</i> (-n)/ <i>pete2</i> (-n)]
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	<i>PetE2</i>	Wildtypallele des Plastocyanin 2 Gens (AGI; A1g20340)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	<i>pete2</i> (-n)	homozygote Mutation in Plastocyanin 2; n : Linie; [<i>pete2</i> (-n)/ <i>pete2</i> (-n)]
DTT	Dithiothreitol	<i>PetE2/pete2</i> (-n)	Heterozygote <i>pete2</i> (-n) Mutante
dTTP	Desoxythymintriphosphat	pH	negativer log ₁₀ der [H ⁺] Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	pI	isoelektrische Punkt
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat	pmol	Picomol (Stoffmenge)
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
F ₀	Grundfluoreszenz	PQ	PQH ₂ Plastochinon, Plastohydrochinon
fl. N ₂	flüssiger Stickstoff	PSI	Photosystem I
F _m	maximale Fluoreszenz	PSII	Photosystem II
F _m '	maximale Fluoreszenz in lichtadaptierten Blättern	PVDF	Polyvinylidenfluorid
F _{ms}	maximale Fluoreszenz im stationären Zustand	PVP	Polyvinylpyrrolidon
FNR	Ferredoxin-NADP+ Oxidoreductase	Q _A	an PsII fest gebundene Plastochinon
F _t	transiente Fluoreszenz	Q _B	freies Plastochinon
F _v	variable Fluoreszenz	qE	Wärmeabhängige Fluoreszenzlöschung
F _v /F _m	Effizienz der photochem. Reaktion an PSII	qI	Photoinhibitorische Fluoreszenzlöschung
F _{vs}	variable Fluoreszenz im stationären Zustand	qN	nicht- photochemische Fluoreszenzlöschung
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung	qP	photochemische Fluoreszenzlöschung
gDNA	genomische DNA	r- HPLC	Umkehrphasen Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie
GI.	<i>Gene Identifikation</i> , genutzt von NCBI	RB	rechte T-DNA Border
Gm ^R	Gentamycin Resistenz	RFP	rot fluoreszierendes Protein
GST	<i>Gene Sequence Tag</i>	Rif ^R	Rifampicin Resistenz
<i>hcf</i>	<i>high chlorophyll fluorescence</i>		
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid		
IEF	isoelektrische Fokussierung		
IgG	Immunglobulin G		
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactopyranosid		

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Z-Schema der Photosynthese.....	13
Abb. 1-2: Eine PAM-Messung der Chlorophyllfluoreszenz an einem <i>Arabidopsis thaliana</i> Blatt.	15
Abb. 1-3: Schematische Darstellung des Cytochrom <i>b₆/f</i> -Komplexes.....	17
Abb. 1-4: Modelle des Photosystem I-Komplexes in höheren Pflanzen.....	19
Abb. 1-5: Vergleich der Tertiärstrukturstruktur und der Oberfläche von Cyt <i>c₆</i> und Plastocyanin	21
Abb. 1-6: Interaktionen des Plastocyanins mit Cyt <i>f</i> und Photosystem I.	24
Abb. 2-1A: Ein Vergleich der Primärstruktur der Plastocyanin-Proteine.....	26
Abb. 2-1B: Ein Vergleich der Tertiärstruktur und Oberflächenbeschaffenheit der Plastocyanine.	27
Abb. 2-2A: Die Mutationen der <i>PetE</i> -Loci.....	29
Abb. 2-2B: Co-Segregations Analysen der Plastocyanin-Doppelmutante.....	29
Abb. 2-3: <i>hcf</i> -Phänotyp der <i>pete</i> -Doppelmutante.	30
Abb. 2-4: Wachstum der Plastocyanin-Linien.	30
Abb. 2-5A: Bestimmung der <i>PetE</i> -Transkriptmenge in <i>pete</i> -Mutanten.	32
Abb. 2-5B: Quantifizierung der <i>PetE</i> -Transkriptmenge in der Doppel-Mutante.....	33
Abb. 2-5C: Quantifizierung der <i>PetE</i> -Transkriptmenge in <i>PetE</i> -Überexprimierer.	33
Abb. 2-5D: Westernanalysen der Plastocyanin-Doppelmutante	33
Abb. 2-5E: Westernanalysen der Plastocyanin-Linien.	34
Abb. 2-5F: IEF/SDS-Page und immunologische Detektion der Plastocyanin-Isoproteine.....	35
Abb. 2-7A: "green"-PAGE der Thylakoidmembran-Proteinkomplexe der Plastocyanin Doppel-Mutante	37
Abb. 2-7B: Die Komposition der Thylakoidmembran-Proteinkomplexe in LDS/SDS-PAGE.	39
Abb. 2-7C: Die Komposition der Proteinkomplexe in den Thylakoidmembranen in Western-Analysen.	39
Abb. 2-8: Messung der effektiven Quantenausbeute das PSII in Abhängigkeit von aktinischen Lichtstärke.	41
Abb. 2-9: Relativer Oxidationszustand von P ₇₀₀ unter unterschiedlichen Lichtintensitäten.	42
Abb. 2-10: Kinetik der Fluoreszenz-Induktion der Plastocyanin Doppel-Mutante.	44
Abb. 2-11A: Hochauflösende Absorptions-Messungen der Cyt <i>f</i> Oxidationskinetik.	45
Abb. 2-11B: Ein Vergleich der Cyt <i>f</i> Oxidationskinetik zum Plastocyanin-Gehalt der Plastocyanin-Mutanten.	46
Abb. 2-12: Wachstum der Plastocyanin-Mutanten auf Medium mit veränderter Kupferkonzentrationen.	47
Abb. 2-13A: Das regulatorische Bereich des <i>Atc_x</i> -Gens.....	48
Abb. 2-13B: Die <i>Atc_x</i> mRNA-Akkumulation ermittelt mittels Genevestigator.	49
Abb. 2-13C: Ein Vergleich der Primärstruktur der Cytochrom <i>c_x</i> - ähnlicher Proteine.....	50
Abb. 2-13D: Vorhergesagte Tertiärstruktur des <i>Atc_x</i>	51
Abb. 2-14A: PCR und RT-PCR Analysen an Cytochrom <i>c_x</i> -Linien	52
Abb. 2-14B: Northern-Analysen an 35S <i>CaMV</i> :: <i>Atc_x</i> Linien	53
Abb. 2-15: Wachstum der Cytochrom <i>c_x</i> -Linien.	54
Abb. 2-16: <i>Atc_x</i> -Epitop.	55
Abb. 2-17A: Transiente Protoplastentransformation mit einem <i>Atc_x</i> - <i>RFP</i> Fusionsprotein.	55
Abb. 2-17B: Immunologische Detektion von <i>Atc_x</i> -Protein in Thylakoidlumen-Fraktion	56
Abb. 2-18: PCR, RT-PCR und Northern-Analysen an chimären <i>A. thaliana</i> Pflanzen.....	57

Abb. 2-19: Selektion einer Plastocyanin-Doppelmutante die als chimäre <i>Chl.Cyt c₆</i> exprimiert	58
Abb. 2-20: Differenzielle Transkriptregulation kernkodierter Chloroplastenproteine.....	59
Abb. 2-21: Northern-Analysen an Photosynthese-Mutanten.	60
Abb. 3-1: Ein Vergleich der hydrophoben Nord-Domänen der <i>A. thaliana</i> PetE1 und PetE2-Plastocyanine.	75
Abb. 6-1: ClustalW-Alignment der cDNA - Nukleotidsequenzen der beiden <i>PetE</i> -Gene.	122
Abb. 6-2: Alignment reifer Aminosäuresequenzen der Plastocyanin-Gene aus unterschiedlichen Spezies.	123
Abb. 6-3: Phylogenetisches Baum der reifen Plastocyanin-Aminosäuresequenzen.	124
Abb. 6-4: Lichtkurven an Cytochrom <i>c_x</i> -Linien.	125
Abb. 6-6: Messung der Photoinhibition in Cytochrom <i>c_x</i> -Linien.	126
Abb. 6-7: Verlauf der typischen Lichtinduktion/Erholung-Messkurven zur Analyse der Fluoreszenzmessung	128

5.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2-4: Bestimmungen der Blattflächen der Plastocyanin-Linien.	31
Tab. 2-5A: Relative <i>PetE</i> -Transkriptmengen.	32
Tab. 2-5F: Quantitative Bestimmung der Menge des Gesamtplastocyanins in den Pc-Linien.	34
Tab. 2-6A: Pigmentgehalt der Doppel-Mutante.	36
Tab. 2-6B: Pigmentgehalt der Plastocyanin Linien.	37
Tab. 2-7B: Quantitative Bestimmung der Thylakoidmembranproteine in Plastocyanin Linien.	38
Tab. 2-8A: Spektroskopische Analysen der Plastocyanin-Linien.....	40
Tab. 2-8D: Die Wärmedissipation (qE) der Plastocyanin-Mutanten und Überexprimierer.....	42
Tab. 2-15: Bestimmung der Blattflächen der Cytochrom <i>c_x</i> -Linien.	53
Tab. 4-1: Antibiotika und Fungizide.....	84
Tab. 4-2: Phytohormone.	84
Tab. 5-3: Verwendete <i>A. thaliana</i> Linien.	88
Tab. 6-1: Spektroskopische Parameter der Cytochrom <i>c_x</i> -Linien bei 60μE.	125
Tab. 6-2: Lichtkurven an Cytochrom <i>c_x</i> – Linien.	125
Tab. 6-3: Lichtabhängige Fluoreszenzlöschung in Cytochrom <i>c_x</i> -Linien.....	126
Tab. 6-4: Der relative Oxidationszustand von P ₇₀₀ in Cytochrom <i>c_x</i> -Linien.....	126
Tab. 6-5: <i>State transition</i> in Plastocyanin-Linien.	127
Tab. 6-6: Lichtabhängige Fluoreszenzlöschung in Plastocyanin-Linien.	127
Tab. 6-8B: Die effektiven Quantenausbeute das PSII (Φ_{II}) in Abhängigkeit von aktinischen Lichtstärke gemessen mit einem PAM101-Instrument.	129
Tab. 6-8C: Die effektiven Quantenausbeute das PSII (Φ_{II}) in Abhängigkeit von aktinischen Lichtstärke gemessen mit dem Robot-Instrument.....	129
Tab. 6-9: Relative Oxidationszustand von P ₇₀₀ unter unterschiedlichen Lichtintensitäten.	129

5.4. Literaturverzeichnis

- Aarts M., Corzan P. *et al.* (1995). "A two-element Enhancer-Inhibitor transposon system in *Arabidopsis thaliana*." *Mol. Gen. Genet.* 247: 555-564.
- Abdallah F., Salamini F. *et al.* (2000). "A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*." *Trends Plant Sci.* 5: 141-142.
- Allen J. F. (2004). "Cytochrome *b₆f*: structure for signalling and vectorial metabolism." *Trends Plant Sci.* 3: 130-137.
- Allen J. F., Alexciev K. *et al.* (1995). "Regulation by redox signalling,." *Curr. Biol.* 5: 869-872.
- Andrews T. J. und Lorimer G. H. (1887). "Rubisco: Structure, mechanisms, and prospects for improvement." In: Hatch M. D.; Boardman N. K. (Hrsg.) *The Biochemistry of Plants*, Aufl. 10: Photosynthesis. San Diego (Academic Press): 131-218.
- Anron D. I. (1984). "The discovery of photosynthetic phosphorylation." *Trends Biochem. Sci.* 9: 258-262.
- Bailey S., Walters R. G. *et al.* (2001). "Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses." *Planta* 213: 794–801.
- Balcells L., Swinburne J. *et al.* (1991). "Transposons as tools for the isolation of plant genes." *Trends in Biotechnology* 9: 31-37.
- Barkan A., Miles D. *et al.* (1986). "Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize." *Embo J.* 5: 1421-1427.
- Barker R. F., Thompson D. V. *et al.* (1984). "Nucleotide sequence of the maize transposable element Mol." *Nucleic Acids Res.* 12: 5955-5967.
- Bassham, T. A. (1965). "Photosynthesis: The path of carbon." In: Bonner, J.; Varner, E. *Plant Biochemistry*. 2: 875-902.
- Bassi R. und Yamamoto H. Y. (1995). "Carotenoids: localization and function in photosynthetic apparatus of higher plants, In photosynthetic antenna systems." Yocum C., ed. Springer-Verlag, Heidelberg: 1-35.
- Bassi R., dal Belin Peruffo A. *et al.* (1985). "Differences in chlorophyll-protein complexes and composition of polypeptides between thylakoids from bundle sheaths and mesophyll cells in maize." *Eur. J. Biochem.* 146: 589-595.
- Behringer F. J. und Medford J. I. (1992). "A plasmid rescue technique for the recovery of plant DNA disrupted by T-DNA insertion." *Plant Mol. Biol. Rep.* 10: 190-198.
- Ben-Shem A., Frolov F. *et al.* (2003). "Crystal structure of plant photosystem I." *Nature* 426: 630-635.
- Ben-Shem A., Nelson N. *et al.* (2003). "Crystallization and initial X-ray diffraction studies of higher plant photosystem I." *Acta Crystallogr. D.* 59: 1824–1827.
- Berghofer J. und Klosgen R. B. (1999). "Two distinct translocation intermediates can be distinguished during protein transport by the TAT (Deltaph) pathway across the thylakoid membrane." *FEBS Lett.* 460: 328-332.
- Berghofer J., Karnauchov I. *et al.* (1995). "Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecA protein from spinach chloroplasts. Evidence for azide resistance of Sec-dependent protein translocation across thylakoid membranes in spinach." *J. Biol. Chem.* 270: 18341-18346.
- Birnboim H. C. und Doly J. (1997). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucl. Acids. Res.* 7: 1513-1532.

