

**Untersuchungen zur Hochlicht-Akklimatisierung
von *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Defekten im Kohlenhydratstoffwechsel**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Jessica Schmitz
aus Ahlen (Westfalen)

Februar 2011

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von August 2007 bis Februar 2011 am Botanischen Institut der Universität zu Köln angefertigt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge
Prof. Dr. Reinhard Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 11. April 2011

„Je komplizierter der Mechanismus, umso leichter ist es, ein bisschen Verwirrung zu stiften“

Montgomery „Scotty“ Scott (Star Trek III, 1984)

Inhalt

I. Abbildungsverzeichnis.....	IV
II. Tabellenverzeichnis.....	VI
III. Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Der Elektronenfluss in der Photosynthese.....	1
1.2 Protektive Mechanismen zum Schutz der Photosynthese bei erhöhter Lichtabsorption.....	3
1.3 Akklimatisierung der Photosynthese an veränderte Lichtbedingungen.....	9
1.4 Retrograde Signale.....	11
1.5 Zentrale metabolische Stoffwechselwege der Photosynthese.....	14
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. MATERIAL & METHODEN.....	19
2.1 Pflanzenlinien.....	19
2.2 Primer.....	19
2.3 Chemikalien und Enzyme.....	20
2.4 Software und Datenbanken.....	21
2.5 Anzuchtbedingungen von <i>A. thaliana</i>	21
2.5.1 Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde.....	21
2.5.2 Anzucht von <i>A. thaliana</i> in Sterilkultur.....	22
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.6.1 Genomische DNA-Isolierung aus <i>A. thaliana</i>	23
2.6.2 Polymerase Kettenreaktion.....	23
2.6.3 Agarosegelelektrophorese.....	24
2.6.4 RNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.6.5 Quantitative und qualitative Bestimmung isolierter RNA.....	26
2.6.6 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qPCR).....	26
2.7 Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.7.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus <i>A. thaliana</i>	27
2.7.2 Proteinmengenbestimmung mit Amidoschwarz.....	28
2.7.3 Denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	29
2.7.4 Anfärbung von Proteinen im Gel mit kolloidalem Coomassie.....	30
2.7.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot).....	30
2.7.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	31
2.7.7 Immunologischer Nachweis von Proteinphosphorylierung.....	32
2.7.8 Blaue native kontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (Blue Native).....	32
2.7.9 Massenspektrometrische Analyse.....	35
2.8 Bestimmung photosynthetischer Parameter.....	35
2.8.1 Messungen der PSII-Aktivität <i>in vivo</i>	35
2.8.2 Messungen der PSI-Aktivität <i>in vivo</i>	36
2.8.3 Bestimmung der Fluoreszenz-Emissions-Spektren der Photosysteme bei 77 K.....	37

2.9	Elektronenmikroskopie.....	38
2.9.1	Fixierung von Blattmaterial für die Elektronenmikroskopie	38
2.9.2	Herstellung von Schnittpräparaten für die Elektronenmikroskopie	39
2.10	Genomweite Expressionsanalyse von <i>A. thaliana</i>	40
2.10.1	Experimenteller Aufbau	40
2.10.2	Statistische Analyse zur Identifizierung differentiell regulierter Gene	40
2.11	Quantitative und qualitative Pigmentanalysen	41
2.11.1	Bestimmung des MgProtoIX-Gehaltes	41
2.11.2	Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes.....	41
2.12	Quantitative und qualitative Metabolitanalysen.....	42
2.12.1	Qualitative und quantitative Bestimmung von Adenylaten.....	42
2.12.2	Qualitativer Nachweis von Stärke in Blättern	43
2.12.3	Quantitative Bestimmung löslicher Zucker in Blättern	43
2.12.4	Quantitative Bestimmung der Stärke in Blättern.....	44
3.	ERGEBNISSE.....	46
3.1	Charakterisierung des Hochlicht-abhängigen Phänotyps der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante.....	47
3.1.1	Untersuchung der Photosyntheseeffizienz im Hoch- und Schwachlicht.....	49
3.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Ultrastruktur der Chloroplasten.....	55
3.1.3	Immunologische Analyse Photosynthese assoziierter Proteine	56
3.1.4	Auftrennung der am Elektronentransport beteiligten Superkomplexe	60
3.1.5	Untersuchung der Chl <i>a</i> Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K	63
3.1.6	Aufschlüsselung der erhöhten Chl <i>a</i> Fluoreszenz der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante	64
3.2	Betrachtung des HCF Phänotyps der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante im metabolischen Kontext.....	69
3.2.1	Überblick über den Kohlenhydratstoffwechsel im Hochlicht.....	70
3.2.2	Betrachtung der ATP/ADP Gehalte zur Überprüfung des zellulären Energiestatus.....	72
3.2.3	Effekte von exogen gefütterter Saccharose auf den Wachstums- und HCF Phänotyp	73
3.2.4	Analyse weiterer Stoffwechselmutanten mit ähnlichem HCF Phänotyp	78
3.3	Transferexperimente zur Untersuchung der Akklimatisierung der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante im Hochlicht	86
3.3.1	Effekte auf den HCF Phänotyp durch Schwachlicht Exposition.....	87
3.3.2	Analysen der Akklimatisierung der Photosyntheseeffizienz an Hochlicht	89
3.3.3	Genomweite Expressionsanalysen in Kurzzeit- und Langzeit-Akklimatisierungsphasen an Hochlicht	92
4.	DISKUSSION.....	110
4.1	Die homozygote Doppelmutante <i>adg1-1/tpt-2</i> ist lebensfähig.....	111
4.2	Eine Veränderung der Photosynthese-assoziierten Komponenten im Hochlicht verursacht den HCF Phänotyp der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante	113
4.2.1	Die Veränderungen im Stoffwechsel der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante führen zu starker Photoinhibition unter Hochlicht	114
4.2.2	Die Regulation der Lichtabsorption ist in der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante gestört	116
4.2.3	Ungebundene LHCs verursachen der HCF Phänotyp der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante	117
4.2.4	Führt eine Limitierung der ETK zu einer Etablierung alternativer Elektronenflüsse?	120
4.2.5	Der metabolische Status der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante ist direkt für die Ausprägung des HCF Phänotyp verantwortlich.....	124
4.2.6	Weitere Stoffwechselmutanten zeigen einen HCF Phänotyp im Hochlicht	126

4.3 Die Akklimatisierung der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante an Hochlicht ist verändert ...	128
4.3.1 Die globale Expressionsanalyse der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante offenbart eine deutliche veränderte Akklimatisierungsantwort auf Hochlicht	128
4.3.2 Der HCF Phänotyp - ein physiologisches Modell.....	131
5. ZUSAMMENFASSUNG	134
6. <i>ABSTRACT</i>	136
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	137
8. ANHANG	153
8.1 Bestätigung der generierten Stoffwechselmutanten.....	153
Danksagung.....	155
Erklärung.....	157
Lebenslauf.....	159

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Übersicht über die Elektronentransportkette der Photosynthese.....	8
Abbildung 3.1	Identifizierung der <i>tpt-2</i> „knock-out“ Mutante.	46
Abbildung 3.2	Wachstumsphänotyp der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten.	48
Abbildung 3.3	F_v/F_m -Verhältnisse der verwendeten Mutanten <i>adg1-1</i> , <i>tpt-2</i> , <i>adg1-1/tpt-2</i> im Vergleich zum WT in Falschfarben dargestellt.	51
Abbildung 3.4	Gegenüberstellung der Elektronentransportraten am PSII und PSI in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte.....	54
Abbildung 3.5	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Thylakoidstruktur des WT und der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante im Vergleich von LL und HL.....	56
Abbildung 3.6	Immunologischer Nachweis der wichtigsten Photosynthese-assoziierten Proteine im Vergleich von HL und LL angezogenen WT, <i>adg1-1</i> , <i>tpt-2</i> sowie <i>adg1-1/tpt-2</i> Pflanzen.....	59
Abbildung 3.7	Proteinsuperkomplexe der Thylakoidmembran von im HL angezogenen <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppel- sowie den entsprechenden Einzelmutanten und des WT.....	61
Abbildung 3.8	Relative Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz-Emissions-Spektren von isolierten Thylakoiden des WT und der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante bei 77 K.....	64
Abbildung 3.9	Verlauf der Chl <i>a</i> Fluoreszenz bei Induktion mit Licht des HL angezogenen WT sowie der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante.	65
Abbildung 3.10	Einfluss der Inhibitoren Tentoxin, Nigericin und Dithiothreitol auf die Chl <i>a</i> Fluoreszenzlöschung im Licht.	66
Abbildung 3.11	Chl <i>a</i> Fluoreszenzkinetiken bei verschiedenen Inhibitorbehandlungen und fernrotem Licht.	67
Abbildung 3.12	Darstellung der einzelnen Komponenten der absoluten Chl <i>a</i> Fluoreszenz im WT und der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante.	69
Abbildung 3.13	Diurnale Änderungen des Stärke-, Saccharose-, Glukose- und Fruktosegehaltes im Blatt beim WT, <i>tpt-2</i> , sowie <i>adg1-1</i> und <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante.	71
Abbildung 3.14	Absolute ATP, ADP, und AMP Gehalte pro g Frischgewicht im Blatt der Mutanten und des WT im Vergleich von HL und LL.....	73
Abbildung 3.15	Veränderung des HL-abhängigen Phänotyps der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante nach Fütterung von 50 mM Saccharose.....	74
Abbildung 3.16	Relative Expression des GPT2 unter Einfluss exogen gefütterter Saccharose.....	76
Abbildung 3.17	Einfluss exogener Saccharose auf den HCF Phänotyp in der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante und der <i>adg1-1/tpt-2/gpt2-1</i> Tripelmutante.	78
Abbildung 3.18	Phänotypische Betrachtung der generierten Doppelmutanten unter HL Anzucht.	81
Abbildung 3.19	Relative Anteile der Chl <i>a</i> Fluoreszenz Komponenten der neu generierten Stoffwechselfeldoppelmutanten.	83

Abbildung 3.20 Phänotypischer Vergleich der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante und <i>dpa1</i> Mutante bei Anzucht auf Saccharose im HL.	84
Abbildung 3.21 Immunologische Untersuchung verschiedener Photosynthese-assoziiierter Proteine in Abhängigkeit von Saccharose.	86
Abbildung 3.22 Änderung der Chl <i>a</i> Fluoreszenzparameter bei Exposition HL angezogener Pflanzen mit LL.	88
Abbildung 3.23 Darstellung der einzelnen Chl <i>a</i> Fluoreszenzparameter im Zeitverlauf nach ein Transfer von LL ins HL.	90
Abbildung 3.24 <i>Lhcb1</i> Transkriptakkumulation im HL Transfer im Vergleich mit den Mg-Protoporphyrin IX Gehalten.	92
Abbildung 3.25 Schematische Darstellung der Arrayauswertung.	93
Abbildung 3.26 Übersicht über die Anzahl signifikant de-regulierter Gene in der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante und den entsprechenden Einzelmutanten im Vergleich zum WT.	95
Abbildung 3.27 Proportionale Anteile der funktionellen Gruppen der Kandidatengene der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante.	97
Abbildung 3.28 Hierarchische Übersicht der signifikant überrepräsentierten funktionellen Gruppen von den Kandidatengene zu ZP4h.	98
Abbildung 3.29 Hierarchische Übersicht der signifikant überrepräsentierten funktionellen Gruppen von den Kandidatengene zu ZP2d.	99
Abbildung 3.30 Darstellung aller vorausgesagten DNA Motive der 5' UTR für die Kandidatengene nach ZP2d HL Exposition, gefiltert nach Bedingung 3.	109
Abbildung 4.1 Aufbau der abundantesten PSII-LHCII Superkomplexe in <i>A. thaliana</i>	120
Abbildung 8.1 Qualitativer Stärkenachweis mittels Iod-Kaliumiodid Färbung zur Verifizierung von homozygoten Mutanten im Stärkemetabolismus.	153
Abbildung 8.2 Bestätigung der homozygoten T-DNA Insertion im TPT bzw. GPT2 Allel mittels PCR.	154

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1	Zusammenstellung der physiologischen Charakteristika der einzelnen Pflanzenlinien im Vergleich von HL und LL Anzuchten.....	49
Tabelle 3.2	Zusammenstellung der Chlorophyll <i>a</i> Fluoreszenz Parameter der einzelnen Pflanzenlinien im Vergleich von HL und LL.....	50
Tabelle 3.3	Parameter der Photosyntheseeffizienz am PSI der Mutanten und des WT im Vergleich von HL und LL.....	52
Tabelle 3.4	Zusammenstellung aller mittels LC-MS/MS identifizierten Proteine des >1000 kDa Superkomplexes.....	62
Tabelle 3.5	Vergleichende Übersicht der gemessenen Chlorophyll- und Carotinoidgehalte bei Saccharoseanzucht der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante sowie des WT.....	74
Tabelle 3.6	Zusammenstellung der Chl <i>a</i> Fluoreszenz Parameter bei Saccharoseanzucht der <i>adg1-1/tpt-2</i> und des WT.....	75
Tabelle 3.7	Zusammenfassung der Chl <i>a</i> Fluoreszenzparameter der generierten Stoffwechselmutanten unter HL Anzucht.....	80
Tabelle 3.8	Zusammenstellung der Chl <i>a</i> Fluoreszenzparameter von <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante und <i>dpa1</i> Mutante im HL.....	85
Tabelle 3.9	Verwendete Filterregeln zur Identifikation von Kandidatengen in der <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante.....	94
Tabelle 3.10	Zusammenfassung der unter Bedingung 1 gefilterten Kandidatengene zu ZP4h und ZP2d.....	102
Tabelle 3.11	Zusammenfassung der unter Bedingung 2 gefilterten Kandidatengene zu ZP4h mit putativer chloroplastidärer Lokalisation.....	103
Tabelle 3.12	Zusammenfassung der unter Bedingung 3 gefilterten Kandidatengene zu ZP4h mit putativer chloroplastidärer Lokalisation.....	104
Tabelle 3.13	Zusammenfassung der unter Bedingung 2 gefilterten Kandidatengene zu ZP2d mit putativer chloroplastidärer Lokalisation.....	105
Tabelle 3.14	Zusammenfassung der unter Bedingung 3 gefilterten Kandidatengene zu ZP2d mit putativer chloroplastidärer Lokalisation.....	106
Tabelle 3.15	Zusammenstellung der Transkriptionsdaten der Photosynthese-assoziierten Gene im stationären Vergleich von WT und <i>adg1-1/tpt-2</i> Doppelmutante zum ZP2d.....	107

III. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent	MEX1	Maltoseexporter
% (w/v)	Gewichtsprozent	min	Minute(n)
3-PGA	3-Phosphoglyzerinsäure	mRNA	<i>messenger</i> RNA
ADG1	ADP-Glukosepyrophosphorylase, kleine Untereinheit	NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
AL	aktinisches Licht	NDH	NAD(P)H Dehydrogenase
APX	Ascorbatperoxidase	NF	Norflurazon
ATP	Adenosintriphosphat	OD	optische Dichte
bp	Basenpaare	P _a	anorganisches Phosphat
bzw.	beziehungsweise	PAM	Puls-Amplituden-Modulation
cDNA	komplementäre DNA	PC	Plastocyanin
CEF	zyklischer Elektronenfluss	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Chl	Chlorophyll	PFD	Photonenflussdichte
d	Tag(e)	PGI	Phosphoglucoseisomerase
DBMIB	Dibrommethylisopropyl-Benzoquinone	PGM	Phosphoglucosemutase
DCMU	Dichlorphenylharnstoff	pH	<i>potentia hydrogenii</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>pmf</i>	<i>proton motive force</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PQ	Plastoquinon
DTT	Dithiothreitol	PS	Photosystem
E	Extinktion	q _E	Hoch-Energie Löschung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	q _P	photochemische Energielöschung
ET	Elektronentransport	RNA	Ribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und Andere)	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
ETK	Elektronentransportkette	<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i>
ETR	Elektronentransportrate	RT	Raumtemperatur
F ₀	Grundfluoreszenz	s	Sekunde(n)
F _d	Ferredoxin	SEX1	Glukan-Wasser-Dikinase
F _m	maximale Fluoreszenz	SD	Standardabweichung
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase	SDS	Natriumdodecylsulfat
FR	dunkelrot	SE	Standardfehler
Fru	Fruktose	Suc	Saccharose
F _v /F _m	maximale Quanteneffizienz	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	T-DNA	Transfer-DNA
g	Gramm	TP	Triosephosphat
Glc	Glukose	TPT	Triosephosphat/Phosphat Translokator
GPT	Glukose-6-phosphat/Phosphat Translokator	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
GUN	<i>genome uncoupled</i>	UV	Ultraviolett
h	Stunde(n)	VDE	Violaxanthin De-Epoxidase
H ⁺	Proton	Vol.	Volumen
HCF	Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz	WT	Wildtyp
HL	Hochlicht	WWZ	Wasser-Wasser-Zyklus
LEF	Linearer Elektronenfluss	XPT	Xylulose-5-phosphat/Phosphat Translokator
LHC	Lichtsammelkomplex	XZ	Xanthophyllzyklus
LL	Schwachlicht	z.B.	zum Beispiel
M	mol/Liter	ZP	Zeitpunkt

1. EINLEITUNG

Alle anabolischen Stoffwechselprozesse sind energieabhängig. Pflanzen gewinnen ihre Energie durch die Photosynthese im Chloroplasten, welche sie dazu befähigt absorbierte Lichtenergie in Form von chemischer Energie zu speichern. Daher ist Licht der wichtigste abiotische Faktor, der Entwicklung, Wachstum und Reproduktion bestimmt. Im Rahmen der Photosynthese wird das Licht verwendet, um Wassermoleküle zu oxidieren und die gewonnenen Elektronen über die Redoxpotential-abhängige Elektronentransportkette (ETK) auf NADP^+ zum Aufbau von Reduktionsäquivalenten (NADPH) zu übertragen. An diesen Elektronentransport ist die Synthese der energiereichen Verbindung ATP aus ADP und P_a gekoppelt. Die Assimilierung von CO_2 im Stroma der Chloroplasten wird durch die Verfügbarkeit von NADPH und ATP limitiert. Veränderungen in der Lichtquantität und -qualität können dramatische Störungen der ETK sowie der Folgereaktionen verursachen. Somit sind die Akklimatisierungsprozesse der Photosynthesemaschinerie an veränderte Lichtbedingungen von entscheidender Bedeutung für das Überleben der Pflanze. Im Folgenden wird die Photosynthese in Bezug auf Leistung und ihre protektiven Mechanismen im metabolischen Zusammenhang von photosynthetisch aktiven Pflanzengewebe dargestellt.

1.1 DER ELEKTRONENFLUSS IN DER PHOTOSYNTHESE

Die als Photosynthese bezeichneten physikalischen, chemischen und biochemischen Prozesse sind in der pflanzlichen Zelle im Chloroplasten lokalisiert. Die Chloroplasten sind durch Endosymbiose mit einem prokaryotischen Organismus hervorgegangen (Race *et al.*, 1999). Pflanzliche Chloroplasten besitzen drei Membransysteme, die äußere und die innere Hüllmembran sowie die Thylakoidmembran, welche durch Ausstülpungen der inneren Membran hervorgeht. Dieses Membransystem legt durch Schaffung eines zweiten Reaktionsraumes im Stroma des Chloroplasten, dem inneren Thylakoidlumen, die Grundlage für die Reaktionen der Photosynthese. Das Thylakoidmembransystem bildet Strukturen mit hohen gestapelten Membranen (Granathylakoide) und ungestapelten Membranen (Stromathylakoide) aus. Die ETK wird durch drei membranständige Komplexe, das Photosystem II (PSII), Cytochrom b_6f Komplex (Cyt b_6f) und Photosystem I (PSI), vermittelt, welche wiederum über den membranständigen Plastochinon Pool (PQ-Pool) und das auf der

Lumenseite mit den Thylakoiden assoziierte Plastocyanin (PC) miteinander gekoppelt sind. Diese Membrankomplexe sind jedoch nicht gleichmäßig in der Thylakoidmembran verteilt. Während PSI in der Stromathylakoiden lokalisiert, ist das funktionelle PSII in den Granathylakoiden vorzufinden (Danielsson *et al.*, 2004). Dies verhindert die excitonische Energieübertragung von PSII auf PSI (Trissl und Wilhelm, 1993). Der Cyt b_6f Komplex ist hingegen homogen in den Thylakoiden verteilt (Allred und Staehelin, 1986). Alle Komplexe der ETK sind multimere Proteinsuperkomplexe, von denen im Folgenden nur Untereinheiten im direkten Zusammenhang mit der ETK beschrieben werden (für Details siehe Abbildung 1.1 A und Abbildung 4.1 B; Review von Barber, 2004; Busch und Hippler, 2010).

Das Licht wird durch die Lichtsammelkomplexe (*light harvesting complex* = LHC) absorbiert und die Anregungsenergie zu den Reaktionszentren von PSII und PSI über strahlungslosen Energietransfer (Excitonentransfer) weitergeleitet (Melis, 2004). Im Zentrum des PSII, gebunden in der Proteinuntereinheit PsbA (D1), befindet sich ein Chlorophyll *a* (Chl *a*) Dimer (P680), welches durch Licht mit einer Wellenlänge von 680 nm angeregt werden kann und ein Elektron an den primären Elektronenakzeptor Pheophytin *a* (Pheo) weiter gibt. Das oxidierte P680 besitzt ein Redoxpotential von 1,15 V, welches benötigt wird um am sauerstoffentwickelnden Komplex (*oxygen evolving complex* = OEC), einem Mn_4Ca^+ -Cluster, Wasser zu oxidieren. Die photolytische Wasserspaltung gibt unter Oxidation von zwei Molekülen H_2O ein Molekül O_2 und 4 Protonen (H^+) in das Thylakoidlumen ab (Cady *et al.*, 2008). Hierbei werden vier Elektronen freigesetzt und über die ETK transportiert.

Das reduzierte Pheo überträgt ein Elektron an ein im PSII Zentrum PsbD (D2) gebundenes Plastochinon A (Q_A), welches im Folgenden das membrangängige Plastochinon (PQ) an der Q_B Bindestelle des D2 Proteins reduziert. PQ ist ein Zwei-Elektronenakzeptor und löst sich nach Aufnahme von zwei Elektronen und zwei H^+ , aus dem Stroma des Chloroplasten, vom PsbA ab und geht als Plastohydrochinon (PQH_2) in den PQ-Pool ein. PQH_2 überträgt ein Elektron über den Cyt b_6f Komplex, unter Abgabe von Protonen ins Thylakoidlumen, auf PC weiter. Hier wird von einem Zwei-Elektronentransportschritt (PQH_2) auf einen Ein-Elektronentransportschritt umgeschaltet, wodurch der Cyt b_6f Komplex zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des photosynthetischen Elektronentransports wird (Sacksteder *et al.*, 2000; Baniulis *et al.*, 2008).

Neben der H^+ -Übertragung ins Thylakoidlumen durch die Re-Oxidation von PQH_2 wird über den Q-Zyklus am Cyt b_6f ein weiteres H^+ pro Elektron transloziert.

PC reduziert auf der Donorseite des PSI das zuvor durch Lichtabsorption und Elektronenweitergabe oxidierte Reaktionszentrum des PSI (P700). Analog zu P680 befindet sich im P700 ein Chl a Dimer, das Licht mit einer Wellenlänge von 700 nm absorbieren kann und ein Elektron an ein modifiziertes Chl a (A_0) überträgt. Vom P700 aus werden die Elektronen entlang des Redoxpotentialgefälles über ein Phyllochinon (A_1) und nachfolgend über drei proteingebundene Eisenschwefelzentren auf Ferredoxin (Fd) übertragen. Hier vermittelt die Ferredoxin-NADP⁺ Oxidoreduktase (FNR) die Übertragung der Elektronen in einem Zwei-Elektronentransportschritt von Fd auf NADP⁺ zum Aufbau des Reduktionsäquivalents NADPH (Mulo, 2010). Hierbei dient FAD als Kofaktor. Dieser lineare Elektronenfluss (LEF, Abbildung 1.1 A) von H_2O zu NADP⁺ ist an die H^+ Translokation durch den Cyt b_6f , PQH_2 und den OEC, ins Thylakoidlumen gekoppelt. Das aufgebaute elektrochemische Potential der Protonen (*proton motive force* = *pmf*) wird verwendet, um über die thylakoidale CF_0 - CF_1 ATP-Synthase ATP aus ADP und P_a zu synthetisieren (McCarty, 2004).

Die stromabwärtsliegenden Prozesse der Photosynthese, die CO_2 Assimilation (Stoffwechsel) und die Abnahme von NADPH und ATP, sind eng mit den stromaufwärtsliegenden Prozessen (Lichtabsorption, Elektronentransport und Etablierung eines pH-Gradienten über der Thylakoidmembran) gekoppelt. Im Tagesverlauf, aber auch über den gesamten Entwicklungszeitraum der Pflanze kommt es zu starken Fluktuationen der Lichtintensität (z.B. Licht/Schatten). Um das Licht bei geringeren bzw. hohen Photonenflussdichten (PFDs) effizient nutzen zu können, müssen protektive Mechanismen und Akklimatisierungsprozesse etabliert sein bzw. werden.

1.2 PROTEKTIVE MECHANISMEN ZUM SCHUTZ DER PHOTOSYNTHESE BEI ERHÖHTER LICHTABSORPTION

Unter natürlichen, physiologischen Bedingungen kommt es zu Situationen, in denen zu viel Licht absorbiert wird, welches aufgrund von Limitationen in der ETK und den stromabwärtsliegenden Prozessen nicht für die photochemischen Reaktionen verwendet werden kann. In diesem Fall greifen protektive Mechanismen, welche innerhalb kurzer Zeit zu

einem Abfluss des „Energiedrucks“ in alternative Wege führen. Diese im Folgenden beschriebenen protektiven Mechanismen werden häufig in der Literatur unter dem Begriff der Kurzzeitakklimatisierung oder Kurzzeitantwort zusammengefasst (Bailey *et al.*, 2001). Da diese Mechanismen aber nicht direkt zu einer stöchiometrischen Veränderung der Photosynthesemaschinerie führen und nicht durch eine Veränderung in der Genexpression induziert werden, werden sie im Rahmen dieser Arbeit als protektive Mechanismen beschrieben. Allerdings kann die Kapazität dieser protektiven Mechanismen mit voranschreitender Akklimatisierung (Abschnitt 1.3) durch verstärkte *de novo* Synthese von essentiellen (Protein) Komponenten vergrößert werden und sind somit auch Gegenstand der Akklimatisierungsprozesse.

(1) Protektive Mechanismen am PSII

Am PSII stehen die Löschung der absorbierten Energie durch photochemische Prozesse, die Wärmedissipation und die Chl *a* Fluoreszenz miteinander in Konkurrenz. Im intakten System ist die Chl *a* Fluoreszenz minimal (3 %) und hat keine physiologische Bedeutung. Mithilfe der Puls-Amplituden-Modulation (PAM) Fluorometrie lassen sich jedoch, über Änderungen der variablen Chl *a* Fluoreszenz (F_v) des PSII, Photosyntheseeffizienz und Elektronentransportraten (ETR) bestimmen (Abschnitt 2.8.1). Kann die absorbierte Lichtenergie nicht in den photochemischen Prozessen verwendet werden (photochemische Energielöschung; q_p = hohe F_v), wird ein Großteil der Energie auf Kosten der F_v in Form von Wärme an den LHCIIs abgestrahlt (nicht-photochemische Energielöschung; q_E =niedriges F_v ; Ruban und Horton, 1994). Dieser Prozess der „Hoch-Energie“ Löschung (q_E) wird über den transthylakoidalen pH-Gradienten reguliert. Es wurde postuliert, dass die Ansäuerung des Thylakoidlumens eine Konformationsänderung der LHCII induziert. Die Lebensdauer der Anregungszustände der Chl Moleküle wird verkürzt und somit die Wahrscheinlichkeit zur Wärmeabstrahlung erhöht (Horton *et al.*, 2008). Kontrovers hierzu postulierten Barros *et al.* (2009) auf Basis von Kristallstrukturanalysen, dass die Energielöschung des LHCII durch Interaktion mit anderen Pigment-Protein Komplexen verursacht wird, ohne dass eine Konformationsänderung induziert werden muss. q_E ist abhängig von weiteren Prozessen, welche ebenfalls über den pH-Gradienten reguliert werden. Durch Absinken des pH-Wertes im Thylakoidlumen unter 5,8 wird das dort lokalisierte Enzym Violaxanthin De-Epoxidase aktiviert (VDE; Pfündel und Dilley, 1993). Die VDE wiederum ist essentiell für den Umsatz von Violaxanthin über Antheraxantin

zu Zeaxanthin (Demmig-Adams und Adams, 1996). Zusammen mit der enzymatischen Rückreaktion durch die Zeaxanthin Epoxidase beschreibt dieser Umsatz den Xanthophyllzyklus (XZ). Auch wenn über Mutanten mit einem Defekt in der VDE (*npq1*) gezeigt werden konnte, dass der XZ essentiell für das q_E ist, bleibt die Funktion des XZ am q_E unklar (Niyogi *et al.*, 1998). Es wurde postuliert, dass Zeaxanthin als allosterischer Regulator die Konformationsänderung der LHCII kontrolliert (Horton *et al.*, 2000). Li *et al.* (2000) identifizierten eine weitere q_E Mutante (*npq4*) mit einer Defizienz in der lumenständigen PSII Untereinheit PsbS, welche jedoch einen funktionsfähigen XZ besitzt. Es wird angenommen, dass PsbS durch Protonierung als pH-Sensor fungiert und das q_E an den LHCII in Kooperation mit dem XZ auf unbekannte Weise reguliert (Bonente *et al.*, 2008).

Wird die Lichtenergie nicht über q_E oder q_P abgeführt, können die Chl Moleküle in den LHCs vom angeregten Singulettzustand ($^1\text{Chl}^*$) in den in der langlebigen Tripletzustand ($^3\text{Chl}^*$) übergehen. Dieser kann direkt durch Übertragung der Energie auf eng assoziierte Carotinoidmoleküle, deren Elektronenorbitale sich mit dem angeregten Chl überlagern, gelöscht werden (Edge und Truscott, 2004). Die Carotinoidmoleküle können im Folgenden die Energie schadlos als Wärme abstrahlen. So kann die Energieübertragung vom $^3\text{Chl}^*$ auf O_2 und der damit einhergehenden Bildung von hoch reaktivem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) in den LHCs verringert werden. Bei einer akzeptorseitigen Limitation durch reduziertes Q_A am PSII, führt dies ebenfalls zu einer Überführung des Reaktionszentrums P680 in den langlebigen $^3\text{Chl}^*$ Zustand. Durch Übertragung der Energie von $^3\text{Chl}^*$ auf O_2 entsteht hier ebenfalls $^1\text{O}_2$, welcher durch das Antioxidans α -Tocopherol im P680 durch Oxidation abgebaut werden kann (Trebst *et al.*, 2002). Übermäßige Produktion von $^1\text{O}_2$ ist jedoch Hauptkomponente der oxidativen Schädigung am PSII Reaktionszentrum (Triantaphylidès *et al.*, 2008).

Das PsbA (D1) Protein, im Reaktionszentrum des PSII, unterliegt aufgrund der Schädigung durch die stetige $^1\text{O}_2$ Produktion einem kontrollierten Ab- und Aufbauzyklus (*damage and repair cycle*). Überwiegt jedoch die photooxidative Schädigung des PSII die Reparaturmechanismen (*de novo* Synthese von PsbA) spricht man von Photoinhibition (Melis, 1999), welche die Photosyntheseeffizienz dramatisch reduziert. Dieser Prozess der Photoinhibition wird vermutlich durch die Rückkopplung des Redoxzustands des Q_A oder Aktivierung des q_E über die *pmf* moduliert (Foyer *et al.*, 1990).

(2) Protektive Mechanismen am PSI

Auch am PSI kann es dann zu einer akzeptorseitigen Limitation kommen, wenn der Redoxzustand des Stromas aufgrund fehlender Abnahme der Reduktionsäquivalente hoch ist und nicht ausreichend NADP^+ zur Reduktion zu Verfügung steht. In diesem Fall können die Elektronen am PSI direkt auf Sauerstoff übertragen werden. Hierbei wird vermutlich an den Fe-S Clustern des PSI, durch Übertragung eines Elektrons auf O_2 , ein Sauerstoffradikal (O_2^- ; Superoxid-Anion) gebildet (Asada, 1999). Der reaktive Sauerstoff wird über das Enzym Superoxiddismutase (SOD) unter Aufnahme von zwei H^+ zu H_2O_2 umgesetzt. Die Detoxifizierung des H_2O_2 wiederum erfolgt über die Ascorbat Peroxidasen (APX), von denen mehrere Isoformen im Chloroplasten vorliegen (Peltier *et al.*, 2002). Bei der Verwendung von Ascorbat als Elektronen- und H^+ -donor entsteht H_2O . Die hierbei übertragenen Elektronen kommen ursprünglich aus der Wasserspaltung am OEC und werden letztendlich wieder auf Wasser zurückgeführt. Daher wird dieser Prozess auch als Wasser-Wasser-Zyklus (WWZ) beschrieben. Ob dieser alternative Abfluss der Elektronen jedoch einen signifikanten Anteil am Elektronentransport hat und zur Reduktion der Photoinhibition beiträgt wird kontrovers diskutiert (Heber, 2006). Lovelock und Winter (1996) zeigten jedoch, dass der WWZ bei tropischen Bäumen etwa 30 % des Elektronentransportes ausmachen kann.

Neben dem WWZ können die Elektronen am PSI auch in einem zyklischen Elektronentransport (CEF) wieder von Fd^- oder NADPH in die ETK am Cyt b_6f oder PQ-Pool zurückgeführt werden (Joliot und Joliot, 2002; Breyton *et al.*, 2006; Joliot und Joliot 2006). Schon 1963 konnten Tagawa *et al.* durch *in vitro* Studien an isolierten Thylakoiden nachweisen, dass eine ATP-Synthese in Anwesenheit von Fd^- , ADP sowie P_a stattfand, wenn nur PSI spezifisch angeregt wurde. Die Mechanismen und involvierten Proteinkomplexe sind, trotz der Entdeckung im Jahr 1963, noch immer nicht klar umrissen. In höheren Pflanzen existieren mindestens zwei, teilweise redundante Systeme des CEF, die nach den involvierten Komplexen benannt sind, und vier mögliche Transportwege der Elektronen vom PSI vermuten lassen (Abbildung 1.1 B [1-4]; Munekage *et al.*, 2004). Erstens, der NAD(P)H-Plastochinon-Dehydrogenase Komplex (NDH) könnte die Elektronen direkt von Fd^- oder auch NADPH Elektronen zurück über den PQ-Pool auf Cyt b_6f übertragen (Abbildung 1.1 B [1-2]). Die Substrataffinität des NDH Komplexes zu NADH ist allerdings höher als zu NADPH (Casano *et al.*, 2000; Rumeau *et al.*, 2005). Zweitens, das Protein PGR5

(*protongradient regulation 5*) in Kooperation mit PGRL1 (*PGR5-like 1*) könnte als Elektronenüberträger von Fd⁻ oder der FNR auf den Cyt b₆f fungieren (Dal Corso *et al.*, 2008). Erst kürzlich konnten Iwai *et al.* (2010) nachweisen, dass sich PSI-LHCI-LHCII-FNR-Cyt b₆f-PGRL1 in *Chlamydomonas reinhardtii* zu einem Superkomplex formieren, welcher wahrscheinlich den CEF vermittelt (Abbildung 1.1 B [3-4]).

Physiologisch erhöht die Übertragung der Elektronen auf den PQ-Pool über den CEF die Ansäuerung des Thylakoidlumens und könnte, unter Bedingungen, in denen der LEF limitiert ist, zur ATP Synthese beitragen. Parallel hierzu wird über eine Verstärkung des q_E in Abhängigkeit des CEF diskutiert, da die *pgr5* Mutante aus *A. thaliana* in der Induktion des q_E gestört ist (Rumeau *et al.*, 2007; Miyake, 2010). Der CEF könnte als Mechanismus zur Anpassung der ATP/NADPH Verhältnisse fungieren, wenn die Abnahme der Reduktionsäquivalente aufgrund von Perturbationen im Stoffwechsel oder Lichtabsorption verändert wird. Wie groß die Beteiligung des CEF am Elektronentransport sein kann, wird seit langem diskutiert. Messungen in *Hordeum vulgare* unter HL und Trockenstress konnten einen Anteil von fast 30 % des CEF am PSI zeigen (Clark und Johnson, 2001), während Messungen unter physiologischen Bedingungen bei *Spinacia oleracea* dem CEF nur eine geringe, konstante Beteiligung am ET beimessen (Klughammer und Schreiber, 1994).

(3) Verringerung/Veränderung der Lichtabsorption

Änderungen in der Lichtintensität oder -qualität führen zu einer ungleichen Anregung der Photosysteme und somit zu einer Reduzierung der Effizienz durch z.B. Photoinhibition. Um diesem Prozess entgegen zu wirken, kommt es in den Thylakoiden zu *state transitions*, dem prominentesten Mechanismus der Kurzzeitantwort der Photosynthese auf veränderte Lichtbedingungen. Hierbei werden die PSII assoziierten Lichtsammelkomplexe (LHCII) an der Lhcb2 Proteinuntereinheit (*state 1*) phosphoryliert und dissoziieren von den PSII Zentren ab. Verantwortlich für die Phosphorylierung ist die chloroplastidäre Proteinkinase STN7 (Bonardi *et al.*, 2005; Bellafiore *et al.*, 2005). Die phosphorylierten LHCII wandern von den Granathylakoiden in Bereiche der Stromathylakoide und assoziieren mit PSI (*state 2*). Die für die Dephosphorylierung der LHCII verantwortliche Phosphatase (TAP38) wurde erst kürzlich identifiziert (Pibril *et al.*, 2010; Shapiguzov *et al.*, 2010). Diese Anpassungen laufen im Minutenzeitraum ab und werden sehr wahrscheinlich über den Reduktionsgrad des

Plastochinon Pools (PQ-Pool) reguliert, der in Abhängigkeit des eingestrahlt Lichts mehr oxidiert oder reduziert vorliegt (Allen *et al.*, 1981).

Auf extraplastidärer Ebene lässt sich im HL eine Chloroplastenbewegung an die lateralen Zellwände, die so genannte Lichtvermeidungsbewegung beobachten, während hingegen im LL die Chloroplasten nach dem Licht ausgerichtet werden um die maximale Photonenausbeute zu erreichen. Diese Bewegung wird über Blaulichtrezeptoren, welche mit der Zellmembran assoziiert sind, vermittelt (Sakamoto *et al.*, 2002). Neuere Studien von Suetsugu *et al.* (2009) konnten einen Zusammenhang mit der Lichtvermeidungsbewegung an kurzen Aktinfilamenten, vermittelt durch Kinesin ähnliche Motorproteine, KAC1 und KAC2, zeigen.

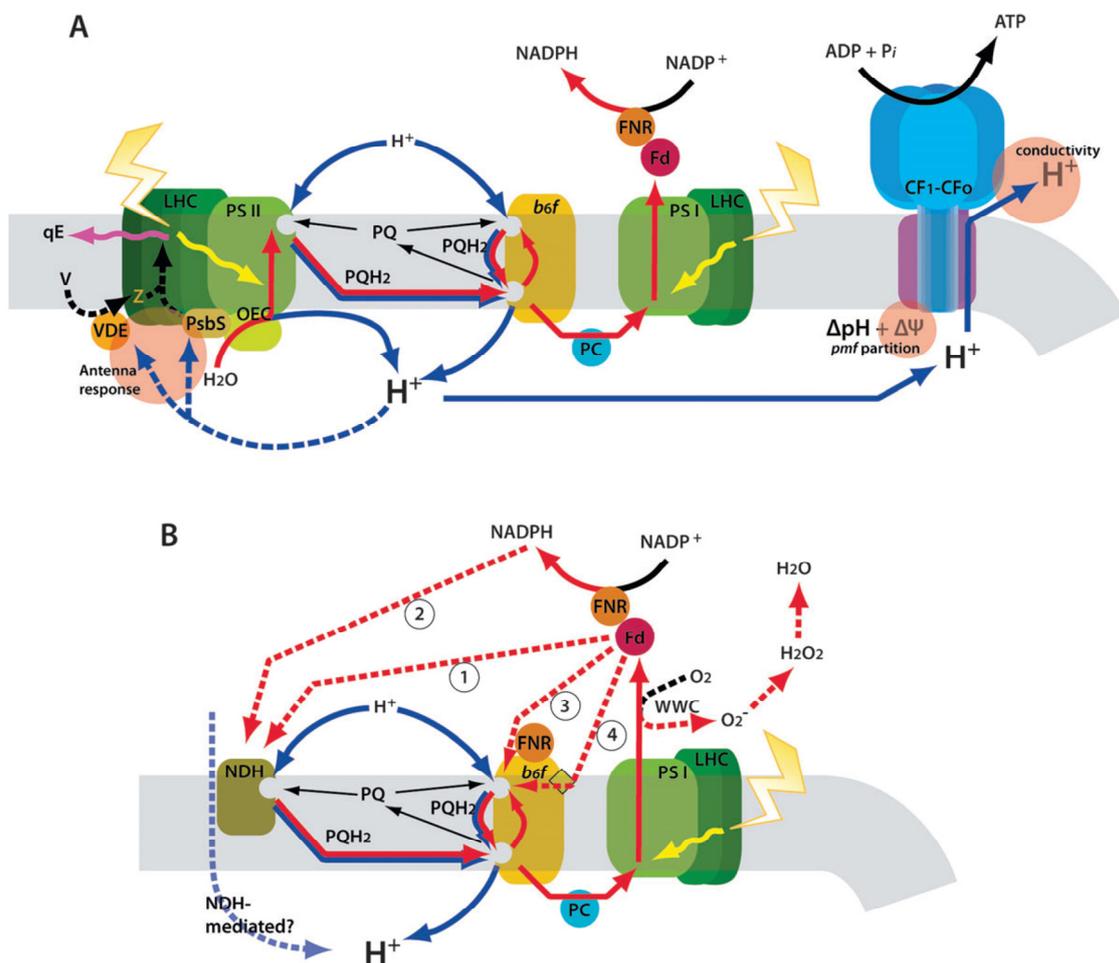


Abbildung 1.1 Übersicht über die Elektronentransportkette der Photosynthese. (A) Modell des linearen Elektronentransportes (LEF) im Zusammenhang mit dem Aufbau der Reduktionsäquivalente NADPH und ATP. (B) Modell des zyklischen Elektronentransportes (CEF) mit den putativ involvierten Komponenten. Blau: Transportwege der Protonen (H^+), Rot: Transportwege der Elektronen, Fd=Ferredoxin, FNR=Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase, NDH=NAD(P)H Dehydrogenase, CF₁-CF₀=ATP-Synthase, PC=Plastocyanin, VDE=Violaxanthin De-epoxidase, WWZ=Wasser-Wasser-Zyklus. (1-4) mögliche Wege des zyklischen Elektronentransport (modifiziert nach Cruz *et al.*, 2005).

1.3 AKKLIMATISIERUNG DER PHOTOSYNTHESE AN VERÄNDERTE LICHTBEDINGUNGEN

Die Langzeitanpassung umfasst den spezifischen Auf- und Abbau von Photosynthese-assoziierten Komponenten durch *de novo* Synthese zum Umbau der Photosynthesemaschinerie. Diese Prozesse bedingen eine Veränderung der Transkription und Translation von kernkodierten und plastomkodierten Genen. Der Umbau der Photosynthese-assoziierten Komponenten zur Optimierung der Lichtabsorption ist ein Mechanismus der unter dem Begriff „Akklimatisierung“ zusammengefasst werden kann.

(1) Stöchiometrische Änderungen der Photosynthese-assoziierten Komponenten

Die Akklimatisierungsprozesse der Photosynthese und des Chloroplasten selbst wurden bereits eingehend beschrieben. Die Beobachtung, dass ein Anstieg der Chl *a/b* Verhältnisse mit steigenden Lichtintensitäten korreliert, geht auf die Größenabnahme der LHCII zurück (Leong und Anderson 1984a). Unter LL Bedingungen angezogene Pflanzen besitzen wenige PSII Reaktionszentren mit großen Antennen, die das Licht effizient absorbieren und der Photochemie zuleiten. Im Gegensatz dazu wird die Anzahl der PSII Reaktionszentren im HL erhöht, welche jedoch mit kleinen Antennen ausgestattet sind (Bailey *et al.*, 2001). Diese stöchiometrische Änderung der Antennen im Licht wird über Regulierung der Lhcb Proteine transkriptionell gesteuert. Im HL konnte eine gesteigerte Abundanz des Cyt b_6/f Komplex und der RubisCO (Leong und Anderson 1984b; Seemann *et al.*, 1987) sowie eine gesteigerte Aktivität der thylakoidalen ATPase, beobachtet werden (Leong und Anderson, 1984b). Auch die absoluten Gehalte an PSI sind im LL gegenüber Anzuchten im HL verdoppelt. Die Gehalte der LHC Proteine des PSI bleiben jedoch konstant (Bailey *et al.*, 2001).

Die stöchiometrischen Änderungen wirken sich konkret auf die Ultrastruktur der Chloroplasten aus. Während in den Chloroplasten LL-akklimatisierter Pflanzen eine stärkere Stapelung der Granathylakoide und eine geringe Anzahl der Plastoglobuli zu beobachten ist, kann im HL eine deutliche Abnahme der Stapelung parallel mit einer Zunahme der Plastoglobuli beobachtet werden (Lichtenthaler *et al.*, 1982; Allen und Forsberg, 2001).

(2) Anpassung der protektiven Mechanismen

Logan *et al.* (1998) zeigten, dass die Produktion von H_2O_2 und O_2^- mit steigenden PFDs ebenfalls zu einer Erhöhung der Proteingehalte von den detoxifizierenden Enzymen SOD und APX führen. Auch die Größe des Xanthophyll-Pools kann durch eine gesteigerte Biosynthese

mit steigenden PFDs zunehmen und somit die Kapazität für die Photoprotektion erhöhen (Bailey *et al.*, 2004; Forster *et al.* 2009).

Häufig wird dem CEF eine protektive Funktion zugeschrieben und es konnte gezeigt werden, dass unter Stressbedingungen wie z.B. HL die Aktivität gesteigert wird (Dal Corso *et al.*, 2008). Es sind allerdings wenige Studien bekannt, die eine Induktion der CEF assoziierten Komponenten im Zusammenhang mit der Akklimatisierung zeigen. Bei Hitze- und Trockenstress konnte jedoch eine gesteigerte Expression bzw. Aktivität der PGR5 bzw. NDH-Untereinheiten gezeigt werden (Johnson, 2010).

Physiologisch führt der stöchiometrische Umbau, auch unter extremen Bedingungen, zu einer hohen Quantenausbeute und Photosyntheseeffizienz. Die Perzeption und Signalweiterleitung zur Veränderung der Stöchiometrie ist im Detail noch nicht verstanden. Untersuchungen von Photorezeptormutanten durch Walters *et al.* (1999) zeigten, dass dieser Mechanismus nicht entscheidend für die Akklimatisierung der Photosynthese an die Lichtbedingungen ist. Die untersuchten Mutanten waren in der Lage, den stöchiometrischen Umbau der Photosynthese bei den jeweiligen Lichtbedingungen zu induzieren. Heute wird im Allgemeinen angenommen, dass die Kontrolle des Umbaus auf einem selbst-regulatorischen *feedback* System basiert. Dies beinhaltet die Perzeption von Ungleichgewichten in der Photosynthese durch veränderte Lichtabsorption anhand des Reduktionsgrads der ETK bzw. des PQ-Pools. Mithilfe von Inhibitorstudien, welche die Reduktion bzw. Re-Oxidation des PQ-Pools verhindern ([3-(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff] [DCMU] bzw. 2,5-Dibromo-6-Methyl-3-Isopropyl-1,4-Benzochinon [DBMIB]), wurde gezeigt, dass die Expression Photosynthese-assoziiierter Gene an den Reduktionsgrad des PQ-Pools gekoppelt ist (La Roche *et al.*, 1995; Escoubas *et al.*, 1995; Tullberg *et al.*, 2000). Pesaresi *et al.* (2009) fanden Hinweise, dass diese Perzeption des Reduktionsgrads an die Aktivität der STN7 Kinase gekoppelt ist. Ähnliche Ergebnisse erhielt man, wenn mit verschiedenen Lichtqualitäten gearbeitet wurde, die bevorzugt PSII bzw. PSI anregen (Pfannschmidt *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass durch den Reduktionsgrad der ETK Signale generiert werden, welche den aktuellen physiologischen Status der Photosynthese dem Zytosol übermitteln. Das Signal, welches die Information überträgt, konnte allerdings bislang nicht identifiziert werden.

1.4 RETROGRADE SIGNALE

Chloroplasten evolvierten aus freilebenden prokaryotischen Organismen, die über die Endosymbiose in die eukaryotische Zelle aufgenommen wurden. Während der Evolution der höheren Landpflanzen wurden die meisten Gene des plastidären Genoms (Plastom) in das Genom des eukaryotischen Wirtes transferiert (horizontaler Gentransfer). Schätzungsweise werden über 95 % der über 3000 für die Funktionalität benötigten plastidären Proteine im Zytosol translatiert und in den Plastid importiert (Keeling und Palmer, 2008). So kodiert das *A. thaliana* Plastom nur noch für 87 Proteine, welche für den Photosyntheseapparat und Metabolismus, sowie für die Transkription und Translation essentiell sind (Sato *et al.*, 1999).

Die lokale Trennung der Genome macht eine enge Koordination der Regulation zwischen Wirt und Symbiont unabdingbar. Nicht nur während der Differenzierung und Entwicklung der Plastiden und der Pflanzengewebe, sondern auch bei ausdifferenzierten Zelltypen muss eine stete Kommunikation über den Status bestehen. Die Genexpression des Plastiden ist integriert in das eukaryotische Regulationssystem, denn viele RNA-Bindeproteine, involviert in die chloroplastidäre Genexpression, sind kernkodiert. Diese umfassen z.B. Pentatricopeptid Repeat Proteine (PPR, Schmitz-Linneweber und Small, 2008), RNA-Polymerase Sigma-Faktoren (Tanaka *et al.*, 1997) oder auch RNA *splicing* Faktoren (Kroeger *et al.*, 2009). Die postulierten Kommunikationssignale vom Chloroplast zum Kern, die dort die Genexpression an veränderte Bedingungen anpasst, werden als retrograde, die Antwort des Kerns hingegen als anterograde Signale bezeichnet. Die chemische Natur dieser Signale ist unbekannt. Jedoch werden derzeit fünf unabhängige plastidengenerierte Signalklassen, abhängig vom Ort der Entstehung, definiert: (1) Tetrapyrrolbiosynthese, (2) Redox Prozesse in der Photosynthese, (3) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und ROS-assoziierte Prozesse, (4) Plastidäre Genexpression, (5) Metabolische Signale oder Flüsse (Pfannschmidt, 2010). Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

(1) Tetrapyrrolbiosynthese

Eine der detailliertesten Studien über retrograde Signale entwickelte sich mit der Entdeckung der *genome uncoupled* Mutanten (*gun1-5*), die auch bei starker Photoinhibition verursacht durch Norflurazonbehandlung (NF) keine Reprimierung der *Lhcb1* Expression zeigten (Susek *et al.*, 1993). NF inhibiert die Phytyl-Desaturase und daher den Aufbau der Carotinoide.

Interessanterweise sind die betroffenen Gene der Mutanten (*GUN2-5*) in die Chlorophyllbiosynthese involviert. Strand *et al.* (2003) postulierten, dass die Akkumulation der Chlorophyllvorstufe, MgProtoporphyrin IX, für die Reprimierung der *Lhcb1* Expression notwendig ist. Diese Theorie wurde durch Mochizuki *et al.* und Moulin *et al.* (2008) widerlegt, die keine Korrelation zwischen *Lhcb1* Transkription und MgProtoIX Akkumulation feststellen konnten. In Widerspruch zu den von Strand *et al.* (2003) publizierten Daten zeigten sie, dass die MgProtoIX Gehalte im Wildtyp (WT) bei NF Behandlung stark absanken. Es wird angenommen, dass der metabolische Fluss oder aber die Enzymaktivität in der Chlorophyllbiosynthese selbst eine entscheidende Rolle spielt.

(2) Redox Prozesse in der Photosynthese

Durch Modulation des Reduktionsgrads der ETK, vornehmlich durch Inhibitoren wie DCMU oder Licht verschiedener spektraler Qualität, zeigte sich ein Zusammenhang zu der Transkription kernkodierter Gene. So konnte eine vollständige Oxidation des PQ-Pools durch DCMU Behandlung, die HL-abhängige Induktion bestimmter Gene verhindern (Escoubas *et al.*, 1995; Pfannschmidt *et al.*, 2001). Eine vollständige Reduktion des PQ-Pools durch Applizierung von DBMIB Behandlung führte hingegen zu einer Induktion HL-abhängiger Gene (Karpinski *et al.*, 1999). Eine der detailliertesten Studien zur transkriptionellen Kontrolle kernkodierter Gene als Antwort auf einen veränderten Reduktionsgrad der ETK stammt von Fey *et al.* (2005). Hier wurden in einem Macroarray-Ansatz 286 Gene identifiziert, deren Transkription direkt abhängig vom Reduktionsgrad der ETK waren. Es wurden, interessanterweise, nur sehr wenige Gene gefunden, die mit der Photosynthese assoziiert sind. Bei dem überwiegenden Teil der Gene handelte es sich um solche, die in den Stoffwechsel eingebunden sind.

