

# Identifizierung und Charakterisierung von chloroplastidären Proteinkinasen mit dem Schwerpunkt auf der PPPK10

---

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von  
Ivo Schliebner  
aus  
Halle/Saale

München  
23.September 2008

- 
1. Gutachter: Prof. Dr. D. Leister
  2. Gutachter: Prof. Dr. J. Nickelsen

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2008

## 1. Zusammenfassung

Photosynthetische Organismen sind in der Lage, Lichtenergie in chemische Energie umzuwandeln. Bei höheren Pflanzen erfolgen diese komplexen Vorgänge in den Chloroplasten unter strenger Kontrolle der Energieverteilung und Expression der beteiligten Genprodukte. Eine entscheidende Rolle hierbei kommt der reversiblen Phosphorylierung der in die Signalkaskaden eingebundenen Proteine zu. Obwohl die höchste Konzentration an phosphorylierten Proteinen in den Chloroplasten höherer Pflanzen detektiert wurde, waren jedoch zu Beginn der Arbeit die entsprechenden chloroplastidären Proteinkinasen weitgehend unbekannt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit bioinformatischen Hilfsmitteln 12 Proteinkinasen ermittelt, die von vier unterschiedlichen Algorithmen unabhängig als chloroplastidäre Proteine vorhergesagt wurden. Anschließend wurde ihre subzelluläre Lokalisation *in vivo* verifiziert. Von den 12 putativ chloroplastidären Proteinkinasen konnten drei in den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* bestätigt werden. Unter diesen befand sich das Genprodukt des Gens *PPPK10*, welches nicht nur in die Chloroplasten, sondern auch in die Mitochondrien geleitet wird. Analysen von Insertionsmutationen ergaben, dass der *knock out* dieses Gens zum Keimungsdefekt homozygoter Pflanzen führte. Eine Reduktion der Transkriptmenge um 80% resultierte in einem verminderten Wuchs der Pflanzen. Jedoch konnte kein Defekt in der Effizienz der Lichtreaktionen der Photosynthese und in der Anpassungsfähigkeit an Lichtbedingungen, die spezifisch für Photosystem I oder Photosystem II sind, festgestellt werden. Dennoch konnten Unterschiede im Phosphorylierungsmuster der Membranproteine der Chloroplasten und der Stromaproteine im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Vor allem konnte ein Effekt der Mutation auf die Transkription der chloroplastidären und mitochondrialen Gene beobachtet werden. Eine redox-abhängige Regulation der Transkription unter Beteiligung des Genproduktes des Gens *PPPK10* wird vorgeschlagen und in Hinblick auf die organellspezifischen Transkriptionsmaschinerien diskutiert.

## 2. Summary

Photosynthetic organisms are able to utilize light energy by converting it into chemical energy. In higher plants those complex processes are harbored in specific organelles, namely chloroplasts. These energy conversion processes do not only require a very precise regulation of energy distribution between the two photosystems but also the regulation of expression of the genes involved in these processes. The required regulatory systems are organized in signaling cascades and are the target of reversible protein phosphorylation. This post-translational modification is catalyzed by protein kinases and protein phosphatases. Due to the complexity of the processes within the chloroplasts it is not surprising that in these organelles the highest concentration of phosphorylated proteins have been found. At the beginning of this work almost nothing was known about chloroplast localized protein kinases. Therefore a bioinformatic approach was employed to identify 12 tentative chloroplast protein kinases. All of them have been predicted to contain a plastid targeting signal by four independent prediction algorithms. Surprisingly, only for three out of these 12 protein kinases the plastid localization could be experimentally confirmed in *Arabidopsis* protoplasts. One of them localized not only to the chloroplasts but also to mitochondria. A more detailed analysis of insertion mutants of the corresponding gene revealed that its knock-out leads to a germination deficiency. The reduction of the transcript-abundance to 20% of wild-type level resulted in a reduced growth. However, these plants were not affected in their photosynthetic performance or acclimation to light specific for photosystem I or photosystem II. Nevertheless, the phosphorylation pattern of chloroplast membrane proteins and stroma proteins differed in comparison to wild type. Most notably the mutation led to changes in the transcription of genes, encoded in the chloroplast and mitochondria. This suggests a role in the redox-dependent regulation of the transcriptional machineries of the two evolutionary diverged organelles.

### 3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<sup>35</sup> S CaMV	<sup>35</sup> S Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus
ATP	Adenosintriphosphat
BN	blau nativ
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpPK2 $\alpha$	chloroplastidäre Proteinkinase II $\alpha$ aus Senf
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dt.	Deutschland
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
Lab.	Laboratorien
m	Meter
M	Molarität
min	Minute
mol	Mol
NADP+H <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NEP	Im Zellkern kodierte RNA-Polymerase
Osm	Osmolarität
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Im Plastom kodierte RNA-Polymerase
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-vermittelte Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat

T-DNA	Transfer-DNA
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
w/v	Masse pro Volumen

## 4. Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	3
2. Summary .....	4
3. Abkürzungsverzeichnis.....	5
4. Inhaltsverzeichnis.....	7
5. Einleitung.....	12
5.1 Die Grundlage jeglichen Lebens auf der Erde bilden autotrophe Organismen.....	12
5.2 Proteinimport in die Chloroplasten .....	13
5.3 Proteinimport in die Mitochondrien.....	14
5.4 Dualer Import in Mitochondrien und Chloroplasten .....	16
5.5 Vorhersage der subzellulären Lokalisation .....	17
5.6 Posttranslationale Modifikationen von Proteinen in Pflanzen.....	19
5.6.1 Reversible Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen katalysiert.....	20
5.6.2 Phosphorylierung im Chloroplasten.....	25
5.6.2.1 Bekannte Kinasen und deren Funktionen im Chloroplasten.....	25
5.7 Ziel der Arbeit.....	28
6. Material und Methoden.....	29
6.1 Materialien .....	29
6.1.1 Chemikalien und Enzyme .....	29
6.1.2 Kits.....	29
6.1.3 Medien .....	30
6.1.3.1 Medien zur Aufzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	30
6.1.3.2 Medium zur Aufzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
6.1.3.3 Medium zur Aufzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Sterilkultur .....	30
6.1.3.4 Medien für Protoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31

6.1.3.5	Antibiotika .....	31
6.1.4	Oligonukleotide und deren Verwendung.....	31
6.1.5	Plasmide .....	35
6.1.6	Organismen .....	35
6.1.6.1	<i>Escherichia coli</i> .....	35
6.1.6.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	36
6.1.6.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> und deren Wachstumsbedingungen .....	36
6.2	Methoden.....	38
6.2.1	Bioinformatische Ressourcen.....	38
6.2.1.1	Sequenzdatenbanken, Sequenzanalysen und Homologiesuchen mittels BLAST .....	38
6.2.1.2	Vorhersagealgorithmen für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen .	38
6.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	40
6.2.2.1	DNA-Analyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
6.2.2.2	RNA-Analyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	40
6.2.2.2.1	Northern Analyse .....	41
6.2.2.2.2	reverse Transkriptase vermittelte real-time PCR.....	41
6.2.2.2.3	Charakterisierung der chloroplastidären und mitochondrialen Genexpression.....	41
6.2.2.2.4	Charakterisierung des PPPK10-Transkripts der Linie pppk10-2.....	42
6.2.2.3	Komplementation der Linien <i>pppk10-2</i> und <i>pppk10-3</i> .....	42
6.2.2.4	Intrazelluläre Lokalisation von RFP-Fusionsprodukten in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten .....	42
6.2.3	Biochemische Methoden .....	44
6.2.3.1	Bestimmung der Chlorophyllkonzentration .....	44
6.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	44
6.2.3.3	Präparation intakter Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44



---

6.2.3.4	Präparation von Thylakoiden und Stroma aus Chloroplasten.....	44
6.2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Proteindetektion .....	44
6.2.3.6	Immunoblot-Analysen .....	45
6.2.3.7	2D Blue native/SDS PAGE für die Analyse von Thylakoidproteinen .....	45
6.2.3.8	Phosphoproteinanreicherung der Stroma-Fraktionen .....	46
6.2.4	Fluoreszenz- und Absorptionsanalysen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
6.2.4.1	Chlorophyllfluoreszenzmessungen .....	46
6.2.4.2	Messungen des Redoxstatus der Reaktionszentren von Photosystem I....	47
6.2.5	Anpassung an Photosystem II- bzw. Photosystem I-spezifisches Licht.....	48
6.2.6	<i>In vitro</i> Import von Proteinen in Mitochondrien und Chloroplasten aus Erbse ( <i>Pisum sativum</i> ) .....	48
6.2.7	Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie.....	49
7.	Ergebnisse .....	50
7.1	Vorhersage plastidärer Proteinkinasen in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
7.2	Lediglich 3 von 12 Proteinkinasen konnten in Chloroplasten nachgewiesen werden .....	53
7.3	Genotypisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Insertionsmutantenlinien .....	57
7.4	PPPK10 gehört zur Familie der Casein Kinasen II $\alpha$ und hat 3 Homologe in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	60
7.5	PPPK10 ist in den Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert .....	62
7.6	Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten im Gen <i>PPPK10</i> .....	65
7.7	Eine T-DNA Insertion im vierten Intron des Gens <i>PPPK10</i> führt zum Keimungs- defekt .....	65
7.8	Der Defekt in der Keimung der Linie <i>pppk10-3</i> kann komplementiert werden .....	65
7.9	Zwei T-DNA Insertionen im 5'-Bereich von <i>PPPK10</i> führen nicht zu einem Defekt in der Keimung .....	66

---

7.10	Entgegengesetzte mRNA-Expression des Gens <i>PPPK10</i> in den Linien <i>pppk10-1</i> und <i>pppk10-2</i> .....	66
7.11	In der Linie <i>pppk10-2</i> war ein Teil des Insertionsfragments Bestandteil des Transkripts.....	68
7.12	Auch das <i>PPPK10</i> -Transkript der Linie <i>pppk10-2</i> kodiert für ein Translationsprodukt, welches die Kapazität hat, in Mitochondrien und Chloroplasten zu dirigieren .....	69
7.13	Eine Insertion im 5'-Bereich des Gens <i>PPPK10</i> der Linie <i>pppk10-2</i> führt zu einer Reduktion in der Blattfläche .....	70
7.14	Photosynthetische Parameter der Linie <i>pppk10-2</i> weisen keine Unterschiede zum Wildtyp auf.....	72
7.14.1	Die Grundparameter der Chlorophyllfluoreszenz weisen keine Unterschiede auf .....	72
7.14.2	Keine Unterschiede von $F_s/F_m$ nach PSI bzw. PSII Licht.....	74
7.15	PSI Oxidation ist in <i>pppk10-2</i> im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht .....	75
7.16	Expressionsanalysen von Transkripten nach oxidativem Stress.....	76
7.16.1	Die Transkriptmengen plastidenkodierter Gene sind beeinflusst .....	77
7.16.2	Die Abundanz von Transkripten, deren Translationsprodukte Funktionen in den Mitochondrien erfüllen, ist beeinflusst.....	81
7.17	Die Zusammensetzung der chloroplastidären Proteinkomplexe von <i>pppk10-2</i> ist mit der des Wildtyps vergleichbar .....	83
7.18	Die Proteinphosphorylierungsmuster des Stromas und der Thylakoide sind in der Linie <i>pppk10-2</i> verändert .....	84
7.19	Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Insertionslinien mit einer Insertionsmutation im Gen <i>PPPK6</i> .....	87
7.19.1	Entgegengesetzte mRNA-Expression des Gens <i>PPPK6</i> in den Insertionsmutanten.....	87
7.19.2	Keine Auxin-abhängigen Unterschiede im Wurzelwachstum.....	88

8.	Diskussion.....	90
8.1	Vorhersage chloroplastidärer Proteinkinasen und experimentelle Bestätigung ....	90
8.2	PPPK10 ist die erste Proteinkinase, die in den Chloroplasten und Mitochondrien von <i>Arabidopsis thaliana</i> lokalisiert ist .....	91
8.3	Putative Substrate von PPPK10.....	92
8.4	PPPK10 beeinflusst die Transkriptmengen der Gene, die in den Chloroplasten kodiert vorliegen.....	95
8.5	PPPK10 beeinflusst Transkriptmengen von Genen mit Funktionen in den Mitochondrien.....	101
8.6	PPPK6 und PPPK9 .....	102
9.	Literaturverzeichnis.....	103
10.	Danksagung .....	121
11.	Lebenslauf .....	122
12.	Ehrenwörtliche Versicherung.....	124
13.	Anhang .....	125

## 5. Einleitung

### 5.1 Die Grundlage jeglichen Lebens auf der Erde bilden autotrophe Organismen

Die Grundlage jeglichen Lebens auf der Erde bilden autotrophe Organismen. Zu diesen Organismen gehören die Pflanzen. Diese autotrophe Lebensweise wird in grünen Pflanzen durch Chloroplasten ermöglicht. Die Chloroplasten dieser Organismen sind die Orte der Photosynthese. Bei der Photosynthese erfolgt die Absorption von Lichtenergie. In Form von chemischer Energie, wird diese absorbierte Lichtenergie nicht nur für metabolische Prozesse nutzbar, sondern auch speicherbar. Diese komplexen energetischen Vorgänge erfordern eine Subkompartimentierung dieses Organells. So werden die Chloroplasten von einer äußeren und inneren Hüllmembran umschlossen. Zwischen diesen Membranen befindet sich der Intermembranraum. Die durch die innere Hüllmembran umgrenzte wässrige Phase wird als Stroma bezeichnet. Zusätzlich zu den Hüllmembranen weisen Chloroplasten ein weiteres Membransystem auf: die Thylakoidmembranen, welche das Lumen umschließen. Die Thylakoide sind Orte der sog. Lichtreaktion der Photosynthese, bei der Lichtenergie absorbiert, Wasser oxidiert und dabei Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ , sowie der Phosphatgruppendonator Adenosintriphosphat (ATP) gebildet werden. Hierbei erfolgt die Lichtabsorption in den Photosystemen II und I. Durch die Lichtanregung werden Elektronen aus den Reaktionszentren der Photosysteme abgegeben. Die so resultierende Elektronenlücke wird im Falle von Photosystem II durch die Oxidation von Wasser, und im Falle des Photosystems I durch die vom Photosystem II stammenden Elektronen geschlossen. Der Elektronentransfer zwischen diesen beiden Photosystemen wird durch den Plastochinon-Pool, den Cytochrom  $b_6f$ -Komplex und den Plastocyanin-Pool vermittelt. Letztendlich werden die Elektronen in einer durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase katalysierten Reaktion auf Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat ( $\text{NADP}^+$ ) übertragen, welches zu  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  reduziert wird. Während der Elektronentransportvorgänge wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut. Dieser treibt die Photophosphorylierung von ADP zu ATP an. Die Reduktionsäquivalente ( $\text{NADPH}+\text{H}^+$ ) und ATP werden in der sog. Dunkelreaktion im Stroma für die Fixierung von Kohlendioxid verwendet. Neben der Photosynthese finden in den

Chloroplasten weitere Prozesse wie beispielsweise Lipidstoffwechsel, Phytohormonsynthesen und Sekundärmetabolitsynthesen statt. Schätzungen gehen davon aus, dass ca. 3600 Proteine für die Aufrechterhaltung dieser Prozesse benötigt werden (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000, Leister, 2003).

Nach der Endosymbiontentheorie geht der Ursprung der Chloroplasten auf frei lebende Cyanobakterien zurück (Mereschkowsky, 1905, Margulis, 1970, Gray und Doolittle, 1982, Schimper, 1983). Im Laufe der Evolution entwickelten sich aus autonomen Organismen – den Cyanobakterien - semi-autonome Organellen – die Chloroplasten. Dieser Prozess ging einher mit der Reduzierung des Genoms der Chloroplasten. So weisen die Genome von Chloroplasten eine Größe von 35kbp - 191kbp auf. Jedoch haben die Vorfahren der Chloroplasten, die freilebenden Cyanobakterien, eine Genomgröße von 1660kbp - ca. 9000kbp (Timmis et al., 2004). Hierbei kam es sowohl zum Verlust, als auch zum Transfer genetischer Informationen in den Zellkern und der Integration ins Genom der Pflanzenzelle (Martin und Herrmann, 1998). Dies hat nicht nur zur Folge, dass chloroplastidäre Proteine im Cytosol der Zelle synthetisiert werden. Auch müssen kernkodierte Proteine, die ihre Funktion in den Chloroplasten ausüben, diesem Organell entsprechend zugeordnet und anschließend in das Zielorganell transportiert werden. Weiterhin ist eine Koordination der Genexpression der kernkodierten und der plastidenkodierten Proteine notwendig. Auf diese Vorgänge soll im Folgenden näher eingegangen werden.

## **5.2 Proteinimport in die Chloroplasten**

Die Mehrzahl der Proteine im Chloroplasten werden als sog. Vorläufer-Proteine (engl.: *precursor proteins*) im Cytosol synthetisiert und post-translational in das Organell importiert. Die meisten dieser Proteine werden mit einer N-terminalen Erweiterung, der sog. Präsequenz oder dem Transitpeptid, synthetisiert. Dieser Präsequenz kommt besondere Bedeutung bei der Erkennung der Organellzugehörigkeit und der Initiation des Translokationsereignisses zu. Im Allgemeinen wird diese Präsequenz nach erfolgtem Import in das Zielorganell proteolytisch abgetrennt. In den Aminosäuresequenzen ist kein einheitliches Motiv für diese Transitpeptide festzustellen. Jedoch weisen sie insgesamt eine positive Ladung auf und sind reich an den Aminosäuren Serin und Threonin (Bruce, 2001, Soll und Schleiff, 2004, Bedard und Jarvis, 2005, Stengel et al., 2007). Erreichen Vorläufer-Proteine die Chloroplastenoberfläche, werden die

Transitpeptidsequenzen von Rezeptoren der Translokasen der äußeren Hüllmembran der Chloroplasten (*translocons at the outer membrane of the chloroplast* – TOC) erkannt. Anschließend erfolgt die Translokation der Proteine durch den TOC-Komplex in Abhängigkeit von Energie und resultiert in der Lokalisation der transportierten Proteine im Intermembranraum (Soll und Schleiff, 2004, Bedard und Jarvis, 2005, Stengel et al., 2007).

Wird eine Lokalisation des Transportsubstrates im Stroma oder den Thylakoiden der Chloroplasten angestrebt, muss die innere Hüllmembran der Chloroplasten überwunden werden. Hieran sind die Translokasen der inneren Hüllmembran (*translocons at the inner membrane of the chloroplast* – TIC) beteiligt. Dieser Translokationsprozess erfordert Energie in Form von ATP. Im Allgemeinen, wird anschließend im Stroma der Chloroplasten die chloroplastendrigierende Präsequenz durch die stromale Prozessierungspeptidase (SPP) proteolytisch abgespalten (Soll und Schleif, 2004).

Ein weiterer alternativer Transportweg in das Stroma der Chloroplasten wird für Proteine angenommen, die kein abspaltbares Transitpeptid aufweisen. Besonders die Daten von Kleffmann et al. (2004) wiesen auf ein Vielzahl von chloroplastidären Proteinen ohne Transitpeptid hin. In diesem Zusammenhang kann die Beobachtung stehen, dass die *Carbonic Anhydrase1* (CAH1) infolge eines Vesikeltransports, vermittelt über das Endoplasmatische Retikulum, in die Chloroplasten transportiert wird (Villarejo et al., 2005, Radhamony und Theg, 2006).

### **5.3 Proteinimport in die Mitochondrien**

Neben den Chloroplasten, bei denen weithin ein prokaryotischer Ursprung akzeptiert ist, wird auch die Rekrutierung der Mitochondrien auf ein endosymbiotisches Ereignis der eukaryotischen Zelle zurückgeführt (u. a. Timmis et al., 2004). Für die Mitochondrien wird angenommen, dass die Vorläufer frei lebende  $\alpha$ -Proteobakterien waren. Als Folge des endosymbiotischen Ereignisses kam es ebenso, wie bei den Chloroplasten, zu einem partiellen Gentransfer aus dem Urgenom der Organelle in den Kern (Timmis et al., 2004). Auch wenn die Anzahl der angenommenen mitochondrialen Proteine zwischen 850 und 2000 (Sickmann et al., 2003, Heazlewood et al., 2005, Pesaresi et al., 2007) schwankt, so wird dennoch die Diskrepanz der im Organell verbliebenen proteinkodierenden Gene (31 Gene in dem Mitochondriengenom von *Arabidopsis thaliana* (Timmis et al., 2004)) und der

für die Funktionalität der Mitochondrien benötigten Proteine deutlich. Wie auch für die Chloroplasten, mussten die pflanzlichen Zellen Mechanismen entwickeln, durch die die Translokation kernkodierter Proteine in die äußere oder innere Hüllmembran der Mitochondrien, in den durch diese Membranen umschlossenen Intermembranraum oder in die Mitochondrienmatrix erfolgen kann. Daher soll im Folgenden der Import in die Mitochondrien zusammengefasst werden.

Bislang konnten vier Importwege in Mitochondrien nachgewiesen werden. Der erste Importweg wird als „Präsequenz-Weg zu der Matrix und inneren Mitochondrienmembran“ bezeichnet. Hierbei werden die Proteine mit einer aminoterminalen Präsequenz im Cytosol synthetisiert. Diese Präsequenz formt eine positiv geladene amphipatische  $\alpha$ -Helix und leitet das Protein über die äußere und innere Mitochondrienmembran in die Matrix, wo sie im Allgemeinen abgespalten wird. Der Weg der Proteine in die Matrix wird durch den TOM-Komplex (*translocon of the outer membrane*) in der äußeren Hüllmembran der Mitochondrien und den TIM23-Komplex (*translocon of the inner membrane*) der inneren Membran ermöglicht. Hierbei bilden der TOM-Komplex und der TIM23-Komplex eine funktionelle Einheit. Dieser Transport hängt von ATP und einem elektrochemischen Potentialgradienten ab (Bolender et al., 2008). Der Import von Proteinen der inneren Hüllmembran mit Präsequenz weist zusätzlich ein hydrophobes Sortierungssignal auf. In diesem Fall wird der Import in die innere Hüllmembran unterbrochen und das Protein in die Membran freigesetzt.

Ein zweiter Transportweg in die Mitochondrien wird als „Carrier-Weg in die innere Membran“ bezeichnet. Diese Carrier-Proteine dienen dem Metabolitentransport über die innere Hüllmembran und weisen sechs Transmembrandomänen auf. Sie werden im Cytosol ohne eine abspaltbare Präsequenz synthetisiert. Der Transport erfolgt über den gleichen TOM-Kanal (TOM40). Im Intermembranraum vermitteln Chaperon-Komplexe die Interaktion mit dem TIM22-Komplex. Von diesem werden die Carrier-Proteine in die innere Membran entlassen. Dieser Schritt erfolgt in Abhängigkeit von einem Membranpotential über die innere Hüllmembran (Truscott et al., 2003, Bolender et al., 2008).

Der dritte bekannte Transportweg in die Mitochondrien wird als „Intermembranraum-Import und Assemblierung“ bezeichnet. Hierbei werden Proteine mit kleinen Molekularmassen über den TOC-Komplex in den Intermembranraum transportiert. Dort

werden diese vom MIA-Komplex (mitochondriale Intermembranraum Import- und Assemblierungsmaschinerie) in Empfang genommen. MIA vermittelt die Ausbildung intermolekularer Disulfid-Brücken, was zu einer Komplexbildung führt (Bolender et al., 2008).

Der vierte beschriebene Transportweg beschreibt die Sortierung und Assemblierung der Proteine der äußeren Mitochondrienhüllmembran. In diesem Membransystem sind sog. *β-barrel* Proteine integriert. Diese, im Cytosol synthetisierten Proteine, werden durch den SAM-Komplex inseriert (Bolender et al., 2008).

Neben der strikten Trennung des Transports von Proteinen in die Mitochondrien oder die Chloroplasten, mehren sich seit 1990 (Huang et al., 1990) Berichte über Proteine, die in beide Organellen transportiert werden (Peeters und Small, 2001, Silva-Filho, 2003, Millar et al., 2006). Daher sollen im Folgenden die bekannten Charakteristika dieses spannenden Sortierungsmechanismus eingeführt werden.

#### **5.4 Dualer Import in Mitochondrien und Chloroplasten**

Wie bereits dargelegt, sind aus evolutionären Gründen die Importmaschinerien der Chloroplasten und Mitochondrien sehr verschieden. Dies gewährleistet auch einen zielgerichteten Transport in die entsprechenden Organellen. Dennoch steigt stetig die Zahl der Proteine an, die in beiden Organellen nachgewiesen wurden. Hierbei sind vor allem Proteine, die in sog. *house-keeping*-Prozessen involviert sind, wie DNA- /RNA-Metabolismus, Translation und Zellabwehr, Substrate des „*dual-targeting*“ (*targeting* – engl.: zielen, hinführen Silva-Filho, 2003, Mackenzie, 2005). Der Import dieser Proteine in die Mitochondrien bzw. Chloroplasten wird auch durch die TOM-/TIM-Komplexe bzw. TOC-/TIC-Komplexe katalysiert. Wie auch bei den Proteinen, die ausschließlich zu den Mitochondrien oder Chloroplasten transportiert werden, werden auch bei dual dirigierten Proteinen N-terminale Transitpeptide genutzt. Diese können in zwei Formen auftreten. Zunächst können durch die Nutzung alternativer Translationsstarts oder alternativem *Exon-Splicing* aus einem Gen zwei Proteine gebildet werden, die sich in ihren organell-dirigierenden Sequenzen unterscheiden (sog. *Twin-presequences*, Peeters und Small, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne der Glutathion-Reduktase aus Erbsen neben dem klassischen Translationsinitiationsstartpunkt einen alternativen



Translationsinitiationsstartpunkt im als 5'-UTR annotierten Bereich aufwies. Über diesen alternativen Translationsinitiationsstartpunkt wurde die Glutathion-Reduktase sowohl in die Chloroplasten, als auch in die Mitochondrien dirigiert, wohingegen durch den klassischen Translationsinitiationsstartpunkt nur ein plastidenlokalisiertes Translationsprodukt entstand (Christensen et al., 2005).

Eine zweite Form der Transitsequenzen wird als „zweideutiges Transitpeptid“ (engl.: *ambiguous presequence*) bezeichnet. Diese Transitpeptide werden sowohl als Importsignal für die Mitochondrien, als auch für die Chloroplasten erkannt (Peeters und Small, 2001). Der Vergleich von zweideutigen Signalsequenzen mit spezifischen Signalsequenzen für Mitochondrien und Chloroplasten ergab, dass diese Transitsequenzen, Charakteristiken von sowohl den chloroplastendirigierenden als auch den mitochondriendirigierenden Sequenzen aufweisen (Peeters und Small, 2001).

Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass auch die subzelluläre Lokalisation der mRNA in der räumlichen Nähe zu Hefe-Mitochondrien, vermittelt durch RNA-bindende Proteine, einen co-translationalen Transport in die Mitochondrien fördert. Die Autoren zeigten, dass hierfür Bereiche in 3'-UTR der mRNAs notwendig sind und somit als Information für die Lokalisation an den Mitochondrien dienen (Marc et al., 2002).

## **5.5 Vorhersage der subzellulären Lokalisation**

Es wurden große Anstrengungen unternommen, um die subzelluläre Lokalisation von Proteinen mithilfe bioinformatischer Methoden zu ermitteln. Hierzu wurden eine Vielzahl an Algorithmen entwickelt, die sich nach Casadio et al. (2008) in drei Gruppen unterteilen lassen: (1) Methoden, die auf Sequenzähnlichkeiten basieren, (2) Methoden, die auf Suchen nach funktionellen Motiven bzw. Domänen basieren und (3) Sequenzbasierte Methode.

Die unter (1) zusammengefassten Algorithmen basieren auf der Annahme, dass Proteine, die eine hohe Sequenzidentität aufweisen, auch in dasselbe subzelluläre Kompartiment transportiert werden. Hierfür müssen gut annotierte Datenbanken vorhanden sein, um die Lokalisation des untersuchten Proteins anhand der bekannten Lokalisation eines Homologen vorherzusagen. Jedoch werden von diesen Algorithmen im Allgemeinen geringfügige Veränderungen in den Aminosäuresequenzen nur schwach bewertet, was bei N- oder C-

terminalen Signalsequenzen jedoch zu einer veränderten subzellulären Lokalisation führen kann (Casadio et al., 2008).

Die in (2) zusammengefassten Algorithmen suchen in den Aminosäuresequenzen der untersuchten Proteine nach Motiven oder Domänen, die sich mit einer spezifischen subzellulären Lokalisation korrelieren lassen. Diese Methoden weisen die gleichen Schwachstellen auf, wie die Methoden, die auf Sequenzähnlichkeiten basieren (Casadio et al., 2008).

Die am häufigsten verwendete Methode ist die sequenzbasierte Methode (3). Hierbei wird von der Aminosäuresequenz ausgegangen, und nach Charakteristika in der Sequenz gesucht, wie z.B. der Hydrophobizität bestimmter Bereiche oder der Aminosäurezusammensetzung von Bereichen in Hinblick auf die Ladung. Diese Merkmale werden genutzt, um zu bewerten, ob eine organell-dirigierende Sequenz in dem untersuchten Peptid bzw. Protein auftritt. Gemeinsam für alle Algorithmen dieser Kategorie ist, dass diese durch maschinelles Lernen anhand von Proteinsequenzen mit bekannter Lokalisation, Charakteristika für entsprechende subzelluläre Kompartimente erkennen sollen. Diese Charakteristika werden in Datensätzen mit unbekannter Lokalisation gesucht, und anschließend i.d.R. einem Kompartiment zugewiesen (Schneider und Fechner, 2004, Emanuelsson et al., 2007, Casadio et al., 2008). Hieraus ergibt sich eine wesentliche Limitierung dieser Methoden. Der Algorithmus kann nur so gut sein, wie der Datensatz, mit dem gelernt wurde.

Die Effizienz von Vorhersagealgorithmen lässt sich u. a. durch die Sensitivität, die die Frequenz, mit der ein tatsächlich im Kompartiment lokalisiertes Protein auch diesem zugeordnet wurde, reflektiert, und der Spezifität, die angibt, welcher Anteil der vorhergesagten Proteine tatsächlich in dem vorhergesagten Kompartiment zu finden ist, beschreiben (Richly und Leister, 2004). Ein Vergleich der Vorhersagealgorithmen ist durch die Verwendung einheitlicher Testdaten möglich. Entsprechend wurden mehrfach derartige Vergleiche berichtet, die die Effizienz von Vorhersagealgorithmen untersuchten, sowohl mittels tierischen Proteindaten (Klee und Ellis, 2005, Sprenger et al., 2006, Pierleoni et al., 2006, Klee und Sosa, 2007), sowie einschließlich pflanzlicher Proteine (Richly und Leister, 2004, Casadio et al., 2008). Keiner der hierbei untersuchten Algorithmen war den übrigen überlegen. Jedoch zeigten Richly und Leister (2004), dass die Kombination verschiedener Algorithmen zumindest die Vorhersage kernkodierter Chloroplastenproteine verbessert.

Die Vorhersage von Proteinen, die in zwei Organellen lokalisiert sind, ist momentan nicht möglich (Peeters und Small, 2001).

## **5.6 Posttranslationale Modifikationen von Proteinen in Pflanzen**

Pflanzen müssen während ihres gesamten Lebenszyklus auf endogene und exogene Veränderungen, wie beispielsweise der Lichtqualität, der Lichtquantität, des Wasserpotentials, der Temperatur, auf Pathogenattacken u.v.m. reagieren. Um auf diese Reize reagieren zu können, müssen die zellulären Funktionen mit gewisser Flexibilität reguliert werden. Hierfür wurden - nicht nur von Pflanzen - Mechanismen entwickelt, die die reversible posttranslationale Modifikation von Proteinen, eingebunden in Signaltransduktionswege, einschließt. Bislang sind circa 300 Modifikationen bekannt (Jensen, 2004).

Unter dieser Vielzahl an Modifikationen, wurden jedoch nur einige in Pflanzen untersucht. So wurde bislang für 248 Proteine von *Arabidopsis thaliana* angenommen, dass diese durch eine Glycosylphosphatidylinositol-Modifikation (GPI-Modifikation) an der Oberfläche der Plasmamembran verankert sind. Diese GPI-modifizierten Proteine sind an Prozessen, wie Differenzierung, Signaltransduktion und der Zellantwort auf Pathogene, beteiligt (Borner et al., 2003).

Eine weitere prominente Modifikation von Proteinen ist die Ubiquitinierung. Hierbei wird das Polypeptid Ubiquitin an Lysin-Reste eines Zielproteins kovalent gebunden. Dieser Prozess markiert Proteine für die Degradation im Proteasom (Glickman und Ciechanover, 2002, Welchman et al., 2005).

Desweiteren sind S-Nitrosylierungen an Cystein-Resten von Proteinen zu beobachten. Diese kovalente Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) an Proteine wird in Zusammenhang mit dem Signalweg von reaktiven Sauerstoffspezies gebracht. Beide Prozesse sind an der Abwehr von Pathogenen beteiligt (Grennan, 2007).

Eine weitere posttranslationale Modifikation lässt sich z.B. an Histonen beobachten. Hier führt die Acetylierung von Lysin zu einer Lockerung der Chromatinstruktur und Aktivierung der in diesem Bereich liegenden Gene (Clayton et al., 2006, Bonisch et al., 2008). Eine weitere Form der Acetylierung ist die sog. N- $\alpha$ -Acetylierung. Houtz et al. (2008) weisen

darauf hin, dass die große Untereinheit der RubisCO eine derartige Acetylierung erfährt. Weiterhin wurde die cytosolische N-Acetylierung als Notwendigkeit für die Akkumulation von Vorläuferproteinen in den Chloroplasten vorgeschlagen (Pesaresi et al., 2003). Diese Form der Acetylierung soll an der Aktivitätsänderung und an der Stabilität des acetylierten Proteins involviert sein (Houtz et al., 2008).

Die Methylierung spielt eine vielseitige Rolle in der Regulation der Chromatinstruktur (Bonisch et al., 2008). Weiterhin wurde berichtet, dass die Methylierung der Thylakoidfraktion nach Inkubation im Licht ansteigt (Niemi et al., 1990).

Die am besten untersuchte Form der post-translationalen Modifikation von Proteinen ist die reversible Phosphorylierung.

### 5.6.1 Reversible Phosphorylierung wird durch Proteinkinasen katalysiert

Das Interesse an dieser Form der post-translationalen Modifikation stieg während der vergangenen Jahren stetig an (vgl. Abbildung 5-1).

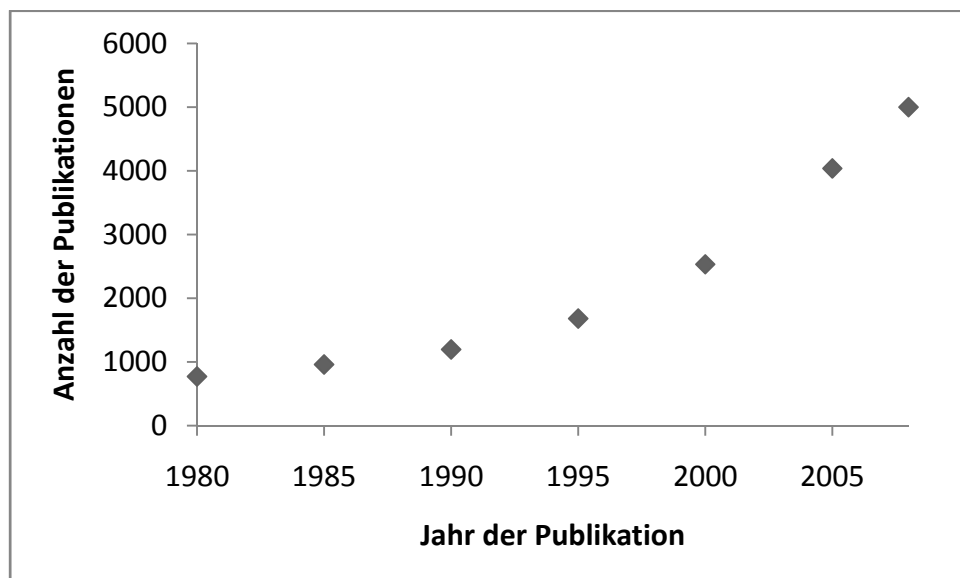
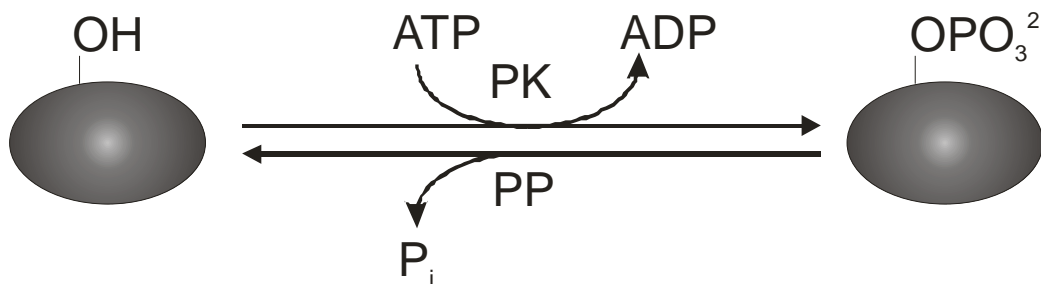


Abbildung 5-1: Anzahl der Publikationen, die nach einer Suchanfrage mit dem Terminus „protein phosphorylation plant“ von PubMed-Service (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) zurückgegeben wurden. Im Juni 2008 wurden 5000 Publikationen gefunden, die diesem Suchkriterium entsprechen, darunter 430 Übersichtsartikel.

Ursächlich hierfür kann die Vielfalt der Prozesse sein, in der die Proteinphosphorylierung eine entscheidende Rolle einnimmt. Bislang wird angenommen, dass etwa 1/3 aller zellulären Proteine phosphoryliert vorliegen (Zolnierowicz und Bollen, 2000). In eukaryotischen Zellen werden vor allem Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste phosphoryliert

(Laugesen et al., 2004). Es werden aber auch Phosphorylierungen der Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure als bedeutendes Element des Zwei-Komponenten-Signalwegs in Pro- und Eukaryoten beschrieben (Saito, 2001). Lediglich wenig ist bekannt über die Phosphorylierung von Lysin, Arginin, Glutaminsäure und Cystein (Wolschin, 2006). Die reversible Phosphorylierung von Proteinen wird durch Proteinkinasen (Phosphorylierung des Substrats) und Proteinphosphatasen (Dephosphorylierung des Substrats) katalysiert (Abbildung 5-2).