- Björkman, O. und Demming B. (1987). "Photon yield of O₂-evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins." *Planta* 170: 489-504.
- Blankenship R. E. und Prince R. C. (1985). "Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis." *Science* 10: 382-383.
- Bohner H. und Boger P. (1978). "Reciprocal formation of cytochrome c-553 and plastocyanin in *Scenedesmus*." *FEBS Lett.* 85: 337-339.
- Boyer P. D. (1997). "The ATP synthase-a splendid molecular machine." *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717-749.
- Büchel, C. und Wilhelm C. (1993). "In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives." *Photochemistry and Photobiology* 58: 137-148.
- Budziszewski G. J., Lewis S. P. *et al.* (2001). "*Arabidopsis* genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning." *Genetics* 159: 1765-1778.
- Cline K., Ettinger W. F. *et al.* (1992). "Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP." *J. Biol. Chem.* 267: 2688-2696.
- Clough S. J. und Bent A. F. (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.* 16: 735-743.
- Cohen Y., Yalovsky S. *et al.* (1995). "Integration and assembly of photosynthetic protein complexes in chloroplast thylakoid membranes." *Biochim. Biophys. Acta.* 1241: 1-30.
- Cramer W. A., Soriano, G. M. *et al.* (1996). "Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis ." *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47: 477-508.
- Dannenberga A. M. und Suga M. (1981). "Histochemical stain for macrophages in cell smears and tissue sections: β -galactosidase, acid phosphatase, nonspecific esterase, succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase." *Academic Press, San Diego In: Methods for Studying Mononuclear Phagocytes* (Adams D. O., Edelson P. J., Koren H.S., eds): 375-396.
- Davenport H. E. (1965). "The role of soluble protein factors in chloroplast electron transport. In: San Pietro (eds) *Non-Heme Iron Protein. Role in Energy Conversion.*" The Antioch Press, Yellow Springs, Ohio: 115-135.
- De Block M. (1993). "Cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implication for plant breeding." *Euphytica* 71: 1-14.
- De la Rosa M. A., Navarro J. A. *et al.* (2002). "An evolutionary analysis of the reaction mechanisms of photosystem I reduction by cytochrome *c₆* and plastocyanin." *Bioelectrochemistry* 55: 41-45.
- De Rienzo F., Gabdoulline R. R. *et al.* (2001). "Electrostatic analysis and Brownian dynamics simulation of the association of plastocyanin and cytochrome *f*." *Biophys. J.* 81: 3090-3104.
- Debus R. J. (1992). "The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution." *Biochim. Biophys. Acta* 1102: 296-352.
- Devereux J., Haeberli P. *et al.* (1984). "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX." *Nucleic Acids Res.* 12: 387-395.
- Döring H. P., Tillman E. *et al.* (1984). "DNA sequence of the maize transposable element." *Nature* 307: 127-130.
- Drepper F., Hippler M. *et al.* (1996). "Binding dynamics and electron transfer between plastocyanin and photosystem I." *Biochemistry* 35: 1282-1295.

- Edwards K., Johnstone C. *et al.* (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.
- Emanuelsson O., Nielsen H. *et al.* (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.
- Errampalli D., Patton D. *et al.* (1991). "Embryonic lethals and T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 3: 149-157.
- Farah J., Rappaport F. *et al.* (1995). "Isolation of a *psaF*-deficient mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*: efficient interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center is mediated by the PsaF subunit." *EMBO J.* 14: 4976-4984.
- Färber A., Young A. J. *et al.* (1997). "Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants: the relationship between zeaxanthin conversion and nonphotochemical fluorescence quenching." *Plant Physiol. Biochem.* 115: 1609-1618.
- Fedoroff N., Wessler S. *et al.* (1983). "Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds." *Cell.* 35: 235-242.
- Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1983). "A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Analytical Biochem.* 132: 6-13.
- Feldmann K. A., Marks M. D. *et al.* (1989). "A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis." *Science* 243: 1351-1354.
- Fey V. und Wagner R. (2005). "Photosynthetic redox control of nuclear gene expression." *J. Exp. Bot.* 56: 1491-1498.
- Finazzi G., Sommer F. *et al.* (2005). "Release of oxidized plastocyanin from photosystem I limits electron transfer between photosystem I and cytochrome *b₆f* complex in vivo." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 7031-7036.
- Fitzmaurice W. P., Lehman L. J. *et al.* (1992). "Development and characterization of a generalized gene tagging system for higher plants using an engineered maize transposon Ac." *Plant Mol. Biol.* 20: 177-198.
- Flügge U.-I. und Held H. W. (1991). "Metabolite translocator of the chloroplast envelope." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 129-144.
- Genty B., Briantais J. M. *et al.* (1989). "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electrontransport and quenching of chlorophyll fluorescence." *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.
- Ghanotakis D. und Yacum C. F. (1990). "Photosystem II and the oxygen-evolving complex." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 255-276.
- Gray J. C. (1992). "Cytochrome *f*: structure, function and biosynthesis." *Photosynth. Res.* 34: 359-374.
- Gray M. W. (1992). "The endosymbiont hypothesis revisited." *Int. Rev. Cytol.* 141: 233-357.
- Grbic V. und Bleeker A. B. (1995). "Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*." *Plant J.* 8: 595-602.
- Greene L. F., McCarthy J. F. *et al.* (1939). "Inhibition of respiration and photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa* by organic compounds that inhibit copper catalysts." *J. Biol. Chem.* 128: 447-453.
- Gupta R., He Z. *et al.* (2002). "Functional relationship of cytochrome *c₆* and plastocyanin in *Arabidopsis*." *Nature* 417: 567-71.

- Haehnel W., Jansen T. *et al.* (1994). "Electron transfer from plastocyanin to photosystem I." *EMBO J.* 13: 1028-1038.
- Hageman J., Robinson C. *et al.* (1986). "A thylakoid processing protease is required for complete maturation of the lumen protein plastocyanin." *Nature* 324: 567 - 569.
- Haldrup A., Naver H. *et al.* (1999). "The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I." *Plant J.* 17: 689-698.
- Haldrup A., Simpson D. J. *et al.* (2000). "Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*: the PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to the antenna function." *J. Biol. Chem.* 275: 31211-31218.
- Hamel P., Olive J. *et al.* (2000). "A new subunit of cytochrome *b₆f* complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition." *J. Biol. Chem.* 275: 17072-17079.
- Hanahan D. (1983). "Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Harting M. A., Rommens C. M. *et al.* (1991). "The use of transgenic plants to understand transposition mechanisms and to develop transposon tagging strategies." *Plant Mol. Biol.* 16: 449-461.
- Hensel L. L., Grbic V. *et al.* (1993). "Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *arabidopsis*." *Plant Cell* 5: 553-564.
- Hippler M. *et al.* (1996). "The plastocyanin binding domain of photosystem I." *EMBO J.* 15: 6374-6384.
- Hippler M., Drepper F. *et al.* (1999). "Insertion of the N-terminal part of PsaF from *Chlamydomonas reinhardtii* into photosystem I from *Synechococcus elongatus* enables efficient binding of algal plastocyanin and cytochrome *c₆*." *J. Biol. Chem.* 274: 4180-4188.
- Hippler M., Ratajczak R. *et al.* (1989). "Identification of the plastocyanin binding subunit of Photosystem I." *FEBS Lett.* 250: 280-284.
- Hope A. B. (2000). "Electron transfers amongst cytochrome *f*, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms." *Biochim. Biophys. Acta* 1456: 5-26.
- Horton P., Ruban A. V. *et al.* (1996). "Regulation of light harvesting in green plants." *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- Hulford A., Hazell L. *et al.* (1994). "Two distinct mechanisms for the translocation of proteins across the thylakoid membrane, one requiring the presence of a stromal protein factor and nucleotide triphosphates." *J. Biol. Chem.* 269: 3251-3256.
- Ihnatowicz A., Pesaresi P. *et al.* (2004). "Mutants for photosystem I subunit D of *Arabidopsis thaliana*: effects on photosynthesis, photosystem I stability and expression of nuclear genes for chloroplast functions." *Plant J.* 37: 839-852.
- Jach G., Binot E. *et al.* (2001). "Use of red fluorescent protein from *Discosoma sp.* (*dsRED*) as a reporter for plant gene expression." *Plant J.* 28: 483-491.
- James H. E., Bartling D. *et al.* (1989). "Transport of proteins into chloroplasts. Import and maturation of precursors to the 33-, 23-, and 16-kDa proteins of the photosynthetic oxygen-evolving complex." *J. Biol. Chem.* 264: 19573-19576.
- Jensen P. E., Gilpin M., *et al.* (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: 24701-24708.
- Jensen P. E., Haldrup A. *et al.* (2003). "Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function." *Physiologia Plantarum* 119: 313-321.
- Joliot P. und Joliot A. (2002). "Cyclic electron transfer in plant leaf." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 10209-10214.

- Jordan P., Fromme P. *et al.* (2001). "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution." *Nature* 411:909-917.
- Junge W., Lill H. *et al.* (1997). "ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics." *Trends Biochem. Sci.* 22: 420-423.
- Kallas T. (1994). "The cytochrome *b₆f* Komplex." In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*; (Bryant, D., ed.), Kluwer Academic Publishers, Niederlande: 259-317.
- Kannt A., Young S. *et al.* (1996). "The role of acidic residues of plastocyanin in its interaction with cytochrome *f*." *Biochim. Biophys. Acta* 1277: 115-126.
- Karnauchov I., Cai D. *et al.* (1994). "The thylakoid translocation of subunit 3 of photosystem I, the *psaF* gene product, depends on a bipartite transit peptide and proceeds along an azide-sensitive pathway." *J. Biol. Chem.* 269: 32871-32878.
- Karplus P. A., Daniels M. J. *et al.* (1991). "Atomic structure of ferredoxin-NADP⁺ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family." *Science* 251: 60-66.
- Katoh S. (1960a). "A new copper protein from *Chlorella ellipsoidea*." *Nature* 186: 533-534.
- Katoh S. (1960b). "Crystallization of an algal cytochrome, *Porphyra tenera*-cytochrome 553." *Nature* 186: 138-139.
- Katoh S. und San Pietro A. (1967). "Photooxidation and reduction of cytochrome-552 and NADP photoreduction by *Euglena* chloroplasts." *Arch. Biochem. Biophys.* 121: 211-219.
- Katoh S. und Takamiya A. (1961). "A new leaf copper protein plastocyanin, a natural Hill oxidant." *Nature* 189: 665-666.
- Katoh S., Shiratori I. *et al.* (1962). "Purification and some properties of spinach plastocyanin." *J. Biochem.* 51: 32-40.
- Keren N. und Ohad I. (1999). "In: *The molecular Biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*."
- Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. und Merchant, S., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande: 569-596.
- Kieselbach T., Hagman A. *et al.* (1998). "The Thylakoid Lumen of Chloroplasts." *J. Biol. Chem.* 273: 6710-6716.
- Kim S. J., Robinson D. *et al.* (1996). "An *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding PS II-X, a 4.1 kDa component of photosystem II: a bipartite presequence mediates SecA/delta pH-independent targeting into thylakoids." *FEBS Lett.* 390: 175-1758.
- Klosgen R. B., Brock I. W. *et al.* (1992). "Proton gradient-driven import of the 16 kDa oxygen-evolving complex protein as the full precursor protein by isolated thylakoids." *Plant Mol. Biol.* 18: 1031-1034.
- Koncz C., Mayerhofer R. *et al.* (1990). "Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*." *EMBO J.* 9: 1337-1346.
- Kuras R. und Wollman F. A. (1994). "The assembly of cytochrome *b₆f* complexes: an approach using genetic transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *EMBO J.* 13: 1019-1027.
- Laemmli U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227: 680-685.
- Laidler V., Chaddock A. M. *et al.* (1995). "A SecY homolog in *Arabidopsis thaliana*. Sequence of a full-length cDNA clone and import of the precursor protein into chloroplasts." *J. Biol. Chem.* 270: 17664-17667.