(3) ROS und ROS assoziierte Prozesse

Die photosynthetischen Reaktionen können zu der Formierung von ROS, hauptsächlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff (1O_2), insbesondere unter hohen Lichtintensitäten führen (Abschnitt 1.2). Im Zusammenhang mit der ROS Entstehung konnte durch Karpinski *et al.* (1999) eine Induktion von kernkodierten Genen beobachtet werden, welche in die Detoxifizierung von ROS involviert waren. Die H_2O_2 Akkumulation korrelierte positiv mit der Induktion der Ascorbatperoxidase (APX2). Allerdings bestehen Zweifel, ob H_2O_2 und 1O_2 tatsächlich direkt als Signalmoleküle wirken können. Denn 1O_2 ist hoch reaktiv und

reagiert daher sehr schnell mit plastidären Komponenten (Krieger-Liszkay, 2005). Daher scheidet es als Signalvermittler über die Distanz vom Plastid zum Kern aus (Kleine *et al.*, 2009). Die H₂O₂ Entstehung ist kein Photosynthese-spezifischer Prozess, sondern H₂O₂ kann auch bei anderen Stoffwechselfvorgängen, z.B. in den Peroxisomen, gebildet werden.

(4) Plastidäre Genexpression

Die Inhibierung der chloroplastidären Transkription oder auch der Proteinbiosynthese unter Verwendung verschiedener Antibiotika, stellte einen Zusammenhang mit der nukleären Genexpression her. In den *constitutive photomorphogenic* Mutanten (*cop1-4*) kommt es auch im Dunkeln zu einer normalerweise lichtabhängigen Expression der *Lhcb1* Gene. Bei Inhibierung der plastidären Proteinbiosynthese durch Lincomycin wurde die Expression hingegen reprimiert. Diese postulierte Regulation findet allerdings nur in der frühen Keimungsentwicklung statt (Oelmüller, 1986). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch mithilfe der *gun1* Mutante (chloroplastidär lokalisiertes PPR) hergestellt werden. Während im WT bei Lincomycinbehandlung die Akkumulation der *Lhcb1* und *RbcS* (RubisCO *small subunit*) Transkripte reduziert wurde, zeigte sich die *gun1* Mutante insensitiv gegenüber der Lincomycinbehandlung (Gray *et al.*, 2003). Möglicherweise konvergieren die Signalwege der chloroplastidären Genexpression und der Tetrapyrrolbiosynthese bei GUN1.

(5) Metabolische Signale oder Flüsse

Bis heute gibt es lediglich Indizien, die auf eine Rolle des Metabolismus in der retrograden Signalgebung hindeuten. So ist in einem vorwärtsgerichteten genetischen *screen* auf Veränderungen in der Akklimatisierung von Mutanten (*acclimation of photosynthesis to environment = ape*), eine Mutante mit einem Defekt im chloroplastidären Triosephosphat/Phosphat Translokator (TPT, Abschnitt 1.5) aufgefallen (Walters *et al.*, 2003, Walters *et al.*, 2004). Die *tpt-1* Mutante zeigte eine reduzierte Photosyntheseeffizienz nach Transfer von LL ins HL.

Zusätzliche Hinweise auf eine Beteiligung des Stoffwechsels an der retrograden Signalgebung konnten durch die Beobachtung gewonnen werden, dass die Akkumulation von Glukose (Glc) oder Saccharose (Suc) Photosynthese-assoziierte Gentranskripte reprimieren (Rolland *et al.*, 2006).

1.5 ZENTRALE METABOLISCHE STOFFWECHSELWEGE DER PHOTOSYNTHESE

Die Produktion von NADPH und ATP in der Photosynthese muss in einem streng stöchiometrischen Verhältnis stehen und dem Bedarf der an sie gekoppelten Reaktionen im nachgeschalteten Stoffwechsel angepasst sein. Photoinhibition durch Schädigung am PSII bei hohen Lichtintensitäten senkt die Photosyntheseeffizienz, reduziert dadurch die Produktion von NADPH und ATP und führt folglich zu Limitationen im Stoffwechsel (*feed forward* Kontrolle durch Licht). Im Gegenzug muss der Stoffwechsel an die Produktion von NADPH und ATP angepasst werden können. Denn eine Diskrepanz zwischen Produktion und Abnahme der Reduktionsäquivalente und ATP würde zu einem „Rückstau“ an der Photosynthesemaschinerie und somit zu einer Störung der ETK führen (*feedback* Kontrolle durch den Metabolismus; Cruz *et al.*, 2005). Die Abnahme von NADPH und ATP erfolgt primär im Calvin-Zyklus (reduktiver Pentosephosphatzyklus). Befindet sich der Calvin-Zyklus im Fließgleichgewicht, werden $\frac{2}{3}$ des aus der Reduktion hervorgehenden Glyzerinaldehyd-3-Phosphates (GAP) in den regenerativen Prozess eingeschleust, während $\frac{1}{3}$ in den weiteren Stoffwechsel einfließen. Primär sind dies die Stärke- und Saccharosebiosynthese.

Die transitorische Stärke dient als Kohlenhydratspeicher und wird am Tag während der Lichtphase im Chloroplasten aufgebaut und in der Dunkelperiode fast vollständig aufgebraucht (Smith *et al.*, 2005). Der Aufbau der transitorischen Stärke im Chloroplasten erfolgt über Fruktose-6-Phosphat (Fru6P), einem Intermediat des Calvin-Zyklus, welches über das Enzym Phosphoglucoseisomerase (PGI) in Glukose-6-Phosphat (Glc6P) umgesetzt wird. Diese Reaktion steht im Gleichgewicht mit der Folgereaktion zu Glukose-1-Phosphat (Glc1P), vermittelt über das Enzym Phosphoglukomutase (PGM). Unter Verbrauch von ATP wird im Folgenden durch die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase (AGPase) Glc6P zu ADP-Glukose (ADP-Glc) adenyliert, welches als direktes Substrat der löslichen und Granula-gebundenen Stärke Synthasen (SS und GBSS) auf ein nicht reduzierendes Ende einer α -1,4- verknüpften Glukankette übertragen wird (Smith *et al.*, 1997). Die AGPase als Schlüsselenzym der Stärkebiosynthese (Ballicora *et al.*, 2004) besteht aus einer regulatorischen und katalytischen Untereinheit (ADG1 bzw. ADG2). Im Stroma der Chloroplasten lokalisiert bildet es ein Heterotetramer, welches über 3-PGA allosterisch aktiviert und durch anorganisches P_i inhibiert wird (Smith *et al.*, 1997). Des Weiteren konnte durch Arbeiten von Hendriks *et al.*

(2003) eine post-translationale redoxabhängige Aktivierung der AGPase gezeigt werden. Diese Aktivierung hängt möglicherweise mit der NADP-Thioredoxin Reduktase C (NTRC) zusammen, von der angenommen wird, dass sie den Aktivierungszustand in Abhängigkeit vom Licht und/oder Saccharose reguliert (Michalska *et al.*, 2009). Da transitorische Stärke den Energiespeicher in der Dunkelperiode darstellt, zeigen *A. thaliana* Mutanten mit Defekten in der AGPase (*adg1*) oder weiter stromaufwärts liegender Prozesse (*pgm1*, *pgi1*) besonders unter Kurztagbedingungen eine Wachstumsretardierung (Kofler *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Kunz *et al.*, 2010). Der Verlust der Stärkebiosynthese ist jedoch nicht letal für die Pflanzen. Offenbar kann der Stoffwechsel auf anderen Wegen in der Nacht die notwendige Energie bereitstellen. Es wurde postuliert, dass der Fettsäurestoffwechsel über die β -Oxidation eine Schlüsselrolle in der Energiebereitstellung in Pflanzen mit Defekten in der Stärkebiosynthese übernehmen kann (Kunz *et al.*, 2009).

In der Dunkelperiode erfolgt der Abbau der Stärke; dieser wird reguliert durch die Phosphorylierung des Amylopektins durch die Enzyme Glukan-Wasser-Dikinase (GWD) und Phosphoglukan-Wasser-Dikinase (PWD; Kötting *et al.*, 2005). *A. thaliana* Mutanten mit Defekt in der GWD (*sex1 = starch excess 1*) akkumulieren hohe Mengen an Stärke im Chloroplasten (Yu *et al.*, 2001). Die Endprodukte des Stärkeabbaus, Maltose (Mal) sowie Glc fließen in die Saccharosebiosynthese im Zytosol oder in die Glykolyse ein (Weise *et al.*, 2004; Zeeman *et al.*, 2007). Über den in der inneren Hüllmembran lokalisierten Maltoseexporter MEX1 (*maltose excess 1*) wird Mal ins Zytosol transportiert (Niittylä *et al.*, 2004) und dort vermutlich über eine Transglukosidase (DPE2; *disproportionating (iso)enzyme 2*) in den Stoffwechsel eingeschleust (Chia *et al.*, 2004; Lu und Sharkey, 2004). Glukose wird über einen Glukosetransporter (GlcT) ins Zytosol transportiert (Weber *et al.*, 2000) und dort vermutlich direkt durch eine an der äußeren Hüllmembran verankerte Hexokinase zu Glc6P phosphoryliert und der Saccharosebiosynthese zugeführt. Im Gegensatz zu den Mutanten mit Defekten in der Stärkebiosynthese, die unter Langtagbedingungen keine gravierenden Phänotypen aufzeigen, ist die *mex1-1* Mutante chlorotisch und wachstumsretardiert (Lu *et al.*, 2006). Dies geht auf eine Akkumulation der Stärkeabbauprodukte Maltose im Chloroplasten zurück, die in der Dunkelperiode über das 40-fache vom WT steigen kann und offenbar zu schwerwiegenden Störungen führt (Stettler *et al.*, 2009).

Saccharose ist der Haupttransportzucker und wird vom Ort der Synthese, dem *source* Gewebe, zu heterotrophen Organen der Pflanze, den *sink* Geweben, über das Phloem transportiert. Im Licht werden die im Calvin-Zyklus synthetisierten Triosephosphate (TP) über den Triosephosphat/Phosphat Translokator (TPT) im Austausch gegen P_a ins Zytosol geschleust (Flügge *et al.*, 1989; Flügge, 1999). Alternativ können die TP auch im Gegenaustausch mit 3-Phosphoglyzerinsäure (3-PGA) exportiert werden. Die TP können im Zytosol durch die NAD-Glyzerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (NAD-GAPDH) zu NADH und 3-PGA oxidiert werden, welches zum Import erneut zur Verfügung steht. Mithilfe dieses 3-PGA/TP Shuttles kann so Reduktionskraft aus dem Chloroplasten abgeführt werden (Flügge und Heldt, 1984). Im Zytosol werden aus zwei Molekülen TP durch das Enzym Aldolase ein Molekül Fruktose-1,6-bisphosphat (Fru1,6P) aufgebaut. Im Folgenden dephosphoryliert die Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) Fru1,6P zu Fruktose-6-Phosphat (Fru6P), welches über die zytosolischen Isoformen der PGM, und PGI in Glc1P umgesetzt wird. Durch die UDP-Glukosepyrophosphorylase (UGPase) wird Glc1P in UDP-Glukose (UDP-Glc) umgesetzt und zusammen mit einem Molekül Fru6P zu dem Disaccharid Saccharose-Phosphat durch die Saccharosephosphatsynthase (SPS) kondensiert. Während der Saccharosebiosynthese wird das gebundene Phosphat freigesetzt, welches wieder als Substrat für den TPT zu Verfügung steht. Somit ist der TP Export durch die Bereitstellung von P_a an die Saccharosebiosynthese gekoppelt. Des Weiteren wird der Umsatz von TP zu Fru6P im Zytosol über Fru2,6P reguliert, welches ein Inhibitor der FBPase darstellt (Stitt *et al.*, 1987). Im Dunkeln akkumulierendes Fru2,6P führt zu einer Abschaltung der FBPase Aktivität (Servaites *et al.*, 1989), daher können TP im Dunkeln nicht in die Saccharosebiosynthese einfließen.

Der TPT ist der Hauptexporter der Photoassimilate im Licht. Durch die Isolierung einer TPT Mutante (*tpt-1*) mit drastisch verminderter Transportaktivität auf etwa 10-20 % konnte gezeigt werden, dass der verminderte Export der TPs fast vollständig über den Fluss in die Stärkebiosynthese und Abbau im Licht kompensiert wurde (Schneider *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2004). Dies bestätigte die früheren Beobachtungen an *Nicotiana tabacum* Pflanzen, die ein *antisense* Konstrukt des *TPT* exprimierten (Häusler *et al.*, 1998; Häusler *et al.*, 2000a; Häusler *et al.*, 2000b). Durch Einkreuzung einer *A. thaliana* Mutante mit Funktionsverlust in der AGPase (*adg1-1*) wurde die zentrale Rolle des kompensatorischen Mechanismus offenbar. Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten waren stark chlorotisch und wachstumsretardiert.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Chloroplasten zeigten eine starke Erhöhung der Granathylakoide und eine Zunahme der Plastoglobuli (Häusler *et al.*, 2009). Des Weiteren wies die *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante eine deutliche Reduzierung in der Photosyntheseeffizienz auf (Schneider *et al.*, 2002), die durch eine substantielle Erhöhung der Grundfluoreszenz (F_0) verursacht wurde (Häusler *et al.*, 2009). Es wurde postuliert, dass dies auf einen erhöhten Anteil von reduziertem Q_A in diesen Doppelmutanten zurückging. Da angenommen wird, dass der Reduktionsgrad des PQ-Pools regulative Funktionen übernimmt, machen die physiologischen Eigenschaften der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante sie höchst interessant für Studien der retrograden Signalwege und Akklimatisierungsmechanismen im Zusammenhang mit dem Metabolismus.

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Akklimatisierung und die damit einhergehenden Charakteristika der Photosynthese an veränderte Lichtbedingungen beschränkten sich häufig auf die Beobachtungen des Akklimatisierungszustands, während die Prozesse wie Signalgebung und deren Mechanismen nicht ausreichend verstanden sind. Die Beteiligung des Kohlenhydratstoffwechsels an Akklimatisierungsprozessen, da eng mit der Photosynthese assoziiert, wurde immer wieder postuliert (Paul und Pellny, 2002; Kleine *et al.*, 2009). Aufgrund der starken Überschneidungen mit anderen Signalwegen und möglicherweise auch aufgrund der hohen Flexibilität des Kohlenhydratstoffwechsels konnten bis heute keine eindeutigen Hinweise für die Beteiligung des Stoffwechsels an der Akklimatisierung an veränderte Lichtbedingungen gefunden werden. Die durch Schneider *et al.* (2002) generierte *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante bot für solche Studien einen entscheidenden Vorteil. Die Mutante besitzt keine direkte Beeinträchtigung innerhalb der ETK oder der Photosynthese-assoziierten Komponenten und daher können Effekte der Akklimatisierung bzw. auf die Photosynthese direkt mit dem Kohlenhydratstoffwechsel in Verbindung gebracht werden.

Die generelle Überlebensfähigkeit dieser Doppelmutante wurde auf die Restaktivität des TPT zurückgeführt. Eine zweite *tpt* Mutante (*tpt-2*) mit einem vollständigen Funktionsverlust des TPT konnte aber inzwischen identifiziert werden (Diplomarbeit Henseler, 2003). Eine generierte *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante war jedoch überlebensfähig und offenbarte den gleichen Photosynthesephänotyp wie die Doppelmutante. Ziel dieser Arbeit war es daher den Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auf molekularer, biochemischer, sowie biophysikalischer Ebene in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten zu charakterisieren und aufzuklären. Mithilfe von Chlorophyll *a* Fluoreszenzmessungen und Proteinanalysen sollte damit begonnen werden, zunächst den Photosynthesephänotyp zu charakterisieren. In weiterführenden Experimenten sollte der Zusammenhang zwischen Akklimatisierung und Kohlenhydratstoffwechsel detaillierter betrachtet werden. Lichttransferexperimente sollten unter Berücksichtigung der globalen Genexpression Aufschlüsse über wichtige Faktoren der Akklimatisierung im Zusammenhang mit retrograden Signalen geben.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 PFLANZENLINIEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenlinien der Spezies *Arabidopsis thaliana* befinden sich in folgenden genetischen Hintergründen. Als Wildtyp (WT) diente *A. thaliana* L. Heynh. cv. Columbia (Col-0), cv. Wassilewskija (WS-2), sowie cv. Landsberg erecta.

Mutante	AGI	Ökotyp	Mutagenese	Resistenz	Publiziert von
<i>adg1-1</i>	AT5G48300	Col-0	EMS	-	Lin <i>et al.</i> , 1988
<i>gpt2-1</i>	AT1G61800	Col-0	T-DNA	Sulf	Niewiadomski <i>et al.</i> , 2005
<i>mex1-2</i>	AT5G17520	Col-0	EMS	-	Niittylä <i>et al.</i> , 2004
<i>pgi1-1</i>	AT4G24620	Col-0	EMS	-	Yu <i>et al.</i> , 2000
<i>pgm1</i>	AT5G51820	<i>Ler</i>	AC/DS	Hyg/Strep	Kofler <i>et al.</i> , 2010
<i>sex1-3</i>	AT1G10760	Col-0	EMS	-	Yu <i>et al.</i> , 2001
<i>tpt-2</i>	AT5G46110	Col-0	T-DNA	Kan	(SALK_03707)
<i>dpa1</i>	AT4G04640	WS-2	EMS	-	Dal Bosco <i>et al.</i> , 2004

2.2 PRIMER

Alle hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) geliefert. Primer, welche das Kürzel RL tragen sind spezifisch für die qPCR (Abschnitt 2.6.6) entworfen worden.

Name	Sequenz 5'-3'
RL_LhcbI fwd	TTC CCT GGA GAC TAC GGA TG
RL_LhcbI rev	CCC ACC TGC TGT GGA TAA CT
RL_GAPDH-3' fwd	TTG GTG ACA ACA GGT CAA GCA
RL_GAPDH-3' rev	AAA CTT GTC GCT CAA TGC AAT C
RL_GAPDH-5' fwd	TCT CGA TCT CAA TTT CGC AAA A
RL_GAPDH-5' rev	CGA AAC CGT TGA TTC CGA TTC
g_ <i>tpt-2</i> fwd	GTA ACT TAC GAG TAA ACT GGC TAC
g_ <i>tpt-2</i> rev	TGA CTA GCC ATG GAT ACT TGG CGA GGA

Name	Sequenz 5'-3'
TPT fwd	TGC TCT CAC TAT CAA AAC TCT GAA
TPT rev	TGA CAG ACT GCG ACT GGT ATC AA
2 TPT fwd	CGA TCA ACG GAG GAG AGA AA
2 TPT rev	GAT ACT TGG CGA GGA ATC CA
g_gpt-2 fwd	GTC GGA CCA AAC TTT GTC TGG T
g_gpt-2 rev	GGT CTG ATC AAG AAA TGA CAC TGA
Salk_LB	GTC CGC AAT GTG TTA TTA AGT TGT C
GB_LB	ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC
RL_gpt-2 fwd	TGC CCT CGG TGC TGC CAT TG
RL_gpt-2 rev	CCT CAC TGC TTC GCC TGT GAG T
RL_Actin fwd	CTT GCA CCA AGC AGC ATG AA
RL_Actin rev	CCG ATC CAG ACA CTG TAC TTC CTT
RL_UBC fwd	CTG CGA CTC AGG GAA TCT TCT AA
RL_UBC rev	TTG TGC CAT TGA ATT GAA CCC
35S_fwd	GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AG
dpa1_fwd	CAG TCG AAT CTT GAT GAC CGT CGA TGA TG
dpa1_rev	GTT CGT CGA GAA TCA GAG TGG CTC

2.3 CHEMIKALIEN UND ENZYME

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden bei folgenden Herstellern bezogen:

Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biorad (Hercules, Kalifornien), Difco (Hamburg), Duchefa (Haarlem, Niederlande), GE Healthcare (Piscataway, New Jersey), Hartmann (Heidenheim), Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien), Merk (Darmstadt), Millipore (Billerica, Massachusetts), Quiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri), Whatman (Maidstone, England).

Enzyme für die quantitative Metabolitanalyse im gekoppelten enzymatischen Test wurden von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

2.4 SOFTWARE UND DATENBANKEN

Für die Aufnahmen und Analysen der photosynthetischen Parameter (Abschnitt 2.8) wurden wie Programme *DualPAM*, *ImagingWin* sowie *PAMwin* der Firma Walz (Effeltrich) eingesetzt.

Bildaufnahmen zur Bestimmung der Blattflächen oder Bandenintensitäten wurde mit den Programmen *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) sowie *Photoshop CS* (Adobe Systems, San José, Kalifornien) analysiert.

Zur statistischen Auswertung der Microarrays (Abschnitt 2.10) wurden folgenden Programme verwendet: *Robin* (Lohse *et al.*, 2010), *FIRE* (Elemento *et al.*, 2007). Die Kandidatengene wurden manuell in *Access* (Microsoft, Redmond, Washington) gefiltert und mit folgenden Datenbanken abgeglichen: *Aramemnon* (Schwacke *et al.*, 2003), *AtSubP* (Kaundal *et al.*, 2010), *NCBI* (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland), *Tair* (Swarbreck *et al.*, 2008).

Die Chromatogramme der HPLC wurden mithilfe des Programmes *Chromeleon* (Dionex, Sunnyvale, Kalifornien) ausgewertet.

Für die Auswertung der massenspektrometrischen Proteinanalyse wurde die Datenbank *Mascot* (Matrixscience, Perkins *et al.*, 1999) verwendet.

2.5 ANZUCHTBEDINGUNGEN VON *A. THALIANA*

2.5.1 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

Samen der verschiedenen Pflanzenlinien wurden auf einem Gemisch von Einheitserde (Gebr. Patzer GmbH, Sinnatal-Jossa) und Vermiculit (3:1) ausgesät und für 48 h bei 4 °C stratifiziert. Nach etwa zehn Tagen erfolgte die Vereinzelung der Keimlinge auf oben genanntem Substrat.

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in einer Phytokammer (Percival Scientific, Perry, Iowa) bei 40-60 % relativer Luftfeuchte, einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h sowie bei einer Temperatur bei 22/20 °C. Je nach Versuchsaufbau wurden die Pflanzen von Beginn der Keimung bei einer Photonenflussdichte (PFD) von $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL = Hochlicht) bei

30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LL = Schwachlicht) angezogen. Als Lichtquellen dienten kalt-weiß Neonröhren (*Lumilux*, 18W/840, Osram, München). Die Bewässerung erfolgte alle vier bis fünf Tage mit Leitungswasser. Für sämtliche Experimente wurden 24-28 Tage alte Pflanzenrosetten ohne Keimblätter verwendet, die sich im Entwicklungsstadium noch vor der Blühinduktion befanden.

Zur Samengewinnung wurden die Pflanzen im Gewächshaus bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bis zum Abschluss des Reproduktionszyklus angezogen. Die Schädlingsbekämpfung erfolgte wöchentlich mit Nematoden (Sautter und Stepper, Ammerbuch) gegen einen Befall mit Trauermückenlarven. Bei Befall mit Blattläusen wurden die Pflanzen entweder mit 25 % Confidor-Emulsion (Bayer CropScience, Langenfeld) behandelt oder es wurden Florfliegenlarven (Sautter und Stepper, Ammerbuch) ausgebracht.

2.5.2 Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur

Anzuchten, bei denen den Pflanzen verschiedene Stoffe, wie Antibiotika oder Zucker, kontrolliert zugefüttert werden sollten, erfolgten auf MS-Agar (Murashige und Skoog, 1962). Zur Sterilisation wurden alle Medien bei 121 °C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert.

Vor der Aussaat wurden die Samen einer trockenen Oberflächensterilisation durch Chlorgas unterzogen. Hierbei wurden kleine Aliquots der Samen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und zusammen mit einem Becherglas mit 100 ml 13 % Na-Hypochloritlösung in einen Exsikkator gegeben. Die Reaktion zur Entwicklung des Chlorgases wurde durch Zugabe von 3 ml 37 % HCl zur Na-Hypochloritlösung gestartet. Nach 4 h Chlorgas-Behandlung wurden die Samen entnommen und konnten nach einer 20 min Abdampfphase direkt auf die jeweiligen MS-Agar Platten ausgebracht werden. Die Platten wurden mit luftdurchlässigem Vliesklebeband (*Omnipor*, Hartmann) verschlossen. Nach der Stratifizierung bei 4 °C für 48 h wurden die Pflanzen unter den gewünschten Lichtbedingungen (Abschnitt 2.5) in einer Phytokammer angezogen.

Bei Zuckerfütterungsexperimenten wurden die Pflanzen in Abständen von etwa sieben bis zehn Tagen auf frisches MS-Medium umgesetzt.

Standard MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)

0,23 % (w/v)	MS-Salze
0,7 % (w/v)	Phytoagar mit KOH einstellen auf pH 5,8

2.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.6.1 Genomische DNA-Isolierung aus *A. thaliana*

(modifiziert nach Berendzen *et al.*, 2005)

Zur Genotypisierung von Pflanzenlinien mithilfe der PCR wurde zunächst in einer Schnellpräparation genomische DNA (gDNA) isoliert. Hierzu wurde ein kleines Blattfragment von etwa 0,5 cm² mit 2-3 Glasperlen in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 300 µl M-Puffer wurden die Proben zum Zellaufschluss in einem Zelldisruptor (*TissueLyser*, Quiagen) bei 30 Hz für 2 min homogenisiert und anschließend zentrifugiert (20000 g, 2 min, RT). Von dem gDNA enthaltenden Überstand wurden 100 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Es wurde 1 µl der gDNA Präparation für einen PCR-Ansatz als Matrize eingesetzt.

M-Puffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7,2)
300 mM	NaCl
10 % (w/v)	Saccharose

2.6.2 Polymerase Kettenreaktion

(Mullis, 1987)

Die Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“ = PCR) dient der Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten aus heterogenen Nukleinsäuregemischen. Hierbei wird zu Beginn eines jeden PCR-Zyklus eine DNA-Matrize bei 94 °C in ihre Einzelstränge denaturiert. Nach Absenkung der Temperatur wird die Anlagerung synthetischer komplementärer

Oligonukleotide (Primer) ermöglicht, die als Replikationsstartpunkte für die hitzestabile DNA-Polymerase dienen. Die Temperatur T_A („*annealing temperature*“), bei der die Primer hybridisieren, richtet sich hierbei nach der Länge der Primer und des Gehaltes der vier verschiedenen Basen. Die DNA-Polymerase bewirkt dann bei 72 °C, durch Kondensierung der im Ansatz enthaltenen Desoxynukleotide, für eine Amplifizierung der gewünschten DNA-Sequenz.

Als Standard verwendetes Reaktionsgemisch

10 % (v/v)	10 x PCR-Puffer
0,5 µM	„ <i>primer forward</i> “ (10 pmol / µl)
0,5 µM	„ <i>primer reverse</i> “ (10 pmol / µl)
0,1 mM	je dNTP
5 % (v/v)	gDNA
0,25 U	<i>Taq</i> -Polymerase (Promega, Mannheim)

Als Standard verwendetes PCR-Programm:

1.	94 °C	Denaturierung	180 s	} 32 Schleifen
2.	94 °C	Denaturierung	30 s	
3.	T_A °C	Primerhybridisierung	30 s	
4.	72 °C	Amplifikation	30 s / 500 bp	
5.	72 °C	Fertigstellung von unvollendeten Fragmenten	300 s	
6.	4° C	Ende und Lagerung	∞	

2.6.3 Agarosegelelektrophorese

(Sambrook und Russel, 2001)

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurde die Agarose mit 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Es wurden zusätzlich 0,05 % einer 1 % Ethidiumbromidlösung vor dem Polymerisieren hinzugegeben. Die Separation von DNA-Fragmenten erfolgte standardmäßig in 1 % (w/v) Agarosegelen. Bei größeren DNA-Fragmenten ab 3 kb wurden niederprozentigere Gele (0,6 % (w/v) Agarose) verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte anschließend bei

Stromstärken von 60-100 mA in 1x TAE-Puffer. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden im UV bei einer Wellenlänge von etwa 254 nm durch Fluoreszenz des Ethidiumbromids sichtbar gemacht.

Durch das Auftragen eines DNA-Größenstandards (1 kb) der Firma Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien) mit definierten DNA-Bandengrößen war eine Größenabschätzung der aufgetrennten Fragmente möglich.

TAE-Puffer (1x)

40 mM	Tris-HAc (pH 8,0)
1 mM	EDTA

2.6.4 RNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

(modifiziert nach Logemann *et al.*, 1987)

Das zur Untersuchung eingefrorene Pflanzenmaterial (100 mg) wurde unter flüssigem Stickstoff (N₂) pulverisiert und mit 600 µl Z6-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 500 µl PCI-Lösung (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) wurde der Extraktionsansatz gründlich durchmischt und nachfolgend zur Phasentrennung zentrifugiert (20000 g, 10 min, 4 °C). Die obere wässrige Phase wurde entnommen und mit 0,05 Volumen 1 N Essigsäure sowie 0,7 Vol. 100 % Ethanol (EtOH) versetzt um die darin befindliche RNA nachfolgend für eine Stunde auf Eis auszufällen. Nach Zentrifugation (20000 g, 10 min, 4 °C) wurde die sedimentierte RNA mit 500 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und anschließend mit 80 % EtOH gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in 30 µl reinem H₂O aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Z6-Puffer

8 M	Guanidinium-HCl
20 mM	MES
20 mM	EDTA (pH 7,0)
0,7 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

2.6.5 Quantitative und qualitative Bestimmung isolierter RNA

Der Gehalt der isolierten Gesamt-RNA wurde photospektrometrisch bei 260 nm unter Verwendung des Mikrovolumen-Spektrometers (*Nanodrop*, Thermo Scientific) bestimmt. Eine zusätzliche Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der RNA-Proben bei 260/230 nm sowie 260/280 nm gab Auskunft über den Reinheitsgrad und somit über die Qualität der RNA-Proben. Organische Kontaminationen absorbieren Licht von 230 nm während Proteine oder Phenol Licht von 280 nm absorbieren. Proben mit einem 260/230 Quotienten unter 1,8 enthalten deutliche Mengen von organischen Kontaminationen. Der 260/280 Quotient sollte für reine RNA bei etwa 2,0 liegen.

Die isolierte RNA wurde zudem auf einem Agarosegel zur Überprüfung der Intaktheit aufgetrennt (Abschnitt 2.6.3). Dazu wurden 1-2 µg RNA in Glyoxalpuffer (Lonza, Basel, Schweiz) im Verhältnis 1:1 für 30 min bei 65 °C denaturiert. Nach Abkühlen auf Eis konnte die RNA auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt werden.

2.6.6 Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qPCR)

Um die Abundanz verschiedener mRNAs („*messenger*“ RNA) bei verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, musste die RNA zunächst in cDNA („*complementary*“ DNA) umgeschrieben werden. Erst dann kann auf Basis einer PCR die relative Transkriptmenge bestimmt werden.

2.6.6.1 Reverse Transkription isolierter Gesamt-RNA

Es wurden zunächst in einem quantitativen DNA-Verdau alle eventuellen gDNA Kontaminationen in der Gesamt-RNA vollständig entfernt. Hier wurde das *DNA-free* Kit (Ambion, Huntingdon, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die reverse Transkription wurde die RNA-abhängige DNA-Polymerase *Bioscript* (Bioline, London, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Initiierung der Erststrangsynthese wurden OligodT Primer der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) hinzugefügt. Im Anschluss an die Synthese konnten die Proben bis zur qPCR bei -20 °C gelagert werden.

2.6.6.2 Relative Transkriptmengenbestimmung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-green

Die synthetisierte cDNA wurde in einer Standard-PCR (Abschnitt 2.6.2) mit 25-27 Schleifen und spezifischen Primern auf Qualität und Quantität überprüft. Im Anschluss wurde eine adäquate Menge cDNA für die qPCR-Reaktion eingesetzt. Es wurde der Prämix *SYBR Green PCR Master Mix* der Firma Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien) mit ausgewählten Primern nach Angaben des Herstellers mit einem *7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) verwendet. Der Prämix enthält das Fluorochrom „Syber Green I“, das bei unspezifischer Bindung an doppelsträngige DNA eine 1000-fache Fluoreszenzerhöhung erfährt und somit proportional zur DNA Menge mit einer Steigerung des Fluoreszenzsignals reagiert. „Syber green I“ wird bei 475-495 nm zur Fluoreszenz angeregt, dessen Emission bei 515-545 nm während der PCR in „Echtzeit“ detektiert wird. Abhängig von der eingesetzten Transkriptmenge steigt die Fluoreszenz der PCR-Probe in einem Zyklus, dem Schwellenwert-Zyklus (*threshold cycle = C_T*), erstmals signifikant über ihre Hintergrundfluoreszenz hinaus.

Als Referenz für gleichmäßig eingesetzte Transkriptmengen wurde ein endogenes Kontrollgen (*At5g25760 = UBC*, Czechowski *et al.*, 2005) verwendet. Die relative Transkription eines Gens einer Mutante im Vergleich zum Wildtyp (WT) wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T\text{ WT (Gen)}} - C_{T\text{ WT (UBC)}}) - (C_{T\text{ Mutante (Gen)}} - C_{T\text{ Mutante (UBC)}})$$

2.7 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.7.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus *A. thaliana*

(Laemmli, 1970)

Um die Abundanz spezifischer Photosynthese-assoziiierter Proteine nachzuweisen wurde zunächst eine Gesamt-Proteinextraktion aus *A. thaliana* mit 2x Laemmli-Probenpuffer vorgenommen. Etwa 100-200 mg Blattmaterial wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unter Verwendung eines vorgekühlten Bohrers wurden die Proben pulverisiert und nachfolgend mit 300-500 µl Probenpuffer (2x) versetzt. Nach gründlichem Vermischen wurden die Proben für 10 min bei 75 °C erhitzt, der Extrakt

wurde zentrifugiert (20000 *g*, 12 min, RT) und der Überstand mit dem durch SDS in Lösung gehaltenen Protein in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese Extraktionen können nach der Bestimmung der Proteinkonzentration direkt im SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt werden.

Laemmli-Probenpuffer (2x)

62,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
20 % (v/v)	Glyzerin
4 % (w/v)	SDS
100 mM	DTT
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

2.7.2 Proteinmengenbestimmung mit Amidoschwarz

(Schaffner und Weissmann, 1973)

Die Proteine in Lösung wurden in einem Methanol/Essigsäuregemisch in Anwesenheit des Azofarbstoffs Amidoschwarz ausgefällt, wobei sich der Farbstoff an die Proteine anlagert. Jeweils 5 µl des zu bestimmenden Proteinextrakts wurden mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und anschließend mit 400 µl Färbelösung versetzt. Nach Zentrifugation (20000 *g*, 12 min, RT) wurde das bläuliche Proteinsediment mit 1 ml Waschlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Proteinsediment wurde im Folgenden für 10 min getrocknet und in 1 ml 0,2 M NaOH aufgenommen. Die Extinktion der Proben wurde bei 615 nm gegen 0,2 M NaOH als Leerwert im Spektralphotometer bestimmt. Als Referenz diente eine Eichreihe von bekannten Konzentrationen Rinderserumalbumin (BSA) anhand derer die Proteinkonzentration des Pflanzenextraktes berechnet wurde.

Färbelösung

10 % (v/v)	Essigsäure
90 % (v/v)	Methanol
	+ Amidoschwarz

Waschlösung

10 % (v/v)	Essigsäure
90 % (v/v)	Methanol

2.7.3 Denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Die extrahierten und denaturierten Proteine wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Herstellen der Gele erfolgte mithilfe der *Minigel Apparatur System 2050 Midget* (Pharmacia, Freiburg).

Trenngele wurden vor der Polymerisierung mit 100 % Isopropanol überschichtet, welches vor dem Gießen des Sammelgels wieder vollständig entfernt wurde. Bei Gelen, welche für die Auftrennung der Proteinkomplexe in der zweiten Dimension aus der BlueNative Gelelektrophorese verwendet wurden, wurde das Sammelgel mit wassergesättigtem 100 % Isobutanol vor der Polymerisation überschichtet.

Die Proteinextrakte wurden bei 75 °C für 5 min erhitzt und abzentrifugiert (20000 g, 5 min, RT). Jede Tasche des Gels wurde mit gleicher Menge Protein (10 bzw. 5 µg) beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 10-25 mA pro Gel. Nach Eintritt der Proteine in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht. Die aufgetrennten Proteine wurden direkt zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung im Gel gefärbt (Abschnitt 2.7.4) oder für den immunologischen Nachweis spezifischer Proteine auf eine Membran transferiert (Abschnitt 2.7.5).

In der SDS-PAGE wurde der Größenstandard *Pageruler* (Fermentas, St. Leon-Roth) zur Proteingrößenbestimmung eingesetzt.

Laufpuffer (1x)

25 mM	Tris
192 mM	Glyzin
0,1 % (w/v)	SDS

Trenngel-Lösung

375 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
12,5 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,1 % (w/v)	SDS
0,02 % (w/v)	Ammoniumpersulfat (APS)
0,04 % (v/v)	TEMED

Sammelgel-Lösung

125 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
4 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
0,1 % (w/v)	SDS
0,01 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,01 % (v/v)	TEMED

2.7.4 Anfärbung von Proteinen im Gel mit kolloidalem Coomassie

(Kang *et al.*, 2002)

Die durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine wurden mithilfe des Farbstoffes Coomassie G250 sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel dreimal in H₂O für 10 min geschwenkt um das SDS zu entfernen. Im Anschluss wurde das Gel für mindestens 3 h oder über Nacht in der kolloidalen Coomassie-Lösung inkubiert. Zur Intensivierung der Färbung ist es empfehlenswert nochmals mit H₂O für 1 h zu entfärben. Diese Färbemethode erreicht eine Sensitivität von etwa 2 ng BSA/Bande und ist daher mit der Silberfärbung (Rabilloud *et al.*, 1988) vergleichbar.

kolloidales Coomassie

5 % (w/v)	Al ₂ (SO ₄) ₃ · 14-18 H ₂ O
10 % (v/v)	EtOH
0,02 % (w/v)	Coomassie G250
2 % (v/v)	ortho-Phosphorsäure

2.7.5 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

(Khyse-Andersen, 1984)

Proteinproben, die für den immunologischen Nachweis gesuchter Proteine bestimmt waren, wurden nach der Auftrennung durch SDS-PAGE direkt auf eine PVDF-Membran unter Verwendung einer Blotkammer (*Carboglass*, Schleicher und Schuell) transferiert. Die Herstellung der benötigten Anoden- sowie Kathodenpuffer (*Rotiblot-System*, Roth) und der Aufbau der Apparatur wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Aktivierung der PVDF-Membran (Biorad) wurde diese vor dem Aufbau für 2 min in 100 % Methanol

inkubiert. Der Transfer der Proteine erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von $1 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ Gelfläche.

2.7.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Proteinmembranen wurden nach dem Transfer zunächst in H_2O geschwenkt um alle Reste der verwendeten Puffer zu entfernen. Freie Membranbindungsstellen wurden durch 1 h Inkubation bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper unter ständigem Schütteln über Nacht bei 4°C . Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen Photosynthese-assoziierte Proteine wurden von der Firma Agrisera (Vännäs, Schweden) bezogen und nach den Angaben des Hersteller in Blockierlösung verdünnt. Unspezifische Bindungen des Antikörpers wurden nachfolgend durch zweimaliges Waschen in TBS-T und einmaliges Waschen in TBS für 10 min entfernt. Die Bindung des sekundären Antikörpers (Sigma, St. Louis, Missouri), der für die Detektionsreaktion mit der Peroxidase aus Meerrettich („*horseradish peroxidase*“ = HRP) gekoppelt ist, erfolgte in Blockierlösung für 1 h bei RT unter ständigem Schütteln. Hier wurden ebenfalls alle unspezifischen Bindungen durch das oben beschriebene Waschen entfernt.

Zur Detektion wurden $400 \mu\text{l}$ Substratlösung (*Pierce ECL*, Thermo Scientific) über die Membran gegeben. Die entstehende Chemilumineszenz wurde durch Auflegen eines Films (*CL-XPosure*, Thermo Scientific) oder mithilfe einer speziellen Kamera (*LASmini 4000*, Fujifilm) detektiert.

Alle Antikörperverdünnungen wurden mehrfach verwendet und zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

TBS (1x)

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl

TBS-T (1x)

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween 20

Blockierlösung

3 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (1x)

2.7.7 Immunologischer Nachweis von Proteinphosphorylierung

Um den Phosphorylierungsstatus bestimmter Photosynthese-assoziiierter Proteine nachzuweisen wurde ein spezifischer Phosphothreonin-Antikörper (Cell signaling, Beverly, Massachusetts) verwendet. Da das im Milchpulver enthaltene Casein zur Absättigung der Membran selbst stark phosphoryliert ist, wurden die Membranen daher mit BSA blockiert. Auch der Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers in Blockierlösung-P verdünnt.

Blockierlösung-P

3 % (w/v) BSA in TBS (1x)

2.7.8 Blaue native kontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (*Blue Native*)

(Schägger und Pfeifer, 2000)

2.7.8.1 Isolierung von Thylakoidmembranen aus *A. thaliana*

(Bassi *et al.*, 1985)

Für die Isolierung von Thylakoidmembranen wurden etwa 5 g Blattrosetten geerntet und in 100 ml eiskaltem T1-Puffer mithilfe eines Homogenisierers (*Ultra-Turrax*, Janke und Kunkel, Staufen) aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde durch vier Lagen Verbandsmull und eine Lage *Mira cloth* (Calbiochem, San Diego, Kalifornien) filtriert. Das Filtrat wurde abzentrifugiert (1400 g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die sedimentierten Chloroplasten in 100 ml eiskaltem T2-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurde erneut zentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand vollständig abgenommen. Das Membransediment wurde in einem adäquaten Volumen (100-700 µl) eiskaltem T3-Puffer vorsichtig mit einem Feinhaarpinsel resuspendiert, aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

T1-Puffer

400 mM	Sorbitol
100 mM	Tricin-KOH (pH 7,8)
10 mM	NaF
	+ Proteaseinhibitoren

T2-Puffer

25 mM	Hepes-KOH (pH 7,5)
10 mM	EDTA
10 mM	NaF
	+ Proteaseinhibitoren

T3-Puffer

10 mM	Hepes-KOH (pH 7,5)
1 mM	EDTA
10 mM	NaF
50 % (v/v)	Glyzerin
	+ Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitoren - Zusatz

0,2 % (v/v)	100 mM PMSF in Isopropanol
1 % (v/v)	100 mM Benzamidine in 20 mM Hepes-KOH (pH 7,5)
1 % (v/v)	500 mM ϵ -Aminocaprinsäure in H ₂ O

2.7.8.2 Native Solubilisierung und Auftrennung von Membranproteinkomplexen

Der Proteingehalt der nativ aufgereinigten Membranen wurde bestimmt (Abschnitt 2.7.2) und 250 μ g Protein für die Solubilisierung verwendet. Hierzu wurden die Membranen zweimal mit 300 μ l kaltem TMK-Puffer und einmal mit 100 μ l Solubilisierungs-Puffer gewaschen, zentrifugiert (2000 *g*, 2 min, 4 °C) und im Folgenden in 60 μ l Solubilisierungs-Puffer aufgenommen. Nach der Zugabe von 15 μ l 10 % Dodecylmaltosid (DDM) wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (20000 *g*, 15 min, 4 °C). Der grüne Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 10,7 μ l Proben-Additiv versetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (20000 *g*, 5 min, 4 °C) wurde die Probe direkt im Gel (*NativePAGE Novex 3-12 % Bis-Tris Gele 1,0 mm*, Invitrogen) aufgetrennt.

Die Auftrennung erfolgte bei 4 °C und 150-250 V in einem *XCell SureLock* Mini Gel-System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) nach Angaben des Herstellers mit 0,02 % (w/v) Coomassie G250 im Kathoden-Puffer.

TMK-Puffer

10 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
10 mM	MgCl ₂
20 mM	KCl
10 mM	NaF

Solubilisierungs-Puffer

25 % (v/v)	4x NativePage Sample Puffer (Invitrogen)
5 mM	NaF
750 mM	Aminocaprinsäure

Proben-Additiv

0,04 % (w/v)	Coomassie
750 mM	Aminocaprinsäure

2.7.8.3 Denaturierende Auftrennung der Superkomplexe in der zweiten Dimension

Die in der *Blue Native* Gelelektrophorese aufgetrennten Proben wurden in Streifen ausgeschnitten und in 20 ml SDS-Streifenpuffer für 30 min bei 95 °C inkubiert.

Die Streifen wurden auf vorbereitete 12,5 % SDS-Gele (Abschnitt 2.7.3) transferiert und mit 1 % (w/v) Agarose in SDS-Laufpuffer überschichtet. Nach der Auftrennung wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie angefärbt (Abschnitt 2.7.4) und die Proteinuntereinheiten nach Aro *et al.*, (2005) identifiziert.

SDS-Streifenpuffer

10 % (v/v)	Glyzerin
2 % (w/v)	SDS
12,5 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
50 mM	DTT

2.7.9 Massenspektrometrische Analyse

Die Proteinidentifizierung mithilfe der Massenspektrometrie (MS) wurde am Zentrum für Molekulare Medizin (ZMMK, Universität zu Köln) durchgeführt. Ausgestochene Proteinsuperkomplexe aus der BN-Page (Abschnitt 2.7.8) wurden tryptisch verdaut, in der *Nano-liquid* Chromatographie (Proxeon, Odense, Dänemark) aufgetrennt, ionisiert (Elektrospray-Ionisation, ESI) und die Peptide in der Tandem-MS (*HCT Ultra ETD II*, Bruker Daltonik, Bremen) detektiert und fragmentiert. Molekulare Massenspektren in Kombination mit entsprechenden Fragmentierungsspektren wurden für die Datenbanksuche durch Mascot (*Matrixscience*, Perkins *et al.*, 1999) gegen die NCBI Nr Datenbank (*A. thaliana*) verwendet. Dabei wurden folgende Suchparameter festgelegt: Signifikanz: ($p < 0.05$), Peptid und Fragment Massentoleranz: ± 0.3 Da, Enzyme: Trypsin/P, festgelegte Modifizierung: Carbamidomethyl, variable Modifikation: Oxidation.

2.8 BESTIMMUNG PHOTOSYNTHETISCHER PARAMETER

2.8.1 Messungen der PSII-Aktivität *in vivo*

(Schreiber *et al.*, 1986)

Die Änderungen der Chlorophyll *a* (Chl *a*) Fluoreszenz des PSII wurde mithilfe der Puls-Amplituden-Modulations Fluorometrie (PAM; *ImagingPAM* oder *PAM2100*, Walz, Effeltrich) gemessen. Die grundlegenden Größen der Fluoreszenz, wie Grundfluoreszenz (F_0), maximale Fluoreszenz (F_m) wurden an 20 min dunkeladaptierten Pflanzen bestimmt. Während Induktion der Photosynthese (Induktionskinetik = IC) wurde die maximale Fluoreszenzausbeute (F_m') sowie Fluoreszenz (F_t) durch Anwendung der Lichtsättigungspuls Methode bestimmt. Anhand dieser absoluten Werte wurden die maximale Quanteneffizienz von PSII ($F_v/F_m = [F_m - F_0]/F_m$) sowie die Quanteneffizienz im Licht ($\Phi_{PSII} = [F_m' - F_t]/F_m'$) nach Genty *et al.*, (1989) errechnet. Die PSII-Effizienz der Photosynthese im Fließgleichgewicht in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten wurde in einer Lichtsättigungskurve (LK) von $0-700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gemessen. Die Elektronentransportraten (ETR) wurden nach $\text{ETR} = 0,5 \cdot \Phi_{PSII} \cdot \text{PFD} \cdot 0,84$ errechnet (Genty *et al.*, 1989). Der Lichtsättigungspuls dauerte 800 ms bei einer Intensität von etwa $4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Die Inhibitorstudien wurden an abgeschnittenen Blättern durchgeführt, wobei der Inhibitor für 1 h über die Blattspreite infiltriert wurde. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Chl *a* Fluoreszenzparameter mithilfe der *PAM2100* in einer befeuchteten Blattkammer. Tentoxin wurde als spezifischer Inhibitor der thylakoidalen ATPase Aktivität sowie Nigerizin als Entkoppler des transthylakoidalen pH-Gradienten verwendet (Quick *et al.*, 1989). DTT hemmt die De-Epoxidierung von Violaxanthin zu Zeaxanthin und blockiert somit den Xanthophyllzyklus (Gamon *et al.*, 1990).

Inhibitoren

6,5 μ M	Tentoxin in H ₂ O
100 μ M	Nigerizin in H ₂ O
3 mM	DTT in H ₂ O

2.8.2 Messungen der PSI-Aktivität *in vivo*

(Klughammer und Schreiber, 1994)

Analog zu den Messungen der Photosyntheseeffizienz von PSII wird auch bei der Messung der Photosyntheseeffizienz von Photosystem I (PSI) die Lichtsättigungspuls Methode angewandt. Der Reduktionsgrad des PSI wurde hier jedoch durch Absorptionmessungen bei 830 nm unter Verwendung der *DualPAM* (Walz, Effeltrich) bestimmt.

Durch 10 s Dunkelrot Bestrahlung wird PSI vollständig reduziert und durch den nachfolgend applizierten Lichtsättigungspuls (SP) wird der P_m Wert bestimmt. Dieser ist analog zu dem F_m -Wert der Chl *a* Messungen. In diesem Fall ist PSI vollständig oxidiert. Durch Induktion der Photosynthese wird der Reduktionsgrad des PSI verändert, bestimmt durch akzeptor- und donorlimitierende Bedingungen. Im Licht applizierte SP bestimmen den Anteil der noch oxidierbaren PSI (P_m'). Der Reduktionsgrad von PSI selbst wird definiert zwischen 0 (vollständig oxidiert) und 1 (vollständig reduziert). Angegeben werden hier drei komplementäre Quanteneffizienzen Φ_{NA} , Φ_{ND} , Φ_{PSI} . Φ_{NA} repräsentiert den Anteil an PSI, welcher durch Gabe eines SP, aufgrund fehlender Akzeptoren, nicht oxidiert werden können ($\Phi_{NA} = [P_m - P_m'] / P_m$). Φ_{ND} repräsentiert den Anteil der PSI die oxidiert vorliegen ($\Phi_{ND} = 1 - P_m'$). Aus diesen wird die Quanteneffizienz des PSI, nach $\Phi_{PSI} = 1 - \Phi_{ND} - \Phi_{NA}$, berechnet, welche analog zu Φ_{PSII} ist.

2.8.3 Bestimmung der Fluoreszenz-Emissions-Spektren der Photosysteme bei 77 K

2.8.3.1 Isolierung intakter Thylakoide aus *A. thaliana*

(Schöttler *et al.*, 2004)

Es wurden etwa 5 g Blattrosetten von 24 h verdunkelten Pflanzen geerntet und in 100 ml eiskaltem Aufschlussmedium unter Verwendung eines Homogenisierers (*Ultra-Turrax*, Janke und Kunkel, Staufen) aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Homogenisat durch zwei Lagen Verbandsmull und eine Lage *Miracloth* (Calbiochem, San Diego, Kalifornien) filtriert und das Filtrat zentrifugiert (4000 *g*, 3 min, 4 °C). Das Sediment wurde in 1 ml Aufschlussmedium resuspendiert und im Anschluss mit 20 ml Schockmedium versetzt. Nach 30 s Inkubation wurden 20 ml Doppelmedium hinzugegeben und der Ansatz zentrifugiert (200 *g*, 2 min, 4 °C). Der Überstand wurde in einem neuen Zentrifugationsröhrchen erneut zentrifugiert (4000 *g*, 3 min, 4 °C). Im Anschluss wurden die pelletierten Thylakoide in 1-2 ml AufbewahrungsmEDIUM aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Aufschlussmedium

5 mM	MgCl ₂
30 mM	KCl
50 mM	MES
350 mM	Sorbit
	mit KOH auf pH 6,1

Schockmedium

5 mM	MgCl ₂
30 mM	KCl
50 mM	Hepes
	mit KOH auf pH 7,6

Doppelmedium

5 mM	MgCl ₂
30 mM	KCl
50 mM	Hepes
700 mM	Sorbit
	mit KOH auf pH 7,6

Aufbewahrungsmedium

5 mM	MgCl ₂
30 mM	KCl
0,5 mM	MnCl ₂
50 mM	Hepes
350 mM	Sorbit
	mit KOH auf pH 7,8

2.8.3.2 Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K

Die 77 K Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Emissions-Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Schöttler am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie (Golm) durchgeführt.

Die Photosystemkomponenten der Thylakoidproben wurden bei 430 nm und 77 K zur Fluoreszenz angeregt und deren Emission zwischen 655-800 nm unter Verwendung eines Fluorometers (*F-6500*, Jasco GmbH, Groß-Umstadt) aufgezeichnet.

2.9 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Ultrastruktur der Chloroplasten wurden in Teilen in Zusammenarbeit mit Dr. Geimer an der Universität Bayreuth sowie Dr. Buchen an der Universität Bonn durchgeführt.