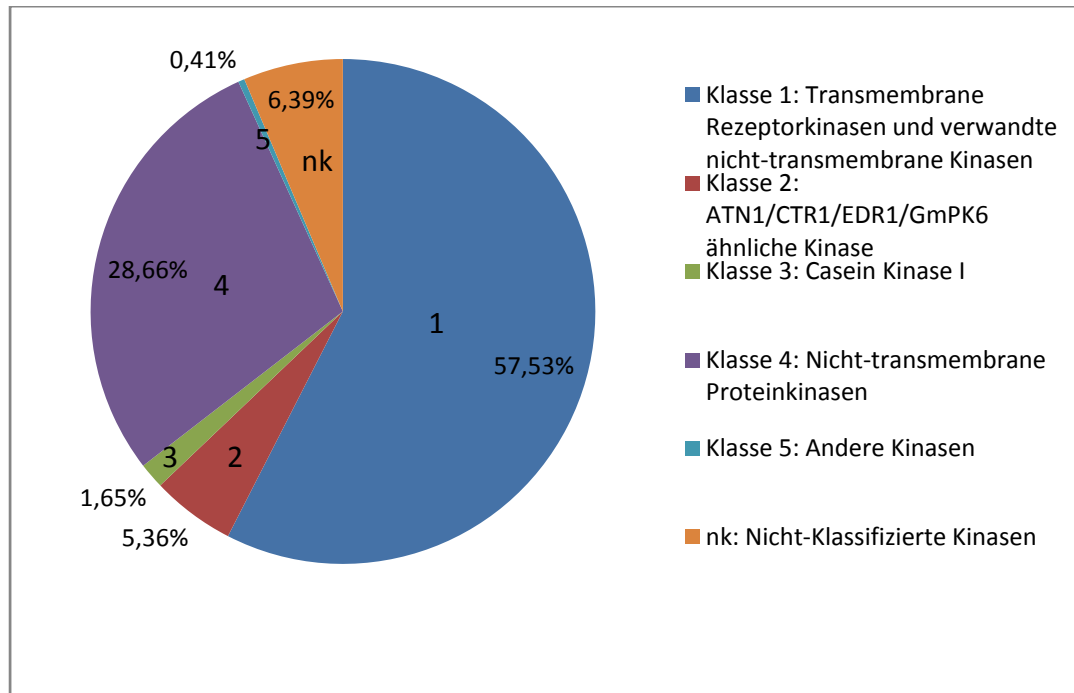


**Abbildung 5-2: Zusammenspiel von Proteinkinase (PK) und Proteinphosphatase (PP) bei der reversiblen Phosphorylierung von Hydroxylgruppen von Proteinen (grau gefüllter Kreis).**

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* kodieren 970 Gene für Proteinkinasen (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>) und 219 Gene für Proteinphosphatasen (Pribil, persönliche Kommunikation). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteinkinasen aus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die Proteinkinasen aus diesem Modellorganismus können gemäß der PlantsP-Datenbank (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>) in fünf Klassen unterteilt werden. Die Unterteilung erfolgte anhand von paarweisen Sequenzvergleichen und anschließendem Clustern. Bei den Klassen handelt es sich um: 1. Transmembrane Rezeptorkinasen und verwandte nicht-transmembrane Rezeptorkinasen, 2. ATN1/CTR1/EDR1/GmPK6 ähnliche Kinasen, 3. Casein Kinasen I, 4. Nicht-transmembrane Proteinkinasen und 5. Andere Kinasen. Bemerkenswert ist, dass bislang 62 Kinasen aus unbekanntem Gründen nicht klassifiziert wurden (Abbildung 5-3).

In der Klasse der transmembranen Rezeptorkinasen und verwandten nicht-transmembranen Rezeptorkinasen werden Proteinkinasen zusammengefasst, die Signale über Membranen weiterleiten. Hierfür verfügen diese über eine extrazelluläre Domäne, die über eine Transmembrandomäne mit einer im Cytosol lokalisierten Proteinkinasedomäne verbunden ist (Morillo und Tax, 2006, Eyüboğlu et al., 2007). Dieser Klasse gehören fast 58% der in der PlantsP-Datenbank gelisteten Proteinkinasen aus *Arabidopsis thaliana* an. Die Funktionen

der in dieser Klasse vertretenen Proteinkinasen sind sehr vielfältig. So fungieren FLS2 (FLAGGELIN SENSITIVE2, Gómez-Gómez und Boller, 2000) und EFR (EF-Tu Rezeptor, Zipfel et al., 2006) in der Perzeption bakterieller Proteine und vermitteln somit Resistenz gegen bakterielle Pathogene (Morillo und Tax, 2006).



**Abbildung 5-3: Prozentualer Verteilung der fünf Proteinkinasen-Klassen und der Gruppe der bislang nicht-klassifizierten Kinasen an der Gesamtheit der Proteinkinasen in der PlantsP-Datenbank, die im Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert sind.**

Auch die Entwicklungsvorgänge der Pflanzen werden durch transmembrane Rezeptorkinasen reguliert. Durch GASSHO1 und GASSHO2 wird während der Embryogenese die Ausbildung der Epidermis kontrolliert. Auch bei der Ausbildung der Cuticula könnten diese Proteine involviert sein (Tsuwamoto et al., 2008). Ein weiterer prominenter Vertreter dieser Klasse ist BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1, Li und Chory, 1997, Wang et al., 2001). Diese Proteinkinase ist an der Signaltransduktion im Brassinosteroid-Signalweg beteiligt. Brassinosteroide gehören der Substanzklasse der Pflanzenhormone an, die bei der Regulation des Wachstums, der Entwicklung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse eine Rolle spielen (Morillo und Tax, 2006).

Die zweite Klasse fasst jene Kinasen zusammen, die eine potentielle duale Spezifität haben, d.h. sowohl Serin- und Threonin-, aber auch Tyrosin-Reste zu phosphorylieren vermögen (Tregear et al., 1996, Rudrabhatla et al., 2006). Ansonsten ist über die Mitglieder dieser Klasse wenig bekannt. Berichtet wurde, dass die *edr1*-Mutante eine erhöhte Resistenz

gegenüber den Pathogenen *Pseudomonas syringae* und *Erysiphe cichoracearum* aufweist (Frye und Innes, 1998). Desweiteren führt die Überexpression einer inaktiven Form von EDR1 zu einer verstärkten Ethylen-induzierten Seneszenz (Tang und Innes, 2002). Zuvor wurde gezeigt, dass ein Defekt im *ctr1*-Gen (*constitutive triple response*) zu einer konstitutiven Ethylen-Antwort führt (Kieber et al., 1993).

Mitglieder der Klasse der Casein Kinasen I sind in allen Eukaryoten vorhanden und bilden eine große Gruppe von monomeren Serin/Threonin-Proteinkinasen (Vielhaber und Virshup, 2001). Lokalisationsstudien in Pflanzen von 14 Casein Kinasen I zeigten, dass fünf Isoformen im Cytoplasma und Kern, vier Isoformen vornehmlich im Cytoplasma und fünf in punktuellen Partikeln lokalisiert waren. Eines der letzteren fünf Proteine wurde co-lokalisiert mit dem plasmodesmalen Protein TMV MP (*Tobacco mosaic virus movement protein*) gefunden, und folglich als PAPK1 (*Plasmodesmal-associated Protein Kinase*) bezeichnet (Lee et al., 2005). Die Funktion dieser Kinasen konnte jedoch bislang nicht endgültig charakterisiert werden. Aus Untersuchungen in tierischen Modellorganismen kann zusammengefasst werden, dass Casein Kinasen I in eine Vielzahl von Prozessen involviert sind, z.B. in der Regulation des RNA-Metabolismus in Nierenzellen der Ratte (Gross et al., 1999), in der Regulation der Translation in Hefe (Paquin und Chartrand, 2008), in der DNA-Reparatur bei Hefe (Hoekstra et al., 1991, (DeMaggio et al., 1992) und *Drosophila* (Santos et al., 1996), sowie in anderen Prozessen, wie der Regulation des circadianen Rhythmus in *Drosophila* und der Alzheimer-Krankheit (Vielhaber und Virshup, 2001). Hierbei wird deutlich, dass einer Kinasenklasse schwer eine alleinige Funktion in einem Prozess oder gar eine Substratklasse zugeordnet werden kann.

Die vierte und zweitgrößte Klasse der Proteinkinasen fasst die nicht-transmembranen Proteinkinasen zusammen. Hierunter befinden sich u. a. die Gruppen der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). MAP-Kinasen agieren in einer linearen Kaskade, bei der eine Phosphorylierungsreaktion als Folge eines exogenen oder endogenen Stimulus stattfindet. Hierbei wird die MAP-Kinase (MAPK) von der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK), und diese wiederum von der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAKKK) phosphoryliert (Mishra et al., 2006). Die Phosphorylierung der MAP-Kinase führt zu deren Aktivierung. Die Phosphorylierungssubstrate der MAP-Kinase umfassen sowohl Proteine des Cytosols, als auch des Zellkerns (hierbei vor allem Transkriptionsfaktoren). Ebenfalls sind die Prozesse, die

über MAP-Kinasen reguliert werden, sehr vielfältig. So wird u. a. die Zellteilung (Krysan et al., 2002, Takahashi et al., 2004), die Abwehr von Pathogenen (Romeis, 2001) durch MAP-Kinasen reguliert. Aber auch an der Transduktion phytohormonaler Signale sind MAP-Kinasen beteiligt (Mishra et al., 2006, Zhang et al., 2006).

Weiterhin beinhaltet die Klasse der nicht-transmembranen Proteinkinasen die Gruppe der Calcium-*response* (engl.: Reaktion, Rückantwort) Proteinkinasen. Änderungen in der intrazellulären Calcium-Konzentration sind Folgen biotischer und abiotischer Stimuli (Sanders et al., 2002). Neben anderen Proteinen wird auch die Aktivität dieser Calcium-*response* Proteinkinasen moduliert. Hierbei lassen sich zunächst zwei Gruppen unterscheiden. Während die Familie der Calcium abhängigen Proteinkinasen direkt Calcium-Ionen über EF-hand Motive binden, erfolgt im Falle der CIPK (*Calcineurin B-like Protein-interacting protein kinase*) die Wahrnehmung der Veränderung der intrazellulären Konzentration über Calcium-bindende Proteine, die daraufhin mit den CIPK interagieren.

Calcium-abhängige Proteinkinasen sind nahezu in allen subzellulären Kompartimenten zu finden. So konnten diese im Cytosol, im Zellkern, in der Plasmamembran, im Endoplasmatischen Retikulum, in den Peroxisomen und in den Mitochondrien detektiert werden (Klimecka und Muszynska, 2007). Kürzlich gelang es CaCPK1 und CaCPK2 (*Cicer arietium Calcium Protein Kinase*) sowohl in der Plasmamembran als auch in der Chloroplastenmembran der Kichererbse zu lokalisieren (Prakash und Jayabaskaran, 2006).

Durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente konnten Substrate dieser Proteinkinasenfamilie identifiziert werden, die dem Kohlenstoff-, Stickstoff- und dem Phospholipidmetabolismus, der Organisation des Cytoskeletts, der Transkription, der Regulation des Proteasoms, u. a. zuzuordnen sind. Weiterhin konnten Veränderungen in der Transkriptmenge einzelner Calcium-abhängiger Proteinkinasen gezeigt werden, so dass auch für diese Gruppe von Proteinkinasen eine vermittelnde Rolle in der Hormonantwort angenommen werden kann (Klimecka und Muszynska, 2007).

Für die Calcium-abhängige Reizweiterleitung durch Proteinkinasen der CIPK-Gruppe werden, wie erwähnt, Proteine benötigt, die Calcium binden. Diese Calcium-bindenden Proteine und mit den CIPK interagierenden Proteine werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Calcineurin B als Calcineurin B-*like* (engl.: ähnlich) bezeichnet (Albrecht et al., 2001, Batistic und Kudla,



2004). Bemerkenswert ist, dass sich durch die zweistufige Transduktion des Signals bereits an dieser Stelle eine Varianz der Signalweiterleitung bewerkstelligen lässt. So wurde beschrieben, dass CLB1 und CLB9 aus *Arabidopsis thaliana* mit fünf bzw. sechs verschiedenen CIPKs interagieren können (Kolukisaoglu et al., 2004). Diesen Gedanken weiterführend, schlugen D'Angelo et al. (2006) vor, dass abhängig davon, ob CLB1 oder CLB9 mit CIPK1 einen Komplex ausbilden, eine Abscisinsäure-abhängige oder Abscisinsäure-unabhängige Stressreaktion erfolgt. Weitere Beispiele für eine Beteiligung von CIPKs und CBLs an abiotischen Stressreaktionen wurden beschrieben (Halfter et al., 2000, Liu et al., 2000).

Eine besondere Bedeutung kommt der Phosphorylierung in den Chloroplasten zu. Auf diese soll im Folgenden eingegangen werden.

## 5.6.2 Phosphorylierung im Chloroplasten

### 5.6.2.1 Bekannte Kinasen und deren Funktionen im Chloroplasten

In den Chloroplasten der Pflanzenzelle konnten die höchsten Konzentrationen an Phosphoproteinen gefunden werden (Bennett, 1991). Bereits 1977 konnte gezeigt werden, dass Proteine der Thylakoidmembran der Chloroplasten phosphoryliert sind (Bennett, 1977, Vener et al., 2001, Hansson und Vener, 2003, Carlberg et al., 2003, Vainonen et al., 2008). Später wurden Phosphoproteine in den übrigen Kompartimenten, mit Ausnahme des Thylakoidlumens, identifiziert (z.B. Stroma: Foyer, 1985, Guitton et al., 1984 Tetlow, 2004, Weber et al, 2006, Bhalla und Bennett, 1987; Innere Chloroplastenmembran: Soll und Bennett, 1988, Peters und Berkowitz, 1998; äußere Chloroplastenmembran: Soll und Buchanan, 1983, Soll et al., 1988, Soll, 1988, Hinz und Flügge, 1988; Intermembranraum: Soll und Bennett, 1988).

Im Gegensatz zu der Vielzahl an berichteten Phosphorylierungen in den Chloroplasten, gibt es bislang lediglich für neun Proteinkinasen Hinweise auf eine Lokalisation in diesem Organell (Tabelle 5-1).

Wohl am besten untersucht ist die Phosphorylierung der Thylakoide. Aufgrund von Sequenzhomologie zu Stt7 aus *Chlamydomonas reinhardtii* konnten in *Arabidopsis thaliana* Gene für die Proteinkinasen STN7 und STN8 identifiziert werden (Depege et al., 2003). Wie

Stt7 in *Chlamydomonas*, so ist STN7 erforderlich für die Phosphorylierung des Lichtsammelkomplexes II und dient somit der Einstellung der Balance des Energieeintrags zwischen den Photosystemen I und II (Prozess als *state transitions* bezeichnet, Bellafiore et al., 2005, Bonardi et al., 2005). Hingegen ist STN8 für die reversible Phosphorylierung der Photosystem II Proteine (D1, D2, CP43, PSII-H und CP29) notwendig (Bonardi et al., 2005). Nicht endgültig geklärt ist, ob diese Proteinkinasen direkt die obigen Photosynthese-Proteine phosphorylieren, oder ob sie in einer Phosphorylierungskaskade involviert sind, die weitere Proteinkinasen beinhaltet. Weitere in dieser Kaskade involvierte Proteinkinasen wurden von Snyders und Kohorn (1999, 2001) als sog. Thylakoid-assoziierte Proteinkinasen TAK1, TAK2 und TAK3 vorgeschlagen. Die Verifizierung der subzellulären Lokalisation in den Thylakoiden schlug für TAK2 und TAK3 gänzlich fehl, wohingegen für TAK1 eine Assoziation mit den Thylakoiden mittels *in vitro* Experimenten, jedoch nicht *in vivo* durch Transfektion von Tabakprotoplasten mit dem Fusionskonstrukt der aus der kodierenden Sequenz von *tak1* und dem rot-fluoreszierenden Protein (RFP), gefunden wurde (Bonardi, 2006).

Weiterhin wurde im Rahmen einer Studie zur subzellulären Lokalisation von Casein Kinasen II (Klasse 4) aus *Arabidopsis thaliana* für eine dieser Kinasen ( $\alpha$ cp) eine chloroplastidäre Lokalisation festgestellt (Tabelle 5-1, Salinas et al., 2006). Diese Kinase wurde bereits in Senf (*Sinapis alba* L.) als cpCK2 $\alpha$  identifiziert (Ogrzewalla et al., 2002). Hierbei wurde gezeigt, dass cpCK2 $\alpha$  aus Senf Komponenten des Transkriptionsapparates *in vitro* phosphoryliert.

Drei weitere plastidär lokalisierte Proteinkinasen wurden im Rahmen von Subproteomanalysen vorgeschlagen (Froehlich et al., 2003, Kleffmann et al., 2004), aber bislang steht die Überprüfung dieser Lokalisation mit unabhängigen Methoden noch aus (Tabelle 5-1). Zumindest für die TOUSLED-like Proteinkinase wurde eine Funktion in der Regulation der Chromatinstruktur und damit einhergehend eine Lokalisation im Zellkern beschrieben (Ehsan et al., 2004).

Tabelle 5-1: Experimentell identifizierte chloroplastidäre Proteinkinasen. <sup>a</sup> entsprechend der PlantsP-Datenbank (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/html/families.html>); <sup>b</sup> bislang nicht klassifiziert; <sup>c</sup> TAK1 weist kein absplattbares chloroplastendirektierendes Transitpeptid auf; <sup>d</sup> eine chloroplastidäre Lokalisation war nicht reproduzierbar (Bonardi, 2006).

AGI Nummer	Bezeichnung	Klasse <sup>a</sup>	Experimentelles Verfahren für die Bestätigung einer plastidären Lokalisation	Referenz
At1g68830	STN7	keine <sup>b</sup>	RFP/GFP-Fusion, <i>in vitro</i> Import, Immunolokalisation	(Bellafiore et al., 2005, Bonardi et al., 2005)
At5g01920	STN8	keine <sup>b</sup>	RFP fusion, <i>in vitro</i> Import	Bonardi et al., 2005, Vainonen et al., 2005
At4g02630	TAK1	1	Immunolokalisation, <i>In vitro</i> Import <sup>c</sup>	Snyders und Kohorn, 1999, Snyders und Kohorn, 2001
At1g01540	TAK2	1	Sequenzhomologie-basierend <sup>d</sup>	
At4g01330	TAK3	1		
At2g23070	$\alpha$ cp PPPK10	4	GFP-Fusion	Salinas et al., 2006
At3g44610	PK-like protein	4	Subproteomanalyse von Chloroplasten	Kleffmann et al., 2004
At5g20930	TSL (TOUSLED)	keine <sup>b</sup>		
At1g76370	Putative PK	1		Froehlich et al., 2003

## 5.7 Ziel der Arbeit

Die Chloroplasten weisen die höchste Konzentration an reversibel phosphorylierten Proteinen auf. Jedoch war zu Beginn der Arbeit nur wenig über chloroplastidäre Proteinkinasen bekannt. Insgesamt sind im Genom von *Arabidopsis thaliana* 970 Proteinkinasen (<http://plantsp.genomics.purdue.edu/html/>) kodiert. Daher wurden zunächst 14 Proteinkinasen mit bioinformatischen Hilfsmitteln identifiziert, die ein chloroplastendirektierendes Transitpeptid enthalten könnten. Dieser Vorhersage folgend, sollte die subzelluläre Lokalisation von 12 dieser putativen chloroplastidären Proteinkinasen (PPPK) *in vivo* verifiziert werden. Weiterhin sollten, mittels eines reversen Genetik-Ansatzes, Insertionsmutanten zu den PPPKs identifiziert werden und durch die Charakterisierungen dieser Linien, Hinweise auf die Funktionen der PPPKs in den Chloroplasten gewonnen werden. Als im Laufe der Arbeit deutlich wurde, dass PPPK10 essentielle Funktionen in *Arabidopsis thaliana* einnimmt, konzentrierten sich nachfolgende Untersuchungen auf detailliertere biochemische, genetische und physiologische Charakterisierungen der Insertionsmutanten dieses Gens. Hierbei wurde eine Diskrepanz in den Phänotypen der Insertionsmutante *pppk10-2* und der *pppk10-3* beobachtet. Homozygote Samen der Linie *pppk10-3* waren nicht keimungsfähig, wohingegen kein Effekt auf die Keimung durch das Allel *pppk10-2* festgestellt werden konnte. Daher musste untersucht werden, inwieweit das Allel *pppk10-2* exprimiert wurde und ob das daraus resultierende Genprodukt das Potential aufwies, das Translationsprodukt in die Mitochondrien und Chloroplasten zu dirigieren. Weiterhin sollte geklärt werden, ob durch die Mutation in der Linie *pppk10-2* Veränderungen in der Photosynthese, der Transkription in den Chloroplasten und den Mitochondrien, der Proteinzusammensetzung und der Proteinphosphorylierung der Chloroplasten zu beobachten waren. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Einklang mit der Literatur genutzt, um zwei Modelle der Regulation der chloroplastidären Transkription zu skizzieren.

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Bio-Rad (München, Dt.), GE Healthcare (München, Dt.), Roth (Karlsruhe, Dt.), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dt.) und Merck (Darmstadt, Dt.) bezogen und wiesen das Qualitätsmerkmal *pro analysis (p.a.)* auf. Die Bestandteile der verwendeten Nährmedien wurden von folgenden Firmen bezogen: Becton, Dickinson and Company (Sparks, USA), Merck (Darmstadt, Dt.), Roth (Karlsruhe, Dt.), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Dt.) und Duchefa (Haarlem, Niederlande). Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Roche Diagnostics – Applied Science (Mannheim, Dt.), Fermentas GmbH (St. Leon-Roth, Dt.), New England Biolabs (Frankfurt/Main, Dt.), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Dt.), Qiagen (Hilden, Dt.) und Promega GmbH (Mannheim, Dt.) bezogen.

#### 6.1.2 Kits

Chemiluminescence Western-Blotting Kit	GE Healthcare (München, Dt.)
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab Biotech GmbH (Erlangen, Dt.)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotech GmbH (Erlangen, Dt.)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Dt.)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH (Hilden, Dt.)
Phosphoprotein Enrichment Kit	Pierce (Rockford, USA)
Gateway® Technology	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Dt.)
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotech GmbH (Erlangen, Dt.)
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Lab. GmbH (München, Dt.)
iQ™ Sybr® Green Supermix	Bio-Rad Lab. GmbH (München, Dt.)

### 6.1.3 Medien

#### 6.1.3.1 Medien zur Aufzucht von *Escherichia coli*

##### LB-Medium:

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

bei Bedarf wurden zugegeben:

- 1,5% (w/v) Agar
- 0,005% (w/v) X-Gal und 0,4 mM IPTG
- Chemikalien zur Selektion

#### 6.1.3.2 Medium zur Aufzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

##### YEB-Medium:

1% (w/v) Hefeextrakt; 0,5%(w/v) Fleischextrakt; 0,5% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Saccharose;  
2 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7,2

Bei Bedarf zugegeben:

- 1,5% (w/v) Agar
- Chemikalien zur Selektion

#### 6.1.3.3 Medium zur Aufzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

##### MS1-Medium

4,4 g/l MS-Salz mit Vitaminen (Murashige & Skoog Medium, Duchefa, Produkt-Nr: M0222.0050), pH 5,7-pH 5,8; 0,8% (w/v) Agar

Bei Bedarf zugeben:

- 1-1,5% (w/v) Saccharose
- Chemikalien zur Selektion
- 50 nM Indol-3-Essigsäure (IAA) – 50 nM Naphthylessigsäure (NAA)

#### 6.1.3.4 Medien für Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

##### MMC-Lösung

10 mM MES; 20 mM CaCl<sub>2</sub> \* 2H<sub>2</sub>O; 0,5 M Mannit; 550 mOsm/l; pH 5,8

##### MSC-Lösung

10 mM MES; 20 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O; 12%(w/v) Saccharose; 550 mOsm/l; pH 5,8

##### MMM-Lösung

10 mM MES; 10 mM MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,5 M Mannitol; 550 mOsm/l; pH5,8

##### PCA-Medium

3052 mg/l B5 Gamborg basal mixture; 746 mg/l MgSO<sub>4</sub>; 450 mg/l CaCl<sub>2</sub>; 50 mg/l Glutamin;  
100 mg/l Caseinhydrolysat; 0,5 mg/l NAA; 70 g/l Glucose; 550 mOsm/l; pH 5,8

##### PEG-Lösung

2 g PEG 4000; 1 ml 1M Mannitol; 500 µl 1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 1,70 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 6.1.3.5 Antibiotika

Antibiotika wurden bei Bedarf in folgenden Konzentrationen verwendet:

**Tabelle 6-1: Antibiotika und die verwendeten Konzentrationen**

Antibiotika	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Selektionsmedium für		
			<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>	<i>A. thaliana</i>
Ampicillin	ddH <sub>2</sub> O	100 mg/ml	100 mg/l	100 mg/l	-
Hygromycin	ddH <sub>2</sub> O	25 mg/ml	15 mg/l	15 mg/l	-
Kanamycin	ddH <sub>2</sub> O	50 mg/ml	50 mg/l	25 mg/l	50 mg/l
Rifampicin	DMSO	100 mg/ml	-	100 mg/l	-

#### 6.1.4 Oligonukleotide und deren Verwendung

Eine Zusammenstellung der Bezeichnung und der Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide (*primer*) in 5' zu 3' Orientierung, kann der Tabelle 6-2 bis Tabelle 6-5 entnommen werden. Diese Tabellen sind nach Verwendungszweck zusammengestellt. Diese Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Dt.) und Metabion GmbH (Martinsried, Dt.) bezogen.

Tabelle 6-2: Zusammenstellung der Oligonukleotide, die für die Klonierung transienter Expressionskonstrukte für Lokalisationsexperimente verwendet wurden. Oligonukleotide, die paarweise benutzt wurden, wurden durch einen Rahmen umschlossen.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz in 5'- zu 3'-Orientierung
At1g51170RFP-1s	TACCATGGAGACAAGACCATCATCA
At1g51170/TP-as	CGCCATGGCACCTCCTTCAGCTAAGAGTTTTGGGAGAAA
At1g68690Ncol-s	CGCCATGGCAACAACACCGGTTCA
At1g68690Ncol-240as	CGCCATGGCTGCGCCCCCAAGAAGAGCTCTCAGGTGGTTTTGG
At2g17220Ncol-s	CGCCATGGGTCTTTGTTGGGGATCT
At2g17220Ncol-330as	CGCCATGGCTGCGCCCCCATGGAGTCTTGTCTTCAAGCCA
At2g23070Ncol-s	CGCCATGGCCTTAAGGCCTTGTACTGG
At2g23070Ncol-324as	CGCCATGGCTGCGCCCCCAGACATCAGCGTAAACCCTAGC
At2g31500Ncol-s	CGCCATGGGAAGTTGTGTTTCGTCGC
At2g31500Ncol-327as	CGCCATGGCTGCGCCCCCACTCCACATCTATCTCCGTCCTTAG
At2g34180Ncol-s	CGCCATGGCTCAAGTACTATCTACAC
At2g34180Ncol-300as	CGCCATGGCTGCGCCCCCAACCGCCAATCCACTCTTCAC
At3g24400Ncol-s	CGCCATGGCATCATCGGCGCCGCCTCC
At3g24400Ncol-355as	CGCCATGGCTGCGCCCCCATGAAGGAGTGATGGCAGGTGG
At3g24550Ncol-s	CGCCATGGCATCCACAGCGCCGTCTCCA
At3g24550Ncol-345as	CGCCATGGCTGCGCCCCCATCCTGAGGGAGTGTTTGGTGGTC
At3g27580Ncol-s	CGCCATGGATTCTTCTTCATCAGTCG
At3g27580Ncol-264as	CGCCATGGCTGCGCCCCCAGCTAGAGTAAACCTTGGC
At4g32710Ncol-s	CGCCATGGCATCGTCTCTCCTTCTTCCTC
At4g32710Ncol-189as	CGCCATGGCTGCGCCCCCAGGAAGCGGTGGGAGCGGAG
At4g36950Ncol-s	CGCCATGGAGTGGATTTCGTAGAGAAACG
At4g36950Ncol-270as	CGCCATGGCTGCGCCCCCAACCACCGGAAGCATACTCAAGAAAC
At5g38560Ncol-s	CGCCATGGCAAGTTTGGTTCCTCCTTTACCGA
At5g38560Ncol-309as	CGCCATGGCTGCGCCCCCACGCCGGAGTTGAGGGAGGAGG
LBgk1/gw-s	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGCCATTTGGACGTGA ATGTAGACAC
At2g23070/GW-324as	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGCCCCCAGACATCA GCGTAAACCCTAGC

Tabelle 6-3: Zusammenstellung der Oligonukleotide, die für die Charakterisierung von Arabidopsis thaliana T-DNA Insertionsmutanten verwendet wurden.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz in 5'- zu 3'-Orientierung
Insertionsspezifische Oligonukleotide	
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCACCT
LBgk1	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
RB1	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG
RBb1	TCAGTGACAACGTCGAGCAC
Tag3 (RB)	CTGATACCAGACGTTGCCCGCATAA



Tag5 (LB) DS5-1	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC ACGGTCGGGAAACTAGCTCTAC
Genspezifische Oligonukleotide	
At1g51170-17s At1g51170-1080as	GGAGTTATTTCGAGATGCA GTTCCGGGTCGGATAGATG
At1g51170-647sv2 At1g51170-2100as	AGAAGAAGACGAAGTCAGCTCG CGTAATCATCAAGTACCATGC
At2g23070-1195s At2g23070-1879as At2g23070-2061as At2g23070--291s At2g23070-871as	CAGTTTCCTGAATTGTAGACC GTCATTCCATTACAGCTTAAAC CAGAGGAGACGAGACATGAT TTCAAGTGGACGATGATGATG ACAGCAAGGGACTCGTAATC
At2g34180-391s At2g34180-1285as	TACATTGTGATGGAGTACGTT AGCTCCTTCTCTACAACCTTC
At1g68690-1684s At1g68690-2788as	GAACTTGTGAAGGCAACAAATGG GTTTCTATGGCATGACTTATCA
At2g17220--429s At2g17220-1348as	CTTCCTCAAATCTTTGCACCAC CTCCCAAGAAAATCACTTCAC
At3g24400--433s At3g24400-1287as	CCATATTGATATAATTGGCCTG CAGGGGGTGCTTCATTGTCTC
At5g38560-91s At5g38560-1589as	ACTCCATCTGCTCCACCTC ACATGTAATCGCTACCAGAATG
At3g24550--541s At3g24550-801as	TGGCATGATAGATTGTCTGC TGGTTAGGAGATGGAGGGCT
At2g31500-505s At2g31500-1452as	GAAGTTGTGTTTCGTCGCCA ACAATCTCATTGAACCGCTGGG
At4g36950-1159s At4g36950-2256as	GTATTGGTTCCGGCGATG GATGAAGTTAAATGCGAATG
At4g36950-1921s At4g36950-3405as	GTTCTTATGCATATTACTIONGAG CATCAACCGTTGGCCAGTCT
At3g27580-354s At3g27580-1650as	TGTCTCGGCGGTTACTTGAAATTG GTTGGTTGGATACAGTAGCTTGAG

At4g32710-1438s	GCAGCTCTGCTCATCATCAATCCA
At4g32710-2778as	AGTTACTTTACCACTGGACGCGT

Tabelle 6-4: Zusammenstellung der Oligonukleotide, die für Transkriptanalysen verwendet wurden. Oligonukleotide, die paarweise benutzt wurden, wurden durch einen Rahmen umschlossen.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz in 5'- zu 3'-Orientierung
Act33s	TGCGACAATGGAACTGGAATG
Act974as	GGATAGCATGTGG AAGTGCATACC
At1g51170-TR_as	CCGTCGCCGCGAATTACCTCC
At1g51170TR-s	CTTAGCTGAAATCGTCTGTGC
At2g23070--27s	CTGAATAAGAGTTAAAAAAGA
At2g23070-365as	GGTCTAACAACGTTGACATC
At2g23070-734s	CGTTGGATTTCTGCCATTCACG
At2g23070-974as	GCAAACATACACCCAAGACTC
At2g23070-E2-3as	TCATAGTCTGAGAGAGTTGG
At2g23070-E2-3s	CAGGATGATTATGAGGTGGTG
At2g23070-E7-10as	CACTGGCTGCGCGGCGTACG
At2g23070-E7-10s	CTTGGCACAGATGAACTCAAC
psaAB-as	CGAAGACCAATGCGCCAATT
psaAB-s	CGTTCGCCGGAACCAGAAGTC
psbA-as	CATAAGAATGTTGTGCTCAGCCT
psbA-s	CCAGTAGATATTGATGGTATTC
rn16-s	CAATGGGCGAAAGCCTGACGG
rn16-as	AGTGTCGGCCAGCAGAGTGC

Tabelle 6-5: Zusammenstellung der Oligonukleotide, die die Sequenzierung von PCR-Fragmenten oder Klonierungsprodukten verwendet wurden.

Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz in 5'- zu 3'-Orientierung
M13 for	GTA AACGACGGCCAG
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC
pDONR201-2792as	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
pDONR201-300s	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
At2g23070-1005s	AATTGGTCAA AATTGCGAAGGT
At2g23070-1083as	GGGTCCA ACTCTATACGGTATT
At2g23070-491s	TTGAAGCCTGTGAAGAAGAAGAA
At2g23070-549as	CAGAGGTTCTGCAGAATCTTAAT
CaMV	CTCGGATTCCATTGCCAGCTAT
dsRED-as	CAGGGTGCTTGACATATACC
pGWB5-7649as	GGACACGCTGAACTTGTGGCCGT
pLeela-2115as	GATTTTTGCGGACTCTAGAAC

## 6.1.5 Plasmide

Folgende Tabelle enthält eine Zusammenstellung der verwendeten Plasmide.

Tabelle 6-6: Zusammenstellung der verwendeten Plasmide

Bezeichnung des Plasmids	Verwendungszweck	Referenz
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Klonierung von PCR-Produkten	Promega GmbH
pDONR <sup>™</sup> 201	Klonierung von PCR-Produkten mittels Gateway <sup>®</sup> -System	Invitrogen GmbH
pLeela	binärer Gateway <sup>®</sup> -Vektor für die Konstruktion von Komplementationskonstrukten unter der Kontrolle eines doppelten 35SCaMV-Promotor	Jacoby et al., 2004
pGJ1425	Vektor für transiente Expression von Peptiden mit C-terminaler Fusion von RFP	Jach et al., 2001
pRASE9	Vektor für transiente Expression von Peptiden mit C-terminaler Fusion von RFP im Gateway <sup>®</sup> -System	Weigel, persönliche Kommunikation
pGWB5	binärer Gateway <sup>®</sup> -Vektor für die Konstruktion von Expressionskonstrukten mit C-terminaler Fusion an GFP unter der Kontrolle eines doppelten 35SCaMV-Promotor	Nakagawa, 2002 (pGW manual)

## 6.1.6 Organismen

### 6.1.6.1 *Escherichia coli*

Tabelle 6-7: Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Stamm	Verwendung	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	Klonierung	F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-,mk+)</i> <i>phoA supE44 <math>\lambda</math>-thi gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
DB3.1 <sup>™</sup>	Propagieren von Gateway <sup>®</sup> -Vektoren	F- <i>gyrA462 endA1 <math>\Delta</math>(sr1-recA) mcrB mrr</i> <i>hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2</i> <i>lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 <math>\Delta</math>leu mtl1</i>	Invitrogen GmbH

6.1.6.2 *Agrobacterium tumefaciens*Tabelle 6-8: Verwendeter Stamm von *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm	Verwendung	Genotyp	Referenz
GV3101	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	Rifampicin-Resistenz (Loake et al. 1988) und Ti-Plasmid pMK90RK	Loake et al. 1988, Koncz et al. 1990

6.1.6.3 *Arabidopsis thaliana* und deren Wachstumsbedingungen

Die in Tabelle 6-9 zusammengefassten Linien der *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) wurde für die Genotypisierung unter Gewächshausbedingungen als Erdkultur herangezogen. Wenn das Pflanzenmaterial für molekularbiologische Experimente verwendet werden sollte, so wurden folgende Wachstumsbedingungen in einer Klimakammer (Vissmann, TE1200\*2250\*80, Hof, Dt.) herangezogen: 12 h bei einer Lichtintensität von  $90-100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einer Temperatur  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  sowie 12 h Dunkelheit bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Für einzelne Experimente wurden Starklichtbedingungen herbeigeführt, indem die Pflanzen einer Lichtintensität von  $1500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt wurden.

Tabelle 6-9: Zusammenfassung der verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Linien

Bezeichnung der Linie	Insertion im Gen	Oligonukleotide, die zur Charakterisierung	Plasmid der Insertion	Referenz
SALK_078048	At1g68690	At1g68690-1684s At1g68690-2788as	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_014687	At1g68690	At1g68690-1684s At1g68690-2788as	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_113804	At2g17220	At2g17220--429s At2g17220-1348as	pROK2	Alonso et al. 2003
163H09	At2g17220	At2g17220--429s At2g17220-1348as	pAC161	Rosso et al. 2003
463H04	At3g24400	At3g24400--433s At3g24400-1287as	pAC161	Rosso et al. 2003
sgt5183	At5g38560	At5g38560-91s At5t38560-1589as		Parinov et al., 1999
SALK_139480	At3g24550	At3g24550--541s At3g24550-801as	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_008504	At3g24550	At3g24550--541s At3g24550-801as	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_146353	At2g31500	At2g31500-503s	pROK2	Alonso et al. 2003

SALK_015986	At2g31500	At2g31500-1452as At2g31500-503s	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_088714	At4g36950	At2g31500-1452as At4g36950-1159s	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_031902	At4g36950	At4g36950-2256as At4g36950-1921s	pROK2	Alonso et al. 2003
169H08	At3g27580	At4g36950-3405as At3g27580-354s	pAC161	Rosso et al. 2003
SALK_047347	At3g27580	At3g27580-1650as At3g27580-354s	pROK2	Alonso et al. 2003
687A09	At4g32710	At3g27580-1650as At4g32710-1438s	pAC161	Rosso et al. 2003
347B02	At5g38560	At4g32710-2778as At5g38560-91s	pAC161	Rosso et al. 2003
		At5g38560-1589as		
Insertionslinien chloroplastidärer Proteinkinasen				
615F11 ( <i>pppk10-2</i> )	At2g23070	At2g23070--291s At2g23070-871as	pAC161	Rosso et al. 2003
150A04 ( <i>pppk10-1</i> )	At2g23070	At2g23070--291s At2g23070-871as	pGKB5	Brunaud et al. 2002
400A04 ( <i>pppk10-1</i> )	At2g23070	At2g23070-1195s	pAC161	Rosso et al. 2003
SALK_044862 ( <i>pppk6-1</i> )	At1g51170	At2g23070-1879as At2g23070-2061as At1g51170-647v2	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_143744 ( <i>pppk6-2</i> )	At1g51170	At1g51170-2100as At1g51170-647v2	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_084711 ( <i>pppk6-3</i> )	At1g51170	At1g51170-2100as At1g51170-17s	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_124748 ( <i>pppk9-1</i> )	At2g34180	At1g51170-1080as At2g34180-391s	pROK2	Alonso et al. 2003
SALK_124753 ( <i>pppk9-2</i> )	At2g34180	At2g34180-1285as At2g34180-391s	pROK2	Alonso et al. 2003
		At2g34180-1285as		
Linien für die funktionelle Komplementation der Insertionslinie <i>pppk10-2</i> und <i>pppk10-3</i>				
<i>pppk10-2</i> #49.E7+LR1-1+pGWB5-2			2X35S::PPPK10_ CDS mit C- terminaler Fusion von GFP	

<i>pppk10-3#9.1+LR1-1+pGWB5</i>	2X35S::PPPK10_ CDS mit C-terminaler Fusion von GFP
<i>pppk10-2#49.E7+2-1-2-6</i>	2X35S::PPPK10_ CDS
<i>pppk10-3#9.1+2-1-2-3</i>	2X35S::PPPK10_ CDS

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Bioinformatische Ressourcen

#### 6.2.1.1 Sequenzdatenbanken, Sequenzanalysen und Homologiesuchen mittels BLAST

Nukleotidsequenzen und Aminosäuresequenzen wurden der TAIR-Datenbank ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) entnommen. Die Identifizierung von Homologien Proteinen erfolgte durch Homologiesuchen mittels BLAST-Algorithmus (*basic local alignment search tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, Altschul et al., 1990) gegen die nicht redundante Proteindatenbank des *National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Potentielle Insertionsmutanten der Gene *PPPK10*, *PPPK9* und *PPPK6* wurden in den ATIDB (*Arabidopsis thaliana integrated database*, <http://atidb.org/cgi-perl/index>) und der T-DNA EXPRESS Datenbank (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) identifiziert.