- Leister D. und Schneider A. (2003). "From genes to photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *Int. Rev. Cytol.* 228: 31-83.
- Leister D., Varotto, C. *et al.* (1999). "Large-scale evaluation of plant growth in *Arabidopsis thaliana* by non-invasive image analysis." *Plant Physiol. Biochem.* 37: 671-678.
- Li X. P., Bjorkman O. *et al.* (2000). "A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting." *Nature* 403: 391-395.
- Li X. P., Muller-Moule P. *et al.* (2002). "PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 15222-15227.
- Link G. (1996). "Geen life: Control of chloroplast gene transcription." *Bioessays* 18: 465-471.
- Loake G. J., Ashby A. M. *et al.* (1988). "Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 towards sugars involves a highly sensitive chemotaxis system." *J. Gen. Microbiol.* 134: 1427-1432.
- Lorkovic Z. J., Schroder W. P. *et al.* (1995). "Molecular characterization of PsbW, a nuclear-encoded component of the photosystem II reaction center complex in spinach." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8930-8934.
- Maiwald D., Dietzmann A. *et al.* (2003). "Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression." *Plant Physiol.* 133: 191-202.
- Malkin R. und Niyogi K. (2000). "Plant Biochemistry and Molecular Biology (Buchanan, B.B. *et al.* eds)." American Society of Plant Physiologists: 568-629.
- Mant A., Schmidt I. *et al.* (1995). "Sec-dependent thylakoid protein translocation. Delta pH requirement is dictated by passenger protein and ATP concentration." *J. Biol. Chem.* 270: 23275-23281.
- Mant A., Woolhead C. A. *et al.* (2001). "Insertion of PsaK into the thylakoid membrane in a "Horseshoe" conformation occurs in the absence of signal recognition particle," *J. Biol. Chem.* 276: 36200-36206.
- Marques J. P., Dudeck I. *et al.* (2003). "Targeting of EGFP chimeras within chloroplasts." *Mol. Genet. Genomics* 269: 381-387.
- Marques J. P., Schattat M. H. *et al.* (2004). "In vivo transport of folded EGFP by the DeltapH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*." *J. Exp. Bot.* 55: 1697-1706.
- Marti-Renom M. A., Stuart A. C. *et al.* (2000). "Comparative protein structure modeling of genes and genomes." *Annu Rev Biophys Biomol. Struct.* 29: 291-325.
- Mayfield A. P., Yohn C. B. *et al.* (1995). "Regulation of chloroplast gene expression." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 147-166.
- Merchant S. und Bogorad L. (1986a). "Regulation by copper of the expression of plastocyanin and cytochrome *c*₅₅₂ in *Chlamydomonas reinhardi*." *Mol. Cell Biol* 6: 462-469.
- Merchant S. und Bogorad L. (1986b). "Rapid degradation of apoplastocyanin in Cu(II)-deficient cells of *Chlamydomonas reinhardtii*." *J. Biol. Chem.* 261: 15850-15853.
- Merchant S. und Bogorad L. (1987). "The Cu(II)-repressible plastidic cytochrome *c*. Cloning and sequence of a complementary DNA for the pre-apoprotein." *J. Biol. Chem.* 262: 9062-9067.
- Metraux J.-P. (1995). "Gibberellins and plant cell elongation." In: Davies, P.J. (Hrsg.) *Plant Hormones: Biochemistry and Molecular Biology*. Boston (Kluwer). 296-317.
- Michl D., Robinson C. *et al.* (1994). "Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoII is imported by a novel, third pathway." *Embo J.* 13: 1310-1317.

- Mitchell P. (1979). "Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences." *Science* 206: 1148-1159.
- Modi S., He S. *et al.* (1991). *Biochim. Biophys. Acta* 1101: 64-68.
- Molina-Heredia F. P., Wastl J. *et al.* (2003). "Photosynthesis: a new function for an old cytochrome?" *Nature* 424: 33-34.
- Moore M., Harrison M. S. *et al.* (2000). "Chloroplast Oxa1p homolog *albino3* is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes." *J. Biol. Chem.* 275: 1529-1532.
- Mori H., Summer E. J. *et al.* (1999). "Component specificity for the thylakoidal Sec and Delta pH-dependent protein transport pathways." *J. Cell. Biol.* 146: 45-56.
- Mori H., Summer E. J. *et al.* (2001). "Chloroplast TatC plays a direct role in thylakoid (Delta)pH-dependent protein transport." *FEBS Lett.* 501: 65-68.
- Müller P., Li X.-P. *et al.* (2001). "Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy." *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.
- Munekage Y., Takeda S. *et al.* (2001). "Cytochrome *b₆f* mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*." *Plant J.* 28: 351-359.
- Murakami A. und Fujita Y. (1993). "Regulation of stoichiometry between PSI and PSII in response to light regime for photosynthesis observed with *Synechocystis* PCC 6714." *Plant Cell Physiol.* 34: 1175-1180.
- Musiani F., Dikiy A. *et al.* (2005). "Structure of the intermolecular complex between plastocyanin and cytochrome *f* from spinach." *J. Biol. Chem.*
- Negrutiu I., Shillito R. *et al.* (1987). "Hybrid genes in the analysis of transformation conditions." *Plant Mol. Biol.* 8: 363-373.
- Neish A. C. (1939). "Studies on chloroplasts. II. Their chemical compositions and the distribution of certain metabolites between the chloroplasts and the remainder of the leaf." *Biochem J.* 33: 300-308.
- Nielsen V. S., Mant A. *et al.* (1994). "Import of barley photosystem I subunit N into the thylakoid lumen is mediated by a bipartite presequence lacking an intermediate processing site." *J. Biol. Chem.* 269: 3762-6.
- Noji H., Yasuda R. *et al.* (1997). "Direct observation of the rotation of F1-ATPase." *Nature* 386: 299-302.
- Nooden L. D. und Leopold A. C. (1988). "Senescence and Aging in Plants." The phenomena of senescence and aging. Academic Press, San Diego: 1-50.
- Ohyama K., Kohchi T. *et al.* (1988). "Newly identified groups of genes in chloroplasts." *Trends Biochem. Sci.* 13: 19-22.
- Park Y. I., Chow W. S. *et al.* (1996). "Chloroplast Movement in the Shade Plant *Tradescantia albiflora* Helps Protect Photosystem II against Light Stress." *Plant Physiol.* 111: 867-875.
- Pearson D. C., und Gross E. L. (1998). "Brownian dynamics study of the interaction between plastocyanin and cytochrome *f*." *Biophys J.* 75: 2698-2711.
- Peltier J. B., Emanuelsson O. *et al.* (2002). "Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction." *Plant Cell.* 14: 211-36.
- Pereira A., Cuypers H. *et al.* (1986). "Molecular analysis of the *En-Spm* transposable element system of *Zea mays*." *EMBO J.* 5: 835-841.

- Pesaresi P., Varotto, C. *et al.* (2001). "Functional genomics of *Arabidopsis* photosynthesis." *Plant Physiol. Biochem.* 39: 1-10.
- Peter G. F. und Thornber J. P. (1991). "Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins." *J. Biol. Chem.* 266: 16745-16754.
- Peterson P. A. (1953). "A mutable pale green locus in maize." *Genetics*: 862-883.
- Peterson P. A. (1987). "Mobile Elements in Plants." *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6: 105-208.
- Peterson P. A. (1993). "Transposable elements in maize: their role in creating plant genetic variability." *Advances in Agronomy* 51: 79-124.
- Peterson, P. A. (1986). "Mobile elements in maize: a force in evolutionary and plant breeding processes." *Stadler Gent. Symp.* 17: 47-78.
- Pfannschmidt T. (2003). "Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes." *Trends Plant Sci.* 8: 33-41.
- Porra R. J., Thompson *et al.* (1989). "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equalization for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents" *Biochem Biophys Acta* 975: 384-394.
- Potter I. und Fry S. C. (1994). "Changes in xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity during hormone-induced growth in lettuce and cucumber hypocotyls and spinach cell suspension cultures." *J. Exp. Bot.* 45: 1703-1710.
- Pullerits T. und Sundström V. (1996). "Photosynthetic light-harvesting pigment-protein complexes: Toward understanding how and why." *Acc. Chem. Res.* 29: 381-389.
- Redei G. P. (1975). "*Arabidopsis* as a genetic tool." *Annu. Rev. Genet.* 9.
- Reichert J., Altschmied L. *et al.* (1995). "Interaction of spinach plastocyanin with photosystem I." in: P. Mathis (Ed.), *From Light to Biosphere, Vol. II*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 693-696.
- Rickwood D. und Hames B. D. (1990). "Elektrophoresis of Nucleic Acids - A Practical Approach." IRL Press, Washington D.C.
- Robinson C. (2000). "The twin-arginine translocation system: a novel means of transporting folded proteins in chloroplasts and bacteria." *Biol. Chem.* 381: 89-93.
- Robinson C., Cai D. *et al.* (1994). "The presequence of a chimeric construct dictates which of two mechanisms are utilized for translocation across the thylakoid membrane." *Embo J.* 13: 279-285.
- Saiki R. K., Gelfand D. H. *et al.* (1988). "Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239: 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E. F. *et al.* (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez R., Pieper, U. *et al.* (2000). "Protein structure modeling for structural genomics." *Nat. Struct. Biol.* 7: 986-990.
- Santini C. L., Bernadac A. *et al.* (2001). "Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic localization in response to osmotic up-shock." *J Biol Chem* 276: 8159-8164.
- Sargent F., Bogsch E. G. *et al.* (1998). "Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway." *Embo J.* 17: 3640-3650.

- Schagger H. und von Jagow G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Scheller H. V., Jensen P. E. *et al.* (2001). "Role of subunits in eukaryotic PSI." *Biochim. Biophys. Acta* . 1507: 41-60.
- Schimper, A. F. W. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyll-Körner und Farb-Körner. *Botanische Zeitschrift* **41**, 105-114.
- Schnell D. J. (1995). "Shedding light on the chloroplast protein import machinery." *Cell.* 83: 521-524.
- Schreiber U., Schliwa U. *et al.* (1986). "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer." *Photosynth. Res.* 10:51-62.
- Schubert M., Petersson U. A., *et al.* (2002). "Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*." *J. Biol. Chem.* 277: 8354-8365.
- Schuenemann D., Amin P. *et al.* (1999). "Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33-kDa but not the 23-kDa subunit of the oxygen-evolving complex." *J. Biol. Chem.* 274: 12177-12182.
- Schuenemann D., Gupta S. *et al.* (1998). "A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10312-10316.
- Settles A. M., Yonetani A. *et al.*, (1997). "Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein." *Science* 278: 1467-1470.
- Smith E. F. und Townsend C. O. (1907). *Science* 25: 671-673.
- Smith R. C., Matthews P. R. *et al.* (1996). "The regulation of leaf elongation and xyloglucan endotransglycosylase by gibberellin in 'Himalaya' barley (*Hordeum vulgare* L.)." *J. Exp. Bot.* 47: 1395-1404.
- Spielman A. und Simpson R. B. (1986). *Mol. Gen. Genet.* 205: 34-41.
- Stachel S. E., Timmerman B. *et al.* (1987). "Activation of *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region." *EMBO J.* 6: 857-863.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* 408: 796 - 815.
- Thompson J. D., Higgins D. G. *et al.* (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting," *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Ting C. S. und Owens T. G. (1993). "Photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*." *Plant Physiol.* 101: 1323-1330.
- Topping J. F., Wei W. *et al.* (1991). "Functional tagging of regulatory elements in the plant genome." *Development* 112: 1009-1019.
- Ubbink M. (2004). *Photosynth. Res.* 81: 277-287.
- Ubbink M., Ejdeback M. *et al.* (1998). "The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome *f*, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics." *Structure* 6: 323-335.
- Ullmann G. M., Hauswald M. *et al.* (1997). "Comparison of the physiologically equivalent proteins cytochrome *c*₆ and plastocyanin on the basis of their electrostatic potentials." *Biochemistry* 36: 16187-16196.
- Varotto C., Pesaresi P. *et al.* (2000). "Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth." *Plant J.* 22: 115-124.