2.9.1 Fixierung von Blattmaterial für die Elektronenmikroskopie

(modifiziert nach Spurr, 1969)

Blattmaterial von im HL und LL angezogenen Pflanzen wurde vorsichtig in etwa 1 mm² große Fragmente geschnitten und direkt in 2 ml Reaktionsgefäßen in Fixierpuffer gelegt. Zur vollständigen Durchtränkung der Blattproben wurde der Fixierpuffer schonend im Exsikkator Vakuum-infiltriert. Blattfragmente, welche nicht in der Fixierlösung herabgesunken waren, wurden verworfen während die herabgesunkenen Proben über Nacht bei 4 °C gelagert wurden. Im Folgenden wurden die Blattproben dreimal mit 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 gewaschen und anschließend mit 50 µl 1 % Osmiumtetroxidlösung (OsO₄) überschichtet. Nach

Inkubation mit OsO_4 für 1 h bei RT wurde das überschüssige OsO_4 durch dreimaliges Waschen mit 1 ml H_2O entfernt.

Die Entwässerung der fixierten und kontrastierten Proben erfolgte schonend durch schrittweise Erhöhung der Acetonkonzentration. Dazu wurden die Proben zunächst in 25 % Aceton eingelegt und für 20 min inkubiert. Im zweiten Entwässerungsschritt mit 50 % Aceton wurde zusätzlich 1 % Uranylacetat zugesetzt und für weitere 90 min inkubiert. Es folgten Waschungen mit 70 %, 96 %, sowie dreimalige Waschungen mit 100 % Aceton für jeweils 20 min um das H_2O vollständig durch Aceton zu substituieren.

Im Folgenden wurde das Aceton durch eine steigende Konzentration von Spurrmedium ersetzt. Die Blattfragmente wurden hierzu über Nacht bei RT mit Spurr:Aceton (1:1) überschichtet. Anschließend wurden die Proben für 4 h in Spurr:Aceton (3:1) und daraufhin für 4 h in Spurr eingelegt. Nach einer Lagerung über Nacht in frischem Spurr wurden die Blattfragmente in Silikonformen mit Spurr für 2 Tage bei 60 °C ausgehärtet.

Fixierpuffer

2 % (v/v)	Glutaraldehyd
50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 7,2

Spurrmedium

6,5 g	Nonenylsuccinicanhydrid (NSA)
2,5 g	Vinylcyclohexandioxid (ERL) 4221D
1,5 g	Diglycidylether von Polypropylenglycol (DER) 736
0,4 g	Dimethylaminoethanol (DMAE)

2.9.2 Herstellung von Schnittpräparaten für die Elektronenmikroskopie

Von den eingebetteten Blattproben wurden mithilfe eines Ultramikrotoms (*MT-600*, RMC, Tuson, USA) 1 μm dicke Semidünnschnitte angefertigt und auf eine qualitative Fixierung hin untersucht. Von ausgesuchten Präparaten wurden im Folgenden Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Diese Schnitte wurden erneut mit 2 % Uranylacetat sowie 2 % Bleiacetat nachkontrastiert und bis zur Untersuchung mit dem *EM 10* Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, Oberkochen) trocken gelagert.

2.10 GENOMWEITE EXPRESSIONSANALYSE VON *A. THALIANA*

2.10.1 Experimenteller Aufbau

Die *A. thaliana* Linien wurden für 28 Tage im LL bei 40 % relativer Luftfeuchte in Langtag (16/8 h) und Temperatur von 22 °C tags und 18 °C nachts angezogen. Drei Stunden nach Tagesanbruch im LL wurden die *A. thaliana* Blattrosetten ohne Keimblätter geerntet (ZP0) und die restlichen Pflanzen ins HL transferiert. Nach vier Stunden (ZP4h) sowie nach 48 Stunden (ZP2d) im HL wurden erneut Proben geerntet. Für jede Bedingung wurde ein unabhängiges biologisches Replikat generiert. Alle Proben wurden zügig geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Gesamt-RNA Isolierung (Abschnitt 2.6.4) bei -80 °C gelagert.

Die nach der Extraktion erhaltene Gesamt-RNA wurde nach Qualitätskontrolle mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Quiagen (Hilden) erneut aufgereinigt. Die Hybridisierungen der verwendeten Affymetrix *ATH1 Genome Arrays* wurde extern im Kompetenzzentrum für Fluoreszenz Bioanalytik (Regensburg) durchgeführt. Die erhaltenen Fluoreszenzdateien (.cel) der hybridisierten Arrays wurden wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben verarbeitet.

2.10.2 Statistische Analyse zur Identifizierung differentiell regulierter Gene

Zur statistischen Analyse wurde das Programm *Robin* (Lohse *et al.*, 2010) verwendet. Die Fluoreszenzdaten der .cel Dateien wurden nach dem RMA Algorithmus („*robust multiarray averaging*“) normalisiert und die statistische Analyse auf differentielle Genexpression basierend auf einem linearen Modell durchgeführt (Smyth 2004). Die erhaltenen *p*-Werte wurden nach der Strategie von Benjamini und Hochberg (1995) korrigiert. Alle generierten Tabellen wurden zum weiteren Abgleich und Filtern in das Programm *Access* (Microsoft, Redmond, Washington) importiert.

Die gefilterten Kandidatengene wurden am Helmholtz Zentrum München in Zusammenarbeit mit Dr. Haberer in statistisch signifikant überrepräsentierte funktionelle Gruppen geordnet. Hier wurden ebenfalls die Kandidatengene mithilfe des Programmes FIRE (Elemento *et al.*, 2007) auf über- oder unterrepräsentierte Promotormotive untersucht.

2.11 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE PIGMENTANALYSEN

2.11.1 Bestimmung des MgProtoIX-Gehaltes

(Lermontova und Grimm, 2006)

Die Bestimmung der MgProtoIX-Gehalte im LL-HL-Transfer wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Grimm (Humboldt Universität, Berlin) durchgeführt. Es wurden zu jedem Zeitpunkt 15-18 Pflanzenrosetten ohne Keimblätter (etwa 100 mg) zu einer Probe zusammengeführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Extraktion erfolgte in einem basischen Methanol-Acetongemisch. Die Porphyrinextrakte wurden in der HPLC aufgetrennt. Durch Anregung bei 405 nm und Detektion der Emission bei 625 nm konnten die Porphyrine nachgewiesen und mithilfe entsprechender Standards quantifiziert werden.

2.11.2 Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes

(Arnon, 1949)

Die quantitative Bestimmung der Photosynthesepigmente wurde auf die Blattfläche bezogen. Es wurden von HL Pflanzen 3-4 Blätter und von LL Pflanzen 10-15 Blätter pro Probe unter Klarsichtfolie ausgelegt und deren Umriss übertragen. Die Folien wurden zusammen mit einem Flächenstandard digitalisiert und die Fläche der einzelnen Blätter mithilfe des Programmes *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) vermessen. Die zuvor abgezeichneten Blätter wurden nach dem Wiegen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zur weiteren Prozessierung bei -80 °C gelagert.

Das gefrorene Blattmaterial wurde mit einem vorgekühlten Pistill in flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit 500 µl 100 % Aceton versetzt. Das Extraktionsgemisch wurde mit zum Neutralisieren starker Säuren CaCO_3 versetzt und für weitere 30 s homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min im Dunkeln bei RT geschüttelt um eine vollständige Pigmentextraktion zu gewährleisten. Nach der Zentrifugation (20000 g, 3 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein lichtundurchlässiges Reaktionsgefäß überführt und bis zur photospektrometrischen Messung auf Eis gelagert. Zur Messungen wurden die Extrakte 1:10 oder 1:5 so verdünnt, dass sie in 80 % Aceton vorlagen. Der Chlorophyllgehalt (Chl) wurde mit den Wellenlängen 647 nm und 664 nm und der Carotenoidgehalt (Car) bei 480 nm, 645 nm

sowie 663 nm mit 80 % Aceton als Leerwert bestimmt. Die zur absoluten Quantifizierung verwendeten Formeln sind im Folgenden aufgeführt:

$$\begin{aligned}\text{Chl(gesamt)} \mu\text{g/ml} &= 20,2 \cdot E_{645} + 8,02 \cdot E_{663} \\ \text{Chla} \mu\text{g/ml} &= 11,78 \cdot E_{664} - 2,29 \cdot E_{647} \\ \text{Chlb} \mu\text{g/ml} &= 20,05 \cdot E_{647} - 4,77 \cdot E_{664} \\ \text{Car} \mu\text{g/ml} &= E_{480} + 0,144 \cdot E_{663} - 0,638 \cdot E_{645}\end{aligned}$$

2.12 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE METABOLITANALYSEN

2.12.1 Qualitative und quantitative Bestimmung von Adenylaten

2.12.1.1 Extraktion und Derivatisierung der Adenylate aus Blattmaterial von *A. thaliana*

(modifiziert nach Häusler *et al.*, 2000)

Zur Extraktion der Adenylate wurden 50-100 mg gefrorenes pulverisiertes Pflanzenmaterial mit 500 μl 1 M Perchlorsäure (HClO_4) versetzt. Nach erneuter Zugabe von 500 μl 0,1 M HClO_4 wurden die Proben abzentrifugiert (20000 g , 2 min, 4 $^\circ\text{C}$) und 400 μl des Überstandes in neue Reaktionsgefäße überführt. Dieser wurde durch Zugabe von 20,5 μl 5 M K_2CO_3 neutralisiert und für 20 min auf Eis offen stehen gelassen, damit sich entwickelndes CO_2 vollständig ausgasen kann. Nach Zentrifugation (20000 g , 2 min, 4 $^\circ\text{C}$) konnte der Überstand bei -80 $^\circ\text{C}$ bis zur Derivatisierung gelagert werden.

Bei der Derivatisierung werden die Nukleotide in fluoreszierende Etheno-Derivate umgewandelt. Hierzu wurden 50 μl des Extraktes mit 405 μl Derivatisierungspuffer sowie 45 μl Chloracetaldehyd (45 % in H_2O , Sigma) versetzt und für 40 min bei 80 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch schnelles Abkühlen auf Eis abgestoppt und die Proben anschließend zentrifugiert (20000 g , 2 min, 4 $^\circ\text{C}$). Die so behandelten Proben konnten direkt in die HPLC-Analyse eingesetzt werden.

Derivatisierungspuffer

62 mM Zitronensäure
76 mM K_2HPO_4
pH 4,0

2.12.1.2 Bestimmung der Adenylatgehalte mittels HPLC

(Haink und Deussen, 2003)

Die Analyse und Detektion der derivatisierten Adenylate erfolgte nach Auftrennung in der *high performance liquid chromatography* (HPLC). Es wurde ein *reversed-phase* (Hyperclone C18 BDS Säule (*base-deactivated silica*) HPLC-System (Dionex, Idstein) eingesetzt, mit Tetrabutylammoniumbisulfat-Puffer (TBAS; A) und Acetonitril:TBAS (2:1; B) als Eluent (Flussrate: $1,7 \text{ ml min}^{-1}$; Gradient: 0-2 min, 18 % B; 2-6 min 50 % B; 6-6,6 min 90 % B; 6,6-7 min, 90 % B; 7-8 min, 0 % B). Durch Anregung der Adenosin Nukleotide bei 280 nm konnte die Fluoreszenz bei 410 nm detektiert werden. Mithilfe der zuvor vermessen Standards wurden die Chromatogramme ausgewertet (*Chromleon*, Dionex), die jeweiligen Adenylate bestimmt und deren Gehalte errechnet.

TBAS - Puffer

5,7 mM	TBAS
30,5 mM	KH_2PO_4
	pH 5,8

2.12.2 Qualitativer Nachweis von Stärke in Blättern

Jod-Kaliumjodidlösung (Lugol'sche Lösung) wurde standardmäßig zum Stärkenachweis verwendet. Blätter von 24-27 Tage alten Pflanzen wurden in 2 ml 80 % EtOH bei 75 °C ausgekocht und mit 1 % Lugol'scher Lösung zur Anfärbung der Stärke versetzt. Nach dem Waschen mit 2 ml H_2O konnte der Stärkegehalt bemessen und photographisch dokumentiert werden.

2.12.3 Quantitative Bestimmung löslicher Zucker in Blättern

(Lin *et al.*, 1988)

Blattmaterial (50-100 mg) wurde zweifach in 80 % EtOH bei 95 °C ausgekocht, der Überstand vollständig abgenommen und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Eindampfen des Extraktes im Vakuumkonzentrator (*SpeedVac*, Eppendorf) wurden die Proben in einem

adäquaten Volumen H₂O (500-1000 µl) für 30 min unter starkem Schütteln gelöst und bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Die quantitative Messung der freien Zucker Glukose, Fruktose sowie Saccharose erfolgte mithilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests durch sequenzielle Zugabe der spezifischen Enzyme (Stitt *et al.*, 1989). Beim Umsatz von Glukose-6-Phosphat (Glc6P) durch die im Assay zugesetzte Glukose-6-Phosphatdehydrogenase wird das NADP⁺ zu NADPH reduziert, dessen Absorption bei 340 nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) detektiert wurde.

Die Reaktionssequenz wurde mit Zugabe von 0,02 U Hexokinase gestartet, welche die im Extrakt enthaltene Glukose und Fruktose am C₆ phosphoryliert. Bei konstanter Absorption wurden 0,2 U Phosphoglukoisomerase (PGI) beigemischt um Fruktose-6-Phosphat (Fru6P) in Glc6P umzusetzen. Bei Erreichen der maximalen Absorptionsänderung wurde im Folgenden 100 U Invertase zugeben um die vorhandene Saccharose in Glukose und Fruktose zu katalysieren. Die absolute Absorptionsänderung bei 340 nm bei bekanntem Extinktionskoeffizienten von NADPH (6,22 cm²·µmol⁻¹) wurde verwendet um die Konzentration (Δc in µmol/ml) des Substrates zu berechnen.

Als Standard verwendeter Reaktionsansatz

100 mM	Hepes-KOH (pH 7,5)
10 mM	MgCl ₂
2 mM	ATP
0,8 mM	NADP ⁺
0,2 U	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
5 % (v/v)	Extrakt

2.12.4 Quantitative Bestimmung der Stärke in Blättern

Das ethanolisch extrahierte Blattmaterial (Abschnitt 2.12.3) wurde erneut mit 80 % EtOH gespült, in 300 µl 0,2 M KOH aufgenommen und mithilfe eines Pistills homogenisiert. Die Proben wurden für 1 h bei 95 °C aufgekocht und nach Abkühlung auf Eis wurde der pH-Wert durch Zugabe von 60 µl 1 M Essigsäure auf etwa 5,5 eingestellt. Anschließend wurden 3,5 U

α -Amylase sowie 2,5 U Amyloglukosidase zugesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (20000 *g*, 5 min, RT) wurde der Überstand bis zur Bestimmung bei 4 °C gelagert.

Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beruht ebenfalls auf einem gekoppelten enzymatischen Test, bei dem der Umsatz von NADP⁺ zu NADPH detektiert wird (Abschnitt 2.12.3). Durch Zugabe von 0,02 U Hexokinase in den Reaktionsansatz (Abschnitt 2.12.3) wurde die Katalyse von Glukose zu Glc6P gestartet. Die absolute Absorptionsänderung bei 340 nm bei bekanntem Extinktionskoeffizienten von NADPH (6,22 cm²· μ mol⁻¹) wurde verwendet um die Konzentration (Δc in μ mol/ml) des Substrates zu kalkulieren.

3. ERGEBNISSE

Die *adg1-1/tpt-1* Mutante wurde bereits durch Schneider *et al.* (2002) beschrieben und zeigt eine deutliche Wachstumsretardierung und inhibitorische Effekte in der Photosyntheseeffizienz, welche bei den entsprechenden Einzelmutanten *adg1-1* und *tpt-1* nicht beobachtet werden konnte. Da es sich bei der *tpt-1* Mutante jedoch um eine „*knock down*“ Mutante handelt, wurde angenommen, dass die generelle Überlebensfähigkeit dieser Doppelmutante auf die 10 % Restaktivität des TPT zurückzuführen ist (Häusler *et al.*, 2009). Es konnte jedoch eine Mutantenlinie identifiziert werden, die keine TPT Transkripte mehr exprimiert (*tpt-2*; siehe auch Diplomarbeit D. Henseler 2003). Bei dieser, als *tpt-2* bezeichneten Mutante, handelt es sich um eine T-DNA Insertionsmutante im Hintergrund des Wildtyps (WT) Col-0, in der die T-DNA acht Basenpaare (bp) hinter dem Startkodon (ATG) inseriert ist (Abbildung 3.1 A). Die Insertion an dieser Position verhindert die Transkription einer funktionellen mRNA. Dies wurde mithilfe von RT-PCR mit dem Primerpaar TPT bestätigt (Abbildung 3.1 B). Die schwache Amplifikation mit dem Primerpaar 2 TPT ist wahrscheinlich auf ein weiteres ATG, welches 32 bp stromabwärts des genspezifischen Startkodons liegt, zurückzuführen. Jedoch liegt dieses Startkodon außerhalb des Leserasters des TPT.

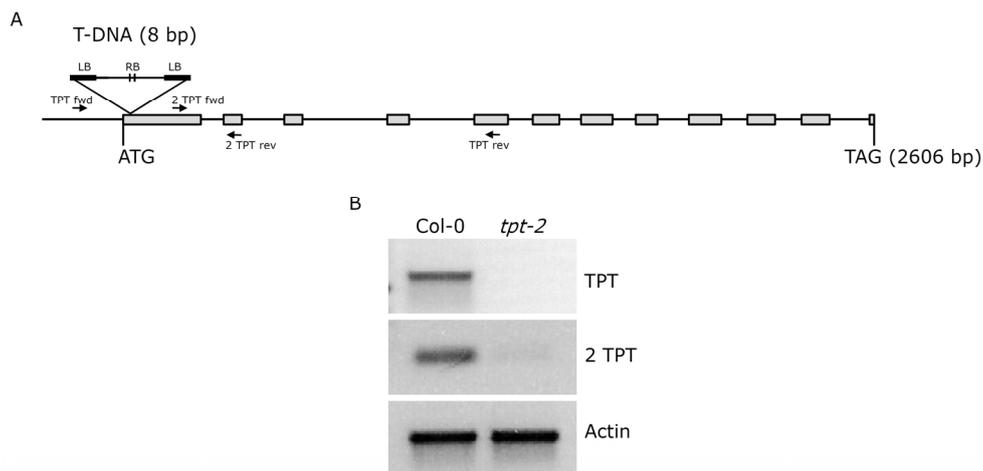


Abbildung 3.1 Identifizierung der *tpt-2* „*knock-out*“ Mutante. (A) Übersicht über die Genstruktur des *TPT* und der T-DNA Insertion. (B) Semiquantitative RT-PCR zur Überprüfung der *TPT* Transkriptionslevel mit den Primerpaaren *TPT* sowie *2 TPT*. Als endogene Kontrolle wurden die Actintranskription mit den Primerpaar *Act_rev/fwd* überprüft.

Auch die im Liposomensystem getestete TP und 3-PGA Transportaktivität bestätigte ebenfalls das Fehlen eines funktionellen TPT. Die Transportaktivität von P_a war um etwa 44 % von 2,94 ($\pm 0,35$) $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ Frischgewicht (FW) im WT auf 1,64 ($\pm 0,02$) $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW in der *tpt-2* Mutante verringert. Der Transport von 3-PGA mit 3,07 ($\pm 0,41$) $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ FW im WT war in der *tpt-2* nicht mehr detektierbar (R. Häusler, persönliche Mitteilung). Diese *tpt-2* Mutation wurde in die *adg1-1* Mutante eingekreuzt und entgegen der postulierten Letalität, war die generierte Doppelmutante *adg1-1/tpt-2* jedoch überlebensfähig und wies den gleichen Phänotyp wie die *adg1-1/tpt-1* Mutante auf (Abschnitt 1.5).

Da die eingeführten Mutationen den Primärstoffwechsel stark beeinträchtigen, ergab sich die Frage nach den möglichen Ursachen für den Photosynthesephänotyp der Doppelmutante. Zur Aufklärung wurden verschiedene fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Bestimmung der Photosyntheseeffizienz sowie proteinbiochemische Methoden eingesetzt, deren Ergebnisse im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. Im Zusammenhang weiterführender physiologischer Analysen im metabolischen Kontext, welche im zweiten Abschnitt der Ergebnisse dargestellt sind, wurden zudem weitere, mit Stoffwechsel und Transportvorgängen assoziierte Doppelmutanten generiert, deren Phänotypen mit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante vergleichbar sind. Mithilfe von Transferexperimenten von schwachen zu hohen Lichtintensitäten sollte die Akklimatisierung basierend auf Photosynthese und Genexpression in der Mutante näher beleuchtet werden. Im letzten Abschnitt werden daher globale Expressionsanalysen im Zusammenhang mit diesen Transferexperimenten dargestellt.

3.1 CHARAKTERISIERUNG DES HOCHLICHT-ABHÄNGIGEN PHÄNOTYPS DER *ADG1-1/TPT-2* DOPPELMUTANTE

Aufgrund des für die *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante beschriebenen Phänotyps (Schneider *et al.* 2002), wurde zunächst der Einfluss von zwei verschiedenen Lichtintensitäten während der Wachstumsphase auf die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen unter sehr geringen Photonenflussdichten (PFD) von $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LL = Schwachlicht) sowie unter einer 10-fach höheren PFD von etwa $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL = Hochlicht) angezogen. Überraschenderweise war nur unter HL Bedingung ein

verändertes Wachstum sowie eine Verminderung der Photosyntheseeffizienz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zu beobachten, während diese unter LL Bedingungen vom WT phänotypisch nicht zu unterscheiden war (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2 Wachstumsphänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten. Die Pflanzen der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, der entsprechenden Einzelmutanten und des WT wurden 26 Tage bei einer PFD von entweder $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HL) oder $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (LL) im Langtag angezogen. Balken = 1 cm

Der morphologische Phänotyp wurde zunächst anhand der Rossettengewichte, der Pigmentgehalte von Chlorophyll (Chl) und Carotinoide (Car) sowie des Proteingehaltes untersucht. Bei HL Anzucht lag das durchschnittliche Rossettengewicht von 24 Tage alten *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten bei $0,016 (\pm 0,003)$ g und war auf etwa 6 % im Vergleich zum WT bei $0,274 (\pm 0,062)$ g vermindert. Das spezifische Blattgewicht der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante war hingegen auf etwa 75 % verringert, was sich auch im Proteingehalt widerspiegelte, der mit 66 % unterhalb dem des WT lag. Die Chl- und Car-Gehalte waren um etwa 50-60 % im HL verringert (Tabelle 3.1). Das Chl *a/b* Verhältnis war von $3,09 (\pm 0,13)$ im WT auf $2,13 (\pm 0,04)$ in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante erniedrigt und deutet auf eine veränderte Stöchiometrie der Photosysteme oder deren LHCs hin. Während *tpt-2* keine Veränderungen in den gemessenen Parametern zeigte, war in *adg1-1* das Rossettengewicht auf $0,167 (\pm 0,025)$ g verringert und damit einhergehend der Rossettendurchmesser deutlich kleiner (Abbildung 3.2). Das spezifische Blattgewicht sowie die Chl Gehalte waren im Vergleich zum WT hingegen erhöht.

Im Unterschied zu der HL Anzucht, waren alle beschriebenen Parameter der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und der entsprechenden Einzelmutanten im LL mit dem WT vergleichbar. Auffällig war jedoch, dass die gemessenen Parameter unter LL Bedingungen im Vergleich zu HL auch im WT verringert waren. Das Chl *a/b* Verhältnis der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante war bei LL-Anzucht mit $2,35 (\pm 0,07)$ gegenüber dem des WT ($2,68 \pm 0,03$) jedoch weiterhin deutlich verringert.

Tabelle 3.1 Zusammenstellung der physiologischen Charakteristika der einzelnen Pflanzenlinien im Vergleich von HL und LL Anzuchten.

HL					
	Chl $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	Car $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	Chl <i>a/b</i>	FW $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$	Protein $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
Col-0	$28,62 \pm 2,65$	$1,06 \pm 0,05$	$3,09 \pm 0,13$	$19,62 \pm 1,61$	$337,58 \pm 42,07$
<i>adg1-1</i>	$32,06 \pm 2,43$	$1,24 \pm 0,09$	$3,00 \pm 0,04$	$24,61 \pm 2,19$	$428,80 \pm 64,47$
<i>tpt-2</i>	$25,87 \pm 0,99$	$1,01 \pm 0,06$	$3,11 \pm 0,07$	$19,45 \pm 2,04$	$323,50 \pm 41,76$
<i>adg1-1/tpt-2</i>	$10,30 \pm 1,08$	$0,55 \pm 0,05$	$2,13 \pm 0,04$	$14,58 \pm 1,13$	$225,87 \pm 47,96$
LL					
Col-0	$12,72 \pm 0,75$	$0,44 \pm 0,03$	$2,68 \pm 0,03$	$7,04 \pm 0,62$	$59,17 \pm 9,99$
<i>adg1-1</i>	$13,38 \pm 1,66$	$0,45 \pm 0,06$	$2,64 \pm 0,06$	$6,78 \pm 0,57$	$56,78 \pm 13,85$
<i>tpt-2</i>	$13,58 \pm 1,13$	$0,45 \pm 0,03$	$2,61 \pm 0,08$	$7,03 \pm 0,38$	$44,28 \pm 3,81$
<i>adg1-1/tpt-2</i>	$13,53 \pm 0,92$	$0,47 \pm 0,04$	$2,35 \pm 0,07$	$7,05 \pm 0,51$	$53,51 \pm 5,12$

n = 5-10, \pm SD

3.1.1 Untersuchung der Photosyntheseeffizienz im Hoch- und Schwachlicht

3.1.1.1 Zusammenfassung der Effizienzbestimmungen am PSII

Aufgrund der vorrausgegangenen Beobachtungen phänotypischer Veränderungen im WT und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, wurde angenommen, dass die Effizienz der Photosynthese in den Pflanzen ebenfalls abhängig von der Lichtintensität sein könnte. Daher wurde mithilfe der PAM die Effizienz des PSII (ΦPSII) über die Chl *a* Fluoreszenz bestimmt. In Tabelle 3.2 sind die relativen sowie absoluten Fluoreszenzwerte von den in HL und LL angezogenen Pflanzenlinien zusammengefasst. Das im dunkeladaptierten Blatt bestimmte F_v/F_m -Verhältnis gibt die maximal erreichbare Quanteneffizienz wieder, also den Anteil des Lichts, der für photochemische Prozesse verwendet werden kann. Unter physiologisch ungünstigen Bedingungen kann es zu Photoinhibition am PSII kommen (Abschnitt 1.2), welches zu einer

Verringerung des F_v/F_m -Verhältnisses führt. Es dient somit auch als Indikator für die Integrität des PSII.

Die im HL angezogene *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wies ein auf fast 25 % verringertes F_v/F_m -Verhältnis im Vergleich zum WT und den entsprechenden Einzelmutanten auf. Dies war jedoch nicht auf eine reduzierte maximale Fluoreszenz (F_m), sondern auf eine erhöhte Grundfluoreszenz (F_0) im dunkeladaptierten Zustand zurückzuführen. Daher kann die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auch als Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz (HCF) Mutante bezeichnet werden. Solche Veränderungen des F_0 lassen sich häufig bei Inhibitorstudien mit Dichlorphenyldimethylharnstoff (DCMU) beobachten. Dieser Inhibitor blockiert die Re-Oxidation des Q_A am PSII und führt somit zu einer dramatischen Erhöhung der Fluoreszenzausbeute am P680 (Tóth *et al.*, 2005). Es wurde daher angenommen, dass eventuell auch in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im dunkeladaptierten Blatt Q_A und damit gekoppelt PQ einen erhöhten Reduktionsgrad aufweist. Eine Dunkelperiode von etwa 20 min sollte jedoch für eine vollständige Re-Oxidation von PQ ausreichen. Die Quanteneffizienz Φ_{PSII} wurde bei PFDs gemessen, welche den Anzuchtbedingungen entsprachen. Hier zeigte sich, dass Φ_{PSII} in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei HL deutlich verringert war (Tabelle 3.2). Bei Untersuchung der Einzelmutanten konnte nur eine geringfügige Verminderung in Φ_{PSII} detektiert werden.

Tabelle 3.2 Zusammenstellung der Chlorophyll *a* Fluoreszenz Parameter der einzelnen Pflanzenlinien im Vergleich von HL und LL.

HL				
	F_v/F_m	F_0	F_m	Φ_{PSII}
Col-0	0,800 ± 0,007	0,061 ± 0,003	0,305 ± 0,013	0,396 ± 0,014
<i>adg1-1</i>	0,778 ± 0,007	0,062 ± 0,004	0,281 ± 0,011	0,366 ± 0,014
<i>tpt-2</i>	0,757 ± 0,030	0,054 ± 0,005	0,224 ± 0,028	0,359 ± 0,046
<i>adg1-1/tpt-2</i>	0,226 ± 0,021	0,276 ± 0,037	0,356 ± 0,048	0,056 ± 0,027
LL				
Col-0	0,744 ± 0,011	0,115 ± 0,020	0,447 ± 0,062	0,584 ± 0,016
<i>adg1-1</i>	0,751 ± 0,010	0,133 ± 0,013	0,532 ± 0,050	0,487 ± 0,077
<i>tpt-2</i>	0,753 ± 0,019	0,138 ± 0,014	0,555 ± 0,030	0,582 ± 0,030
<i>adg1-1/tpt-2</i>	0,746 ± 0,005	0,152 ± 0,007	0,599 ± 0,020	0,472 ± 0,022

n = 8-12, ± SD

Die Verringerung von ΦPSII in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL war bei der Anzucht im LL nicht zu beobachten. Weiterhin erreichte das F_v/F_m -Verhältnis in der Doppelmutante im LL den Wert des WT und der Einzelmutanten und ΦPSII war nur geringfügig erniedrigt. Die absoluten Fluoreszenzwerte F_0 und F_m waren im Vergleich zu den Kontrollen nur leicht erhöht. Es ist anzunehmen, dass die inhibitorischen Effekte durch das HL verursacht werden (Abbildung 3.3)

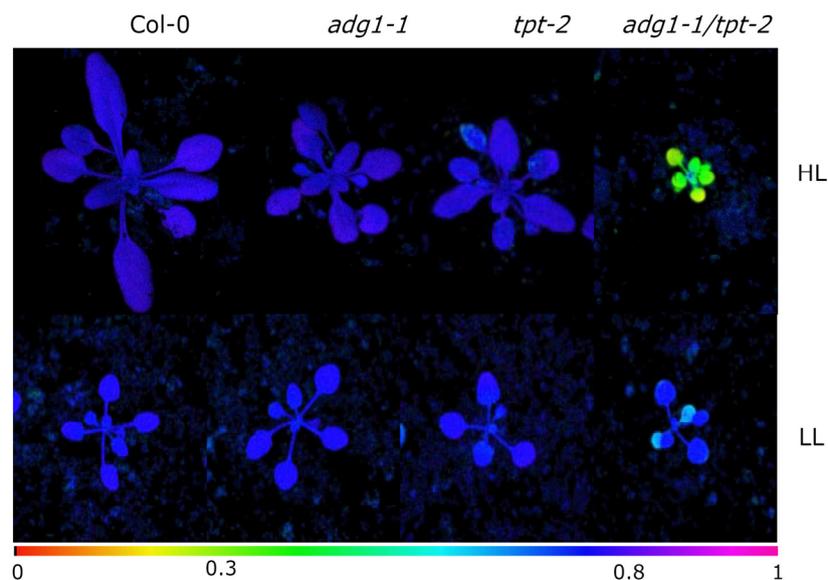


Abbildung 3.3 F_v/F_m -Verhältnisse der verwendeten Mutanten *adg1-1*, *tpt-2*, *adg1-1/tpt-2* im Vergleich zum WT in Falschfarben dargestellt. Die Pflanzen wurden vier Wochen unter HL bzw. LL angezogen und für etwa 20 min dunkeladaptiert. Der farbige Balken beschreibt den verwendeten Farbcodierungsbereich der F_v/F_m -Verhältnisse.

3.1.1.2 Zusammenfassung der Effizienzbestimmungen am PSI

Die Ergebnisse deuteten auf gravierende Defekte in der Effizienz des PSII in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante unter HL Bedingungen hin. Aus diesem Grund wurde weiterführend der Reduktionsgrad des Photosystem I (PSI) durch Absorptionsmessungen bei 830 nm im Licht bestimmt und die Quanteneffizienz (ΦPSI) sowie die Parameter donorseitige Limitierung (ΦND) und akzeptorseitige Limitierung (ΦNA) abgeleitet (Tabelle 3.3; Abschnitt 2.8.2). Konsistent mit den Ergebnissen aus den PSII Messungen konnte gezeigt werden, dass die PSI Effizienz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL um nahezu die Hälfte vermindert war. Diese Verringerung in der PSI Effizienz lässt sich auf eine Veränderung im ΦND zurückführen, deren relativer Wert etwa verdoppelt war. Daher ist anzunehmen, dass die Elektronenübertragung

von Plastocyanin auf PSI oder weiter vorgelagerter Prozesse gestört ist. Der Φ_{NA} Wert war im HL hingegen unverändert und spricht für einen ungestörten Abfluss der Elektronen am PSI.

Diese Beobachtung war ebenfalls ein vom HL-abhängiges Merkmal, welches unter LL Anzucht nicht mehr auftrat. Hier stimmten Φ_{PSI} des WT und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sowie der entsprechenden Einzelmutanten überein und waren im Vergleich zur HL Anzucht sogar erhöht.

Tabelle 3.3 Parameter der Photosyntheseeffizienz am PSI der Mutanten und des WT im Vergleich von HL und LL.

HL			
	Φ_{PSI}	Φ_{ND}	Φ_{NA}
Col-0	0,521 ± 0,071	0,354 ± 0,075	0,125 ± 0,032
<i>adg1-1</i>	0,339 ± 0,052	0,558 ± 0,056	0,103 ± 0,027
<i>tpt-2</i>	0,449 ± 0,049	0,442 ± 0,027	0,108 ± 0,032
<i>adg1-1/tpt-2</i>	0,263 ± 0,063	0,651 ± 0,121	0,095 ± 0,104
LL			
Col-0	0,785 ± 0,109	0,032 ± 0,051	0,186 ± 0,140
<i>adg1-1</i>	0,705 ± 0,128	0,106 ± 0,079	0,189 ± 0,132
<i>tpt-2</i>	0,738 ± 0,052	0,063 ± 0,018	0,176 ± 0,044
<i>adg1-1/tpt-2</i>	0,787 ± 0,095	0,076 ± 0,039	0,147 ± 0,087

n = 3-6, ± SD

3.1.1.3 Vergleichende Untersuchung der am PSI und PSII gemessenen Elektronentransportraten

Basierend auf den Φ_{PSII} und Φ_{PSI} Messungen wurden die Elektronentransportraten (ETR_{II} bzw. ETR_I; $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) am PSII und PSI in Abhängigkeit von der PFD unter den zwei verschiedenen Anzuchtbedingungen LL und HL abgeleitet (Abbildung 3.4). Die Lichtsättigungskurven können, durch Betrachtung der maximal erreichbaren ETR, Aufschluss über die Akklimatisierung der Pflanzen an die jeweiligen Lichtanzuchtbedingungen geben. Im WT lag die gemessene maximale ETR_{II} unter HL Anzucht bei etwa $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, erreichte aber keine Lichtsättigung. Die im LL angezogenen WT Pflanzen hingegen erreichten eine maximale ETR_{II} von nur ca. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und waren bei einer PFD von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ lichtgesättigt (Abbildung 3.4 A). Während die Lichtsättigungskurven der Einzelmutanten mit dem WT vergleichbar waren, lag die maximale ETR_{II} der im HL angezogenen *adg1-1/tpt-2*

Doppelmutante bei unter $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Unter LL Bedingungen hingegen überstieg die maximale ETRII von $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ den unter HL Anzucht gemessenen Wert noch (Abbildung 3.4 D).

Im WT stimmten die ETRII mit der ETRI unter HL bzw. LL Anzucht überein (Abbildung 3.4 E), was für einen funktionellen, linearen Elektronentransport (LEF) spricht. Während in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante die ETRI bei HL Anzucht mit 50 % noch unter dem WT-Niveau lagen, wurde eine Lichtsättigung jedoch erst mit einer ETRI von $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ erreicht (Abbildung 3.4 H). Dieser ETRI Wert lag mit 50 % über der ETRII und lässt auf einen zyklischen Elektronentransport (CEF) um PSI oder auf eine ungleichmäßige Lichtnutzung der beiden Photosysteme der im HL angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten schließen. Die im LL angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten zeigten vergleichbare ETRII und ETRI und es ist abzuleiten, dass unter LL die Photosynthese nicht beeinträchtigt ist.

Die entsprechenden Einzelmutanten zeigten keine deutlichen Veränderungen im Vergleich zum WT; die Lichtsättigungskurven waren mit denen des WT kongruent. Die maximale ETRI der *adg1-1* Mutante war im Vergleich zum WT um etwa 30 % verringert.

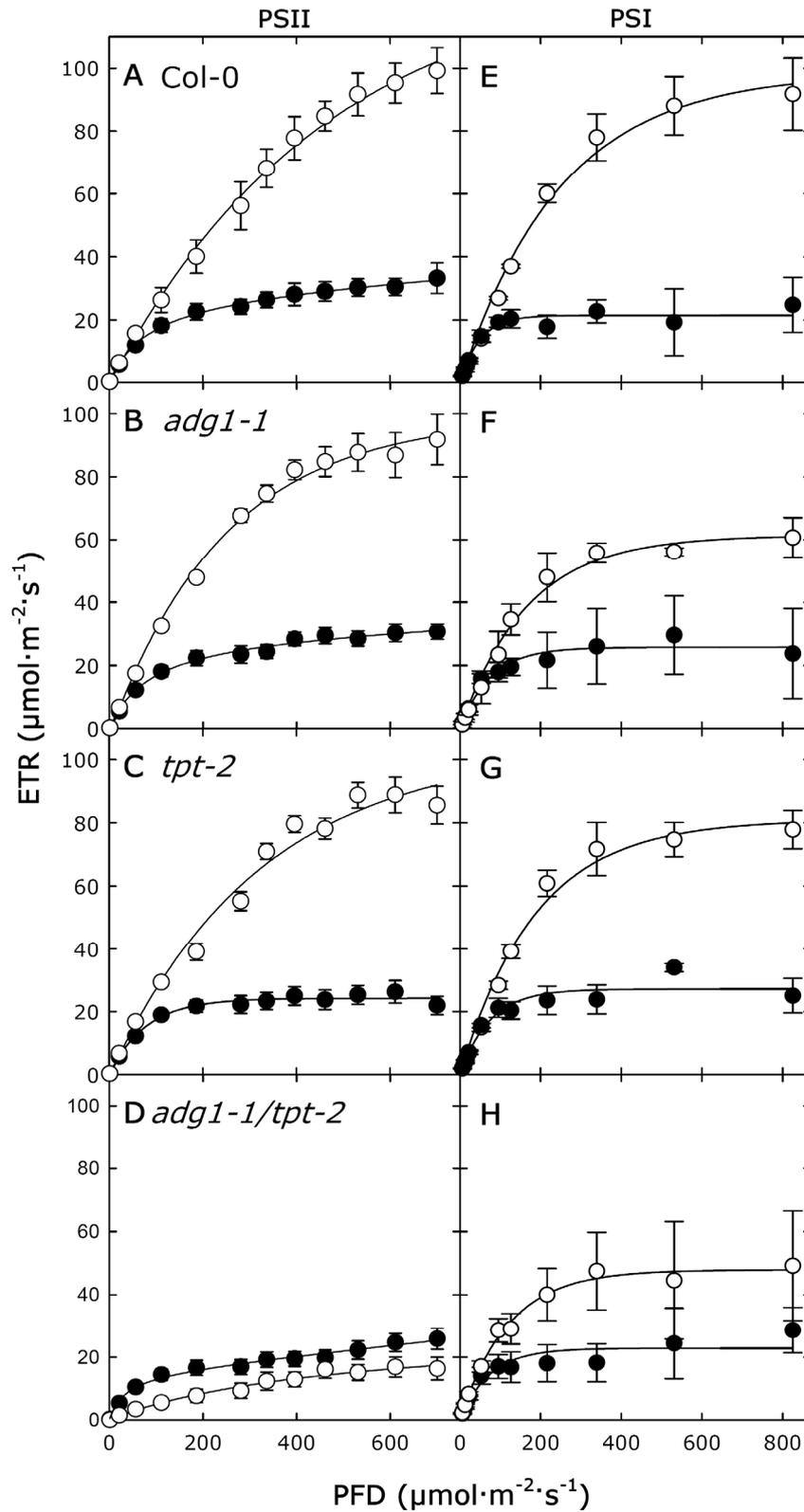


Abbildung 3.4 Gegenüberstellung der Elektronentransportraten am PSII (A-D) und PSI (E-H) in Abhängigkeit von der Photonenflussdichte (PFD). Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wurde zusammen mit dem WT und den entsprechenden Einzelmutanten für vier Wochen im HL (weiß) oder LL (schwarz) angezogen. n = 4-8, \pm SD

3.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Ultrastruktur der Chloroplasten

Bereits in Häusler *et al.* (2009) wurde die Ultrastruktur der Chloroplasten der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante mithilfe elektronenmikroskopischer (EM) Analysen untersucht. Die Beobachtungen ergaben eine deutliche Veränderung des Thylakoidaufbaus, wobei die Granastapel deutlich höher im Vergleich zum WT und den Einzelmутanten waren. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt worden. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Untersuchungen der Thylakoidstruktur in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auch bei LL und HL durchgeführt.

Unterschiede im Aufbau der Ultrastruktur waren schon beim WT zwischen HL und LL zu erkennen (Abbildung 3.5 A-D). Unter HL Anzucht akkumulierten große Mengen an Stärke. Im Bereich der Grana waren die Thylakoidmembranen im Durchschnitt drei- bis fünffach gestapelt und es waren wenige große Plastoglobuli vorhanden. LL Anzucht führte hingegen zu einer ausgeprägteren Membranfaltung der Granathylakoide sowie zu einer geringeren Akkumulation von Stärke. Die Veränderung der Membranfaltung in Abhängigkeit von der Lichtintensität ist ein häufig beobachteter Akklimatisierungsprozess (Abschnitt 1.3), welcher entweder auf die veränderte Proteinkomposition und/oder auf den Phosphorylierungsgrad von LHCII Proteinen zurückgeführt wird (Abschnitt 1.2). Bildung von Stärke war in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im LL nicht und im HL nur selten durch das Auftreten kleiner Stärkekörner zu beobachten. Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante hingegen zeigte im LL sowie im HL eine deutlich ausgeprägtere Faltung der Granathylakoide, deren Stapel bis zu 17-fach gefaltet waren. Des Weiteren kam es im HL zu einem erhöhten Auftreten von Plastoglobuli, welche im LL fast vollständig fehlten (Abbildung 3.5 E-H). Die verstärkte Bildung von Plastoglobuli wurde z.B. für Pflanzen beschrieben, die oxidativem Stress ausgesetzt waren (Austin *et al.*, 2006).

Im Vergleich zu *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wiesen hingegen die Einzelmутanten *adg1-1* sowie *tpt-2* unter den verschiedenen Bedingungen von LL und HL keine gravierenden strukturellen Veränderungen auf (nicht gezeigt). Wie bereits in Häusler *et al.* (2009) unter moderaten Lichtbedingungen gezeigt, wurde in der *adg1-1* Mutante eine tendenziell höhere

Granastapelung beobachtet. In der *tpt-2* Mutante konnte ein vermehrtes Vorkommen von Stärkekörnern detektiert werden.

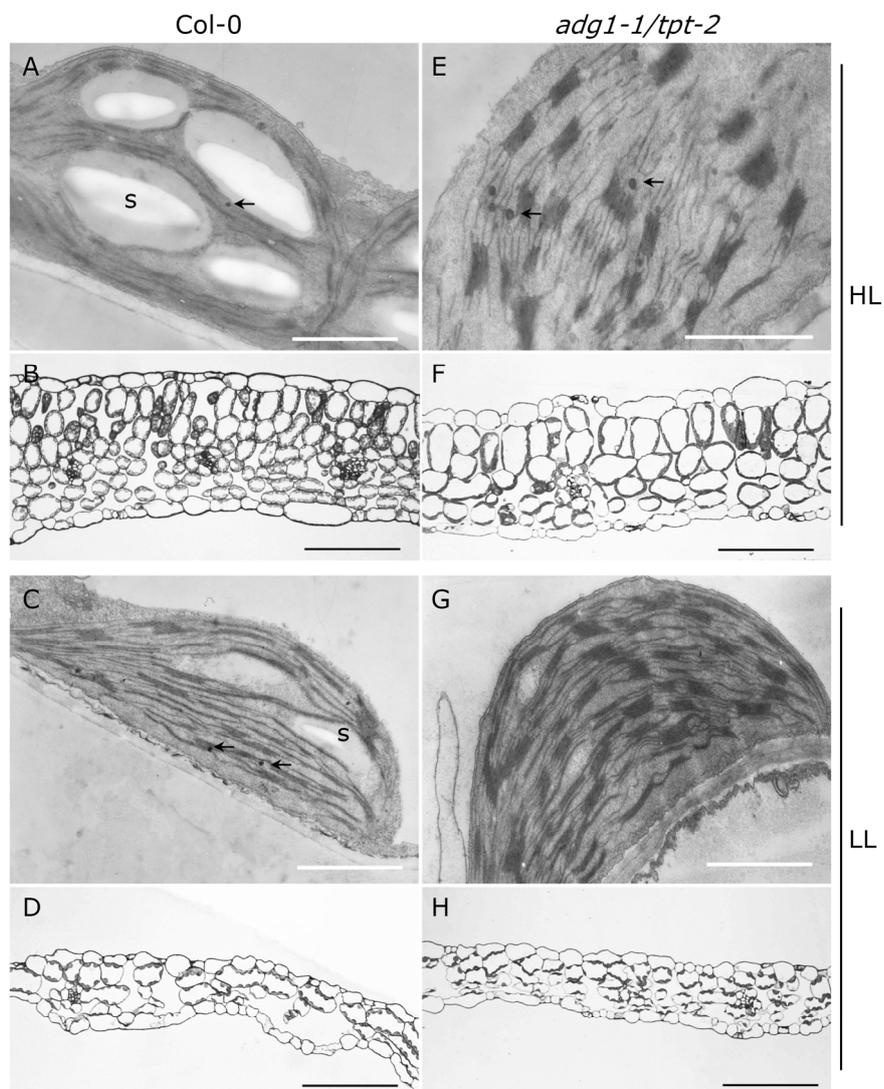


Abbildung 3.5 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Thylakoidstruktur des WT (A-D) und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (C-H) im Vergleich von LL und HL. Die entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen der Blattquerschnitte sind unterhalb der EM Aufnahmen abgebildet. Die Blätter von vier Wochen alten Pflanzen wurden in 2% Glutaraldehyd fixiert und in Spurrmedium eingebettet. Stärkegrana (s), Plastoglobuli (Pfeil), weißer Balken = 1 μm, schwarzer Balken = 100 μm

3.1.3 Immunologische Analyse Photosynthese assoziierter Proteine

Drastische Veränderungen in der Ultrastruktur der Chloroplasten geben Hinweise auf eine veränderte Komposition der Photosynthese-assoziierten Proteine. Dies kann entweder auf das Fehlen bestimmter Proteine oder deren Formierung zu Superkomplexen zurückgeführt

werden. Daher wurde zunächst die Abundanz der wichtigsten Photosynthese-assoziierten Proteine im HL sowie LL immunologisch untersucht.

Repräsentativ für die Zusammensetzung des PSII Kernkomplexes wurden die Anwesenheit der Proteine PsbB (CP47), PsbC (CP43), PsbA (D1), sowie PsbD (D2) untersucht. Alle diese plastomkodierte, zentralen Untereinheiten von PSII waren in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL bei Vergleich zum WT auf etwa 25 % verringert (Abbildung 3.6). Die kernkodierte Lichtsammelkomplexe des PSII hingegen, von denen Lhcb4 sowie Lhcb2 untersucht wurden, waren in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich zum WT nicht verändert. Das Protein Lhcb2 ist eines der Hauptbestandteile des LHCII (Caffarri *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von Lhcb2 durch die STN7-Kinase und die damit verbundene Assoziation bzw. Dissoziation mit PSII ist ein wichtiger Mechanismus zur Balancierung der Lichtabsorption durch die Reaktionszentren von PSII und PSI (*state transitions*, Abschnitt 1.3). Daher wurde der Phosphorylierungsgrad mithilfe eines Phosphothreonin-spezifischen Antikörpers immunologisch untersucht (P*-Threonin). Unter HL Bedingungen war die Phosphorylierung der Lhcb2 Proteine in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante deutlich verringert (Abbildung 3.6 [4]).

Das im Sauerstoff-entwickelnden Komplex (OEC = „*oxygen evolving complex*“) beteiligte PsbO Protein war nur um etwa 50 % verringert. Des Weiteren zeigte das Rieske Protein (PetC), eine Untereinheit des Cytochrom b_6/f Komplexes, keine veränderte Abundanz in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich zum WT.

Für Proteine die am Elektronentransport von PSI beteiligt sind, wurden repräsentativ das kernkodierte Lhca1 sowie das plastomkodierte PsaB Protein, als integraler Bestandteil des PSI, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Lhca1 Protein in seiner Abundanz in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht verändert war, während die Menge an PsaB Protein im Vergleich zum Wildtyp um etwa 50 % erniedrigt war. Weiterhin war die kernkodierte PSI-assoziierte Ferredoxin-NADP⁽⁺⁾-Oxidoreduktase (FNR) im Vergleich zum WT deutlich erhöht. Die ATP-Synthase in der Thylakoidmembran, repräsentativ durch die β -Untereinheit (AtpB) getestet, war indessen um etwa 50 % reduziert.

Die Einzelmutanten zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz der untersuchten Proteine im Vergleich zum WT. Interessanterweise sind alle Veränderungen in

der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auf Proteinebene im LL revertiert und die Proteinabundanz mit dem WT vergleichbar.

Zusammenfassend kann abgeleitet werden, dass hauptsächlich plastomkodierte Proteine in ihrer Abundanz im HL verändert waren, während kernkodierte Proteine unverändert zu sein scheinen. Es lässt sich weiterhin feststellen, dass die Veränderungen auf Proteinebene unter den verschiedenen Lichtbedingungen mit der Etablierung des HCF Phänotyps korrelierten. Offenbar ist das reduzierte Φ PSII und Φ PSI im HL auf eine starke Verminderung der PSII bzw. PSI Kernkomplexe in Relation zur LHCI_{II} bzw. LHCI_I Proteinabundanz zurückzuführen. Möglicherweise führt eine starke Veränderung der Proteinstöchiometrie ebenfalls zu einer Veränderung im Aufbau oder Abundanz der am Elektronentransport beteiligten Superkomplexe. Um die möglichen Änderungen in der Superkomplexformierung zu verstehen, wurden diese in einer nativen Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse dieser Analyse werden in folgendem Abschnitt dargestellt.

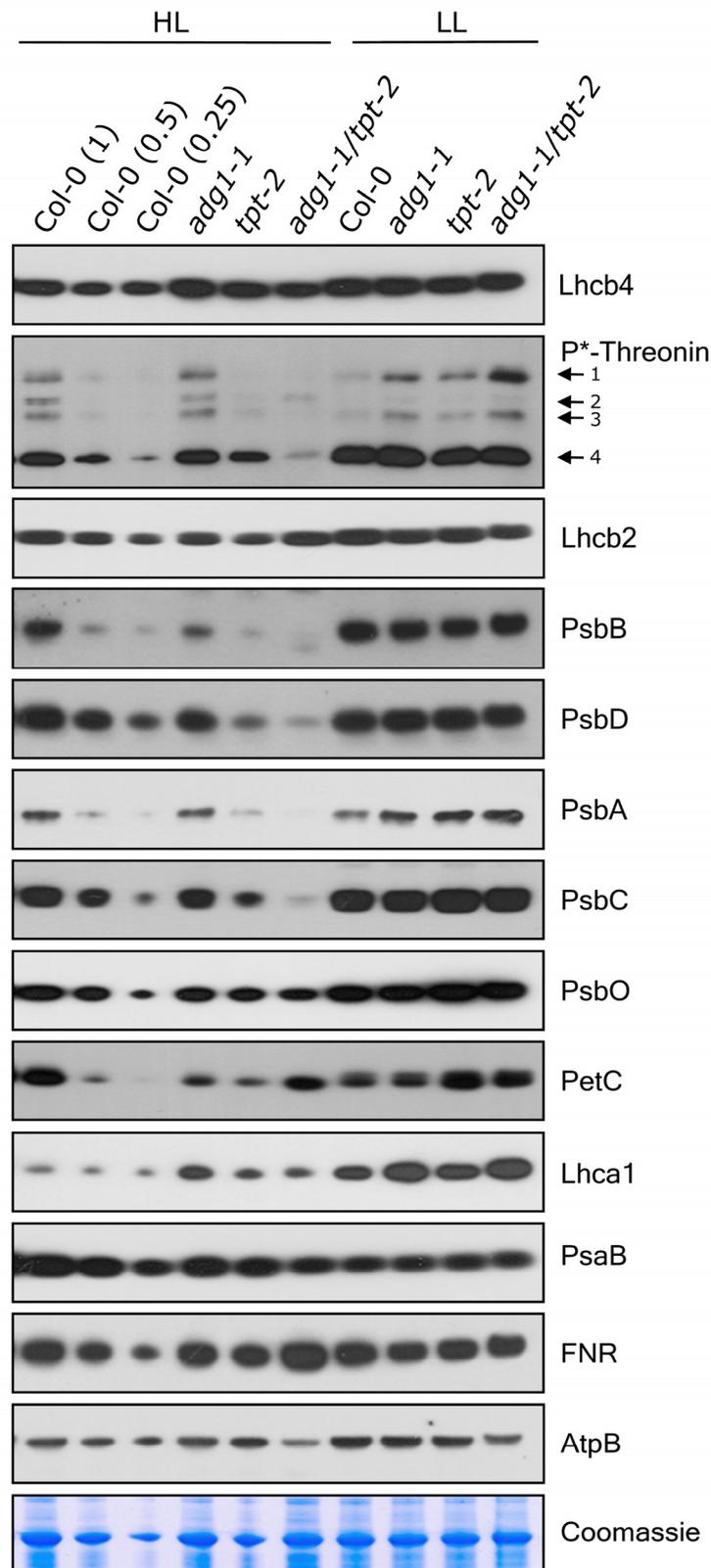


Abbildung 3.6 Immunologischer Nachweis der wichtigsten Photosynthese-assoziierten Proteine im Vergleich von HL und LL angezogenen WT, *adg1-1*, *tpt-2* sowie *adg1-1/tpt-2* Pflanzen. Ein spezifischer Phosphothreonin-Antikörper (P*-Threonin) wurde verwendet um den Phosphorylierungsgrad von (1) PsbC, (2) CaS (*calcium sensing receptor*) Vainonen *et al.* (2008), (3) PsbA/PsbD, (4) Lhcb zu detektieren. Es wurden 10 µg Gesamtprotein in einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt.