#### 6.2.1.2 Vorhersagealgorithmen für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen

Die Vorhersagen der chloroplastidären Lokalisation der in Tabelle 7-2 aufgeführten Proteinkinasen, erfolgten entsprechend Richly und Leister (2004) durch die Kombination der Algorithmen iPSORT (Bannai et al., 2002), PCLR (Schein et al., 2001), Predotar (Small et al., 2004) und TargetP (Emanuelsson et al., 2000). Für die experimentelle Verifikation der subzellulären Lokalisation wurden nur Proteinkinasen ausgewählt, die von allen vier Vorhersagealgorithmen als plastidäre Proteine vorhergesagt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vorhersagen regelmäßig wiederholt und die Anzahl der unabhängigen Algorithmen auf neun erhöht (Tabelle 6-10).

**Tabelle 6-10: Zusammenstellung der Vorhersagealgorithmen, die bei der *in silico* Analyse der plastidären Lokalisation der Proteinkinasen Verwendung fanden**

Name des Vorhersagealgorithmus	Version	Webadresse	Referenz
Predotar	1.03	<a href="http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html">http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html</a>	Small et al., 2004
TargetP	1.1	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>	Emanuelsson et al., 2000
ProteinProwler	1.2	<a href="http://pprowler.imb.uq.edu.au/">http://pprowler.imb.uq.edu.au/</a>	Boden und Hawkins, 2005
AAIndexLOC		<a href="http://aaindexloc.bii.a-star.edu.sg/">http://aaindexloc.bii.a-star.edu.sg/</a>	Tantoso und Li, 2008
PredSL		<a href="http://hannibal.biol.uoa.gr/PredSL/">http://hannibal.biol.uoa.gr/PredSL/</a>	Petsalaki et al., 2006
SLP-Local		<a href="http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html">http://sunflower.kuicr.kyoto-u.ac.jp/~smatsuda/slplocal.html</a>	Matsuda et al., 2005
Wolf PSORT MultiLOC		<a href="http://wolfpsort.org/">http://wolfpsort.org/</a> <a href="http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLOC/">http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLOC/</a>	Horton et al., 2007 Hoglund et., 2006
PCLR	0.9	<a href="http://www.andrewschein.com/pclr/">http://www.andrewschein.com/pclr/</a>	Schein et al., 2001

ChloroP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>, Emanuelsson et al., 1999) wurde weiterhin verwendet, um die Länge des plastidendirigierenden Transitpeptides zu berechnen. Diese Information fand Verwendung für die in 6.2.2.4 erläuterte Fusionierung der vorhergesagten Transitpeptide an RFP. Weiterhin wurde TargetP für die segmentelle Vorhersage der subzellulären Lokalisation PPPK10 verwendet. Hierfür wurde die Aminosäuresequenz dieses Genprodukts um jeweils 5 Aminosäuren verkürzt, bis die ersten 60 Aminosäuren, die das Protein in die Organellen dirigieren, fehlten. Für jede verkürzte Form wurde die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines cTP bzw. mTP durch TargetP (Emanuelsson et al., 2000) ermittelt. Diese Werte wurden anschließend gegen die Anzahl der Aminosäuren, um die das Protein verkürzt wurde, aufgetragen.

## 6.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 6.2.2.1 DNA-Analyse von *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation der DNA aus den in Tabelle 6-9 zusammengestellten Genotypen erfolgte durch das Homogenisieren frischen Blattmaterials in DNA-Homogenisationspuffer (200 mM Tris (pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS), gefolgt von einer Isopropanolfällung. Das DNA-Sediment wurde zweimal mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen und im 10 mM Tris (pH 8,5) resuspendiert. T-DNA Insertionsorte wurden mittels einer Kombination aus genspezifischen und T-DNA-spezifischen Oligonukleotiden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend im Sequenzierservice des Departments Biologie I sequenziert (<http://www.genetik.biologie.uni-muenchen.de/sequencing/>). Für die Charakterisierung der pROK2-vermittelten Insertionsmutanten wurden genspezifische Oligonukleotide entsprechend Tabelle 6-9 und Tabelle 6-3 in Kombination mit den T-DNA-spezifischen Oligonukleotide LBb1 und RBb1 (Tabelle 6-3) verwendet. Für die Charakterisierung der pAC161-vermittelten Insertionsmutanten wurden die genspezifischen Oligonukleotide entsprechend Tabelle 6-9 und Tabelle 6-3 und die für pAC161 spezifischen Oligonukleotide Lbgk1 und RB1 (Tabelle 6-3) verwendet. Die Charakterisierung der pGKB5 vermittelten Insertionsmutanten erfolgte mittels der genspezifischen Oligonukleotide aus Tabelle 6-9 und Tabelle 6-3 und den Insertionsspezifischen Primer Tag5 und Tag3 (Tabelle 6-3). Die Genotypisierung der Linie sgt5183 erfolgt mithilfe der Oligonukleotidkombination DS5 und At5g38560-91s, At5g38560-1589as und DS5, sowie At5g38560-91s und At5g38560-1589as (Tabelle 6-3).

### 6.2.2.2 RNA-Analyse von *Arabidopsis thaliana*

Um die Genexpression der Linien *pppk10-1* und *pppk10-2* bzw. *pppk6-1*, *pppk6-2* und *pppk6-3* zu analysieren, wurde die Gesamt-RNA aus frischem oder bei -80 °C gelagertem Blattmaterial mittels peqGOLD Trifast™ (Peqlab Biotech GmbH, München, Dt.) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Die Expression der Gene, *psbA*, *psaA*, *16srRNA* und *PPPK10* erfolgte mittels *Northern* Analyse (vgl. Kapitel 6.2.2.2.1). Die Expression der Gene *PPPK6* und *PPPK10* wurde mittels einer reversen Transkription vermittelten *real-time PCR* (vgl. Kap. 6.2.2.2.2) analysiert.



#### 6.2.2.2.1 *Northern Analyse*

Die für die Expressionsanalyse über ein denaturierendes 1,5%iges Agarose-Gel getrennte RNA, wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dt.) transferiert und mittels UV-Licht fixiert. Die Hybridisierung der RNA mit den  $^{32}\text{P}\alpha\text{-dCTP}$  markierten Sonden erfolgte nach Sambrook et al., 1989. Die hierbei verwendeten Sonden wurden aus cDNA (vgl. Kapitel 6.2.2.2.2) mit folgenden Oligonukleotiden amplifiziert: At2g23070-E2-3s, At2g23070-E2-3as, psbA-s, psbA-as, psaA-s, psaA-as. Die Detektion erfolgte mithilfe des *Phospho-Imager* Typhoon Trio (GE Healthcare, München, Dt.).

#### 6.2.2.2.2 *reverse Transkriptase vermittelte real-time PCR*

In Ergänzung zur verwendeten Northern-Analyse, wurde reverse Transkriptase vermittelte real-time PCR (RT-real-time PCR) verwendet. Hierfür wurde nach 6.2.2.2 extrahierte Gesamt-RNA für die Erststrang-cDNA Synthese mittels Superscript™ III (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Dt.) entsprechend Herstellerangaben verwendet. Die daraus entstandene cDNA wurde als Matrize für die anschließende real-time PCR mit iQ™ Sybr® Green Supermix (Bio-Rad Lab. GmbH, München, Dt.) unter Verwendung der Oligonukleotide At2g23070-E2-3s, At2g23070-E2-3as, At1g51170-TR\_s, At1g51170-TR\_as, Act33s und Act974as eingesetzt. Die PCR erfolgte im iCycler mit IQ5-Detektionssystem (Bio-Rad, Lab. GmbH, München, Dt.). Die relative Quantifizierung zur Actin1-Kontrolle erfolgte mit der iQ5-Software (Bio-Rad Lab. GmbH, München, Dt.).

#### 6.2.2.2.3 *Charakterisierung der chloroplastidären und mitochondrialen Genexpression*

Die Genexpression plastomkodierter Gene und von Genen, deren Genprodukte eine Funktion in den Mitochondrien haben, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Kandlbinder (Universität Bielefeld, Dt.) durchgeführt. Hierbei erfolgte die Synthese Dioxigenin-markierter cDNA-Proben aus Gesamt-RNA, gefolgt von der Hybridisierung an einem cDNA-Array, der zum einen alle plastomkodierten, bzw. chondromkodierte sowie redox-regulierte kernkodierte Gene abdeckt (Kandlbinder et al., 2004, Finkemeier et al., 2005). Die Nachhybridisierung, das Waschen, die Signaldetektion und die Quantifizierung der Signalintensität erfolgten, wie bei Finkemeier et al. (2005) beschrieben. Die normalisierten Signalintensitäten der verschiedenen getesteten Bedingungen wurden bezüglich ihrer Signifikanz statistisch gegen die entsprechende Kontrolle mittels T-Tests getestet.

Anschließend wurden die Verhältnisse von untersuchter Bedingung zu entsprechender Kontrolle ermittelt.

#### 6.2.2.2.4 Charakterisierung des *PPPK10*-Transkripts der Linie *pppk10-2*

Die Insertionslinie *pppk10-2* wies reduzierte Mengen vom *PPPK10*-Transkript auf. Die Charakterisierung dieses Transkripts erfolgte durch reverse Transkriptase vermittelte PCR (RT-PCR) mit Oligonukleotiden, die den Insertionslocus überspannen (At2g23070--27s und At2g23070-365as) und mit Oligonukleotiden, die hinter dem Insertionslocus binden (At2g23070-734s und At2g23070-974as) sowie Oligonukleotiden, die spezifisch für die *left border* des Insertionsfragments (LBb1) und des Genes (At2g23070-E2-3as) sind.

#### 6.2.2.3 Komplementation der Linien *pppk10-2* und *pppk10-3*

Für die Komplementation von *pppk10-2* und *pppk10-3* wurden jeweils zwei unabhängige Konstrukte hergestellt. Konstrukt 1: Es wurde die komplette kodierende Sequenz des Gens *PPPK10*, inklusive dem Translationsstop-Codon mittels der Oligonukleotide At2g23070attB1 und At2g23070GWas, in den Pflanzenvektor pLeela (Jacoby et al., 2004) ligiert. Konstrukt 2: Es wurde die kodierende Sequenz des Gens *PPPK10* ohne Translationsstop-Codon mittels der Oligonukleotide At2g23070attB1 und At2g23070GW-STOP-as Gateway-vermittelt in den pGWB5 (Nakagawa, 2002) kloniert. Daraus resultierte ein Konstrukt bestehend aus der kodierenden Sequenz des Gens mit C-terminal fusioniertem GFP. Beide Konstrukte wurden benutzt, um die Blüten homozygoter Pflanzen der Linie *pppk10-2* und heterozygoter Pflanzen der Linie *pppk10-3* zu transformieren. Dabei wurde die *floral dip* Methode (Clough und Bent, 1998) angewandt. Nach 4 Wochen wurden die Samen der transformierten Pflanzen geerntet. Transformaten, die homozygot bezüglich einer Insertion im Gen *PPPK10* waren und das Transformationskonstrukt enthielten, wurden durch PCR mittels der Oligonukleotide At2g23070--291s, At2g23070-871as, At2g23070-1195s und At2g23070-1879as, Tag5, LBgk1, At2g23070-491s, pLeela-2115as sowie pGWB5-7649as identifiziert.

#### 6.2.2.4 Intrazelluläre Lokalisation von RFP-Fusionsprodukten in *Arabidopsis* Protoplasten

Die Aminosäuresequenzen der in Tabelle 7-2 aufgeführten Proteinkinasen wurden hinsichtlich ihrer Transitpeptidlängen, wie in 6.2.1.2 angegeben, analysiert. Die daraus

resultierenden Sequenzlängen der putativen Transitpeptide dienten als Orientierung für das Designen der zu klonierenden Transitpeptide. Die vorhergesagten Transitpeptide wurden um die nachfolgenden 50 Aminosäuren des entsprechenden Proteins verlängert. Anschließend wurden davon Oligonukleotide für die Klonierung abgeleitet. Weiterhin wurde in die für die Klonierung der putativen Transitpeptide abgeleiteten Oligonukleotide je eine NcoI (Fermentas GmbH, St. Loen-Roth, Dt.) Restriktionsschnittstelle für die ungerichtete Klonierung in den Vektor pGJ1425 (Jach et al., 2001) eingearbeitet. Die Klonierungen der putativen Transitsequenzen wurden anschließend durch Sequenzierung hinsichtlich der Sequenz und der Einhaltung des Leserasters mit dem RFP überprüft.

Die Präparation der Arabidopsis Protoplasten erfolgte aus den Kotyledonen zwei Wochen alter, in Sterilkultur aufgezogener, Arabidopsis Pflanzen (Ökotyp: Col G1-1). Hierfür wurden die Kotyledonen abgeschnitten und in Protoplastenlösung 1 (10 mM MES, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 M Mannit, pH 5,8, 0,1 g/ml Mazerozym (Duchefa, Haarlem, Niederlande), 0,1 g/ml Cellulase(Duchefa, Haarlem, Niederlande)) 16 h bei 24 °C inkubiert. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation bei 50xg für 10 min angereichert und in 8 ml Protoplastenlösung 2 (10 mM MES, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 M Mannit, 120 g/l Saccharose, pH 5,8) resuspendiert. Diese Protoplastenlösung wurde mit 2 ml Protoplastenlösung 3 (10 mM MES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 M Mannit, pH 5,8) überschichtet und anschließend bei 70xg für 10 min zentrifugiert. Intakte Protoplasten wurden aus der Interphase gewonnen (Dovzhenko et al., 2003). 40 µg Plasmid-DNA wurde für die PEG vermittelte Transfektion der Protoplasten verwendet (Koop et al., 1996). Die mikroskopische Untersuchung erfolgte nach 16-stündiger Inkubation der Protoplasten in Dunkelheit mittels Fluoreszenz Axio Imager Mikroskop im ApoTome Modus (Zeiss, Göttingen, Dt.). Die Fluoreszenz wurde durch die Fluoreszenzlampe C-Cite Serie 120 angeregt. Mikroskopische Bildaufnahmen wurden durch die Filtersätze #43 HE (Zeiss, Göttingen, Dt.) für die RFP-Fluoreszenz und #9 (Zeiss, Göttingen, Dt.) für die Chlorophyllautofluoreszenz realisiert. Für die Lokalisationsbestimmung des Genproduktes PPPK10 wurden die Mitochondrien durch den Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Green FM (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Dt.) entsprechend Herstellerangaben angefärbt und durch den Filtersatz #38HE (Zeiss, Göttingen, Dt.) visualisiert.

### 6.2.3 Biochemische Methoden

#### 6.2.3.1 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration

Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach Aron et al. (1949).

#### 6.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationen löslicher Proteinextrakte aus *Arabidopsis thaliana* wurden mithilfe des Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Lab. GmbH, München, Dt.) entsprechend Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurde die Absorption bei 595 nm mit dem Tecan Safire II (Tecan GmbH, Crailsheim, Dt.) ermittelt.

#### 6.2.3.3 Präparation intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Die Chloroplasten wurden aus den Blättern 4 – 5 Wochen alter Pflanzen präpariert. Hierzu wurden diese in eiskaltem HB-Puffer (450 mM Sorbit, 20 mM HEPES/KOH, pH 8,4, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem®, EMD, San Diego, USA) filtriert. Die Chloroplasten wurden durch Zentrifugation bei 2000xg für 3 min und 4 °C pelletiert. Diese wurden vorsichtig in RB-Puffer (300 mM Sorbit, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, und 2,5 mM EDTA) resuspendiert und auf ein 50%iges Percollkissen überschichtet und bei 13000xg für 6 min sedimentiert. Das Chloroplastensediment wurde entsprechend Abschnitt 6.2.3.4 weiterverarbeitet.

#### 6.2.3.4 Präparation von Thylakoiden und Stroma aus Chloroplasten

Das Chloroplastensediment wurde in HM-Puffer (10 mM HEPES/KOH, pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Chloroplasten in Stroma (Überstand) und Thylakoide (Sediment) durch Zentrifugation bei 10000xg und 4 °C, für 5 min fraktioniert.

#### 6.2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Proteindetektion

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde entsprechend Laemmli (1970) durchgeführt. Das Trenngel wies abhängig von den zu trennenden Proteinen eine Polyacrylamidkonzentration von 10% oder 12,5% auf. Vor der Trennung wurden die Proteinextrakte in SDS-Ladepuffer (6 M Harnstoff, 50 mM Tris-

HCl (pH 6,8), 100 mM Dithiothreitol (DTT), 2% SDS, 10% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau) für 5 min bei 95 °C inkubiert, anschließend auf Eis abgekühlt und auf das SDS-PA-Gel geladen. Die durch die SDS-PAGE getrennten Proteine wurden entweder durch Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt oder einer Silberfärbung unterzogen (Sambrook et al., 1989).

#### 6.2.3.6 Immunoblot-Analysen

Für die Immunodetektion wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran, (Millipore, Schwalbach, Dt.)) mittels eines *semi-dry blotting apparatus* (Bio-Rad Lab. GmbH, München, Dt.) transferiert (Towbin et al., 1979). Dabei wurde eine Stromstärke von 1,5 mA/m<sup>2</sup> Filter für 1,5 h verwendet.

Die Filter wurden anschließend mit geeigneten Verdünnungen von Antikörpern spezifisch gegen Phosphothreonin (Cell Signaling, Danvers, USA) und LHCA4 (Agrisera, Vännäs, Schweden) nach Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989) inkubiert und Signale mittels Chemolumineszenz (ECL-Kit, GE Healthcare, München, Dt.) visualisiert.

#### 6.2.3.7 2D Blue native/SDS PAGE für die Analyse von Thylakoidproteinen

Das Blattmaterial von 4-5 Wochen alten Pflanzen wurde aufgearbeitet, wie in 6.2.3.3 und 6.2.3.4 beschrieben. Für die erste Dimension wurden Thylakoide, entsprechend 22-25 µg Chlorophyll von jedem Genotyp mit 50 mM BIS-TRIS (pH 7,0), 1 M ε-Aminocapronsäure, 5 mM EDTA, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1 mM DTT und 0,6% (w/v) Digitonin für 60 min bei 4 °C solubilisiert. Nicht-solubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation bei 16000xg, 4 °C für 70 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 5%igem (w/v) Coomassie G-250 in 0,5 M ε-Aminocapronsäure versetzt. Die derart vorbereiteten Proben wurden auf eine 5 - 13,5%ige Blue-Native-PAGE (BN-PAGE) (enthielt: 5 - 13,5% Acrylamid, 0,5 M ε-Aminocapronsäure, 0,3% Digitonin) aufgetragen. Die Trennung der Proteinkomplexe mittels BN-PAGE erfolgte bei 200 V mittels dem Kathoden-Puffer (50 mM Tricin, 15 mM BIS-Tris, 0,02% Coomassie G-250) und dem Anodenpuffer (50 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0) wie von Schägger und von Jagow (1991) beschrieben.

Für die Auftrennung der Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurden die Gelstreifen der BN-PAGE zunächst in 50 mM Tris, 192 mM Glyzin, 1% (w/v) SDS, 14 mM 2-Mercaptoethanol) für 5 min bei 40 °C denaturiert. Die Gelstreifen wurden auf einer

12,5%igen SDS-PAGE positioniert. Alle weiteren Schritte wurden in Abschnitt 6.2.3.5 beschrieben.

#### 6.2.3.8 Phosphoproteinanreicherung der Stroma-Fractionen

Die Präparation des Stromas der Genotypen *pppk10-2* und Col-0 nach Dunkel-Adaption, Adaption an 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2,5 h bzw. an 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2 h erfolgte wie in Abschnitt 6.2.3.4 beschrieben. Hierfür wurden für jede Bedingung und Genotyp ein Volumen, entsprechend 500  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt. Anschließend wurde unter Verwendung der Zentrifugationsfilter Centrisart® I (Satorius AG, Göttingen, Dt.) die Stromafraktion umgepuffert, um schließlich in 1 ml Lyse-/Loading-/Wash-Buffer (Bestandteil des Pierce® Phosphoprotein Enrichment Kit) und Phosphatase Inhibitor Cocktail I und II (1:1000 Verdünnung, Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Dt.) gelöst zu sein. Die Anreicherungsschritte für Phosphoproteine wurden entsprechend Herstellerangaben (Pierce® Phosphoprotein Enrichment Kit, Rockford, USA) durchgeführt. Nach dem Eluieren der Phosphoproteine, wurden diese einer TCA-Fällung nach Standardprotokoll unterzogen und in 70  $\mu\text{l}$  SDS-Ladepuffer gelöst. Die Trennung der Phosphoproteine erfolgte, wie in Abschnitt 6.2.3.5 beschrieben.

### 6.2.4 Fluoreszenz- und Absorptionsanalysen von *Arabidopsis thaliana*

#### 6.2.4.1 Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen erfolgten *in vivo* an einzelnen Blättern, 3-4 Wochen alter Pflanzen unter Verwendung des Puls-Amplituden-Fluorometers PAM101/103 (Walz, Effeltrich, Dt.) nach Schreiber et al. (1986) und Varotto et al. (2000). Sättigende Lichtpulse von 800ms Dauer und einer Intensität von 4500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  wurden zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz im Dunkel-adaptiertem Zustand und nach Belichtung ( $F_m'$ ) genutzt. Eine Belichtung der Pflanzen mit aktinischem Licht einer Lichtintensität von 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  sorgte für einen Elektronenfluss zwischen Photosystem II und Photosystem I. Anschließend wurden die Licht-adaptierten Parameter  $\Phi_{\text{psII}}$ , qP, qN und NPQ entsprechend der Formeln in Tabelle 6-11 ermittelt.

War aufgrund der experimentellen Bedingungen keine Bestimmung des  $F'_0$  möglich, so wurde  $F'_0$  mittels der Formel

$$F_0' = \frac{F_0}{\frac{F_M - F_0}{F_M} + \frac{F_0}{F_M'}} \text{ berechnet (Oxborough und Baker, 1997, Steffen, 2003).}$$

Tabelle 6-11: Parameter der Chlorophyllfluoreszenz, die mittels der Puls-Amplituden-Methode bestimmt wurden. Hierbei steht  $F_M$  für die maximale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand,  $F_M'$  für die maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand,  $F_0$  für die Dunkelfluoreszenz,  $F_0'$  für die minimale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand und  $F$  (auch als  $F_S$  oder  $F_t$ ) für die Chlorophyllfluoreszenz im Gleichgewichtszustand.

Bezeichnung des Parameters	Abkürzung	Berechnungsgrundlage
Potentielle Quantenausbeute des Photosystem II	$F_V/F_M$	$\frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M}$
Effektive Quantenausbeute des Photosystem II	$\Phi_{PSII}$	$\Phi_{PSII} = \frac{F_M' - F}{F_M'}$
Photochemische Chlorophyllfluoreszenzlöschung	qP	$qP = \frac{F_M' - F}{F_M' - F_0'}$
Nicht-photochemische Chlorophyllfluoreszenzlöschung	qN	$qN = 1 - \frac{F_M' - F_0'}{F_M' - F_0'}$
Nicht-photochemische Chlorophyllfluoreszenzlöschung	NPQ	$NPQ = \frac{F_M - F_M'}{F_M'}$

#### 6.2.4.2 Messungen des Redoxstatus der Reaktionszentren von Photosystem I

Redox-Änderungen des  $P_{700}$  im Photosystem I wurden durch die Absorptionsänderung bei 810 nm und 860 nm mit der PAM 101/103 Chlorophyllfluorometer (Walz, Effeltrich, Dt.) gemessen. Dieses wurde im Gegensatz zu den Chlorophyllfluoreszenzmessungen mit der Emitter-Detektor-Einheit ED-P700DW verbunden (Schreiber et al., 1988). Die Menge an oxidiertem  $P_{700}$  ( $\Delta A$ ) wurde *in vivo* an einzelnen Blättern bei einer Lichtintensität von  $70 \mu E/m^2s$  ermittelt. Der maximale Pool an oxidierbarem  $P_{700}$  ( $\Delta A_{max}$ ) wurde während der Beleuchtung des Blattmaterials mit dunkelrotem Licht (720 nm,  $50 \mu E/m^2s$ ) ermittelt. Anschließend wurde der Oxidationszustand von  $P_{700}$  berechnet nach  $\Delta A/\Delta A_{max}$ .

### 6.2.5 Anpassung an Photosystem II- bzw. Photosystem I-spezifisches Licht

Die Untersuchung der Anpassungsfähigkeit der Pflanzen an Lichtbedingungen, die spezifisch Photosystem I oder II anregen, erfolgte entsprechend Fey et al. (2005). Hierfür wurden die zu untersuchenden Genotypen als Sterilkultur auf MS-Medium mit 1,5% Saccharose für 17 Tage bei Weißlicht mit einer Lichtintensität von  $35 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  herangezogen. Anschließend wurden die Pflanzen 6 Tage an Licht, spezifisch für Photosystem I (PSI-Licht) oder Photosystem II (PSII-Licht) adaptiert. Oder die Pflanzen wurden 2 Tage an PSI- oder PSII-Licht adaptiert und anschließend für 4 Tage mit Licht der entsprechend anderen Lichtquelle bestrahlt. Das PSII-Licht wurde durch die Verwendung einer Farbfolie 105-orange (LeeFilters, Hampshire, UK) in Verbindung mit der Weißlichtquelle genutzt. Das PSI-Licht wurde durch Verwendung von LED-Elementen mit einer Emissionswellenlänge von 730nm erhalten.

Die Weißlicht-Kontrollpflanzen verblieben die gesamte Wachstumsphase bis zum Zeitpunkt der Chlorophyllfluoreszenzmessungen im Weißlicht.

Anschließend wurde die Chlorophyllfluoreszenz der an die verschiedenen Lichtqualitäten akkumulierten Pflanzen *in vivo* anhand des Video-Bild-Systems FluorCam 690M (Photon Systems Instruments, Brno, Tschechische Republik) untersucht. Nach 15 Minuten Dunkeladaption wurde die maximale Chlorophyllfluoreszenz  $F_M$  durch einen Lichtblitz von 1600 ms ermittelt. Anschließend wurden die Pflanzen mit aktinischem Licht mit einer Lichtintensität von  $90 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 10 Minuten belichtet um die Chlorophyllfluoreszenz im Gleichgewichtszustand (F) zu ermitteln. Die Anpassung an die untersuchten Lichtqualitäten kann durch den Wert  $F_s/F_M$  charakterisiert werden. Hierbei ist  $F_s = F - F'_o$ . (Pfannschmidt et al., 2001). Aus technischen Gründen kann mit dem verwendeten System kein  $F'_o$  aufgezeichnet werden, so dass die Berechnung von  $F_s/F_M$  nach der Formel

$$\frac{F_s}{F_M} = \frac{F - F_0}{F_M} \text{ erfolgte.}$$

### 6.2.6 *In vitro* Import von Proteinen in Mitochondrien und Chloroplasten aus Erbse (*Pisum sativum*)

Die *in vitro* Importexperimente wurde in Zusammenarbeit mit Anja Rödiger, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg nach Krause et al. (2005) durchgeführt.



### **6.2.7 Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie**

Die Identifizierung von Proteinen, die zunächst mittels denaturierender PAGE getrennt wurden, erfolgte durch die Serviceabteilung Massenspektrometrie des Department I, Botanik.

## 7. Ergebnisse

### 7.1 Vorhersage plastidärer Proteinkinasen in *Arabidopsis thaliana*

Der Chloroplast von *Arabidopsis thaliana* enthält zwischen 2500 und 3600 verschiedene Proteine (Leister, 2003, Richly und Leister, 2004). Die Mehrheit dieser plastidären Proteine ist im Zellkern kodiert, wird im Cytosol als Vorläuferproteine translatiert und posttranslational in die Chloroplasten importiert. Die meisten dieser plastidären, kernkodierten Proteine werden mit einer N-terminalen Präsequenz, auch Transitsequenz oder Transitpeptid genannt, synthetisiert. Diese Transitsequenz ist notwendig für das korrekte Dirigieren zum Organell, als auch zur Initiierung der Translokation (Soll und Schleiff, 2004).

Eine Vielzahl der chloroplastidären Proteine werden durch reversible Phosphorylierung modifiziert (Bennett, 1991). Darunter befinden sich Proteine, die in der Photosynthese (Bonardi et al., 2005; Vener et al., 1998; Tikkanen et al., 2008; Vainonen et al., 2008; Vener et al., 2007), dem Stärkemetabolismus (Tetlow et al., 2004) und der Transkription (Baginsky et al., 1997; Kleffmann et al., 2007) involviert sind. Jedoch wurden in *Arabidopsis thaliana* nur wenige plastidär lokalisierte Proteinkinasen funktionell beschrieben. So waren bis zum Beginn (Januar 2005) der Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation lediglich sieben als chloroplastidär lokalisierte Proteinkinasen in Blütenpflanzen beschrieben: die Thylakoid-assoziierten Proteinkinasen TAK1, 2 und 3 (Snyders und Kohorn, 1999, 2001), die redox-sensitive Proteinkinase cpPK2 $\alpha$  (Ogrzewalla et al., 2002), ein Proteinkinase-ähnliches Protein (Kleffmann et al., 2004), eine putative Proteinkinase (Froehlich et al., 2003), sowie die Proteinkinase TOUSLED-like (Kleffmann et al., 2004). Für keine der aufgeführten Proteinkinasen war die Lokalisation *in vivo* in den Chloroplasten bestätigt. Im Laufe der Arbeiten an diesem Thema, kamen weitere in den Chloroplasten lokalisierte Proteinkinasen hinzu, die in Abschnitt 5.6.2.1 zusammengestellt sind. Um den Kenntnisstand chloroplastidärer Proteinkinasen zu erweitern, wurden Proteinkinasen, die in der PlantsP-Datenbank (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>) zusammengestellt waren, bezüglich ihrer Lokalisation in den Chloroplasten zunächst *in silico* analysiert. Hierbei führte die Kombination von verschiedenen Vorhersagealgorithmen zu einer höheren Exaktheit in der

Vorhersage der subzellulären Lokalisation auf Kosten der Sensitivität (Richly und Leister, 2004). Entsprechend wurde für die bioinformatische Vorhersage der subzellulären Lokalisation der 970 Proteinkinasen aus *Arabidopsis thaliana* zunächst eine Kombination aus vier Vorhersagealgorithmen (iPSORT (Bannai et al., 2002), PCLR (Schein et al., 2001), Predotar (Small et al., 2004) und TargetP (Emanuelsson et al., 2000) verwendet. Die Proteinkinasen, die durch alle vier Vorhersagealgorithmen mit einer chloroplastendrigierenden Präsequenz vorhergesagt wurden, wurden durch *in vivo* Lokalisationsstudien bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation analysiert und sind daher in Tabelle 7-2 zusammengestellt.

Die Vorhersagen der chloroplastidären Transitpeptide wurden, aufgrund von Aktualisierungen der TAIR-Datenbank ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), im Laufe der Arbeit wiederholt und die Anzahl der einbezogenen Vorhersagealgorithmen stetig erhöht, bis schließlich neun unterschiedliche Algorithmen Verwendung fanden (Tabelle 6-10). Die Kombination dieser neun Algorithmen, angewendet auf die 970 Proteinkinasen der PlantsP-Datenbank, sind in der Tabelle 7-1 dargestellt. Bei dieser Analyse wurde deutlich, dass die Proteinkinasen STN7 (Bellafiore et al., 2005 Bonardi et al., 2005), STN8 (Bonardi et al., 2005) und  $\alpha$ cp (Salinas et al., 2006), die *in vivo* in den Chloroplasten nachgewiesen werden konnten, von mindestens sechs von neun Vorhersagealgorithmen mit einer plastidendrigierende Präsequenz vorhergesagt wurden. Von den 970 Proteinkinasen, die im Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert werden, konnten 45 Proteinkinasen identifiziert werden, die mindestens durch eben solche sechs von neun Algorithmen eine vorhergesagte, plastidendrigierende Präsequenz aufweisen (Tabelle 7-1). Unter diesen 45 Proteinkinasen ist die Klasse der nicht-transmembranen Proteinkinasen mit 51% deutlich überrepräsentiert, verglichen mit den übrigen Klassen der Proteinkinasen (Abbildung 7-1). Dies ist interessant, da die nicht-transmembranen Proteinkinasen lediglich 29% an der Gesamtheit aller Kinasen einnehmen (vgl. Abbildung 5-3). Weder aus der Klasse der Casein Kinase I, noch aus der Klasse der anderen Kinasen konnte nach dem Kriterium der sechs von neun Vorhersagealgorithmen eine Kinase mit chloroplastendrigierender Transitsequenz ermittelt werden.

Tabelle 7-1: Anzahl der als chloroplastenlokalisiert vorhergesagten Proteinkinasen aus *Arabidopsis thaliana* entsprechend ihrer Proteinkinasenklassen bei Verwendung einer Kombination aus n von 9 Vorhersagealgorithmen (wobei  $1 \leq n \leq 9$ ). Die Einteilung der Proteinkinasen erfolgte entsprechend der PlantsP-Datenbank (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>).

Klasse	Bezeichnung der Klasse nach PlantsP-Datenbank	Anzahl der Kinasen im Genom	Anzahl der plastidär vorhergesagten Proteinkinasen bei Verwendung von n von 9 Vorhersagealgorithmen								
			1/9	2/9	3/9	4/9	5/9	6/9	7/9	8/9	9/9
1	Transmembrane (TM) Rezeptorkinasen und verwandte nicht-TM Rezeptorkinasen	558	263	104	58	35	26	15	12	6	4
2	ATN1/CTR1/EDR1/GmPK6-Verwandte Proteinkinasen	52	28	12	5	4	4	1	0	0	0
3	Casein Kinase I	16	5	2	1	0	0	0	0	0	0
4	Nicht-transmembrane Kinasen	278	159	82	62	45	36	23	11	4	1
5	Andere	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
-	Bislang nicht klassifizierte Proteinkinasen	62	34	22	15	11	6	6	5	5	2
Total		970	491	222	141	95	72	45	28	15	7

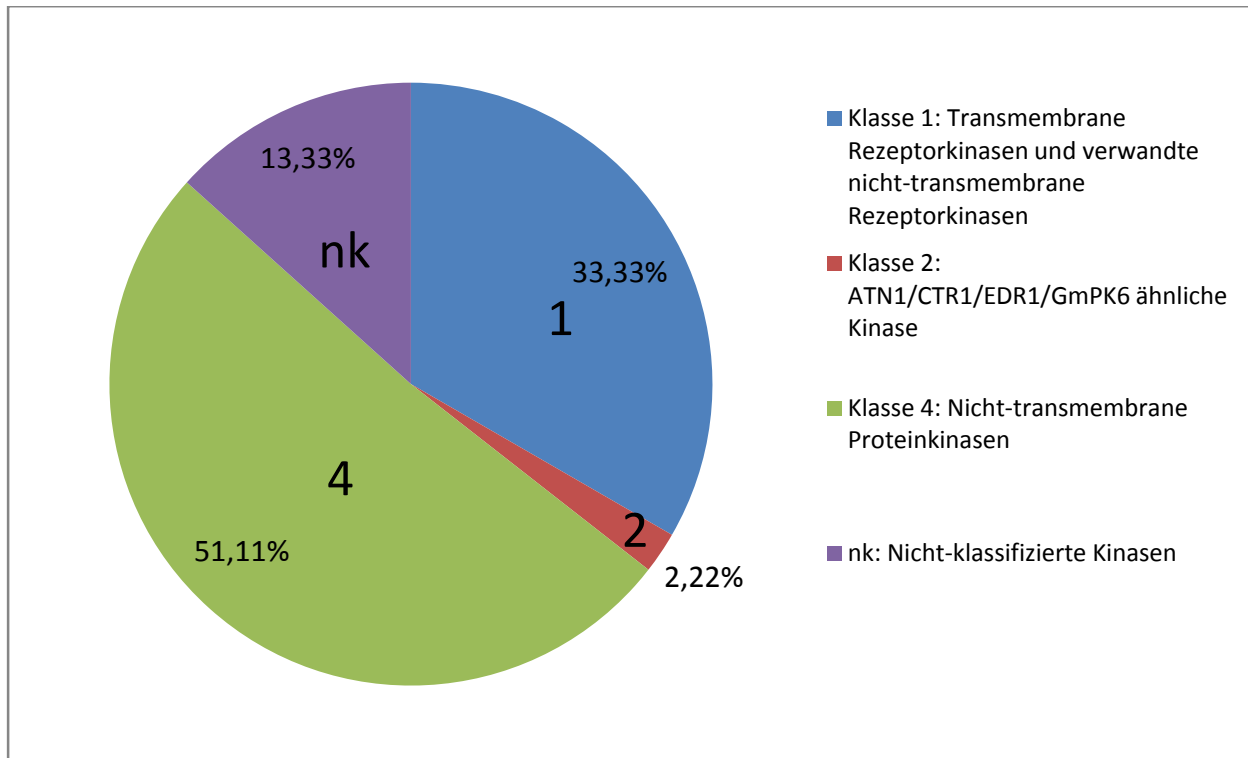


Abbildung 7-1: Prozentuale Verteilung der Proteinkinasen-Klassen an der Gesamtheit der zellulären Kinasen, die von sechs von neun Vorhersagealgorithmen eine vorhergesagte plastidendirektierende Transitsequenz aufweisen. Es wurden keine Vertreter der Proteinkinasen-Klassen 3 und 5 festgestellt, die durch sechs von neun Vorhersagealgorithmen den Chloroplasten zugeordnet wurden.

## 7.2 Lediglich 3 von 12 Proteinkinasen konnten in Chloroplasten nachgewiesen werden

Die Identifizierung von Transitsequenzen anhand von *in silico* Analysen weist eine Spezifität von 0,3 bis 0,45 auf. Selbst durch die Kombination verschiedener Vorhersagealgorithmen kann die Spezifität auf lediglich 0,76 - allerdings auf Kosten der Sensitivität - gesteigert werden (Richly und Leister, 2004). Daher wurde die subzelluläre Lokalisation von 12 der 14 Proteinkinasen, für die von den vier Algorithmen ein chloroplastendirektierendes Transitpeptid vorhergesagt wurde, experimentell *in vivo* überprüft (Tabelle 7-2). Die beiden weiteren Proteinkinasen STN7 und STN8 wurden bereits durch Bonardi et al. (2005) in den Chloroplasten lokalisiert. Hierfür wurden die N-terminalen Bereiche, die die potentiellen Transitsequenzen enthielten, an das rot-fluoreszierende Protein (RFP) fusioniert und anschließend in Arabidopsis Protoplasten transfiziert. Fluoreszenzmikroskopische Verfahren ermöglichten den Vergleich der Positionen der Autofluoreszenz des Chlorophylls, die die Chloroplasten markierten, und der Position der RFP-Fluoreszenz.