- Varotto C., Pesaresi P. *et al.* (2000). "Identification of photosynthetic mutants of *Arabidopsis* by automatic screening for altered effective quantum yield of photosystem 2." *Photosynthetica* 38.
- Vener A. V., van Kan P. J. M. *et al.* (1997). "Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *b₆f* mediates signal transduction between light and proton phosphorylation..." *Proc. Natl. Sci.* 94: 1585-1590.
- Walbot V. (1992). "Reactivation of Mutator transposable elements of maize by ultraviolet light." *Mol Gen Genet.* 234: 353-360.
- Walbot V. (1992). "Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis." *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 49-82.
- Walker M. B., Roy L. M. *et al.* (1999). "The maize *tha4* gene functions in sec-independent protein transport in chloroplasts and is related to *hcf106*, *tatA*, and *tatB*." *J. Cell. Biol.* 147: 267-276.
- Wastl J., Bendall D. S. *et al.* (2002). "Higher plants contain a modified cytochrome *c₆*" *Trends Plant Sci.* 7: 244-245.
- Wastl J., Molina-Heredia F. P. *et al.* (2004). "Redox properties of *Arabidopsis* cytochrome *c₆* are independent of the loop extension specific to higher plants." *Biochim. Biophys. Acta* 1657: 115-120.
- Wastl J., Purton S. *et al.* (2004). "Two forms of cytochrome *c₆* in a single eukaryote." *Trends Plant Sci* 9: 474-476.
- Watson J. D. und Crick H. (1953). "A structure for deoxyribonucleic acid." *Nature* 171: 737.
- Weigel M., Pesaresi P. *et al.* (2003). "Tracking the function of the cytochrome *c₆*-like protein in higher plants." *Trends Plant Sci.* 8: 513-517.
- Whatley J. M. (1993). "The endosymbiotic origin of chloroplasts." *Int. Rev. Cytol.* 144: 259-299.
- Wood P. M. (1977). "The roles of *c*-type cytochromes in algal photosynthesis." *Eur. J. Biochem.* 72: 605-612.
- Wood P. M. (1978). "Interchangeable copper and iron proteins in algal photosynthesis. Studies on plastocyanin and cytochrome *c-552* in *Chlamydomonas*." *Eur. J. Biochem.* 87: 9-19.
- Xu Q., Hoppe D. *et al.* (1995). "Mutational analysis of photosystem-i polypeptides in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC-6803 – targeted inactivation of *PsaI* reveals the function of *PsaI* in the structural organization of *PsaL*." *J. Biol. Chem.* 270: 16243-16250.
- Xu Q., Yu L. *et al.* (1994). "Function and organization of photosystem I in a cyanobacterial mutant strain that lacks *PsaF* and *PsaJ* subunits." *J. Biol. Chem.* 269: 3205-3211.
- Yahandra V. K., Sauer K. *et al.* (1996). "Manganese cluster in photosynthesis: Where plants oxidize water to dioxygen." *Chem. Rev.* 96: 2927-2950.
- Yakushiji E. (1935). "Über das Vorkommen des Cytochromes in höheren Pflanzen und in Algen." *Acta Phytochim.* 8: 325-329.
- Yanish-Perron C., Vieira J. *et al.* (1985). "Improved phage M13 cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* 33: 103-119.
- Zacarias L., und Reid M. S. (1990). "Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves." *Physiol. Plantarum.* 80: 549-554.
- Zambryski P. H., Joos C. *et al.* (1983). "Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity." *EMBO J.* 2: 2143-2150.
- Zito F., Finazzi G. *et al.* (1999). "The *Qo* site of cytochrome *b₆f* complex controls the activation of the LHCII kinase." *EMBO J.* 11: 2961-2969.

6. Anhang

6.1. Nukleotidsequenzen

Alle Nukleinsäure-Sequenzen sind in 5´ zu 3´ Orientierung angegeben.
Die Aminosäuren wurden entsprechend den Empfehlungen der IUPAC-IUP-Kommission für biochemische Nomenklatur mit jeweils einem Buchstaben abgekürzt.

atc_x1; T-DNA flankierende Sequenz; [SALK_011266.56.00.x]

```
GAGTTTGTATCTATTGTTTCGAAAGGTCAATGGAAGAGGAAAAGAAGCTGAAAAACCCAATT
TCTCTAAACCACAACAAAGATTTGGACTTTCTGTAAAGAAGTTAGCTCCGCCACTCAGC
GCGGTTTTACTTGCTGTTTCACCCATCTGTTTCCCTCCAGGTAAACCCCTGTTTCCCTCCG
ACCAAAAGCT
```

atc_x2; T-DNA flankierende Sequenz; [SALK_060643.51.15.x]

```
CCATCTGTGTCCCTCAGGGTAGACCCTTGTTCCTCCGACCAAAAGCTTCTACCTTTAGA
GTATTTGCACTTAGATTGAAATATTACAGAATAGCTCTTCACTTTAAGGAATT
```

Atc_x- cDNA PCR-Amplifikat für -*dsRFP* Fusion in pGJ1425 mit *Nco*I Schnittstellen

```
ATTCCATGGATGAGACTTGTTCCTCTCTGGTGCCTCTTCTTTACCTCCAACCTTTTTTGT
TCCTCCCAACAGGTCAATGGAAGAGGAAAAGAAGCTGAAAAACCCAATTTCTCTAAACCAC
AACAAAGATTTGGACTTTCTGTAAAGAAGTTAGCTCCGCCACTCAGGCGGTTTTACTT
GCTGTTTCACCCATCTGTTTCCCTCCAGAATCTCTTGGGCAGACTTTGGATATACAGAGA
GGAGCTACATTGTTAATAGAGCTTGTATCGGGTGTATGATACAGGTGGAAACATTATT
CAACCTGGTGCAACGCTTTTTACAAAAGACCTCGAAAGAAATGGAGTTGATACTGAGGAA
GAAATATATCGTGTACCTACTTTGGAAAGGGAAGAATGCCGGGATTTGGTGAGAAATGC
ACACCGAGAGGACAATGTACCTTTGGACCGGTTGCAGGACGAAGAAATCAAGCTTCTC
GCTGAATTTGTAAAGTTTCAAGCTGACCAAGGCTGGCCAACCTGTATCTACGGACACCATG
GATA
```

Atc_x- cDNA PCR-Amplifikat für Gateway®-Klonierung; [*attB*-Cyt C6cd]

```
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGACTTGTTCCTCTCTGGTGCCTCTTC
TTTACCTCCAACCTTTTTTGTTCCTCCCAACAGGTCAATGGAAGAGGAAAAGAAGCTGAA
AAACCAATTTCTCTAAACCACAACAAAGATTTGGACTTTCTGTAAAGAAGTTAGCTCC
GCCACTCACGGCGGTTTTACTTGCTGTTTCACCCATCTGTTTCCCTCCAGAATCTCTTGG
GCAGACTTTGGATATACAGAGAGGAGCTACATTGTTAATAGAGCTTGTATCGGGTGTCA
TGATACAGGTGGAAACATTATTCAACCTGGTGCAACGCTTTTTACAAAAGACCTCGAAAG
AAATGGAGTTGATACTGAGGAAGAAATATATCGTGTACCTACTTTGGAAAGGGAAGAAT
GCCGGGATTTGGTGAGAAATGCACACCGAGAGGACAATGTACCTTTGGACCGCGGTTGCA
GGACGAAGAAATCAAGCTTCTCGCTGAATTTGTAAAGTTTCAAGCTGACCAAGGCTGGCC
AACTGTATCTACGGACTAGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAAGTGGTCCCC
```

Atc_x-Topo Konstrukt; PCR-Amplifikat

```
CACCATGCAGACTTTGGATATACAGAGAGGAGCTACATTGTTTAAATAGAGCTTGTATCGG
GTGTCATGATACAGGTGGAAACATTATTCAACCTGGTGCAACGCTTTTTACAAAAGACCT
CGAAAGAAATGGAGTTGATACTGAGGAAGAAATATATCGTGTACCTACTTTGGAAAGGG
AAGAATGCCGGGATTTGGTGAGAAATGCACACCGAGAGGACAATGTACCTTTGGACCGCG
GTTGCAGGACGAAGAAATCAAGCTTCTCGCTGAATTTGTAAAGTTTCAAGCTGACCAAGG
CTGGCCAACCTGTATCTACGGAC
```

PetE1- cDNA Amplifikat für Gateway®-Klonierung; [*attB*-PC1cd]

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGCCGCAATTACATCAGCTACCGTCACC
 ATCCCTTCTTTCACCGCCTAAAGCTCGCCGTCAGCTCAAACCTAAGACATTATCCACC
 ATCAGTAGATCCTCTTCCGCCACCAGGGCGCCACCTAAGCTCGCTTTGAAGTCCCTCTTTG
 AAGGATTTCCGGTGTATCGCAGTGGCAACAGCAGCTTCGATCGTTTTAGCTGGAAATGCG
 ATGGCCATGGAGGTTCTTTTAGGATCCGACGACGGTTCCCTTGCTTTTCGTACCATCTGAA
 TTCACGGTGGCTAAAGGAGAGAAGATCGTGTTCAGAACAACGCAGGGTTCCACATAAC
 GTGGTGTTCGACGAAGACGAGATCCCTAGTGGTGTGGACGCAAGCAAGATCTCGATGGAT
 GAGACAGCGCTTCTAAATGGTGCAGGGGAGACTTACGAGGTTACTTTGACAGAGCCAGGC
 TCTTACGGTTTCTATTGTGCGCCGCCACCAGGGTGTGGTATGGTTGGGAAACTCACCGTC
 AAGTAAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

PetE2- cDNA PCR-Amplifikat für Gateway®-Klonierung; [*attB*-PC2cd]

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATGGCCTCAGTAACCTCAGCCACCGTTGCA
 ATCCCATCTTTCACCGCCTTAAAGCCTCAACCATCAAATCATCCGCCACCGTCAGAATC
 CAAACTGCTGCTGTTGCATCACCGAAGCTTACAGTGAAGTCATCTCTAAAGAACTTCGGA
 GTCGCGGCCGTAGCGGCTGCAGCTTCAATTGCTTTGGCCGAAACGCCATGGCAATAGAA
 GTTCTCTTGGGAGGAGGGGATGGGTCGTTAGCTTTTTATTCCCAACGACTTCTCTATAGCT
 AAAGGAGAGAAGATTGTGTTCAAGAACAACGCTGGATACCCACACAATGTTGTCTTCGAT
 GAAGACGAGATCCCAAGTGGCGTCGACGTGGCCAAGATCTCGATGGACGAGCAAGATCTA
 CTCAACGGTGCGGGAGAGACGTACGAGGTTGCTTTGACCGAGCCAGGGACTTACAGCTTC
 TACTGTGCGCCACATCAGGGTGTGGTATGGTTCGGTAAAGTCACCGTTAACTAAGACCCA
 GCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

PetE2- genomische PCR-Amplifikat für Gateway®-Klonierung; [*g1-attB*-Pc2]