3.1.4 Auftrennung der am Elektronentransport beteiligten Superkomplexe

Die native Auftrennung der Membran-integralen Superkomplexe ermöglicht eine detaillierte Betrachtung der strukturellen Änderungen im Elektronentransportsystem bedingt durch die veränderte Abundanz der mit der Photosynthese-assoziierten Proteine. Dazu wurden Thylakoidmembranen von HL angezogenen Pflanzen isoliert, nativ gelöst und in einer BN-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.7). In der relativen Abundanz der Superkomplexe konnten keine Unterschiede zwischen WT und den Einzelmutanten beobachten werden, während die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante eine veränderte Komposition von bestimmten Komplexen relativ zu den LHCII Trimeren (Abbildung 3.7 [7]) aufwies. Der etwa 110 kDa große LHCII Trimer Superkomplex diente in diesem Fall als Referenz für die Abundanz der anderen Superkomplexe.

Die Gehalte der Superkomplexe von PSI sowie PSII Dimer (Abbildung 3.7 [3], ca. 530 kDa) waren in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante deutlich vermindert. Auch für die hochmolekularen PSII Superkomplexe konnte eine verringerte Abundanz beobachtet werden (Abbildung 3.7 [2]). Diese Ergebnisse unterstützten die immunologischen Untersuchungen, welche zeigten, dass die Kernkomplexe der beiden Photosysteme relativ zu Lhcb2 deutlich vermindert sind. Die geringere Phosphorylierung des Lhcb2 Proteins schien hingegen keinen Einfluss auf die Trimerisierung der LHCII Komplexe zu haben.

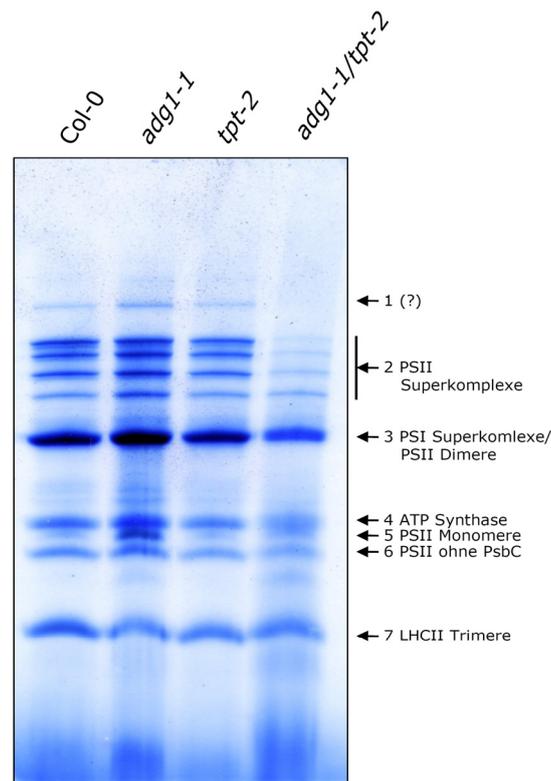


Abbildung 3.7 Proteinsuperkomplexe der Thylakoidmembran von im HL angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sowie den entsprechenden Einzelmutanten und des WT. Die Komplexe wurden mit 2 % DDM solubilisiert und anschließend in einer BN-PAGE (3-12 %) aufgetrennt. Die Proteinsuperkomplexe wurden in der zweiten Dimension in einer denaturierenden SDS-PAGE nach ihren Untereinheiten getrennt und die Superkomplexe (2-7) nach Aro *et al.* (2005) identifiziert. Die Bande (1) wurde aus dem Gel eluiert und die enthaltenen Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert.

Die Auftrennung der Superkomplexe zeigte weiterhin, dass in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante der Superkomplex [1] (>1000 kDa) nicht detektiert werden konnte (Abbildung 3.7). Da dieser Superkomplex nicht eindeutig zugeordnet werden konnte, wurde die WT Bande aus dem Gel eluiert und die darin enthaltenen Proteine massenspektrometrisch (LC-MS/MS) identifiziert. In Tabelle 3.4 sind alle eindeutig identifizierten Proteine zusammengefasst. Diese Proteine lassen sich in drei Hauptkategorien einteilen, (1) NDH-Komplex (NAD[P]H-Plastochinon-Dehydrogenase), (2) PSI-Komplex und (3) PSII-Komplex. Es handelt sich demnach um den NDH-PSI Superkomplex, welcher mit CEF sowie Chlororespiration in Verbindung steht (Rumeau *et al.*, 2007). Diese Identifizierung der Proteine aus dem NDH-PSI Superkomplex stimmt mit den von Peng *et al.* (2009) identifizierten Proteinen überein. Neu identifizierte Proteine hingegen sind DNAJ-HSP sowie ein Protein (*putative MYB-like* TF) mit einer MYB Transkriptionsfaktor ähnlichen Domäne. Beide Proteine besitzen ein putatives Transitpeptid (Aramemnon, Schwacke *et al.*, 2003).

Tabelle 3.4 Zusammenstellung aller mittels LC-MS/MS identifizierten Proteine des >1000 kDa Superkomplexes.

	Protein	Gen	MW ¹ (kDa)	Anzahl Peptide	Abdeckung ² (%)	Punktzahl ³	
NDH- Komplex	NAD7*	AtMg00510	45.5	7	15.3	331.8	
	NDF1*	At1g15980	51	8	18.7	392.4	
	NDF2*	At1g64770	38	5	18.1	221.4	
	NDF6*	At1g18730	12.8	1	9.3	54.4	
	NDH-A	AtCg01100	39.9	2	5	92.3	
	NDH-B.1	AtCg00890	57.1	1	1.8	47.5	
	NDH-D	Atcg01050	56.9	2	4.2	97.2	
	NDH-E	AtCg01070	11.3	1	8.9	70.7	
	NDH-F	AtCg01010	30.5	3	8.5	61.4	
	NDH-I	AtCg01090	20.1	5	25.6	222.2	
	NDH-K	AtCg00430	25.3	5	18.7	203.4	
	NDH-M	At4g37925	24.8	1	9.2	52.6	
	NDH-N	At5g58260	23.4	4	21.5	173.7	
	NDH-O	At1g74880	17.6	1	5.7	42.1	
	NHD-J	AtCg00420	18.5	5	30.4	302.5	
	PPL2*	At2g39470	26.9	4	17.6	170.1	
	PQL1*	At1g14150	22.1	5	21.6	224.9	
	PQL2*	At3g01440	24.8	4	14.5	135.4	
	PSI- Komplex	LHCA1	At3g54890	26	1	5.4	47.1
LHCA3		At1g61520	29.1	6	27.1	296.2	
LHCA4		At3g47470	16.7	2	23	97.5	
LHCA5*		At1g45474	27.8	3	13.7	157.8	
LHCA6		At1g19150	30	3	9.2	59.3	
PSAA		AtCg00350	83.2	4	5.3	191.1	
PSAB		AtCg00340	82.4	5	6.4	285.4	
PSAD-1/-2		At1g03130/At4g02770	22.3	6	22.1	208.9	
PSAE1		At4g28750	11.7	2	19.1	147.7	
PSAF		At1g31330	24.2	6	27.6	375.8	
PSAG		At1g55670	17.1	3	10.6	91.3	
PSAH-1/-2		At1g52230/At3g16140	15.3	2	15.2	95.7	
PSAL		At4g12800	23.1	3	16.4	171.8	
PSAN		At5g64040	18.4	1	5.8	54.2	
PSII- Komplex	LHCB1	At1g29910/At1g29930/At2g34420	25	3	12.9	139.6	
	LHCB4	At5g01530	31.2	2	9.7	112.8	
	LHCB5	At4g10340	30.1	3	12.5	176.7	
	LHCB6	At1g15820	27.5	2	7	60.4	
	PSBA	AtCgt00020	38.9	2	6.5	134.2	
	PSBB	AtCg00680	56	5	12.4	321.5	
	PSBC	AtCg00280	51.8	3	6.8	161.3	
	PSBD	AtCg00270	39.5	4	10.8	199.1	
	PSBE	AtCg00580	9.4	2	22.9	131.3	
	PSBL	AtCg00560	4.5	1	36.8	76.8	
	PSBO-1/-2	At5g66570/At3g50820	35.1	1	2.4	40.5	
	Andere	DNAJ HSP	At5g21430	24.4	4	27.1	232.5
		putative MYB-like TF	At3g04450	48.9	2	4.1	42.8

* Putative neue Untereinheiten des NDH-Superkomplexes (Peng *et al.*, 2009)¹ Theoretische zu erwartende Proteingröße in kDa² Prozentuale Abdeckung der Proteinsequenz durch die identifizierten Peptide³ >38 gilt als eindeutig identifiziert

3.1.5 Untersuchung der Chl α Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K

Bei niedrigen Temperaturen können die charakteristischen Fluoreszenz-Emissionen der Proteinkomplexe von PSII, PSI sowie den assoziierten LHCs differenziert und die Kopplung der LHCs an die Photosysteme detektiert werden. Um die Auswirkungen der drastisch verminderten PSII Kernkomponenten zu analysieren, wurden Aufnahmen der Chl α Fluoreszenz-Spektren bei 77 K an isolierten Thylakoiden der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sowie des WT und der Einzelmutanten durchgeführt. In Abbildung 3.8 sind die aufgenommenen Spektren von 655-800 nm des WT und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante dargestellt.

Während die Emissionsspektren des WT und der Einzelmutanten (nicht gezeigt) identisch waren, wies die Doppelmutante eine charakteristische Verschiebung der Emissionsmaxima der mit PSII assoziierten LHCII (PSII-LHCII) und der mit PSI assoziierten LHCI (PSI-LHCI) auf. Im WT und in den Einzelmutanten besitzt PSII-LHCII ein Emissionsmaximum bei 686 nm, wobei sich eine Emissionsflanke bei 692 nm, verursacht durch CP47, abzeichnet. Emissionssignale bei 686 nm sind typisch für einen excitonisch gut gekoppelten PSII-LHCII Komplex. Die in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auftretende Verschiebung des Emissionsmaximums von 686 auf 684 nm und das Fehlen des PsbB Emissionsmaximums belegte hingegen, dass hier die LHCII mehrheitlich nicht mehr an PSII gebunden sind. Daher wird das PSII-LHCII Signal von der Fluoreszenzemission freier, entkoppelter LHCII überlagert.

Der WT und die beiden Einzelmutanten zeigten ein weiteres Emissionsmaximum bei 731 nm, das typisch für den PSI-LHCI Komplex ist und eine gute Kopplung der LHCI an das PSI belegt. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante lagen hingegen freie, nicht mehr mit PSI gekoppelte LHCI vor. Die Emissionsmaxima ungekoppelter LHCI liegen zwischen 705 und 725 nm, was in der Summe zu einem deutlich erniedrigten und auf 722 nm verschobenen Emissionsmaximum in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante führte.

Ungebundene LHCs, welche ihre Anregungsenergie nicht auf PSII und PSI weiterleiten können, sind hoch-fluoreszent (Barros *et al.*, 2009, Yamane *et al.*, 1997). Offenbar wird ein großer Anteil der Grundfluoreszenz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante von freien, nicht mehr an die Photosysteme gebundenen LHCs emittiert.

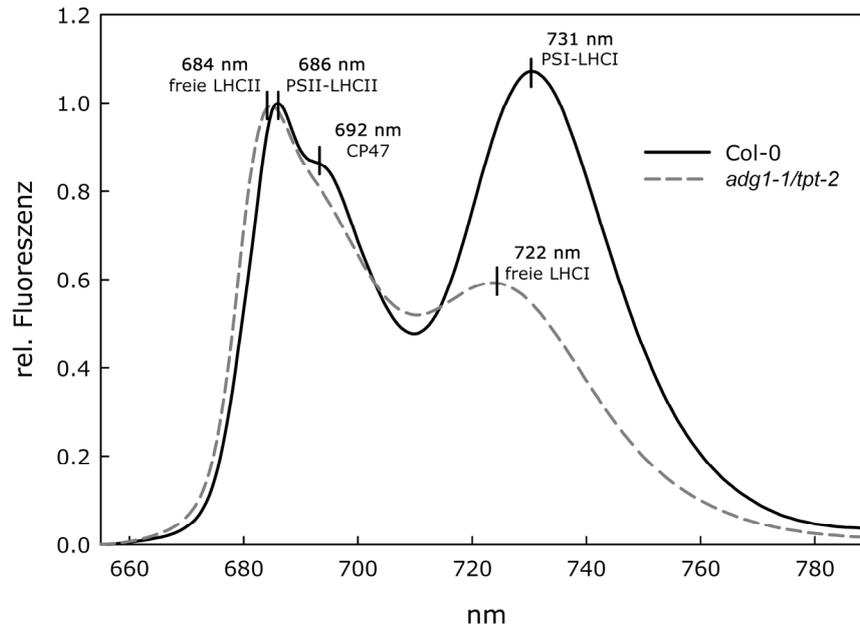


Abbildung 3.8 Relative Chlorophyll *a* Fluoreszenz-Emissions-Spektren von isolierten Thylakoiden des WT (schwarz) und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (grau) bei 77 K. Die Spektren wurden auf das 686 nm Maximum des WT normalisiert.

3.1.6 Aufschlüsselung der erhöhten Chl *a* Fluoreszenz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante

3.1.6.1 Untersuchung der Chl *a* Fluoreszenzlöschung im Licht

Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigte unter HL eine drastische Reduzierung des F_v/F_m -Verhältnisses, verursacht durch eine stark erhöhte Grundfluoreszenz (Abschnitt 3.1.1.1). Diese erhöhte Grundfluoreszenz konnte jedoch bei Induktion der Photosynthese im Licht schnell auf ein ähnliches Niveau wie im WT gelöscht werden (Abbildung 3.9). Über ähnliche Beobachtungen der Fluoreszenzlöschung im Licht sind auch bei einigen weiteren HCF Mutanten berichtet worden, wie zum Beispiel der Cytochrom b559 (*psbE*) Mutante aus *Nicotiana tabacum* (Bondarava *et al.*, 2003; 2010) sowie der ATPase (*AtpC*) Mutante aus *A. thaliana* (DalBosco *et al.*, 2004) und bis heute nicht aufgeklärt.

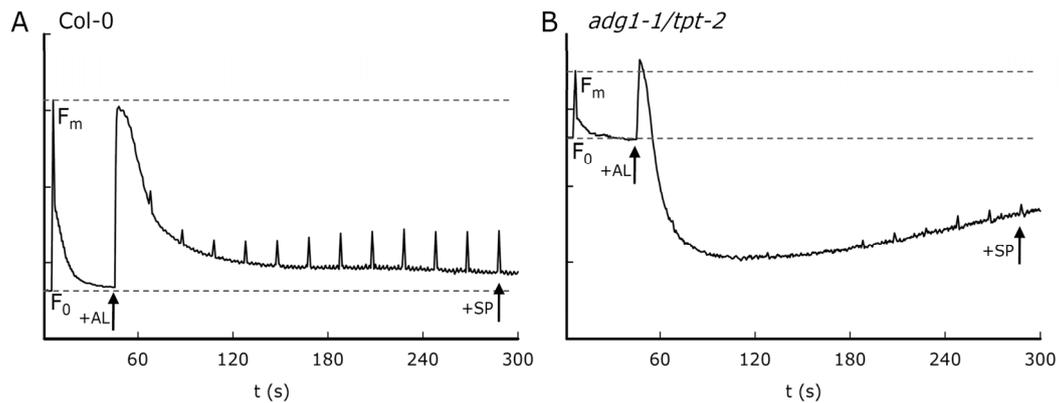


Abbildung 3.9 Verlauf der Chl *a* Fluoreszenz bei Induktion mit Licht des HL angezogenen WT (A) sowie der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (B). Die Induktion erfolgte bei Anzuchtlichtintensitäten von $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (+AL).

Um die Ursachen der Fluoreszenzlöschung im Licht zu analysieren wurden Blätter des WT und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante mit verschiedenen Inhibitoren infiltriert. (1) Tentoxin inhibiert spezifisch die Aktivität der thylakoidalen ATPase und verhindert somit den Abbau des pH-Gradienten. (2) Dithiothreitol (DTT) inhibiert vollständig den Xanthophyllzyklus, welcher ein essentieller Bestandteil von q_E ist. (3) Nigericin ist ein Ionophor, welcher den Aufbau des transthylakoidalen pH-Gradienten verhindert und somit auch die Aktivierung des Xanthophyllzyklus über die Violaxanthin De-Epoxidase. Die Inhibitoren wurden für eine Stunde über die Blattspreite in die Blätter vier Wochen alter Pflanzen infiltriert, und nachfolgend die Induktionskinetik der Chl *a* Fluoreszenz aufgezeichnet (Abbildung 3.10).

Nach der Tentoxinbehandlung zeigte der WT keine Veränderung in der Fluoreszenzlöschung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Durch Behandlung mit dem Ionophor Nigericin konnte hingegen eine geringere Löschung der Fluoreszenz im Licht beobachtet werden, welche in Gegenwart von DTT fast vollständig inhibiert wurde. Ein Großteil der Fluoreszenzlöschung zu Beginn der Induktion der Photosynthese beruht normalerweise auf der Aktivität des Xanthophyllzyklus und der daraus resultierenden Löschung durch die Abstrahlung von Wärme an den LHClIs (q_E ; Abschnitt 1.2) und ist daher mit den Ergebnissen der Inhibitorstudien konsistent.

Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante reagierte bei Tentoxinbehandlung mit einem anfänglich schnelleren Abfall der Fluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es ist anzunehmen, dass durch die Inhibierung der ATPase der transthylakoide pH-Gradient verstärkt wird und die Violaxanthin De-Epoxidase schneller vollständig aktiviert wird. Mit DTT

und Nigericin behandelte Blätter zeigten fast keine Löschung der Fluoreszenz. Offenbar ist die Hauptkomponente der Fluoreszenzlöschung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Licht, unterhalb von F_0 , das q_E an den ungebundenen LHCII.

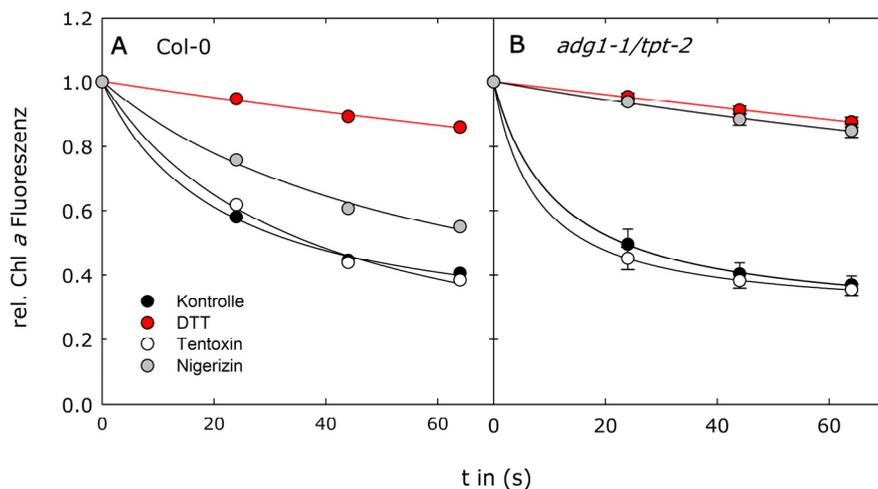


Abbildung 3.10 Einfluss der Inhibitoren Tentoxin (weiß), Nigericin (grau) und Dithiothreitol (DTT, rot) auf die Chl *a* Fluoreszenzlöschung im Licht ($500 \mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Vier Wochen alte Blätter des WT (A) und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (B) wurden mit den jeweiligen Inhibitoren infiltriert und nach anschließender Dunkelinkubation wurde die Induktionskinetik in der *PAM2100* aufgezeichnet. Die Chl *a* Fluoreszenzwerte wurden zur vereinfachten Darstellung auf $F_m (=1)$ normalisiert.

3.1.6.2 Untersuchung zur Chl *a* Fluoreszenzlöschung bei Bestrahlung mit dunkelrotem Licht

Die erhöhte Grundfluoreszenz der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante wurde in Häusler *et al.* (2009) als ein erhöhter Reduktionsgrad des PQ-Pools gedeutet. In einem reduzierten System kann durch eine FR-Bestrahlung der Abfluss der Elektronen durch spezifische Anregung von PSI induziert werden. Versuche mit der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante konnten zeigen, dass die Fluoreszenz zu einem Teil unter FR-Bestrahlung gelöscht wurde (Häusler *et al.*, 2009). Weitere Fluoreszenzkinetiken der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wurden daher unter Verwendung der in Abschnitt 3.1.6.1 beschriebenen Inhibitoren aufgezeichnet (Abbildung 3.11).

Im WT konnte keine deutliche Änderung der Fluoreszenzkinetik in Abhängigkeit von den jeweiligen Inhibitoren bei FR-Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 3.11 A-D). Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigte hingegen, sowohl nach Infiltrierung mit DTT, als auch mit Nigericin keine Fluoreszenzlöschung unter FR-Bestrahlung mehr, sondern im Gegenteil sogar eine Erhöhung (Abbildung 3.11 E-G).

Die Infiltration mit Tentoxin führte hingegen zu einer Verstärkung der Fluoreszenzlöschung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (Abbildung 3.11 H). Des Weiteren wurde bei erneuter Bestimmung von F_m' im FR eine Verringerung der variablen Fluoreszenz (F_v) beobachtet, deren Verringerung exakt dem Anteil der Fluoreszenzlöschung durch FR entsprach (Abbildung 3.10 H). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fluoreszenzlöschung nicht nur im Licht, sondern auch im FR-abhängig von einem Aufbau des transthylakoidalen pH-Gradienten und des damit verbundenen q_E ist. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass eine Fluoreszenzlöschung deutlich langsamer voranschreitet, als es bei einer Re-Oxidation des PQ-Pools zu erwarten wäre (Bukhov *et al.*, 1999).

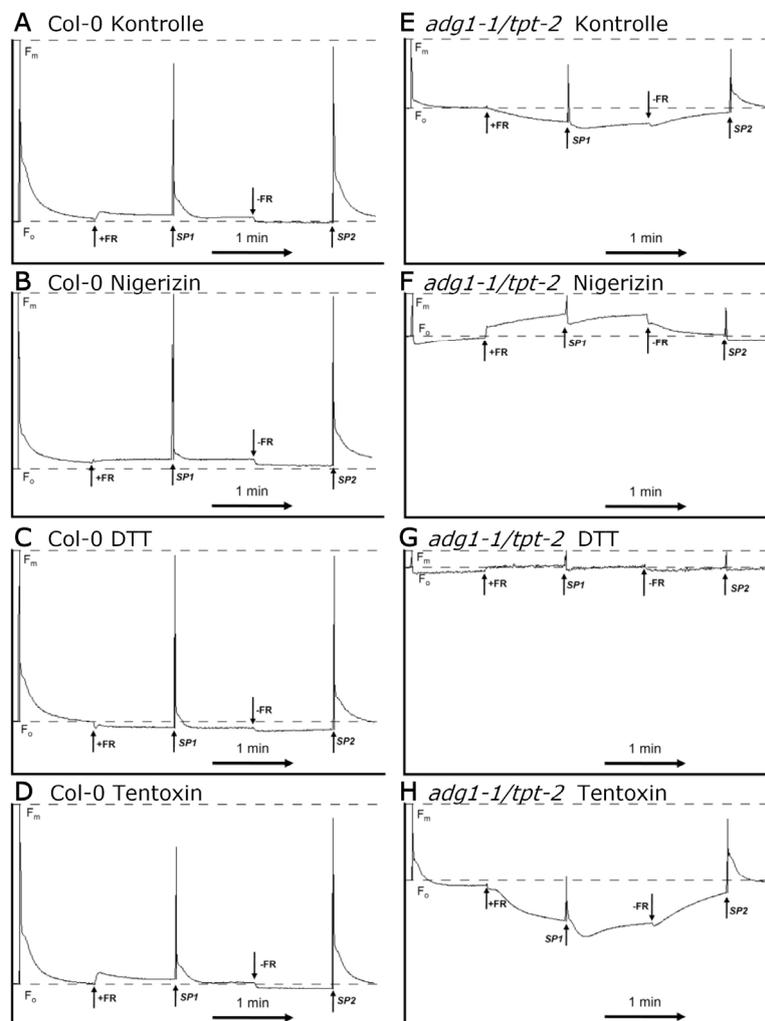


Abbildung 3.11 Chl *a* Fluoreszenzkinetiken bei verschiedenen Inhibitorbehandlungen und fernrotem Licht (FR). Vier Wochen alte Blätter des WT (A-D) und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (E-H) wurden mit Tentoxin, Nigericin und DTT (Dithiothreitol) infiltriert und nach anschließender Dunkelinkubation die Induktionskinetik in der *PAM2100* aufgezeichnet. SP = Lichtsättigungspuls, +=an, -=aus.

3.1.6.3 Zerlegung der absoluten Chl *a* Fluoreszenz in ihre Komponenten

Durch die Messungen der Chl *a* Fluoreszenz bei 77 K wurde belegt, dass die LHC beider PS mehrheitlich nicht mehr an die Reaktionszentren gebunden sind. Um den Anteil ungebundener LHCs an der erhöhten Grundfluoreszenz zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzkinetiken nach Zuschalten von dunkelrotem Licht (FR) und aktinischem Licht (AL) aufgezeichnet. Nach der F_0 und F_m Bestimmung wurden die Blätter der HL angezogenen Pflanzen mit FR bestrahlt. Während die Fluoreszenz des WT bei FR-Bestrahlung unverändert blieb, wurde die Fluoreszenz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zu einem Teil gelöscht, kehrte aber nach dem Ausschalten des FR Lichtes wieder zurück (Abbildung 3.12 A-B).

Unter starker AL-Bestrahlung ($PFD = 4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) wurde die Chl *a* Fluoreszenz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante deutlich gelöscht und erreichte ein Niveau, welches mit dem WT vergleichbar war. Diese schnelle Fluoreszenzlöschung im Licht (siehe auch Abbildung 3.9) unterhalb von F_0 ist, wie in Abschnitt 3.1.6.1 gezeigt, vermutlich auf q_E an den LHCIIs zurückzuführen. Auch hier erholte sich die Fluoreszenz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nach Ausschalten des AL wieder. Bei erneuter F_m Bestimmung im Dunkeln zeigte die variable Fluoreszenz F_v eine drastische Reduktion im Vergleich zum Beginn der Messung. Die FR-Bestrahlung hatte in diesem Fall keinen Effekt mehr auf die Fluoreszenz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante.

Mithilfe der Fluoreszenzkinetiken lassen sich nun die relativen Anteile der Komponenten an F_m bestimmen (Abbildung 3.12 C). Der Anteil der Fluoreszenzlöschung durch FR (Q_{FR}), der Anteil der Fluoreszenzlöschung durch AL (freie LHC), die gemessene Grundfluoreszenz (F_0) nach Ausschalten von AL und die restliche variable Fluoreszenz ($F_{v\max}$) wurden proportional zu F_m (auf eins normalisiert) berechnet. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante lag der Anteil der freien LHCs an der Fluoreszenz bei etwa 30 %, wohingegen diese Komponente im WT nicht vorkam. Interessanterweise wird auch ein Anteil der Fluoreszenz durch FR-Bestrahlung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante gelöscht. Wie jedoch auch schon in Abschnitt 3.1.6.1 und 3.1.6.2 beschrieben, handelt es sich hierbei ebenfalls um eine Fluoreszenzlöschung durch q_E .

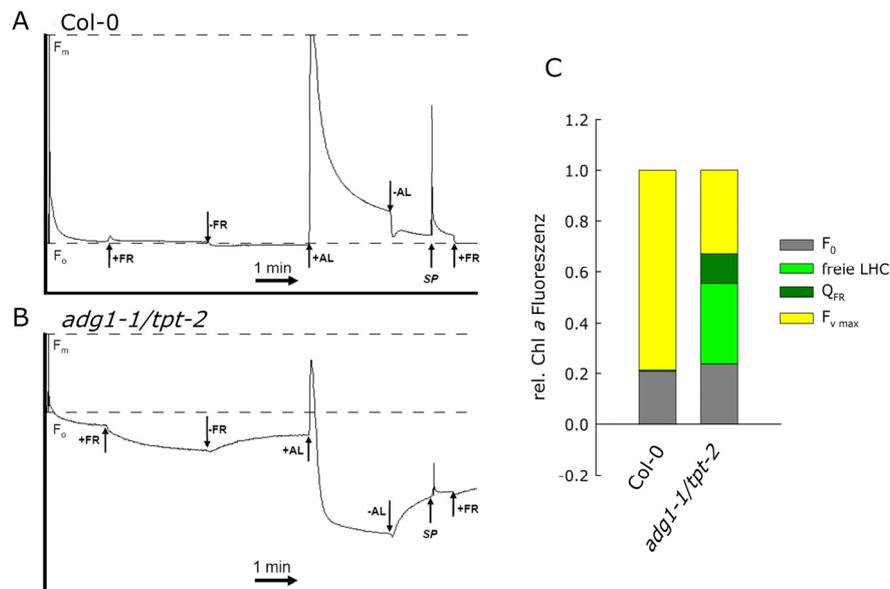


Abbildung 3.12 Darstellung der einzelnen Komponenten der absoluten Chl *a* Fluoreszenz im WT (A) und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (B). Der Verlauf der Chl *a* Fluoreszenzkurven bei dunkelrotem Licht (FR) und aktinischem Licht ($AL = 4000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und des WT. SP = Lichtsättigungspuls, +=an, -=aus (C) Relative Anteile der Chl *a* Fluoreszenz Komponenten: Q_{FR} = Anteil der Fluoreszenzlöschung durch FR, freie LHC = der Anteil der Fluoreszenzlöschung durch AL, F_0 = gemessene Grundfluoreszenz nach Ausschalten von AL und (F_{vmax}) restliche variable Fluoreszenz.

3.2 BETRACHTUNG DES HCF PHÄNOTYPS DER *ADG1-1/TPT-2* DOPPELMUTANTE IM METABOLISCHEN KONTEXT

Da die eingeführten Mutationen von *adg1-1* und *tpt-2* in den Metabolismus der Pflanze eingebunden sind, ergibt sich die Frage, wie diese zu einer solch drastischen Umorganisation der Photosynthese auf molekularer Ebene im HL führen können. Der Abfluss der primären Produkte des Calvinzyklus in die Energie verbrauchenden konkurrierenden Prozesse, Saccharosebiosynthese oder Stärkebiosynthese, ist in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante inhibiert. Es wurde bereits gezeigt, dass im Licht schon die Beschränkung des TP Exportes allein einen erhöhten Stärkeumsatz zur Folge hat. Das Fehlen einer funktionsfähigen Stärkebiosynthese hingegen führt zu einer Akkumulation löslicher Zucker (Schneider *et al.*, 2002; Kunz *et al.*, 2010). Demzufolge muss die Blockierung des Tag- sowie Nachtexports der Photoassimilate aus dem Chloroplasten zu einer starken Störung des Kohlenhydratmetabolismus in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante führen. Diese Störungen im Chloroplasten könnten ursächlich für den HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sein.

3.2.1 Überblick über den Kohlenhydratstoffwechsel im Hochlicht

Um einen Einblick in den Kohlenhydratstoffwechsel der untersuchten Mutanten und des WT HL Bedingungen zu erhalten, wurden die Konzentrationen der löslichen Zucker Saccharose (Suc), Glukose (Glc), Fruktose (Fru), sowie die Konzentration der Stärke im Tagesverlauf bestimmt (Abbildung 3.13). Der Stärkepool der *tpt-2* Mutante war im Vergleich zum WT nahezu verdoppelt und nach der Nachtphase nicht vollständig aufgebraucht. Da die TP hier nicht ins Zytosol in die Saccharosebiosynthese abfließen können, werden die aufgebauten Triosephosphate aus dem Calvinzyklus für die Stärkebiosynthese verwendet. Daher waren die Gehalte an löslichen Zuckern der *tpt-2* Mutante im durchschnittlich geringer als im WT. Es kommt jedoch zu einem Abbau der transitorischen Stärke schon im Licht, deren Produkte über den Maltoseexporter (Niittylä *et al.*, 2004) und den Glukosetransporter ins Zytosol gelangen (Weber *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2004). Die *adg1-1* sowie *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten waren hingegen aufgrund ihrer Mutation im Schlüsselenzym der Stärkebiosynthese nicht in der Lage, signifikante Mengen an Stärke aufzubauen (Abbildung 3.13 B). Während die *adg1-1* Mutante daher im Tagesverlauf bis zu vierfach höhere lösliche Zuckergehalte als der WT akkumulierte, waren in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante die löslichen Zucker im Vergleich zum WT konstant um etwa 50 % erniedrigt.

Der Abfluss der primären Produkte des Calvinzyklus in die Energie verbrauchenden konkurrierenden Prozesse, Saccharosebiosynthese oder Stärkebiosynthese, ist in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante inhibiert. Demnach sind zwei weiterführende Szenarien vorstellbar, die einen Zusammenhang zwischen der Störung im Kohlenhydratstoffwechsel und der Inhibierung der Photosyntheseeffizienz in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante herstellen könnten: (1) Phosphorylierte Intermediate des Calvinzyklus stauen sich im Chloroplasten an, parallel hierzu ist der Import von freiem anorganischen Phosphat (P_a) stark erniedrigt. Die verringerten P_a Gehalte in den Chloroplasten könnten sich negativ auf die ATPase Aktivität auswirken und, neben einer Verschiebung der ATP/ADP-Verhältnisse, die Effizienz der Photosynthese reduzieren. (2) Der inhibierte Export von primären Produkten des Calvinzyklus sowie den fehlenden Stärkeabbauprodukten aus den Chloroplasten könnte zu einer starken Verminderung der Konzentration löslicher Zucker im Zytosol führen, welche wiederum notwendig für eine mögliche Zucker-abhängige Signalgebung sein könnten. Um beide Szenarien näher zu untersuchen, wurde im Folgenden der zelluläre Energiestatus anhand der

ATP/ADP-Verhältnisse bestimmt sowie der Effekt exogen zugeführter Saccharose auf die Photosyntheseeffizienz der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante untersucht.

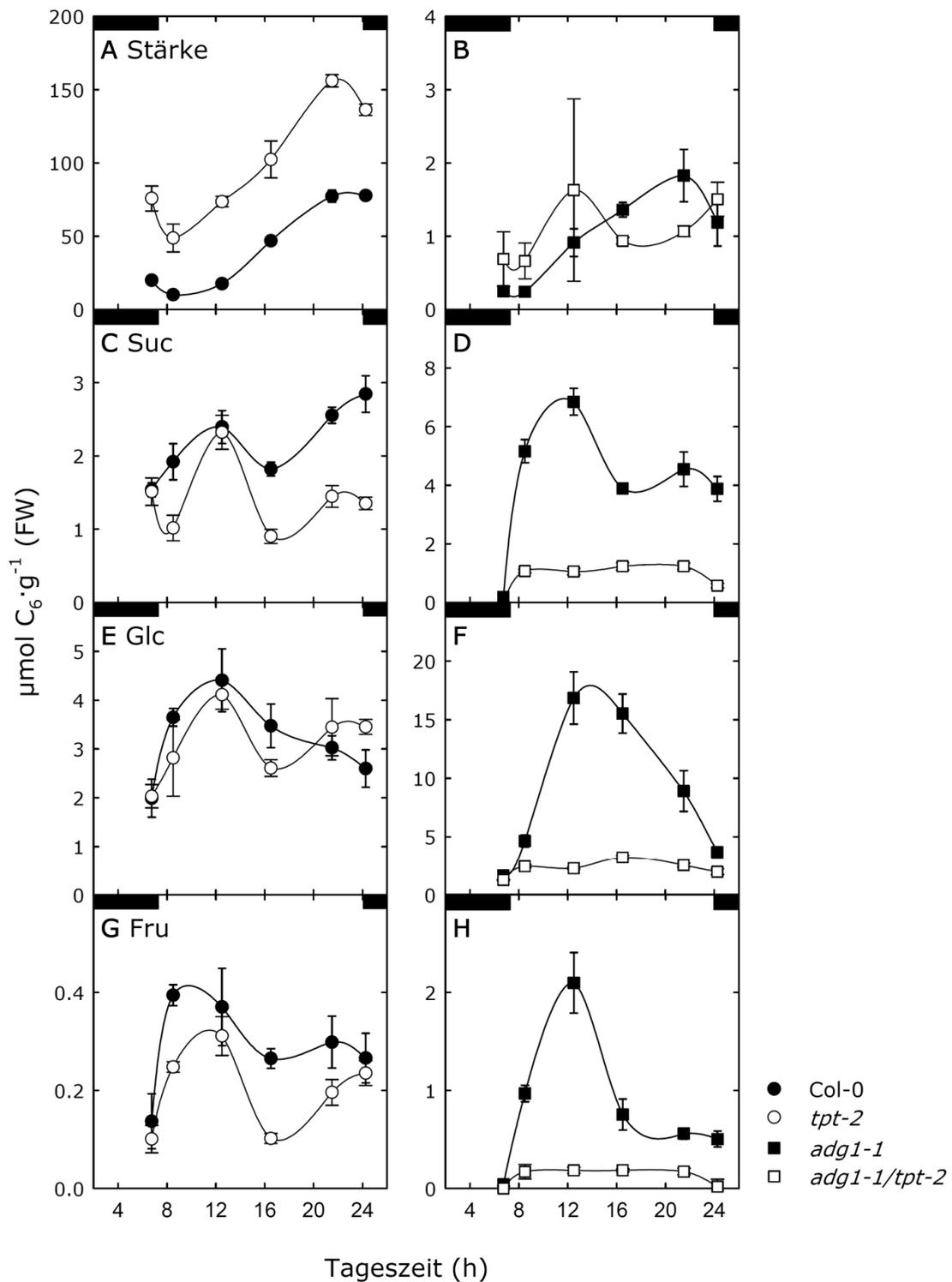


Abbildung 3.13 Diurnale Änderungen des Stärke- (A-B), Saccharose- (C-D), Glukose- (E-F) und Fruktose- (G-H) Gehaltes im Blatt beim WT, *tpt-2*, sowie *adg1-1* und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Die Pflanzen wurden in einem Tag-/Nachtrhythmus von 16/8 h im HL für vier Wochen angezogen. n = 3, \pm SE

3.2.2 Betrachtung der ATP/ADP Gehalte zur Überprüfung des zellulären Energiestatus

Möglicherweise kommt es, durch den Rückstau an phosphorylierten Intermediaten des Calvinzyklus, zu einer Verringerung an freiem P_a im Chloroplasten. Photophosphorylierung und die CF1-ATPase Aktivität sind sensitiv gegenüber einer veränderten P_a Konzentration, und können inhibiert werden, wenn die P_a Konzentrationen sinken (Pammenter *et al.*, 1993). Dies wiederum führt zu einer Verschiebung der ATP/ADP-Verhältnisse und einer Reduktion der Photosyntheseeffizienz (Labate und Leegood, 1988; Leegood und Furbank, 1986).

Vergleichende Analysen des ATP, ADP sowie AMP Gehaltes von unter HL und LL angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten sowie des entsprechenden WT sollten Aufschluss über den zellulären Energiestatus geben. Überraschenderweise waren die gemessenen absoluten Gehalte von ATP und ADP bezogen auf das Blattfrischgewicht der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante weder im HL noch im LL im Vergleich zum WT stark verändert (Abbildung 3.14 A-B). Der AMP Gehalt der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante war unter HL Bedingungen um 50 % verringert. Die ATP/ADP-Verhältnisse waren im WT ($1,76 \pm 0,09$) im Vergleich zur *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante ($1,78 \pm 0,15$) im HL kaum verändert (Abbildung 3.14 C). Im LL kam es zu einer leichten Reduzierung der ATP/ADP-Verhältnisse zwischen WT und Doppelmutante.

Die Einzelmutanten wiesen im HL ein deutlich höheres ATP/ADP-Verhältnis als der WT auf. Der gemessene ATP Gehalt war um das 1,3-fache erhöht. Im LL konnte nur noch in der *adg1-1* Mutante eine Erhöhung der ATP und ADP Gehalte beobachtet werden. In allen Pflanzenlinien waren die absoluten Gehalte von ATP und ADP im LL um bis zu 75 % im Vergleich zum HL erniedrigt.

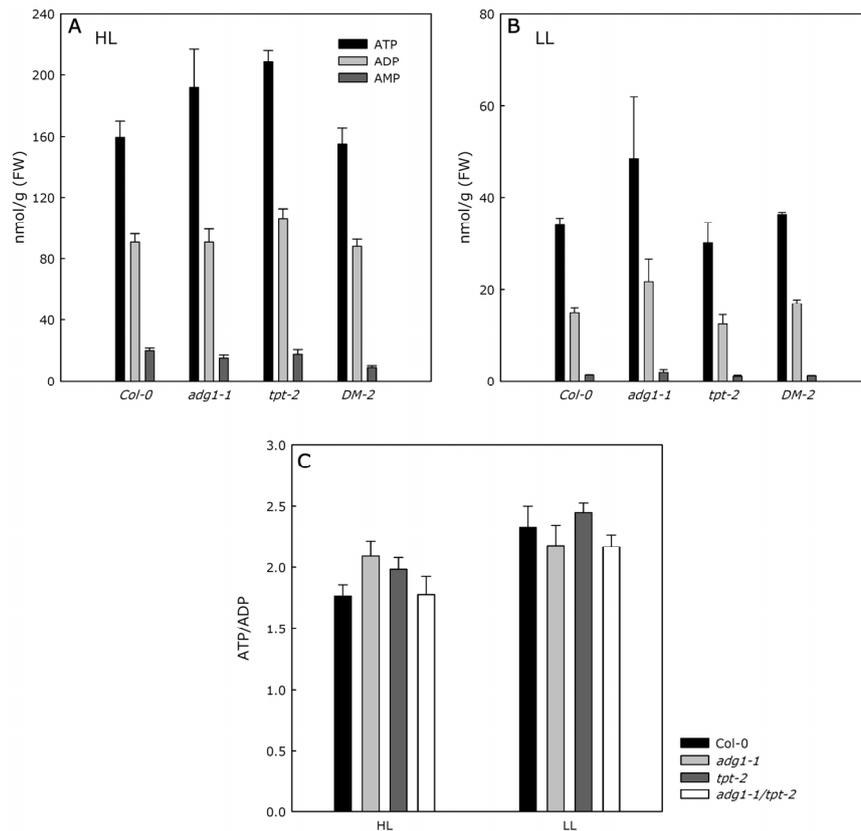


Abbildung 3.14 Absolute ATP, ADP, und AMP Gehalte pro g Frischgewicht (FW) im Blatt der Mutanten und des WT im Vergleich von HL (A) und LL (B). Darstellung des aus den absoluten Gehalten berechnete ATP/ADP-Verhältnis (C). Vier Wochen alte Pflanzenrosetten wurden 4 h nach Tagesanbruch geerntet. $n = 3-6$, \pm SE.

3.2.3 Effekte von exogen gefütterter Saccharose auf den Wachstums- und HCF Phänotyp

Aus den zuvor dargestellten Ergebnissen lässt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem HCF Phänotyp und der Verringerung der Gehalte an löslichen Zuckern in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL erkennen. Um Effekte durch eine mögliche fehlende Zucker-abhängige Signalgebung näher zu untersuchen, wurden von Beginn der Keimung die Pflanzenlinien auf $\frac{1}{2}$ MS Agar mit zugesetzter 50 mM Saccharose angezogen.

Die Saccharosefütterung zeigte schon bei einfacher makroskopischer Betrachtung einen deutlichen Einfluss auf den Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (Abbildung 3.15). Der Rosettendurchmesser war im Vergleich zur nicht gefütterten Kontrolle deutlich vergrößert und die Blattpigmentierung war verstärkt. Daher wurde die Ausprägung des HL-abhängigen

Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante anhand der Chl Gehalte und der Chl *a* Fluoreszenz genauer analysiert.

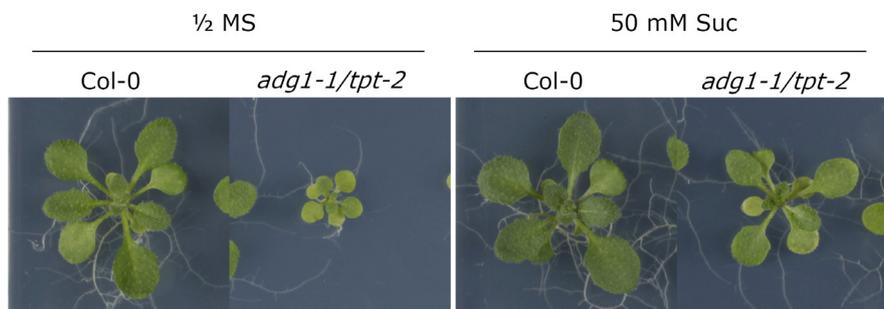


Abbildung 3.15 Veränderung des HL-abhängigen Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nach Fütterung von 50 mM Saccharose. Der WT und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wurden für vier Wochen im HL auf ½ MS Agarplatten sowie auf ½ MS Agarplatten mit 50 mM Saccharose (Suc) angezogen.

In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse der Photosynthesepigmentbestimmungen für die auf Saccharose (Suc) angezogenen Pflanzen als auch der entsprechenden Kontrollen zusammengefasst. Die Chl und Car Gehalte der auf ½ MS Medium angezogenen Pflanzen waren mit denen auf Erde vergleichbar und in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante um 35-40 % verringert. Das Chl *a/b* Verhältnis lag mit $2,22 (\pm 0,08)$ deutlich unterhalb des WT mit $3,02 (\pm 0,14)$. Die exogene Saccharosefütterung führte zu einer Erhöhung der Chl Gehalte auf WT-Niveau, während die Car Gehalte sogar die des WT übertrafen. Auch das Chl *a/b* Verhältnis war in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante mit einem Wert von $2,66 (\pm 0,03)$ deutlich gegenüber der nicht gefütterten Kontrolle erhöht.

Tabelle 3.5 Vergleichende Übersicht der gemessenen Chlorophyll- und Carotinoidgehalte bei Saccharoseanzucht der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sowie des WT. Die Pflanzen wurden für vier Wochen im HL auf ½ MS oder 50 mM Saccharose (Suc) angezogen.

½ MS			
	Chl µg/g	Chl <i>a/b</i>	Car µg/g
Col-0	1428,87 ± 102,96	3,02 ± 0,14	51,28 ± 4,03
<i>adg1-1/tpt-2</i>	848,78 ± 141,66	2,22 ± 0,08	34,38 ± 6,03
50 mM Suc			
Col-0	1644,24 ± 214,17	2,87 ± 0,06	49,83 ± 7,69
<i>adg1-1/tpt-2</i>	1551,26 ± 214,16	2,66 ± 0,03	59,26 ± 8,95

n = 4, ± SD

Die überraschende Rettung des Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nach Saccharosefütterung konnte auch anhand der veränderten Photosyntheseparameter detektiert werden. So war das F_v/F_m -Verhältnis bei exogener Saccharosefütterung im Vergleich zu den Kontrollen auf $\frac{1}{2}$ MS deutlich erhöht, was auf eine Reduzierung der Grundfluoreszenz F_0 zurückzuführen war (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Zusammenstellung der Chl *a* Fluoreszenz Parameter bei Saccharoseanzucht der *adg1-1/tpt-2* und des WT. Die Pflanzen wurden für vier Wochen im HL auf $\frac{1}{2}$ MS oder 50 mM Saccharose (Suc) angezogen.

$\frac{1}{2}$ MS			
	F_v/F_m	F_0	F_m
Col-0	0,756 ± 0,004	0,065 ± 0,005	0,268 ± 0,016
<i>adg1-1/tpt-2</i>	0,509 ± 0,082	0,141 ± 0,037	0,285 ± 0,039
50 mM Suc			
Col-0	0,805 ± 0,008	0,052 ± 0,004	0,268 ± 0,013
<i>adg1-1/tpt-2</i>	0,698 ± 0,093	0,088 ± 0,036	0,288 ± 0,032

n = 9, ± SD

3.2.3.1 Untersuchung der Transkription des GPT2 bei exogen zugeführter Saccharose

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, führten die Zuckerfütterung zu einer teilweisen Komplementation des HL Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Die Zuckerfütterung scheint bestimmte fehlende Signale für die HL-Akklimatisierung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zu kompensieren. Jedoch ist theoretisch auch eine Beteiligung des Glukose-6-Phosphat/Phosphat Translokators (GPT2) an der Rettung des Phänotyps möglich. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass der GPT2 neben seiner eigentlichen Transportaktivität von Glc6P auch eine Affinität zu TP und 3-PGA besitzt (Kammerer *et al.*, 1998).

Normalerweise wird der GPT2 im WT nur in heterotrophen Geweben wie Blüten, Schoten und Wurzeln exprimiert (Niewiadomski *et al.*, 2005). In Blättern von Mutanten der Stärkebiosynthese wie z.B. der *adg1-1*, *pgi1-1* oder *pgm* Mutante konnte jedoch eine transkriptionelle und funktionelle Aktivierung des GPT2 nachgewiesen werden (Kunz *et al.*, 2010). Die erhöhten Gehalte an freien Zuckern der stärkefreien Mutanten könnten als Signal für die Induktion des GPT2 wirken, da bereits gezeigt wurde, dass eine Transportaktivität für

Glc6P in isolierten Chloroplasten mit exogener Bereitstellung von Saccharose korreliert (Quick *et al.*, 1995). Daher könnte eine erhöhte GPT2 Transportaktivität durch exogen zugeführte Saccharose die fehlende TPT Transportaktivität in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante kompensieren. Es wurde untersucht, ob der GPT2 auf transkriptioneller Ebene in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei Saccharosefütterung hochreguliert wird.

Für die Transkriptmengenbestimmung mittels qPCR wurden die Pflanzenlinien für vier Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS Agar sowie $\frac{1}{2}$ MS Agar mit 50 mM Saccharose angezogen. Die Expression des GPT2 wurde mit dem Primerpaar RL_gpt-2_fwd/rev detektiert und gegen UBC mit dem Primerpaar RL_UBC_fwd/rev als endogene Kontrolle normalisiert.

Die in Abbildung 3.16 zusammengefassten relativen Transkriptmengen zeigen nicht nur eine Induktion der GPT2 Transkripte um das 2-fache im WT, sondern auch eine dramatische Hochregulation um das 9-fache in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante als Antwort auf exogen gefütterte Saccharose.

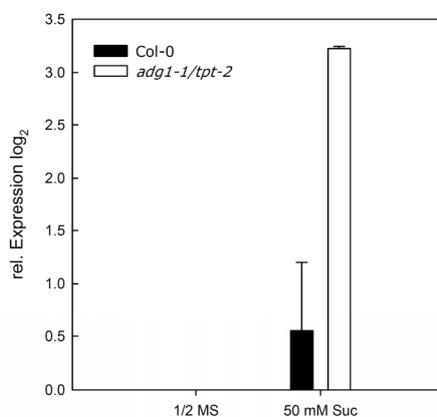


Abbildung 3.16 Relative Expression des GPT2 unter Einfluss exogen gefütterter Saccharose. Der WT (schwarz) und die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (weiß) wurden für vier Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS sowie $\frac{1}{2}$ MS mit 50 mM Saccharose (Suc) angezogen. Dargestellt sind die logarithmierten relativen Veränderungen in Bezug auf die $\frac{1}{2}$ MS Kontrollen.

3.2.3.2 Generierung und Analyse der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Tripelmutante bei exogen zugeführter Saccharose

Um eine Beteiligung des GPT2 an der Rettung des Phänotyps zu verifizieren, wurde eine *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Tripelmutante generiert. Wäre die gesteigerte GPT2 Aktivität für die Rettung des Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante verantwortlich, sollte eine

Komplementation des HL Phänotyps durch exogene Saccharosefütterung in der Tripelmutante unterbunden werden.

Nach dem Einkreuzen der *gpt2-1* Mutante (Niewiadomski *et al.*, 2005) in die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wurde in den Filialgenerationen die Homozygotie für die T-DNA in den Genloci *TPT* sowie *GPT2* durch PCR mit dem Primerpaare *g_tpt-2_fwd/rev* und *Salk_LB* sowie *g_gpt-2_fwd/rev* und *GK_LB* bestätigt (Abbildung 8.2 A, C). Das Fehlen der Aktivität der AGPase wurde durch eine Stärkefärbung im Blatt nachgewiesen (Abbildung 8.1 F).