Tabelle 7-2: *In vivo* Lokalisation von RFP-Fusionsproteinen in Arabidopsis Protoplasten; cTP: chloroplasten-orientierende Transitsequenz; Proteinkinasen, die in den Chloroplasten der Protoplasten gefunden wurden, wurden in Fettschrift annotiert. Die Proteinkinasen wurden als putative chloroplastidäre Proteinkinasen (PPPK) bezeichnet. \* Aminosäuresequenz wurde aus der MIPS Datenbank entnommen; \*\* Bezeichnung als  $\alpha$ cp nach Salinas et al. (2006)

Bezeichnung der Proteinkinase	Arabidopsis Genome Identifizier	Klasse der Protein- kinase	Verhältnis der Vorhersage	Lokalisation anhand der RFP-Fusion
PPPK1	At2g17220	1	9/9	nicht Chloroplasten, nicht Mitochondrien
<b>PPPK6</b>	<b>At1g51170</b>	4	8/9	Chloroplasten
PPPK8	At2g31500	4	8/9	Mitochondrien (nicht verifiziert)
<b>PPPK10</b> ( $\alpha$ cp**)	<b>At2g23070</b>	4	7/9	Chloroplasten und Mitochondrien
PPPK12	At3g24550	1	7/9	Cytosol und peripher
PPPK5	At3g27580	4	7/9	nicht Chloroplasten, nicht Mitochondrien
PPPK11	At5g38560	1	7/9	Cytosol + peripher
PPPK2	At1g68690	1	7/9	Cytosol
<b>PPPK9</b>	<b>At2g34180</b>	4	6/9	Chloroplasten
PPPK7	At4g36950	4	6/9	nicht Chloroplasten, nicht Mitochondrien
PPPK4	At4g32710*	1	5/9	Cytosol
PPPK3	At3g24400	1	5/9	Cytosol und andere Struktur

Eine Überlagerung des Fluoreszenzsignals des Chlorophylls mit dem des RFPs zeigte eine chloroplastidäre Lokalisation der Proteinkinasen an (Abbildung 7-2).

Anhand der Fluoreszenzmikroskopie von transfizierten *Arabidopsis* Protoplasten konnten drei der 12 putativ plastidenlokalisierten Proteinkinasen tatsächlich im Chloroplasten nachgewiesen werden (Abbildung 7-2). Für die Proteinkinase PPPK10 ( $\alpha$ cp in Salinas et al., 2006) konnte die plastidäre Lokalisation entsprechend Salinas et al. (2006) bestätigt werden. Für diese Proteinkinase wurde aber auch eine mitochondriale Lokalisation gefunden (siehe Abschnitt 7.5). Weiterhin wurden die Proteinkinasen PPPK6 und PPPK9 in den Chloroplasten der *Arabidopsis* Protoplasten lokalisiert. Der Abgleich der Ergebnisse der einzelnen Vorhersagealgorithmen mit der experimentellen subzellulären Lokalisation ergab, dass für alle Proteinkinasen, die in den Chloroplasten bestätigt werden konnten, durch fünf gleiche Algorithmen ein chloroplastendrigierendes Transitpeptid vorhergesagt bekamen. Allerdings wurden auch für sechs der nicht in den Chloroplasten bestätigten Proteinkinasen durch diese fünf Algorithmen ein chloroplastendrigierendes Transitpeptid vorhergesagt (vgl. Abbildung 7-2, Tabelle 7-2 und Tabelle A-1). Dies kann ein Hinweis auf eine geringe Spezifität dieser Algorithmen bezüglich chloroplastidärer Proteinkinasen sein. Bemerkenswert ist, dass AAIndexLOC (Tantoso und Li, 2008) zwei plastidäre Proteine korrekt vorhergesagt. Lediglich zwei der neun Proteinkinasen, die nicht in den Chloroplasten bestätigt werden konnten, wurden durch diesen Algorithmus als ein Protein mit einem plastidendrigierenden Transitpeptid vorhergesagt. Die übrigen Algorithmen brachten mehr falsch positive Vorhersagen hervor oder erkannten nur von einer der drei chloroplastidären Proteinkinasen die Transitsequenz (Tabelle A-1). Dennoch kann aufgrund der geringen Anzahl an Proteinkinasen, die im experimentell im Chloroplasten bestätigt werden konnte, keine endgültige Aussage getroffen werden, welcher Algorithmus allein am besten geeignet ist, um chloroplastendrigierende Transitpeptide vorauszusagen.

Alle drei Proteinkinasen, deren Lokalisation in den Chloroplasten verifiziert werden konnte, enthalten eine katalytische Serin/Threonin Proteinkinase-Domäne (cd00180, Marchler-Bauer und Bryant, 2004). Weiterhin ließ sich in der Sequenz von PPPK9 eine weitere konservierte Domäne detektieren. Diese NAF Domäne (pfam03822, Marchler-Bauer und Bryant, 2004) ist eine Protein-Protein-Bindedomäne, die nur in der Gruppe der Calcium-abhängigen CIPKs (*CBL-interacting protein kinases*) zu finden ist.

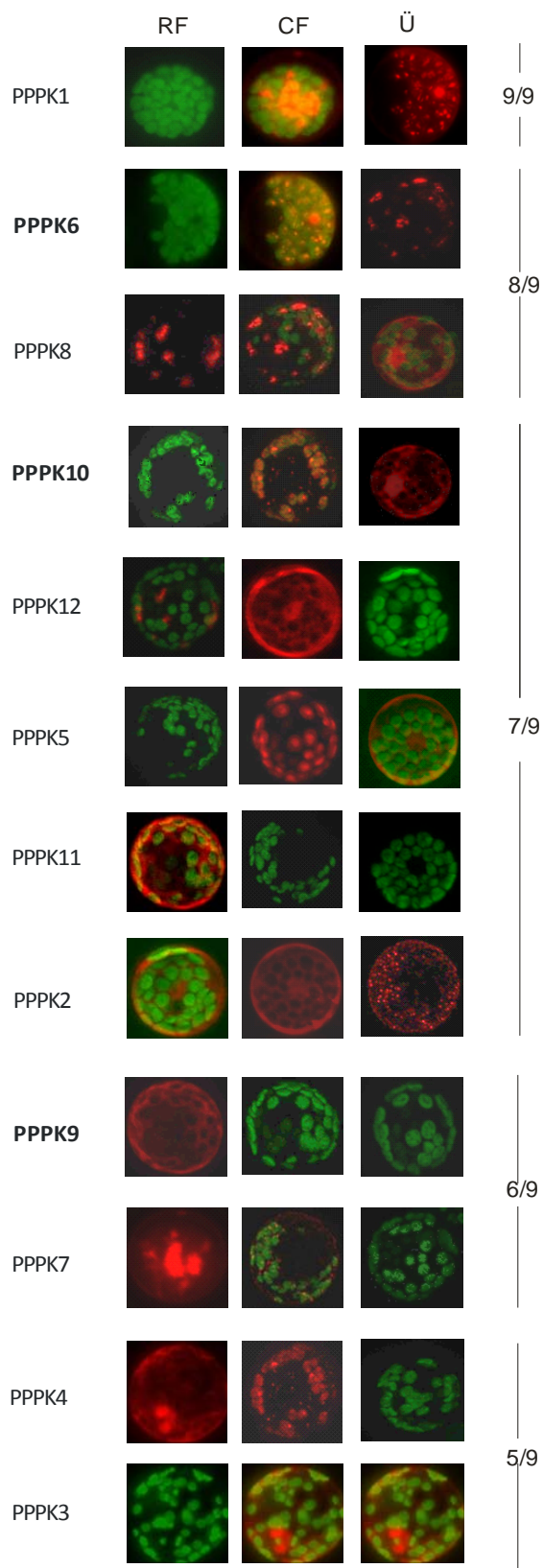


Abbildung 7-2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Arabidopsis Protoplasten, transfiziert mit N-terminalen Fusionen der vorhergesagten Transitpeptide der entsprechenden Proteinkinase an RFP. Es werden Falschfarbenbilder dargestellt, wobei die RFP-Fluoreszenz (RF) in rot und die Chlorophyllautofluoreszenz (CF) in grün gezeigt wird. Für eine exaktere Positionsbestimmung des RFP-Fluoreszenzsignales wurden die RF und CF überlagert (Ü). Weiterhin ist das Verhältnis der plastidenlokalisierten Vorhersagen für die entsprechende Proteinkinase rechts der mikroskopischen Aufnahmen dargestellt.



Sie vermittelt die Bindung zwischen der Proteinkinase und den CBL (*calcineurin B-like proteins*) (Albrecht et al., 2001). Die Ergebnisse des Lokalisationsexperiments für diese Proteinkinase schlagen eine Lokalisation in der Peripherie des Chloroplasten vor (vgl. Abbildung 7-2). Chigri et al. (2005, 2006) beschrieben, dass der Import kernkodierter Proteine in den Chloroplasten durch Calcium reguliert werden kann. Aufgrund der charakteristischen NAF-Domäne und der peripheren Lokalisation von PPPK9 könnte in nachfolgenden Experimenten eine Beteiligung dieser Kinase an den Calcium-regulierten Importprozessen untersucht werden.

Interessant bleibt weiterhin festzustellen, dass die drei in den Chloroplasten lokalisierten Proteinkinasen PPPK6, PPPK10 ( $\alpha$ cp, Salinas et al., 2006) und PPPK9 zu der Proteinkinasenklasse der „nicht-transmembranen Proteinkinasen“ (Klasse 4) gehören. Somit konnten neben der  $\alpha$ cp (Salinas et al., 2006) und TOUSLED (At3g44610, Kleffmann et al., 2004) zwei weitere Proteinkinasen dieser Familie dem Chloroplastenproteom zugeordnet werden. Keine der sechs untersuchten Proteinkinasen, die der Familie der transmembranen Rezeptorproteinkinasen und verwandter nicht-transmembraner Rezeptorproteinkinasen angehörte, konnte in den Chloroplasten nachgewiesen werden.

### **7.3 Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana* Insertionsmutantenlinien**

Parallel zu den Klonierungsarbeiten für die Lokalisationsstudien, wurden Genotypisierungen für Insertionslinien aller 12 putativen chloroplastidären Proteinkinasen durchgeführt. Für alle putativen chloroplastidären Proteinkinasen konnten mittels der *Insertion flanking* Datenbank (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) sowie der Gabi-Kat Datenbank (<http://www.gabi-kat.de/>) potentielle T-DNA Insertionslinien identifiziert werden. Diese wurden bezüglich der genspezifischen Insertion mittels PCR untersucht. Insgesamt wurden 24 Insertionsmutanten untersucht. Hierbei wurde für 11 putative chloroplastidäre Proteinkinasen mindestens eine Insertionslinie identifiziert und eine homozygote Linie bezüglich einer Insertion im untersuchten Gen isoliert. Soweit nicht nachfolgend anders angegeben, unterschieden sich diese Insertionslinien weder im Wuchs, noch in ihrem Habitus oder - soweit untersucht – in der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II vom korrespondierenden Wildtyp. Von einer weiteren Charakterisierung der Insertionsmutanten der Gene *PPPK1*, *PPPK2*, *PPPK3*, *PPPK4*, *PPPK5*, *PPPK7*, *PPPK8*, *PPPK11* und *PPPK12* wurde abgesehen, da deren Fusionskonstrukte keine Hinweise auf eine

chloroplastidäre Lokalisation erbrachten. Auf die Charakterisierung der Insertionslinien, die eine potentielle Insertion in den Genen der chloroplastidären Proteinkinasen (*PPPK6*, *PPPK9*, *PPPK10*) aufwiesen, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Im Rahmen der Genotypisierung der Insertionsmutanten konnten drei Linien identifiziert werden, die T-DNA Insertionen im transkribierten Bereich des Gens *PPPK6* aufwiesen. Die Linie *pppk6-3* (SALK\_084711) enthielt eine T-DNA Insertion im 5'-nichttranslatierten Bereich. Die Linien *pppk6-1* (SALK\_044862) und *pppk6-2* (SALK\_143744) enthielten die T-DNA Insertionen im Exon 1 (Abbildung 7-3). Alle drei Mutantenlinien wuchsen photoautotroph.

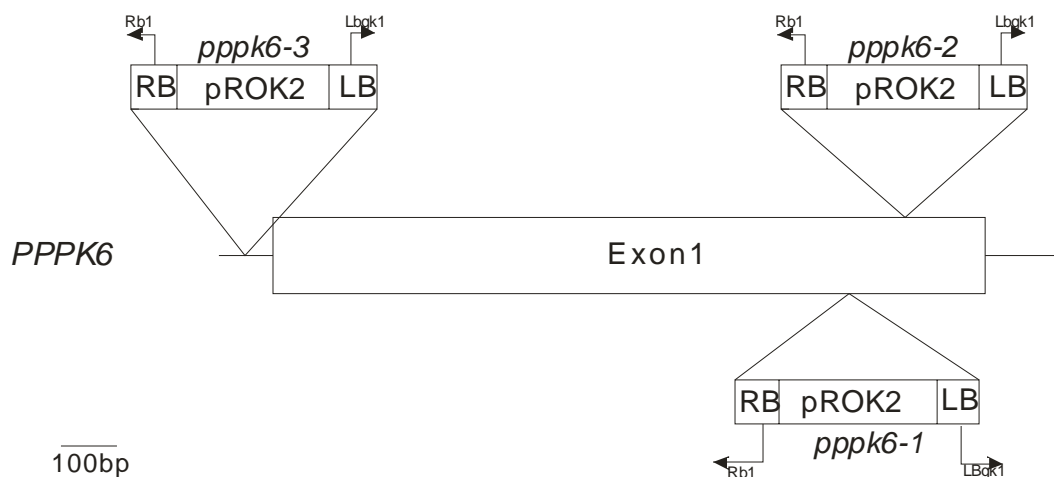


Abbildung 7-3: Schema der T-DNA Insertionen der Linien *pppk6-1*, *pppk6-2* und *pppk6-3* im Gen *PPPK6*.

Ein Effekt der Mutationen auf die Keimung konnte nicht beobachtet werden und die visuelle Analyse der wachsenden Pflanzen erbrachte keine Änderungen des Phänotyps, verglichen mit dem Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Eine detailliertere Charakterisierung der Insertionsmutanten ist in Abschnitt 7.19 zu finden.

Die zwei T-DNA Insertionslinien *pppk9-1* (SALK\_124748) und *pppk9-2* (SALK\_124753) wurden bezüglich einer Insertion in dem Gen *PPPK9* analysiert. Für keine der beiden Insertionslinien konnte eine Insertion im Gen *PPPK9* bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Hingegen konnten für das Gen *PPPK10* drei unabhängige Insertionen in drei verschiedene Insertionslinien verifiziert werden. Die Linie *pppk10-1* (150A04) wies eine T-DNA Insertion im 5'-nichttranslatierten Bereich des Gens *PPPK10* auf.

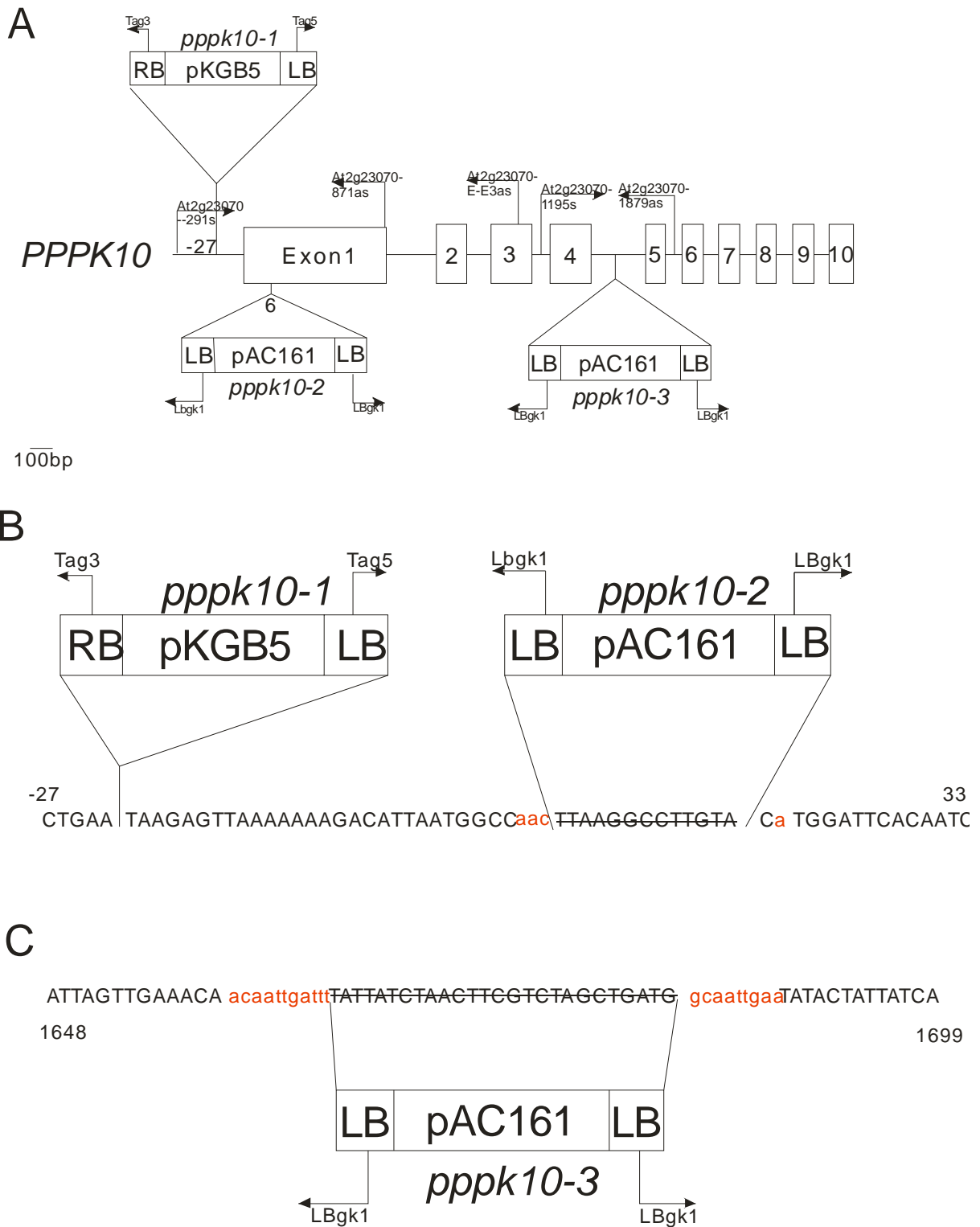


Abbildung 7-4: A) Schema der T-DNA Insertionen der Insertionsmutantenlinien des Gens *PPPK10* samt der Bindungsstellen der für die Genotypisierung verwendeten Oligonukleotide. B) Vergrößerte Darstellung der Insertionsloci der Linien *pppk10-1* und *pppk10-2*. C) Vergrößerte Darstellung des Insertionslocus der Linie *pppk10-3*. In Rot dargestellte Nukleotide resultierten durch die Insertionsereignisse. Nukleotide, die durchgestrichen sind, sind infolge der Insertionsereignisse verloren gegangen. Die Zahlen geben die Position des Nukleotids, relativ zum Translationsstartkodons an.

Die Linie *pppk10-2* (615F11) enthielt eine T-DNA Insertion im ersten Exon und die Linie *pppk10-3* (400A04) enthielt eine Insertion im vierten Intron (Abbildung 7-4). Im Gegensatz zu Gen *PPPK6* führten die Insertionsmutationen im Gen *PPPK10* zu einer starken Beeinträchtigung der entsprechenden Mutantenlinien. Somit sollten im Folgenden diese Linien näher untersucht werden.

#### **7.4 PPPK10 gehört zur Familie der Casein Kinasen II $\alpha$ und hat 3 Homologe in *Arabidopsis thaliana***

In Übereinstimmung mit der Literatur ergaben Sequenzvergleiche mit dem Genprodukt PPPK10, dass im Genom von *Arabidopsis thaliana* insgesamt vier homologe Proteinkinasen kodiert sind. Proteinsequenzvergleiche zeigten dabei sehr deutlich, dass der N-Terminus der Proteine, im Gegensatz zu dem stark konservierten übrigen Teil der Sequenz, variiert. Weiterhin bekannt ist, dass Proteinkinasen dieser Gruppe hoch konserviert in allen eukaryotischen Organismen sind (vgl. Abbildung 7-5, Salinas et al., 2006). Casein Kinasen II wurden zunächst als spezifisch für die reversible Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten vorgeschlagen. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass auch Tyrosin-Reste durch Proteinkinasen dieses Typs phosphoryliert werden können. Von den Casein Kinasen II wurde angenommen, dass diese unabhängig von sekundären Botenstoffen agieren. Lediglich eine Änderung in der Aktivität infolge von Phosphorylierung wurde vorgeschlagen (Litchfield, 2003). Das Holoenzym der Casein Kinasen II ist als Tetramer organisiert und besteht aus zwei katalysischen ( $\alpha$ ) Untereinheiten und zwei regulatorischen ( $\beta$ ) Untereinheiten. Der am Aufbau des Holoenzym beteiligten Untereinheiten kann variieren, wodurch eine unterschiedliche Substratspezifität vermittelt werden soll. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Untereinheiten auch unabhängig voneinander fungieren. Diese Beobachtung ist besonders in Hinblick auf die chloroplastidäre Casein Kinase II  $\alpha_{cp}$  (Salinas et al., 2006) (in dieser Arbeit: PPPK10) von besonderer Relevanz, da bislang keine der regulatorischen ( $\beta$ ) Untereinheiten in den Chloroplasten lokalisiert werden konnte (Salinas et al., 2006, Litchfield, 2003).

$\alpha$ B_At	1	MHLIF--FFSYFLR-----RYLLLLCAILLRPLAHSLLPPLTCVN-TGTVES-----
$\alpha$ A_At	1	MIDTL--FFLFFLFDFSPLRRLLLLCAVLLALRAETAHSPILRSSIVTPTARAVS-----
$\alpha$ C_At	1	-----
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	1	MALRPCTGFTISSLRNASAAANNLFSLLSFSSSSPAKRNLLSSQLQDNLRRFASASLYR
cpck2a_Sa	1	MAFRP-IGYTISSLRKASAANDLRFSSFLSYSSFPAKNLLLS----F'LR'CFSS---LHR
CK2_Hs	1	-----
$\alpha$ B_At	47	-----DVTGIRFDRCLDTDSLAKIS---LSTVMSKARVYTDVNVIRPKDYWDYE
$\alpha$ A_At	53	-----EVSGC---TTIDPDFLVEISDSNQTRAMSKARVYTEVNVIRPKDYWDYE
$\alpha$ C_At	1	-----MSKARVYTDVNVIRPKDYWDYE
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	61	QHLLRNQQQQHQQQQSRVKEKSEITLAQKIGKSIRRAGAPSKARVYADVNVIRPKDYWDYE
cpck2a_Sa	53	R-----QQQQRVNV-KSEITLAQKIGKSIRRAGAPSKARVYADVNVIRPKDYWDYE
CK2_Hs	1	-----MSCPVPSSKARVYTDVNVIRPREYWDYE
$\alpha$ B_At	93	SLNVQWCEQDDYEVVRKVGKGYSEVFEGINMNNNEKCTIKILKPVKKKIKREIKILQN
$\alpha$ A_At	99	SLIVQWCEQDDYEVVRKVGKGYSEVFEGINMNSKEKCTIKILKPVKKKIKREIKILQN
$\alpha$ C_At	23	SLVQWCEQDDYEVVRKVGKGYSEVFEGKNTNERCVIKILKPVKKKIKREIKILQN
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	121	SLAVQWCEQDDYEVVRKVGKGYSEVFEGIHATDNEKCVIKILKPVKKKIKREIKILQN
cpck2a_Sa	102	SLAVQWCEQDDYEVVRKVGKGYSEVFEGIHATDNEKCVIKILKPVKKKIKREIKILQN
CK2_Hs	28	SHVVEWCEQDDYQVVRKLVGRKGYSEVFEGINMNNNEKVVVILKPVKKKIKREIKILQN
$\alpha$ B_At	153	LCCGPNIVKLLDVVRDQHSKTPSLIFEYVNSDFKVLVYPTLTDYDIRYYIYELLKALDFC
$\alpha$ A_At	159	LCCGPNIVKLLDVVRDQHSKTPSLIFEYVNSDFKVLVYPTLTDYDIRYYIYELLKALDFC
$\alpha$ C_At	83	LCCGPNIVKLYDIVRDEHSHKTPSLVFEFVNSVDFKVLVYPTLTDYDIRYYIYELLKALDFC
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	181	LCCGPNIVKLLDIVRDQQSKTPSLIFEHVNNKDFKVLVYPTLSDYDVRYYIYELLKALDFC
cpck2a_Sa	162	LCCGPNIVKLLDIVRDQQSKTPSLIFEHVNNKDFKVLVYPTLSDYDVRYYIYELLKALDFC
CK2_Hs	88	LRGGPNIITLADIVKDPVSRTPALVFEHVNNDFKQLVYQTLTDYDIRFYIYELLKALDFC
$\alpha$ B_At	213	HSQGIMHRDVKPHNVIMIDHELKRLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVASRYFKGPELLVDLQ
$\alpha$ A_At	219	HSQGIMHRDVKPHNVIMIDHELKRLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVASRYFKGPELLVDLQ
$\alpha$ C_At	143	HSQGIMHRDVKPHNVIMIDHQLRKLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVASRYFKGPELLVDLQ
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	241	HSRGMHRDVKPHNVIMIDHEQRKRLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVASRYFKGPELLVDLQ
cpck2a_Sa	222	HSRGMHRDVKPHNVIMIDHEQRKRLRLIDWGLAEFYHPGKEYNVRVASRYFKGPELLVDLQ
CK2_Hs	148	HSMGMHRDVKPHNVIMIDHEHRKRLRLIDWGLAEFYHPGQEYNVRVASRYFKGPELLVDLQ
$\alpha$ B_At	273	DYDYSLDMWSLGCMAFMIFRKEPFFYGHNDQDLVKIAKVLGTDELNAYLNKYQLELDT
$\alpha$ A_At	279	DYDYSLDMWSLGCMAFMIFRKEPFFYGHNDQDLVKIAKVLGTDELNAYLNKYQLELDE
$\alpha$ C_At	203	DYDYSLDMWSLGCMAFMIFRKEPFFYGHNDHDLVKIAKVLGTDELNAYLNKYQLELDE
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	301	DYDYSLDLWWSLGCMAFMIFRKEPFFYGHNDYDQLVKIAKVLGTDELNAYLNKYRIELDE
cpck2a_Sa	282	DYDYSLDLWWSLGCMAFMIFRKEPFFYGHNDYDQLVKIAKVLGTDELNTYLNRYRIELDE
CK2_Hs	208	MYDYSLDMWSLGCMLASMIFRKEPFFHGHNDYDQLVRIKVLGTEDLYDYIDKYNIELDE
$\alpha$ B_At	333	QLEALVGRHSRKPWSKFINADNRHLVSPEAIDVLDKLLRYDHQDRITAKEAMAHYFAQV
$\alpha$ A_At	339	QLEALVGRHSRKPWSKFINADNQHLSPEAIDFLDKLLRYDHQDRITAKEAMAHAYFAQV
$\alpha$ C_At	263	QLEALVGRHVPKWPWSKFINADNQHLSPEAIDFLDKLLQYDHQDRITAREAMDHPYFAQV
PPPK10 ( $\alpha$ cp)	361	NLTSLVGRHSRKPWTIKFINSENQHLAVPEAVDFVDKLLRYDHQERPTAKEAMAHYFYFPI
cpck2a_Sa	342	NLASLVGRHSRKPWSKFINSENQHLAVPEAVDFVDKLLRYDHQERPTAKEAMAHYFENPI
CK2_Hs	268	RFNDITLGRHSRKRWERFVHSENQHLVSPEAIDFLDKLLRYDHQSRLTAREAMEHPYFYTV

Abbildung 7-5: Aminosäuresequenzvergleich der vier Casein II  $\alpha$  Kinasen aus *Arabidopsis thaliana*:  $\alpha$ A (At5g67380),  $\alpha$ B (At3g50000),  $\alpha$ C (At2g23080) und PPPK10 ( $\alpha$ cp; At2g23070) mit den entsprechenden Homologen aus *Sinapis alba* (cpck2a\_Sa, Proteinsequenz aus der Datenbank Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))) und *Homo sapiens* (CK2\_Hs, Sequenz aus der refSeq-Protein Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) in Anlehnung an Salinas et al., 2006.

## 7.5 PPPK10 ist in den Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert

Bereits bei der anfänglichen Überprüfung der subzellulären Lokalisation der putativen chloroplastidären Proteinkinasen fiel auf, dass PPPK10 nicht nur in den Chloroplasten, sondern auch in einem weiteren klar abgegrenzten, deutlich kleinerem Kompartiment, lokalisiert ist (vgl. Abschnitt 7.2 und Abbildung 7-2). Aufgrund der für das homologe Protein in Senf beschriebenen Funktion als regulatorisches Element der plastidären Transkription (Ogrzewalla et al., 2002), sowie dem Umstand, dass bestimmte Bestandteile der Transkriptionsapparates (RPOTmp, Hedtke et al., 2000) von Chloroplasten und Mitochondrien in *Arabidopsis thaliana* gemeinsam genutzt werden, lag es nahe als weiteren Bestimmungsort die Mitochondrien anzunehmen. Daher wurde zunächst die Struktur des organell-dirigierenden Transitpeptides mithilfe bioinformatischer Hilfsmittel näher untersucht. Hierbei wurde dem Konzept von Rudhe et al. (2002) gefolgt. Jene Autoren verkürzten virtuell die Glutathion-Reduktase N-terminal und untersuchten die subzelluläre Lokalisation mit verschiedenen Vorhersagealgorithmen. Dabei wurde mit zunehmender N-terminaler Verkürzung des Proteins eine Abnahme der Wahrscheinlichkeit beobachtet, dass es sich um ein chloroplastendrigierendes Transitpeptid handelte. Umgekehrt nahm die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein mitochondriendrigierendes Transitpeptid handelte, zu. Durch *in vitro* Import-Versuche mit Konstrukten, die Deletionen entsprechend der *in silico* Analyse auswiesen, konnte ein Einfluss auf die Import-Effizienz in die Organellen beobachtet werden (Rudhe et al., 2002). Somit konnten die Autoren mit bioinformatischen Hilfsmitteln Hinweise auf eine dual-dirigierende Domainstruktur erhalten und experimentell bestätigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteinsequenz der PPPK10 *in silico* sukzessive um fünf Aminosäuren N-terminal verkürzt bis die Proteinsequenz ohne das vorhergesagte Transitpeptid vorlag. Jede N-terminal verkürzte Sequenz wurde bezüglich der subzellulären Lokalisation mittels TargetP (Emanuelsson et al., 2000) analysiert. Die daraus resultierende Wahrscheinlichkeiten für ein chloroplastendrigierendes Transitpeptid und mitochondriendrigierendes Transitpeptid wurden gegen die Länge des sich zunehmend verkürzten Proteins aufgetragen. Wie auch im Fall der Glutathion-Reduktase, führte die segmentelle Vorhersage der PPPK10 zunächst zu einer klaren Vorhersage eines plastidendrigierenden Transitpeptids. Durch N-terminale Verkürzung der Proteinsequenz um 30 Aminosäuren konnte eine mitochondriendrigierende Präsequenz berechnet werden.

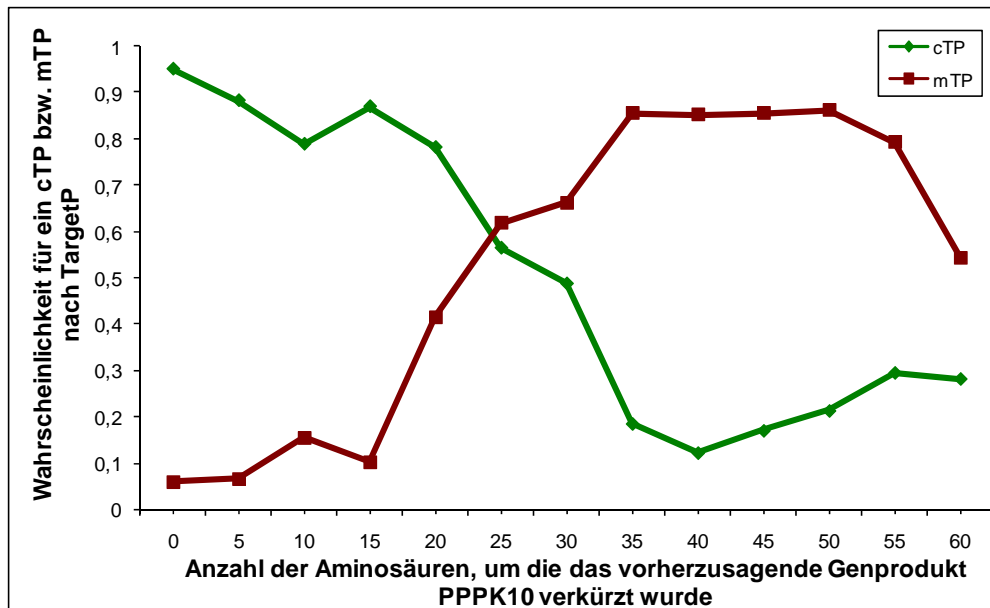


Abbildung 7-6: Die Wahrscheinlichkeit eines chloroplasten- oder mitochondrien-orientierten Transitpeptids (cTP bzw. mTP) in Abhängigkeit von der Länge des Proteins, ermittelt durch den Vorhersagealgorithmus TargetP (Emanuelsson et al., 2000). Für diese Vorhersage wurde die Proteinsequenz schrittweise um fünf Aminosäuren verkürzt.

Entsprechend konnte daher auch für PPPK10 eine dual-dirigierende Domainstruktur angenommen werden. Folgend wurde diese Annahme anhand von Lokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Mitochondrien und *in vitro* Importexperimenten überprüft.

Wie in Abbildung 7-7A ersichtlich ist, konnte eine Lokalisation von PPPK10 in den Mitochondrien und Chloroplasten durch Fusion der potentiellen Transitsequenz an RFP mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Analyse transfizierter Arabidopsis Protoplasten bestätigt werden. Auch durch *in vitro* Importe in isolierte Chloroplasten und Mitochondrien aus Erbsenkeimlingen konnte PPPK10 in beiden Organellen lokalisiert werden (Abbildung 7-7B). Interessant war hierbei festzustellen, dass in diesem experimentellen System die organellendirektierende Transitsequenz weder nach dem Import in die Mitochondrien, noch nach dem Import in die Chloroplasten, abgespalten wurde. Weiterhin wurde durch die Subfraktionierung der Chloroplasten und Mitochondrien deutlich, dass in beiden Organellen das Genprodukt PPPK10, sowohl in den löslichen Fraktionen, als auch in den Membranfraktionen zu finden war.

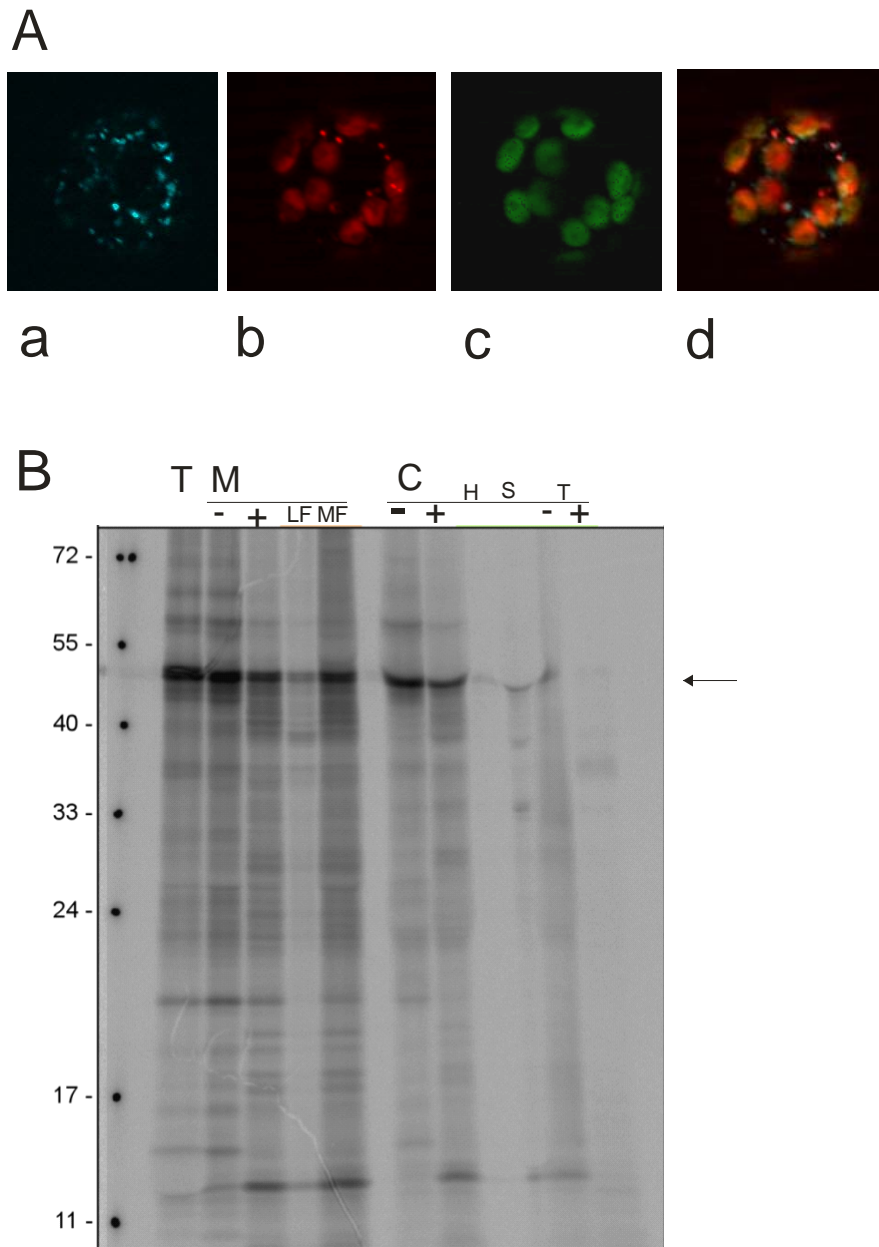


Abbildung 7-7: Lokalisation von PPPK10 in Chloroplasten und Mitochondrien. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *Arabidopsis* Protoplasten, a) von Mitochondrien, mittels MitoTracker Green FM markiert, b) Fluoreszenz des Fusionsproduktes aus N-terminalem PPPK10 mit RFP, c) Autofluoreszenz des Chlorophylls, d) überlagerte Darstellung von a, b und c, bei den Bildern dieser Abbildung handelt es sich um Falschfarbendarstellungen; (B) SDS-PAGE des *in vitro* Imports des Translationsproduktes des Vorläuferproteins PPPK10 in Mitochondrien und Chloroplasten, die aus Erbsen (*Pisum sativum*) isoliert wurden. Aufgetragen wurden das Translationsprodukt (T), der *in vitro* Importansatz in die isolierten Mitochondrien (M) nach (+) und ohne (-) proteolytischen Verdau mit Thermolysin, sowie anschließender Subfraktionierung der Mitochondrien in lösliche Fraktion (LF) und Membranfraktion (MF). Desweiteren wurde der *in vitro* Import Ansatz in die isolierten Chloroplasten (C) nach (+) und ohne (-) proteolytischen Verdau mit Thermolysin, sowie nach anschließender Subfraktionierung der Chloroplasten in Hüllmembranen (H), Stroma (S) und Thylakoide (T) aufgetragen. Der *in vitro* Import wurde durchgeführt in Zusammenarbeit mit Anja Rödiger der MLU Halle/Wittenberg.