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACCGGTACGGACTGACCAGATATCTGACCC
 ATACCATATGGTAAAGAAGTAGCTGCATGATCCTCCATGAACCTGCTCGTTATGCGCAGTA
 CTCTGAACTTTGTTTAAACATGATACCAACTCCTTCTATCATAGCCAACAACACACCTCCG
 ACTAAAGCCGATCTAGCAGACGCGCCTAAGCCTTGACGCAACGAGAGGAATCCTCCAGTG
 GCTGCACCAGATAAGATCGAGTTCATGGATCTTCCCTTTTGTCTTGGCTACACCAACGCA
 CAATCGAAGGTTGAGTAAAGACCACCCACACGGAGAAGCTTCCCTCCGCTTCTCGGCCCG
 CTCATTCTCAAAGCTTGAACGCCGCCGAGAGACGAGCTCCGCCGGGAGAGTTGTAGATT
 CCTCTTATGAGGTGATACGCTGATCCACCAACAGCACCCATCGAAACGCACCTCCGACA
 TCATCTAGGATCCGATCCGGACATGGCTCTCTCGATGATTCTGGAGTTCCCATTTGATTTT
 CGATTTTGATCTACAAGTAACTTTTTAGGGTATAAGAAAAGAGCCCTTGAAAACGAAACT
 AAGAATGAGGAAAAATTAACAAAAATGGAAAAATATCGTGTGTTACGTTACTTGACCAT
 GGTCAAAGCCCATTAAGGCCCATTTGTAAAACAGCTTTATCACAAAATACTAATATAAAA
 ACGCCACGTCATTCAGAACCTTATCTTTATTTAAAACGTGGACAAACATCCTCCACCTC
 ATAATGCCATGTCACGACACAGTATCTAAAATCAACCAATCACAAACGCGTCTTTATAGAT
 AACTTGTTTTTTTATGGAGTTTGTCTTTTAGAGCCATCCATGTCTTATCTCACTTTCTCT
 CTTTACCACATAAAAACTCATAAACTCGATCGAACCAAAGCTAAACGAAAAAACTTAAAA
 CCCAAATCTTATCACTACTCTAAAAGAATCTTCATCATGGCCTCAGTAACTCAGCCACC
 GTTGCAATCCCATCTTTCACCGCCTTAAAGCCTCAACCATCAAATCATCCGCCACCGTTC
 AGAATCCAAACTGCTGCTGTTGCATCACCGAAGCTTACAGTGAAGTCATCTCTAAAGAAC
 TTCGGAGTCGCGGCCGTAGCGGCTGCAGCTTCAATTGCTTTGGCCGAAACGCCATGGCA
 ATAGAAGTTCTCTTGGGAGGAGGGGATGGGTCGTTAGCTTTTTATTCCCAACGACTTCTCT
 ATAGCTAAAGGAGAGAAGATTGTGTTCAAGAACAACGCTGGATACCCACACAATGTTGTC
 TTCGATGAAGACGAGATCCCAAGTGGCGTCGACGTGGCCAAGATCTCGATGGACGAGCAA
 GATCTACTCAACGGTGCGGGAGAGACGTACGAGGTTGCTTTGACCGAGCCAGGGACTTAC
 AGCTTCTACTGTGCGCCACATCAGGGTGTGGTATGGTTCGGTAAAGTCACCGTTAACTAA
 AATGTGTGTGAGTAAGTGAAGGAGTCTCGACTCAATTAGAGGCTCTTCTTTTACATT
 CTTACATTATTACATAAAGTGTTTTGTAAATCTAAAGAGTGTGAAATCGAATGGACCGTG
 ATTGTTGTTGACTGTGACTGGTTCCATAAAATGGTTTTTCTTGGTTTTATATATGATGCT
 TATGTCTCGCCCTGAAGTTATGATTAATTTAAGTAGGAAAGTGAACGTTTGAATAAGCG
 CTTTTCATAGAGGTATTTAGTTAGATGGTCTAATTTGAAGAAAATTAGATATATGACTAT
 GGTGCTAAATAGTAGTTGGTAAATAATTAATTTTGTGTCAGATTGACCAAATTAATCTCAA
 TGCACTCACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC

Chlamydomonas reinhardtii Cyt c₆ (p-538) cDNA; CD J02774

ATGCTTCAGTTGGCGAACCGTAGCGTGAGGGCTAAGGCCGCTCGTGCCAGCCAAAGCGCT
 CGGAGTGTCTCGTGTGCGGCTGCCAAGCGCGGTGCGGATGTTGCTCCCCTGACGTCGGCC
 CTGGCGGTCACCGCATCCATCCTGCTCACGACTGGCGCGGCGAGCGCTAGCGCAGCTGAC
 CTCGCTCTCGGCGCCAGGTCTTCAACGGCAACTGTGCCGCGTGCCACATGGGCGGTTCGC
 AACAGCGTGATGCCCGAGAAGACGCTGGACAAGGCCGCCCTTGAGCAGTACCTGGATGGC
 GGCTTCAAGGTGGAGAGCAGCATCTATCAGGTGGAGAATGGCAAGGGGGCGATGCCGGCG
 TGGGCGGATCGGCTGTTCGGAGGAGGAAATCCAGGCTGTGGCGGAGTACGTGTTCAAGCAG
 GCCACGGATGCCGCTGGAAGTACTAG

6.2. Aminosäuresequenzen

Atc_x::V5-(His)₆ TOPO Konstrukt

MPGFGEKCTPRGQCTFGPRLQDEEIKLLAEFVKFQADQGWPTVSTDKGELNSKLEGKPIIP
 NPLLGLDSTRTGHHHHHH

Atc_x::dsRFP Konstrukt

MRLVLSGASSFTSNLFCSSQQVNGRGKELKNPISLNHNKDLDFLLKKLAPPLTAVLLAVS
 PICFPPESLGQTLDIQRGATLFRACIGCHDTGGNI IQPGATLFTKDLERNVDTEEEIY
 RVTYFGKGRMPGFGEKCTPRGQCTFGPRLQDEEIKLLAEFVKFQADQGWPTVSTDTMGSS
 KNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNTVKLVTKGGPLPFAWDILSPQ
 FQYGSKVYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKF
 IGVNFPSDGPVMQKKTMGWEASTERLYPRDGLKGEIHKALKLKDGGHYLVEFKSIYMAK
 KPVQLPGYYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL

PetE2_{TP}::Chl Cyt c₆ Konstrukt

MASVTSATVAIPSF'TGLKASTIKSSATVRIQTAAVASPKLTVKSSLKNFVAAVAAAASI
 ALAGNAMAADLALGAQVFNNGCAACHMGRNSVMPEKTLDKAALEQYLDGGFKVESSIYQ
 VENGKGAMPAWADRLSEEEIQAVAEYVFKQATDAAWKY

6.3. Alignments von Nukleotidsequenzen der *A. thaliana* Plastocyanin-Gene

<i>PetE1</i> -cDNA..	ATGGCCGCAATTACATCAGCTACCGTCACCATCCCTTCTTTACCGGCCTAAAGCTCGCC	60
<i>PetE2</i> -cDNA..	ATGGCCTCAGTAACCTCAGCCACCGTTGCAATCCCATCTTTACCGGCCTAAAGCCTCA	60
	***** ** * ** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	GTCAGCTCAAAACCTAAGACATTATCCACCATCAGTAGATCCACTTCCGCCACCAGGGCG	120
<i>PetE2</i> -cDNA..	ACCA--TCAA-----ATCATCCGCCACCGTCAGAATCCAAACTGCTGCTGTTGCA	108
	** **** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	CCACCTAAGCTCGCTTTGAAGTCCTCTTTGAAGGATTTCCGGTGTGCATCGCAGTGGCAACA	180
<i>PetE2</i> -cDNA..	TCACCGAAGCTTACAGTGAAGTCATCTCTAAAGAACTTCGGAGTCGCGGCCGTAGCGGCT	168
	**** ***** * ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	GCAGCTTCGATCGTTTTAGCTGGAAATGCGATGGCCATGGAGGTTCTTTTAGGATCCGAC	240
<i>PetE2</i> -cDNA..	GCAGCTTCAATTGCTTTGGCCGGAACGCCATGGCAATAGAAGTTCTCTGGGAGGAGGG	228
	***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	GACGGTTCCTTGCTTTTCGTACCATCTGAATTCACGGTGGCTAAAGGAGAGAAGATCGTG	300
<i>PetE2</i> -cDNA..	GATGGTTCGTTAGCTTTTATTCCCAACGACTTCTCTATAGCTAAAGGAGAGAAGATTGTG	288
	** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	TTCAAGAACAACGCAGGGTTCACACATAACGTGGTGTTCGACGAAGACGAGATCCCTAGT	360
<i>PetE2</i> -cDNA..	TTCAAGAACAACGCTGGATACCCACACAATGTTGTCTTCGATGAAGACGAGATCCCAAGT	348
	***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	GGTGTGGACGCAAGCAAGATCTCGATGGATGAGACAGCGCTTCTAAATGGTGCAGGGGAG	420
<i>PetE2</i> -cDNA..	GGCGTCGACGTGGCCAAGATCTCGATGGACGAGCAAGATCTACTCAACGGTGCGGGAGAG	408
	** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	ACTTACGAGGTTACTTTGACAGAGCCAGGCTCTTACGGTTTCTATTGTGCGCCGACCAG	480
<i>PetE2</i> -cDNA..	ACGTACGAGGTTGCTTTGACCGAGCCAGGGACTTACAGCTTCTACTGTGCGCCACATCAG	468
	** ***** ***** ***** ***** * ***** ***** ** * ** *	
<i>PetE1</i> -cDNA..	GGTGCTGGTATGGTTGGGAAACTCACCGTCAAGTAA	516
<i>PetE2</i> -cDNA..	GGTGCTGGTATGGTCGGTAAAGTCACCGTAACTAA	504
	***** ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

Abbildung 6-1: ClustalW-Alignment der cDNA - Nukleotidsequenzen der beiden *PetE*-Gene. Mit einem Sternchen wurden identische Nukleinsäuren gekennzeichnet.

6.4. Alignments der Plastocyanin-Proteine unterschiedlicher Spezies

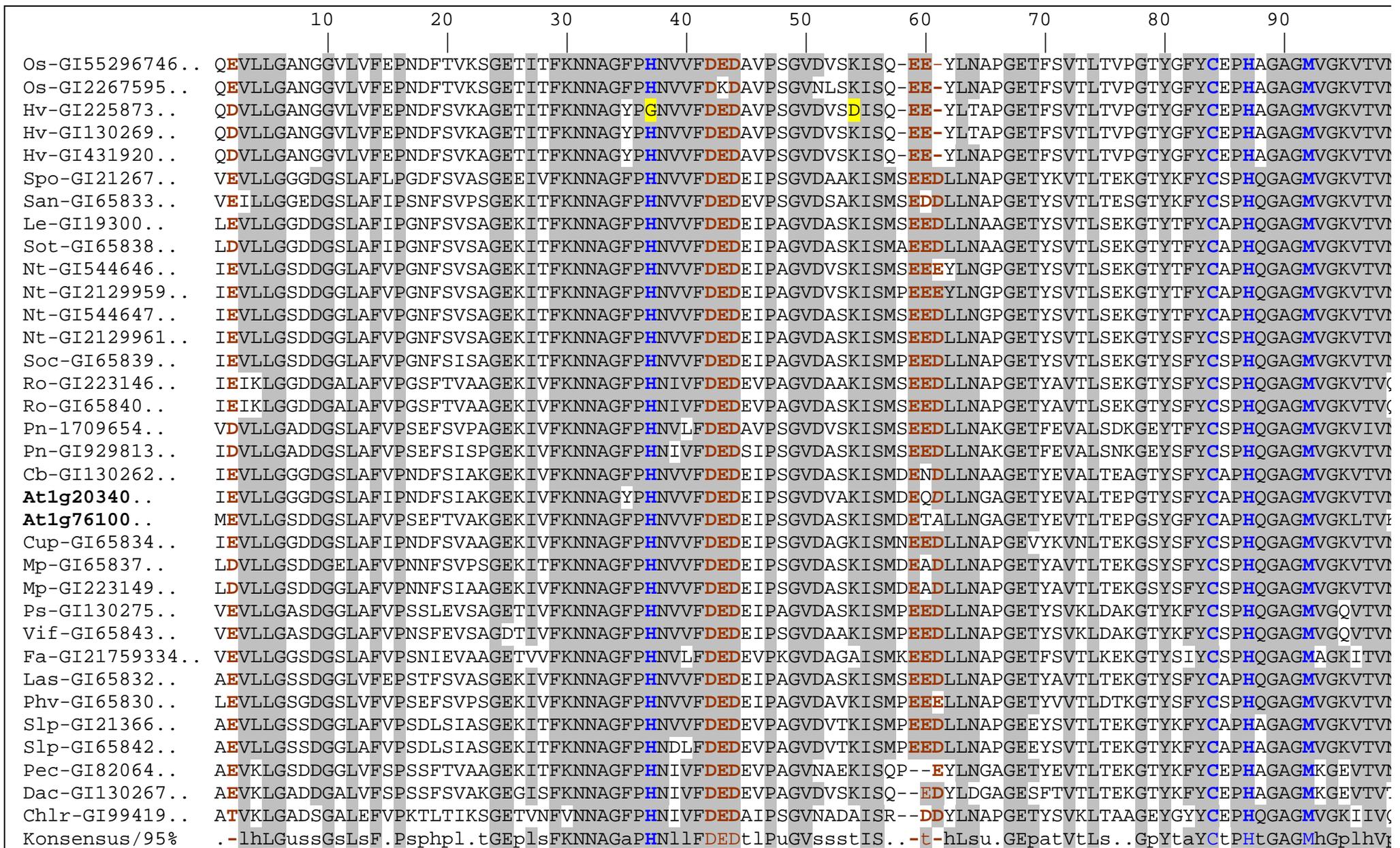


Abbildung 6-2: ClustalW-Alignment reifer Aminosäuresequenzen der Plastocyanin-Gene aus unterschiedlichen Spezies.