Die verifizierte Tripelmutante wurde im Vergleich mit dem WT und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL auf $\frac{1}{2}$ MS und $\frac{1}{2}$ MS mit 50 mM Saccharose angezogen und eventuelle Veränderungen des Phänotyps anhand der *Chl a* Fluoreszenzparameter detektiert. Im Vergleich der Tripelmutante mit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante konnten unter $\frac{1}{2}$ MS Anzucht keine Veränderungen des Phänotyps festgestellt werden (Abbildung 3.17 A-B). Das Wachstum sowie F_v/F_m -Verhältnis waren vergleichbar mit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Bei exogener Saccharosefütterung zeigte sich, dass auch in der Tripelmutante die gleichen phänotypischen Änderungen eintraten. Der Rosettendurchmesser war vergrößert und das F_v/F_m -Verhältnis war im Vergleich zur $\frac{1}{2}$ MS Anzucht, wie in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante erhöht (Abbildung 3.17 C-D). Bei der Betrachtung der F_v/F_m -Verhältnisse in Falschfarben wurde deutlich, dass die jüngeren Rosettenblätter besser auf die exogen zugeführte Saccharose reagierten als die älteren Blätter.

Folglich ist die Induktion des GPT2 eine Konsequenz der Saccharosefütterung, jedoch nicht Ursache der Abmilderung des *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten Phänotyps.

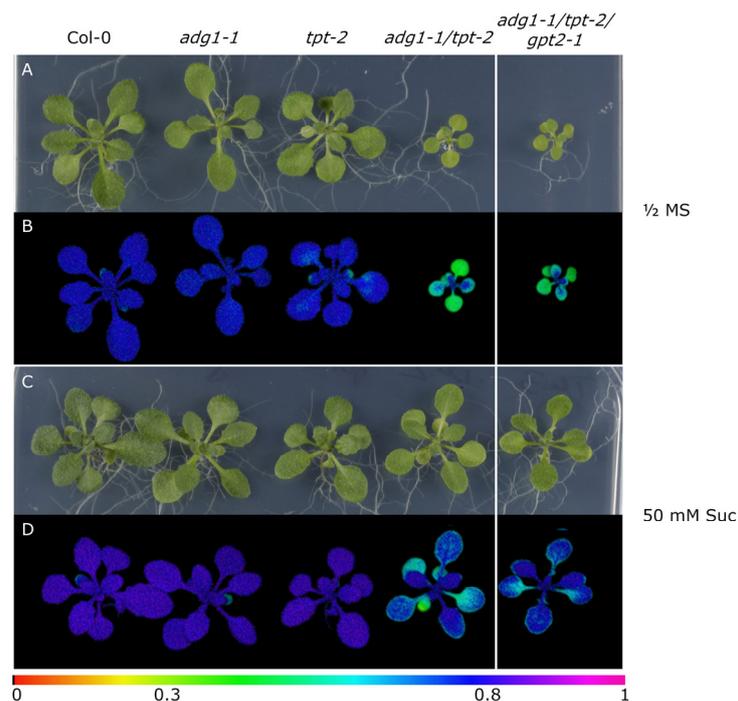


Abbildung 3.17 Einfluss exogener Saccharose auf den HCF Phänotyp in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und der *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Tripelmutante. Der WT, die *adg1-1* und *tpt-2* Einzelmutanten und die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wurden für vier Wochen auf $\frac{1}{2}$ MS sowie $\frac{1}{2}$ MS mit 50 mM Saccharose (Suc) im Vergleich zur Tripelmutante unter HL Bedingungen angezogen (A, C). Das F_v/F_m -Verhältnis wurde mithilfe der *ImagingPAM* aufgenommen und in Falschfarben dargestellt (B, D). Der farbige Balken beschreibt den verwendeten Farbcode der F_v/F_m -Verhältnisse.

3.2.4 Analyse weiterer Stoffwechselmutanten mit ähnlichem HCF Phänotyp

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, zeigte die Doppelmutante, die in Enzymen bzw. Transportern für Intermediate des primären Kohlenstoffwechsels defizient ist, eine starke Reduktion der Photosyntheseeffizienz unter HL Bedingungen. Um die Ursachen dieser phänotypischen Ausprägung weiter zu charakterisieren, sollten zusätzliche Mutanten generiert werden, die in verschiedenen Enzymen oder Transportern des Stärkemetabolismus Defekte aufweisen.

3.2.4.1 Generierung und Analyse von weiteren Doppelmutanten mit Defekten im Stärkemetabolismus und im Triosephosphat-Transport

Neben der *adg1-1* Mutante, sind weitere Mutanten in der Stärkebiosynthese bzw. im Stärkekatabolismus (Abschnitt 1.5) bereits bekannt und charakterisiert. Dazu zählen Mutanten mit Defekten in der Phosphoglucoseisomerase (*pgi1-1*; Yu *et al.*, 2000), in der Phosphoglucosemutase (*pgm1*; Kofler *et al.*, 2010), in der Glukan-Wasser-Dikinase

(*sex1-3 = starch excess*; Yu *et al.*, 2001) und des Maltoseexporters (*mex1-2 = maltose excess*; Niittylä *et al.*, 2004). Bei *sex1-3* und *mex1-2* handelt es sich um Mutanten, die aufgrund der Inhibition des Stärkeabbaus substantielle Mengen transitorischer Stärke im Chloroplasten akkumulieren. Weiterhin konnte Niittylä *et al.* (2004) zeigen, dass die *mex1-2* Mutante Maltose, das Hauptexportprodukt aus dem Stärkeabbau, in der Nacht in den Chloroplasten akkumuliert.

Die Mutanten *pgi1-1*, *pgm1*, *sex1-3* und *mex1-2* wurden in die *tpt-2* Mutante eingekreuzt und die Homozygotie der T-DNA Insertion für den Genlocus *TPT* mit den Primerkombinationen *g_tpt-2_fwd/rev* und *Salk_LB* bestätigt (Abbildung 8.2 A-B). Die Homozygotie für die Mutation in der PGI bzw. PGM wurde durch die Färbung der Stärke am Ende der Lichtperiode nachgewiesen. Die Homozygotie für die Mutation in der SEX1 bzw. im MEX1 wurde durch die Färbung der Stärke am Ende der Dunkelperiode bestätigt. (Abbildung 8.1 B-D). Durch die Arbeiten von Cho *et al.* (2010) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kreuzung der *tpt-2* Mutante mit der *mex1-2* Mutante zu einem schweren Wachstumsphänotyp mit einer gleichzeitigen Veränderung der Photosyntheseeffizienz führt. Die Studien der Änderungen der Photosyntheseeffizienz sollten hier im Detail weiterführend analysiert werden.

Alle generierten Doppelmutanten wurden in Abhängigkeit von HL auf die Ausprägung des *adg1-1/tpt-2* Phänotyps hin untersucht. Die stärkefreien Doppelmutanten *pgi1-1/tpt-2* und *tpt-2/pgm1* zeigten den gleichen Wachstums- und HCF Phänotyp wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (Abbildung 3.18 A, Tabelle 3.7). Auch die *sex1-3/tpt-2* Mutante zeigte eine Wachstumsretardierung sowie eine Veränderung der Chl *a* Fluoreszenz Parameter (Abbildung 3.18 B). Das F_v/F_m -Verhältnis war von 0,799 ($\pm 0,012$) im WT auf 0,707 ($\pm 0,036$) in der *sex1-3/tpt-2* Mutante jedoch nur geringfügig erniedrigt. Durch die Aufnahmen mithilfe der *ImagingPAM* konnte allerdings ein retikulierter Phänotyp detektiert werden, der sich durch eine stärkere Verringerung des F_v/F_m -Verhältnis im Interkostalbereich des Blattes bemerkbar machte, wohingegen das F_v/F_m -Verhältnis an den Blattadern weniger stark vermindert war. Die *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante war deutlich chlorotisch und zeigte eine starke Wachstumsretardierung im Vergleich zu WT (Abbildung 3.18 C). Obwohl hier der makroskopische Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante entsprach, war das F_v/F_m -Verhältnis nicht so drastisch verringert (Tabelle 3.7).

Bei allen untersuchten Einzelmutanten, bis auf *mex1-2*, konnten keine gravierenden Veränderungen in der Photosyntheseeffizienz im Vergleich zum WT festgestellt werden. Die *mex1-2* Mutante ist unter HL Anzucht blass-grün und zeigt ein leicht verringertes F_v/F_m -Verhältnis von $0,748 (\pm 0,016)$. Es ist festzuhalten, dass alle Doppelmutanten, neben dem Wachstumsphänotyp, eine Reduzierung in Φ_{PSII} sowie F_v/F_m im HL aufwiesen. Dies war in allen Fällen auf eine Erhöhung der Grundfluoreszenz zurückzuführen. Unter LL Bedingungen konnten keinerlei Unterschiede zwischen WT, den Einzelmutanten und den Doppelmutanten beobachtet werden. Die Doppelmutanten wurden im Folgenden eingehender auf ihren HL-abhängigen HCF Phänotyp hin untersucht.

Tabelle 3.7 Zusammenfassung der Chl *a* Fluoreszenzparameter der generierten Stoffwechselmutanten unter HL Anzucht. Die vier Wochen alten Pflanzenlinien wurden für 20 min verdunkelt und die folgende Induktionskinetik bei $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ mithilfe der *ImagingPAM* aufgenommen.

HL	F_v/F_m	F_0	F_m	Φ_{PSII}
Col-0	$0,799 \pm 0,012$	$0,050 \pm 0,006$	$0,247 \pm 0,017$	$0,383 \pm 0,031$
Ler	$0,801 \pm 0,009$	$0,056 \pm 0,007$	$0,279 \pm 0,025$	$0,448 \pm 0,016$
<i>pgm1</i>	$0,783 \pm 0,013$	$0,048 \pm 0,005$	$0,221 \pm 0,019$	$0,364 \pm 0,021$
<i>pgi1-1</i>	$0,775 \pm 0,016$	$0,050 \pm 0,005$	$0,220 \pm 0,012$	$0,294 \pm 0,040$
<i>pgi1-1/tpt-2</i>	$0,318 \pm 0,025$	$0,177 \pm 0,013$	$0,260 \pm 0,018$	$0,092 \pm 0,020$
<i>tpt-2/pgm1</i>	$0,285 \pm 0,031$	$0,205 \pm 0,025$	$0,286 \pm 0,031$	$0,070 \pm 0,035$
<i>sex1-3</i>	$0,781 \pm 0,008$	$0,067 \pm 0,005$	$0,304 \pm 0,024$	$0,360 \pm 0,022$
<i>sex1-3/tpt-2</i>	$0,707 \pm 0,036$	$0,093 \pm 0,012$	$0,317 \pm 0,020$	$0,309 \pm 0,033$
<i>mex1-2</i>	$0,748 \pm 0,016$	$0,076 \pm 0,009$	$0,302 \pm 0,032$	$0,332 \pm 0,033$
<i>mex1-2/tpt-2</i>	$0,536 \pm 0,054$	$0,150 \pm 0,019$	$0,323 \pm 0,016$	$0,185 \pm 0,046$

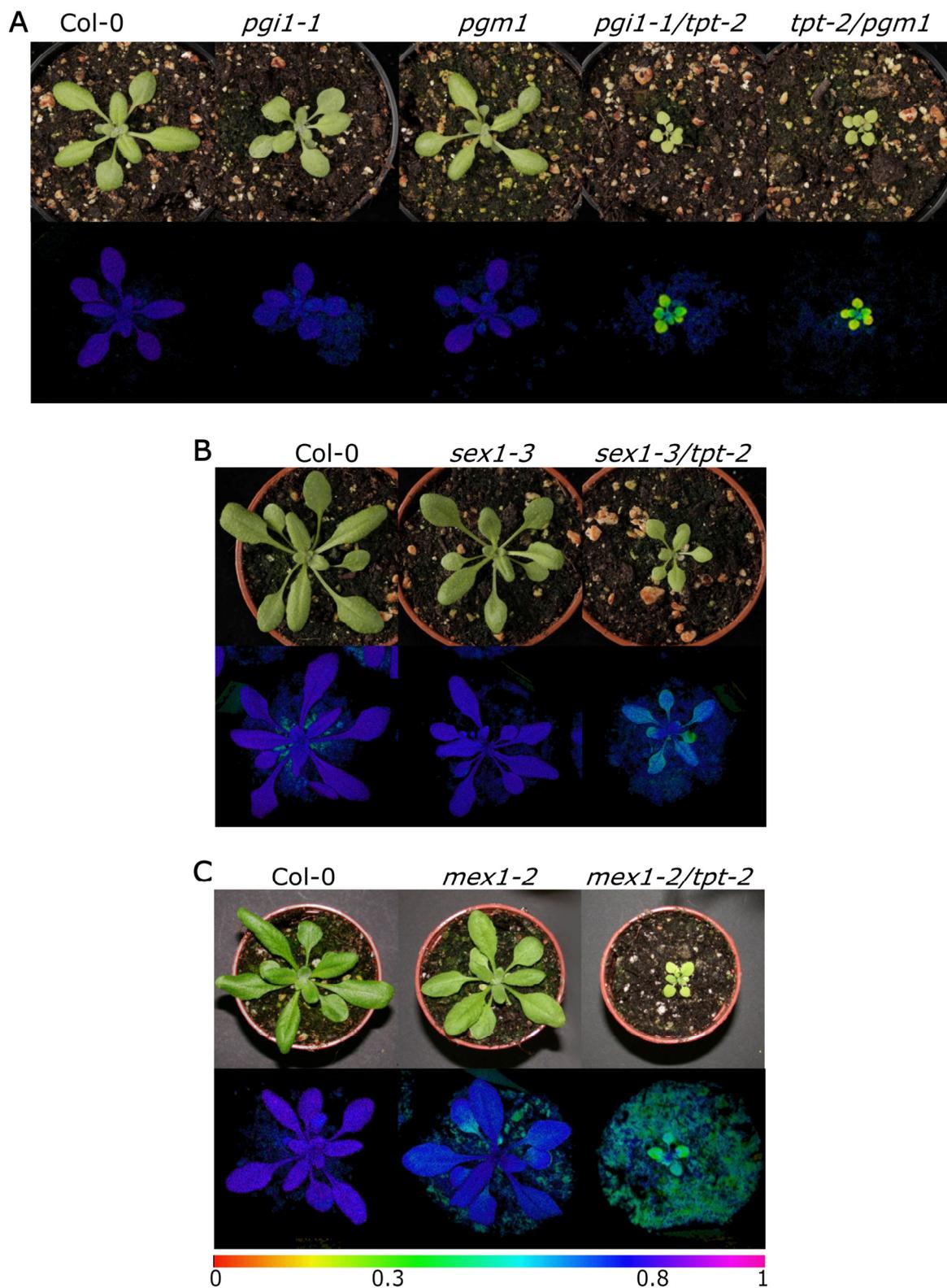


Abbildung 3.18 Phänotypische Betrachtung der generierten Doppelmutanten unter HL Anzucht. (A) Die *pgi1-1/tpt-2* sowie *tpt-2/pgm1* Doppelmutanten wurden mit den entsprechenden Einzelmutanten sowie dem WT für vier Wochen auf Erde im Langtag angezogen. Darunter ist das gemessene F_v/F_m -Verhältnis in Falschfarben dargestellt. Gleiches gilt für die *sex1-3/tpt-2* (B) und die *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante (C). Der farbige Balken beschreibt den verwendeten Farbcode der F_v/F_m -Verhältnisse.

3.2.4.2 Differenzierung der HCF Phänotypen der Stoffwechselfdoppelmutanten

Wie bereits in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, beruht der HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auf dem hohen Anteil nicht mehr mit den Photosystemen assoziierter LHCs, was zu einer dramatischen Erhöhung der Grundfluoreszenz im dunkeladaptierten Blatt führt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Fluoreszenz im Licht nicht-photochemisch auf WT-Niveau gelöscht werden kann (Abschnitt 3.1.6.1). Auch bei Bestrahlung mit FR wurde ein Teil der Fluoreszenz gelöscht, was durch die Inhibitorstudien (Abschnitt 3.1.6.2) auf den CEF zurückgeführt werden konnte. Um festzustellen, ob die neu generierten Doppelmutanten einen identischen Phänotyp aufwiesen, wurden die gleichen Fluoreszenzkinetiken, wie unter Abschnitt 3.1.6.3 beschrieben, unter FR-Bestrahlung und aktinischem Licht (AL) aufgenommen. In Abbildung 3.19 sind die errechneten Anteile von ungebundenen LHCs an der Fluoreszenz für die *pgi1-1/tpt-2*, *pgm1/tpt-2*, *sex1-3/tpt-2*, *mex1-2* sowie *mex1-2/tpt-2* zusammengefasst.

Die stärkefreien Doppelmutanten *pgi1-1/tpt-2* sowie *pgm1/tpt-2* wiesen einen zur *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante identischen HCF Phänotyp auf. Ein hoher Anteil der Fluoreszenz konnte durch Licht und auch durch FR gelöscht werden. In der *sex1-3/tpt-2* Doppelmutante war dieser Anteil der Fluoreszenzlöschung deutlich geringer, da hier die Grundfluoreszenz nur um das 1,4-fach im Vergleich zu WT erhöht war. Im Gegensatz hierzu, wurde in der *pgi1-1*- bzw. *pgm1/tpt-2* Doppelmutante eine um das 4-fache erhöhte Grundfluoreszenz beobachtet. Auch in der *mex1-2* Mutante ließ sich eine Fluoreszenzlöschung durch aktinisches Licht beobachten. Dieser Effekt war in der *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante deutlich verstärkt. Allerdings war in der *mex1-2* Mutante bzw. *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante der Anteil der Fluoreszenz, die durch FR gelöscht werden kann, sehr viel geringer bzw. nicht vorhanden.

Die Doppelmutanten, welche Defekte im Stärkeanabolismus und in der TP Transportaktivität aufweisen, besitzen den gleichen HCF Phänotyp wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Der parallel eingebrachte Defekt im Stärkekatabolismus bei der *sex1-3/tpt-2* Doppelmutante zeigte nur geringe Einflüsse in die Photosynthese. Interessanterweise wies der HCF Phänotyp der *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante andere Charakteristika auf als die der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und ist somit nicht mit diesem vergleichbar. Es bedarf jedoch weiterer immunologischer Untersuchungen, um zu klären ob auch in den neu generierten

Doppelmutanten die Proteingehalte von PSII und PSI Komponenten in Korrelation mit dem HCF Phänotyp verändert sind. Eine native Auftrennung der Superkomplexe könnte hier ebenfalls Aufschluss über die Veränderungen in der Photosynthese geben.

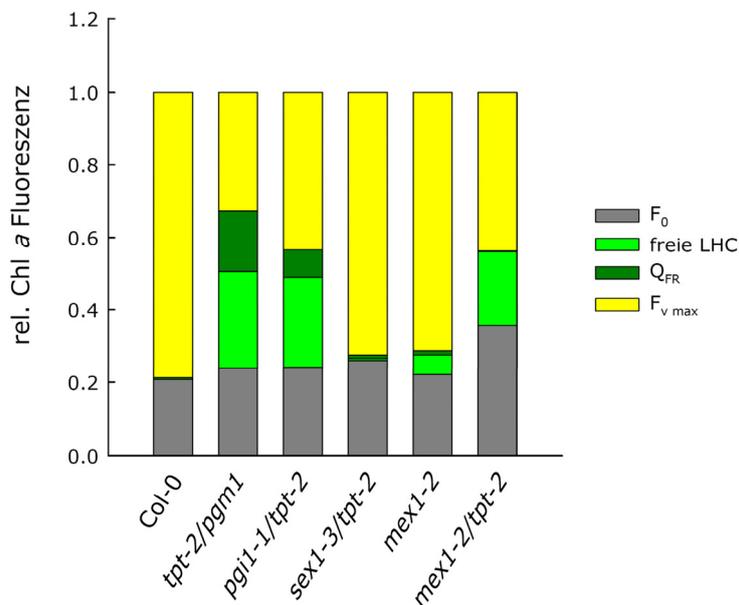


Abbildung 3.19 Relative Anteile der Chl *a* Fluoreszenz Komponenten der neu generierten Stoffwechselfdoppelmutanten. Die Mutanten sowie der WT wurden für vier Wochen im HL angezogen. Die Aufnahme der Fluoreszenzkinetiken erfolgte nach mindestens 20 min Verdunkelung. Q_{FR} = Anteil der Fluoreszenzlöschung durch FR, freie LHC = der Anteil der Fluoreszenzlöschung durch AL ($4000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), F_0 = gemessene Grundfluoreszenz nach Ausschalten von AL und (F_{vmax}) restliche variable Fluoreszenz.

3.2.4.3 Vergleich der ATPase Mutante mit dem HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante

Durch die Kreuzung der *tpt-2* Mutante mit verschiedenen Mutanten mit einer Defizienz in der Stärkebiosynthese bzw. -degradation konnte gezeigt werden, dass der HCF Phänotyp generell von der Stärkebiosynthese abhängig zu sein scheint und nicht spezifisch mit der Mutation in der AGPase gekoppelt ist (Abschnitt 3.2.4.2). Dal Bosco *et al.* (2004) charakterisierten eine Mutante (*dpa1*), welche einen vergleichbaren HCF Phänotyp aufweist wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Die Mutation betrifft den Genlocus der γ -Untereinheit der thylakoidständigen ATPase, welche zur Destabilisierung des gesamten ATPase Komplexes in der Thylakoidmembran führt. Der Verlust oder die Verminderung der ATPase Aktivität in der Thylakoidmembran führt ebenfalls zu einer erhöhten Grundfluoreszenz im dunkeladaptierten Blatt, welche bei Lichtgabe jedoch gelöscht wird. Dieser Effekt war bei Nigericinbehandlung unterbunden. Bei FR-Bestrahlung war hingegen keine Fluoreszenzlöschung zu beobachten.

Interessanterweise konnten immunologische Untersuchungen jedoch zeigen, dass in der *dpa1* Mutante die Proteine der PSII Kernkomponenten in ihrer Abundanz nicht verringert waren (Dal Bosco *et al.*, 2004). Durch den funktionellen Verlust der thylakoidständigen ATPase ist die Mutante heterotroph und nur auf ½ MS mit 50 mM Saccharose lebensfähig.

Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Mutante wurde die *dpa1* Mutante ebenfalls im Vergleich zu WT im HL auf ½ MS mit 50 mM Saccharose angezogen (Abbildung 3.20). Die *dpa1* Mutante zeigte eine deutliche Wachstumsretardierung und eine blass-grüne Pigmentierung. Das F_v/F_m -Verhältnis war deutlich erniedrigt ($0,428 \pm 0,125$), verursacht durch eine substantielle Erhöhung der Grundfluoreszenz in Kombination mit einer deutlichen Verminderung der maximalen Fluoreszenz (Tabelle 3.8). Im Gegensatz hierzu war die maximale Fluoreszenz in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auf Saccharose oder auch auf den entsprechenden Kontrollen erhöht. Aufgrund der vollständigen Inhibierung der thylakoidständigen ATPase war in der *dpa1* Mutante kein Φ PSII mehr messbar.

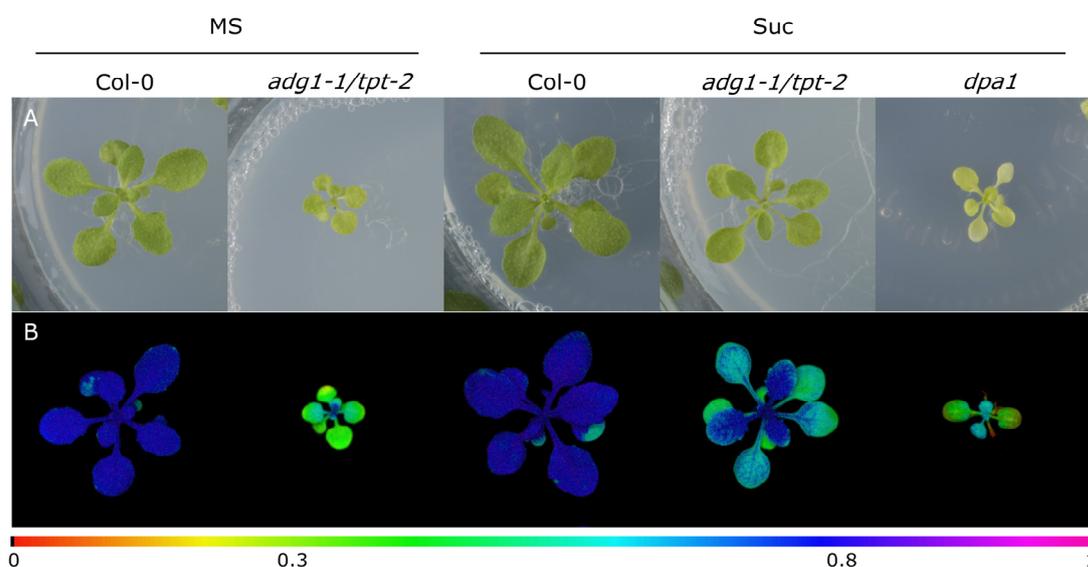


Abbildung 3.20 Phänotypischer Vergleich der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und *dpa1* Mutante bei Anzucht auf Saccharose im HL. Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, die *dpa1* Mutante und der WT wurden für vier Wochen auf ½ MS und ½ MS mit 50 mM Saccharose angezogen (A). Das F_v/F_m -Verhältnis wurde mithilfe der *ImagingPAM* aufgenommen und in Falschfarben dargestellt (B). Der farbige Balken beschreibt den verwendeten Farbcode der F_v/F_m -Verhältnisse.

Tabelle 3.8 Zusammenstellung der Chl *a* Fluoreszenzparameter von *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und *dpa1* Mutante im HL. Die Aufnahme der Induktionskurven erfolgte bei $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nach mindestens 20 min Verdunkelung von vier Wochen alten Pflanzen.

50 mM Suc				
	F_v/F_m	F_0	F_m	Φ_{PSII}
Col-0	$0,775 \pm 0,012$	$0,064 \pm 0,005$	$0,284 \pm 0,026$	$0,346 \pm 0,018$
<i>adg1-1/tpt-2</i>	$0,625 \pm 0,060$	$0,119 \pm 0,025$	$0,315 \pm 0,021$	$0,208 \pm 0,038$
<i>dpa1</i>	$0,428 \pm 0,125$	$0,140 \pm 0,037$	$0,244 \pm 0,035$	0
$\frac{1}{2}$ MS				
Col-0	$0,759 \pm 0,010$	$0,073 \pm 0,005$	$0,305 \pm 0,023$	$0,337 \pm 0,017$
<i>adg1-1/tpt-2</i>	$0,345 \pm 0,103$	$0,251 \pm 0,053$	$0,387 \pm 0,080$	$0,057 \pm 0,053$

n = 6, \pm SD

Der HCF Phänotyp der *dpa1* Mutante besitzt offenbar Ähnlichkeiten zu der auf $\frac{1}{2}$ MS angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Im Weiteren sollten immunologische Untersuchungen zusätzliche Informationen über die Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede zwischen dem HCF Phänotyp der *dpa1* Mutante und dem HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante liefern. Hierzu wurden repräsentativ für die wichtigsten Photosynthese-assoziierten Komponenten die Gehalte der Proteine Lhcb2, PsbD, psbE sowie Lhca1 getestet (Abbildung 3.21). In der *dpa1* Mutante waren die PSII assoziierten Proteine und auch das Lhcb2 Protein in ihrer Abundanz im Vergleich zum WT nicht verändert. Daher war das relative Verhältnis von PSII Kernkomponenten zu Lhcb2, wie in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante beobachtet, in der *dpa1* Mutante im HL nicht verändert (Abschnitt 3.1.3). Jedoch war der Phosphorylierungsgrad des Lhcb2 Proteins in der *dpa1* Mutante verringert, was identisch mit dem bestimmten Phosphorylierungsgrad von Lhcb2 in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei $\frac{1}{2}$ MS- bzw. Erdanzucht war (Abbildung 3.21 [4]). Lediglich die Abundanz des mit PSI assoziierten Lhca1 Proteins war in der *dpa1* Mutante um etwa 50 % verringert.

Durch Zuckerfütterung wurden in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante die Photosyntheseeffizienz und die Chl-Gehalte auf WT-Niveau gerettet (Abschnitt 3.2.3). Die weiterführende immunologische Untersuchung zeigte weiterhin, dass auch die Proteinabundanz der PSII Kernkomponenten in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei Saccharosefütterung wieder auf WT-Niveau zurückkehrte. Es war nicht nur eine Normalisierung des Verhältnisses von Lhcb2 zu PSII, sondern auch eine stärkere Phosphorylierung der Lhcb2 Proteine zu beobachten.

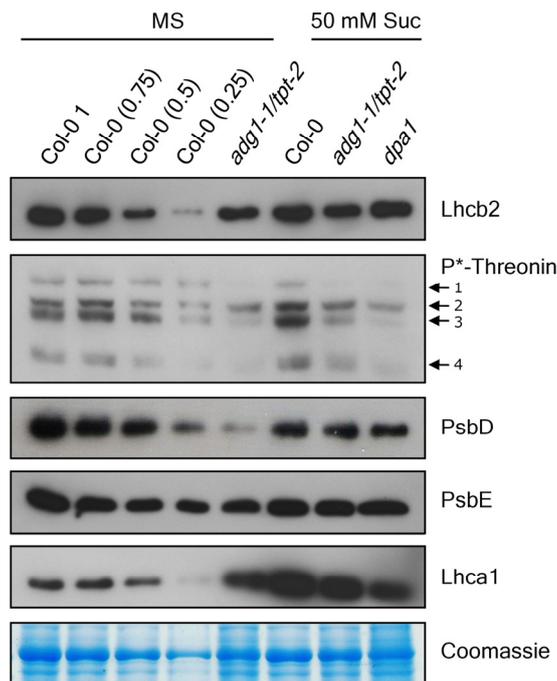


Abbildung 3.21 Immunologische Untersuchung verschiedener Photosynthese-assoziiierter Proteine in Abhängigkeit von Saccharose (Suc). Die Proteine wurden aus Blattrosetten vier Wochen alter Pflanzen extrahiert, welche auf $\frac{1}{2}$ MS bzw. $\frac{1}{2}$ MS mit 50 mM Suc angezogen wurden. Ein spezifischer Phosphothreonin-Antikörper (P*-Threonin) wurde verwendet, um den Phosphorylierungsgrad von (1) PsbC, (2) CaS (*calcium sensing receptor*) Vainonen *et al.* (2008) (3) PsbA/PsbD, (4) Lhcb zu detektieren.

3.3 TRANSFEREXPERIMENTE ZUR UNTERSUCHUNG DER AKKLIMATISIERUNG DER *ADG1-1/TPT-2* DOPPELMUTANTE IM HOCHLICHT

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten deutlich, dass der HCF- und Wachstumsphänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante HL-abhängig ist. Nicht nur das Wachstum der *adg1-1/tpt-2* Mutante ist im HL retardiert, sondern auch die Photosyntheseleistung, die mit grundlegenden Änderungen in Struktur und Aufbau der Photosynthese-assoziierten Komponenten korreliert. Daher ist anzunehmen, dass die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in den Prozessen der HL-Akklimatisierung gestört ist. Um die Ursache und Prozesse für die Etablierung dieses Phänotyps zu bestimmen, wurden Transferexperimente durchgeführt, bei denen die Pflanzen entweder im HL angezogen und ins LL transferiert wurden, oder im LL angezogen und ins HL transferiert wurden. Hierbei lag der Fokus auch auf der zeitlichen Abhängigkeit der Akklimatisierung und der Diskriminierung von Kurzzeit- und Langzeitantworten auf HL.

3.3.1 Effekte auf den HCF Phänotyp durch Schwachlicht Exposition

Durch Saccharosefütterungen konnte gezeigt werden, dass der HL-abhängige Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante stark abgemildert wird (Abschnitt 3.2.3), und im LL nicht auftritt (Abschnitt 3.1). Die folgenden Experimente sollten klären, ob eine Revertierung des Phänotyps durch einen Wechsel der Lichtbedingungen möglich ist, oder ob es sich hierbei um eine irreversible phänotypische Ausprägung handelt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sowie der WT für vier Wochen unter HL angezogen und nachfolgend für 48 h in permanente Dunkelheit (DD) oder permanentes LL transferiert. Als Maß für die Veränderung des Phänotyps über die Zeit wurden die F_v/F_m -Verhältnisse mithilfe der *ImagingPAM* aufgezeichnet (Abbildung 3.22). Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, diente auch hier das F_v/F_m -Verhältnis als Indikator für die Integrität des PSII. Der WT zeigte im Verlauf der DD Inkubation eine leichte Abnahme des F_v/F_m -Verhältnisses, was möglicherweise auf die einsetzende dunkelinduzierte Seneszenz zurückzuführen ist (Abbildung 3.22 A und E) und durch die Verminderung der maximalen Fluoreszenz verursacht wurde (Abbildung 3.22 C). Durch LL Exposition des HL angezogenen WT kam es hingegen nach 48 h aufgrund eines Anstiegs der maximalen Fluoreszenz noch zu einer leichten Erhöhung des F_v/F_m -Verhältnisses von $0,763 (\pm 0,019)$ auf $0,787 (\pm 0,006)$ im Zeitverlauf (Abbildung 3.22 D).

Überraschenderweise wurde der HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht durch den Transfer in Dunkelheit kuriert. Im Gegenteil konnte eine drastischere Verminderung des F_v/F_m -Verhältnisses mit voranschreitender Dunkelinkubation beobachtet werden (Abbildung 3.22 B und F). Nur durch LL Exposition wurde der HCF Phänotyp deutlich, wie der Anstieg des F_v/F_m -Verhältnisses zeigte, abgemildert (Abbildung 3.22 B und H). Dieser Anstieg von F_v/F_m von $0,301 (\pm 0,032)$ auf $0,673 (\pm 0,057)$ innerhalb von 48 h nach Transfer in LL Bedingungen ging auf eine kontinuierlichen Steigerung der maximalen Fluoreszenz, sowie auf ein Absinken der Grundfluoreszenz zurück (Abbildung 3.22 G). Es ist anzumerken, dass nach 4 h LL Exposition zunächst ein primäres Maximum der Grundfluoreszenz erreicht wird, welches erst mit Dauer der Exposition wieder absinkt. Durch die Betrachtung des F_v/F_m -Verhältnisses in Falschfarben wurde deutlich, dass die jüngeren Blätter der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante schneller auf den Transfer ins LL reagieren als ältere Blätter

(Abbildung 3.22 B). Aus den oben beschriebenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der HCF Phänotyp in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auch durch die Änderung der Lichtbedingungen revertiert werden kann und es sich somit um einen dynamischen und reversiblen Prozess zu handeln scheint.

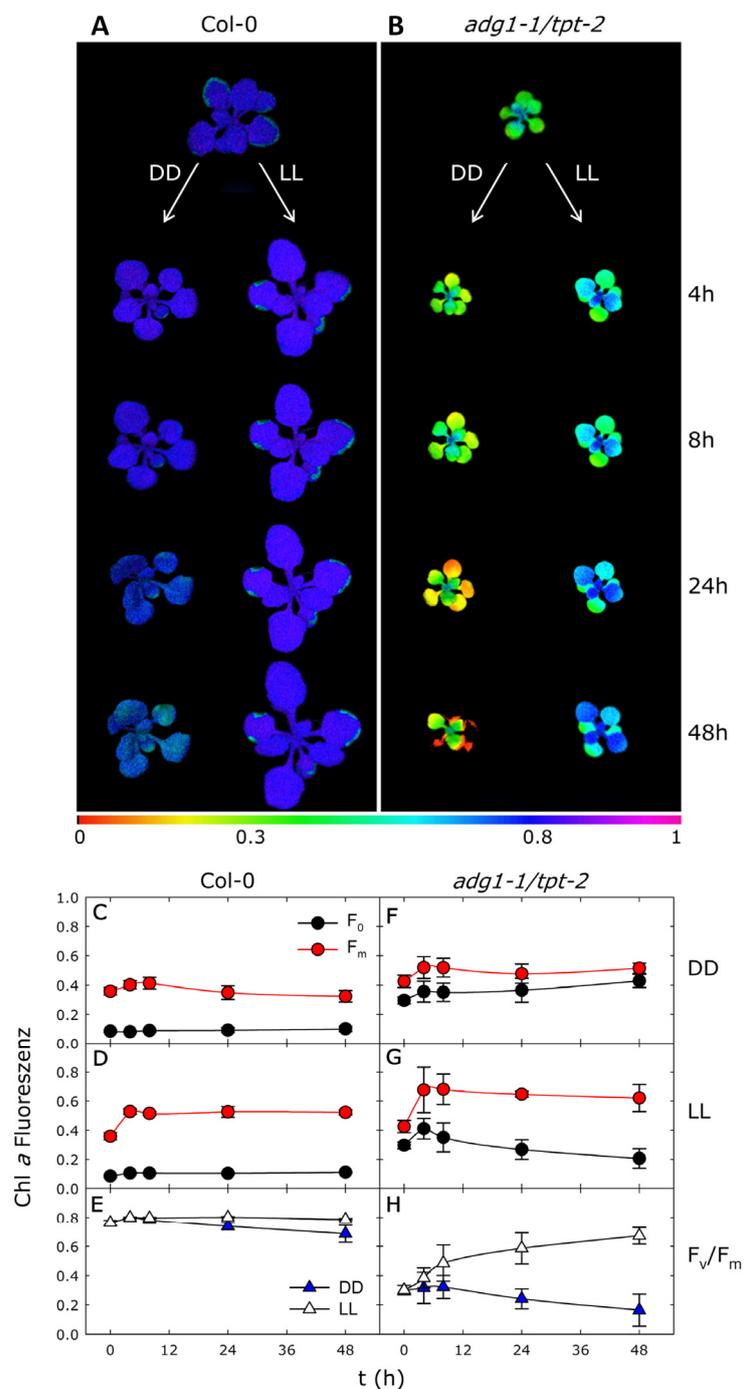


Abbildung 3.22 Änderung der Chl *a* Fluoreszenzparameter bei Exposition HL angezogener Pflanzen mit LL. (A-B) Veränderung der F_v/F_m-Verhältnisse des WT und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante über einen Zeitraum von 48 h Dunkelinkubation (DD) oder LL. Einzelne Fluoreszenzparameter sind gegen die Zeit dargestellt; Grundfluoreszenz (F₀, schwarz) und der maximalen Fluoreszenz (F_m, rot) des WT (C-D) und der *adg1-1/tpt-2* Mutante (F-H). Der farbige Balken beschreibt den verwendeten Farbcode der F_v/F_m-Verhältnisse.

3.3.2 Analysen der Akklimatisierung der Photosyntheseeffizienz an Hochlicht

Prozesse der HL-Akklimatisierung sind verbunden mit einem strukturellen Umbau Photosynthese-assoziiierter Komponenten (Bailey *et al.*, 2001). Diese gehen einher mit Veränderungen der Photosyntheseeffizienz, welche sich leicht über die Messung von Chl *a* Fluoreszenzparametern bestimmen lassen. Um die Akklimatisierung des WT, der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und den entsprechenden Einzelmutanten an HL Bedingungen untersuchen zu können wurden im LL angezogene Pflanzen, ins HL transferiert und die Chl *a* Fluoreszenzparameter mithilfe der *ImagingPAM* aufgezeichnet (Abbildung 3.23).

Das F_v/F_m -Verhältnis des WT und der Einzelmutanten sank in Folge der HL Exposition schon innerhalb der ersten 8 h deutlich auf unter 0,6 ($\pm 0,01$ [WT]) ab. Die Betrachtung der absoluten Fluoreszenzparameter zeigte, dass das Absinken des F_v/F_m -Verhältnisses auf ein starkes Absinken von F_m sowie einer Verdoppelung von F_0 zurückging (Abbildung 3.23 B-D). Erstaunlicherweise dauerte es sieben Tage bis das F_v/F_m -Verhältnis wieder auf das ursprüngliche Niveau anstieg (Abbildung 3.23 A). Nach dieser Zeit stieg F_m über den ursprünglichen Level, während F_0 zurück auf das Ausgangsniveau im LL fiel.

Bei der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante hingegen sank das F_v/F_m -Verhältnis innerhalb der ersten 8 h deutlich drastischer auf 0,335 ($\pm 0,019$). Während im WT keine weitere Verminderung des F_v/F_m -Verhältnisses nach 24 h zu beobachten war, sank das F_v/F_m -Verhältnis in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante innerhalb dieser Zeit weiter bis auf 0,141 ($\pm 0,013$) ab und erholte sich leicht nach sieben Tagen auf 0,27 ($\pm 0,021$). Wie die Aufschlüsselung des F_v/F_m -Verhältnisses in die einzelnen Fluoreszenzparameter der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigt, war das primäre Absinken der Chl *a* Fluoreszenz nach 4-8 h auf ein drastisches Absinken von F_m mit einer parallelen kontinuierlichen Zunahme von F_0 zurückzuführen (Abbildung 3.23 E). F_0 erreichte nach 48-72 h einen Wert von 0,224 ($\pm 0,025$) und war somit 2,2-fach höher als im WT und den entsprechenden Einzelmutanten. Am Ende des Akklimatisierungsprozesses war der F_0 in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, durch parallelen Rückgang des F_0 im WT, um das 4,1-fache erhöht. F_m hingegen stieg im Zeitverlauf von sieben Tagen auf ein Niveau vom WT an.

Die Erholung des F_v/F_m -Verhältnisses und der damit verbundenen absoluten Fluoreszenzparameter aufgrund von HL Exposition dauerte im WT und den Einzelmutanten

etwa sieben Tage. Offenbar greifen erst nach dieser Zeit die für die Langzeitakklimatisierung an HL notwendigen Mechanismen. Während in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in den ersten 4 h der HL Exposition noch ein ähnlicher Verlauf im Vergleich zum WT zu beobachten ist, kommt es jedoch über die Zeit zu keiner substantiellen Veränderung der Chl *a* Fluoreszenzparameter mehr (Abbildung 3.23 A).

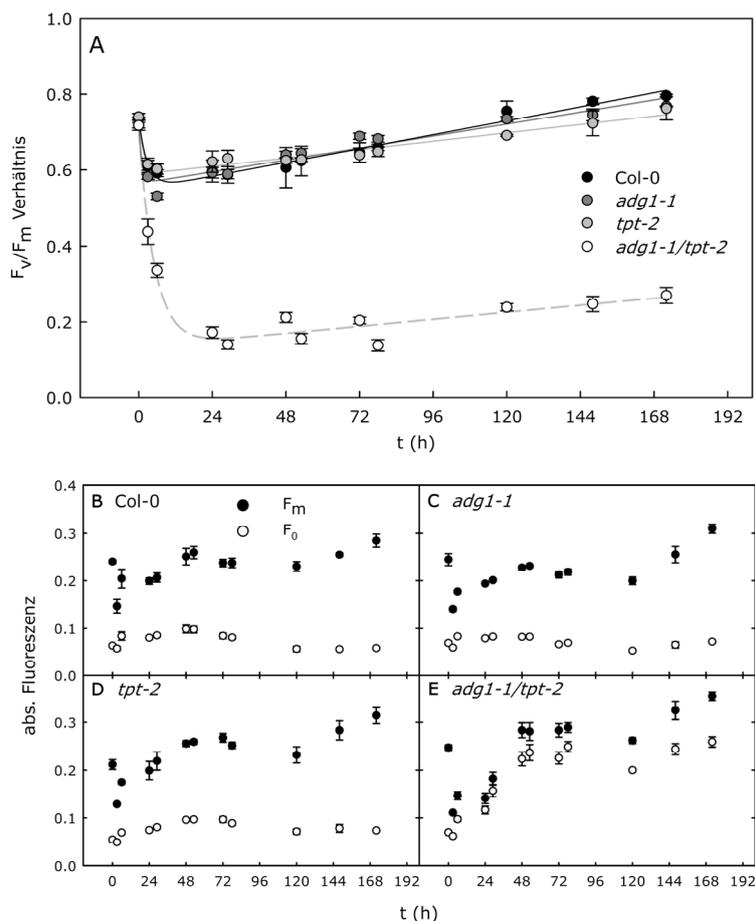


Abbildung 3.23 Darstellung der einzelnen Chl *a* Fluoreszenzparameter im Zeitverlauf nach ein Transfer von LL ins HL. (A) Zeigt die Veränderungen des F_v/F_m -Verhältnisses über die Zeit bei HL Exposition. (B-E) Aufschlüsselung der absoluten Fluoreszenzparameter F_0 (weiß) und F_m (schwarz) für den WT (B), *adg1-1* (C), *tpt-2* (D) und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (E). Die Pflanzen wurden für vier Wochen im LL angezogen und anschließend in HL transferiert.

3.3.2.1 Untersuchungen zur Kurzzeit-Akklimatisierung an Hochlicht

Starke und vor allem schnelle Schwankungen in der Lichtintensität, wie sie auch unter natürlichen Bedingungen vorkommen, führen zu adaptiven Mechanismen, die eine Schädigung der Photosynthesemaschinerie in der Pflanze, durch z.B. gebildete reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) verhindern. Eine frühe Antwort auf die photooxidative Schädigung der Photosysteme ist die De-Regulation der Expression der *Lhcb1* Gene als sogenannte „Zeigergene“ auf transkriptioneller Ebene um den Anteil des absorbierten Lichts zu vermindern (Mäenpää und Andersson, 1989). Eine Akkumulation von Mg-Protoporphyrin IX (MgProtoIX), eine Vorstufe in der Chl-Biosynthese, galt als das Signal für die Initiierung der Transkriptionsregulierung (Strand *et al.*, 2003; Abschnitt 1.4). Daher wurde die Befähigung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zur Kurzzeitakklimatisierung repräsentativ durch die *Lhcb1* Transkriptmengenbestimmung in einem HL-Transfer mittels qPCR analysiert (Abbildung 3.24 A-D). Parallel hierzu wurden die MgProtoIX-Gehalte im HL und LL sowie im Zeitverlauf bestimmt (Abbildung 3.24 E-F).

Innerhalb der ersten 30-60 min der HL Exposition konnte eine Erhöhung der *Lhcb1* Transkriptmengen beobachtet werden, die aber innerhalb von 4 h beim WT und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sowie den entsprechenden Einzelmutanten im Vergleich zum LL deutlich abnahm. Koussevitzky *et al.* (2007) konnten ebenfalls im Zeitverlauf mittels Northern Blot zeigen, dass die Transkriptmenge der *Lhcb1* Gene im WT zunächst nach 30 min leicht anstieg aber nach 6 h kaum mehr zu detektieren war und sind daher kongruent mit den Beobachtungen dieser Arbeit. Bei dauerhaft an HL adaptierten WT und Einzelmutanten setzte sich dieser Trend fort, da die *Lhcb1* Transkription im Vergleich zum LL deutlich vermindert war. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante hingegen war, trotz anfänglicher De-Regulierung innerhalb der ersten 4 h, eine höhere *Lhcb1* Transkription unter HL Bedingungen gegenüber LL Bedingungen festzustellen.

Die MgProtoIX-Gehalte sanken innerhalb des HL Transfers bei allen Pflanzenlinien ab und zeigten keine Korrelation zu der De-Regulierung der *Lhcb1* Transkription. Unter HL Anzuchten waren die MgProtoIX-Gehalte im Vergleich zum LL sogar um das 3-fache im Vergleich zum WT erhöht. Dies wiederum unterstützt die durch Mochizuki *et al.* und Moulin *et al.* (2008) publizierten MgProtoIX-Messungen, die die Beteiligung der Chl-Vorstufe an der chloroplastidären Signalgebung als Antwort auf Photooxidation widerlegten.

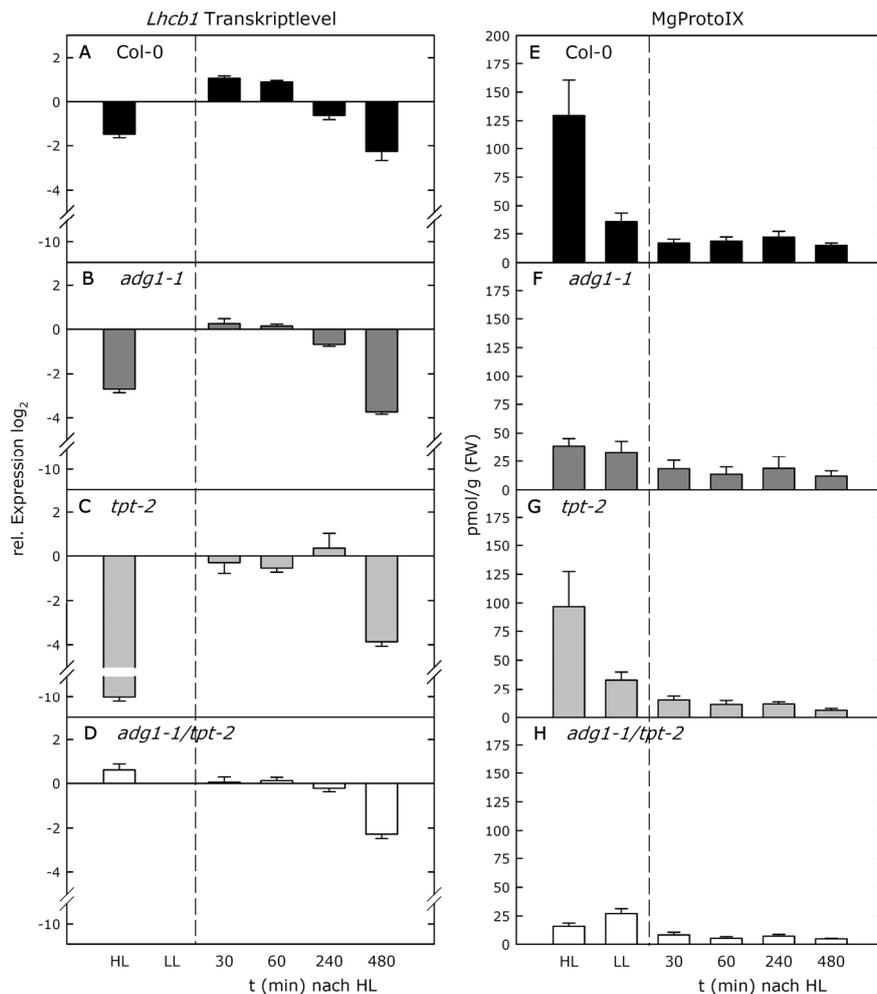


Abbildung 3.24 *Lhcb1* Transkriptakkumulation im HL Transfer im Vergleich mit den Mg-Protoporphyrin IX (MgProtoIX) Gehalten. (A-D) Die relativen Transkriptmengen des *Lhcb1* Gens vom WT, der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und den entsprechenden Einzelmantanten wurden mittels qPCR bestimmt und gegen den LL als Referenz dargestellt. Repräsentativ für die Bestimmungen ist ein biologisches Replikat dargestellt. n = 2, ± SD. (E-H) Die absoluten Gehalte von MgProtoIX pro g Frischgewicht (FW) wurden mittels HPLC Fluoreszenzdetektion quantifiziert. n = 3, ± SD

3.3.3 Genomweite Expressionsanalysen in Kurzzeit- und Langzeit-Akklimatisierungsphasen an Hochlicht

Akklimatisierungsprozesse an HL sind durch Kurzzeitantworten und Langzeitantworten charakterisiert (Abschnitt 1.3). Auf Basis der Photosyntheseeffizienzmessungen sowie der *Lhcb1* Transkriptmengenbestimmung wurde der Zeitpunkt für das Einsetzen der Kurzzeitantwort auf 4 h definiert. Da es nach zwei Tagen im HL im WT zu einer beginnenden Erholung des F_v/F_m -Verhältnisses kam, ist anzunehmen, dass erst zu diesem Zeitpunkt die Initiierung einer dauerhaften HL-Akklimatisierung der Photosynthese-assoziierten

Komponenten stattfand. Im gleichen Zeitfenster kam es zu einem dramatischen Anstieg der Grundfluoreszenz in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, welche grundlegend für den HCF Phänotyp ist. Um die Antworten bzw. fehlenden Antworten, die möglicherweise auch zur Etablierung des HCF Phänotyps führen, auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden genomweite Expressionsanalysen in einem HL Transferexperiment unter Verwendung von *ATH1 Genome Arrays* (Affymetrix) durchgeführt, welcher 22 810 unterschiedliche Transkripte erfasst.

Der WT, die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und die entsprechenden Einzelmutanten wurden unter LL Bedingungen angezogen (ZP0) und ins HL transferiert. Die Probennahme erfolgte nach 0 h (ZP0), nach 4 h (ZP4h) und nach 48 h (ZP2d).

Die von Affymetrix gelieferten Rohdaten wurden mithilfe des Programmes Robin (Lohse *et al.*, 2010) statistisch ausgewertet. Es sollten nicht nur die stationären Unterschiede in der Genexpression zu einem Zeitpunkt betrachtet werden, sondern vielmehr die Regulation der Gene im Vergleich von ZP0 vs. ZP4h sowie ZP0 vs. ZP2d (Abbildung 3.25).

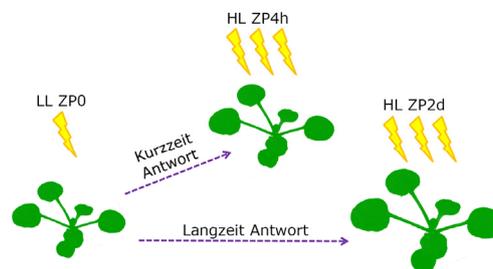


Abbildung 3.25 Schematische Darstellung der Arrayauswertung.