## **7.6 Charakterisierung von T-DNA Insertionsmutanten im Gen PPPK10**

Bereits in den frühen 80er Jahren des letzten Jahrtausends wurde die reverse Genetik (engl. *reverse genetics*) als Mittel der Wahl für die funktionelle Charakterisierung von Genen diskutiert (z.B. Ruddle, 1982; Ruddle, 1984; Williams, 1985). Hierbei wird die Funktion eines Gens oder Genproduktes durch deren Modifikation untersucht. Auch in dieser Arbeit wurde dieses Verfahren angewendet, um bei der Aufklärung der Funktion des Genprodukts von *PPPK10* beizutragen. Hierzu wurden drei *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionslinien in den *flanking* Datenbanken (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) sowie der Gabi-Kat Datenbank (<http://www.gabi-kat.de/>) identifiziert. Durch PCR-basierte Genotypisierung dieser Linien konnten drei unabhängige Mutantenallele bestätigt werden. Deren Auswirkungen auf das Wachstum der Pflanzen soll im Folgenden beschrieben werden.

## **7.7 Eine T-DNA Insertion im vierten Intron des Gens PPPK10 führt zum Keimungsdefekt**

Erste Hinweise darauf, dass die Insertion im vierten Intron zu einem Keimungsdefekt der Pflanzen führte, ergaben sich bereits während der Charakterisierung der Insertionslinie *pppk10-3*. So konnten keine Pflanzen, die bezüglich der Insertion im vierten Intron des Gens *PPPK10* homozygot waren, identifiziert werden. In einem Keimungstest bildeten lediglich 72% der Nachkommen der heterozygoten Linie *pppk10-3* (n=158) eine Pflanze aus, wohingegen 99,5% der Nachkommen des Wildtyps (n=214) Pflanzen ausbildeten. Jene Nachkommen der heterozygoten Linie *pppk10-3* waren phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Interessant war zu klären, ob der signifikante (Student T-Test: p=0,005) Defekt in der Keimung eine Folge der Insertion im Gen *PPPK10* war.

## **7.8 Der Defekt in der Keimung der Linie *pppk10-3* kann komplementiert werden**

Es wurden heterozygote Nachkommen der Linie *pppk10-3* stabil mit der kodierenden Sequenz von *PPPK10* transformiert und die Transformanten hinsichtlich einer homozygoten Insertion im Gen *PPPK10* analysiert. Hierbei konnten Pflanzen identifiziert werden, die das Transformationskonstrukt enthielten und hinsichtlich der Insertion im vierten Intron des Gens *PPPK10* homozygot waren (Abbildung 7-8).

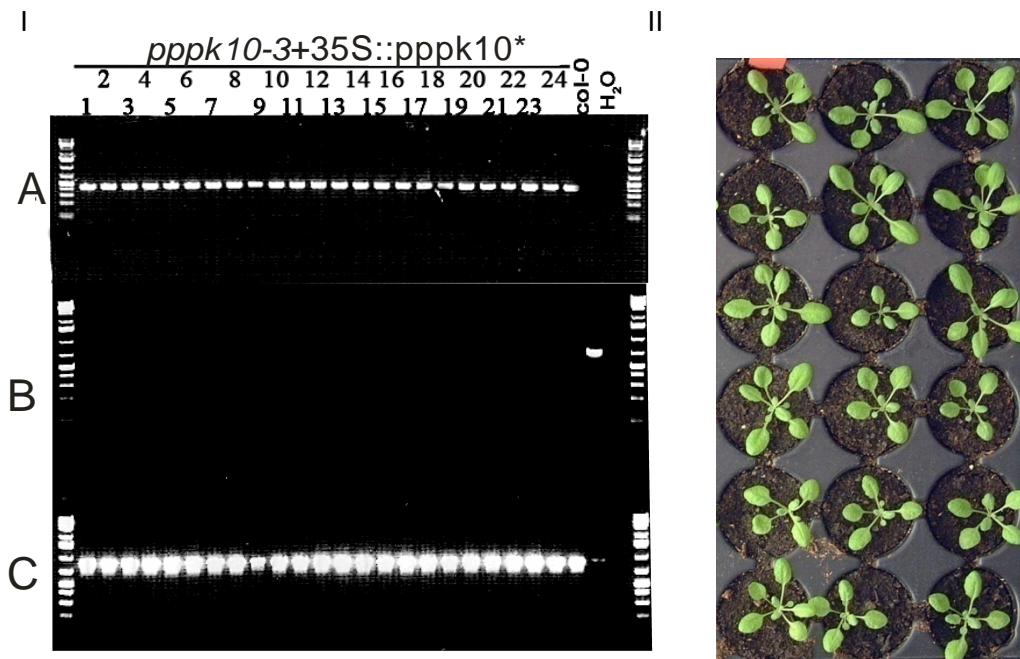


Abbildung 7-8: (I) Genotypisierung der komplementierten T2 Generation *pppk10-3+35S::PPP10\*#40.1-24*. In der Reihe A sind die PCR-Produkte der Reaktion zwischen den Oligonukleotiden spezifisch für das T-DNA Insertionsfragment und spezifisch für das Gen; in der Reihe B sind die PCR-Produkte aus der Reaktion mit jeweils im Intron-bindenden genspezifischen Oligonukleotiden; in Reihe C sind die PCR-Produkte der Reaktion aus Oligonukleotiden spezifisch für das Komplementationskonstrukt jeweils nach gelelektrophoretischer Trennung dargestellt. \* symbolisiert, dass es sich bei der Sequenz nicht um die entsprechende genomische DNA handelt, sondern um die intronlose kodierende Sequenz. (II) Nachkommen der Linie *pppk10-3+35S::PPP10\*#40.1* im Alter von 23 Tagen.

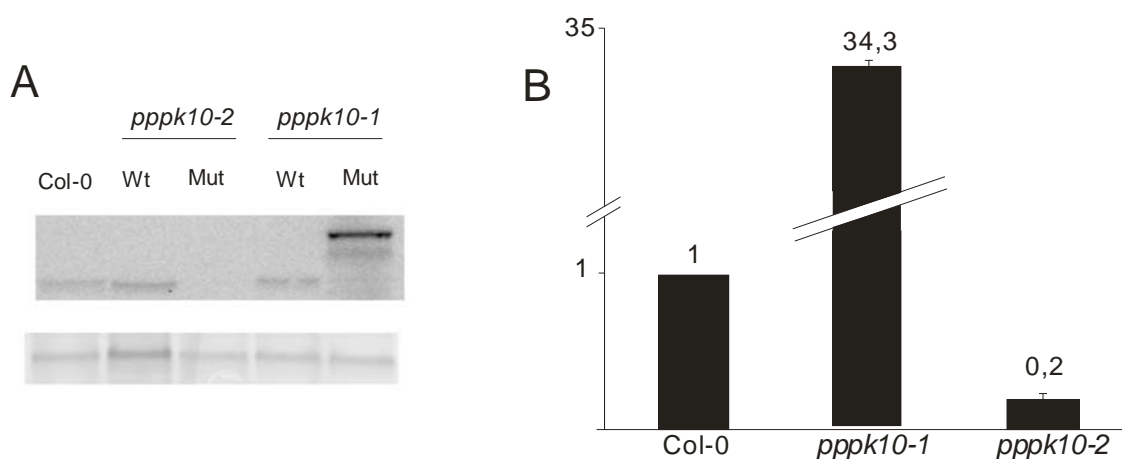
### 7.9 Zwei T-DNA Insertionen im 5'-Bereich von *PPP10* führen nicht zu einem Defekt in der Keimung

Zwei weitere *Arabidopsis thaliana* Mutantenlinien konnten identifiziert werden. Die Linie *pppk10-1* enthielt eine T-DNA Insertion im Promotor des Gens *PPP10*, die Linie *pppk10-2* eine Insertion nach dem sechsten Nukleotid, relativ zum annotierten Translationsstartpunkt (Abbildung 7-4). Für beide Linien konnten homozygote Pflanzen unter Standardwachstumsbedingungen identifiziert werden. Somit führten T-DNA Insertionen in diesem Bereich des nicht zu einem Defekt in der Keimung.

### 7.10 Entgegengesetzte mRNA-Expression des Gens *PPP10* in den Linien *pppk10-1* und *pppk10-2*

Die Insertionen in diesen Linien veränderten die Expression des Gens *PPP10*. So konnte anhand von Northern-Analysen gezeigt werden, dass die Insertion im Promotorbereich des Gens *PPP10* der *pppk10-1* zu einer Akkumulation des Transkripts führte. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Größe dieses Transkriptes nicht der des Wildtyps entsprach (Abbildung 7-9A). Ursächlich hierfür konnte die Struktur des für die Mutagenese

verwendeten Insertionsfragments sein. Diese zeichnete sich durch das Vorhandensein des Phosphinothricin-Acetyl-Transferase-Gens (*pat*-Gen) aus, dessen Expression durch einen 35S::CaMV-Promotor kontrolliert wurde. Durch die Insertion der T-DNA wurde dieses Konstrukt in räumliche Nähe zum Gen *PPPK10* gebracht. Somit war anzunehmen, dass die Expression eines zusammengesetzten Transkripts, bestehend aus dem des *pat*-Gens und des *PPPK10*-Gens unter der Kontrolle des 35S::CaMV-Promotors in den Pflanzen der Linie *pppk10-1* zu detektieren war. Entgegen der beobachteten Akkumulation des *PPPK10*-Transkriptes um das 34-fache in der Linie *pppk10-1*, konnte keine mRNA dieses Gens in der Linie *pppk10-2* anhand der Northern-Analyse detektiert werden (Abbildung 7-9A).



**Abbildung 7-9:** Expressionsanalysen der Insertionsmutanten *pppk10-2* und *pppk10-1* durch Northern-Analysen (A) und mittels reverser Transkriptase-vermittelter *real-time* PCR (B). Für die Northern-Analyse wurden 30 µg Gesamt-RNA pro Genotyp geladen. Im oberen Teil der Abbildung wurde die Hybridisierung mit der genspezifischen Sonde dargestellt, im unteren Teil die Methylenblau-Färbung der rRNA. Das in B dargestellte Diagramm gibt die zum Wildtyp normalisierte Expression des *PPPK10*-Transkripts in den Mutantelinien *pppk10-1* und *pppk10-2* wieder.

Dies war überraschend, da eine Insertion im vierten Intron dieses Gens der Linie *pppk10-3* zu einem Defekt in der Keimung führte, wohingegen eine Insertion im ersten Exon der Linie *pppk10-2* offensichtlich keinen derart gravierenden Phänotyp verursachte. Es wurde vermutet, dass die Transkriptmenge unter der Detektionsgrenze des Northern-Blots lag. Um die Empfindlichkeit der Expressionsanalyse zu erhöhen, wurde die Methode der RT-*real-time* PCR angewandt. Hiermit ließ sich zeigen, dass zwar die Transkriptmenge in der Linie *pppk10-2* um 80% reduziert war, aber dass es sich nicht um eine *knock out*-Mutante handelte. Da die Expression des Gens in dieser Linie unter der Detektionsgrenze der Northern-Analyse lag, wurden zur Charakterisierung des Transkripts PCR-Techniken verwendet.

### 7.11 In der Linie *pppk10-2* war ein Teil des Insertionsfragments Bestandteil des Transkripts

Interessanterweise konnte eine Diskrepanz im Phänotyp der Linie *pppk10-3* und *pppk10-2* beobachtet werden. Wohingegen die erste Linie keine homozygoten Nachkommen produzieren konnte, stellte dies kein Problem für die Linie *pppk10-2* dar. Folglich waren 20% *PPPK10*-Transkript ausreichend, um photoautotrophes Wachstum zu ermöglichen. Die Insertion dieser Linie konnte im ersten Exon des Gens nachgewiesen werden. Jedoch konnte für diesen Bereich des Gens aufgrund von *in silico* Analysen angenommen werden, dass er als organellendirektierende Transitsequenz diene. Folglich war zu klären, ob die Insertion in diesem Bereich Teil des Transkripts war oder durch post-transkriptionale Modifikationen aus der reifen mRNA durch sog. *Splicing* entfernt wurde. Hierzu wurden PCR-Analysen mit cDNA, die aus der Linie *pppk10-2* gewonnen wurde, durchgeführt.

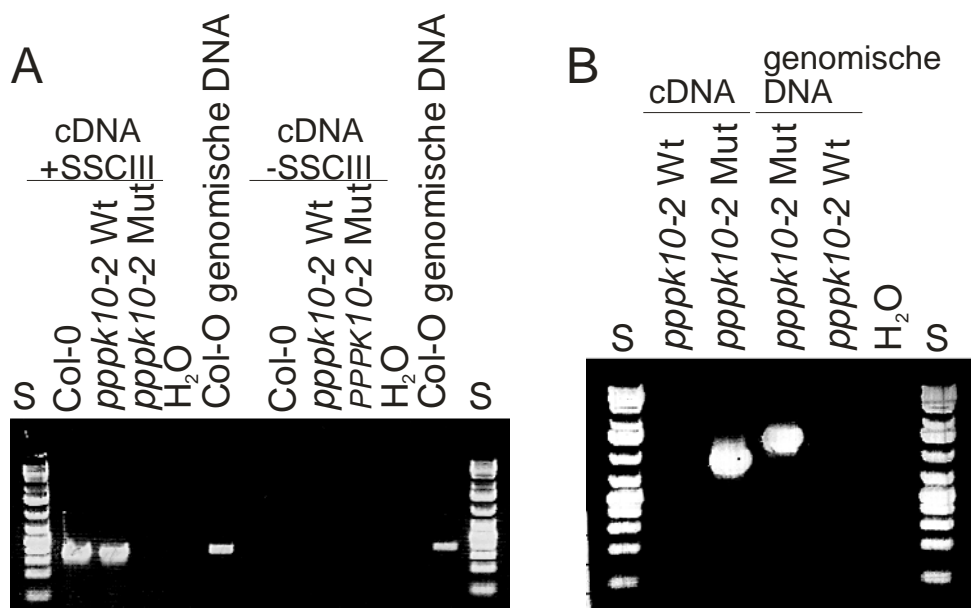


Abbildung 7-10: Charakterisierung des *PPPK10*-Transkripts im Vergleich zwischen Wildtyp (Col-0), dem segregierten Wildtyp der Linie *pppk10-2* (*pppk10-2* Wt) und der homozygoten Mutante der Linie *pppk10-2* (*pppk10-2* Mut). In A sind PCR-Produkte aus der Reaktion mit cDNA und den Insertionslocus-überspannenden Oligonukleotiden At2g23070--27s und At2g23070-356s dargestellt (links). Um Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde in einem parallelen Ansatz die cDNA Synthese-Reaktion ohne reverse Transkriptase (-SSCIII) durchgeführt und anschließend mit der gleichen Oligonukleotidkombination untersucht (rechts). In B sind die PCR-Produkte aus der Reaktion von cDNA bzw. genomischer DNA mit Oligonukleotiden, die zum einen in dem Insertionsfragment binden (LBgk1) und zum anderen im dritten Exon von *PPPK10* (At2g23070-E2-3as) binden. Mit S ist wurde die Spur den Molekulargewichtsmarker bezeichnet.

Wie in Abbildung 7-10A deutlich wurde, war es nicht möglich ein PCR-Produkt mit Oligonukleotiden, die den Insertionslocus überspannen, in der Linie *pppk10-2* zu amplifizieren. Entsprechend konnte geschlussfolgert werden, dass die Insertion nicht infolge

post-transkriptionaler Modifikationen aus der mRNA herausgeschnitten wurde. Weiterhin konnte mittels Oligonukleotiden, die in dem Insertionsfragment und im dritten Exon des *PPPK10*-Transkripts banden, gezeigt werden, dass zumindest Bereiche der Insertion auch Teil des Transkripts in der Linie *pppk10-2* waren (Abbildung 7-10 B). Die Sequenzanalyse dieses Transkripts ergab, dass kein klassischer Translationsstartpunkt festzustellen war. Entsprechend dieser Ergebnisse, musste von einer Modifikation im N-Terminus des Translationsproduktes von *PPPK10* in der Mutantenlinie *pppk10-2* ausgegangen werden. Wie bereits erwähnt, sind besonders diese Bereiche kernkodierter und plastiden- bzw. mitochondrienlokalisierter Proteine für das Leiten dieser Proteine in die Zielorganellen verantwortlich. Fraglich war nun, ob die durch die Insertion verursachte Modifikation des N-Terminus die Lokalisation des *PPPK10*-Genprodukts aus der Linie *pppk10-2* beeinflusste.

#### **7.12 Auch das *PPPK10*-Transkript der Linie *pppk10-2* kodiert für ein Translationsprodukt, welches die Kapazität hat, in Mitochondrien und Chloroplasten zu dirigieren**

Um die subzelluläre Lokalisation des Translationsproduktes der Linie *pppk10-2* zu untersuchen, wurde aus der cDNA dieser Linie der für den N-Terminus kodierenden Bereich entsprechend Abbildung 7-10 B amplifiziert, an RFP fusioniert und anschließend Protoplasten aus *Arabidopsis* transfiziert. Wie aus der Abbildung 7-11 hervorgeht, konnte auch für das Konstrukt, welches, wie in der Linie *pppk10-2* zu beobachten war, aus einem Teil des Insertionsfragments und dem verbleibenden Teil des putativen Transitpeptides und desweiteren fusioniert an RFP war, eine Lokalisation des RFP sowohl in den Mitochondrien, als auch in Chloroplasten der Protoplasten festgestellt werden. Somit konnte gefolgert werden, dass ein Translationsprodukt aus der mRNA des Gens *PPPK10* der Linie *pppk10-2* gebildet werden konnte, und welches das Potential hat, das Translationsprodukt in die Mitochondrien und Chloroplasten dieser Linie zu dirigieren. Hierdurch ließ sich weiterhin eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Phänotypen der Linie *pppk10-3* und *pppk10-2* finden. Durch die Präsenz eines in der Abundanz reduzierten und modifizierten, jedoch offensichtlich funktionellen *PPPK10*-Genprodukts in der Linie *pppk10-2* wären homozygote Pflanzen dieser Linie in der Lage, photoautotroph zu wachsen. Jedoch, wie folgend gezeigt werden soll, führte diese Insertion zu einem reduzierten Wachstum.

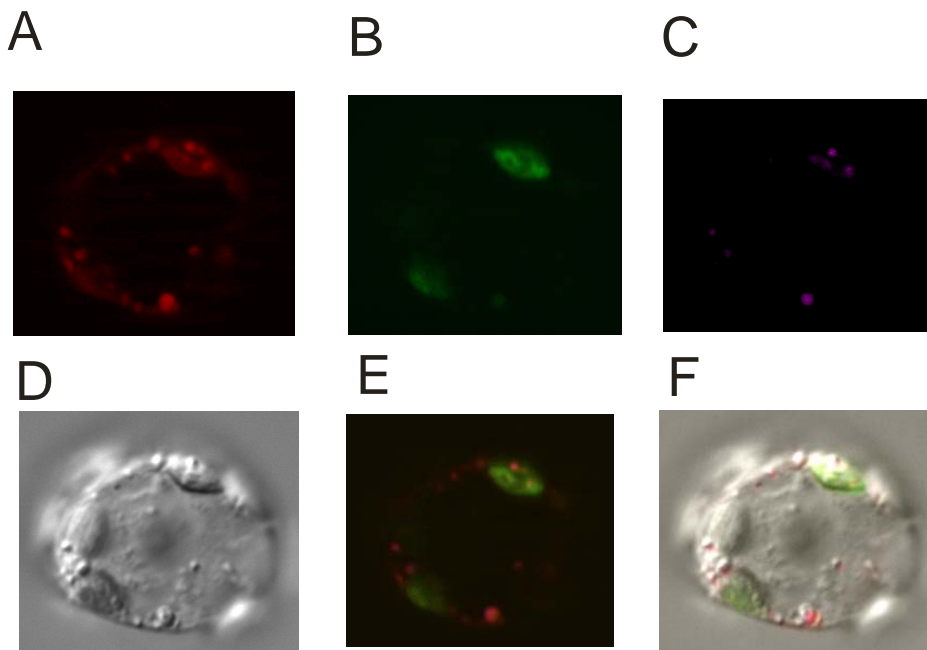


Abbildung 7-11: Mikroskopische Aufnahmen eines Arabidopsis Protoplasten mit der Lokalisation von *left border*-Transitpeptid fusioniert an RFP in Chloroplasten und Mitochondrien. (A) Fluoreszenz des RFP-Fusionsproduktes, (B) Autofluoreszenz des Chlorophylls der Chloroplasten, (C) Fluoreszenz der mittels MitoTracker Green FM markierten Mitochondrien, (D) differenzielle Interferenzkontrast-Aufnahme, (F) überlagerte Darstellung von A bis D. Bei den Bildern A, B, C, E und F handelt es sich um Falschfarbendarstellungen.

### **7.13 Eine Insertion im 5'-Bereich des Gens *PPPK10* der Linie *pppk10-2* führt zu einer Reduktion in der Blattfläche**

Interessant war zu beobachten, dass die Insertionslinie *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp und der Insertionslinie *pppk10-1* ein reduziertes Wachstum aufwies. Folglich wurde die Blattflächenzunahme in dem Zeitraum vom 14ten Tag nach Aussaat bis zum 25sten Tag nach der Aussaat ermittelt. Wie in Abbildung 7-12 deutlich wird, war die Blattflächenzunahme der Linie *pppk10-2* im Beobachtungszeitraum deutlich reduziert. Während der Wildtyp 25 Tage nach der Aussaat eine durchschnittliche Blattfläche von  $5 \pm 1,2 \text{ cm}^2$  aufwies, konnte für diese Linie lediglich eine Blattfläche von  $0,7 \pm 0,2 \text{ cm}^2$  ermittelt werden. Die Insertionslinie *pppk10-1* zeigte keine Reduktion der Blattfläche im Vergleich zum Wildtyp. Um zu untersuchen, ob die Reduktion in der Blattfläche der Linie *pppk10-2* eine Folge der Insertion im 5'-Bereich des translatierten Bereichs des Gens *PPPK10* war, wurden Pflanzen dieser Linie zum einen mit der kodierenden Sequenz des Gens *PPPK10* als Fusion mit GFP, zum anderen mit nur der kodierenden Sequenz, transformiert.

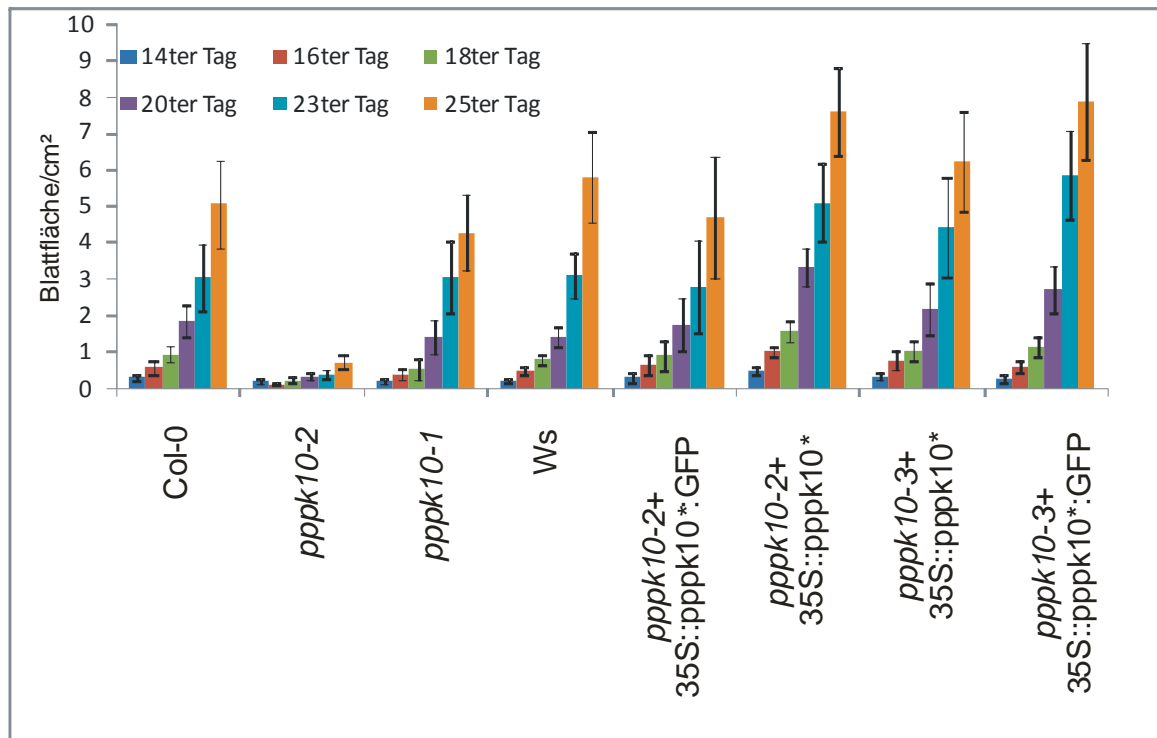


Abbildung 7-12: Blattfläche der Wildtyp-Linien Col-0 (n=18) und Ws (n=18), der Insertionslinien *pppk10-2* (n=18) und *pppk10-1* (n=18), sowie der Komplementationslinien *pppk10-2+35S::PPPK10\*:GFP* (n=11), *pppk10-2+35S::PPPK10\** (n=16), *pppk10-3+35S::PPPK10\*:GFP* (n=18), *pppk10-3+35S::PPPK10\** (n=18) 14, 16, 18, 20, 23 und 25 Tage nach der Aussaat. Die Komplementation wurde mit der kodierenden Sequenz der des Gens *PPPK10* durchgeführt und durch das \* symbolisiert.

Die Expression dieser Komplementationskonstrukte erfolgte unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors (35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus). Die Analyse der Blattfläche über den oben genannten Beobachtungszeitraum erbrachte, dass Pflanzen mit exprimierten Komplementationskonstrukten keine Reduktion der Blattflächen wie die der Linie *pppk10-2*, aufwiesen. Weiterhin wurde deutlich, dass die Expression der Komplementationskonstrukte im genetischen Hintergrund der Insertionslinie *pppk10-2* zu einer Zunahme der Blattflächen sogar im Vergleich mit denen des Wildtyps führte. So konnte zu jedem Zeitpunkt der Blattflächenanalyse eine größere Fläche für die Linie *pppk10-2+35S::PPPK10\** bestimmt werden, was nach 25 Tagen nach der Aussaat in einer Blattfläche von durchschnittlich  $7,6 \pm 1,2$  cm<sup>2</sup> resultierte. Die Blattfläche des Wildtyps wies nach entsprechender Wachstumsperiode lediglich  $5 \pm 1,2$  cm<sup>2</sup> auf. Auch die komplementierten Pflanzen der keimungsdefekten Linie *pppk10-3* (vgl. Absatz 7.8) bestätigten die Zunahme der Blattfläche als Folge der Expression der Komplementationskonstrukte. Wie in Abbildung 7-12 deutlich wird, wiesen die Linien *pppk10-3+35S::PPPK10\** und *pppk10-3+35S::PPPK10\*:GFP* nach 25 Tagen nach der Aussaat eine Blattfläche von durchschnittlich  $6,2 \pm 1,4$  cm<sup>2</sup> bzw.  $7,9 \pm 1,6$  cm<sup>2</sup> pro Pflanze auf.

Zusammenfassend kann aus den Untersuchungen der Blattflächen gefolgert werden, dass die Linie *ppk10-2* eine nachweislich reduzierte Blattfläche aufwies. Ursächlich hierfür war die Insertion im Gen *PPPK10*, was anhand der Komplementation dieser Linie mit der kodierenden Sequenz des entsprechenden Gens gezeigt werden konnte.

#### **7.14 Photosynthetische Parameter der Linie *ppk10-2* weisen keine Unterschiede zum Wildtyp auf**

Wie hinreichend belegt ist, kann eine Reduktion der Blattfläche durch Defekte in der Photosynthese begründet sein (DalCorso et al., 2008, Pesaresi et al., 2001, Varotto et al., 2000, Andersson et al., 2003, Eckardt et al., 1997). Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *PPPK10* auch in den Organellen der Photosynthese, den Chloroplasten, lokalisiert ist. Somit sollte mit den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Reduktion der Blattfläche der Linie *ppk10-2* aus einer Beeinträchtigung der Photosynthese resultiert.

##### **7.14.1 Die Grundparameter der Chlorophyllfluoreszenz weisen keine Unterschiede auf**

Der photosynthetische Elektronentransport wurde anhand von Chlorophyllfluoreszenz-Messungen bei Raumtemperatur mittels Puls-Amplitudenmodulation-Chlorophyllfluorometer (PAM) durchgeführt. Hierbei waren zunächst Parameter, die den photosynthetischen Zustand des Photosystems II beschreiben, zugänglich. Zunächst wurden diese Parameter unter Lichtintensitäten von 70-80  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  ermittelt, wie sie während der Aufzucht der Pflanzen verwendet wurden. Wie aus Tabelle 7-3 deutlich wurde, wiesen die Mutationsinsertionslinien keine signifikanten Unterschiede der photosynthetischen Parameter im Vergleich zu den Wildtypen unter der verwendeten Lichtintensität auf.

Desweiteren wurden die Pflanzen hinsichtlich ihrer photosynthetischen Aktivität untersucht, nachdem diese für zwei Stunden einer Lichtintensität von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  ausgesetzt waren. Derartige Lichtintensitäten haben photoinhibitorische Effekte zur Folge (Aro et al., 1993a; Aro et al., 1993b). Interessant war nun zu untersuchen, inwieweit die Photosynthese im Vergleich zwischen Mutante und entsprechendem Wildtyp beeinflusst war.



**Tabelle 7-3: Spektroskopische Daten aus Wildtyp- und Mutantenblättern bei 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Messungen jedes Genotyps wurden dargestellt. Die verwendeten Ökotypen Columbia-0 (Col-0) und Wassilewskija (Ws) entsprachen den genetischen Hintergründen von Linie *pppk10-2* und Linie *pppk10-1*.**

Linie	Fv/Fm	$\Phi_{\text{PSII}}$	qP	qN	NPQ
Col-0	0,81 $\pm$ 0	0,70 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,03
<i>pppk10-2</i>	0,80 $\pm$ 0	0,67 $\pm$ 0,02	0,87 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01
<i>pppk10-1</i>	0,81 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02
Ws	0,81 $\pm$ 0	0,70 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01

Erwartungsgemäß war in allen untersuchten Genotypen eine Reduktion der maximalen Quantenausbeute (Fv/Fm) zu beobachten (vgl. Tabelle 7-3 und Tabelle 7-4). Entsprechend konnte auch eine Reduktion der effektiven Quantenausbeute des Photosystems II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) und der photochemischen Fluoreszenzlöschung (qP) als Folge der Bestrahlung mit Starklicht im Vergleich zu den Proben bei 70  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  festgestellt werden, wohingegen Parameter der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung zunahmen.

**Tabelle 7-4: Spektroskopische Daten aus Wildtyp- und Mutantenblättern nach zwei Stunden bei 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Messungen jedes Genotyps wurden dargestellt. Die verwendeten Ökotypen Columbia-0 (Col-0) und Wassilewskija (Ws) entsprachen den genetischen Hintergründen von Linie *pppk10-2* und Linie *pppk10-1*.**

Linie	Fv/Fm	$\Phi_{\text{PSII}}$	qP	qN	NPQ
Col-0	0,54 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,07
<i>pppk10-2</i>	0,56 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,06
<i>pppk10-1</i>	0,54 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0	0,49 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,04
Ws	0,58 $\pm$ 0,07	0,21 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,14

Der Vergleich der Insertionsmutantenlinien mit den entsprechenden Wildtypen nach Starklichtbehandlung wies jedoch auf keine Unterschiede durch diesen Stressstimulus hin. Auch Chlorophyllfluoreszenz-basierende Photoinhibitionsexperimente mit anschließender

Erholung bei 20  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  nach Bonardi et al. (2005) wiesen auf keinen Unterschied bei der Photoinhibition und der anschließenden Rekonstitution zwischen der Linie *pppk10-2* und dem Wildtyp hin (Daten nicht gezeigt).

#### 7.14.2 Keine Unterschiede von Fs/Fm nach PSI bzw. PSII Licht

Die redox-abhängige Regulation der Langzeitanpassung in der Stöchiometrie der Photosysteme infolge von Änderungen in der Lichtqualität lässt sich durch die Analyse von Chlorophyllfluoreszenzparametern verfolgen (Dietzel et al., 2008, Pfannschmidt und Liere, 2005, Allen, 2005). Hierdurch wurde gezeigt, dass die Proteinkinase *STN7* in diesem Prozess involviert war (Bonardi et al., 2005). Die Langzeitanpassung in der Stöchiometrie der Photosysteme setzt eine Regulation der Transkription voraus. Da Experimente mit der homologen Proteinkinase zum Genprodukt PPPK10 aus Senf auf eine Beteiligung dieser cpPK2 $\alpha$  an der Regulation der Transkription von - zumindest - *psbA* und *trnQ* hinwiesen (Baginsky et al., 1999, Baena-Gonzalez et al., 2001), sollte im Folgenden untersucht werden, ob PPPK10 an der Langzeitanpassung an unterschiedliche Lichtqualitäten involviert ist.

Um diese Veränderungen in der Langzeitanpassung infolge von Lichtqualitätsänderungen zu untersuchen, wurden Pflanzen an Licht, welches bevorzugt entweder Photosystem II oder Photosystem I anregt, adaptiert und anschließend diese Lichtbedingungen invertiert. Daraufhin wird mithilfe der Chlorophyllfluoreszenz das Parameterverhältnis  $F_s$  (*steady-state* (Gleichgewichts-) Fluoreszenz) zu  $F_m$  (maximale Fluoreszenz) ermittelt (Pfannschmidt et al., 2001, Fey et al., 2005). Anhand des Vergleichs zwischen der Mutante und dem Wildtyp können Veränderungen in diesem Anpassungsmechanismus festgestellt werden. Überraschenderweise wurde jedoch beobachtet, dass keine Unterschiede in der Langzeitanpassung an Lichtqualitäten spezifisch für Photosystem I bzw. Photosystem II festzustellen waren (Abbildung 7-13). Auch die Anpassung an Licht, spezifisch für Photosystem II, nach vorangegangener zweitägiger Adaption an Photosystem I-Licht und anders herum, wies auf keine Veränderung in der Anpassungsfähigkeit zwischen Wildtyp und Mutantenlinie *pppk10-2* hin.

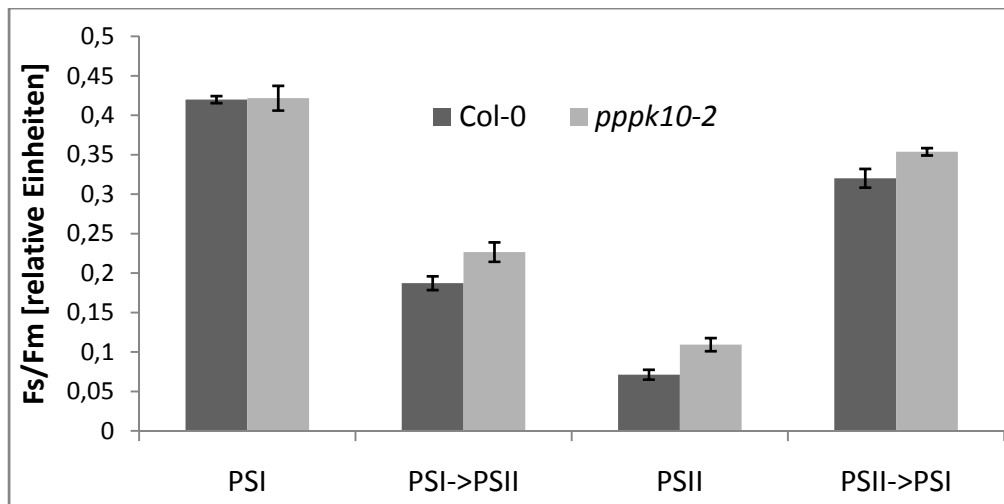


Abbildung 7-13: Photosynthetische Anpassung an unterschiedliche Lichtqualitäten des Wildtyps, sowie der Insertionsmutante *pppk10-2*. Die Pflanzen wurden für sechs Tage an Licht, spezifisch für Photosystem I (PSI) oder spezifisch für Photosystem II (PSII) akklimatisiert. Oder sie wuchsen für zwei Tage im PSII bzw. PSI, um dann für weitere vier Tage im entsprechend anderen Licht (PSII zu PSI, oder PSI zu PSII) transferiert zu werden. Anschließend wurde das Fs/Fm-Verhältnis ermittelt.

Entsprechend war zu folgern, dass durch die Insertionsmutation in der Linie *pppk10-2*, keine Beeinträchtigung in der redox-abhängigen Langzeitanpassung an Lichtqualitäten, die spezifisch Photosystem II bzw. Photosystem I anregen, hervorgerufen wurden.

### 7.15 PSI Oxidation ist in *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht

Die bisher dargestellten Ergebnisse beschrieben lediglich die Vorgänge um Photosystem II. Im Folgenden wurde die Quantenausbeute des Photosystems I bestimmt. Hierfür wurde die Absorptionsänderung bei 830nm als Folge des Oxidations-/ Reduktionszustands von Photosystem I, wie durch Klughammer und Schreiber (1994) beschrieben, genutzt. Wie nun in der Abbildung 7-14 deutlich wird, lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Insertionsmutanten und ihren entsprechenden Wildtypen feststellen. Somit schienen in den untersuchten Genotypen die gleichen Anteile der Reaktionszentren des Photosystems I an den Energieweiterleitungsprozessen unter Lichtbedingungen, wie sie während Aufzucht vorlagen, involviert zu sein.