Mehrere Aminosäuresequenzen einer Spezies wurden nur dann dargestellt, wenn das reife Protein Unterschiede aufwies. In der Konsensus=Konsensus-Sequenz sind die konservierten Aminosäuren groß geschrieben, in kleinen Buchstaben und Zeichen wurden die Aminosäuren nach Eigenschaften beschrieben (o=alkoholisch; l=aliphatisch; .=irgendeine; a=aromatisch; c=geladen; h=hydrophobisch; -=negativ; p=polar; +=positive; s=klein; u=sehr klein; t=turn-ähnlichelike). Das Einkernige Cu-Zentrum wird von den blau markierten Aminosäuren gebildet. Die rot dargestellten Aminosäuren sind sauer und wichtig für Interaktionen des Plastocyanins mit PSI und Cyt *b₆/f*-Komplex.

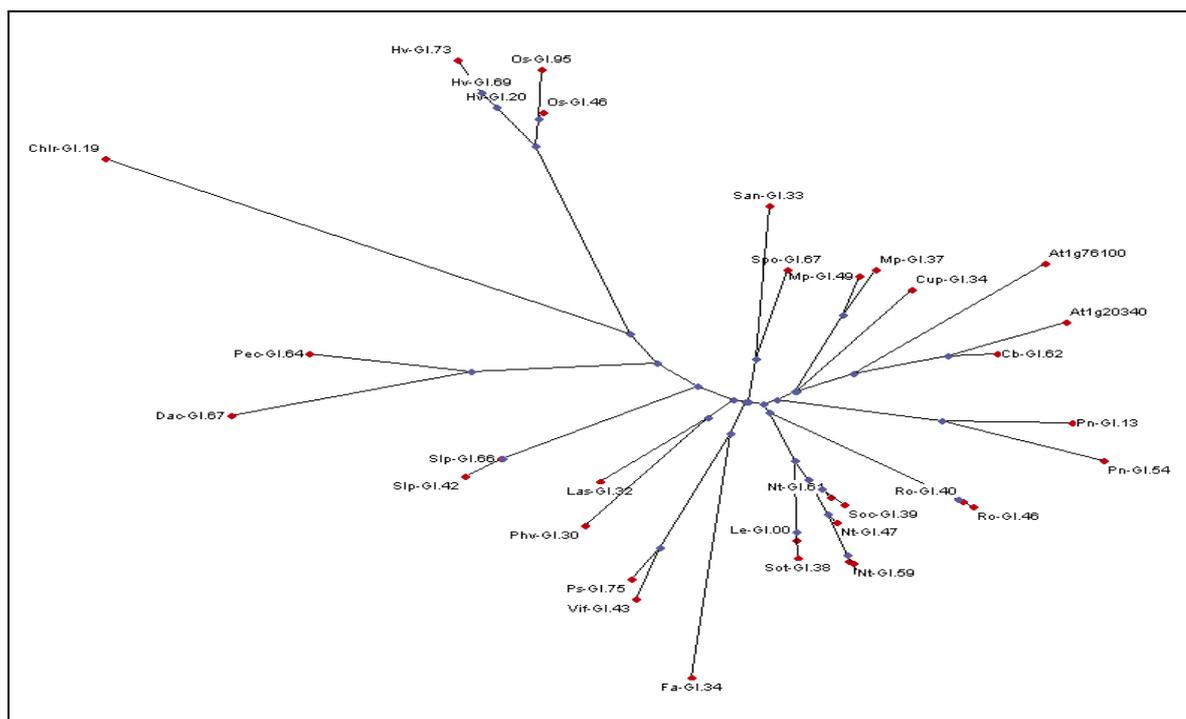


Abbildung 6-3: Phylogenetisches Baum der reifen Plastocyanin-Aminosäuresequenzen. Angegeben wurde ein Kürzel für die Art und die letzten zwei Ziffer der GI-Nummer der Sequenz.

- At: *Arabidopsis thaliana*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids II; Brassicales; Brassicaceae]
 Cb: *Capsella bursa-pastoris*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids II; Brassicales; Brassicaceae]
 Chlr: *Chlamydomonas reinhardtii*; [Chlorophyta; Chlorophyceae; Chlamydomonadales; Chlamydomonadaceae]
 Cup: *Cucurbita pepo*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Cucurbitales; Cucurbitaceae]
 Dac: *Daucus carota*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Apioideae; Scandiceae; Daucinae]
 Fa: *Fritillaria agrestis*; [Streptophyta; Liliopsida; Liliales; Liliaceae]
 Hv: *Hordeum vulgare*; [Streptophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; Pooideae; Triticeae]
 Las: *Lactuca sativa*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Cichorioideae; Cichorieae]
 Le: *Lycopersicon esculentum*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae; Solanum]
 Mp: *Mercurialis perennis*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Malpighiales; Euphorbiaceae; Acalyphoideae; Acalypheae]
 Nt: *Nicotiana tabacum*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae]
 Os: *Oryza sativa*; [Streptophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; Ehrhartoideae; Oryzaceae]
 Pec: *Petroselinum crispum*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; campanulids; Apiales; Apiaceae; Apioideae; apioid superclade; Apium clade]
 Phv: *Phaseolus vulgaris*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Phaseoleae]
 Pn: *Populus nigra*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Malpighiales; Salicaceae; Salicaceae]
 Ps: *Pisum sativum*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Viciae]
 Ro: *Rumex obtusifolius*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; Caryophyllales; Polygonaceae]
 San: *Sambucus nigra*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; campanulids; Dipsacales; Adoxaceae]
 Slp: *Silene latifolia*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; Caryophyllales; Caryophyllaceae]
 Soc: *Solanum crispum*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae]
 Sot: *Solanum tuberosum*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; asterids; lamiids; Solanales; Solanaceae]
 Spo: *Spinacia oleracea*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; Caryophyllales; Amaranthaceae]
 Vif: *Vicia faba*; [Streptophyta; eudicotyledons; core eudicots; rosids; eurosids I; Fabales; Fabaceae; Papilionoideae; Viciae]

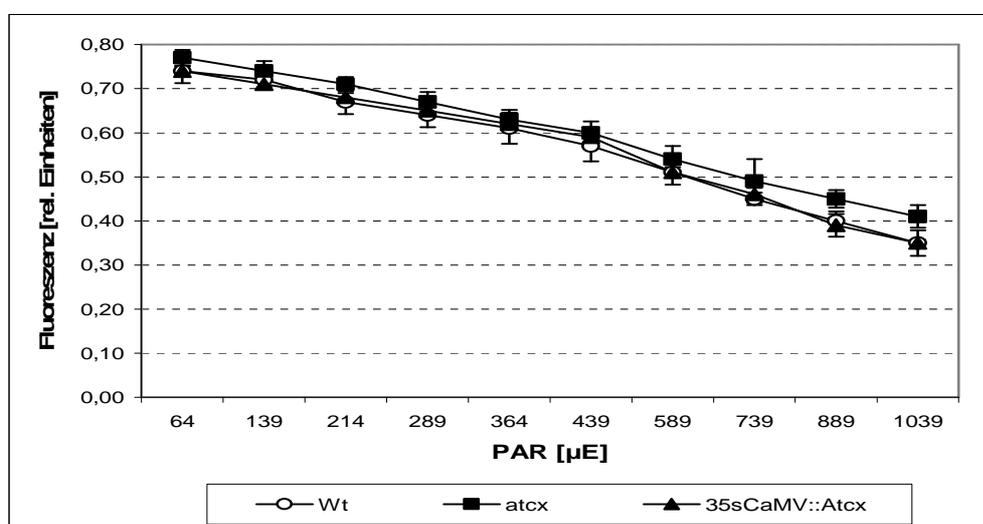
6.5. Weitere spektroskopische Messungen

6.5.1. PAM-Messungen an Cytochrom c_x -Linien

Tabelle 6-1: Spektroskopische Parameter der Cytochrom c_x -Linien bei 60 μ E.

	Fv/m	Φ_{II}	1-qP	qN	qT
Wt	0,82 \pm 0,01	0,74 \pm 0,01	0,054 \pm 0,01	0,177 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
atc_x	0,82 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01	0,056 \pm 0,01	0,161 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
35SCaMV:: Atc_x	0,82 \pm 0,01	0,75 \pm 0,01	0,042 \pm 0,01	0,172 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01

Fluoreszenzmessungen an acht Wochen alten Wildtyp-Pflanzen (Wt) und Cytochrom c_x -Linien (atc_x und 35SCaMV:: Atc_x). Mittels einer PAM-101-Einheit wurde die Effizienz der photochemischen Reaktion des PSII (Fv/Fm); die effektive Quantenausbeute am PSII (Φ_{II}), Redox-Status von Q_A (1-qP), nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (qN) und *state-1-2-transition* (qT) ermittelt. Die Werte wurden bei einer Illumination mit aktinischem Licht von 60 μ E aufgenommen.

Abbildung 6-4: Lichtkurven an Cytochrom c_x -Linien.

An acht Wochen alten Pflanzen wurde die effektive Quantenausbeute am PSII Φ_{II} (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Intensität des aktinischen Lichts (X-Achse) gemessen. Zwischen Wildtyp-Pflanzen (Wt) und den Cytochrom c_x -Linien (atc_x und 35SCaMV:: Atc_x) sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die dazugehörigen Messwerte wurden in der Tabelle 6-2 zusammengefasst.

Tabelle 6-2: Lichtkurven an Cytochrom c_x - Linien.

	Wt	atc_x	35SCaMV:: Atc_x
64 μ E	0,74 \pm 0,028	0,77 \pm 0,018	0,74 \pm 0,01
139 μ E	0,72 \pm 0,021	0,74 \pm 0,022	0,71 \pm 0,006
214 μ E	0,67 \pm 0,028	0,71 \pm 0,016	0,68 \pm 0,01
289 μ E	0,64 \pm 0,028	0,67 \pm 0,022	0,65 \pm 0,01
364 μ E	0,61 \pm 0,035	0,63 \pm 0,022	0,62 \pm 0,006
439 μ E	0,57 \pm 0,035	0,6 \pm 0,026	0,59 \pm 0,012
589 μ E	0,51 \pm 0,028	0,54 \pm 0,03	0,51 \pm 0,012
739 μ E	0,45 \pm 0,014	0,49 \pm 0,05	0,46 \pm 0,015
889 μ E	0,4 \pm 0,021	0,45 \pm 0,02	0,39 \pm 0,026
1039 μ E	0,35 \pm 0,007	0,41 \pm 0,026	0,35 \pm 0,029

Die effektive Quantenausbeute am PSII Φ_{II} in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtintensität [μ E]. Diese Daten wurden in der Abbildung 6-4. grafisch dargestellt.