3.3.3.1 Identifizierung der differentiell regulierten Gene auf Hochlicht

Die Expressionsdaten wurden zunächst auf die Annahme hin geprüft, dass der HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante HL-abhängig ist. Im LL sollten daher keine gravierenden Änderungen in der Genexpression auftreten, die mit dem HCF Phänotyp in Zusammenhang stehen. Dazu wurden Vergleiche der Einzelmutanten sowie der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zum ZP0 mit dem WT durchgeführt und alle Gene mit signifikanten Änderungen gefiltert. Die Gene wurden als signifikant de-reguliert angenommen, wenn $p \leq 0,05$ war und die

Nullhypothese abgelehnt wurde. Das Venndiagramm in Abbildung 3.26 A zeigt, dass nur 12 Gene in der *tpt-2* Einzelmutante, und 212 Gene in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante signifikant veränderte Transkriptionslevel zu ZP0 aufwiesen. Interessanterweise sind zu diesem Zeitpunkt jedoch 1 675 Gene in der *adg1-1* Mutante in Vergleich zum WT de-reguliert, von denen 1 522 spezifisch nur in der *adg1-1* Mutante gefunden wurden.

Die statistisch ausgewerteten Expressionsdaten wurden nach Kandidatengen gen gefiltert. Als Kandidatengene wurden Gene definiert, die folgende Bedingungen erfüllten: (1) signifikant gegenläufig reguliert in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und signifikant gegenläufig reguliert im WT, oder (2) signifikant de-reguliert in der Mutante und nicht-signifikant reguliert in WT, oder (3) nicht-signifikant reguliert in der Mutante und signifikant reguliert im WT (Tabelle 3.9). Durch einen zusätzlichen Abgleich der Gene, die in den entsprechenden Einzelmutanten eine gleiche Regulation aufweisen, können so Gene identifiziert werden, die in direktem Zusammenhang mit der phänotypischen Ausprägung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante stehen.

Tabelle 3.9 Verwendete Filterregeln zur Identifikation von Kandidatengen in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante.

Bedingung	Mutante		Col-0	
	Log FC ¹	p-Wert	Log FC ¹	p-Wert
1	> 0 bzw. < 0	≤ 0.05	< 0 bzw. > 0	≤ 0.05
2	> 0 bzw. < 0	≤ 0.05		> 0.05
3		> 0.05	> 0 bzw. < 0	≤ 0.05

¹ Logarithmierte relative Transkriptionsänderung in Vergleich zu ZP0

Die signifikant de-regulierten Gene, ZP0 zu ZP4h, bzw. ZP2d innerhalb der einzelnen Pflanzenlinien wurden mit dem WT abgeglichen. In den Einzelmutanten und der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigte eine große Anzahl an Genen eine unterschiedliche Antwort auf HL nach 4 h bzw. 2 d, welche im WT nicht signifikant reguliert waren (Abbildung 3.26 B). Nach 4 h waren in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante 4 391 Gene de-reguliert, von denen 487 in der *tpt-2* Mutante bzw. 996 in der *adg1-1* Mutante ebenfalls bei dem Vergleich auffielen. 1 076 Gene zeigten in allen Mutanten eine De-Regulation nach 4 h im Vergleich zum WT. Zu ZP4h waren 1 832 Gene spezifisch und signifikant in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in ihrer Transkription verändert. Diese Gene wurden als putative Kandidatengene in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante identifiziert, welche möglicherweise aufgrund einer veränderten retrograden

Signalkaskade in ihrer Expression verändert sein könnten. Beim Filtern der Gene nach dem oben beschriebenen Prinzip für ZP2d vs. ZP0, konnten in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante 1 681 Gene identifiziert werden, die spezifisch nur in dieser Mutante bzw. nur im WT reguliert sind (Abbildung 3.26 C). Aufgrund der hohen Zahl der Kandidatengene wurden zwei Strategien zur Entschlüsselung und Sortierung verfolgt. (1) Die Kandidatengene wurden abhängig von der erfüllten Bedingung in funktionelle Gruppen geordnet (Abschnitt 3.3.3.2). (2) Zusätzlich wurden alle Kandidatengene der vorhergesagten subzellulären Lokalisierung durch *AtSubP* zugeordnet und speziell die chloroplastidär lokalisierten Proteine näher betrachtet (Abschnitt 3.3.3.3)

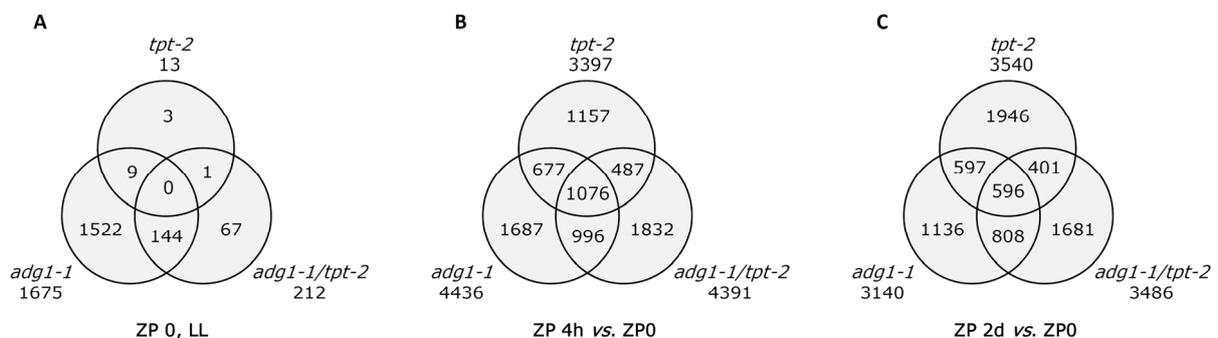


Abbildung 3.26 Übersicht über die Anzahl signifikant de-regulierter Gene in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und den entsprechenden Einzelmutanten im Vergleich zum WT. (A) Statischer Vergleich der signifikant regulierten Gene zum ZP0. (B-C) Anzahl der Gene der Mutanten im Vergleich zu WT, die als Antwort auf HL nach ZP4h bzw. ZP2d differenziell reguliert werden. Diese wurden weiterführend untereinander abgeglichen um Schnittmengen gleich regulierter Gene zwischen den Einzelmutanten und in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zu identifizieren. Die Differenzmenge der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei ZP4h (1 832) bzw. ZP2d (1 681) beschreibt somit die Kandidatengene.

3.3.3.2 Zuordnung der Kandidatengene in funktionelle Gruppen

Die herausgefilterten Kandidatengene der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante bei ZP 4h (1 832) und ZP 2d (1 681) wurden, unter Berücksichtigung der Bedingungen nach denen sie gefiltert wurden, in funktionellen Gruppen geordnet (Abbildung 3.27). Hierbei erfüllten die größte Anzahl an Genen sowohl bei ZP 4h als auch bei ZP 2d Bedingung 2. Von besonderem Interesse sind Gene, die zur Gruppe „Transkription“ und „Protein“ zugeordnet wurden. Bei nahezu allen Bedingungen fielen 25 % der gesamten Kandidatengene in diese Gruppen. Die Gruppe „Transkription“ umfasste hierbei alle Gene, die in der Regulation der Transkription eine Funktion besitzen. Die Gruppe „Protein“ beinhaltete alle Gene, welche mit den Funktionen

Translation, post-translationale Modifikationen, Degradierung, Assemblierung sowie Faltung von Proteinen assoziiert sind.

Um zu testen, welche funktionellen Gruppen signifikant überproportional vertreten waren, wurden die Kandidatengene zu den ZP4h sowie ZP2d statistisch analysiert. Die dabei identifizierten signifikant überrepräsentierten Gruppen wurden mithilfe des web-basierten Programmes QuickGO (Binns *et al.*, 2009) hierarchisch klassifiziert und in Abbildung 3.28 für ZP4h und in Abbildung 3.29 für ZP2d graphisch dargestellt. Grundsätzlich werden bei der Einteilung in funktionelle Gruppen drei Hauptkomponenten unterscheiden: (1) Molekulare Funktion, (2) Zelluläre Komponente und (3) Biologischer Prozess. Interessanterweise sind bei ZP4h alle überrepräsentierten Gruppen in den Translationsprozess, sowohl auf intraorganeller als auch auf zytosolischer Ebene, involviert.

Zu ZP2d konnten deutlich mehr signifikant überrepräsentierte Gruppen identifiziert werden als bei ZP4h. Es wurden mehrere Gruppen identifiziert, welche mit dem Vesikeltransport, *Vesicletargeting* und *Vesiclecoating* assoziiert sind. Des Weiteren umfasst eine generelle Gruppe alle Gene, welche mit dem Chloroplasten funktionell assoziiert sind. Die beobachteten massiven Transkriptionsänderungen betrafen auch Gene, welche im mitochondrialen und auch vakuolären Stoffwechsel eingebunden sind. Offenbar sind alle Subkompartimente der Zelle an dem Prozess der Akklimatisierung an HL beteiligt. Neben dem intrazellulären Proteintransport sind ebenfalls metabolische Prozesse sowie die Antwort auf Nährstoffmangel auf transkriptioneller Ebene betroffen.

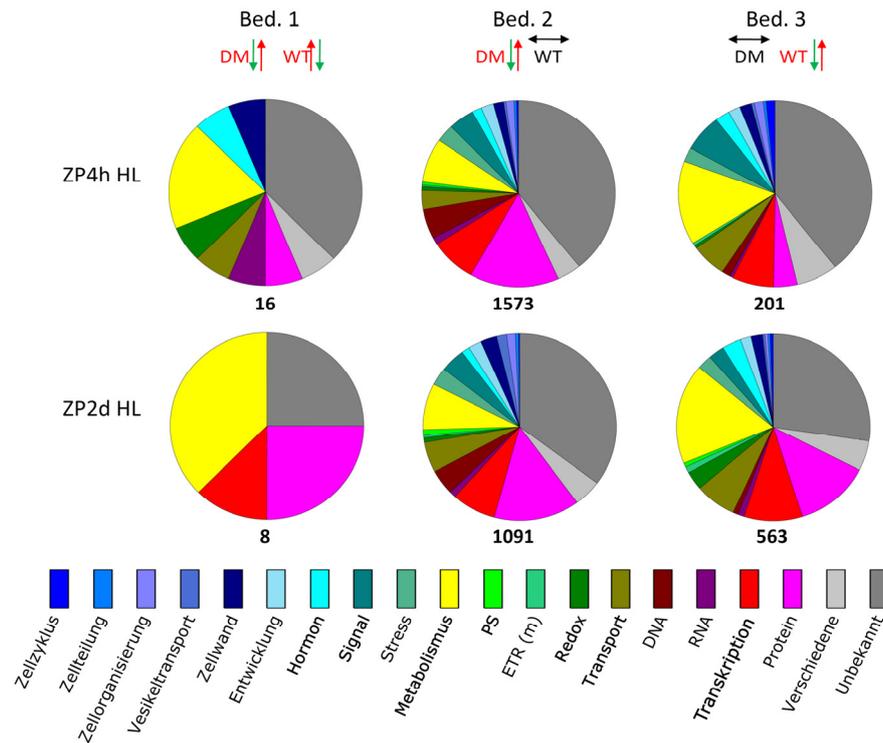


Abbildung 3.27 Proportionale Anteile der funktionellen Gruppen der Kandidatengene der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Die Zuordnung der Gene, die zu ZP4h bzw. als Kandidaten identifiziert worden sind, erfolgte unter Berücksichtigung der erfüllten Bedingung (1-3). Der verwendete Farbcodes mit der funktionellen Zuordnung ist angegeben.

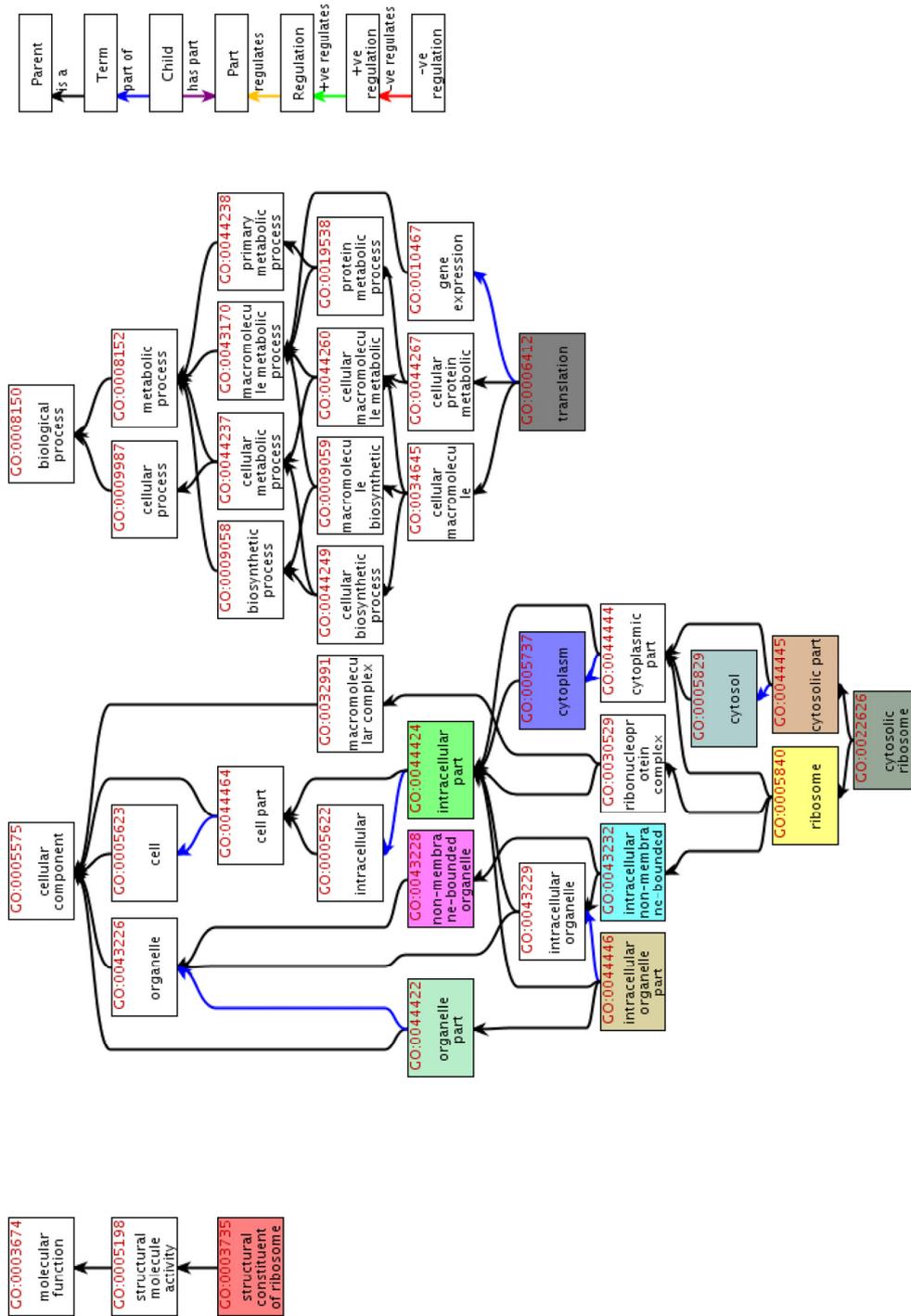


Abbildung 3.28 Hierarchische Übersicht der signifikant überrepräsentierten funktionellen Gruppen von den Kandidatengenen zu ZP4h. Farblich unterlegte Gruppen sind als statistisch signifikant identifiziert worden, während weiß unterlegte Gruppen die Zusammenhänge der übergeordneten Gruppen repräsentieren. Über dem Gruppennamen sind die Nummern in rot der Kategorien angegeben, welche unter www.geneontology.org abgefragt werden können.

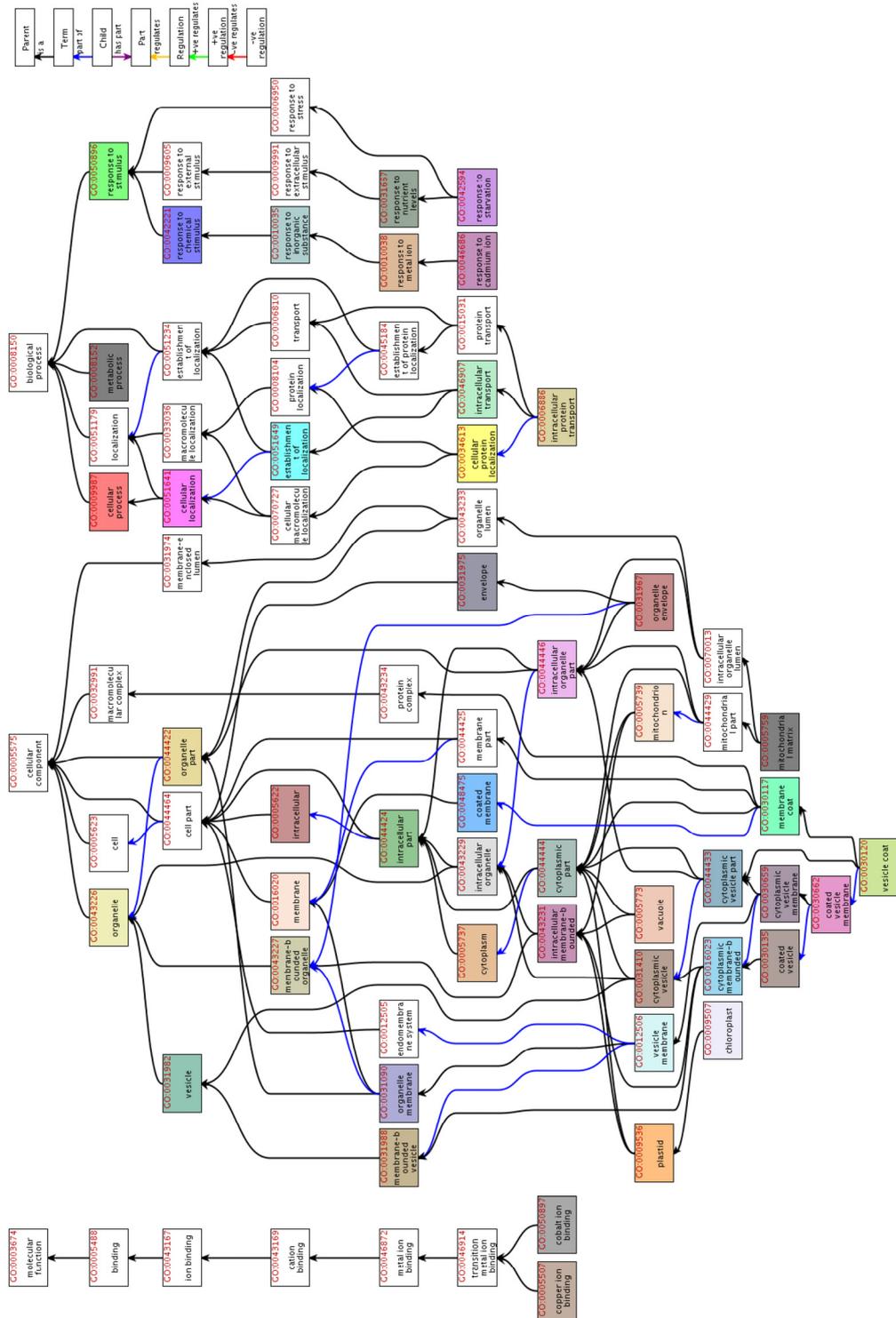


Abbildung 3.29 Hierarchische Übersicht der signifikant überrepräsentierten funktionellen Gruppen von den Kandidatengenen zu ZP2d. Farbige unterlegte Gruppen sind als statistisch signifikant identifiziert worden, während weiß unterlegte Gruppen die Zusammenhänge der übergeordneten Gruppen repräsentieren. Über dem Gruppennamen sind die Nummern in rot der Kategorien angegeben, welche unter www.geneontology.org abgefragt werden können.

3.3.3.3 Zuordnung der Kandidatengene nach ihrer subzellulären Lokalisierung

Eine Veränderung der Lichtbedingungen in den oben beschriebenen Experimenten sollte sich, neben der Änderung der Expression genereller Stoffwechselfgene, besonders auf die Expression kernkodierter Gene, die aber für plastidär lokalisierte Proteine kodieren, auswirken. Daher wurden die Kandidatengene ihrer vorausgesagten Lokalisation zugeordnet und näher betrachtet. Das in dieser Arbeit verwendete Vorhersageprogramm *AtSubP* (Kaundal *et al.*, 2010) berücksichtigt die kombinatorischen Effekte der Proteineigenschaften, wie der Aminosäuresequenz, Sequenz-Struktur Effekte und auch C-terminale Sequenzmotive und erhöht die Genauigkeit der Vorhersage deutlich. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass nicht alle hier gelisteten Proteine tatsächlich im Chloroplasten lokalisieren.

Entsprechend der Vorhersage durch *AtSubP* sind 19,6 % der Proteine aus der Gesamtheit von 22810 (*ATH1 Genome Array*) in den Zellorganellen lokalisiert, bzw. 10,6 % in den Chloroplasten. Unter den Genen, die zum ZP4h nach den Parametern für Bedingung 2 bzw. Bedingung 3 dereguliert waren, kodieren 12,1 % bzw. 13 % für Proteine mit einer vorhergesagten plastidären Lokalisation. Zum ZP2d kodieren 13,5 % bzw. 15,4 % der nach den Parametern für Bedingung 2 deregulierten Gene für plastidär lokalisierte Proteine. In Anbetracht der Tatsache dass nur 10,6 % der auf dem ATH1 Genchip repräsentierten Gene für plastidärlokalisierte Proteine kodieren, zeigen die oben genannten Ergebnisse eine erhöhte De-Regulation kernkodierter, plastidärlokalisierter Proteine unter den gewählten experimentellen Bedingungen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der statischen Überprüfung der funktionellen Gruppen (Abschnitt 3.3.3.2) kommt es zu einer überproportionalen De-Regulation von kernkodierten Genen für chloroplastidär lokalisierte Proteine.

Die unter Bedingung 1 identifizierten Kandidatengene mit chloroplastidärer Lokalisierung sind aufgrund ihrer geringen Anzahl vollständig für ZP4h sowie ZP2d in Tabelle 3.10 zusammengefasst. Interessanterweise findet sich unter beiden Zeitpunkten ein Gen, welches mit dem Schwefelmetabolismus in Verbindung steht (putative Phosphoadenosin Phosphosulphat-Sulfotransferase) und in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich zum WT nach HL Exposition deutlich reprimiert wurde. Die am stärksten de-regulierten Gene mit putativer chloroplastidärer Lokalisation zu den jeweiligen Zeitpunkten unter Berücksichtigung

der Bedingung 2 bzw. 3, sind in Tabelle 3.11 bis Tabelle 3.14 aufgelistet. Bei ZP4h nach HL Exposition konnten weitere signifikant reprimierte Gene in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante identifiziert werden, welche mit dem Schwefelmetabolismus assoziiert sind. Zu diesem Zeitpunkt wurden sehr viele, in die plastidäre Transkription und Translation involvierte Gene nur in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante signifikant induziert (Tabelle 3.11). GUN3, die Phytochromobilinsynthase, war hier auf transkriptioneller Ebene induziert. Dies ist von besonderem Interesse, da GUN3 bei der retrograden Signalgebung fungiert (Strand *et al.*, 2003; Abschnitt 1.4). Im WT wurden hingegen zu diesem Zeitpunkt (Bedingung 3) hauptsächlich im Metabolismus involvierte Gene de-reguliert, welche in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in ihrer Expression nicht signifikant verändert waren. Darunter ist zum Beispiel das Gen, welches für die MgChelatase (GUN5; Mochizucki *et al.*, 2001) kodiert. GUN5 war in seiner Expression zwar nur leicht aber signifikant reprimiert.

Nach ZP2d HL Exposition waren in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wie bei ZP4h besonders viele Gene induziert, welche mit dem plastidären Translationsprozess assoziiert sind (Bedingung 2). Weiterhin wurde zu diesem Zeitpunkt auch die Expression einer Untereinheit des Sauerstoff entwickelnden Komplexes (*PsbP2*) und das „cold-responsive protein“ *COR15a* herunter reguliert. Die unter Bedingung 3 gefilterten plastidären Gene weisen ein breites Spektrum an physiologischen Funktionen auf. Sie sind in vor allem an vielen metabolischen aber auch Photosynthese-assoziierten Prozessen beteiligt.

Tabelle 3.10 Zusammenfassung der unter Bedingung 1 gefilterten Kandidatengene zu ZP4h und ZP2d. Gelb: Schwefelmetabolismus; rosa: Transkription, Translation, Proteinfaltung; grün: Pigment, Photosynthese, Redox; blau: Transport.

ZP 4h Gen	Bedingung 1 Funktion ¹	adg1-1/tpt-2 vs. WT	
		Lokalisierung ²	Log FC ³
AT4G21990	putative PAPS sulfotransferase (AtAPR3)	C	-2.31
AT1G72800	hypothetical protein	-	-1.92
AT1G74100	putative sulphotransferase (AtSOT16)	Z	-1.62
AT4G33030	UDP-sulfoquinovose synthase, sulfolipid biosynthesis protein (SQD1)	C	-1.59
AT5G48180	protein of unknown function	Z	-1.16
AT5G45410	hypothetical protein	C	-1.01
AT5G42850	putative thioredoxin	Z	-1.00
AT1G53310	phosphoenolpyruvate carboxylase (AtPPC1)	Z	-0.96
AT5G59000	putative membrane protein, contains RING-finger-type domain	-	-0.89
AT2G40800	putative Tim21-type component of mitochondrial membrane translocase	C	-0.82
AT5G15180	peroxidase, putative	E	0.74
AT2G02710	putative blue light receptor (AtPLP)	ZM	1.01
AT1G22710	sucrose-proton symporter (AtSUC2)	ZM	1.05
AT5G27670	putative H2A-type histone	N	1.12
AT3G13750	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	E	1.88
AT5G18600	putative glutaredoxin	Z	3.53
ZP 2d	Bedingung 1		
AT5G26220	putative ChaC-like protein	-	-2.65
AT4G21990	putative PAPS sulfotransferase (AtAPR3)	C	-1.96
AT1G62660	putative family-32-type glycosyl hydrolase	-	-1.63
AT4G33030	UDP-sulfoquinovose synthase, sulfolipid biosynthesis protein (SQD1)	C	-1.47
AT5G46350	putative WRKY-type transcription factor	N	0.98
AT5G66490	hypothetical protein	M	1.32
AT3G62690	putative ubiquitin ligase, ATL-subfamily (AtATL5)	N	1.51
rps12.1	ribosomal protein S12 (trans-splice part 1 of 2)	C	2.95

¹ vorausgesagte bzw. experimentell bestimmte Funktion basierend auf Aramemnon 6.2

² vorausgesagte subzelluläre Lokalisierung basierend auf AtSubP, C=Chloroplast, N=Nukleus, M=Mitochondrium, Z=Zytosol, E=extrazellulär, ZM=Zellmembran

³ Logarithmierte relative Transkriptionsänderung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich zum WT

Tabelle 3.11 Zusammenfassung der unter Bedingung 2 gefilterten Kandidatengene zu ZP4h mit putativer chloroplastidärer Lokalisation. Gelb: Schwefelmetabolismus; rosa: Transkription, Translation, Proteinfaltung; grün: Pigment, Photosynthese, Redox; blau: Transport.

ZP 4h	Bedingung 2	<i>adg1-1/tpt-2</i>
Gen	Funktion ¹	Log FC ²
At4g15530	pyruvate, orthophosphate dikinase	-2.38
At5g01220	UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransferase (sulfolipid synthase) (AtSQD2)	-1.46
At2g38760	annexin 3 (ANN3)	-1.31
At1g74710	isochorismate synthase 1 (AtICS1/AtEDS16/AtSID2)	-1.29
At1g62180	putative phosphoadenosine phosphosulfate (PAPS) sulfotransferase (AtAPR2)	-1.17
At4g17550	putative small solute transporter	-1.12
At2g17500	putative membrane transport protein	-1.05
At1g05690	TAZ zinc finger protein / BTB/POZ domain-containing protein	-1.05
At5g06480	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein	-1.03
At1g52290	protein kinase, putative	-1.01
At5g43780	ATP-sulfurylase (AtAPS4)	-0.97
At5g19980	putative nucleotide sugar transporter (AtGONST4)	-0.87
At1g67930	putative COG5-like component of COG golgi membrane trafficking complex	-0.84
At1g08250	putative arogenate dehydratase (AtADT6)	-0.84
At4g29890	putative choline monooxygenase	-0.81
At4g25720	putative glutamine cyclotransferase	-0.80
At4g26160	putative thioredoxin	-0.79
At5g51770	putative protein contains similarity to protein kinase	-0.78
At1g31130	hypothetical protein	-0.77
At4g34180	putative cyclase	-0.75
At1g74850	protein of unknown function, involved in plastid gene expression (AtPTAC2)	0.64
At3g43600	aldehyde oxidase (AtAO2/AAO2)	0.64
At5g45040	cytochrome c6 (AtC6)	0.64
At4g38160	putative mtERF-type protein of unknown function	0.67
At5g52970	protein of unknown function	0.72
At5g04600	protein of unknown function, contains RNA binding domain	0.72
At2g19720	S15A-type protein of small ribosomal subunit (AtRPS15aB)	0.73
At3g62910	ribosome release factor for chloroplast translation machinery (AtcprF1/AtAPG3)	0.74
At5g40160	protein of unknown function	0.75
At3g25660	putative amidase	0.76
At4g13650	protein of unknown function, contains pentatricopeptide (PPR) repeat	0.78
At1g06820	carotenoid isomerase (AtCRTISO)	0.81
At4g30720	hypothetical protein	0.86
At3g09150	phytochromobilin:ferredoxin oxidoreductase (AtGUN3/AtHY2)	0.86
At4g37380	protein of unknown function, contains pentatricopeptide (PPR) repeat	0.89
At1g70200	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	0.90
At1g36390	putative grpE-like co-chaperone	0.95
At3g19810	protein of unknown function	0.98
At3g62930	putative glutaredoxin	1.41
At1g16410	cytochrome P450 monooxygenase, in aliphatic glucosinolate synthesis (AtSPS)	2.06

¹ vorausgesagte bzw. experimentell bestimmte Funktion basierend auf Aramemnon 6.2

² Logarithmierte relative Transkriptionsänderung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante

Tabelle 3.12 Zusammenfassung der unter Bedingung 3 gefilterten Kandidatengene zu ZP4h mit putativer chloroplastidärer Lokalisation. Gelb: Schwefelmetabolismus; rosa: Transkription, Translation, Proteinfaltung; grün: Pigment, Photosynthese, Redox; blau: Transport.

ZP 4h	Bedingung 3	WT
Gen	Funktion ¹	Log FC ²
At4g18340	putative endo-1,3-beta-glucosidase	-1.27
At5g25630	protein of unknown function, contains pentatricopeptide (PPR) repeat	-0.90
At5g45110	ankyrin repeat family protein	-0.77
At3g12950	hypothetical protein	-0.61
At2g40490	putative uroporphyrinogen decarboxylase (AtHEME2)	-0.53
At5g13630	magnesium-chelatase subunit chlH, chloroplast (AtGUN5)	-0.49
At3g11490	putative small GTPase-activating protein	-0.48
At2g38050	steroid 5-alpha-reductase (AtTDE1/AtDEt2)	0.43
At3g03600	S2-type protein of small ribosomal subunit (AtRPS2)	0.47
At4g33480	protein of unknown function	0.47
At3g62580	putative membrane protein of unknown function	0.53
At4g24620	glucose-6-phosphate isomerase (AtPGI1)	0.53
At4g26500	putative SufE-like component of iron-sulfur cluster assembly complex	0.60
At1g11790	putative arogenate dehydratase (AtADT1)	0.62
At2g02880	mucin-related	0.62
At3g03420	Ku70-binding family protein	0.67
At1g28150	protein of unknown function	0.70
At3g15840	involved in non-photochemical reduction of plastoquinone (AtPIFI)	0.70
At4g04020	plastid-lipid associated protein PAP, putative / fibrillin, putative	0.74
At5g43390	hypothetical protein	0.87
At3g07630	putative arogenate dehydratase (AtADT2)	0.90
At3g02630	acyl-(acyl-carrier-protein) desaturase, putative / stearoyl-AZ desaturase, putative	1.02
At2g13100	putative small solute transporter	1.07
At5g61820	putative MTN19-like protein of unknown function	1.28
At1g20510	coumarate-CoA ligase-like enzyme involved in jasmonic acid biosynthesis (AtOPCL1)	1.88
At4g17470	putative palmitoyl protein thioesterase	2.35

¹ vorausgesagte bzw. experimentell bestimmte Funktion basierend auf Aramemnon 6.2

² Logarithmierte relative Transkriptionsänderung des WT

Tabelle 3.13 Zusammenfassung der unter Bedingung 2 gefilterten Kandidatengene zu ZP2d mit putativer chloroplastidärer Lokalisation. Gelb:Schwefelmetabolismus; rosa:Transkription, Translation, Proteinfaltung; grün: Pigment, Photosynthese, Redox; blau:Transport.

ZP 2d	Bedingung 2	<i>adg1-1/tpt-2</i>
Gen	Funktion ¹	Log FC ²
At3g14990	putative 4-methyl-5-thiazole monophosphate biosynthesis protein	-1.63
At1g52290	protein kinase, putative	-1.59
At2g42540	cold-responsive protein / cold-regulated protein (<i>cor15a</i>)	-1.38
At5g01220	UDP-sulfoquinovose:DAG sulfoquinovosyltransferase (sulfolipid synthase) (<i>AtSQD2</i>)	-1.28
At2g30790	subunit PsbP of photosystem II oxygen evolving complex (<i>AtPsbP2</i>)	-1.22
At4g17550	putative small solute transporter	-1.16
At2g24762	putatively involved in regulation of amino acid export (<i>AtGDU4</i>)	-1.01
At5g45550	putative Mob1-like phosphoprotein of unknown function	-0.90
At5g42090	putative membrane protein, contains Lung-7tm-R-type domain	-0.86
At3g54650	protein of unknown function, contains LRR and F-box domain (<i>AtFBL17</i>)	-0.86
At4g01220	putative (1,3)-alpha-D-xylosyltransferase	-0.86
At1g61260	hypothetical protein	-0.82
At1g76100	putative plastocyanin	-0.76
At3g25860	putative dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase	-0.74
At1g76360	putative protein kinase similar to protein kinase (<i>APK1A</i>)	-0.73
At1g57620	putative p24-type membrane component of COPI-/COPII-coated vesicle	-0.69
At4g25360	protein of unknown function	-0.68
At4g20840	putative reticuline dehydrogenase	-0.67
At5g18520	putative membrane protein	-0.63
At4g31480	putative beta subunit of coatomer (COP) adaptor complex	-0.61
At1g70200	unknown protein	0.77
At1g68730	zinc finger (DNL type) protein	0.79
At3g28080	putative membrane protein	0.79
At4g38160	putative mTERF-type protein	0.82
At3g09650	protein of unknown function, in processing of chloroplast RNAs (<i>AtHCF152</i>)	0.84
At5g24000	putative membrane protein	0.84
At3g23170	protein of unknown function	0.88
At4g26370	putative NusB-like protein	0.89
At2g31840	protein of unknown function	0.91
At4g34138	UDP-dependent glycosyl transferase (<i>AtUGT73B1</i>)	0.93
At2g32650	hypothetical protein	0.94
At3g62910	chloroplast ribosome release factor for translation machinery (<i>AtcprF1/AtAPG3</i>)	0.94
At1g69380	putative membrane protein	0.94
At5g55740	protein of unknown function, involved in RNA editing of <i>ndhD</i> (<i>AtCRR21</i>)	0.97
At1g60960	putative zinc(II)/iron(II) cation transporter (<i>AtIRT3</i>)	1.02
At2g24120	plastidial DNA-directed RNA polymerase (<i>AtRPOPT</i>)	1.08
At4g39940	adenylylsulfate kinase (<i>AtAKN2</i>)	1.12
At1g15510	protein of unknown function, required for transcript <i>accD</i> RNA editing (<i>AtECB2</i>)	1.20
At5g23010	2-isopropylmalate synthase 3 (<i>IMS3</i>)	1.45
At1g16410	cytochrome P450 monooxygenase, in aliphatic glucosinolate synthesis (<i>AtSPS</i>)	2.11

¹ vorausgesagte bzw. experimentell bestimmte Funktion basierend auf Aramemnon 6.2

² Logarithmierte relative Transkriptionsänderung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante

Tabelle 3.14 Zusammenfassung der unter Bedingung 3 gefilterten Kandidatengene zu ZP2d mit putativer chloroplastidärer Lokalisation. Gelb:Schwefelmetabolismus; rosa:Transkription, Translation, Proteinfaltung; grün: Pigment, Photosynthese, Redox; blau:Transport.

ZP 2d	Bedingung 3	WT
Gen	Funktion ¹	Log FC ²
At5g22500	fatty acyl-CoA reductase (AtFAR1)	-1.70
At4g19170	carotenoid dioxygenase (AtCCD4)	-1.57
At1g80920	putative co-chaperone component of TOC protein import machinery (AtTOC12)	-1.47
At1g53870	putative phospholipid scramblase	-1.20
At1g08570	putative thioredoxin	-1.05
At2g25080	putative glutathione peroxidase (AtGPX1)	-0.89
At3g13710	putative Rab-type GTPase receptor (AtPRA1.F4)	-0.70
At1g73750	putative lipase	-0.69
At2g32860	putative beta-glycosyl hydrolase	-0.66
At1g15340	putative mediator of chromatin cytosine methylation (AtMBD10)	-0.64
At2g07707	putative mitochondrion MFO-ATP synthase subunit	-0.63
At4g25080	putative magnesium protoporphyrin IX O-methyltransferase	-0.60
At5g52100	dihydrodipicolinate reductase protein	-0.55
At5g27210	putative membrane protein of unknown function	-0.52
At5g58870	ATP-dependent metalloprotease (AtFTsH9)	-0.50
At1g63460	putative glutathione peroxidase (AtGPX8)	0.86
At2g32920	protein disulfide isomerase (AtPDIL2-3/AtPDI9)	0.87
At5g33290	xylogalacturonan xylosyltransferase (AtXGD1)	0.90
At5g17380	putative pyruvate decarboxylase	0.93
At4g11010	nucleoside diphosphate kinase (AtNDPK3)	1.00
At5g27280	zinc finger (DNL type) protein	1.03
At4g27070	beta subunit of tryptophan synthase (AtTSB2)	1.16
At3g54960	protein disulfide isomerase (AtPDIL1-3/AtPDI1)	1.18
At4g35630	phosphoserine aminotransferase (AtPSAT)	1.23
At4g14680	ATP-sulfurylase (AtAPS3)	1.24
At1g21750	protein disulfide isomerase (AtPDIL1-1/AtPDI5)	1.27
At1g20510	coumarate-CoA ligase-like enzyme involved in jasmonic acid biosynthesis (AtOPCL1)	1.38
At2g28900	putative plastid outer envelope protein (AtOep16-1)	1.51
At3g03640	putative beta-glycosidase (AtGluc)	1.53
At3g45140	lipxygenase (AtLOX2)	1.92
At1g17745	putative D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1.94
At3g51430	strictosidine synthase-like protein (AtYLS2)	2.09
At3g25760	allene oxide cyclase (AtAOC1/AtERD12)	2.60
At1g61800	glucose-6-phosphate/phosphate translocator (AtGPT2)	2.90
At4g17470	putative palmitoyl protein thioesterase	3.57

¹ vorausgesagte bzw. experimentell bestimmte Funktion basierend auf Aramemnon 6.2

² Logarithmierte relative Transkriptionsänderung des WT

Im Zusammenhang mit den identifizierten Kandidatengenem wurden auch die direkt an der Photosynthese beteiligten Proteine in Hinblick auf die zuvor durchgeführten Western Blots im Detail betrachtet (Tabelle 3.15). Dabei wurde, wie bei der getesteten Proteinabundanz, auch ein statischer Zustand bei ZP2d zwischen WT und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante analysiert. Die integralen Bestandteile der PSII Reaktionszentrums, welche in der Proteinabundanz bis auf 10 % verringert waren, wurden deutlich stärker als im WT transkribiert. Im Gegensatz zu der Transkriptionsaktivierung der plastomkodierten Gene war für die kernkodierten Gene, wie *Lhcb2.2* oder *FNR*, keine Veränderung in der Transkription im Vergleich zum WT festzustellen. Interessanterweise wurden sieben von zehn plastomkodierten Untereinheiten des NDH-Komplexes (*NdhH*, hier repräsentativ gezeigt) deutlich stärker exprimiert als im WT, während die kernkodierten Untereinheiten (*AtNDH18*, repräsentativ) keine verstärkte Expression aufwiesen. Durch Auftrennung der Proteinsuperkomplexe in der BN-PAGE konnte jedoch gezeigt werden, dass der NDH-Superkomplex in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht vorhanden ist. Auch *PsaA*, Kernkomponente des PSI, wurde stark induziert, während kernkodierte Gene des LHCI nicht verändert waren.

Tabelle 3.15 Zusammenstellung der Transkriptionsdaten der Photosynthese-assoziierten Gene im stationären Vergleich von WT und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zum ZP2d.

<i>adg1-1/tpt-2</i> vs. WT ZP2d				
Gen	Funktion	Lok ¹	Prot. ²	Log FC ³
At3g27690	Lhcb2.1	G	o	-0,72
AtpB	ATPase beta subunit	P	-	-0,42
At3g50820	subunit of photosystem II complex (AtPsbO2)	G	-	-0,15
At4g03280	Rieske FeS protein (AtPETC)	G	o	-0,10
At1g20020	ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase (AtLFNR2)	P	+	-0,05
At4g04640	chloroplast CF1-ATP synthase subunit (AtATP-gamma1)	G	n.d.	0,00
At3g54890	component of light-harvesting complex I (AtLHCa1)	G	o	0,01
PsaB	PSI P700 apoprotein A2	P	-	0,05
At2g05070	Lhcb2.2	G	o	0,05
At5g43750	component of subcomplex B of chloroplast NDH (AtNDH18)			0,27
PetB	cytochrome B6	P	o	0,33
PsbE	PSII cytochrome b559	P	-	1,31
NdhH	NADH dehydrogenase 49KDa protein	P	n.d.	2,03
PsbC	PSII 43 KDa protein (CP43)	P	-	2,71
PsbB	PSII 47KDa protein (CP47)	P	-	3,31
PsaA	PSI P700 apoprotein A1	P	n.d.	3,41
PsbD	PSII D2 protein (D2)	P	-	3,60
PsbA	PSII 32 KDa protein (D1)	P	-	4,64

¹ Lokalisierung des Gens auf G = Genom bzw. P = Plastom

² Proteinabundanz basierend auf den immunologischen Untersuchungen; + = erhöht, - = vermindert, o = unverändert, n.d. = nicht detektiert

³ Logarithmierte Transkriptionsänderungen zwischen WT und *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zu ZP2d

3.3.3.4 Identifizierung von über- und unterrepräsentierten regulatorischen Elementen der Kandidatengene

Die Identifizierung der Kandidatengene eröffnet die Möglichkeit zur Suche gemeinsamer über oder unterrepräsentierter Sequenzmotive innerhalb der Promotorregionen. Daher wurden alle Gruppen der Kandidatengene mithilfe des Programmes *FIRE* (*finding regulatory elements; Elemento et al., 2007*) auf sich wiederholende Sequenzmotive hin untersucht. Dazu wurden sie in Abhängigkeit ihrer Transkriptionsänderung in gleich große Gruppen geordnet und auf alle möglichen Sequenzmotive von 5-8 bp Länge getestet. Ausschließlich in der Gruppe zu ZP2 unter Bedingung 3 konnten insgesamt neun Motive identifiziert werden, von denen jedoch nur drei Motive bekannt sind. Diese sind GADOWNAT, 14BPATERD1 sowie OBF45BSinGST6. Diese Gruppe beinhaltete alle Gene, die signifikant im WT ansprachen, aber in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht reguliert wurden.

Das GADOWNAT Motiv wurde in *A. thaliana* Promotorsequenzen von Genen identifiziert, welche nach exogener Gibberellinsäure (GA) Behandlung reprimiert wurden (Ogawa *et al.*, 2003). Auch in dem experimentellen Ansatz dieser Arbeit war dieses Motiv in den Promotorsequenzen stark reprimierter Gene im WT signifikant überrepräsentiert. Das 14BPATERD1 Motiv fungiert bei der Induktion von Genen unter Trockenstress (Simpson *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu war in dieser Arbeit das Promotormotiv in der Gruppe der stark reprimierten Gene signifikant überrepräsentiert und in der Gruppe der induzierten Gene signifikant unterrepräsentiert. Die gruppierten Kandidatengene zu ZP2d (Bedingung 3) wurden zusätzlich auf überrepräsentierte funktionelle Gruppen getestet. In der Gruppe der am stärksten reprimierten Gene (relative Transkriptionsänderung \log_2 -4,4 bis -0,9) war die funktionelle Gruppe „Transkriptionsfaktor Aktivität“ signifikant überrepräsentiert. Die funktionelle Zuordnung „Antwort auf chemischen Reiz“ war hingegen in der Gruppe der stark induzierten Gene (relative Transkriptionsänderung \log_2 +1,2 bis +3,7) überrepräsentiert. Unter diesem Begriff werden auch die Antworten auf z.B. den Redoxstatus, oxidativen Stress oder auch Nährstoffe zugeordnet.

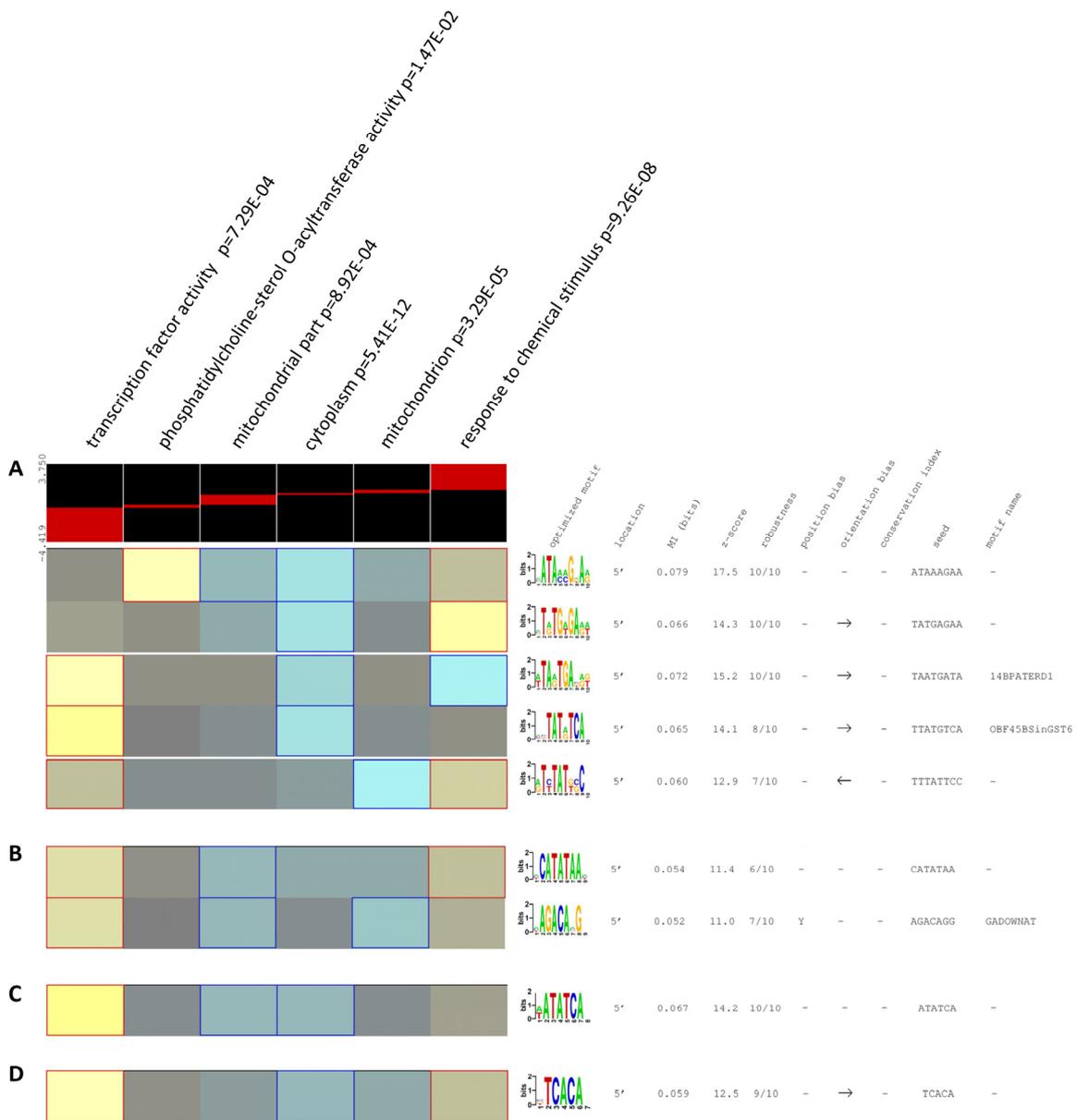


Abbildung 3.30 Darstellung aller vorausgesagten DNA Motive der 5' UTR für die Kandidatengene nach ZP2d HL Exposition, gefiltert nach Bedingung 3. Diese Gruppe beinhaltet *alle* Gene, die signifikant im WT ansprechen aber in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht reguliert werden. Die Gene wurden entsprechend ihrer logarithmischen Transkriptionsänderung in sechs gleichgroße Cluster sortiert. Für jeden Cluster wurde die am höchsten signifikante funktionelle Gruppe ermittelt und oben angegeben. Gelb zeigt eine Überrepräsentation bzw. Blau eine Unterrepräsentation des links angegebenen Motives. Signifikante Über-/Unterrepräsentation ($p \leq 0,05$) ist rot/blau umrandet. Die Position sowie Orientierung des Motives sind zusammen mit der Robustheit des statistischen Tests angegeben. (A) Alle identifizierten 8 bp langen Motive, bzw. 7 bp (B), 6 bp (C) und 5 bp (D).

4. DISKUSSION

Die Prozesse der Akklimatisierung in Abhängigkeit von der Lichtintensität und die notwendigen Signalkaskaden sind nur unvollständig verstanden. Es wird angenommen, dass die Regulation der Akklimatisierung über den Reduktionsgrad der Elektronentransportkette (ETK), insbesondere des Plastochinon Pools (PQ-Pool) reguliert und perzipiert wird. Weitere Signalwege über die Tetrapyrrolbiosynthese, die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die plastidäre Transkription wurden postuliert (Abschnitt 1.4). Über die Beteiligung des Kohlenhydratstoffwechsels an der Akklimatisierung der Photosynthese wurde ebenfalls häufig spekuliert (Paul und Pellny, 2003; Kleine *et al.*, 2009; Pfannschmidt *et al.*, 2009). Wohl auch aufgrund der hohen Flexibilität des Kohlenhydratstoffwechsels konnten bislang keine Stoffwechselmutanten identifiziert werden, die einen eindeutigen und direkten Defekt in den Akklimatisierungsprozessen zeigten. Eine nähere Analyse der Einbindung von Metaboliten in die Signalgebung bei der Akklimatisierung an veränderte Lichtbedingungen erscheint jedoch ein erfolversprechender Ansatz zu sein, da die Signatur des Metaboloms sich schnell und direkt in Abhängigkeit von Umweltreizen und auch während der Akklimatisierungsprozesse verändert (Bräutigam *et al.*, 2009). Ob und wie diese Veränderungen in der metabolischen Signatur perzipiert und in Signale umgewandelt werden könnten, ist bislang nicht klar. Es wäre denkbar, dass hierbei ähnliche Mechanismen wie bei dem seit einiger Zeit etablierten „*sugar signalling*“ greifen. Freie Zucker besitzen in einer Reihe von physiologischen Prozessen wie z.B. der Entwicklung, Seneszenz und auch Stress eine Signalwirkung (Smeekens 2000; Rolland *et al.*, 2002; Rolland *et al.*, 2005).

Die durch Schneider *et al.* (2002) generierte *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante, die eine Verringerung im Tagesexport von Triosephosphaten (TPT; *tpt-1*) und einen Defekt in der Stärkebiosynthese (AGPase; *adg1-1*) aufweist, zeigte einen drastischen Wachstums- und Photosynthesephänotyp (Häusler *et al.*, 2009). Dieser ist, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, mit einer dramatischen Verminderung der Akkumulation von freien Zuckern gekoppelt. Die generelle Überlebensfähigkeit der bereits beschriebenen Doppelmutante wurde der dort vorhandenen Restaktivität des TPT zugeschrieben. Die *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante offenbarte eine verminderte maximale Quanteneffizienz (F_v/F_m -Verhältnis), die durch eine Erhöhung der Grundfluoreszenz im dunkeladaptierten Blatt verursacht wurde.