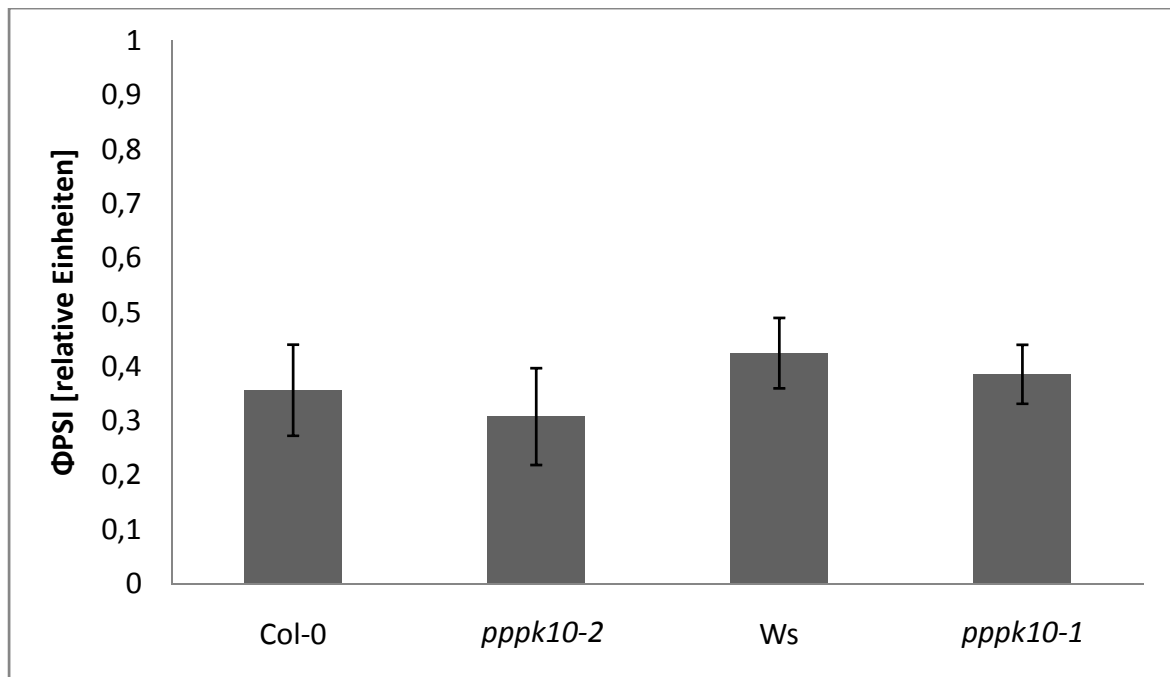


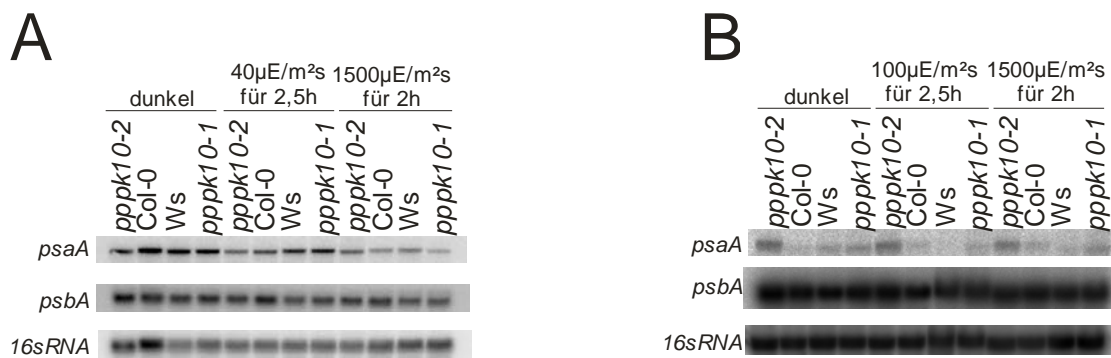
Abbildung 7-14: Effektive Quantenausbeute von Photosystem I der Insertionsmutanten *pppk10-2* und *pppk10-1*, sowie deren Wildtypen Col-0 und Ws. Dargestellt wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung aus n=5 Messungen je Genotyp.

### 7.16 Expressionsanalysen von Transkripten nach oxidativem Stress

In der Literatur wurde für cpPK2 $\alpha$  aus Senf die Beteiligung an der Regulation der Transkription in den Chloroplasten vorgeschlagen. Hierbei wurde eine Starklicht-abhängige, über den Redox-Zustand von Glutathion vermittelte Regulation der Transkription als Folge der Aktivitätsänderung der PTK postuliert (Baginsky et al., 1999, Ogrzewalla et al., 2002 Baena-Gonzalez et al., 2001). Weiterhin wurde berichtet, dass Casein Kinasen II, wie das Genprodukt von *PPP10*, an der Phosphorylierung von Nukleotid-assoziierten Proteinen (Kanekatsu et al., 1993, 1995, Jeong et al., 2004, Lisitsky et al., 1995) beteiligt zu sein scheinen. Folglich wurden Expressionsanalysen von Genen durchgeführt, die entweder im Chloroplasten oder Mitochondrien kodiert sind. Weiterhin wurden die Expressionen redox-regulierter kernkodierter Gene untersucht. Für diese Transkriptanalyse der Linie *pppk10-2* und dem Wildtyp nach Beleuchtung mit 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2,5 Stunden und 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für zwei Stunden wurden *cDNA-Arrays* nach Kandlbinder et al. (2004) und Finkemeier et al. (2005) durchgeführt. Bei der folgenden Auswertung wurden nur Gene berücksichtigt, die mindestens unter einer der getesteten Bedingungen eine signifikante Änderung ( $p < 0,05$ ) der Transkriptmenge zeigten.

### 7.16.1 Die Transkriptmengen plastidenkodierter Gene sind beeinflusst

Zunächst wurde jedoch die Expression der plastidenkodierten Gene *psaA* und *psbA* als repräsentative Vertreter von Transkripten für die Photosysteme I und II, in Abhängigkeit von unterschiedlicher Lichtstärke, in den Insertionsmutanten *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp mittels Northern-Analysen untersucht.



**Abbildung 7-15:** Genexpressionsanalyse von *psbA* und *psaA* in den Insertionsmutanten zum Gen *PPPK10* im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen als Folge der Inkubation in Dunkelheit, Licht mit der Intensität während der Wachstumsphase und Starklicht (1500 µE/m²s). In (A) der Abbildung sind die Transkripte von 6 Tage alten Pflanzen dargestellt. In (B) sind die Transkripte von 4 Wochen alten Pflanzen unter den angegebenen Lichtbedingungen dargestellt. *16sRNA* diente als Ladungskontrolle.

Hierzu wurden (A) Pflanzen im Keimlingsstadium, die in Sterilkultur herangezogen wurden, und (B) Pflanzen aus Erdkultur im Alter von 4 Wochen untersucht. Zunächst war festzustellen, dass sich die Expression der *psbA*-mRNA, sowohl im Keimlingsstadium, als auch in adulten Pflanzen der untersuchten Genotypen, in Abhängigkeit von der Lichtintensität lediglich geringfügige Änderungen aufwies (Abbildung 7-15). Weiterhin wurde eine Regulation der *psaA*-Transkriptakkumulation deutlich. Hierbei war interessant zu bemerken, dass diese Regulation deutlicher im Keimlingsstadium der Genotypen *Col-0*, *Ws* und *pppk10-1* ausfiel, als in den adulten Pflanzen. Weiterhin bemerkenswert war, dass eben diese Regulation in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen, bei der Insertionsmutante *pppk10-2* sowohl im Keimlingsstadium, als auch im adulten Stadium der Pflanzen, deutlich schwächer ausfiel. Dies wies in Übereinstimmung mit Literaturdaten, die durch *in vitro* Transkriptionsanalysen gewonnen wurden (Baginsky et al., 1999, Ogrzewalla et al, 2002), auf eine Beteiligung der PPPK10 an der Regulation der Transkription hin. In Gegensatz zu diesen Literaturdaten, die die PTK aus Senf untersuchten, wurde in dieser Arbeit lediglich eine schwache Regulation des *psbA*-Transkripts festgestellt. Dies war zunächst überraschend. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Varianz der Transkriptmenge von *psaA*

infolge einer Lichtqualitätsänderung von PSI-spezifischem Licht zu PSII-spezifischem und umgekehrt, im Vergleich zur *psbA*-Transkriptmenge, stärker variiert (Fey et al., 2005). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse von Fey et al., 2005 und den Transkriptanalysen dieser Arbeit, kann so eine Spezies-abhängige Regulation des *psbA*-Transkription in Abhängigkeit von Redox-Signalen postuliert werden.

Ein umfassenderes Bild chloroplastidärer Transkription konnte mittels Macroarray-Untersuchungen nach Kandlbinder et al. (2004) gewonnen werden. Da anhand der Northern-Analysen die deutlichsten Unterschiede zwischen Insertionsmutante *pppk10-2* und Wildtyp festgestellt wurden, wurde die Abundanz der chloroplastidären Transkripte von Keimlingen der Insertionsmutante *pppk10-2* und des Wildtyp jeweils nach 2,5 Stunden bei einer Lichtintensität von 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , wie sie während der Wachstumsphase vorlag, und nach 2 Stunden bei einer Lichtintensität von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  miteinander verglichen.

Bereits in den Proben der Linie *pppk10-2* und des Wildtyps nach einer Beleuchtung von 2,5 Stunden mit 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  lassen sich deutliche Unterschiede in der Transkriptmenge feststellen. So akkumulierten die Transkripte jener Genprodukte, die in der Genexpression eine entscheidende Rolle spielen, in der Insertionslinie *pppk10-2* (Abbildung 7-16A). Die Expression des Gens *rpoB* ist unter diesen Bedingungen um das Dreifache, die des Gens *rpoA* um mehr als das Zweifache in der Mutantenlinie *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Auch die Expression des Gens *rpoC1* ist um den Faktor 1,5 in der Mutante, verglichen mit der des Wildtyps, erhöht. Neben diesen für Untereinheiten der bakterien-ähnlichen RNA-Polymerase der Chloroplasten kodierenden Gene, konnte für weitere, in der Genexpression involvierte Gene, eine differentielle Expression beobachtet werden. Auch die Transkripte der Gene *matK* und *rps16* sind in der Insertionsmutante *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp akkumuliert. Im Gegensatz dazu sind die Transkripte der ATPase-Untereinheiten A, B, E, F und H, sowie der Untereinheiten der Photosysteme PSBA, B, C, D und PSAA signifikant reduziert. Weiterhin waren die Transkripte der Photosystem I-Assemblierungsfaktoren YCF3 und YCF4 in der Linie *pppk10-2* weniger stark akkumuliert, als es im Wildtyp der Fall war (Abbildung 7-16A).

Nach einem Starklichtstimulus von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für zwei Stunden könnten drastische Veränderungen im Verhältnis der Transkriptmengen einiger plastidenkodierter Gene in der Insertionslinie *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 7-16B). So

waren nun in der Insertionsmutante größere Transkriptmengen der ATPase-Untereinheiten A, B, E, F und H zu detektieren. Wie aus Abbildung 7-16C und D deutlich wird, ließ sich diese Zunahme des Verhältnisses der Transkriptmenge auf die signifikante Reduktion der Transkriptmenge des Wildtyps nach Erhöhung der Lichtstärke und einem zum Teil schwachen Anstieg der Transkriptmengen in der Insertionsmutante unter gleichen Bedingungen, zurückführen. Auch die Transkripte der für Untereinheiten des Photosystem II kodierenden Gene *psbA*, *B*, *C* und *D* wurden durch den Starklichtstimulus um das 1,3 bis 1,8 fache in der Mutante akkumuliert. Während die Transkripte der Gene *psbA*, *C* und *D* im Wildtyp unter diesen Bedingungen nicht signifikant reguliert wurden, war eine Reduktion der Transkripte des *psbB*-Gens zu beobachten. Die Transkripte des *psaA*-Gens wurden sowohl in der Insertionsmutante *pppk10-2* als auch im Wildtyp infolge der Starklichtbehandlung reduziert. Konsistent mit den Ergebnissen der Northern-Transkriptanalyse war die Reduktion der Transkriptmenge in dem Wildtyp stärker als in der Insertionsmutante. Ebenfalls der gleichen Tendenz folgte die Regulation der Transkripte *accD* und *ycf1*. Beide wurden infolge des Starklichtreizes in Wildtyp und Mutante akkumuliert. Hierbei konnten jedoch signifikant mehr Transkripte dieser Gene in der Insertionsmutante als im Wildtyp detektiert werden. Interessant war auch, dass die Transkripte, die für die bakterien-ähnliche RNA-Polymerase kodieren, durch die Beleuchtung der Pflanzen mit Starklicht in ähnlichen Verhältnissen in Mutante und Wildtyp vorlagen. Hierfür erfolgte die Reduktion der Transkriptmengen nach der Starklichtbehandlung in der Insertionsmutante *pppk10-2*, sowie eine Zunahme der Transkriptmengen im Wildtyp nach gleicher Behandlung (Abbildung 7-16B, C, D).

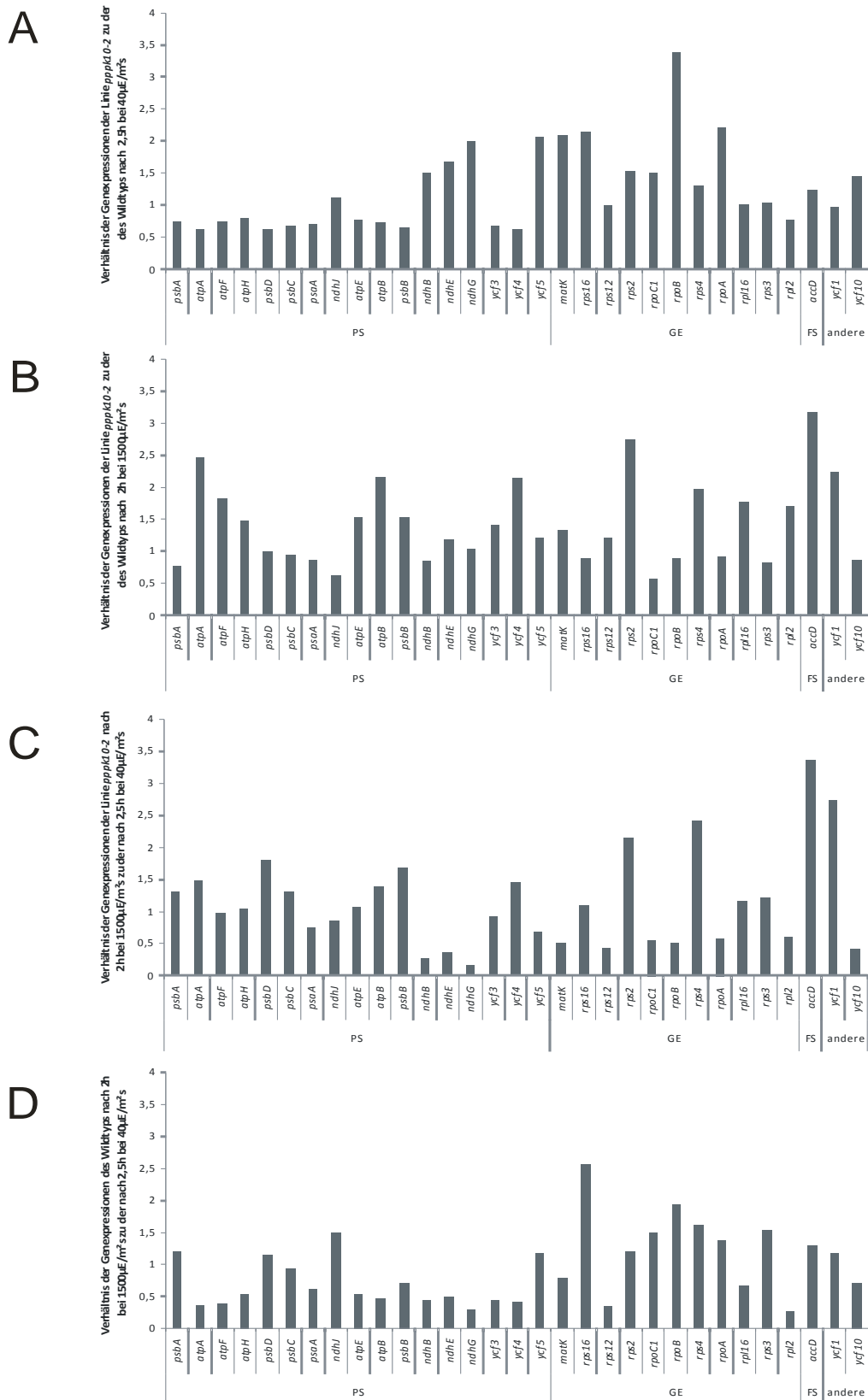


Abbildung 7-16: Änderungen der Transkriptabundanz plastidenkodierter Gene, dargestellt als Verhältnis der Transkriptmengen zwischen (A) der Linie *pppk10-2* und der des Wildtyps nach 2,5 h Beleuchtung mit einer Lichtintensität von 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , (B) der Linie *pppk10-2* und der des Wildtyps nach 2 h Beleuchtung mit einer Lichtintensität von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , sowie als das Verhältnis der Transkriptmengen nach 2 h bei 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  zu 2,5 h bei 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  (C) der Linie *pppk10-2* und (D) des Wildtyps. Die plastomkodierten Gene wurden hinsichtlich ihrer Funktion in der Photosynthese (PS), Genexpression (GE), Fettsäuresynthese (FS) und anderen gruppiert.



### **7.16.2 Die Abundanz von Transkripten, deren Translationsprodukte Funktionen in den Mitochondrien erfüllen, ist beeinflusst**

Das Genprodukt PPPK10 kommt sowohl in den Chloroplasten, als auch in den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* vor. Ein Einfluss auf die chloroplastidäre Transkriptabundanz infolge veränderter Lichtintensitäten konnte bereits gezeigt werden. Im Folgenden wurde ein möglicher Einfluss der reduzierten Expression von *PPPK10* auf die Transkriptabundanz von Genen mit einer Funktion in den Mitochondrien unter Lichtintensitäten, wie sie während der Wachstumsphase vorlagen und nach Starklicht, mit einer Lichtintensität von  $1500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , untersucht. Hierfür fanden Macroarrays nach Finkemeier et al. (2005) Verwendung. Zur Auswertung herangezogen wurden nur Gene, die unter mindestens einer der untersuchten Bedingungen eine signifikante Änderung ( $p < 0,1$ ) in der Abundanz zeigten.

Wie in Abbildung 7-17A deutlich wird, unterschied sich die Abundanz jener Transkripte, deren Translationsprodukte einer Funktion in den Mitochondrien nachkommen, geringfügig zwischen der Insertionsmutante *pppk10-2* und dem Wildtyp, nachdem die Keimlinge 2,5 Stunden bei einer Lichtintensität von  $40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  inkubiert wurden. Auffallend ist, dass vor allem die kernkodierte Untereinheit der ATP-Synthase (ATPS6 und ATPSE3) um den Faktor 1,7 in der Insertionsmutante *pppk10-2* akkumulierten, während die Expression der chondromkodierte ATP-Synthase-Untereinheit ATP6-1 um die Hälfte in der Mutantenlinie, verglichen zum Wildtyp, reduziert war. Auch die am Aufbau des NADH-Dehydrogenase-Komplexes beteiligten, chondromkodierte Untereinheiten Nad9 und Nad4L sind in der Insertionsmutante unter Lichtbedingungen, wie sie während der Wachstumsphase vorlagen, in ihrer Transkriptabundanz um den Faktor 2 reduziert. Keine signifikanten Unterschiede lassen sich unter diesen Bedingungen in der Transkriptabundanz der ribosomalen Proteine Rpl16 und Rps3 zwischen Insertionsmutante und Wildtyp beobachten.

Nach Inkubation der Keimlinge des Wildtyps und der Insertionsmutante *pppk10-2* für 2 Stunden bei  $1500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  konnte jedoch ein signifikanter Anstieg des Transkriptverhältnisses dieser Transkripte in der Mutante zum Wildtyp registriert werden (Abbildung 7-17B).

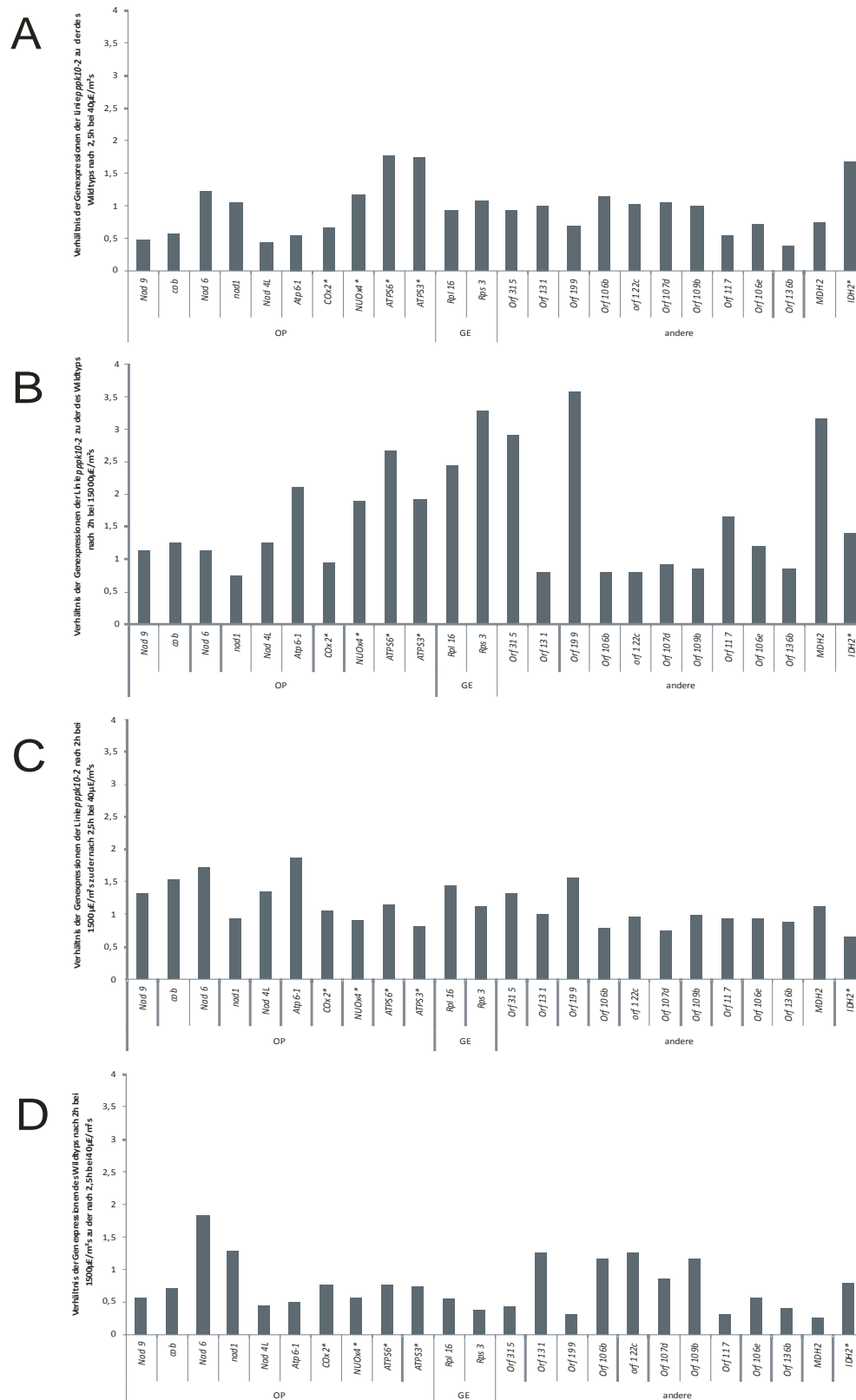


Abbildung 7-17: Änderungen der Transkriptabundanz von Genen, deren Translationsprodukte Funktionen in den Mitochondrien haben, dargestellt als Verhältnis der Transkriptmengen zwischen (A) der Linie *ppk10-2* und der des Wildtyps nach 2,5 h Beleuchtung mit einer Lichtintensität von 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , (B) der Linie *ppk10-2* und der des Wildtyps nach 2 h Beleuchtung mit einer Lichtintensität von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ , sowie als das Verhältnis der Transkriptmengen nach 2 h bei 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  zu 2,5 h bei 40  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  (C) der Linie *ppk10-2* bzw. (D) des Wildtyps. Die Transkripte wurde hinsichtlich der Funktion ihrer Translationsprodukte in der Oxidativen Phosphorylierung (OP), Genexpression (GE) und anderen gruppiert. Die mit \* annotierten Gene sind im Kerngenom kodiert.

Dieser Anstieg des Transkriptverhältnisses war durch eine inverse Regulation der Transkriptabundanz im Wildtyp, verglichen mit der Insertionsmutante *pppk10-2* nach einem Starklichtreiz begründet. So wurde infolge des Anstiegs der Lichtintensität auf 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2 Stunden die Transkriptmenge von *Rpl16* und *Rps3* reduziert (Abbildung 7-17D). In der Insertionsmutante wurden leicht zunehmende Mengen dieser Transkripte beobachtet (Abbildung 7-17C). Für eine Vielzahl an Transkripten konnte diese Reduktion der Transkriptmengen, wie eben für *Rpl16* und *Rpl3* beschrieben, als Reaktion auf einen Starklichtstimulus im Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 7-17D). Im Gegensatz dazu, blieb die Transkriptabundanz der meisten untersuchten Gene nach Starklicht in der Insertionsmutante *pppk10-2* auf dem Niveau der Transkriptabundanz unter Wachstumsbedingungen oder darüber (Abbildung 7-17C). Da die Insertionsmutante *pppk10-2* durch eine reduzierte Expression des Gens *PPPK10* gekennzeichnet war, kann durch die Array-Untersuchungen der mitochondrialen Genexpression eine Funktion von PPPK10 als negativer Regulator der mitochondrialen Genexpression nach Starklicht vorgeschlagen werden.

### **7.17 Die Zusammensetzung der chloroplastidären Proteinkomplexe von *pppk10-2* ist mit der des Wildtyps vergleichbar**

In den bisher beschriebenen Ergebnissen konnte ein Effekt auf die Transkription der Mutante beobachtet werden. Da, entsprechend der letzten veröffentlichten Annotation des Genoms von *Arabidopsis thaliana*, 87 Protein-kodierende Gene im Plastom (Tair 8 release, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) enthalten sind, und 57% davon an dem photosynthetischen Elektronentransport in der Thylakoidmembran beteiligt sind, wurde die Proteinzusammensetzung dieser Multiproteinkomplexe mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Zunächst erfolgte die Trennung der nativen Proteinkomplexe der Thylakoidmembran entsprechend ihres Molekulargewichtes, anschließend wurden die Proteine der Größe nach getrennt, die an dem Aufbau eines Komplexes beteiligt waren. Wie in der Abbildung 7-18: deutlich wird, war die Zusammensetzung der Thylakoidmembranen in allen Genotypen vergleichbar. Lediglich die chloroplastidäre Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Abbildung 7-18, Ziffer 1) konnte in der Thylakoidpräparation der Linie *pppk10-2* nicht detektiert werden. Hierbei handelte es sich jedoch um ein kernkodiertes Protein des Zuckerphosphat-Metabolismus, und nicht um ein Enzym der photosynthetischen

Elektronentransportkette der sogenannten Lichtreaktion (Schnarrenberger und Kruger, 1986).

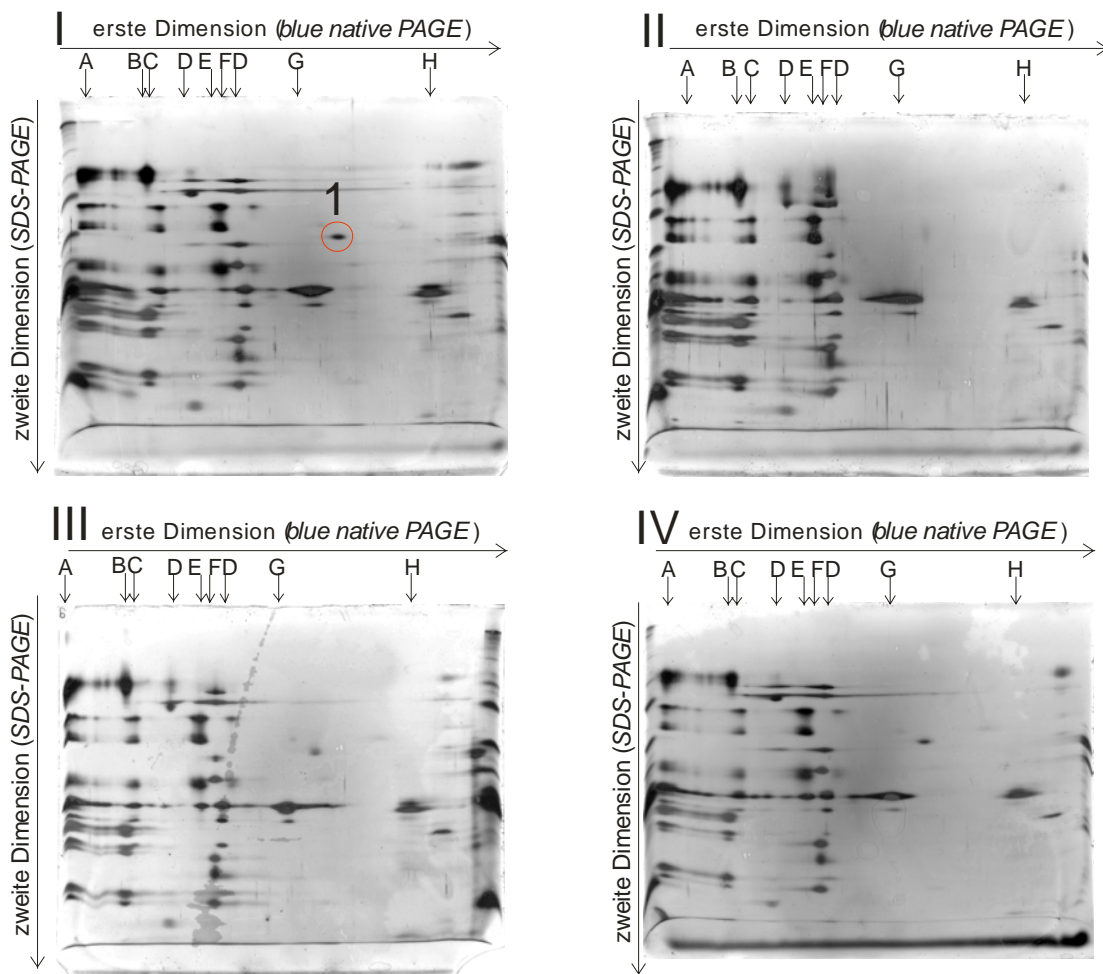
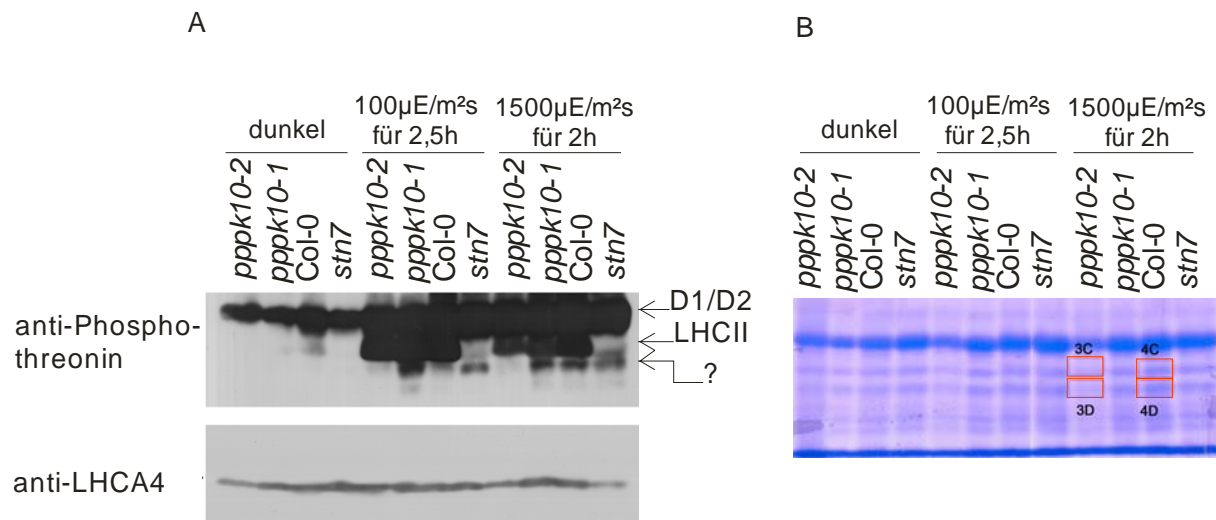


Abbildung 7-18: Trennung der photosynthetischen Komplexe der Genotypen Col-0 (I), *pppk10-2* (II), *Ws* (III) und *pppk10-1* (IV) in deren Untereinheiten. In der ersten Dimension erfolgte die Trennung der Komplexe (A - Superkomplexe, B – PSI mit LHCI, C – PSII-Dimer mit LHCII, D – ATPase, E – PSII-Kernkomplex, F – Cytochrom  $b_6f$ -Komplex, G – LHCII-Trimer, H – LHCII-Monomer). In der zweiten Dimension wurden die Bestandteile der Komplexe mittels denaturierender SDS-PAGE getrennt. Hierbei wurde der mit der Ziffer 1 gekennzeichnete Proteinspot nicht in der Insertionsmutante detektiert, und als Fructose 1,6-bisphosphat-Aldolase mittels LC/MS identifiziert.

### 7.18 Die Proteinphosphorylierungsmuster des Stromas und der Thylakoide sind in der Linie *pppk10-2* verändert

Wie bereits dargelegt, wurde durch die Arbeiten von Salinas et al., 2006 nicht nur die subzelluläre Lokalisation in den Chloroplasten bestätigt. Weiterhin wurde gezeigt, dass keine der für die Aktivität und Spezifität der Casein Kinase II notwendigen  $\beta$ -Untereinheiten eine plastidäre Lokalisation aufwies. Weiterhin wiesen Literaturdaten klar darauf hin, dass Casein Kinasen II, um die es sich bei dem Genprodukt PPPK10 handelte, eine breite

Substratspezifität aufweisen (Meggio und Pinna, 2003). Daher wurde die Phosphorylierung der Thylakoide, in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtintensitäten, der vier Genotypen *pppk10-2*, *pppk10-1*, Col-0 und *stn7* (Bonardi et al., 2005) untersucht. Hierzu wurden die Proteine der Thylakoidmembran durch eine denaturierende 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Antikörper, die spezifisch Phosphothreonin erkennen, immunodekoriert.

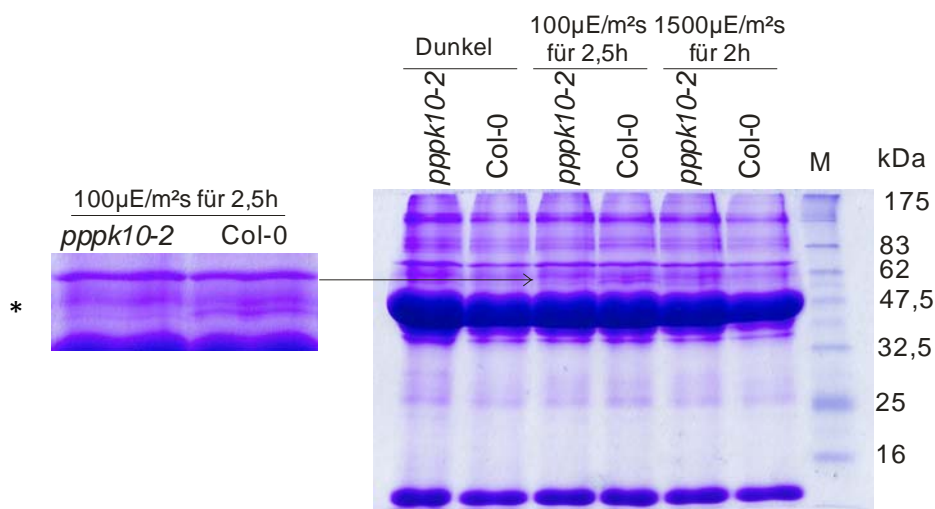


**Abbildung 7-19:** (A) Phosphorylierung der Thylakoidmembran-Proteine D1, D2, LHCII und einem unbekanntem Protein. Die zu untersuchenden Pflanzen wurden zunächst dunkeladaptiert (dunkel), anschließend für 2,5 h im Licht mit einer Quantität von 100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  inkubiert (100  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2,5 h), um dann für weitere 2 h Licht mit einer Intensität von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  ausgesetzt zu werden. Nach der Präparation der Thylakoide, wurden die Proteine durch eine 10%ige SDS-PAGE getrennt. Die Detektion der Phosphoproteine erfolgte mittels Immunoblot-Analyse mit einem anti-Phosphothreonin-Antikörper. Als Ladungskontrolle diente eine Immunoblot-Analyse mit einem Anti-LHCA4-Antikörper. (B) Repräsentativer Coomassie-R250-gefärbter Gelausschnitt, für den der Immunoblot in (A) dargestellt ist. Die roten Kästchen 3C, 3D, 4C und 4D markieren Bereiche, die für die Proteinidentifizierung mittels LC/MS verwendet wurden.

Wie in Abbildung 7-19A gezeigt, ist die Phosphorylierung der am Aufbau der Reaktionszentren von Photosystem II beteiligten Proteine D1 und D2 in allen untersuchten Genotypen identisch. Auch CP29 und CP43 (nicht dargestellt) unterliegen der bereits in der beschriebenen Phosphorylierung in allen untersuchten Genotypen. Im Gegensatz zur Kontrolllinie *stn7* (Bonardi et al., 2005), konnte weiterhin die lichtabhängige Phosphorylierung der Proteine des Lichtsammelkomplexes LHCII im Wildtyp, aber auch in den Insertionslinien *pppk10-2* und *pppk10-1* gezeigt werden (Abbildung 7-19A). Desweiteren wies die Phosphorylierung des kürzlich beschriebenen Phosphoproteins CaS (Vainonen et al., 2008) keine Unterschiede in der Phosphorylierung zwischen den untersuchten Genotypen auf (nicht dargestellt). Jedoch konnte ein neues Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 22kDa identifiziert werden. Die Phosphorylierung des Proteins

schien im Wildtyp mit steigender Lichtintensität zuzunehmen. Bemerkenswert war weiterhin, dass dieses Phosphoprotein in der Insertionslinie *pppk10-2* nicht nachgewiesen werden konnte. Anschließend wurde der Bereich, in dem das potentielle Phosphoprotein lief, aus einem entsprechenden Coomassie-R250 gefärbten Gel ausgeschnitten und mittels LC/MS untersucht. Eine Vielzahl an Proteinen konnte in diesen Gelabschnitt nachgewiesen werden, jedoch gelang es nicht, entsprechender Phosphopeptide in der Wildtypprobe zu identifizieren. (Anhang: Tabellen A-2 bis A-5).

Weiterhin wurden die Stromafractionen der Insertionslinie *pppk10-2* im Vergleich mit der des Wildtyps Col-0 untersucht. Die in Western-Analysen mittels Anti-Phosphothreonin erhaltenen Signale waren jedoch so schwach, dass eine Auswertung nicht möglich war. Daher erfolgte eine Anreicherung der Phosphoproteine mittels PIERCE® Phosphoprotein Enrichment Kit.