Tabelle 6-3: Lichtabhängige Fluoreszenzlöschung in Cytochrom c_x -Linien.

qP	Wt	<i>atc_x</i>	35S <i>CaMV</i> :: <i>Atc_x</i>
150μE	0,79 ±0,03	0,86 ±0,03	0,8 ±0,03
300μE	0,71 ±0,03	0,75 ±0,01	0,69 ±0,02
600μE	0,51 ±0,03	0,47 ±0,06	0,52 ±0,06
1200μE	0,31 ±0,04	0,22 ±0,03	0,26 ±0,03

qI	Wt	<i>atc_x</i>	35S <i>CaMV</i> :: <i>Atc_x</i>
150μE	0,08 ±0,02	0,09 ±0,03	0,05 ±0,02
300μE	0,15 ±0,04	0,1 ±0,03	0,13 ±0,01
600μE	0,28 ±0	0,28 ±0,03	0,27 ±0,03
1200μE	0,37 ±0,06	0,67 ±0,08	0,61 ±0,08

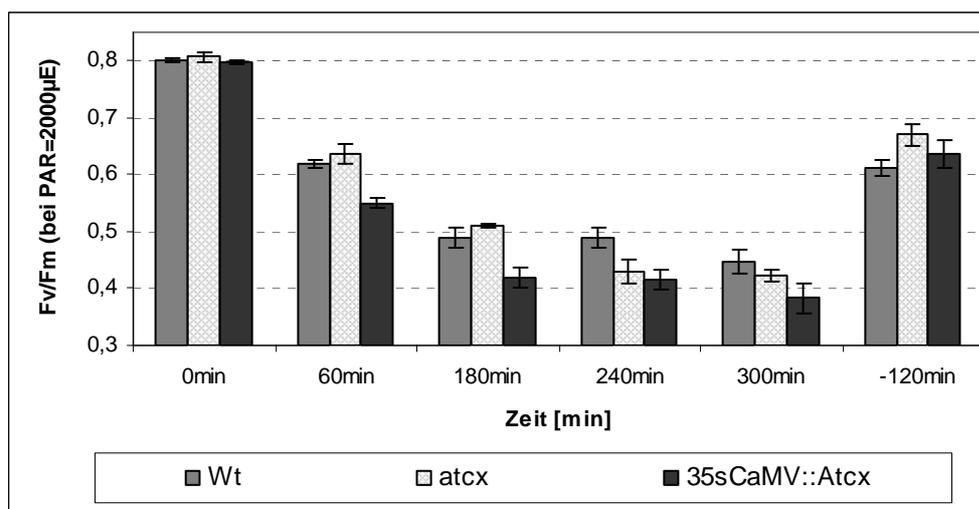
qE	Wt	<i>atc_x</i>	35S <i>CaMV</i> :: <i>Atc_x</i>
150μE	0,55 ±0,17	0,65 ±0,12	0,52 ±0,09
300μE	1,02 ±0,28	1,45 ±0,09	1,53 ±0,01
600μE	1,51 ±0,04	2,19 ±0,27	2,11 ±0,26
1200μE	2,22 ±0,15	2,37 ±0,3	2,38 ±0,3

Die photochemische Fluoreszenzlöschung $\{qP = F_{ST}/F_{VS}\}$ und nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung $\{qI = (F_M/F_M') - 1$ Photoinhibition; $qE = (F_M/F_{MS}) - (F_M/F_M')$ Wärmedissipation} wurden bei Raumtemperatur mittels einer PAM101-Einheit, aus Lichtinduktion/Erholungs-Kurven (wie in Abb. 6-7.) unter unterschiedlicher Intensität des aktinischen Lichts (150-1200 μE) berechnet.

Tabelle 6-4: Der relative Oxidationszustand von P_{700} in Cytochrom c_x -Linien.

	150μE	300μE	600μE	900μE	1200μE
Wt	39,3 ±4,9	50,7 ±6,3	70,3 ±8,8	75,5 ±9,4	84,2 ±10,5
<i>atc_x</i>	43,3 ±5,4	58,6 ±7,3	81 ±10,1	85,7 ±10,7	96,3 ±12
35S <i>CaMV</i> :: <i>Atc_x</i>	30,9 ±3,9	38,6 ±4,8	70,4 ±8,8	84,5 ±10,6	93 ±11,6

In PSI, unter unterschiedlicher aktinischer Belichtung stellt sich ein intermediärer Oxidations- bzw. Redoxzustand ein. Bei geringen Lichtintensitäten ist P_{700} überwiegend reduziert, bei hohen Lichtintensitäten überwiegend oxidiert. Der relative Oxidationszustand [in %] wurde mittels einer PAM101/PAM-102 Einheit mit ED-P700-DW-Emitter/Detektor und zwei 102-FR Fernrot-Dioden an acht Wochen alten Pflanzen bestimmt.

Abbildung 6-6: Messung der Photoinhibition in Cytochrom c_x -Linien.

Blattscheiben von Wildtyp-Pflanzen (Wt) und Cytochrom c_x -Linien (*atc_x*; 35S*CaMV*::*Atc_x*) wurden bei 27°C; in Wasser einer mehrstündiger Illumination mit 2000 μE ausgesetzt. In definierten Zeitabständen wurde die Effektivität der photochemischen Reaktion am PSII (F_v/F_m) gemessen. Nach 300 min wurde das aktinische Licht ausgeschaltet und für zwei Stunden (-120min) die Erholung des photosynthetischen Apparats betrachtet.

6.5.2. PAM-Messungen an Plastocyanin-Linien

Tabelle 6-5: State transition in Plastocyanin-Linien.

	qT
Wt	0,12 \pm 0,01
<i>pete1-1.1</i>	0,14 \pm 0,01
<i>pete2-1.1</i>	0,17 \pm 0,01
35SCaMV::PetE1	0,12 \pm 0,01
35SCaMV::PetE2	0,11 \pm 0,01

Tabelle 6-6: Lichtabhängige Fluoreszenzlöschung in Plastocyanin-Linien.

qP	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV::PetE1	35SCaMV::PetE2
150 μ E	0,79 \pm 0,03	0,87 \pm 0,1	0,69 \pm 0,06	0,78 \pm 0,04	0,92 \pm 0,05
300 μ E	0,71 \pm 0,03	0,79 \pm 0,02	0,64 \pm 0,03	0,70 \pm 0,01	0,74 \pm 0,06
600 μ E	0,51 \pm 0,03	0,58 \pm 0,07	0,47 \pm 0,06	0,5 \pm 0,06	0,51 \pm 0,06
1200 μ E	0,31 \pm 0,04	0,4 \pm 0,05	0,26 \pm 0,03	0,3 \pm 0,04	0,32 \pm 0,04

qI	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV::PetE1	35SCaMV::PetE2
150 μ E	0,08 \pm 0,02	0,06 \pm 0,06	0,05 \pm 0,05	0,05 \pm 0,03	0,07 \pm 0,03
300 μ E	0,15 \pm 0,04	0,12 \pm 0,03	0,09 \pm 0,05	0,16 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02
600 μ E	0,28 \pm 0	0,23 \pm 0,03	0,26 \pm 0,03	0,29 \pm 0,04	0,33 \pm 0,04
1200 μ E	0,37 \pm 0,06	0,46 \pm 0,06	0,47 \pm 0,06	0,42 \pm 0,05	0,53 \pm 0,07

qE	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV::PetE1	35SCaMV::PetE2
150 μ E	0,55 \pm 0,14	0,65 \pm 0,14	0,14 \pm 0,11	0,67 \pm 0,1	1,03 \pm 0,05
300 μ E	1,02 \pm 0,18	1,12 \pm 0,14	1,12 \pm 0,14	1,37 \pm 0,09	1,24 \pm 0,39
600 μ E	1,61 \pm 0,14	1,59 \pm 0,2	1,53 \pm 0,19	2,04 \pm 0,28	1,64 \pm 0,23
1200 μ E	2,22 \pm 0,15	2,49 \pm 0,31	2,33 \pm 0,29	3,1 \pm 0,39	2,43 \pm 0,3

Die photochemische Fluoreszenzlöschung $\{qP = F_{ST}/F_{VS}\}$ und nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung $\{qI = (F_M/F_M') - 1\}$ Photoinhibition; $qE = (F_M/F_{MS}) - (F_M/F_M')$ Wärmedissipation} wurden bei Raumtemperatur mittels einer PAM101-Einheit, aus Lichtinduktion/Erholungs-Kurven (wie in Abb.6-7.) unter unterschiedlicher Intensität des aktinischen Lichts (150-1200 μ E) berechnet.

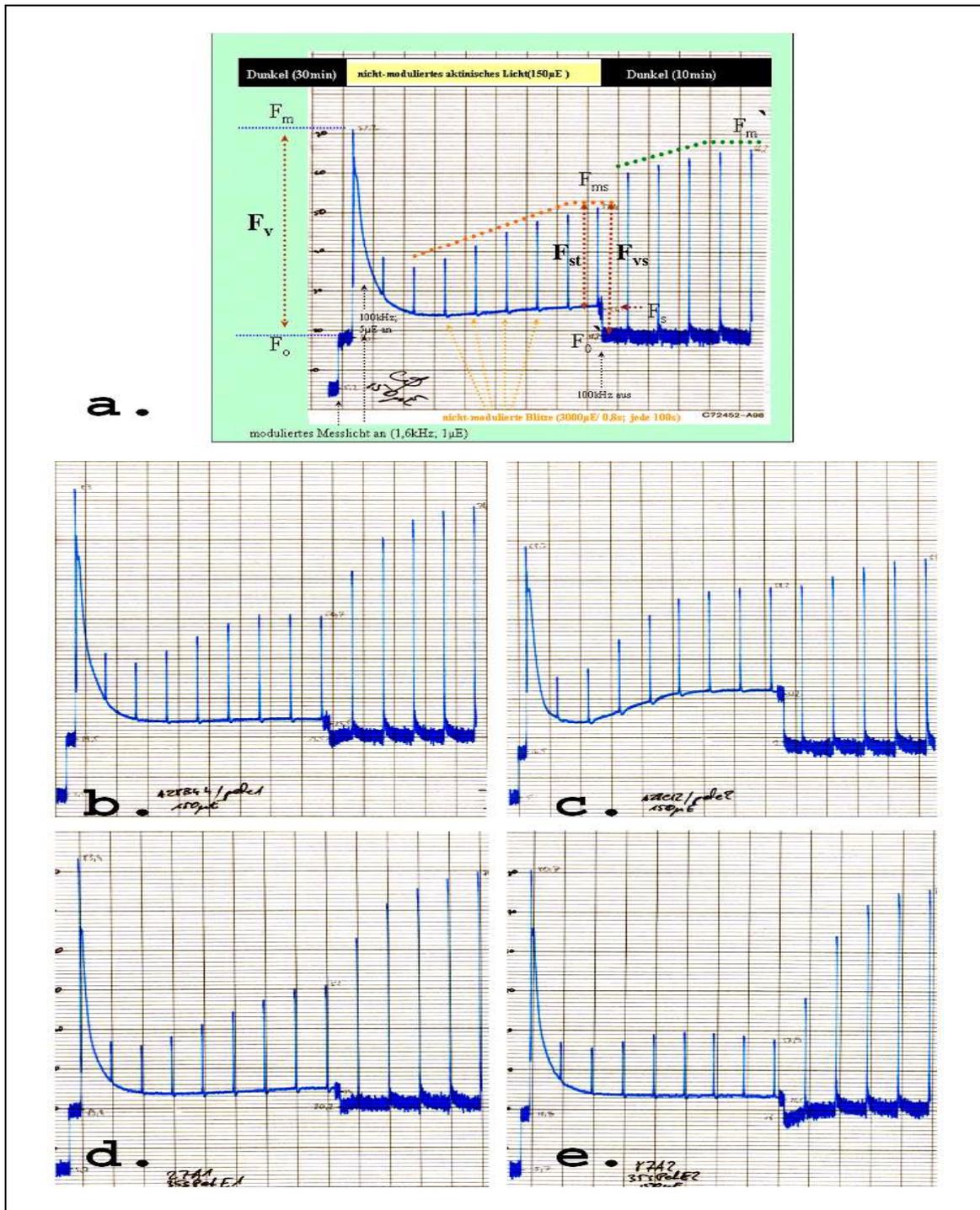


Abbildung 6-7: Verlauf der typischen Lichtinduktion/Erholung-Messkurven zur Analyse der Fluoreszenzmessung an Wildtyp-Pflanzen (a.) und Plastocyanin-Linien (b.: *pete1-1.1*; c.: *pete2-1.1*; d.: *35SCaMV::PetE1*; e.: *35SCaMV::PetE2*). Die Messungen wurden mit einer PAM101-Einheit und bei Raumtemperatur durchgeführt. Aufgeführt sind nur Induktionskurven die unter einer Illumination von 150 μ E aktinischen Lichts aufgenommen wurden. Die X-Achse protokolliert Zeit, die Y-Achse die Fluoreszenz. Die angegebenen Abkürzungen bedeuten: F_0 : Grundfluoreszenz; F_m : Maximale Fluoreszenz im Dunkeln; F_v : Variable Fluoreszenz; F_{ms} : Maximalfluoreszenz im stationären Zustand; F_o' : Grundfluoreszenz nach Ausschalten des aktinischen Lichts; F_m' : Maximalfluoreszenz nach 10min Erholung. F_{st} ist die Differenz von F_{ms} und der Grundfluoreszenz im aktinischen Licht. Mit hellroten Punkten wurde die Zunahme und Stagnation der thermischen Dissipation im aktinischen Licht dargestellt. Wegen nicht bereiten Reaktionszentren, in diesem Zustand konkurrieren nur Wärme und Fluoreszenz um die Anregungsenergie. Mit grünen Punkten ist der Verlauf der Rückregulation (Erholung) im Dunkeln dargestellt.