Die erhöhte Grundfluoreszenz wurde mit einem stark reduzierten PQ-Pool in Verbindung gebracht (Häusler *et al.*, 2009). Des Weiteren konnten Untersuchungen zur Ultrastruktur der Chloroplasten eine erhöhte Granastapelung der Thylakoide sowie das vermehrte Vorkommen von Plastoglobuli belegen (Häusler *et al.*, 2009). Diese physiologischen Charakteristika machen die *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante für Studien der Regulierung der Photosynthese im Zusammenhang mit dem Kohlenhydratstoffwechsel interessant. Ein kürzlich identifiziertes zweites Allel einer *tpt* Mutante (*tpt-2*) weist einen kompletten Verlust des TPT auf transkriptioneller sowie auf funktioneller Ebene auf und wurde ebenfalls in die *adg1-1* Mutante sowie in weitere Stoffwechsellmutanten (*mex1-2*, *pgi1-1*, *pgm1*, *sex1-3*) eingekreuzt. Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante war überlebensfähig, was eine essentielle Rolle der restlichen TPT-Aktivität für das Überleben von *adg1-1/tpt-1* ausschließt. Diese, aufgrund des Fehlens einer TPT-Restaktivität besser definierte Doppelmutante, wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit herangezogen, um Veränderungen der Akklimatisierung an Hochlicht zu studieren. Diese Doppelmutante wurde bezüglich ihrer Eigenschaften von Photosyntheseeffizienz, Proteinkomposition des Chloroplasten sowie Akklimatisierung in Abhängigkeit verschiedener Lichtintensitäten charakterisiert und im Zusammenhang zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und der Akklimatisierung an hohe Lichtintensitäten analysiert.

4.1 DIE HOMOZYGOTE DOPPELMUTANTE *ADG1-1/TPT-2* IST LEBENSFÄHIG

Inhibition der beiden zentralen Stoffwechselprozesse, welche die Pflanze mit Energie und Kohlenhydraten am Tag und in der Nacht versorgen, sollte zur Letalität führen. Die neu etablierte Doppelmutante war jedoch überlebensfähig. Es ist anzunehmen, dass die generelle Überlebensfähigkeit durch kompensatorische Mechanismen gewährleistet wird. So könnte in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante der Export von Photoassimilaten im Licht durch Induktion anderer Phosphattranslokatoren übernommen werden. In Frage kämen hierfür der Glukose-6-Phosphat/Phosphat Translokator (GPT), von denen *A. thaliana* zwei Isoformen (GPT1 bzw. GPT2) besitzt, sowie der Xylulose-5-Phosphat/Phosphat Translokator (XPT), der auch für Triosephosphate (TP) eine signifikante Transportaktivität aufweist (Eicks *et al.*, 2002). Die Expression des *GPT1* (Niewiadomski *et al.*, 2005) ist normalerweise auf die Schließzellen der Spaltöffnungen und die leitbündelnahen Bereiche beschränkt (Kunz *et al.*, 2010), während

der *GPT2* nur in reproduktiven, heterotrophen Geweben exprimiert wird (*Arabidopsis eFP Browser*; Winter *et al.*, 2007). In Mutanten mit Defekten in der Stärkebiosynthese, wie *adg1-1*, *pgi1-1*, *pgm1* (Abschnitt 1.5), wird die *GPT2* Aktivität auf transkriptioneller und funktioneller Ebene auch im Blatt stark induziert (Kunz *et al.*, 2010). Diese Induktion der *GPT* Aktivität korreliert mit einer Akkumulation von löslichen Zuckern am Tag (Quick *et al.*, 1995; Kunz *et al.*, 2010), welche durch den Defekt in der Stärkebiosynthese ebenfalls in den Mutanten (z.B. *adg1-1*) akkumulieren (Schneider *et al.*, 2002; Abbildung 3.13). Neben der Tatsache, dass die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht in der Lage ist, große Mengen an freien Zuckern zu akkumulieren (Abbildung 3.13) wurde durch Generierung einer *adg1-1/tpt-2/gpt2-1* Tripelmutante (Abbildung 3.15) demonstriert, dass *GPT2* nicht für die Überlebensfähigkeit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante verantwortlich ist.

Der *XPT* ist schwach, aber ubiquitär in der gesamten Pflanze exprimiert; es gibt jedoch keine Hinweise auf eine Induktion auf transkriptioneller Ebene in Blättern der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante (R.E. Häusler, nicht publizierte Daten). Aufschluss über die Einbindung des *XPT* an der Überlebensfähigkeit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante könnte das Einkreuzen der *xpt* Mutante in den Hintergrund der Doppelmutante geben.

Vitha *et al.* (2000) zeigten im Zusammenhang mit Studien über den Wurzelgravitropismus, dass die *adg1-1* Mutante in Einzelfällen kleine Stärkekörner im Chloroplasten der Blätter aufbaut. Des Weiteren wurde durch Fettke *et al.* (2010) eine alternative Stärkebiosynthese im Chloroplasten der Mutanten *pgm1* postuliert, der durch Import von Glc1P über die *AGPase* in der *pgm1* Mutante und möglicherweise über die *Glukanphosphorylase (PHS1)* in der *adg1-1* Mutante ablaufen könnte (Fettke *et al.*, 2010). Für Amyloplasten aus Kartoffelknollen konnten Fettke *et al.* (2010) zeigen, dass dort dieses Enzym (*S.t. PHO1*) in Richtung der Stärkesynthese arbeiten kann. Dementsprechend wäre es auch denkbar, dass eine Restaktivität einer alternativen Stärkebiosynthese das Überleben der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sichert. Allerdings ist bislang kein Transporter für Glc1P, weder in *A. thaliana* noch anderen Modellorganismen der höheren Pflanzen, identifiziert worden. Die Generierung weiterer Kreuzungen der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante mit Mutanten mit Defekten im Export von Stärkeabbauprodukten wäre hier aufschlussreich.

4.2 EINE VERÄNDERUNG DER PHOTOSYNTHESE-ASSOZIIERTEN KOMPONENTEN IM HOCHLICHT VERURSACHT DEN HCF PHÄNOTYP DER *ADG1-1/TPT-2* DOPPELMUTANTE

Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigte den gleichen Wachstums- und Photosynthesephänotyp wie die durch Schneider *et al.* (2002) generierte *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante. Basierend auf den vorangegangenen Beobachtungen des morphologischen Phänotyps und den veränderten Photosyntheseeffizienzen durch Schneider *et al.* (2002) und Häusler *et al.* (2009) wurde der Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in Abhängigkeit von Hochlicht (HL) sowie Schwachlicht (LL) untersucht. Überraschenderweise war die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante unter LL Bedingungen vom WT und den Einzelmutanten nicht zu unterscheiden, während im HL gravierende Defekte im Wachstum und der Photosynthese auftraten. Der Photosynthesephänotyp unter HL war charakterisiert durch eine drastische Verminderung der Quanteneffizienz von PSII und PSI. Die F_v/F_m -Verhältnisse, als Maß für die maximal erreichbare Quanteneffizienz sowie die Integrität des PSII, waren aufgrund einer dramatischen Erhöhung der Grundfluoreszenz verringert (Tabelle 3.2). Daher kann die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auch als Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz (HCF) Mutante bezeichnet werden. Die Grundlagen dieses HL-abhängigen Photosynthesephänotyps werden im Folgenden basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit diskutiert.

Im WT konnten die Anpassungen an HL anhand der Zunahme der Chl- und Car-Gehalte als auch der Chl *a/b* Verhältnisse detektiert werden. Diese Veränderung der Chl *a/b* Verhältnisse basiert auf einer stöchiometrischen Änderung der Photosysteme relativ zu ihren LHCs. Unter HL Bedingungen wird die Abundanz der LHCIIs vermindert, während die Anzahl der PSII steigt (Bailey *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu zeigten die Chl *a/b* Verhältnisse der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante keine positive Korrelation zur Akklimation; diese waren im Vergleich zum WT unter HL stark verringert und unter LL kaum verändert (Tabelle 3.1). Dies gab erste Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung der Photosynthese-assoziierten Komponenten und eine gestörte Akklimation an HL der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Übereinstimmend mit den veränderten Photosynthesepigmentgehalten im HL zeigte die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich zum WT eine drastische Verminderung der Photosyntheseeffizienz im HL. Eine mögliche fehlerhafte Akklimation an HL wurde unterstrichen durch die veränderte Ultrastruktur der Chloroplasten. Die EM Aufnahmen des WT zeigten eine für LL akklimatisierte Pflanzen charakteristische höhere Stapelung der

Granathylakoide, welche im HL abnahm. Im Gegensatz dazu zeigte die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht nur im LL, sondern auch im HL deutlich überrepräsentierte, hohe Granastapel (Abbildung 3.5) und deutet somit auf eine fehlerhafte Akklimatisierung. Unter Berücksichtigung des nur im HL auftretenden HCF Phänotyps ist es daher unwahrscheinlich, dass die Veränderung der Ultrastruktur im LL und HL ursächlich für die eingeschränkte Photosyntheseeffizienz ist. Es ist vielmehr vorstellbar, dass eine fehlende Anpassung der chloroplastidären Ultrastruktur an HL Bedingungen mit der verminderten Photosyntheseeffizienz verbunden ist. Des Weiteren kam es im HL zu einer starken Bildung von Plastoglobuli in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, welche im LL fast vollständig fehlte. Die verstärkte Bildung von Plastoglobuli wurde ebenfalls für Pflanzen beschrieben, die oxidativem Stress ausgesetzt waren (Austin *et al.*, 2006). Es ist daher im Zusammenhang mit der reduzierten Photosyntheseeffizienz anzunehmen, dass auch die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante stärkerem oxidativen Stress ausgesetzt ist.

4.2.1 Die Veränderungen im Stoffwechsel der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante führen zu starker Photoinhibition unter Hochlicht

Die chloroplastidäre Ultrastruktur, zusammen mit den veränderten Chl *a/b* Verhältnissen, deuten auf eine veränderte HL-Akklimatisierung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante hin. Daher wurde die Abundanz der Photosynthese-assoziierten Proteine immunologisch im Vergleich zwischen HL und LL untersucht (Abbildung 3.6). Es wurde festgestellt, dass vornehmlich alle plastomkodierte Proteinuntereinheiten beider Photosysteme im HL deutlich in ihrem Gehalt vermindert waren. Dies betraf vor allem die vier essentiellen Kernkomponenten des PSII (PsbB [CP47], PsbC [CP43], PsbA [D1], PsbD [D2]; Abbildung 4.1 B) sowie des PSI (PsaB), deren Gehalte zwischen 10-50 % im Vergleich zum WT abnahmen. Die Proteingehalte der thylakoidalen ATPase, repräsentativ getestet durch die Untereinheit AtpB, war nur leicht verringert, während die kernkodierte Photosynthese-assoziierte Proteine der LHCII (Lhcb2, Lhcb4) und LHCI (Lhca1) unverändert blieben. Die native Auftrennung der Photosynthese-assoziierten Superkomplexe stützte die Beobachtungen der veränderten LHC/PS Stöchiometrie im HL (Abbildung 3.7). Übereinstimmend mit den reduzierten PSII Komponenten war auch hier die Superkomplexformierung von PSI und PSII deutlich vermindert. Die Abundanz der LHCs war unverändert und führte somit zu einer

überproportionalen Anzahl der LHC relativ zu den Photosystemen im Vergleich zum WT. Die globalen Expressionsanalysen offenbarten, dass die plastomkodierte Proteinuntereinheiten der Photosysteme auf transkriptioneller Ebene stark induziert wurden (Tabelle 3.15). Daher kann gefolgert werden, dass die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante der Degradation der Photosysteme gegensteuert.

Die Degradation wird verursacht durch eine erhöhte Absorption von Lichtenergie, die aufgrund einer akzeptorseitigen Limitation am PSII (reduziertes Q_A) nicht in die photochemischen Reaktionen abgeleitet werden kann, sondern unter anderem durch Anregung von Sauerstoff zur vermehrten Produktion von Singulett-Sauerstoff (1O_2) führt (Abschnitt 1.2). Die Produktion von 1O_2 wiederum führt zur oxidativen, irreversiblen Schädigung der Proteinkomponenten der Reaktionszentren am PSII sowie des Chl und kann bei verstärkter Bildung bis zur Lipidperoxidation der Thylakoidmembranen führen (Krieger-Liszkay, 2005; Triantaphylidès *et al.*, 2008). Die damit einhergehende Degradation der PSII Komponenten wird durch *de novo* Synthese kompensiert. Übersteigen die destruktiven Mechanismen am PSII jedoch die Kapazität der Reparaturmechanismen spricht man von Photoinhibition (Melis, 1999). Im Rahmen der Reparaturmechanismen kommt es zu einer teilweisen Disassemblierung des PSII Komplexes mit gleichzeitiger, lateraler Abwanderung in die Stromathylakoide. Hier werden die photooxidativ geschädigten PSII Untereinheiten, hauptsächlich PsbA (D1), kontrolliert abgebaut und durch neu synthetisiertes Protein in Koordination mit der Chl-Biosynthese ersetzt (Aro *et al.*, 1993; Melis, 1999; Nixon *et al.*, 2011). Dieser Reparaturmechanismus ist durch zwei entscheidende Mechanismen, nämlich die Chl-Biosynthese sowie die Translation der PsbA mRNA (Staub und Maliga 1994), lichtabhängig. Daher kann der Phänotyp durch eine verlängerte Dunkelinkubation nicht revertiert werden, was ebenfalls die Hypothese stützt, dass die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante unter starker Photoinhibition leidet (Abbildung 3.22). Parallel zu der Abnahme der PSII Komponenten kam es ebenfalls zu einer Abnahme von PSI. Über die destruktiven Mechanismen am PSI ist bisher wenig bekannt und normalerweise ist die PSI Abundanz bei Photoinhibition am PSII nicht betroffen (Powles, 1984). Die verminderten Chl-Gehalte, die stark verminderte PSII Abundanz, sowie die erhöhte Formierung der Plastoglobuli sind eindeutige Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress unter HL. Dieser führt zu der stark reduzierten Photosyntheseeffizienz am PSII.

4.2.2 Die Regulation der Lichtabsorption ist in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante gestört

Im Zuge der Akklimatisierungsprozesse wird die Lichtabsorption über die Zunahme bzw. Abnahme der LHCII Größe relativ zu PSII erhöht bzw. verringert. Diese Regulation der LHCII Abundanz wird bedingt durch eine transkriptionelle Kontrolle der kernkodierten Proteinuntereinheiten und einen gerichteten Abbau im Chloroplasten (Lhcb Proteine; Walters und Horten, 1994; Escoubas *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1995). Diese transkriptionelle Kontrolle ist mit dem Reduktionsgrad des PQ-Pools assoziiert. Es wird angenommen, dass die Perzeption des Reduktionsgrades von PQ zur Generierung von Signalen führt, welche die Transkription der Photosynthese-assoziierten Komponenten sowohl der plastomkodierten als auch der kernkodierten Gene reguliert (Escoubas *et al.*, 1995; Pfannschmidt *et al.*, 1999). Durch Transkriptanalysen der kernkodierten *Lhcb1* Gene mithilfe der qPCR konnte gezeigt werden, dass die Expression des *Lhcb1* Gens im WT unter HL im Vergleich zum LL deutlich verringert war (Abbildung 3.24). Diese Akklimatisierungsantwort auf HL blieb in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante jedoch aus. Die Transkriptgehalte waren im Vergleich zum LL kaum verändert. Parallel hierzu war die Proteinabundanz der Lhcb2 Proteine unter HL ebenfalls nicht reduziert (Abbildung 3.6). Dies lässt die Vermutung zu, dass die für die Akklimatisierung notwendige Signalgebung auf Grund von fehlenden „Transmittern“ oder durch eine Perturbation im Reduktionsgrad des PQ-Pools unterbrochen ist. Gestützt wird diese These durch die globale Expressionsanalyse, die zeigte, dass die plastomkodierten Gene deutlich induziert werden, während die kernkodierten Photosynthese-assoziierten Gene in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante fast nicht verändert waren (Tabelle 3.15). Dieser Aspekt sollte in weiterführenden Analysen mittels qPCR weiter vertieft und bestätigt werden.

Die Verteilung der Lichtabsorption zwischen den beiden Photosystemen wird in Abhängigkeit der Lichtintensitäten, aber auch -qualitäten durch den Prozess der *state transitions* (Abschnitt 1.2) reguliert. Unter verstärkter Anregung durch PSII Licht werden die assoziierten LHCII an der Lhcb2 Untereinheit phosphoryliert und assoziieren in der phosphorylierten Form mit PSI (Rochaix, 2011). Der Phosphorylierungsgrad von Lhcb2, CaS, PsbA/PsbD und PsbC war in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante unter HL Anzucht dramatisch verringert. Während unter HL Bedingungen die Abnahme der Phosphorylierung der Verringerung in den Komponenten von PsbA, PsbD und PsbC entsprach, zeigte sich eine stark verminderte Lhcb2 Phosphorylierung relativ zur Abundanz. Eine mögliche Perturbation in dem Prozess der *state*

transitions wäre die Folge. Die STN7 Kinase, welche die Phosphorylierung am Lhcb2 vermittelt, wird ebenfalls über den Reduktionsgrad des PQ-Pools aktiviert (Allen, 1992; Chuartzman *et al.*, 2007). Interessanterweise kann die STN7 Kinase aber auch über das Ferredoxin/Thioredoxinsystem am PSI deaktiviert werden, wenn es unter hohen Lichtintensitäten zu einer akzeptorseitigen Limitierung am PSI kommt (Rintamäkiet *al.*, 1997; Hou *et al.*, 2003). Dieser Mechanismus könnte ebenfalls für die verminderte Phosphorylierung der Lhcb2 Proteine in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL verantwortlich sein. Im Zusammenhang mit der Phosphorylierung der LHCII erhöht sich die negative Ladungsverteilung in den Granathylakoiden und könnten zu einem Entfalten der Granastapel führen. Dies wäre kongruent mit der Beobachtung, dass unter HL im WT die Granathylakoide weniger abundant sind (Lichtenthaler *et al.*, 1982). Es wird allerdings kontrovers diskutiert, ob die Lhcb2 Phosphorylierung oder auch die LHCII Abundanz mit der Umstrukturierung der chloroplastidären Ultrastruktur in Zusammenhang steht. Denn der Anteil des mobilen LHCII Pools in höheren Pflanzen liegt lediglich bei 15-20 % (Allen, 1992). Des Weiteren konnte durch Andersson *et al.* (2003) gezeigt werden, dass *A. thaliana* Mutanten, welche durch Expression eines antisense Konstrukts gegen *Lhcb2.1* einen vollständigen Verlust der Lhcb2 und Lhcb1 Proteine aufwiesen, eine deutliche Stapelung von Granathylakoiden zeigten. Die fehlende Phosphorylierung der Lhcb2 Proteine, trotz der unveränderten Abundanz könnte jedoch eine mögliche Erklärung für die hohe Granathylakoidstapelung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante sein.

4.2.3 Ungebundene LHCs verursachen der HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante

Durch die fehlende Anpassung der Abundanz der LHCII Komplexe parallel mit einer starken Verminderung der PSII Komponenten ist die Stöchiometrie der Lhcb2 Proteine zu PSII in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante unter HL dramatisch verändert. Auch die Stöchiometrie von LHCI zu PSI scheint betroffen zu sein; PsaB war in den immunologischen Untersuchungen um 50 % vermindert, während die Lhca1 Abundanz nicht beeinträchtigt war. Interessanterweise zeigten die Fluoreszenz-Emissions-Spektren bei 77 K, dass die LHCs mehrheitlich nicht mehr an die Photosysteme gebunden sind (Abbildung 3.8). Losgelöste LHCs sind hoch fluoreszent (Yamane *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2009) und möglicherweise die Hauptursache für den HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Diese erhöhte Fluoreszenz der LHCs konnte im

Licht auf ein Niveau des WT gelöscht werden und gab Grund zu der Annahme, dass die LHCs an der „Hoch-Energie“ Löschung (q_E ; Abschnitt 1.2) beteiligt sind. Dies konnte unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren für die ATPase (Tentoxin), einem Entkoppler des transthylakoidalen pH Gradienten (Nigericin) als auch einen Inhibitor des Xanthophyllzyklus (DTT) bestätigt werden (Abbildung 3.10). Durch die Infiltrierung der Blätter mit Nigericin oder DTT konnte die Fluoreszenzlöschung im Licht vollständig unterbunden werden, während eine Blockierung der ATPase zu einer noch gesteigerten Löschung führte.

Die „Hoch-Energie“ Löschung q_E ist einer der wichtigsten Regulatoren der Lichtabsorption, und schützt als protektiver Mechanismus PSII vor Photoinhibition durch die Abstrahlung der Anregungsenergie in Form von Wärme. Es benötigt die Beteiligung des pH-Gradienten über die Thylakoidmembran und eines intakten Xanthophyllzyklus in Koordination mit der PSII Untereinheit PsbS (Abschnitt 1.2). Die topologische Organisation der LHCII, die durch biochemische Untersuchungen und EM Aufnahmen aufgeklärt wurde, ist von entscheidender Bedeutung für q_E . Die LHCII sind in zwei Schichten um PSII organisiert. Die kleinste Einheit eines PSII-LHCII Komplexes wird durch ein Heterotrimer (Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3) gebildet, das mit Lhcb5 (CP29), Lhcb6 (CP26) um das dimere PSII Zentrum assoziiert ist (Boekema *et al.*, 1999; Morosinotto *et al.*, 2006). Diese Struktur wird auch als C_2S_2 Partikel bezeichnet, wobei C die Anzahl der PSII Zentren und S die Anzahl der stark gebundenen LHCII Trimere beschreibt (Abbildung 4.1). Die äußere Schicht wird aus LHCII Trimeren und Lhcb6 (CP24) zur Ausbildung eines $C_2S_2M_2L_x$ aufgebaut, wobei M die Anzahl der moderat und L der lose (*loosely*) gebundenen LHCII Trimere benennt. Betterle *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Dissoziation eines Superkomplexes aus LHCII-M, Lhcb5 und Lhcb6 vom PSII im Licht für die Initiierung von q_E notwendig ist. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass auch an diesen ungebundenen LHCII q_E stattfindet. Betterle *et al.* (2009) zufolge ist die Dissoziation ein reversibler, schneller Prozess, der nicht mit dem Auf- und Abbau der Proteinkomponenten in Zusammenhang steht und durch Lichteinstrahlung induziert wird. In Dunkelheit re-assoziiert dieser Komplex wieder mit den PSII Zentren. Da jedoch die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante auch im dunkeladaptierten Blatt eine erhöhte Grundfluoreszenz besaß, muss davon ausgegangen werden, dass die LHCII nicht mehr mit PSII re-assoziiieren. Langzeitverdunkelungsexperimente konnten diese Vermutung bestätigen (Abbildung 3.22). Im WT war aufgrund dunkelinduzierter Seneszenz eine Verringerung der

F_v/F_m -Verhältnisse zu beobachten, was sich aus einer Abnahme der maximalen Fluoreszenz ableitete. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante hingegen war die weitere Verringerung der F_v/F_m -Verhältnisse auf einen Anstieg der Grundfluoreszenz zurückzuführen.

Die Anzahl und Assoziierung der LHCII hängt bedeutend von den Lichtbedingungen ab. Wachstum unter LL führt zur Akkumulation von LHCII-M und -L Trimeren um die Lichtabsorption am PSII zu erhöhen, während die PSII Zentren die äußeren Schichten im HL verlieren. Diese Akklimatisierungsantwort verläuft über einen längeren Zeitraum von Tagen und bindet die transkriptionelle Kontrolle als auch den gerichteten Abbau von Proteinen mit ein (Lindahl *et al.*, 1995; Ballottari *et al.*, 2007). Während zwar der protektive Mechanismus des q_E in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante etabliert ist, setzt aber offenbar ein Akklimatisierungsprozess zur Verminderung der Lichtabsorption durch Verringerung der LHCII Abundanz unter HL nicht ein.

Die *dpa1* Mutante, welche einen Funktionsverlust in der transthylakoidalen ATPase besitzt, kann den pH-Gradienten nicht mehr abbauen, was eine Blockierung der ETK zur Folge hat (Dal Bosco *et al.*, 2004). Daher war in dieser Mutante keine Photosyntheseeffizienz mehr messbar. Die Mutante zeigte jedoch einen vergleichbaren HCF Phänotyp wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und wurde daher zu Vergleichszwecken in die Untersuchungen mit einbezogen. Durch Inhibitorversuche konnten Dal Bosco *et al.* (2004) zeigen, dass die Löschung der hohen Chl *a* Fluoreszenz im Licht durch Nigericin unterbunden werden konnte. Zwar wurde dies auch auf ein erhöhtes q_E zurückgeführt, eine Klärung des Mechanismus blieb aber aus. Die weiterführenden immunologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (Abbildung 3.21) zeigten, dass, obwohl die Mutante den gleichen HCF Phänotyp aufwies, die Abundanz der PSII und auch der Lhcb2 nicht verändert waren. Daher ist auszuschließen, dass die verminderte Abundanz der Photosysteme in der *adg1 1/tpt-2* Doppelmutante allein für eine Entkopplung der LHCs verantwortlich ist. Möglicherweise geht die Ursache des HCF Phänotyps auf die veränderte Phosphorylierung der Lhcb2 Proteine zurück. Denn interessanterweise war die Phosphorylierung dieser Proteine in der *dpa1* Mutante ebenso wie in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante deutlich verringert (Abbildung 3.21).

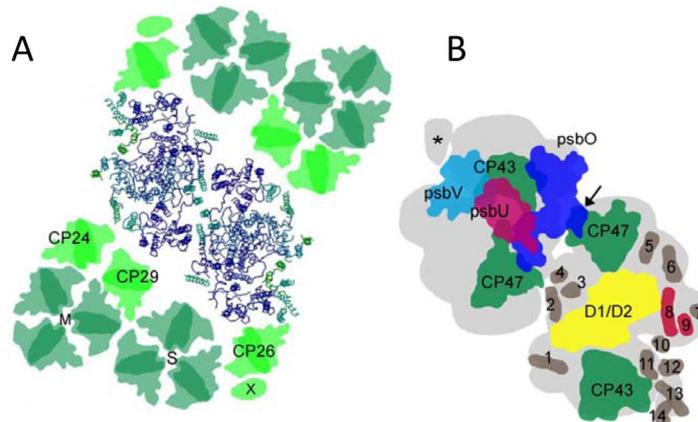


Abbildung 4.1 Aufbau der abundantesten PSII-LHCII Superkomplexe in *A. thaliana* ($C_2S_2M_2$). (A) Aufsicht auf die PSII-LHCII Struktur. Dunkelgrün=LHC-Trimere, Hellgrün=kleine Antennenkomplexe, M=moderat gebunden, S=Stark gebunden (B) Modell der Proteinanordnung im PSII Reaktionszentrum (Monomer). 1-14 benennen transmembrane α -Helices von kleinen Proteinuntereinheiten, 8 und 9 beschreiben die Lage der PsbF und PsbE (Cytochrom b559) Untereinheiten (modifiziert nach Dekker und Boekema, 2005).

4.2.4 Führt eine Limitierung der ETK zu einer Etablierung alternativer Elektronenflüsse?

In der Publikation von Häusler *et al.* (2009) wurde spekuliert, dass ein Teil der gesteigerten Grundfluoreszenz der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante auf einem erhöhten Reduktionsgrad des PQ-Pools im dunkeladaptierten Blatt beruht, da die Fluoreszenz zum Teil durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (FR) gelöscht werden konnte. FR-Bestrahlung regt spezifisch PSI an und führt zu einem Abfluss der Elektronen aus dem stromaufwärts liegenden System. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch FR-Bestrahlung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in Gegenwart der Inhibitoren Nigericin oder DTT gezeigt werden, dass auch diese teilweise Fluoreszenzlöschung an den Aufbau eines pH-Gradienten gekoppelt war (Abbildung 3.11). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die FR-Bestrahlung ein zyklischer Elektronentransport (CEF) um PSI induziert wurde, der für den Aufbau eines pH-Gradienten verantwortlich war. Der Anteil der Fluoreszenzlöschung der LHCII durch FR-Bestrahlung spiegelte vermutlich die maximale Kapazität des CEF wider. Auch bei FR-Bestrahlung mit sehr hohen Photonenflussdichten ($PFD = 1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) konnte die Fluoreszenz in der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante nur teilweise gelöscht werden, während im Licht die Fluoreszenz auf WT-Niveau sank (Häusler *et al.*, 2009).

Weitere Hinweise auf die Etablierung des CEF unter HL fanden sich auch in den berechneten Elektronentransportraten von PSII und PSI (ETR_{II}; ETR_I). Im linearen Elektronentransport (LEF)

liegt das Verhältnis der ETRII:ETRI bei 1:1. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante lag dieses Verhältnis jedoch, bei vergleichbaren PFDs von aktinischem Licht (AL), bei 1:2 (Abbildung 3.4). Dies deutet einerseits auf einen hohen Anteil zyklischen Elektronentransports (CEF) am PSI hin, könnte aber auch auf einer ungleichmäßigen Verteilung der Anregungsenergie auf beide Photosysteme beruhen. Der exakte Mechanismus des CEF ist nicht im Detail verstanden, aber durch neuere Arbeiten an *Chlamydomonas reinhardtii* konnte die Bildung eines Superkomplexes aus PSI-LHCI-LHCII-FNR-Cyt b_6f -PGRL1 gezeigt werden, welcher möglicherweise hier den CEF vermittelt (Iwai *et al.*, 2010). Dies lässt vermuten, dass auch die erhöhte Abundanz der Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante ein weiterer Hinweis auf vermehrten CEF unter HL ist (Abbildung 3.6). Des Weiteren könnte in zukünftigen Experimenten die Beteiligung des CEF an der Ausprägung des HCF Phänotyps durch Inhibitoren überprüft werden. Studien zum CEF zeigten beispielsweise, dass der Elektronentransport (ET) über PGR5 Antimycin A sensitiv ist (Dal Corso *et al.*, 2008). Nach Infiltrierung des Inhibitors sollte daher auch in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante hier die ETRI deutlich gesenkt werden, und die Fluoreszenzlöschung unter FR-Bestrahlung inhibiert werden.

Der zweite hypothetische ET des CEF verläuft über den NAD(P)H-Plastochinon-Dehydrogenase Komplex (NDH). Wie jedoch durch die native Auftrennung der Photosynthese-assoziierten Superkomplexe gezeigt werden konnte, kommt es in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht zu einer Bildung des NDH-Superkomplexes. Daher kann dieser alternative Elektronenfluss ausgeschlossen werden. Über Ursachen der fehlenden Bildung kann nur spekuliert werden. Möglicherweise ist der Komplex auf Grund einer fehlerhaften Transkriptionsregulierung zwischen Kern und Chloroplast instabil. Durch die globalen Expressionsanalysen wurde deutlich, dass obwohl die plastomkodierte NDH-Untereinheit induziert wurde, die kernkodierte NDH-Untereinheit aber keine erhöhte Expression aufwies (Abschnitt 3.3.3.3). Die physiologische Relevanz des NDH-Komplexes in höheren Pflanzen ist noch immer unklar, da auch *ndh* Mutanten nur leichte Effekte auf den CEF erkennen ließen (Munekage *et al.*, 2004). Auch wenn dieser putative alternative Elektronenfluss für die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante ausgeschlossen werden kann, sollte in zukünftigen Arbeiten die Abundanz der einzelnen NDH-Untereinheiten weiterführend immunologisch untersucht werden. Zudem könnte eine weitere native Auftrennung der Superkomplexe von LL

angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten klären, ob es sich um einen generellen Defekt in der Assemblierung des NDH-Komplexes handelt oder im Zusammenhang mit der HL-Akklimation steht.

Bisherige Publikationen verweisen wiederholt auf den CEF als einen Mechanismus für die Verstärkung des transthylakoidalen pH-Gradienten und für die Induktion von q_E (Rumeau *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2009). Mutanten mit Defekten in CEF (*pgr5*), die unter HL Bedingungen angezogen worden waren, waren sensitiver gegenüber Photoinhibition (Munekage *et al.*, 2002). CEF wird sehr wahrscheinlich über den Reduktionsgrad des NADPH-Pools reguliert und durch eine erhöhte Akkumulation von NADPH relativ $NADP^+$ am PSI eine akzeptorseitige Limitierung eintritt (Okegawa *et al.*, 2008). Dies wäre konsistent mit dem durch Häusler *et al.* (2009) bestimmten erhöhten NADPH/NADP-Verhältnis in der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante, welches zu einer akzeptorseitigen Limitierung am PSI führen könnte. Diese These sollte in weiterführenden Untersuchungen durch eine erneute Bestimmung der NADPH/NADP-Verhältnisse unter Einbeziehung der verschiedenen Lichtbedingungen in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante überprüft werden. Dies könnte auch mit der verringerten Lhcb2 Phosphorylierung in Zusammenhang stehen, da die verantwortliche Kinase unter reduzierenden Bedingungen im Stroma abgeschaltet wird (Abschnitt 4.2.2).

Allerdings steht eine akzeptorseitige Limitierung des PSI im Widerspruch zu den durch Absorptionsmessungen bestimmten Parametern des PSI. Hier wurde festgestellt, dass es zu einer donorseitigen, nicht aber zu einer akzeptorseitigen Limitierung am PSI kommt, also die Re-Oxidation des P700 durch Elektronen vom P680 limitiert ist. Daher könnte auf einen vermehrt oxidierten PQ-Pool geschlossen werden. Durch die dramatischen stöchiometrischen Veränderungen der Photosynthese-assoziierten Komponenten und die hohe Grundfluoreszenz im dunkeladaptierten Blatt geraten die Bestimmungen der Photosyntheseeffizienzen *in vivo* und die sich daraus ableitenden Parameter an ihre Grenzen. Kalkulationen der ETRs beruhen auf bestimmten Annahmen. So wird davon ausgegangen, dass etwa 84 % des eingestrahlt Lichts vom Blatt absorbiert werden und das Licht gleichmäßig von beiden Photosystemen absorbiert wird. Die beschriebenen Veränderungen der im HL angezogenen *adg1-1/tpt-2* Doppelmutanten führten aber auch zu einem

verminderten Chl-Gehalt und daher können die Absorption des Lichts und somit die tatsächlichen ETRs deutlich verringert sein. Wenn die Stöchiometrie der Photosysteme oder deren LHCs zueinander verändert ist, was durch die veränderten Chl *a/b* Verhältnisse angedeutet wird, ist es denkbar, dass es zu einer ungleichen Verteilung der Lichtabsorption zwischen den Photosystemen kommen kann. Dies würde zu einer Unter- bzw. Überschätzung der ETRs führen. Hinweise für eine solche Unterschätzung der ETR am PSII lieferten parallele Messung der Chl *a* Fluoreszenz und der O₂ Entwicklung in der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante (Häusler *et al.* 2009). Das ETR/O₂ Verhältnis sank bei einer PFD oberhalb von etwa 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ deutlich unter den theoretischen Minimalwert von vier ab. Im WT hingegen lag das ETR/O₂ Verhältnis bei der gesamten Lichtserie zwischen vier und sechs.

Eine weitere Möglichkeit des Abflusses von Elektronen zur Verringerung des „Energiedrucks“ in der ETK könnte über den Wasser-Wasser-Zyklus (WWZ) laufen (Abschnitt 1.2). In diesem Fall würden die Elektronen am PSI nicht auf NADP⁺ sondern auf O₂ übertragen werden, wobei es zur Bildung von Superoxid-Anionen kommt. Die sequenzielle Detoxifizierung der Superoxid-Anionen läuft über Superoxiddismutase (SOD; Bildung von H₂O₂) und die Ascorbatperoxidase (APX; Jablonski und Anderson, 1982). Bei dieser Reaktion wird Ascorbat (Asc) durch H₂O₂ zu einem Molekül Monodehydroascorbatradikal (MDA) oxidiert. Zwei Moleküle MDA können im Folgenden zu einem Molekül Asc und einem Molekül Dehydroascorbat (DHA) reagieren. Die Regenerierung von Asc als Elektronendonator verläuft über das Glutathionsystem unter Verbrauch von NADPH im Stroma des Chloroplasten. Bereits durch Häusler *et al.* (2009) konnte ein deutlicher Abfall der Asc/DHA-Verhältnisse in der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante beobachtet werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass alternative Abflüsse der Elektronen aus dem System etabliert sind. Experimente zur Bestimmung der Asc und DHA sowie der Glutathiongehalte in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante befinden sich zurzeit in Vorbereitung. Eine erhöhte Produktion von hochreaktiven Superoxid-Anionen am PSI könnte zu einer irreversiblen Proteinschädigung führen und die um fast 50 % verringerte Abundanz des PSI erklären.

4.2.5 Der metabolische Status der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante ist direkt für die Ausprägung des HCF Phänotyp verantwortlich

Das Wachstum auf exogener Saccharose konnte den Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante unter HL stark abmildern. Neben einer Erhöhung der Wachstumsrate, wahrscheinlich durch Bereitstellung von Kohlenhydratvorstufen im Zytosol für das vegetative Wachstum wurde allerdings auch der HCF Phänotyp abgemildert. Die Chl- und auch die Car-Gehalte wurden bei den Fütterungsversuchen auf WT-Niveau gerettet. Die Chl *a* Fluoreszenz im dunkeladaptierten Blatt konnte deutlich gesenkt und die Photosyntheseeffizienz erhöht werden. Die Revertierung ging einher mit der Herstellung der wildtypischen Stöchiometrie der Photosynthese-assoziierten Komponenten; die PSII Abundanz (psbD) war deutlich erhöht (Abbildung 3.21). Interessanterweise konnte auch eine mit dem WT vergleichbare Phosphorylierung der Lhcb2 Proteine nach Saccharosefütterung im HL beobachten werden. Im Vergleich mit der *dpa1* Mutante kann daher geschlossen werden, dass die Lhcb2 Phosphorylierung mit dem HCF Phänotyp korreliert, während die verringerte PSII Abundanz keine Korrelation zeigt.

Wie bereits eingangs in der Diskussion erwähnt, wird aufgrund der Akkumulation löslicher Zucker im Zytosol die GPT2 Aktivität deutlich erhöht (Quick *et al.*, 1995). Somit könnte eine Induktion des GPT2, aufgrund der Saccharosefütterung, die fehlende TPT Transportaktivität in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante kompensieren und in der Lichtphase einen alternativen Export für Photoassimilate darstellen. Tatsächlich konnte mittels qPCR eine deutliche transkriptionelle Induktion des *GPT2* im WT und in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante detektiert werden. Durch Generierung einer *adg1-1/tpt-2/gpt-2* Tripelmutante wurde dieser Zusammenhang überprüft. Diese Tripelmutante zeigte den gleichen HCF Phänotyp wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante. Auch konnte der Phänotyp der Tripelmutante durch Fütterung exogener Saccharose gerettet werden. Dies schließt die Beteiligung des GPT2 an der Rettung des Phänotyps aus. Man könnte jedoch zwei mögliche Szenarien, wie die Rettung des Phänotyps durch Saccharosefütterung zustande kommt, ableiten.

(1) Die Zufuhr von exogen angebotenen Zuckern induziert weitere Transporter auf transkriptioneller oder auf funktioneller Ebene. Über einen Austausch von Reduktionsäquivalenten über die Chloroplastenmembran könnte die Energie aus dem Chloroplasten nach Vorbild des 3-PGA/TP Shuttles abgeleitet werden (Abschnitt 1.5). Ein

Kandidat für einen solchen kompensatorischem Mechanismus wäre das „Malat Ventil“. Hierbei wird überschüssiges NADPH im Chloroplasten verwendet, um aus Oxalacetat (OAA) Malat durch die NADP-Malatdehydrogenase (NADP-MDH) aufzubauen (Scheibe, 1991). Das Malat wird über einen erst kürzlich charakterisierten Transporter 2-Oxoglutarat/Malat Transporter (OMT1; Kinoshita *et al.*, 2011) im Gegentausch mit OAA ins Zytosol transportiert. Hier kann es zu OAA unter NADH Aufbau dehydrogeniert werden, oder auch in die ATP Synthese in den Mitochondrien einfließen. Scheibe *et al.* (2005) zeigten, dass das „Malat-Ventil“ bei HL induziert werden kann, wobei die Anzucht unter Kurztagbedingungen ein entscheidender Faktor ist. Unter Langtagbedingungen konnte hingegen keine Induktion beobachtet werden. Dies macht eine Einbindung bei der Rettung des Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, welche in allen Experimenten unter Langtagbedingungen angezogen worden sind, unwahrscheinlich. Um eine Rolle des „Malat Ventils“ bei der Rettung des Phänotyps zu untersuchen, könnten Hinweise durch Generierung von Tripelmutanten, durch Kreuzung der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante mit Mutanten mit Defekt im OMT1 oder auch der NADP-MDH, gewonnen werden.

(2) Die zugeführten Zucker besitzen eine Signalwirkung, die eventuell über einen Hexokinase-abhängigen Signalweg perzipiert werden und eine Transkription essentieller chloroplastidärer Komponenten regulieren. Dies könnte z.B. eine Reprimierung der *Lhcb* Gene beinhalten und zu einer adäquaten Anpassung des Metabolismus und der Photosynthese-assoziierten Komponenten führen und die starke Photoinhibition in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante verringern. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Kohlenhydratakkumulation und Photosyntheseeffizienz konnte durch Krapp *et al.* (1993) bereits hergestellt werden (Harrington und Bush, 2003). Durch Fütterung exogener Glukose wurden parallel Photosynthese-assoziierte Gene, die kleine Untereinheit der RubisCO (*RbcS*), *Lhcb1*, sowie die γ -Untereinheit der thylakoidalen ATPase reprimiert. Nachfolgende Arbeiten konnten dies auf die Funktion einer Hexokinase (HXK1) zurückleiten (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003). Das *A. thaliana* Genom kodiert für fünf (putative) Hexokinasen (HXL1-3) und Hexokinasen-ähnliche (HXKL1-2) Proteine. Auch hier könnte eine Generierung von Kreuzungen mit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante und HXK-Mutanten Aufschluss über zuckerabhängige Signalwege geben. Sollten solche Kreuzungen die zuckerabhängige Rettung

des HCF Phänotyps vermindern, wäre dies ein eindeutiger Beweis für eine Beteiligung der Zuckersignale in der Akklimatisierung.

4.2.6 Weitere Stoffwechselmutanten zeigen einen HCF Phänotyp im Hochlicht

Die Generierung weiterer Doppelmutanten mit Defekten in der Stärkebiosynthese sowie im Export sollten weitere Aufschlüsse über die Zusammenhänge zwischen Metabolitstatus der Chloroplasten bzw. des Zytosols und den Akklimatisierungsprozessen geben. Alle Doppelmutanten mit Defekten in der Stärkebiosynthese (*pgi1-1*, *pgm1*) und der Deletion des TPT offenbarten den gleichen HCF Phänotyp wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante in Abhängigkeit von HL (Abbildung 3.18 A). Daher kann der Anstau eines Intermediats wie z.B. Glc1P für die Ursache des Phänotyps ausgeschlossen werden. Eine Doppelmutante mit einem Defekt im Stärkeabbau (*sex1-3*; GWD) und dem TP Export zeigte nur eine leichte vergleichbare phänotypische Ausprägung des HCF (Abbildung 3.18 B). Dies deutet darauf hin, dass ein Abfluss der aufgebauten Zucker in eine funktionelle Stärkebiosynthese möglicherweise auch zu einer erhöhten Abnahme von ATP und NADPH führt. Die generierte *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante mit einem Funktionsverlust des Maltoseexports (Abschnitt 1.5) zeigte zwar eine schwere Wachstumsretardierung und stark chlorotische Blätter, jedoch war hier der Effekt auf die Chl *a* Fluoreszenz schwächer ausgeprägt als in den *pgi1-1/tpt-2* sowie die *tpt-2/pgm1* Doppelmutanten. Interessanterweise war auch in der *mex1-2* Einzelmutante eine leichte Erhöhung der Grundfluoreszenz zu beobachten. Durch weiterführende Aufnahmen von Fluoreszenzkinetiken unter FR-Bestrahlung konnten weitere Unterschiede erarbeitet werden. Während die *pgi1-1/tpt-2* sowie die *tpt-2/pgm1* Doppelmutanten eine vergleichbare Fluoreszenzlöschung im Licht und unter FR-Bestrahlung wie die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zeigten, war in der *mex1-2* Mutante sowie in der *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante nur im Licht eine Löschung der Fluoreszenz zu beobachten. Bei der *sex1-3/tpt-2* Doppelmutante konnte, aufgrund der nur geringfügig erhöhten Grundfluoreszenz, nur eine sehr leichte Fluoreszenzlöschung im Licht beobachtet werden. Weitergehende Analysen bei Funktionsverlust des Maltoseexports wurden durch Stettler *et al.* (2009) mit dem durch Punktmutagenese entstanden *mex1-1* Allels in *A. thaliana* durchgeführt. Diese Autoren folgerten aus ihren Beobachtungen, dass die Veränderungen der Photosyntheseeffizienz auf einen Anstau der toxischen Stärkeabbauprodukte Maltose und höheren Oligosaccharide wie

z.B. Maltotriose zurückgingen. Es wurde postuliert, dass die veränderte Homöostase der Chloroplasten zu einer gerichteten Degradation der Chloroplasten, gefördert über retrograde Signalwege, in intakten Zellen führt. Cho *et al.* (2010) generierten zur Analyse des Glukosetransports über die Chloroplastenmembran ebenfalls eine *tpt-2/mex1-2* Doppelmutante, welche die gleichen phänotypischen Charakteristika aufwies wie die in dieser Arbeit generierte *mex1-2/tpt-2* Doppelmutante. Interessanterweise konnte diese Mutante ebenfalls durch Fütterung von Saccharose gerettet werden (Cho *et al.*, 2010), was gegen die von Stettler *et al.* (2009) postulierte gerichtete Degradation von Chloroplasten in der *mex1-1* Einzelmutante spricht. Denn auch unter Saccharosefütterung würden die toxischen Abbauprodukte weiterhin im Chloroplasten akkumulieren, allerdings würde das osmotische Potential des Zytosols steigen. Daher kann gefolgert werden, dass die Mechanismen der Fluoreszenzlöschung und den damit verbundenen HCF Phänotyp der *pgi1-1-* bzw. *pgm1/tpt-2* Doppelmutanten und der *mex1-2* bzw. *mex1-2/tpt-2* unterschiedliche Ursachen haben. In den *pgi1-1-* bzw. *pgm1/tpt-2* Doppelmutanten handelt es sich vermutlich ebenfalls um q_E an losgelösten LHCI in einem intakten Chloroplasten. Bei den *mex1-2* und auch *mex1-2/tpt-2* Mutante kann jedoch die Fluoreszenz durch den Integritätsverlust des gesamten Chloroplasten nicht mehr an den LHCI gelöscht. Daher bleibt auch die FR-abhängige Fluoreszenzlöschung aus.

Aus den dargestellten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass nicht die Aktivität des TPT oder eine funktionelle AGPase direkt für den HCF Phänotyp ausschlaggebend ist. Die Ergebnisse der Zuckerfütterung und der Generierung der verschiedenen Stoffwechselfeldoppelmutanten deuten darauf hin, dass der generelle metabolische Status des Zytosols oder auch zwischen Chloroplast und Zytosol z.B. über die HXK perzipiert werden könnte, welches im Folgenden entscheidend zur Akklimatisierung der Photosynthese beitragen könnte. Das Verständnis der metabolischen Homöostase zwischen Chloroplast und Zytosol in Vergleich von LL und HL in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante könnte wichtige Hinweise geben.

4.3 DIE AKKLIMATISIERUNG DER *ADG1-1/TPT-2* DOPPELMUTANTE AN HOCHLICHT IST VERÄNDERT

Während das WT-Rosettengewicht unter HL-Bedingungen um das 34-fache zunahm, konnte in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante lediglich eine 2,4-fache Erhöhung detektiert werden (Tabelle 3.1). Offenbar hat sich die Photosynthese und stromabwärtsliegenden Prozesse im WT an die erhöhte PFD angepasst. Dies spiegelt sich ebenfalls in den gesteigerten Elektronentransportraten am PSII (ETRII) unter HL-Anzucht wider (Abbildung 3.4 A). Die maximal erreichbaren ETRII der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante waren auf 25 % im Vergleich zum WT vermindert. Im Vergleich zwischen LL und HL Anzucht von *adg1-1/tpt-2* wird deutlich, dass die maximal erreichbaren ETRII im HL nicht gesteigert werden konnten (Abbildung 3.4). Zugleich zeigte die Messung der löslichen Zucker im Tagesverlauf unter HL eine generelle Verringerung der Saccharose-, Glukose- und Fruktosegehalte um etwa 50 % im Vergleich zum WT. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante verhindert der Defekt im TPT den Export der Photoassimilate im Licht während parallel hierzu die Synthese von Stärke, als Kohlenhydratspeicher für die Nacht, inhibiert ist. Daher ist anzunehmen, dass der Pflanze nicht in ausreichendem Maße Kohlenhydrate zum vegetativen Wachstum zur Verfügung stehen und dies somit die Ursache für das retardierte Wachstums darstellt. Zuckerlimitation führt aber nicht zu einem generell verminderten Energiestatus im Licht. Die absoluten Gehalte an ATP und ADP sowie deren Verhältnis waren weder unter HL noch unter LL Anzucht im Vergleich zum WT verändert (Abbildung 3.14). Kunz *et al.* (2009) untersuchten die Effekte einer inhibierten β -Oxidation von Fettsäuren durch Deletion eines putativen peroxisomalen Fettsäuretransporters (PXA1). Durch die Generierung einer *adg1-1/pxa1* Doppelmutante konnte gezeigt werden, dass die Energiebereitstellung durch die β -Oxidation in der Nacht eine Schlüsselrolle in stärkefreien Mutanten übernimmt. Daher ist es möglich, dass auch in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante die Energiedefizienz in der Nacht durch die β -Oxidation teilweise kompensiert werden kann. Messungen der ATP und ADP Gehalte am Ende der Dunkelperiode könnten hier wichtige Hinweise geben.

4.3.1 Die globale Expressionsanalyse der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante offenbart eine deutliche veränderte Akklimatisierungsantwort auf Hochlicht

Die statischen Vergleiche der phänotypischen Eigenschaften der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im HL und LL deuten auf eine fehlerhafte oder auch inhibierte Akklimatisierung an HL hin. Um

die zeitlichen Prozesse im Detail aufzulösen, wurden die Pflanzen in einer Zeitreihe nach Transfer von LL auf eine 10-fach stärkere Lichtintensität (HL) näher untersucht. Die Akklimatisierung der Photosynthese wurde in dieser Zeitreihe anhand der Chl *a* Fluoreszenzparameter untersucht. Innerhalb der ersten 24 h war in allen getesteten Pflanzenlinien ein starker Abfall des F_v/F_m -Verhältnisses zu beobachten, was durch einen Rückgang der maximalen Fluoreszenzausbeute (F_m) bedingt wurde. Während im WT nach etwa 48 h eine Erholung der Fluoreszenzparameter einsetzte, stieg in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante jedoch ab diesem Zeitpunkt die Grundfluoreszenz (F_0) dramatisch an (Abbildung 3.23). Offenbar begann der Akklimatisierungsprozess nach etwa 48 h und war nach etwa sieben Tagen im WT abgeschlossen. Erst nach diesem Zeitraum hatten sich die F_v/F_m -Verhältnisse im WT wieder normalisiert. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante prägte sich nach 48 h der HCF Phänotyp aus. Basierend auf der zeitlichen Aufschlüsselung wurden zum Zeitpunkt (ZP) nach vier Stunden (4h) und nach zwei Tagen (2d) HL Exposition eine genomweite Expressionsanalyse im Vergleich zum LL (ZP0) durchgeführt. Die Analyse der genomweiten Expressionsdaten beschränkte sich in dieser Arbeit auf die Aufschlüsselung der unterschiedlichen Antworten der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich zum WT. Prinzipiell eröffnet aber schon die Analyse der WT Expressionsdaten die Möglichkeit, detaillierte Studien über die HL-Akklimatisierung unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen vorzunehmen.

Putative Kandidatengene der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wurden unter drei Bedingungen herausgefiltert. Alle Gene, welche im WT signifikant gegenläufig zur *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante reguliert waren, wurden unter Bedingung 1 zusammengefasst. Bedingung 2 erfüllten alle Gene, die in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante signifikant reguliert wurden, aber im WT nicht ansprachen. Im Gegenteil dazu wurden alle Gene, die im WT signifikant reguliert wurden, aber in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante nicht ansprachen, unter Bedingung 3 zusammengefasst. Unter Ausschluss der in den Einzelmutanten de-regulierten Gene, konnten so 1 832 Gene zu ZP4h sowie 1 681 Gene zu ZP2d identifiziert werden, die nur in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante im Vergleich eine veränderte Transkription nach HL Exposition aufwiesen (Abbildung 3.26). Zum ZP4h waren Gene, die mit der Transkriptionsprozessen in Zusammenhang stehen, in der Doppelmutante signifikant überrepräsentiert. Es lassen sich generell aus der Zuordnung der Kandidatengene in ihre funktionellen Gruppen zwei

Tendenzen beobachten. (1) Die *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante wies im Vergleich zum WT zu beiden ZP im HL einen deutlich höheren Anteil an de-regulierten Genen auf, die in Transkriptionsprozesse eingebunden sind. (2) Im Gegensatz dazu wurde im WT ein hoher Anteil an de-regulierten Genen gefunden wurde, die mit dem Stoffwechsel assoziiert sind (Abbildung 3.27).