**Abbildung 7-20:** Phosphoprotein-angereicherte Stromafraction der Genotypen *pppk10-2* und Col-0. (A) Die zu untersuchenden Pflanzen wurden zunächst dunkeladaptiert (dunkel), anschließend für 2,5 h im Licht mit einer Quantität von  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  inkubiert ( $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2,5 h), um dann für weitere 2 h Licht mit einer Intensität von  $1500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  ausgesetzt zu werden. Nach der Präparation der Stromafraction und Anreicherung der Phosphoproteine, wurden diese Proteine durch eine 12,5%ige SDS-PAGE getrennt. Die aufgetrennten Phosphoproteine wurden durch eine Coomassie-R250-Färbung visualisiert. (B) Fokussierter Bildausschnitt im Molekulargewichtsbereich von 70kDa bis 50 kDa. Ein Phosphoprotein war in der Linie *pppk10-2* unter der Detektionsgrenze exprimiert (markiert mit \*). Auf eine Markierung der mittels LC/MS untersuchten Gelbereiche wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Wie in Abbildung 7-20 deutlich wird, waren die Proteinmuster der Phosphoproteinfraktionen nicht nur zwischen den zwei untersuchten Genotypen Col-0 und *pppk10-2* nahezu identisch, sondern auch die Behandlung des Pflanzenmaterials mit Dunkelheit,  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  und  $1500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  schien keine gravierenden Effekte auf den Pool der Phosphoproteine dieser Stromapräparationen auszuüben. Lediglich im Molekulargewichtsbereich von 50 bis 60 kDa

konnte eine Wildtyp-spezifische Bande (d.h. nicht in der Linie *ppk10-2*) detektiert werden. Mittels LC/MS konnte eine Vielzahl möglicher Kandidaten, die eine Phosphorylierung tragen könnten, detektiert werden (Anhang: Tabellen A-6 und A-7). Der direkte Nachweis von phosphorylierten Peptiden dieser potentiellen Substrate des Genproduktes PPPK10 gelang bislang nicht.

### **7.19 Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Insertionslinien mit einer Insertionsmutation im Gen *PPPK6***

Neben dem Genprodukt PPPK10, konnte auch das Produkt des Gens *PPPK6* in den Chloroplasten nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich ebenfalls um eine Serin/Threonin-Proteinkinase. Wie bereits im Abschnitt 7.3 vorgestellt, konnten drei *Arabidopsis thaliana* Linien mit einer Insertion im Gen *PPPK6* identifiziert werden (vgl. Abbildung 7-3).

#### **7.19.1 Entgegengesetzte mRNA-Expression des Gens *PPPK6* in den Insertionsmutanten**

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit die Expression der *PPPK6*-mRNA infolge der T-DNA Insertionen in den homozygoten Linien *pppk6-1*, *pppk6-2* und *pppk6-3* verändert war. Hierzu wurden die Transkriptmenge von *PPPK6*, relativ zur *Actin1*-Expression und normalisiert zur Expression im Wildtyp mittels reverser Transkriptase-vermittelter *real-time* PCR (RT-*real-time* PCR) bestimmt.

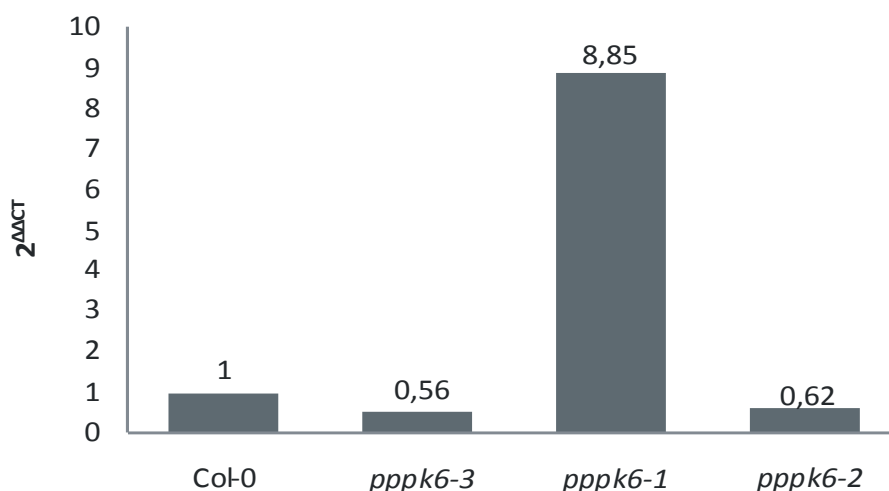


Abbildung 7-21: Expression der *PPPK6*-mRNA in den Insertionsmutanten dieses Gens. Die Werte geben die relative Expression der *PPPK6*-mRNA zur *Actin1*-mRNA, normalisiert zum Wildtyp (col-0) an.

Wie aus der Abbildung 7-21 deutlich wird, führte die Insertion in der Linie *pppk6-3* im Promotorbereich des Gens *pppk6* zu einer Reduktion des entsprechenden Transkripts. Auch für die Linie *pppk6-2* konnte eine Reduktion der Transkriptmenge von *PPPK6* beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde eine Akkumulation des entsprechenden Transkripts um den Faktor 8,8 infolge der Insertion im ersten Exon der Linie *pppk6-1* festgestellt.

### 7.19.2 Keine Auxin-abhängigen Unterschiede im Wurzelwachstum

Obwohl es sich bei den Insertionsmutanten zu *PPPK6* nicht um sogenannte *knock out* Mutanten handelte, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Durch *in silico* Transkriptanalysen mittels Genevestigator ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch), (Zimmermann et al., 2004, Zimmermann et al., 2005)), wurde ein Auxin-abhängiger Anstieg der Transkriptmenge von *PPPK6* beobachtet (Abbildung 7-22).

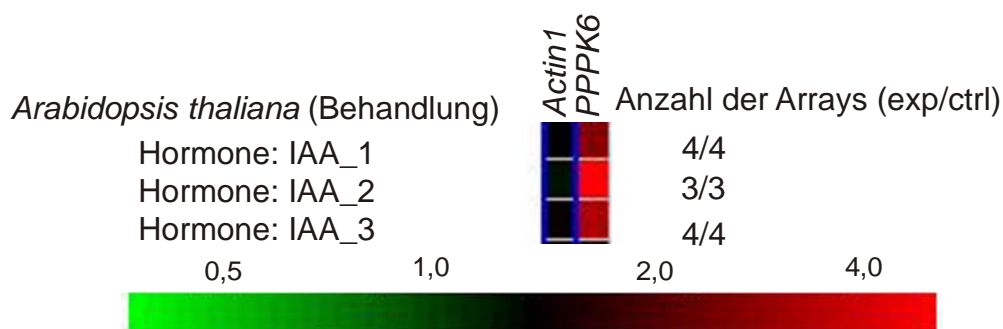
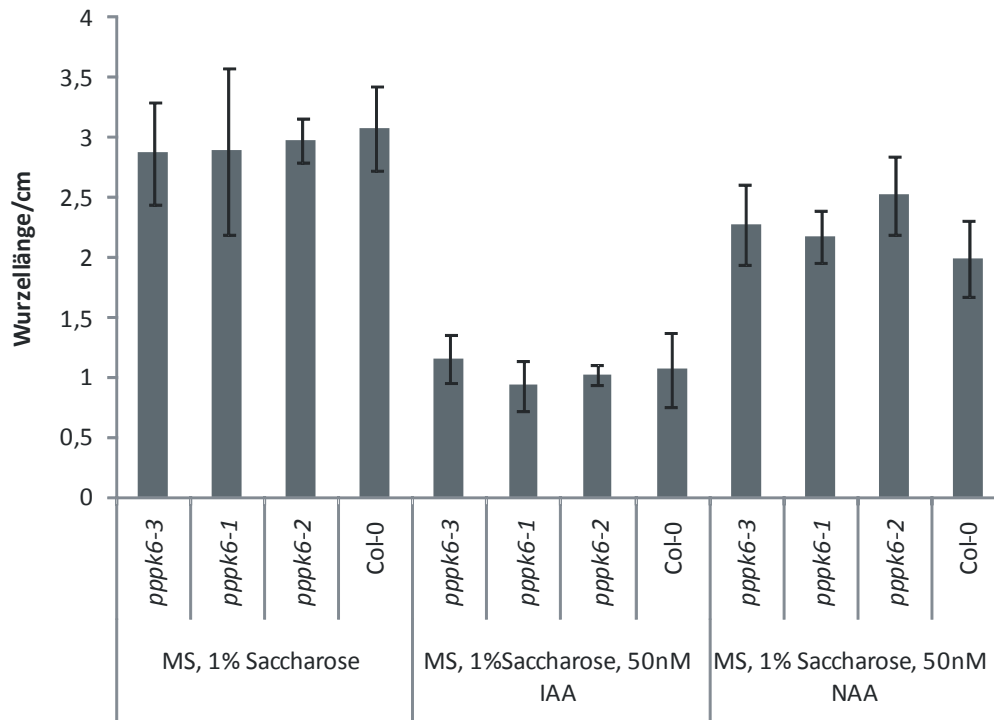


Abbildung 7-22: *In silico* Analyse der *PPPK6*-Transkriptmenge in Abhängigkeit von exogen appliziertem Auxin. Abbildung nach [genevestigator.ethz.ch](http://genevestigator.ethz.ch), modifiziert.

Das Pflanzenhormon Auxin wird sowohl im Cytosol, als auch in Chloroplasten gebildet (McQueen-Mason und Hamilton, 1989, Ros Barceló et al., 1990). Daraus ergeben sich zwei Pools, auf die intrazelluläres Auxin verteilt ist: erstens im Cytosol und zweitens in den Chloroplasten. Diese Homöostase zwischen den zwei Auxin-Pools wird reguliert (Sitbon et al., 1993). Aufgrund der Lokalisation von *PPPK6* im Chloroplasten und der Zunahme der Transkriptmenge infolge von Auxinzugabe, ist es möglich, dass diese Kinase an der Regulation dieser Homöostase beteiligt sein könnte. Ein gängiger Test, die Reaktion von Pflanzen auf Veränderungen im Auxinhaushalt durch exogene Applikation zu untersuchen, ist die Analyse der Wurzellänge in Abhängigkeit von Auxin. Entsprechend wurde getestet, ob die Insertionsmutanten des Gens *PPPK6* einen Effekt bei der Auxin-abhängigen Hemmung des Wurzelwachstums zeigten.





**Abbildung 7-23:** Wurzellänge der Mutantenlinien, die eine Insertion im Gen *PPPK6* aufwiesen, im Vergleich zu der des Wildtyps in Abhängigkeit von Auxinzugabe. Die zu untersuchenden Pflanzen wurden auf MS-Medium mit 1% Saccharose für fünf Tage angezogen und anschließend für weitere 10 Tage auf MS-Platten mit 1% Saccharose, oder mit 1% Saccharose mit 50 nM Indol-3-essigsäure (IAA) oder mit 50 nM Naphthylessigsäure (NAA, synthetisches Auxin). Anschließend wurde die Wurzellänge von mindestens 4 Pflanzen ermittelt, und als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Wie aus Abbildung 7-23 deutlich wird, sind keine signifikanten Unterschiede infolge der Auxinzugaben von 50 nM Indol-3-essigsäure bzw. 50 nM Naphthylessigsäure auf die Hemmung des Wurzelwachstums zu beobachten. Damit kann eine Funktion von *PPPK6* in der Regulation der Auxinsynthese jedoch nicht ausgeschlossen werden, weil hinsichtlich der Expressionsdaten (vgl. Abschnitt 7.19.1) keine der Mutanten eine gravierende Reduktion der Transkriptmenge aufwies und die Insertionen der Linien *pppk6-1* und *pppk6-2* die katalytische Domäne des Translationsproduktes um maximal 20 Aminosäuren verkürzen würde. Entsprechend war weiterhin anzunehmen, dass die Translationsprodukte den Gens *PPPK6* in allen drei Insertionsmutanten funktionell zu sein schien. Dennoch, und da Heilmann et al. (1981) einen lichtabhängigen Auxin-Flux in die Chloroplasten zeigte, wurden die Phosphorylierungsmuster der Chloroplasten der Insertionsmutanten nach Dunkelinkubation und nach Belichtung mit  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2,5 h mittels Immunoblot-Analysen mit Anti-Phosphothreonin untersucht. Dabei ergaben sich jedoch keine Unterschiede in der Phosphorylierung von Dunkel-adaptierten Pflanzen zu Pflanzen nach  $2,5 \text{ h}$  bei  $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  zwischen den Insertionsmutanten und dem Wildtyp (nicht gezeigt).

## 8. Diskussion

### 8.1 Vorhersage chloroplastidärer Proteinkinasen und experimentelle Bestätigung

Phosphorylierung in den Chloroplasten ist eine seit langem bekannte post-translationale Modifikation von Proteinen (Bennett, 1977). Die höchste Konzentration an Phosphopeptiden wurde in den Chloroplasten gefunden (Bennett, 1991). Jedoch wurden bislang nur acht Proteinkinasen in den Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* beschrieben (vgl. Tabelle 5-1). In dieser Arbeit wurden Proteinkinasen des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich einer N-terminalen chloroplastendirektierenden Transitsequenz mittels einer Kombination aus neun verschiedenen Vorhersagealgorithmen analysiert. Die chloroplastidäre Lokalisation von 12 Proteinkinasen wurde experimentell überprüft. Hierbei konnte beobachtet werden, dass lediglich drei der putativen 12 Chloroplastenproteinkinasen tatsächlich in diesem Kompartiment lokalisiert sind. Das Ergebnis der Lokalisationsexperimente ist nicht konsistent mit bereits publizierten Daten. So zeigten Richly und Leister (2004), dass durch die Kombination von drei verschiedenen Vorhersagealgorithmen die Spezifität der Vorhersage einer chloroplastidären Lokalisation um 42% gesteigert werden konnte. Entsprechend wurde angenommen, im Rahmen dieser Lokalisationsstudie etwa sieben Proteinkinasen in den Chloroplasten zu finden.

Deutlich wurde jedoch, dass mindestens neun der 12 untersuchten Proteinkinasen in oder an intrazellulären Strukturen, lokalisiert sind. So wurde das Fusionsprodukt von PPPK8 mit RFP in kleinen Kompartimenten lokalisiert, die Mitochondrien entsprechen könnten. Weiterhin konnten für die RFP-Konstrukte *PPPK11* und *PPPK12*, neben einer Lokalisation im Cytosol, auch eine Anreicherung an der Peripherie der Protoplasten beobachtet werden. Für diese beiden Proteine wurde im Zuge von Proteomics-Studien eine Plasmamembranlokalisation gefunden (Dunkley et al., 2006, Nuhse et al., 2003; Nuhse et al., 2004). Diese Lokalisation konnte zwar aufgrund einer fehlenden Positivkontrolle für die Plasmamembran in unserem experimentellen Ansatz nicht bestätigt werden, jedoch wurde durch diese Proteomics-Studien die in unserem Versuchsansatz beobachtete nicht-chloroplastidäre Lokalisation bestätigt.

Wegen der kompartimentierten Lokalisation jener neun Proteinkinasen kann gefolgert werden, dass es im Falle der Proteinkinasen problematisch ist, zwischen den exakten subzellulären Lokalisationen mithilfe bioinformatischer Hilfsmittel zu unterscheiden.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass aus der Familie der transmembranen Rezeptorkinasen und verwandten nicht-transmembranen Rezeptorkinasen in unserem Lokalisationsansatz kein Vertreter in den Chloroplasten bestätigt werden konnte. Bei dieser Familie handelt es sich um Proteinkinasen, die an der Signalübertragung über Membranen (im Besonderen über die Plasmamembranen) beteiligt sind (Morillo und Tax, 2006). Lediglich die aus Tabak isolierte Proteinkinase NtDSK1 (*Nicotiana tabacum dual specificity kinase1*), die ihre homologesten Verwandten in der Familie der transmembranen Rezeptorkinasen und verwandten nicht-transmembranen Rezeptorkinasen hat, konnte bislang in den Chloroplasten von *Arabidopsis* Protoplasten lokalisiert werden (Cho et al., 2001). Sequenzhomologiesuchen ergaben, dass das NtDSK1-Homologe in *Arabidopsis thaliana* das Genprodukt AT3G13690 ist (BLAST: *Identity*: 41%, *Positives*: 55%, eigene Untersuchungen). Dieses Protein wird von keinem der neun verwendeten Vorhersagealgorithmen in den Chloroplasten vorhergesagt, und erfüllte daher nicht das anfängliche Auswahlkriterium von vier von vier Vorhersagen eines plastidendirektierenden Transitpeptids in der Sequenz. Entsprechend gehören die Kinasen, die in den Chloroplasten nachgewiesen werden konnten, der Klasse 4 (nicht-transmembrane Proteinkinasen) an.

## **8.2 PPPK10 ist die erste Proteinkinase, die in den Chloroplasten und Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* lokalisiert ist**

Im Rahmen der Lokalisationsstudien konnte für die Proteinkinase PPPK10 ( $\alpha$ cp, nach Salinas et al. (2006)) neben einer Lokalisation in den Chloroplasten, auch eine Lokalisation in den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Die Lokalisation von Genprodukten eines Locus in zwei subzellulären Kompartimenten ist bereits seit längerem bekannt (z.B. Small et al, 1998). Auch für bestimmte Proteinkinasen wurden duale Lokalisationen beschrieben (Wang et al., 1996, Jaaro et al., 1997). Diese Proteinkinasen werden abhängig von Stimuli entweder im Cytosol oder im Zellkern lokalisiert. Jedoch war bislang keine Proteinkinase bekannt, die in die beiden semi-autonomen Organellen - die Mitochondrien und die Chloroplasten - importiert wurden. So wurden bislang vor allem Proteine des DNA- und RNA-Metabolismus, der Translation und Zellabwehr beschrieben, die in diese beiden

Organellen dual dirigiert werden (Silva-Filho, 2003). Hierunter sind 17 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (Duchene et al., 2005), die in den Chloroplasten als auch in den Mitochondrien zu finden waren. Aber auch Proteine, die an der Transkription in den Organellen (z.B. die kernkodierte *phage-like* RNA Polymerase RpoT;2 (oder auch RPOT<sub>mp</sub>), Hedtke et al., 2000) und deren Regulation (Sigma-Faktor ZmSig2B aus Mais, Beardslee et al., 2002) beteiligt sind, wurden als dual dirigiert in den Mitochondrien und Chloroplasten gefunden. Umso interessanter war die Beobachtung des dualen Imports von PPPK10 in die Mitochondrien und Chloroplasten, da angenommen wird, dass jenem Mechanismus vor allem jene Proteine unterliegen, die in beiden Organellen basale Funktionen erfüllen (Peeters und Small, 2001). Ist daher auch PPPK10 in Prozesse involviert, die für beide Organellen von essentieller Bedeutung sind? Diese Frage muss aus zwei Gründen klar bejaht werden. Zum einen belegen zahlreiche Literaturstellen eine Beteiligung von Kinasen dieser Gruppe in essentiellen Prozessen, wie DNA-/RNA-Metabolismus, aber auch in der Signaltransduktion (Meggio und Pinna, 2003, Salinas et al., 2006). Ein zweiter deutlicher Hinweis auf eine essentielle Funktion dieser Kinasen in Chloroplasten und/oder Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* ist der Phänotyp der Insertionslinie *pppk10-3*: homozygote Mutanten sind selbst in Sterilkultur nicht keimungsfähig. Dieser letale Phänotyp konnte auch für Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gezeigt werden. In diesem Falle mussten beide für Casein Kinasen II $\alpha$ -Untereinheiten kodierenden Gene ausgeschaltet werden (Padmanabha et al., 1990). Im Gegensatz zu Hefe, wo diese Gene als Duplikat vorliegen, weist *Arabidopsis thaliana* vier Gene auf, die für Casein Kinasen II  $\alpha$ -Untereinheiten kodieren. Allerdings ist das Genprodukt des Gens *PPPK10* das einzige unter diesen vier homologen Proteinen in *Arabidopsis*, welches in die Chloroplasten (Salinas et al., 2006) und Mitochondrien transportiert wird.

### **8.3 Putative Substrate von PPPK10**

Der letale Phänotyp der Hefen konnte durch Expression der katalytischen Untereinheit aus anderen Organismen (Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen) komplementiert werden (Moreno-Romero et al., 2008). Diese Demonstration der starken Konservierung dieser Proteinkinasen über eine große evolutionäre Distanz, ermöglicht auch Rückschlüsse darauf, an welchen Prozessen PPPK10 beteiligt sein könnte. So wurde ein breites Spektrum von Phosphorylierungssubstraten von Casein Kinasen II aus einer Vielzahl von Modellorganismen identifiziert. Meggio und Pinna (2003) fassten bereits 308 Proteine zusammen, die als

Substrate der Casein Kinasen II beschrieben wurden. Hierunter fanden sich 87 Signalproteine, 60 Transkriptionsfaktoren, 50 Proteine, die die DNA-Replikation, Transkription und Translation beeinflussen, aber auch Proteine viraler Herkunft und Strukturproteine (Meggio und Pinna, 2003). Deutlich weniger Phosphorylierungssubstrate sind aus dem Reich der Pflanzen bekannt.

Dennoch konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass diese Gruppe von Proteinkinasen eine entscheidende Rolle in der Zellteilung und Zell-Zyklus-Kontrolle in den Pflanzenzellen einnimmt (Espunya et al., 1999, Espunya et al., 2005, Moreno-Romero et al., 2008). Weiterhin wurde die Casein Kinasen II vermittelte Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren GFB1 (Klimczak et al., 1992), AT-1, (Datta und Cashmore., 1989), Hy5 (Hardtke et al., 2000) und HFR1 (Park et al., 2008) beschrieben. Jene Transkriptionsfaktoren sind an der Photomorphogenese beteiligt. Desweiteren wurde eine Beteiligung der Casein Kinasen II vermittelten Phosphorylierung an dem Abscisinsäure- und Salicylsäure-Signalweg, an der Samenentwicklung und dem circadianen Rhythmus (Riera et al., 2001, Moreno-Romero, 2008) beschrieben.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse waren Phosphorylierungen in den Chloroplasten, die von Casein Kinasen II vermittelt werden. Die Mehrzahl der beschriebenen und phosphorylierten Proteine war im DNA-/RNA-Metabolismus involviert, z.B. 28RNP aus Spinat (RNP: *RNA-binding protein*, Lisitsky und Schuster, 1995), p34 (aus Spinat), p35 und p39 (aus Mais) und p33 (aus Lebermoos) (Kanekatsu et al., 1995), MPF1 aus Tabak (MPF: *MAR-binding filament-like protein*, Jeong, 2004) sowie der Transkriptionsfaktor SIG1 aus Senf (Ogrzewalla et al., 2002). Aber auch Komponenten der Photosynthesemaschinerie wurden als Substrate einer Casein Kinase II vorgeschlagen (CP29: Testi et al., 1996,  $\beta$ -Untereinheit der ATPase: Kanekatsu et al., 1998).

Wegen der Vielzahl an vorgeschlagenen Phosphorylierungssubstraten untersuchten wir die Phosphorylierungsmuster der Membranfraktionen der Chloroplasten und der Stromafraktionen der Mutanten des Gens *PPPK10* im Vergleich zum Wildtyp nach Dunkelheit, 2,5 Stunden Licht mit einer Intensität, wie sie während des Wachstums vorlagen und nach zwei Stunden Licht, mit einer Intensität von  $1500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Wir konnten Proteinbanden in der Membranfraktion und der Stromafraktion nach Anreicherung der Phosphoproteine detektieren, die im Wildtyp nachzuweisen waren, jedoch nicht in der

Insertionsmutante *pppk10-2*. Diese Ergebnisse sind konsistent mit unseren Erwartungen. Weil die Insertionslinie *pppk10-1* (Insertion im Promotor), für die eine Akkumulation der *PPPK10*-mRNA festgestellt werden konnte, keine signifikanten Unterschiede im Phosphorylierungsmuster in der Membranpräparation und der Stromapräparation (nicht gezeigt) aufwies, war anzunehmen, dass das Genprodukt des Gens *PPPK10* präsent und funktionell war. Entsprechend konnten auch keine Unterschiede in der Phosphorylierung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden für die Linie *pppk10-2*, im Vergleich zu dem Wildtypen, Unterschiede in den Phosphorylierungsmustern der Membranfraktionen (eine Proteinbande bei 22kDa) und Phosphoprotein-angereicherten Stromafraktionen (eine Proteinbande bei 50-60kDa) festgestellt werden. Mittels Massenspektrometrie konnten Kandidaten als potentielle Substrate identifiziert werden. Allerdings konnten bislang keine phosphorylierten Peptide nachgewiesen werden. Die Identifizierung von phosphorylierten Peptiden mittels Massenspektrometrie wird durch mehrere Einflüsse erschwert. Zum einen liegen häufig reversibel phosphorylierte Proteine mit Funktionen in der Signaltransduktion in geringen Konzentrationen vor. Darüberhinaus ist lediglich ein geringer Prozentsatz des entsprechenden Proteins tatsächlich in der phosphorylierten Form anzutreffen (Mann et al., 2002, Reinders und Sickmann, 2005). Somit ist der Nachweis phosphorylierter Peptide durch den hohen Hintergrund an Peptiden in der nicht-phosphorylierten Form schwierig. Verschiedene Methoden der Anreicherung wurden entwickelt, um die Fraktion der phosphorylierten Proteine und Peptide anzureichern. In Rahmen dieser Arbeit wurde für die Präparation der phosphorylierten Proteine aus dem Stroma das Phosphoprotein Enrichment Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet. Dennoch gelang der Nachweis von Phosphopeptiden nach tryptischem Verdau des Probenmaterials nicht. Daher kann die Instabilität der Phosphatbindung auch im Rahmen der Untersuchungen in dieser Arbeit eine Rolle spielen. Diese Instabilitäten werden beispielsweise durch stark alkalische pH-Bedingungen bedingt, die auch während massenspektrometrischer Untersuchungen auftreten. Dies kann zum Verlust der Phosphatgruppe führen (Lohrig, 2008). Für die Identifizierung der Substrate der *PPPK10* kann in nachfolgenden Untersuchungen zum einen nach der Anreicherung der Phosphoproteine und deren tryptischen Verdau, eine Anreicherung der Phosphopeptide durchgeführt werden. Diese Vorgehensweise konnte bereits erfolgreich bei der Charakterisierung löslicher Phosphoproteine aus *Arabidopsis thaliana* angewendet werden (Lohrig, 2008). Hierbei ist allerdings eine sehr große Menge an Probenmaterial erforderlich.

Zum anderen wurde eine sensitive Methode der Identifizierung direkter Substrate durch Shah et al. (1997), Shah und Shokat (2002), sowie Elben et al. (2003) vorgeschlagen. Hierfür wurden die ATP-Bindenden der Proteinkinasen modifiziert, so dass diese Proteine in der Lage waren radioaktiv markierte ATP-Analoga zu nutzen. Die Substrate der Kinase werden durch die exklusive Nutzung der ATP-Analoga spezifisch radioaktiv markiert und können im Anschluss massenspektrometrisch identifiziert werden. Hierfür ist unter anderem die Kenntnis der Kristallstruktur zur Bestimmung der zur modifizierenden Aminosäuren hilfreich. Aufgrund der starken Konservierung der Aminosäuresequenz unter den Casein Kinasen II könnte hierfür die Kristallstruktur der CK2 $\alpha$  aus Mais herangezogen werden (Niefind et al., 1998).

#### **8.4 PPPK10 beeinflusst die Transkriptmengen der Gene, die in den Chloroplasten kodiert vorliegen**

Bereits 1997 gelang es eine Proteinkinase aus Senf-Chloroplasten biochemisch aufzureinigen, die *in vitro* Transkriptionsfaktoren der Chloroplasten phosphorylierte (Baginsky et al., 1997, Link, 2003). Diese Proteinkinase wurde assoziiert mit der PEP der Chloroplasten aus Senf gefunden und eine redox-abhängige Kontrolle der plastidären Genexpression beschrieben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Proteinkinase als Repressor der *psbA*-Transkription fungiert, und dass die Aktivität dieser Proteinkinase durch Phosphorylierung und durch einen Anstieg im Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion (GSH:GSSG) infolge von Starklicht unterdrückt wird (Baginsky et al., 1999, Baena-Gonzalez et al., 2001, Pfannschmidt und Liere, 2005). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde diese Proteinkinase als PTK (*plastid-transcription kinase*) bezeichnet (Baginsky et al., 1999). Später gelang es, das Gen dieser Kinase aus Senf zu klonieren, und wurde als cpPK2 $\alpha$  bezeichnet (Ogrzewalla et al., 2002).

Aufgrund der Homologie zwischen PPPK10 und der cpPK2 $\alpha$  aus Senf wurde zunächst auch der Einfluss von Starklicht auf die Transkriptmengen von *psbA* und *psaA* in der PPPK10-Mutantenlinie *pppk10-2* und dem Wildtyp untersucht. Hierbei konnte nur eine geringe Änderung in der Expression von *psbA* beobachtet werden. Deutlich konnte jedoch eine Reduktion des *psaA*-Transkripts infolge von Starklicht festgestellt werden, die bei der *pppk10-2* Mutante deutlich geringer ausfiel. Diese Ergebnisse widersprechen den oben dargelegten Beobachtungen in Senf-Keimlingen von Baena-Gonzalez (2001). Ursächlich

hierfür könnten mindestens zwei Gründe sein. Zum einen wurden unterschiedliche Organsimen verwendet. So besteht die Möglichkeit, dass Senf mit einer Aktivierung der Transkription infolge eines Starklichtreizes, und somit mit einer Deaktivierung der *cpPK2 $\alpha$*  reagiert und *Arabidopsis* mit einer Aktivierung der *PPP10* und folglich einer Repression der Transkription. Zum Zweiten unterschied sich das experimentelle Design. So isolierten Baena-Gonzalez et al. (2001) Chloroplasten aus Senfkeimlingen, die drei Stunden einer Lichtintensität von 1000  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  ausgesetzt waren und stellten einen Anstieg im GSH:GSSG-Verhältnis sowie einen Anstieg der Transkriptionsaktivität in *in organello run-on* Transkriptionsanalysen fest. In *Arabidopsis thaliana* wurde eine Abnahme des GSH/(GSH+GSSG)-Verhältnisses infolge von Starklicht beobachtet, und GSH als Radikalfänger für Starklicht-induzierte reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) vorgeschlagen (Karpinski et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl sechs Tage alte Keimlinge, als auch vier Wochen alte Pflanzen einer zwei Stunden andauernden Lichtintensität von 1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  ausgesetzt und anschließend die vorliegende Transkriptmenge mittels Northern-Blot und Macroarray-Analysen ermittelt. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Transkriptmenge direkt nach dem Starklicht-Stimulus. Im Gegensatz dazu bleibt offen, ob Baena-Gonzalez (2001) die aus Senf-Keimlingen isolierten Chloroplasten weiter diesem Stimulus aussetzten und ob der redox-abhängige Effekt während der *run-on* Transkription aufrecht erhalten blieb.

Ein guter Überblick über die chloroplastidäre Transkriptmengen konnte mittels Macroarrays nach Kandlbinder et al. (2004) erlangt werden. Hierbei wurde beobachtet, dass die Insertionslinie *pppk10-2* bereits unter Lichtbedingungen wie sie während der Wachstumsperiode vorlagen, eine Reduktion der Transkripte, die für Photosynthesekomponenten kodieren, im Vergleich zum Wildtyp, aufwies. Eine Ausnahme davon waren Transkripte, die für Untereinheiten des NADPH-Dehydrogenase-Komplexes kodieren. Diese Transkripte akkumulierten in der Insertionsmutante *pppk10-2*, im Vergleich zum Wildtyp, oder waren in ihrer Transkriptabundanz unverändert. Eine ähnliche Beobachtung konnte für die Transkripte gemacht werden, deren Genprodukte in der Genexpression der Chloroplasten beteiligt sind (z.B. *rpoB*, *rpoA*, *rps16*, *matK*, *rps2*, *rps4*, *rps3*). In diesem Zusammenhang muss darauf verwiesen werden, dass die Transkription der plastidenkodierten Gene, die für Untereinheiten der Photosynthesekomplexe kodieren,



vorwiegend durch die plastomkodierte bakterien-ähnliche RNA-Polymerase (PEP) realisiert wird (Allison et al., 1996). Diese RNA-Polymerase setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen. Die Kernuntereinheiten dieser RNA-Polymerase werden durch die plastidären Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* kodiert. Sigma-Faktoren, die im Zellkern kodiert vorliegen, vervollständigen das Enzym zum Holoenzym (Ohyama et al., 1986, Hu und Bogorad, 1990, Huet et al., 1991, Pfannschmidt und Link, 1994, Pfannschmidt und Link, 1997, Lysenko, 2007). Die Expression der sog. Haushaltsgene (engl.: *housekeeping genes*) des Plastoms soll vor allem von einer zweiten kernkodierten RNA-Polymerase (NEP) katalysiert werden (Allison et al., 1996). Diese RNA-Polymerase gehört zu einer kleinen Proteinfamilie, die Charakteristika der RNA-Polymerase aus Phagen aufweisen. Im Kerngenom von *Arabidopsis thaliana* kodieren drei Gene für Mitglieder dieser phagen-ähnlichen RNA-Polymerasen: *RpoT<sub>p</sub>*, *RpoT<sub>m</sub>* und *RpoT<sub>mp</sub>* (Lerbs-Mache, 1993, Courtois et al., 2007). In Blütenpflanzen entstanden die drei Gene für Phagen-ähnliche RNA-Polymerasen durch zwei Genduplikationsereignisse (Binder und Brennicke, 2003). Unter diesen befindet sich eine, die exklusiv in den Chloroplasten (*RPO<sub>Tp</sub>*), eine zweite, die ausschließlich in den Mitochondrien (*RPO<sub>Tm</sub>*) und eine dritte, die in beiden Organellen (*RPO<sub>Tmp</sub>*) lokalisiert ist (Hedtke et al., 2000). Unter Beachtung der Ergebnisse der Macroarrays nach Kandlbinder et al. (2004) ließ sich folglich vor allem ein Einfluss der Mutation in der Linie *pppk10-2* auf die PEP-vermittelte Transkription photosynthese-assoziiierter Gene feststellen. Durch diese Suppression der chloroplastidären Gene in dieser Insertionslinie konnte gefolgert werden, dass die PPPK10 unter den gewählten experimentellen Bedingungen die Transkription dieser Gene förderte. Im Gegensatz dazu wurden die Transkripte der Haushaltsgene in gleicher Abundanz oder in höheren Konzentrationen in der Insertionslinie *pppk10-2*, im Vergleich zum Wildtyp, detektiert. Somit schien die NEP-vermittelte Transkription dieser Gene zumindest nicht reprimiert zu werden. In Übereinstimmung mit Hinweisen aus der Literatur (Loschelder et al., 2004) kann folglich eine funktionelle Assoziation der PPPK10 und der PEP-vermittelten Transkription angenommen werden.

Interessant war die Beobachtung, dass durch die Behandlung der Pflanzen mit Starklicht (1500  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  für 2 h) vor allem die Transkripte der ATPase-Untereinheiten im Wildtyp deutlich reduziert vorlagen. Für diese Transkripte konnte eine Akkumulation in der Insertionslinie *pppk10-2* beobachtet werden. In Gegensatz dazu wurden die Transkripte, die für Untereinheiten des Photosystems II kodieren, im Wildtyp weniger stark reguliert, jedoch

erfolgte eine Akkumulation dieser Transkripte in der Insertionslinie *pppk10-2* infolge des Starklichtreizes. Dies führte zu annähernd gleichen Mengen dieser Transkripte in der Insertionslinie und Wildtyp nach diesem Starklichtreiz. Weiterhin war eine komplexe Regulation der Expression der Haushaltsgene sowohl in der Insertionslinie *pppk10-2*, als auch im Wildtyp nach einem Starklichtreiz zu beobachten. Zusammengefasst suggerieren diese Ergebnisse, dass die Proteinkinase PPPK10 in der starklicht-abhängigen, und somit redox-abhängigen Regulation der chloroplastidären Transkription involviert sein kann, wie bereits durch *in vitro* Versuche mit der homologen Proteinkinase aus Senf vorgeschlagen wurde (Ogrzewalla et al., 2002). Jedoch schien die Regulation der Transkription infolge dieses Reizes genspezifisch vermittelt zu werden: zum einen in Abhängigkeit von PPPK10, als auch unabhängig von PPPK10. Hierbei war eine Unterteilung des Regulationsmechanismus unabhängig vom Typ der RNA-Polymerase, die die Transkription des entsprechenden Genes vermittelt. Dies legt nahe, dass die Regulation der Transkription in den Chloroplasten weitere Faktoren beinhalten muss, die diese Spezifität vermitteln. Der Phosphorylierungsstatus der kernkodierten Sigma-Faktoren wäre ein geeigneter Mechanismus, eine derartige Spezifität, zumindest für die PEP-vermittelten Transkriptionen, zu vermitteln. Wie dargelegt sind Sigma-Faktoren am Aufbau der PEP beteiligt und fördern die PEP-vermittelten Transkription. In diesem Zusammenhang sei weiterhin darauf hingewiesen, dass die Expression NEP-transkribierter Haushaltsgene durch den Sigma-Faktor Sig2 negativ kontrolliert werden kann. Die molekularen Mechanismen dieser Repression sind bislang unbekannt (Kanamaru und Tanaka, 2004). Diese Komplexität der chloroplastidären Genexpression wird weiterhin durch aktuelle Untersuchungen plastidärer Promotoren unterstützt. So konnte eine hohe Diversität dieser Promotoren festgestellt werden (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007).

Anhand der Daten der Expressionsanalysen dieser Arbeit kann ein Modell der Regulation der chloroplastidären Transkription infolge von Veränderungen in der Lichtquantität aufgestellt werden (Abbildung 8-1). Auf eine Beteiligung an der Regulation der chloroplastidären Transkription infolge von Veränderungen in der Lichtqualität konnte anhand der Analysen der Photosyntheseparameter nach Adaption der Insertionslinie *pppk10-2* an Licht, spezifisch für Photosystem I oder für Photosystem II, kein Hinweis gefunden werden. Daher wird hierfür, wie in Abbildung 8-2 dargestellt, eine PPPK10-unabhängige Signaltransduktionskaskade vorgeschlagen.