Tabelle 6-8B: Die effektiven Quantenausbeute des PSII (Φ_{II}) in Abhängigkeit von aktinischen Lichtstärke gemessen mit einem PAM101-Instrument.

	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV:: <i>PetE1</i>	35SCaMV:: <i>PetE2</i>
60 μ E	0,75 \pm 0,01	0,75 \pm 0,02	0,71 \pm 0,03	0,74 \pm 0,01	0,76 \pm 0,02
150 μ E	0,56 \pm 0,02	0,6 \pm 0,03	0,51 \pm 0,02	0,57 \pm 0,03	0,65 \pm 0,05
300 μ E	0,42 \pm 0,03	0,48 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01	0,41 \pm 0,01	0,52 \pm 0,05
600 μ E	0,27 \pm 0,01	0,31 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03	0,25 \pm 0,03	0,36 \pm 0,04
1200 μ E	0,13 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02

Unter Langtagbedingungen propagierte, acht Wochen alte Pflanzen wurden mit PAM101 (800 ms / 3000 μ E saturierende Lichtimpuls) vermessen.

Tabelle 6-8C: Die effektiven Quantenausbeute des PSII (Φ_{II}) in Abhängigkeit von aktinischen Lichtstärke gemessen mit dem Robot-Instrument.

	Wt	<i>pete1-1.1</i>	<i>pete2-1.1</i>	35SCaMV:: <i>PetE1</i>	35SCaMV:: <i>PetE2</i>
64 μ E	0,74 \pm 0,028	0,74 \pm 0,024	0,7 \pm 0,01	0,73 \pm 0,005	0,74 \pm 0,012
139 μ E	0,72 \pm 0,021	0,73 \pm 0,02	0,63 \pm 0,021	0,69 \pm 0,005	0,72 \pm 0,015
214 μ E	0,67 \pm 0,028	0,71 \pm 0,017	0,56 \pm 0,025	0,61 \pm 0,01	0,67 \pm 0,021
289 μ E	0,64 \pm 0,028	0,67 \pm 0,018	0,5 \pm 0,025	0,55 \pm 0,025	0,64 \pm 0,03
364 μ E	0,61 \pm 0,035	0,65 \pm 0,019	0,45 \pm 0,025	0,51 \pm 0,02	0,61 \pm 0,031
439 μ E	0,57 \pm 0,035	0,63 \pm 0,043	0,4 \pm 0,025	0,48 \pm 0,035	0,58 \pm 0,023
589 μ E	0,51 \pm 0,028	0,57 \pm 0,037	0,34 \pm 0,031	0,4 \pm 0,04	0,54 \pm 0,025
739 μ E	0,45 \pm 0,014	0,52 \pm 0,054	0,29 \pm 0,03	0,35 \pm 0,04	0,51 \pm 0,042
889 μ E	0,4 \pm 0,021	0,49 \pm 0,05	0,26 \pm 0,03	0,31 \pm 0,03	0,48 \pm 0,047
1039 μ E	0,35 \pm 0,007	0,45 \pm 0,053	0,23 \pm 0,032	0,28 \pm 0,025	0,45 \pm 0,02

Unter Langtagbedingungen propagierte, acht Wochen alte Pflanzen wurden mit "Robot" vermessen.

Tabelle 6-9: Relative Oxidationszustand von P₇₀₀ unter unterschiedlichen Lichtintensitäten.

	150 μ E	300 μ E	600 μ E	900 μ E	1200 μ E
Wt	30,26 \pm 3,78	39,08 \pm 4,88	54,17 \pm 6,77	58,14 \pm 7,27	64,83 \pm 8,1
<i>pete1-1.1</i>	11,02 \pm 1,38	19,09 \pm 2,39	48,1 \pm 6,01	58,48 \pm 7,31	70,6 \pm 8,82
<i>pete2-1.1</i>	27,3 \pm 3,41	48,2 \pm 6,03	71,4 \pm 8,93	77,8 \pm 9,73	94,3 \pm 11,79
35SCaMV:: <i>PetE1</i>	35,02 \pm 4,38	42,79 \pm 5,35	54,31 \pm 6,79	57,99 \pm 7,25	65,14 \pm 8,14
35SCaMV:: <i>PetE2</i>	28,26 \pm 3,53	39,32 \pm 4,92	52,55 \pm 6,57	57,94 \pm 7,24	64,96 \pm 8,12

Mit dem PAM101/102-Fluorometer (mit ED-P700DW Emitter/Detektor und 102-FR Photodioden) wurde das relative Oxidationszustand (in % oxid. P₇₀₀) in Abhängigkeit von der Intensität des aktinischen Lichts bestimmt und über Menge der PSI-Komplexes normalisiert.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Francesco Salamini und Prof. Dr. Dario Leister betreut worden.

Martin Christian Weigel

Leverkusen, 01.Dezember.2005

Veröffentlichungen

Aus dieser Arbeit gingen folgende Teilveröffentlichungen hervor:

“Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*.”; Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D.; J Biol Chem. 2003 Aug 15;278(33):31286-9. Epub 2003 May 28.

“Tracking the function of the cytochrome c_6 -like protein in higher plants.”; Weigel M, Pesaresi P, Leister D.; Trends Plant Sci. 2003 Nov;8(11):513-7.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Leister für die Überlassung des Themas sowie die gute Betreuung, die vielen hilfreichen Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Francesco Salamini und Herrn Prof. Dr. Maarten Koornneef für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Abteilung für „Pflanzenzüchtung und Ertragsphysiologie“ am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, sowie die Begutachtung dieser Dissertationsschrift.

Ich danke meinen Kollaborationspartnern für ihre Hilfe: Herrn Prof. Dr. P. (Jahns Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) für die HPLC-Analysen und die Anleitung zu den PAM-Messungen; und Herrn Prof. Dr. F. A. Wollmann, Prof. Dr. P. Joliot, Dr. F. Rappaport und Dr. G. Finazzi (Institut de Biologie Physico-Chimique; Paris) für die Hilfe bei den Messungen der Fluoreszenz-Induktionskinetiken.

Herrn Claudio Varotto, Paolo Pesaresi, Ivo Schliebner, Alexander Biehl und Erik Richly die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben danke ich für die sachliche und moralische Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Mein größter Dank gebührt meiner geliebten Ehefrau Aleksandra, meinem tapferen Sohn Matthias und meiner wunderschönen Tochter Jana, die mir in jeder Situation zur Seite standen und mich immer unterstützen.

Abstract

In *Arabidopsis thaliana*, plastocyanin is encoded by two nuclear genes, *PetE1* and *PetE2*, which are highly homologous. The double mutant *pete1-1.1 pete2-1.1* is seedling-lethal, high-chlorophyll-fluorescent and deficient for all subunits of photosystem II and photosystem I. The contention that, in higher plants, plastocyanin is the only mobile electron donor to photosystem I was recently shaken by the discovery of a cytochrome *c*₆-like protein in *Arabidopsis* and other flowering plants. The characterization of *Arabidopsis* plants carrying disrupted genes for both Plastocyanins and with a functional cytochrome *c*₆ from *Arabidopsis thaliana* (cyt *c*_x) or *Chlamydomonas reinhardtii* (cyt *c*₅₅₂) cannot grow photoautotrophically because of a complete block in light-driven electron transport. These results suggest that in higher plants the possibility that cyt *c* functions alongside plastocyanin in photosynthetic electron flow can be excluded. Additionally, complementation experiments of plastocyanin double mutant with *PetE1* and *PetE2* genes have shown that both plastocyanin genes have redundant function. However, chlorophyll fluorescence measurements using the Pulse Amplitude Modulation (PAM) of the *pete1-1.1* and 35S*CaMV::PetE2* –lines (in the double mutant background) indicate that release of oxidized plastocyanin from photosystem I can affect the light-driven electron transport. In *A. thaliana*, this effect can be mediated by a difference in the structures of hydrophobic “north pole” (*PetE1*:₃₇F; *PetE2*:₃₇Y) and in acid *northern-patch* (*PetE1*:₆₁ETA; *PetE2*:₆₁EQD) of the *PetE*-isoplastocyanins.

Zusammenfassung

In *Arabidopsis thaliana* existieren zwei kernkodierte Loci für Plastocyanin: *PetE1* und *PetE2*. Die Nukleotidsequenzen der Gene, und ihre Peptidsequenzen weisen hohe Homologie zueinander auf. Die Doppelmutante aus *pete1-1.1* und *pete2-1.1* ist unter photoautotrophen Bedingungen nicht lebensfähig. Unter UV-Illumination weist sie eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Fluoreszenz und eine nahezu vollständige Reduktion des Photosynthese-Apparates auf. Mit der Entdeckung des Cytochrom *c*₆- homologen Proteins in *Arabidopsis* entfachte erneut eine Diskussion ob in höheren Pflanzen nur Plastocyanin Elektronen zum PSI transportiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *Arabidopsis*-Linien mit Mutationen in beiden Plastocyanin-Genen und im Beisein von funktionellen Cytochrom *c*₆-Homologen aus *A. thaliana* (Cyt *c*_x) oder *Chlamydomonas reinhardtii* (Cyt *c*₅₅₂) nicht autotroph lebensfähig sind. Die Beobachtung begründet sich in einer vollständigen Blockade des lichtbetriebenen Elektronentransports und suggeriert, dass in höheren Pflanzen die Funktion des Cytochrom *c* –Proteins als ein Elektronencarrier zwischen Cytochrom *b*_{6/f}-Komplex und Photosystem I ausgeschlossen werden kann.

Im Komplementationsexperimenten der Plastocyanin-Doppelmutante mittels *PetE1* und *PetE2* –Gene wurde festgestellt dass die beiden Plastocyanin-Gene eine redundante Funktion aufweisen. Messungen der Chlorophyllfluoreszenz mittels Puls-Amplituden-Modulation (PAM) an den *pete1-1.1* und 35S*CaMV::PetE2* –Linien brachten weiterhin Hinweise darauf, dass der Zerfall der Komplexe aus oxidiertem Plastocyanin und Photosystem I einen Einfluss auf den Effizienz des Elektronentransports zwischen Cyt *b*_{6/f} und PSI haben kann. In *A. thaliana* könnte der Effekt aufgrund strukturellen Unterschiede in der hydrophober „Nord-Domäne“ (*PetE1*:₃₇F; *PetE2*:₃₇Y) und in der saueren *northern-patch* Domäne (*PetE1*:₆₁ETA; *PetE2*:₆₁EQD) der Iso-Plastocyanine zustande kommen.