Nach der Zuordnung der Kandidatengene zu einer putativen subzellulären Lokalisierung wurden die als chloroplastidär vorausgesagten Genprodukte im Detail betrachtet. Es lassen sich mehrere generelle Aussagen über die Transkriptionsregulierung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante treffen. (1) Gene, welche mit dem Schwefelmetabolismus in den Chloroplasten in Verbindung stehen wurden in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante zum ZP4h deutlich reprimiert. (2) Gene, die mit der Regulation der chloroplastidären Expression assoziiert sind, wurden vermehrt zu ZP4h und ZP2d in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante induziert. (3) Die veränderte Expression betraf viele Genprodukte, die in unterschiedliche Prozesse, wie etwa Schwefel-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel sowie Pigmentbiosynthese, innerhalb der Chloroplasten eingebunden sind. Insbesondere sind kernkodierte Gene interessant, die mit der chloroplastidären Transkriptionsregulierung im Zusammenhang stehen. Die Regulation dieser Gene deutet darauf hin, dass der veränderte Status der Chloroplasten in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante perzipiert wird und als Signal zum Kern weitergeleitet wird. Fey *et al.* (2005) konnten bei Studien der Genregulation in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtqualitäten, welche präferentiell PSII oder PSI anregen und somit den Reduktionsgrad des PQ-Pools modulieren, in Kombination mit dem Inhibitor DCMU (Abschnitt 1.4), 286 differentiell regulierte Gene identifizieren. Die Regulation dieser Gene war direkt vom Reduktionsgrad des PQ-Pools abhängig und betraf alle großen Gengruppen, wie Metabolismus, Transkriptionsregulierung und auch Photosynthese. Interessanterweise gibt es eindeutige Überlappungen zwischen den dort identifizierten Genen und den im Rahmen dieser Arbeit gefilterten chloroplastidär lokalisierten Kandidatengenen, wie z.B. die Adenylylsulfate Kinase (AtAKN2; At4g39940) oder die ATP-Sulfurylase (AtAPS4; At5g43780). Dies lässt eine essentielle Funktion des Schwefelmetabolismus bei den Akklimatisierungsprozessen der Photosynthese, in direkter Abhängigkeit vom Reduktionsgrad des PQ-Pools, vermuten.

Für die Analyse der Expressionsdaten wurde ein sehr breitgefächertes Ansatz gewählt, da kein Schwellenwert der Expression erreicht werden musste, sondern es ausreichend war, wenn die Gene als statistisch signifikant reguliert erkannt wurden. Daher gibt es eine große Anzahl unter den Kandidatengenen, welche nur schwach de-reguliert wurden und möglicherweise aufgrund von sekundären Effekten in der Transkription verändert waren. Dies könnte auch erklären, warum nur unter der Bedingung 3 zu ZP2d signifikant über- und unterrepräsentierte Promotormotive gefunden wurden (Abbildung 3.30). Unter dieser Bedingung wurden alle Gene, die im WT, aber nicht in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante, signifikant ansprechen, zusammengefasst. Das interessanteste Promotermotiv GADOWNAT ist in die Reprimierung von Genen durch das exogen applizierte Pflanzenhormon Gibberellinsäure (GA) eingebunden (Ogawa *et al.*, 2003). Es ist denkbar, dass GA-abhängige Signalwege in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante verändert sind.

4.3.2 Der HCF Phänotyp - ein physiologisches Modell

Der Photosynthese-Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante ist HL-abhängig und durch eine stark erniedrigte Photosyntheseeffizienz an beiden Photosystemen und eine stark erhöhte Chl *a* Fluoreszenz (HCF) im dunkeladaptierten Blatt charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verringerung der Effizienz am PSII auf eine starke Photoinhibition zurückgeht, die zu einer deutlich verminderten Abundanz der PSII Kernproteine führt. Der HCF Phänotyp selbst wird verursacht durch losgelöste LHCI und korreliert negativ mit dem Phosphorylierungsgrad der Lhcb2 Proteine. Im Licht kann die durch die losgelösten LHCs absorbierte Anregungsenergie in Abhängigkeit von dem über der Thylakoidmembran etablierten pH-Gradienten als Wärme (q_E) abgestrahlt werden. Somit könnten die verbliebenen, intakten Photosysteme vor einer Überanregung im HL geschützt werden. Ein derartiger Schutzmechanismus wurde bislang noch nicht beschrieben. Während die protektiven Mechanismen (Photoinhibition, q_E und möglicherweise auch der Wasser-Wasser-Zyklus) auf veränderte Lichtintensität greifen, ist aber offensichtlich die Langzeitantwort bei der HL-Akklimatisierung der Photosynthese in *adg1-1/tpt-2* sowie *tpt-2/pgm1* und *pgi1-1/tpt-2* verändert. Dies lässt sich insbesondere aus einer fehlenden Verminderung der Lhcb2 Proteinabundanz, einer nahezu unveränderten Ultrastruktur der Chloroplasten und den Transkriptionsspiegeln der *Lhcb1* Gene im statischen Vergleich von HL

und LL ableiten. Dies führt zu einer dramatischen Veränderung der Stöchiometrie der mit der Photosynthese-assoziierten Komponenten.

Unter Einbeziehung der Lichttransferexperimente kann ein Modell postuliert werden, welches die Etablierung des HCF Phänotyps in Teilen erklärt. Unter LL Bedingungen befindet sich die Photosynthese nahe des Licht-Kompensationspunktes und es ist wahrscheinlich, dass die Produktion von NADPH und ATP für die in den Chloroplasten stattfindenden Stoffwechselprozessen in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante adäquat ist. Bei einem Transfer zu HL Bedingungen wird der hierdurch erhöhte Reduktionsgrad der ETK und des PQ-Pools perzipiert und führt zunächst zu einer „Kurzzeitantwort“. Dies kann aus den Expressionsdaten der *Lhcb1* Gene im Kurzzeittransfer in HL abgeleitet werden (Abbildung 3.24)

Aufgrund der erhöhten NADPH/NADP-Verhältnisse in der *adg1-1/tpt-1* Doppelmutante und den Defekten des Tag- und Nachtexports von Photoassimilaten der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante kann postuliert werden, dass es im weiteren Verlauf der erhöhten Lichtabsorption zu einer fehlenden Abnahme von NADPH und ATP kommt, welche in einem *feedback* Mechanismus die Photosyntheseeffizienz durch Photooxidation sowie das hohe q_E an den entkoppelten LHCII reduziert. Gestützt wird diese Hypothese durch Versuche von Durchan *et al.* (2001) an *Nicotiana tabacum* Pflanzen in CO₂ freier Luft. Der CO₂ Mangel führt zu einer Inhibierung des Calvin-Zyklus, dem primären Abnehmer von ATP und NADPH, und es bildete sich im Folgenden ein mit der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante vergleichbarer HCF Phänotyp aus. Die Annahme eines erhöhten Reduktionsgrads des Chloroplastenstromas würde mit der Abschaltung der LHCII STN7 Kinase und mit der erniedrigten *Lhcb2* Phosphorylierung in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante übereinstimmen (Rintamäki *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 2003).

Die Langzeitantwort zur Induktion der Akklimatisierungsprozesse, die gezielte Induktion bzw. Repression von Photosynthese- und auch Metabolismus-assoziierten Genen, ist in der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante massiv gestört. Da es durch Saccharosefütterung zu einer Revertierung des HCF Phänotyps kommt, könnte angenommen werden, dass die Zuckerakkumulation im Zytosol, die notwendigen Akklimatisierungsprozesse einleitet und eine Signalfunktion besitzt. Im Folgenden werden Gene induziert, deren Produkte (1) die stöchiometrische Anpassung der Photosynthese-assoziierten Komponenten an HL einleiten

und (2) zum Abfluss der Kohlenhydrate und somit der Reduktionskraft aus dem Chloroplasten führen. Im physiologisch intakten Chloroplasten würde dieser Prozess durch eine beginnende Zuckerakkumulation im HL induziert.

Dieses Modell ist spekulativ und sollte durch nachfolgende Experimente geprüft werden. Dazu muss das Verständnis der Stoffwechselforgänge in den Chloroplasten der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante vertieft werden. Vorstellbar wäre durch nicht-wässrige Fraktionierung den Metabolitenpool von Chloroplast und Zytosol getrennt zu bestimmen. Eine genomweite Expressionsanalyse nach Zuckerfütterung könnte Hinweise auf die Expression von Transportern geben, welche an der Rettung des Phänotyps der *adg1-1/tpt-2* beteiligt sind. Während der GPT2 durch die Experimente dieser Arbeit ausgeschlossen werden kann, könnten jedoch andere Transporter eine funktionelle Rolle spielen. Die Generierung von Kreuzungen von Mutanten in diesen Transportern oder auch den Hexokinasen in den Hintergrund der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante würden deren essentielle Bedeutung bei der Zucker-abhängigen Rettung unterstreichen. In diesem Zusammenhang muss geklärt werden, welche Zucker neben Saccharose eine Revertierung des Phänotyps verursachen. Desweiteren könnten Messungen von an der Detoxifizierung beteiligten Komponenten wie z.B. die Asc/DHA-Verhältnisse Aufschluss über die Etablierung alternativer Elektronenflüsse geben. Durch Inhibitorversuche mit Antimycin A könnte die Rolle des CEF am HCF Phänotyp der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante untersucht werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Akklimatisierungsprozesse an veränderte Lichtbedingungen von Stoffwechselmutanten mit Defekten im Tages- und Nachtexport von Photoassimilaten untersucht. Hierzu wurde eine kürzlich identifizierte Mutante mit vollständigem Funktionsverlust des Triosephosphat/Phosphat Translokators (TPT; *tpt-2*) sowohl in den Hintergrund von (1) Mutanten mit einer deutlich beeinträchtigten Stärkebiosynthese in den Blättern (AGPase, *adg1-1*; plastidäre Phosphoglukomutase, *pgm1*; Phosphoglukoseisomerase, *pgi1-1*) als auch in (2) Mutanten mit Defekten im Stärkeabbau (Glukan-Wasser-Dikinase, *sex1-3*) bzw. im Export von Stärkeabbauprodukten (Maltoseexporter, *mex1-2*) eingekreuzt. Die erstaunlicherweise überlebensfähigen Doppelmutanten zeigten eine starke Wachstumsretardierung und mit Ausnahme der *sex1-3/tpt-2* Doppelmutante einen Photosynthesephänotyp. Dieser war charakterisiert durch eine verminderte Photosyntheseeffizienz und eine stark erhöhte Grundfluoreszenz. Daher wurden diese Doppelmutanten auch als „Hoch-Chlorophyll-Fluoreszenz“ (HCF) Mutanten definiert.

Es wurde festgestellt, dass der HCF Phänotyp nur unter Hochlichtbedingungen ausgebildet wurde, während die Doppelmutanten unter Schwachlichtbedingungen phänotypisch vom Wildtyp nicht zu unterscheiden waren. In der *adg1-1/tpt-2* Doppelmutante führte eine Anzucht im Hochlicht zu einer dramatischen Veränderung der Gehalte von Photosynthese-assoziierten Proteinen. Die plastomkodierte zentrale Untereinheit von beiden Photosystemen waren stark verringert, während die kernkodierte Lichtsammelkomplexe weder auf transkriptioneller noch auf Proteinebene eine Veränderung zeigten. Die Ursache der stark erhöhten Grundfluoreszenz konnte auf eine Ablösung der Lichtsammelkomplexe von den Photosynthesezentren zurückgeführt werden. Die erhöhte Fluoreszenz der ungebundenen Lichtsammelkomplexe wurde im Licht durch den Prozess der „Hoch-Energie“-Löschung in Form von Wärme abgestrahlt. Dieser Prozess kann als protektiver Mechanismus interpretiert werden und wurde in dieser Form bisher noch nicht beschrieben. Es wird postuliert, dass die beobachteten Veränderungen im Zusammenhang mit einer fehlerhaften Hochlicht-Akklimatisierung aufgrund einer veränderten retrograden Signalgebung stehen. Aus der Analyse von genomweiter Expressionsdaten konnte abgeleitet

werden, dass Veränderungen der Lichtintensität dennoch perzipiert werden und zu einer Modulation der chloroplastidären Genexpression führen.

Fütterung mit exogener Saccharose führte zu einer Revertierung des HCF- sowie des Wachstumsphänotyps im Hochlicht. Daher wird die Rolle Zucker-abhängiger Signalwege bei der Hochlicht-Akklimatisierung diskutiert und ein Modell postuliert, wie es zu einer regulatorischen Funktion des Kohlenhydratstoffwechsels kommen kann.

6. ABSTRACT

In the present work the acclimation response to high light of *A. thaliana* plants defective in the day- and night path of photoassimilate export was analyzed. A newly discovered mutant with complete loss of activity of the triosephosphate/phosphate translocator (TPT; *tpt-2*) was crossed into the background of (1) plants affected in the starch biosynthesis in leaves (AGPase, *adg1-1*; plastidic phosphoglucomutase, *pgm1*; plastidic phosphoglucose isomerase, *pgi1-1*) as well as (2) mutants defective in starch degradation (glucane water dikinase, *sex1-3*) or in the export of starch degradation products (maltose transporter, *mex1-2*). Surprisingly, the double mutants were still viable although showing strong growth retardation and developed, except for the *sex1-3/tpt-2* double mutant, a dramatic photosynthetic phenotype. This phenotype was characterized by a reduced photosynthetic efficiency and increased ground fluorescence. Therefore these double mutants were defined as “high-chlorophyll-fluorescence” (HCF) mutants.

The HCF phenotype was observable only in mutant plants grown under high light conditions, whereas plants grown in low light did not differ from the wild type. In the *adg1-1/tpt-2* double mutant, growth in high light led to a drastic alteration in the content of photosynthesis-associated proteins. The amount of plastome-coded core subunits of both photosystems were strongly reduced, whereas the nuclear-encoded light harvesting complex subunits did not show any significant changes neither transcriptionally nor at the protein level. The increased ground fluorescence was due to the detachment of the light harvesting complexes from the reaction centers. In the light the increased fluorescence of the free antenna could be quenched by thermal dissipation. This process at the side of free antenna was interpreted as a protective mechanism and was never described in this form. It is postulated that the observed changes are the consequence of an altered acclimation to high light due to a perturbation in retrograde signaling. But as it was revealed by a genome-wide transcriptional analysis, changes in the light intensity could be perceived by the *adg1-1/tpt-2* double mutant, leading to a modulation of the nuclear-encoded plastidic genes.

Exogenous sucrose supply led to a rescue of both the HCF and the growth phenotypes under high light. The role of sugar-dependent signaling pathways in high light acclimation is discussed and a model is presented proposing a regulatory function of the carbon metabolism.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Allen JF** (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* **1098**: 275-335
- Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ** (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* **291**: 25-29
- Allen JF, Forsberg J** (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci* **6**: 317-326
- Allred DR, Staehelin LA** (1986) Spatial organization of the cytochrome b6-f complex within chloroplast thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **849**: 94-103
- Andersson J, Wentworth M, Walters RG, Howard CA, Ruban AV, Horton P, Jansson S** (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J* **35**: 350-361
- Arnon DI** (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Aro EM, McCaffery S, Anderson JM** (1993) Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiol* **103**: 835-843
- Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Saleem A, Battchikova N, Rintamaki E** (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J Exp Bot* **56**: 347-356
- Aro EM, Virgin I, Andersson B** (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**: 113-134
- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Biol* **50**: 601-639
- Austin JR, 2nd, Frost E, Vidi PA, Kessler F, Staehelin LA** (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* **18**: 1693-1703
- Bailey S, Horton P, Walters RG** (2004) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the relationship between photosynthetic function and chloroplast composition. *Planta* **218**: 793-802
- Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P** (2001) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* **213**: 794-801
- Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J** (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynth Res* **79**: 1-24
- Ballottari M, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R** (2007) Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *J Biol Chem* **282**: 8947-8958

- Baniulis D, Yamashita E, Zhang H, Hasan SS, Cramer WA** (2008) Structure–Function of the Cytochrome b6f Complex. *Photochem Photobiol* **84**: 1349-1358
- Barber J** (2004) Photosystem II: Protein Components. *Encyc of Biol Chem* **3**: 367-374
- Barros T, Royant A, Standfuss J, Dreuw A, Kühlbrandt W** (2009) Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state. *EMBO J* **28**: 298-306
- Bassi R, dal Belin Peruffo A, Barbato R, Ghisi R** (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
- Bellafiore S, Barneche F, Peltier G, Rochaix JD** (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN 7. *Nature* **433**: 892-895
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**: 289-300
- Berendzen K, Searle I, Ravenscroft D, Koncz C, Batschauer A, Coupland G, Somssich IE, Ulker B** (2005) A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* **1**: 1746-4811
- Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stork H** (1970) D-glucose, Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. *Methoden der enzymatischen Analyse* **2**: 1163-1168
- Bertani G** (1951) A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in *Escherichia coli*. *Genetics* **36**: 598-611
- Betterle N, Ballottari M, Zorzan S, de Bianchi S, Cazzaniga S, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R** (2009) Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J Biol Chem* **284**: 15255-15266
- Binns D, Dimmer E, Huntley R, Barrell D, O'Donovan C, Apweiler R** (2009) QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching. *Bioinformatics* **25**: 3045-3046
- Boekema EJ, Van Roon H, Van Breemen JFL, Dekker JP** (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur J Biochim* **266**: 444-452
- Bonardi V, Pesaresi P, Becker T, Schleiff E, Wagner R, Pfannschmidt T, Jahns P, Leister D** (2005) Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* **437**: 1179-1182
- Bondarava N, De Pascalis L, Al-Babili S, Goussias C, Golecki JR, Beyer P, Bock R, Krieger-Liszkay A** (2003) Evidence that cytochrome b 559 mediates the oxidation of reduced plastoquinone in the dark. *J Biol Chem* **278**: 13554-13560
- Bondarava N, Gross CM, Mubarakshina M, Golecki JR, Johnson GN, Krieger Liszkay A** (2010) Putative function of cytochrome b559 as a plastoquinol oxidase. *Physiol Plantarum* **138**: 463-473

- Bonente G, Howes BD, Caffarri S, Smulevich G, Bassi R** (2008) Interactions between the photosystem II subunit PsbS and xanthophylls studied in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **283**: 8434-8445
- Bräutigam K, Dietzel L, Kleine T, Stroher E, Wormuth D, Dietz KJ, Radke D, Wirtz M, Hell R, Dormann P** (2009) Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2715-2732
- Breyton C, Nandha B, Johnson GN, Joliot P, Finazzi G** (2006) Redox Modulation of Cyclic Electron Flow around Photosystem I in C3 Plants. *Biochemistry* **45**: 13465-13475
- Bukhov NG, Wiese C, Neimanis S, Heber U** (1999) Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynth Res* **59**: 81-93
- Busch A, Hippler M** (2010) The structure and function of eukaryotic Photosystem I. *Biochim Biophys Acta* in press
- Cady CW, Crabtree RH, Brudvig GW** (2008) Functional models for the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Coordination Chem Rev* **252**: 444-455
- Caffarri S, Croce R, Cattivelli L, Bassi R** (2004) A Look within LHCII: Differential Analysis of the Lhcb1- 3 Complexes Building the Major Trimeric Antenna Complex of Higher-Plant Photosynthesis. *Biochemistry* **43**: 9467-9476
- Casano LM, Zapata JM, Mart n M, Sabater B** (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. *J Biol Chem* **275**: 942-948
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM** (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J* **37**: 853-863
- Cho MH, Lim H, Shin DH, Jeon JS, Bhoo SH, Park YI, Hahn TR** (2010) Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* in press
- Chuartzman SG, Nevo R, Shimoni E, Charuvi D, Kiss V, Ohad I, Brumfeld V, Reich Z** (2008) Thylakoid membrane remodeling during state transitions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 1029-1039
- Chung CT, Miller RH** (1993) Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells. *Methods Enzymol* **218**: 621-627
- Cleland RE** (1998) Voltammetric measurement of the plastoquinone redox state in isolated thylakoids. *Photosynth Res* **58**: 183-192
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743
- Cruz JA, Avenson TJ, Kanazawa A, Takizawa K, Edwards GE, Kramer DM** (2005) Plasticity in light reactions of photosynthesis for energy production and photoprotection. *J Exp Bot* **56**: 395-406

- Cruz JA, Sacksteder CA, Kanazawa A, Kramer DM** (2001) Contribution of Electric Field ($[\Delta]\psi$) to Steady-State Trans-thylakoid Proton Motive Force (pmf) in Vitro and in Vivo. Control of pmf Parsing into $[\Delta]\psi$ and $[\Delta]pH$ by Ionic Strength. *Biochemistry* **40**: 1226-1237
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR** (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**: 5-17
- Dal Bosco C, Lezhneva L, Biehl A, Leister D, Strotmann H, Wanner G, Meurer J** (2004) Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 1060-1069
- Dal Corso G, Pesaresi P, Masiero S, Aseeva E, Schünemann D, Finazzi G, Joliot P, Barbato R, Leister D** (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* **132**: 273-285
- Danielsson R, Albertsson P, Mamedov F, Styring S** (2004) Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochim Biophys Acta* **1608**: 53-61
- Dekker JP, Boekema EJ** (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* **1706**: 12-39
- Demmig-Adams B, Adams WW** (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* **1**: 21-26
- Durchan M, Vácha F, Krieger-Liszkay A** (2001) Effects of severe CO₂ starvation on the photosynthetic electron transport chain in tobacco plants. *Photosynth Res* **68**: 203-213
- Ebbert V, Adams lii WW, Mattoo AK, Sokolenko A, Demmig Adams B** (2005) Up regulation of a photosystem II core protein phosphatase inhibitor and sustained D1 phosphorylation in zeaxanthin retaining, photoinhibited needles of overwintering Douglas fir. *Plant Cell Environ* **28**: 232-240
- Edge R, Truscott T** (2004) Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species. *Photochemistry of Carotenoids*: 223-234
- Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flügge UI, Fischer K** (2002) The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol* **128**: 512-522
- Elemento O, Slonim N, Tavazoie S** (2007) A universal framework for regulatory element discovery across all genomes and data types. *Mol Cell* **28**: 337-350
- Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG** (1995) Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10237-10241
- Fettke J, Albrecht T, Hejazi M, Mahlow S, Nakamura Y, Steup M** (2010) Glucose 1-phosphate is efficiently taken up by potato (*Solanum tuberosum*) tuber parenchyma cells and converted to reserve starch granules. *New Phytol* **185**: 663-675

- Fettke J, Chia T, Eckermann N, Smith A, Steup M** (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J* **46**: 668-684
- Fettke J, Malinova I, Albrecht T, Hejazi M, Steup M** (2010) Glucose 1-phosphate transport into protoplasts and chloroplasts from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* in press
- Fey V, Wagner R, Bräutigam K, Wirtz M, Hell R, Dietzmann A, Leister D, Oelmüller R, Pfannschmidt T** (2005) Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **280**: 5318-5328
- Flügge UI** (1999) Phosphate translocators in plastids. *Annu Rev Plant Biol* **50**: 27-45
- Flügge UI, Fischer K, Gross A, Sebald W, Lottspeich F, Eckerskorn C** (1989) The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J* **8**: 39-46
- Flügge UI, Heldt HW** (1984) The phosphate-triose phosphate-phosphoglycerate translocator of the chloroplast. *Trends Biochem Sci* **9**: 530-533
- Forster B, Osmond CB, Pogson BJ** (2009) De novo synthesis and degradation of Lx and V cycle pigments during shade and sun acclimation in avocado leaves. *Plant Physiol* **149**: 1179-1195
- Foyer C, Furbank R, Harbinson J, Horton P** (1990) The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth Res* **25**: 83-100
- Gamon JA, Field CB, Bilger W, Björkman O, Fredeen AL, Peñuelas J** (1990) Remote sensing of the xanthophyll cycle and chlorophyll fluorescence in sunflower leaves and canopies. *Oecologia* **85**: 1-7
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **990**: 87-92
- Gilmore AM, Hazlett TL** (1995) Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: Formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2273-2277
- Giraud E, Ho LH, Clifton R, Carroll A, Estavillo G, Tan YF, Howell KA, Ivanova A, Pogson BJ, Millar AH, Whelan J** (2008) The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol* **147**: 595-610
- Gray JC, Sullivan JA, Wang JH, Jerome CA, MacLean D** (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression. *Philosophical Transactions B* **358**: 135-145
- Haink G, Deussen A** (2003) Liquid chromatography method for the analysis of adenosine compounds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **784**: 189-193
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

- Harrington GN, Bush DR** (2003) The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* **15**: 2493-2496
- Häusler RE, Fischer KL, Flügge UI** (2000) Determination of low-abundant metabolites in plant extracts by NAD(P)H fluorescence with a microtiter plate reader. *Anal Biochem* **281**: 1-8
- Häusler RE, Geimer S, Kunz HH, Schmitz J, Dörmann P, Bell K, Hetfeld S, Guballa A, Flügge UI** (2009) Chlororespiration and grana hyperstacking: how an *Arabidopsis* double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. *Plant Physiol* **149**: 515-533
- Häusler RE, Schlieben NH, Flügge UI** (2000a) Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). II. Assessment of control coefficients of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta* **210**: 383–390
- Häusler RE, Schlieben NH, Nicolay P, Fischer K, Fischer KL, Flügge UI** (2000b) Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). I. Comparative physiological analysis of tobacco plants with antisense repression and overexpression of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta* **210**: 371-382
- Häusler RE, Schlieben NH, Schulz B, Flügge UI** (1998) Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta* **204**: 366-376
- Heber U** (2002) Irrungen, Wirrungen? The Mehler reaction in relation to cyclic electron transport in C3 plants. *Photosynth Res* **73**: 223-231
- Hendriks JHM, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P** (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol* **133**: 838-849
- Horton P, Johnson MP, Perez Bueno ML, Kiss AZ, Ruban AV** (2008) Photosynthetic acclimation: Does the dynamic structure and macro organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS J* **275**: 1069-1079
- Hou CX, Rintamäki E, Aro EM** (2003) Ascorbate-Mediated LHCII Protein Phosphorylation LHCII Kinase Regulation in Light and in Darkness. *Biochemistry* **42**: 5828-5836
- Ihnatowicz A, Pesaresi P, Varotto C, Richly E, Schneider A, Jahns P, Salamini F, Leister D** (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
- Iwai M, Takizawa K, Tokutsu R, Okamuro A, Takahashi Y, Minagawa J** (2010) Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**: 1210-1213
- Jablonski PP, Anderson JW** (1982) Light-dependent reduction of hydrogen peroxide by ruptured pea chloroplasts. *Plant Physiol* **69**: 1407-1413

- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5-19
- Jenny A, Mark W, Walters Robin G, Howard Caroline A, Ruban Alexander V, Peter H, Stefan J** (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II—effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J* **35**: 350-361
- Johnson GN** (2010) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochim Biophys Acta* **1807**: 384-389
- Joliot P, Joliot A** (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10209-10214
- Joliot P, Joliot A** (2006) Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 362-368
- Kammerer B, Fischer K, Hilpert B, Schubert S, Gutensohn M, Weber A, Flügge UI** (1998) Molecular characterization of a carbon transporter in plastids from heterotrophic tissues: the glucose 6-phosphate/phosphate antiporter. *Plant Cell* **10**: 105-118
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C** (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY* **23**: 1511-1512
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P** (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 654-657
- Kaundal R, Saini R, Zhao PX** (2010) Combining Machine Learning and Homology-Based Approaches to Accurately Predict Subcellular Localization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**: 36-54
- Keeling PJ, Palmer JD** (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Rev Gen* **9**: 605-618
- Kinoshita H, Nagasaki J, Yoshikawa N, Yamamoto A, Takito S, Kawasaki M, Sugiyama T, Miyake H, Weber APM, Taniguchi M** (2011) The chloroplastic 2 oxoglutarate/malate transporter has dual function as the malate valve and in carbon/nitrogen metabolism. *Plant J* **65**: 15-26
- Kleine T, Voigt C, Leister D** (2009) Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? *Trends Gen* **25**: 185-192
- Klughammer C, Schreiber U** (1994) An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm. *Planta* **192**: 261-268
- Kofler H, Häusler RE, Schulz B, Groner F, Flügge UI, Weber A** (2000) Molecular characterisation of a new mutant allele of the plastid phosphoglucomutase in *Arabidopsis*, and complementation of the mutant with the wild-type cDNA. *Mol Gen Genet* **263**: 978-986
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of T L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen* **204**: 383-396

- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G** (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol* **137**: 242-252
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J** (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**: 715-719
- Kramer DM, Cruz JA, Kanazawa A** (2003) Balancing the central roles of the thylakoid proton gradient. *Trends Plant Sci* **8**: 27-32
- Krapp A, Hofmann B, Schäfer C, Stitt M** (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: a mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *Plant J* **3**: 817-828
- Krieger-Liszkay A** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* **56**: 337-346
- Kroeger TS, Watkins KP, Friso G, Van Wijk KJ, Barkan A** (2009) A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4537-4542
- Kunz HH, Häusler RE, Fettke J, Herbst K, Niewiadomski P, Gierth M, Bell K, Steup M, Flügge UI, Schneider A** (2010) The role of plastidial glucose-6-phosphate//phosphate translocators in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in starch biosynthesis. *Plant Biol* **12**: 115-128
- Kunz HH, Scharnewski M, Feussner K, Feussner I, Flügge UI, Fulda M, Gierth M** (2009) The ABC Transporter PXA1 and Peroxisomal β -Oxidation Are Vital for Metabolism in Mature Leaves of *Arabidopsis* during Extended Darkness. *Plant Cell* **21**: 2733-2749
- Kyhse-Andersen J** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Met* **10**: 203-209
- La Roche, Ejmlm J, Falkowski PG** (1995) Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of plastochinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 10237-10241
- Labate CA, Leegood RC** (1988) Limitation of photosynthesis by changes in temperature. *Planta* **173**: 519-527
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Leegood RC, Furbank RT** (1986) Stimulation of photosynthesis by 2% oxygen at low temperatures is restored by phosphate. *Planta* **168**: 84-93
- Leong TY, Anderson JM** (1984) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynth Res* **5**: 105-115
- Leong TY, Anderson JM** (1984) Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. II. Regulation of electron transport capacities, electron carriers, coupling factor (CF 1) activity and rates of photosynthesis. *Photosynth Res* **5**: 117-128

- Lermontova I, Grimm B** (2006) Reduced activity of plastid protoporphyrinogen oxidase causes attenuated photodynamic damage during high-light compared to low-light exposure. *Plant J* **48**: 499-510
- Li XP, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK** (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**: 391-395
- Lichtenthaler HK, Kuhn G, Prenzel U, Buschmann C, Meier D** (1982) Adaptation of chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll-protein levels to high-light and low-light growth conditions. *Z. Naturforsch* **37**: 464-475
- Lin TP, Caspar T, Somerville C, Preiss J** (1988) Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol* **86**: 1131-1135
- Lin TP, Caspar T, Somerville CR, Preiss J** (1988) A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme. *Plant Physiol* **88**: 1175-1181
- Lindahl M, Yang DH, Andersson B** (1995) Regulatory Proteolysis of the Major Light Harvesting Chlorophyll a/b Protein of Photosystem II by a Light Induced Membrane Associated Enzymic System. *Eur J Biochem* **231**: 503-509
- Logan BA, Demmig-Adam B, Adams WW** (1998) Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. upon a sudden increase in growth PPF in the field. *J Exp Bot* **49**: 1881-1888
- Logan BA, Grace SC, Adams lii WW, Demmig-Adams B** (1998) Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments. *Oecologia* **116**: 9-17
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem* **163**: 16-20
- Lohse M, Nunes-Nesi A, Kruger P, Nagel A, Hannemann J, Giorgi FM, Childs L, Osorio S, Walther D, Selbig J, Sreenivasulu N, Stitt M, Fernie AR, Usadel B** (2010) Robin: an intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis. *Plant Physiol* **153**: 642-651
- Lovelock CE, Winter K** (1996) Oxygen-dependent electron transport and protection from photoinhibition in leaves of tropical tree species. *Planta* **198**: 580-587
- Lu Y, Sharkey TD** (2004) The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* **218**: 466-473
- Lu Y, Sharkey TD** (2006) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ* **29**: 353-366
- Maenpaa P, Andersson B** (1989) Photosystem II heterogeneity and long-term acclimation of light-harvesting. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences* **44**: 403-406
- Maxwell DP, Laudenbach DE, Huner NPA** (1995) Redox regulation of light-harvesting complex II and cab mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **109**: 787-795

- McCarty RE** (2004) An overview of the function, composition and structure of the chloroplast ATP synthase. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*: 439-451
- Melis A** (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci* **4**: 130-135
- Melis A** (2004) Excitation energy transfer: functional and dynamic aspects of Lhc (cab) proteins. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*: 523-538
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P** (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9908-9913
- Miyake C** (2010) Alternative Electron Flows (Water–Water Cycle and Cyclic Electron Flow Around PSI) in Photosynthesis: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. *Plant Cell Phys* **51**: 1951-1963
- Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, Chory J** (2001) *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 2053-2058
- Mochizuki N, Tanaka R, Tanaka A, Masuda T, Nagatani A** (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 15184-15189
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336
- Morosinotto T, Bassi R, Frigerio S, Finazzi G, Morris E, Barber J** (2006) Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I less mutant of barley. *FEBS J* **273**: 4616-4630
- Moulin M, McCormac AC, Terry MJ, Smith AG** (2008) Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 15178-15183
- Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350
- Mulo P** (2010) Chloroplast-targeted ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase (FNR): Structure, function and location. *Biochim Biophys Acta* in press
- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa KI, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* **429**: 579-582
- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T** (2002) PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* **110**: 361-371
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* **15**: 473-497

- Niewiadomski P, Knappe S, Geimer S, Fischer K, Schulz B, Unte US, Rosso MG, Ache P, Flügge UI, Schneider A** (2005) The *Arabidopsis* plastidic glucose 6-phosphate/phosphate translocator GPT1 is essential for pollen maturation and embryo sac development. *Plant Cell* **17**: 760-775
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**: 87-89
- Nixon PJ, Michoux F, Yu J, Boehm M, Komenda J** (2011) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann Bot* **106**: 1-16
- Niyogi KK, Grossman AR, Bjorkman O** (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **10**: 1121-1134
- Oelmüller R, Levitan I, Bergfeld R, Rajasekhar VK, Mohr H** (1986) Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* **168**: 482-492
- Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S** (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591-1604
- Okegawa Y, Kagawa Y, Kobayashi Y, Shikanai T** (2008) Characterization of factors affecting the activity of photosystem I cyclic electron transport in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **49**: 825-834
- Oliver SN, Tiessen A, Fernie AR, Geigenberger P** (2008) Decreased expression of plastidial adenylate kinase in potato tubers results in an enhanced rate of respiration and a stimulation of starch synthesis that is attributable to post-translational redox-activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Exp Bot* **95**: 315-325
- Pammenter NW, Loreto F, Sharkey TD** (1993) End product feedback effects on photosynthetic electron transport. *Photosynth Res* **35**: 5-14
- Paul MJ, Pellny TK** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J Exp Bot* **54**: 539-547
- Peltier JB, Emanuelsson O, Kalume DE, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles DA, Soderberg L, Roepstorff P, Von Heijne G** (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14**: 211-236
- Peng L, Fukao Y, Fujiwara M, Takami T, Shikanai T** (2009) Efficient operation of NAD (P) H dehydrogenase requires supercomplex formation with photosystem I via minor LHCI in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3623-3640
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS** (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567

- Pesaresi P, Hertle A, Pribil M, Kleine T, Wagner R, Strissel H, Ihnatowicz A, Bonardi V, Scharfenberg M, Schneider A, Pfannschmidt T, Leister D** (2009) *Arabidopsis* STN7 kinase provides a link between short- and long-term photosynthetic acclimation. *Plant Cell* **21**: 2402-2423
- Pesaresi P, Lunde C, Jahns P, Tarantino D, Meurer Jr, Varotto C, Hirtz R-D, Soave C, Scheller HV, Salamini F, Leister D** (2002) A stable LHCII-PSI aggregate and suppression of photosynthetic state transitions in the *psae1-1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 940-948
- Pfannschmidt T** (2010) Plastidial retrograde signalling—a true “plastid factor” or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci* **15**: 427-435
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF** (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625-628
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Tullberg A, Link G, Allen JF** (1999) Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life* **48**: 271-276
- Pfannschmidt T, Schütze K, Brost M, Oelmüller R** (2001) A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *J Biol Chem* **276**: 36125-36130
- Pfündel EE, Dilley RA** (1993) The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol* **101**: 65-71
- Powles SB** (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiol* **35**: 15-44
- Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R, Leister D** (2010) Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol* **8**: 317-326
- Quick P, Scheibe R, Stitt M** (1989) Use of tentoxin and nigericin to investigate the possible contribution of Δ pH to energy dissipation and the control of electron transport in spinach leaves. *Biochim Biophys Acta* **974**: 282-288
- Quick WP, Scheibe R, Neuhaus HE** (1995) Induction of hexose-phosphate translocator activity in spinach chloroplasts. *Plant Physiol* **109**: 113-121
- Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P** (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9**: 288-291
- Race HL, Herrmann RG, Martin W** (1999) Why have organelles retained genomes? *Trends Genet* **15**: 364-370
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**: 62-66
- Rintamäki E, Salonen M, Suoranta UM, Carlberg I, Andersson B, Aro EM** (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation in vivo. *J Biol Chem* **272**: 30476-30482
- Rochaix JD** (2011) Assembly of photosynthetic complexes. *Plant Physiol in press*

- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Ann Rev Plant Biol* **57**: 675-709
- Rolland F, Moore B, Sheen J** (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14**: 185-205
- Ruban AV, Horton P** (1994) Spectroscopy of non-photochemical and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves; evidence for a role of the light harvesting complex of photosystem II in the regulation of energy dissipation. *Photosynth Res* **40**: 181-190
- Rumeau D, Becuwe-Linka N, Beyly A, Louwagie M, Garin J, Peltier G** (2005) New subunits NDH-M,-N, and-O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell* **17**: 219-232
- Rumeau D, Peltier G, Cournac L** (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* **30**: 1041-1051
- Sacksteder CA, Kanazawa A, Jacoby ME, Kramer DM** (2000) The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: a proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14283
- Sakamoto K, Briggs WR** (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**: 1723-1735
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S** (1999) Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* **6**: 283-290
- Schaffner W, Weissmann C** (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* **56**: 502-514
- Schägger H, Pfeiffer K** (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19**: 1777-1783
- Schägger H, von Jagow G** (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochem* **199**: 223-231
- Scheibe R** (1991) Redox-modulation of chloroplast enzymes: a common principle for individual control. *Plant Physiol* **96**: 1-3
- Scheibe R, Backhausen JE, Emmerlich V, Holtgreffe S** (2005) Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *J Exp Bot* **56**: 1481-1489
- Schmitz-Linneweber C, Small I** (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**: 663-670
- Schneider A, Häusler RE, Kolukisaoglu Ü, Kunze R, Van Der Graaff E, Schwacke R, Catoni E, Desimone M, Flügge UI** (2002) An *Arabidopsis thaliana* knock out mutant of the chloroplast triose phosphate/phosphate translocator is severely compromised only when starch synthesis, but not starch mobilisation is abolished. *Plant J* **32**: 685-699
- Schöttler MA, Kirchhoff H, Weis E** (2004) The role of plastocyanin in the adjustment of the photosynthetic electron transport to the carbon metabolism in tobacco. *Plant Physiol* **136**: 4265-4274

- Schreiber U, Klughammer C, Neubauer C** (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Z Naturforsch* **43c**: 686–698
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W** (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**: 51-62
- Schwacke R, Schneider A, Van Der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge UI, Kunze R** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* **131**: 16-26
- Seemann JR, Sharkey TD, Wang J, Osmond CB** (1987) Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency, and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. *Plant Physiol* **84**: 796-802
- Servaites JC, Geiger DR, Tucci MA, Fondy BR** (1989) Leaf carbon metabolism and metabolite levels during a period of sinusoidal light. *Plant Physiol* **89**: 403-408
- Shapiguzov A, Ingelsson B, Samol I, Andres C, Kessler F, Rochaix JD, Vener AV, Goldschmidt-Clermont M** (2010) The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHClI dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 4782-4787
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi Shinozaki K** (2003) Two different novel cis acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark induced senescence. *Plant J* **33**: 259-270
- Smeekens S** (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Plant Biology* **51**: 49-81
- Smith AM, Denyer K, Martin C** (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Biol* **48**: 67-87
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM** (2005) Starch degradation. *Plant Biol* **56**: 73-98
- Smyth GK** (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3
- Spurr AR** (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**: 31-43
- Staub JM, Maliga P** (1994) Translation of *psbA* mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J* **6**: 547-553
- Stern DB, Goldschmidt-Clermont M, Hanson MR** (2009) Chloroplast RNA metabolism. *Plant Biol* **61**: 125-155
- Stettler M, Eicke S, Mettler T, Messerli G, Hörtensteiner S, Zeeman SC** (2009) Blocking the metabolism of starch breakdown products in *Arabidopsis* leaves triggers chloroplast degradation. *Mol Plant* **2**: 1233-1246
- Stitt M, Gerhardt R, Wilke I, Heldt HW** (1987) The contribution of fructose 2, 6 bisphosphate to the regulation of sucrose synthesis during photosynthesis. *Physiol Plantarum* **69**: 377-386

- Stitt M, Lilley RMC, Gerhardt R, Heldt H** (1989) Determination of metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods Enzymol* **174**: 518-552
- Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR, Chory J** (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* **421**: 79-83
- Suetsugu N, Yamada N, Kagawa T, Yonekura H, Uyeda TQP, Kadota A, Wada M** (2010) Two kinesin-like proteins mediate actin-based chloroplast movement in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8860-8865
- Susek RE, Ausubel FM, Chory J** (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**: 787-799
- Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini TZ, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L** (2007) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nuc Acids Res* **36**: 1009-1014
- Tagawa K, Tsujimoto HY, Arnon DI** (1963) Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **49**: 567-572
- Takahashi S, Milward SE, Fan DY, Chow WS, Badger MR** (2009) How does cyclic electron flow alleviate photoinhibition in *Arabidopsis*? *Plant Physiol* **149**: 1560-1567
- Tanaka K, Tozawa Y, Mochizuki N, Shinozaki K, Nagatani A, Wakasa K, Takahashi H** (1997) Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett* **413**: 309-313
- Tóth SZ, Schansker G, Strasser RJ** (2005) In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study. *Biochim Biophys Acta* **1708**: 275-282
- Trebst A, Depka B, Holländer-Czytko H** (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **516**: 156-160
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* **148**: 960-968
- Trissl HW, Wilhelm C** (1993) Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem Sci* **18**: 415-419
- Tullberg A, Alexciev K, Pfannschmidt T, Allen JF** (2000) Photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psaB* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinone pool. *Plant Cell Physiol* **41**: 1045-1054
- Tung WL, Chow KC** (1995) A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**: 128-129
- Vainonen JP, Sakuragi Y, Stael S, Tikkanen M, Allahverdiyeva Y, Paakkarinen V, Aro E, Suorsa M, Scheller HV, Vener AV** (2008) Light regulation of CaS, a novel phosphoprotein in the thylakoid membrane of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J* **275**: 1767-1777

- Varotto C, Pesaresi P, Meurer J, Oelmüller R, Steiner-Lange S, Salamini F, Leister D** (2000) Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth. *Plant J* **22**: 115-124
- Vitha S, Zhao L, Sack FD** (2000) Interaction of root gravitropism and phototropism in *Arabidopsis* wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol* **122**: 453-462
- Walters RG, Horton P** (1994) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: changes in composition of the photosynthetic apparatus. *Planta* **195**: 248-256
- Walters RG, Ibrahim DG, Horton P, Kruger NJ** (2004) A mutant of *Arabidopsis* lacking the triose-phosphate/phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light. *Plant Physiol* **135**: 891-906
- Walters RG, Rogers JJ, Shephard F, Horton P** (1999) Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the role of photoreceptors. *Planta* **209**: 517-527
- Walters RG, Shephard F, Rogers JJM, Rolfe SA, Horton P** (2003) Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiol* **131**: 472-481
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Groner F, Hebbeker U, Flügge UI** (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* **12**: 787-802
- Weise SE, Weber APM, Sharkey TD** (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474-482
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS One* **2**: e718
- Yamane Y, Kashino Y, Koike H, Satoh K** (1997) Increases in the fluorescence F_0 level and reversible inhibition of photosystem II reaction center by high-temperature treatments in higher plants. *Photosynth Res* **52**: 57-64
- Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge UI, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G** (2001) The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* **13**: 1907-1918
- Yu TS, Lue WL, Wang SM, Chen J** (2000) Mutation of *Arabidopsis* plastid phosphoglucose isomerase affects leaf starch synthesis and floral initiation. *Plant Physiol* **123**: 319-326
- Zeeman S, Smith S, Smith A** (2007) The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem J* **401**: 13-28

8. ANHANG

8.1 BESTÄTIGUNG DER GENERIERTEN STOFFWECHSELMUTANTEN

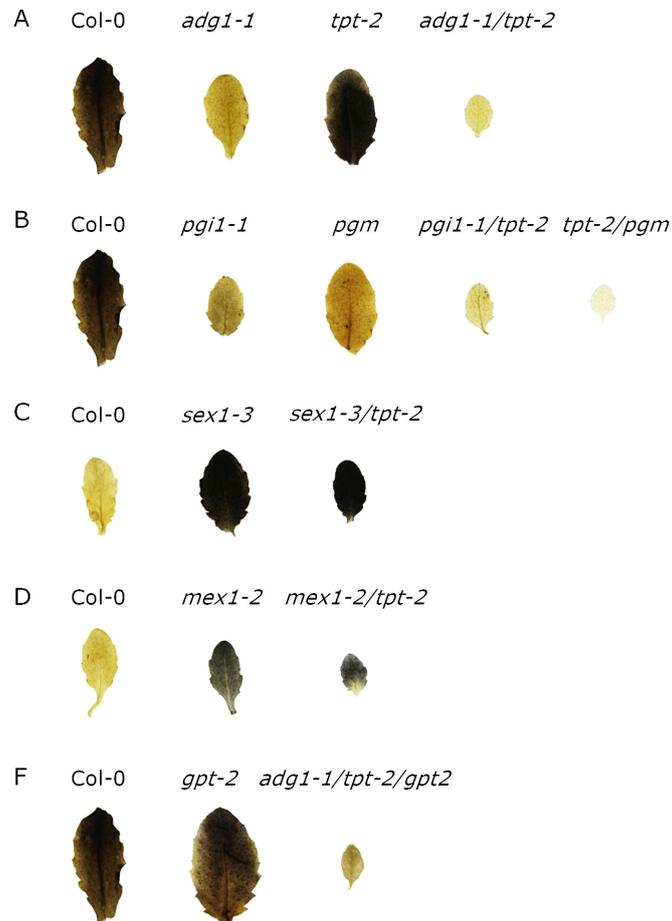


Abbildung 8.1 Qualitativer Stärkenachweis mittels Iod-Kaliumiodid Färbung zur Verifizierung von homozygoten Mutanten im Stärkemetabolismus. Die Mutanten *adg1-1*, *pgi1-1* und *pgm1*, mit Defizienzen im Stärkeanabolismus, wurden am Ende der Lichtperiode auf den Stärkegehalt getestet (A,B,F). Die Mutanten *sex1-3* und *mex1-2*, welche Defekte im Stärkekatabolismus besitzen, wurden am Ende einer verlängerten Dunkelperiode auf mögliche Reststärke getestet (C-D).

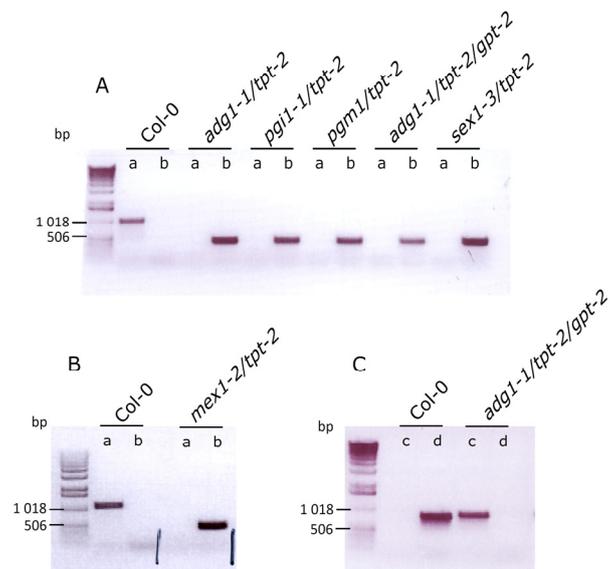


Abbildung 8.2 Bestätigung der homozygoten T-DNA Insertion im TPT (A-B) bzw. GPT2 (C) Allel mittels PCR. (A-B) Die Homozygotie der *tpt-2* wurde mit den Primerpaaren *g_tpt-2_fwd/rev* (a, 1114 bp) sowie *Salk_LB/g_tpt-2_rev* (b, 450 bp) in den generierten Doppelmутanten getestet und die amplifizierten Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. (C) Die homozygote Insertion der T-DNA im GPT2 wurde mit den Primerpaaren *g_gpt2fwd/rev* (d, 822 bp) sowie *Salk_LB/g_gpt-2_rev* (c, 850 bp) überprüft und die amplifizierten Fragmente im Agarosegel aufgetrennt. Aufgrund der Größe der T-DNA Insertion kann kein WT Fragment mit dem genspezifischen Primerpaar amplifiziert werden; Somit bestätigt die Abwesenheit dieses Fragmentes die Homozygotie der Mutanten.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Ulf-Ingo Flügge für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation, für das in mich gesetzte Vertrauen, für die vielen Möglichkeiten die sich mir über die Zeit geboten haben -von der wissenschaftlichen Freiheit bis zu dem Besuch von Tagungen- und die netten Ausflüg(g)e zu den anderen Mitgliedern der RU804 „Retrograde Signalling in Plants“.

Bei Herrn Prof. Krämer möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Dr. Rainer Häusler danke ich für die tolle Betreuung, Verständnis und Hilfe bei allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit, für das Beantworten von geschätzten zehntausend Fragen, die vielen extrem lehrreichen Diskussionen und Anregungen, die entscheidend zu meinem Verständnis der Photosynthese und vor allem der PAM beigetragen haben.

Bei Kirsten Bell möchte ich mich ebenfalls bedanken, die immer mit den liebevollsten Händen für mich gekreuzt und mir bei den unzähligen Ernten geholfen hat.

Ich danke auch Dr. Stephan Krüger für die große und interessierte Diskussionsbereitschaft und für die Unterstützung bei den ATP/ADP-Analysen, die ohne ihn nicht möglich gewesen wären.

Ich danke Prof. D. Leister und Dr. T. Pfanschmidt als Mitglieder des „thesis committee“, die bereitwillig Tipps gegeben oder auch Antikörper und Labor zur Verfügung gestellt haben.

Dr. M.A. Schöttler danke ich für die entscheidenden Aufnahmen der Fluoreszenz-Emissions-Spektren.

Auch bei Dr. Brigitte Buchen möchte ich mich für die Hilfe bei den EM Aufnahmen bedanken.

Für die schöne und lehrreiche Zeit, die ich in dieser Arbeitsgruppe verbringen durfte und die Unterstützung danke ich: Natallia Ashykhmina, Dorien Engländer, Dr. Martin Engqvist, Henning Frerigmann, Dr. Markus Gierth, Dr. Christian Greiten, Dr. Tamara Gigolashvili, Ulrike Hebbeker, Elke Hilgers, Nils Jaspert, Claudia Jonik, Anke Kuhn, Dr. Henning Kunz, Sonja Lott, Dr. Frank Ludewig, Alexandra Maier, Dr. Veronica Maurino, Dereje Mekonnen, Claudia Nothelle, Dr. Veena Prabhakar, Annemarie Reichel, Dr. Rainer Schwacke, Claudia Schwanitz, Jessica Singh, Dr. Pia Staehr, Veronika Ungewickell, Diana Vogelmann, Simon von Berlepsch, Raphael Wemhöner, Dr. Katja Wester, Judith Wienstroer, Nicole Wöstefeld und Martina Zell.
Danke an alle!

Ein riesiges „Danke“ geht an meinen wichtigsten Unterstützer in allen Lebenslagen, Fabio Facchinelli und auch Andrea Meffert und Monique Hölting. Auch meinen Eltern danke ich für die langjährige Unterstützung und Geduld.

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, Karten 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. Ulf-Ingo Flügge betreut worden.

Köln

(Jessica Schmitz)

Teilpublikation

Schmitz J, Schöttler MA, Krüger S, Geimer S, Schneider A, Kleine T, Leister D, Bell K, Flügge UI, Häusler RE (2011). Defects in Carbohydrate Metabolism compromise Acclimation to High Light in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology (submitted)

LEBENS LAUF

Jessica Schmitz

Wolfstr. 45

53111 Bonn

jessica.schmitz@uni-koeln.de

Geburtsdatum,-ort: 15.11.1981, Ahlen (Westfalen)

- Aug. 1992 - Jun. 2001 Gymnasium an der Schweizer Allee, Dortmund
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- Okt. 2001 - Apr. 2006 Grund- und Hauptstudium der Biologie an der
Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität Bonn.
- Apr. 2006 Mündliche Diplomprüfungen in den Fächern
Pflanzenphysiologie, Zellbiologie, Chemie.
- Mai 2006 – Mär. 2007 Diplomarbeit am Institut für molekulare
Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen,
Universität Bonn unter Leitung von Frau Prof. D.
Bartels. Titel: „Molekulare Charakterisierung
zweier putativer Betainaldehyd-Dehydrogenasen
aus *A. thaliana* „.
- seit Aug. 2007 Promotionsstudent am Lehrstuhl II des
Botanischen Instituts der Universität zu Köln
unter der Leitung von Herrn Prof. U.-I. Flügge.