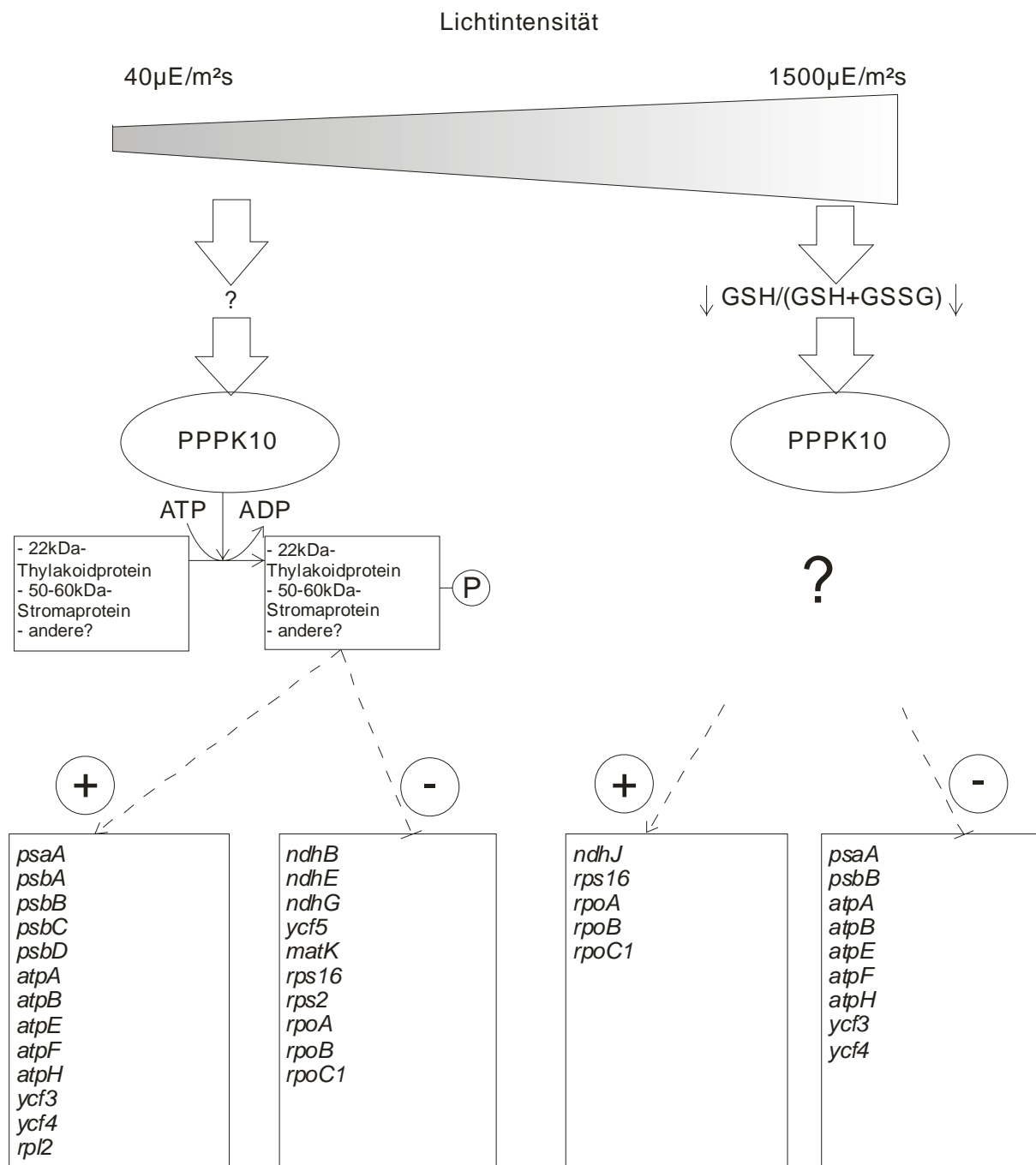
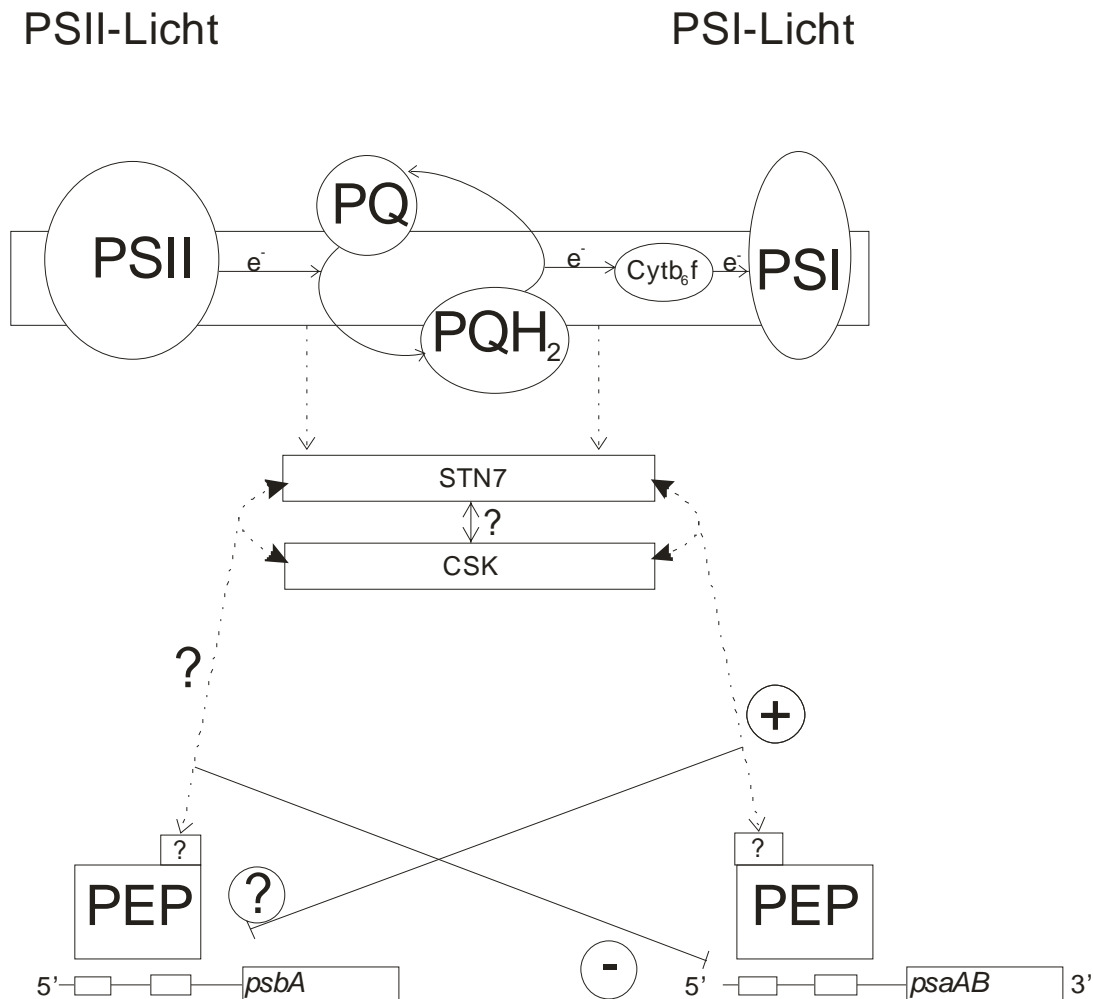


Abbildung 8-1: Modell der PPPK10-vermittelten chloroplastidären Transkriptionsregulation in *Arabidopsis thaliana* infolge veränderter Lichtquantität. Unter Wachstumslichtbedingungen phosphoryliert PPPK10 Effektoren der chloroplastidären Transkription, z.B. das 22kDa-Thylakoidprotein, ein 50-60kDa Stromaprotein und andere. Dadurch wird die Transkription verschiedener Gene stimuliert (+) und anderer supprimiert (-). Durch Starklicht wird in *Arabidopsis thaliana* ein Verringerung des Verhältnisses von reduziertem zum Gesamt-Glutathion beobachtet (Karpinski et al., 1997). Hierdurch kann der Redox-Status von PPPK10 moduliert werden, woraus eine Deaktivierung des Enzyms oder eine Veränderung in der Substratspezifität bewirkt wird. Dies führt zur Anpassung der chloroplastidären Transkription an Starklicht-Verhältnisse. P: Phosphat-Rest

Interessant ist, dass kürzlich eine weitere Proteinkinase beschrieben werden konnte, die an der Regulation der chloroplastidären Transkription beteiligt ist. Diese zum Zwei-

Komponenten-Signal-Transduktionssystem gehörende Sensor Kinase CSK (*chloroplast sensor kinase*) vermittelt Änderungen in der *psaA*-Genexpression nach Veränderungen in der Lichtqualität (Puthiyaveetil et al., 2008).



**Abbildung 8-2:** Modell der chloroplastidären Transkriptionsregulation in *Arabidopsis thaliana* infolge veränderter Lichtqualitäten. Ein Ungleichgewicht zwischen der Lichtanregung der Photosysteme I und II durch Lichtbedingungen, die entweder Photosystem I oder Photosystem II bevorzugen, wird über den Redox-Zustand der Elektronentransportkette auf bislang unbekanntem Signaltransduktionsweg(en), an denen die Proteinkinasen STN7 und CSK beteiligt sind, auf den PEP-Komplex übertragen und die Transkription der für die Reaktionszentren der Photosysteme I und II kodierenden Gene *psaAB* und *psbA* angepasst. Durch einen reduzierten Plastoquinon-Pool (PQ) wird die Transkriptmenge von *psaAB* erhöht. Ein oxidiertes Plastoquinon-Pool führt zu einer Unterdrückung der *psaAB*-Transkription. Dass eine aktive Zunahme der *psbA*-Transkription in *Arabidopsis thaliana* zu beobachten ist, ist umstritten (Fey et al., 2005 vs. Puthiyaveetil und Allen, 2008). Das Modell wurde in Anlehnung an Pfanschmidt und Liere (2005) erstellt. e<sup>-</sup>: Elektronen

Auch *stn7* Mutanten sind in Anpassung an Photosystem I-spezifisches bzw. Photosystem II-spezifisches Licht beeinträchtigt (Bonardi et al., 2005). In Gegensatz dazu konnte kein Defekt in der Anpassung an verschiedene Lichtqualitäten durch eine PPPK10-Mutation beobachtet werden. Daher kann gefolgert werden, dass die Anpassung an verschiedene Lichtqualitäten auf der Ebene der Transkription durch die Proteinkinasen CSK und STN7 vermittelt wird (Abbildung 8-2). Hingegen weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass PPPK10 nicht

an der Regulation der chloroplastidären Transkription infolge veränderter Lichtqualitäten, beteiligt ist.

### **8.5 PPPK10 beeinflusst Transkriptmengen von Genen mit Funktionen in den Mitochondrien**

Weiterhin wurde die Expression von Genen, die eine Funktion in den Mitochondrien ausüben, in der Linie *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp nach 2,5 h unter Lichtbedingungen, wie zur Wachstumsphase der Pflanzen vorlagen und nach 2 h bei  $1500\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  untersucht. Hierbei ergaben sich geringfügige Unterschiede in der Expression dieser Gene bereits unter Wachstumsbedingungen bei Linie *pppk10-2* im Vergleich zum Wildtyp. Deutlich wurde jedoch die Änderung der Transkriptabundanz nach einem Starklichtreiz. Während vor allem Transkripte, deren Translationsprodukte in Komplexen der oxidativen Phosphorylierung und der Genexpression involviert sind, im Wildtyp infolge dieses Reizes eine Reduktion in ihrer Transkriptabundanz erfuhren, war diese Reduktion dieser Transkriptmengen in der Linie *pppk10-2* nicht zu beobachten. Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Reduktion der Transkripte im Wildtyp infolge des oxidativen Stressreizes durch PPPK10 vermittelt sein könnte. Diese Beobachtung war insofern interessant, dass cpPK2 $\alpha$  vor allem in Zusammenhang mit der PEP der Chloroplasten gebracht wurde (Loschelder et al., 2004, Link, 2003, Pfannschmidt und Liere, 2005). Jedoch konnte bislang keine mit der bakterien-ähnlichen PEP der Chloroplasten vergleichbare RNA-Polymerase in Mitochondrien identifiziert werden. Die Transkription der chondromkodierten Gene wird somit lediglich von zwei phagen-ähnlichen RNA-Polymerasen (RPOT<sub>m</sub> und RPOT<sub>mp</sub>) katalysiert (Hedtke et al., 2000). Wie im Falle der Transkriptionsregulation in den Chloroplasten wäre auch eine Regulation der mitochondrialen Transkription durch Phosphorylierung DNA-bindender Proteine vorstellbar. Aus Mitochondrien von Erbsen (*Pisum sativum*) wurde ein 43kDa-Protein, aufgrund der Eigenschaft an Promotoren zu binden, aufgereinigt (Binder und Bennicke, 2003). Aus Weizen-Mitochondrien gelang es, ein 69kDa Protein (bezeichnet als p63) aufzureinigen. Dieses Protein zeigte eine Affinität zu dem Promotor von *cox2* (Ikeda et al., 1999). Interessanterweise wurde auch der sigma-ähnliche Transkriptionsfaktor ZmSig2B sowohl in den Chloroplasten, als auch in den Mitochondrien aus Mais detektiert (Beardslee et al., 2002). Dies war überraschend, da diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls mit der bakterien-ähnlichen RNA-Polymerase der Chloroplasten in Verbindung gebracht wurden

(Lysenko, 2007). Das homologe Protein AtSig2 (SigB) aus *Arabidopsis thaliana* wurde jedoch lediglich in den Chloroplasten nachgewiesen (Kanamaru et al., 1999). Aber auch bei *Arabidopsis thaliana* gelang es das DNA-bindende Protein AtWhy2 in den Mitochondrien zu detektieren. Eine Funktion von AtWhy2 wird in der mitochondrialen Genexpression vermutet (Marechal et al., 2008). Den Ergebnissen dieser Arbeit folgend, kann eine weitere Komponente des Regulationsmechanismus der mitochondrialen Genexpression hinzugefügt werden. Ob PPPK10 direkt diese oder andere potentielle Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, oder direkt die Aktivität der chloroplastidären bzw. mitochondrialen RNA-Polymerasen moduliert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

## **8.6 PPPK6 und PPPK9**

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit Anstrengungen unternommen, die Funktion der chloroplastidären Proteinkinasen PPPK6 und PPPK9 mit Hilfe von Insertionsmutanten zu untersuchen. Für das zweite Gen konnte keine Insertion im Gen *PPPK9* in den untersuchten putativen Insertionslinien identifiziert werden. Im Falle des Gens *PPPK6* zeigten die positiv auf eine Insertion in diesem Gen getesteten Linien keine Veränderung im Phosphorylierungsmuster und keinen Effekt auf die Reduktion des Wurzelwachstums infolge von Auxin-Gabe. Bereits diskutiert wurde, dass die Insertionen keinen *knock out* des Gens verursachen könnten. Weiterhin konnte das homologe Genprodukt des Gens *At3g20830* (73% der Aminosäuren sind mit PPPK6 identisch) die zellulären Funktionen von PPPK6 übernehmen und somit die Ausbildung des Phänotyps vermindern. Für nachfolgende Untersuchungen dieser Gene soll die Verwendung von Mutantenlinien vorgeschlagen werden, die eine dominante und defekte Form dieser Kinasen überexprimieren. Ideal wäre, wenn die Expression der defekten Kinase induzierbar wäre, wie durch Tang und Innes (2002) beschrieben.

## 9. Literaturverzeichnis

- Albrecht, V., Ritz, O., Linder, S., Harter, K., und Kudla, J.** (2001). The NAF domain defines a novel protein–protein interaction module conserved in Ca<sup>2+</sup>-regulated kinases. *EMBO J* **20**, 1051-1063.
- Allen, J.F.** (2005). Photosynthesis: the processing of redox signals in chloroplasts. *Curr Biol* **15**, R929-932.
- Allison, L.A., Simon, L.D., und Maliga, P.** (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* **15**, 2802-2809.
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R.G., Howard, C.A., Ruban, A.V., Horton, P., und 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.
- Aro, E.M., McCaffery, S., und Anderson, J.M.** (1993). Photoinhibition and D1 Protein Degradation in Peas Acclimated to Different Growth Irradiances. *Plant Physiol.* **103**, 835-843.
- Aro, E.-M., Virgin, I., und Andersson, B.** (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* **1143**, 113-134.
- Baena-Gonzalez, E., Baginsky, S., Mulo, P., Summer, H., Aro, E.M., und Link, G.** (2001). Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant Physiol.* **127**, 1044-1052.
- Baginsky, S., Tiller, K., und Link, G.** (1997). Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol Biol* **34**, 181-189.
- Baginsky, S., Tiller, K., Pfannschmidt, T., und Link, G.** (1999). PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant Mol Biol* **39**, 1013-1023.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., und Miyano, S.** (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**, 298-305.
- Batistic, O., und Kudla, J.** (2004). Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**, 915-924.

- Beardslee, T.A., Roy-Chowdhury, S., Jaiswal, P., Buhot, L., Lerbs-Mache, S., Stern, D.B., und Allison, L.A.** (2002). A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *Plant J* **31**, 199-209.
- Bedard, J., und Jarvis, P.** (2005). Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J Exp Bot* **56**, 2287-2320.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., und Rochaix, J.D.** (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**, 892-895.
- Bennett, J.** (1977). Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature* **269**, 344-346.
- Bennett, J.** (1991). Protein-phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annual Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**, 281-311.
- Bhalla, P., und Bennett, J.** (1987). Chloroplast phosphoproteins: Phosphorylation of a 12-kDa stromal protein by the redox-controlled kinase of thylakoid membranes. *Arch Biochem Biophys* **252**, 97-104.
- Binder, S., und Brennicke, A.** (2003). Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 181-188; discussion 188-189.
- Boden, M., und Hawkins, J.** (2005). Prediction of subcellular localization using sequence-biased recurrent networks. *Bioinformatics* **21**, 2279-2286.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., und Pfanner, N.** (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* **9**, 42-49.
- Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P., und Leister, D.** (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* **437**, 1179-1182.
- Bonardi, V.** (2006). Molecular-genetic characterization of thylakoid protein phosphorylation in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, In Fakultät für Biologie (München: LMU).
- Bonisch, C., Nieratschker, S.M., Orfanos, N.K., und Hake, S.B.** (2008). Chromatin proteomics and epigenetic regulatory circuits. *Expert Rev Proteomics* **5**, 105.
- Borner, G.H., Lilley, K.S., Stevens, T.J., und Dupree, P.** (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* **132**, 568-577.
- Bruce, B.D.** (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 2-21.



- Carlberg, I., Hansson, M., Kieselbach, T., Schroder, W.P., Andersson, B., und Vener, A.V.** (2003). A novel plant protein undergoing light-induced phosphorylation and release from the photosynthetic thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 757-762.
- Casadio, R., Martelli, P.L., und Pierleoni, A.** (2008). The prediction of protein subcellular localization from sequence: a shortcut to functional genome annotation. *Brief Funct Genomic Proteomic*, eln003.
- Chigri, F., Soll, J., und Vothknecht, U.C.** (2005). Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J* **42**, 821-831.
- Chigri, F., Hormann, F., Stamp, A., Stammers, D.K., Bolter, B., Soll, J., und Vothknecht, U.C.** (2006). Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16051-16056.
- Cho, H.S., Yoon, G.M., Lee, S.S., Kim, Y.A., Hwang, I., Choi, D., und Pai, H.-S.** (2001). A novel dual-specificity protein kinase targeted to the chloroplast in tobacco. *FEBS Lett* **497**, 124-130.
- Christensen, A.C., Lyznik, A., Mohammed, S., Elowsky, C.G., Elo, A., Yule, R., und Mackenzie, S.A.** (2005). Dual-Domain, Dual-Targeting Organellar Protein Presequences in Arabidopsis Can Use Non-AUG Start Codons. *Plant Cell* **17**, 2805-2816.
- Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., und Mahadevan, L.C.** (2006). Enhanced Histone Acetylation and Transcription: A Dynamic Perspective. *Mol Cell* **23**, 289-296.
- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R., und Lerbs-Mache, S.** (2007). Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the *rrn* Operon from the PC Promoter at Early Developmental Stages in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**, 712-721.
- DalCorso, G., Pesaresi, P., Masiero, S., Aseeva, E., Schunemann, D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., und 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.
- D'Angelo, C., Weinl, S., Batistic, O., Pandey, G.K., Cheong, Y.H., Schultke, S., Albrecht, V., Ehlert, B., Schulz, B., Harter, K., Luan, S., Bock, R., und Kudla, J.** (2006). Alternative complex formation of the Ca<sup>2+</sup>-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **48**, 857-872.
- Datta, N., und Cashmore, A.R.** (1989). Binding of a Pea Nuclear Protein to Promoters of Certain Photoregulated Genes Is Modulated by Phosphorylation. *Plant Cell* **1**, 1069-1077.
- DeMaggio, A.J., Lindberg, R.A., Hunter, T., und Hoekstra, M.F.** (1992). The budding yeast HRR25 gene product is a casein kinase I isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7008-7012.

- Depege, N., Bellafiore, S., und Rochaix, J.-D.** (2003). Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* **299**, 1572-1575.
- Dietzel, L., Brautigam, K., und Pfannschmidt, T.** (2008). Photosynthetic acclimation: state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry-functional relationships between short-term and long-term light quality acclimation in plants. *FEBS J* **275**, 1080-1088.
- Duchene, A.-M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N.M., Zaepfel, M., Marechal-Drouard, L., und Small, I.D.** (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16484-16489.
- Dunkley, T.P., Hester, S., Shadforth, I.P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S.L., Griffin, J.L., Bessant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R.B., Dupree, P., und Lilley, K.S.** (2006). Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6518-6523.
- Eblen, S.T., Kumar, N.V., Shah, K., Henderson, M.J., Watts, C.K., Shokat, K.M., und Weber, M.J.** (2003). Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs. *J Biol Chem* **278**, 14926-14935.
- Eckardt, N.A., Snyder, G.W., Portis, A.R., Jr., und Orgen, W.L.** (1997). Growth and photosynthesis under high and low irradiance of *Arabidopsis thaliana* antisense mutants with reduced ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase content. *Plant Physiol.* **113**, 575-586.
- Ehsan, H., Reichheld, J.P., Durfee, T., und Roe, J.L.** (2004). TOUSLED kinase activity oscillates during the cell cycle and interacts with chromatin regulators. *Plant Physiol.* **134**, 1488-1499.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., und von Heijne, G.** (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**, 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., und von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., und Nielsen, H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**, 953-971.
- Espunya, M.C., Combettes, B., Dot, J., Chaubet-Gigot, N., und Martinez, M.C.** (1999). Cell-cycle modulation of CK2 activity in tobacco BY-2 cells. *Plant J* **19**, 655-666.
- Espunya, M.C., Lopez-Giraldez, T., Hernan, I., Carballo, M., und Martinez, M.C.** (2005). Differential expression of genes encoding protein kinase CK2 subunits in the plant cell cycle. *J Exp Bot* **56**, 3183-3192.

- Eyüboğlu, B., Pfister, K., Haberer, G., Chevalier, D., Fuchs, A., Mayer, K.F., und Schneitz, K.** (2007). Molecular characterisation of the STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY of genes encoding putative leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **7**, 16.
- Fey, V., Wagner, R., Brautigam, K., Wirtz, M., Hell, R., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmüller, R., und 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.
- Finkemeier, I., Goodman, M., Lamkemeyer, P., Kandlbinder, A., Sweetlove, L.J., und Dietz, K.-J.** (2005). The Mitochondrial Type II Peroxiredoxin F Is Essential for Redox Homeostasis and Root Growth of *Arabidopsis thaliana* under Stress. *J Biol Chem* **280**, 12168-12180.
- Foyer, C.H.** (1985). Stromal Protein-Phosphorylation in Spinach (*Spinacia-Oleracea*) Chloroplasts. *Biochem J* **231**, 97-103.
- Froehlich, J.E., Wilkerson, C.G., Ray, W.K., McAndrew, R.S., Osteryoung, K.W., Gage, D.A., und Phinney, B.S.** (2003). Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J Proteome Res* **2**, 413-425.
- Frye, C.A., und Innes, R.W.** (1998). An *Arabidopsis* mutant with enhanced resistance to Powdery Mildew. *Plant Cell* **10**, 947-956.
- Glickman, M.H., und Ciechanover, A.** (2002). The Ubiquitin-Proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**, 373-428.
- Gómez-Gómez, L., und Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR Receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**, 1003-1011.
- Gray, M.W., und Doolittle, W.F.** (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev* **46**, 1-46.
- Grennan, A.K.** (2007). Protein S-Nitrosylation: Potential targets and roles in signal transduction. *Plant Physiol.* **144**, 1237-1239.
- Gross, S.D., Loijens, J.C., und Anderson, R.A.** (1999). The casein kinase I $\alpha$  isoform is both physically positioned and functionally competent to regulate multiple events of mRNA metabolism. *J Cell Sci* **112 (Pt 16)**, 2647-2656.
- Guillon, C., Dorne, A.M., und Mache, R.** (1984). *Inorganello* and *invitro* phosphorylation of chloroplast ribosomal proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **121**, 297-303.
- Halfter, U., Ishitani, M., und Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3735-3740.

- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hansson, M., und Vener, A.V.** (2003). Identification of three previously unknown in vivo protein phosphorylation sites in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Proteomics* **2**, 550-559.
- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K., und Deng, X.W.** (2000). HY5 stability and activity in arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J* **19**, 4997-5006.
- Heazlewood, J.L., und Millar, A.H.** (2005). AMPDB: the Arabidopsis Mitochondrial Protein Database. *Nucleic Acids Res* **33**, D605-610.
- Hedtke, B., Borner, T., und Weihe, A.** (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**, 435-440.
- Heilmann, B., Hartung, G., und Gimmler, H.** (1981). Subcellular compartmentation of indole-3-acetic acid in mesophyll cells of *Spinacea oleracea*. *Z. Naturforsch.* **36c**, 679-685.
- Hinz, G., und Flugge, U.I.** (1988). Phosphorylation of a 51-kDa envelope membrane polypeptide involved in protein translocation into chloroplasts. *Eur J Biochem* **175**, 649-659.
- Hoekstra, M.F., Liskay, R.M., Ou, A.C., DeMaggio, A.J., Burbee, D.G., und Heffron, F.** (1991). HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* **253**, 1031-1034.
- Hoglund, A., Donnes, P., Blum, T., Adolph, H.W., und Kohlbacher, O.** (2006). MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics* **22**, 1158-1165.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., und Nakai, K.** (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* **35**, W585-587.
- Houtz, R.L., Magnani, R., Nayak, N.R., und Dirk, L.M.A.** (2008). Co- and post-translational modifications in Rubisco: unanswered questions. *J Exp Bot* **59**, 1635-1645.
- Hu, J., und Bogorad, L.** (1990). Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1531-1535.
- Hu, J., Troxler, R.F., und Bogorad, L.** (1991). Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid rpoC1 gene. *Nucleic Acids Res* **19**, 3431-3434.

- Huang, J., Hack, E., Thornburg, R.W., und Myers, A.M.** (1990). A yeast mitochondrial leader peptide functions in vivo as a dual targeting signal for both chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* **2**, 1249-1260.
- Ikeda, T.M., und Gray, M.W.** (1999). Characterization of a DNA-Binding Protein Implicated in Transcription in Wheat Mitochondria. *Mol Cell Biol* **19**, 8113-8122.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Jaaro, H., Rubinfeld, H., Hanoach, T., und Seger, R.** (1997). Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3742-3747.
- Jach, G., Binot, E., Frings, S., Luxa, K., und Schell, J.** (2001). Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *Plant J* **28**, 483-491.
- Jakoby, M., Wang, H.-Y., Reidt, W., Weisshaar, B., und Bauer, P.** (2004). FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **577**, 528-534.
- Jensen, O.N.** (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 33-41.
- Jeong, S.Y., Pepper, N., und Meier, I.** (2004). Phosphorylation by protein kinase CKII modulates the DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein. *Planta* **219**, 298-302.
- Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K., und Takahashi, H.** (1999). Plastidic RNA polymerase {sigma} factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **40**, 832-842.
- Kanamaru, K., und Tanaka, K.** (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2215-2223.
- Kandlbinder, A., Finkemeier, I., Wormuth, D., Hanitzsch, M., und Dietz, K.-J.** (2004). The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plantarum* **120**, 63-73.
- Kanekatsu, M., Munakata, H., Furuzono, K., und Ohtsuki, K.** (1993). Biochemical characterization of a 34 kda ribonucleoprotein (p34) purified from the spinach chloroplast fraction as an effective phosphate acceptor for casein kinase II. *FEBS Lett* **335**, 176-180.

- Kanekatsu, M., Ezumi, A., Nakamura, T., und Ohtsuki, K.** (1995). Chloroplast ribonucleoproteins (RNPs) as phosphate acceptors for casein kinase II: purification by ssDNA-cellulose column chromatography. *Plant Cell Physiol* **36**, 1649-1656.
- Kanekatsu, M., Saito, H., Motohashi, K., und Hisabori, T.** (1998). The beta subunit of chloroplast ATP synthase (CF0CF1-ATPase) is phosphorylated by casein kinase II. *Biochem Mol Biol Int* **46**, 99-105.
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G., und Mullineaux, P.M.** (1997). Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *Plant Cell* **9**, 627-640.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., und Ecker, J.R.** (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
- Klee, E., und Ellis, L.** (2005). Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinformatics* **6**, 256.
- Klee, E.W., und Sosa, C.P.** (2007). Computational classification of classically secreted proteins. *Drug Discov Today* **12**, 234-240.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjolander, K., Gruissem, W., und Baginsky, S.** (2004). The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr Biol* **14**, 354-362.
- Kleffmann, T., von Zychlinski, A., Russenberger, D., Hirsch-Hoffmann, M., Gehrig, P., Gruissem, W., und Baginsky, S.** (2007). Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. *Plant Physiol* **143**, 912-923.
- Klimczak, L.J., Schindler, U., und Cashmore, A.R.** (1992). DNA Binding Activity of the Arabidopsis G-Box Binding Factor GBF1 Is Stimulated by Phosphorylation by Casein Kinase II from Broccoli. *Plant Cell* **4**, 87-98.
- Klimecka, M., und Muszynska, G.** (2007). Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* **54**, 219-233.
- Klughammer, C., und 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**, 261-286.
- Kolukisaoglu, U., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O., und Kudla, J.** (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**, 43-58.
- Krause, K., Kilbienski, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A., und Krupinska, K.** (2005). DNA-binding proteins of the Whirly family in Arabidopsis thaliana are targeted to the organelles. *FEBS Lett* **579**, 3707-3712.

- Krupa, A., Anamika, und Srinivasan, N.** (2006). Genome-wide comparative analyses of domain organisation of repertoires of protein kinases of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Gene* **380**, 1-13.
- Krysan, P.J., Jester, P.J., Gottwald, J.R., und Sussman, M.R.** (2002). An *Arabidopsis* Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family Encodes Essential Positive Regulators of Cytokinesis. *Plant Cell* **14**, 1109-1120.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laugesen, S., Bergoin, A., und Rossignol, M.** (2004). Deciphering the plant phosphoproteome: tools and strategies for a challenging task. *Plant Physiol Biochem* **42**, 929-936.
- Lee, J.-Y., Taoka, K.-i., Yoo, B.-C., Ben-Nissan, G., Kim, D.-J., und Lucas, W.J.** (2005). Plasmodesmal-associated protein kinase in Tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell* **17**, 2817-2831.
- Leister, D.** (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**, 47-56.
- Lerbs-Mache, S.** (1993). The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5509-5513.
- Li, J., und Chory, J.** (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929-938.
- Link, G.** (2003). Redox Regulation of Chloroplast Transcription. *Antioxid Redox Signal* **5**, 79-87.
- Lisitsky, I., und Schuster, G.** (1995). Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Res* **23**, 2506-2511.
- Litchfield, D.W.** (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**, 1-15.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S., und Zhu, J.-K.** (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3730-3734.
- Lohrig, K.** (2008). Phosphorylierungsanalytik plastidärer Proteine aus *A. thaliana*. Dissertation, In Fakultät der Chemie (Bochum RUB), pp. 151.
- Loschelder, H., Homann, A., Ogrzewalla, K., und Link, G.** (2004). Proteomics-based sequence analysis of plant gene expression - the chloroplast transcription apparatus. *Phytochemistry* **65**, 1785-1793.
- Lysenko, E.** (2007). Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant Cell Rep* **26**, 845-859.

- Mackenzie, S.A.** (2005). Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends Cell Biol* **15**, 548-554.
- Mann, M., Ong, S.E., Gronborg, M., Steen, H., Jensen, O.N., und Pandey, A.** (2002). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* **20**, 261-268.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., und Jacq, C.** (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* **3**, 159-164.
- Marchler-Bauer, A., und Bryant, S.H.** (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**, W327-331.
- Marechal, A., Parent, J.S., Sabar, M., Veronneau-Lafortune, F., Abou-Rached, C., und Brisson, N.** (2008). Overexpression of mtDNA-associated AtWhy2 compromises mitochondrial function. *BMC Plant Biol* **8**, 42.
- Margulis, L.** (1970). *Origin of eucaryotic cells.* (New Haven: Yale University Press).
- Martin, W., und Herrmann, R.G.** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**, 9-17.
- Matsuda, S., Vert, J.P., Saigo, H., Ueda, N., Toh, H., und Akutsu, T.** (2005). A novel representation of protein sequences for prediction of subcellular location using support vector machines. *Protein Sci* **14**, 2804-2813.
- McQueen-Mason, S.J., und Hamilton, R.H.** (1989). The biosynthesis of Indole-3-acetic acid from D-tryptophan in Alaska Pea plastids. *Plant Cell Physiol* **30**, 999-1005.
- Meggio, F., und Pinna, L.A.** (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* **17**, 349-368.
- Mereschkowsky, C.** (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.*, 25: 593–604. English translation in Martin, W., Kowallik, K. V. (1999). Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *Eur J Phycol* **34**, 287–295.
- Millar, A.H., Whelan, J., und Small, I.** (2006). Recent surprises in protein targeting to mitochondria and plastids. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 610-615.
- Mishra, N.S., Tuteja, R., und Tuteja, N.** (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* **452**, 55-68.
- Moreno-Romero, J., Carme Espunya, M., Platara, M., Arino, J., und Carmen Martinez, M.** (2008). A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J* **55**, 118-130.
- Morillo, S.A., und Tax, F.E.** (2006). Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 460-469.



- Niefind, K., Guerra, B., Pinna, L.A., Issinger, O.G., und Schomburg, D.** (1998). Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from *Zea mays* at 2.1 Å resolution. *EMBO J* **17**, 2451-2462.
- Niemi, K.J., Adler, J., und Selman, B.R.** (1990). Protein methylation in Pea chloroplasts. *Plant Physiol* **93**, 1235-1240.
- Nuhse, T.S., Stensballe, A., Jensen, O.N., und Peck, S.C.** (2003). Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1234-1243.
- Nuhse, T.S., Stensballe, A., Jensen, O.N., und Peck, S.C.** (2004). Phosphoproteomics of the Arabidopsis plasma membrane and a new phosphorylation site database. *Plant Cell* **16**, 2394-2405.
- Ogrzewalla, K., Piotrowski, M., Reinbothe, S., und Link, G.** (2002). The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *Eur J Biochem* **269**, 3329-3337.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S.-i., Inokuchi, H., und Ozeki, H.** (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**, 572-574.
- Oxborough, K., und Baker, N.R.** (1997). Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring F'o. *Photosynth res* **54**, 135-142.
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J.L., Hanna, D.E., und Glover, C.V.** (1990). Isolation, sequencing, and disruption of the yeast CKA2 gene: casein kinase II is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**, 4089-4099.
- Paquin, N., und Chartrand, P.** (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends Cell Biol* **18**, 105-111.
- Parinov, S., Sevugan, M., De, Y., Yang, W.-C., Kumaran, M., und Sundaresan, V.** (1999). Analysis of Flanking Sequences from Dissociation Insertion Lines: A Database for Reverse Genetics in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 2263-2270.
- Park, H.-J., Ding, L., Dai, M., Lin, R., und Wang, H.** (2008). Multisite phosphorylation of Arabidopsis HFR1 by casein kinase II and a plausible role in regulating its degradation rate. *J Biol Chem*, M801720200.
- Peeters, N., und Small, I.** (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 54-63.

- Pesaresi, P., Varotto, C., Meurer, J., Jahns, P., Salamini, F., und Leister, D.** (2001). Knock-out of the plastid ribosomal protein L11 in Arabidopsis: effects on mRNA translation and photosynthesis. *Plant J* **27**, 179-189.
- Pesaresi, P., Gardner, N.A., Masiero, S., Dietzmann, A., Eichacker, L., Wickner, R., Salamini, F., und Leister, D.** (2003). Cytoplasmic N-Terminal Protein Acetylation Is Required for Efficient Photosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1817-1832.
- Pesaresi, P., Schneider, A., Kleine, T., und Leister, D.** (2007). Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 600-606.
- Peters, J.S., und Berkowitz, G.A.** (1998). Characterization of a chloroplast inner envelope P-ATPase proton pump. *Photosynth Res* **57**, 323-333.
- Petsalaki, E.I., Bagos, P.G., Litou, Z.I., und Hamodrakas, S.J.** (2006). PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **4**, 48-55.
- Pfannschmidt, T., und Link, G.** (1994). Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol Biol* **25**, 69-81.
- Pfannschmidt, T., und Link, G.** (1997). The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol Gen Genet* **257**, 35-44.
- Pfannschmidt, T., Schutze, K., Brost, M., und 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.
- Pfannschmidt, T., und Liere, K.** (2005). Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxid Redox Signal* **7**, 607-618.
- Pierleoni, A., Martelli, P.L., Fariselli, P., und Casadio, R.** (2006). BaCellLo: a balanced subcellular localization predictor. *Bioinformatics* **22**, e408-416.
- Prakash, S.S.R., und Jayabaskaran, C.** (2006). Expression and localization of calcium-dependent protein kinase isoforms in chickpea. *J Plant Phys* **163**, 1135-1149.
- Puthiyaveetil, S., Kavanagh, T.A., Cain, P., Sullivan, J.A., Newell, C.A., Gray, J.C., Robinson, C., van der Giezen, M., Rogers, M.B., und Allen, J.F.** (2008). The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10061-10066.
- Puthiyaveetil, S., und Allen, J.F.** (2008). Transients in chloroplast gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 871-874.

- Radhamony, R.N., und Theg, S.M.** (2006). Evidence for an ER to Golgi to chloroplast protein transport pathway. *Trends Cell Biol* **16**, 385-387.
- Reinders, J., und Sickmann, A.** (2005). State-of-the-art in phosphoproteomics. *Proteomics* **5**, 4052-4061.
- Richly, E., und Leister, D.** (2004). An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* **329**, 11-16.
- Riera, M., Peracchia, G., und Pagès, M.** (2001). Distinctive features of plant protein kinase CK2. *Mol CellBiochem* **227**, 119-127.
- Romeis, T.** (2001). Protein kinases in the plant defence response. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 407-414.
- Ros Barceló, A., Pedreno, M.A., Ferrer, M.A., Sabater, F., und Munoz, R.** (1990). Indole-3-methanol is the main product of the oxidation of indole-3-acetic acid catalyzed by two cytosolic basic isoperoxidases from *Lupinus Planta* **181**, 448-450.
- Ruddle, F.H.** (1982). Reverse genetics as a means of understanding and treating genetic disease. *Adv Neurol* **35**, 239-242.
- Ruddle, F.H.** (1984). The William Allan Memorial Award Address: Reverse Genetics and Beyond. *Am J Hum Genet* **36**, 944-953.
- Rudhe, C., Clifton, R., Whelan, J., und Glaser, E.** (2002). N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *J Mol Biol* **324**, 577-585.
- Rudrabhatla, P., Reddy, M., und Rajasekharan, R.** (2006). Genome-Wide Analysis and Experimentation of Plant Serine/ Threonine/Tyrosine-Specific Protein Kinases. *Plant Mol Biol* **60**, 293-319.
- Saito, H.** (2001). Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chem. Rev.* **101**, 2497-2510.
- Salinas, P., Fuentes, D., Vidal, E., Jordana, X., Echeverria, M., und Holuigue, L.** (2006). An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in *Arabidopsis*: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol* **47**, 1295-1308.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., und Harper, J.F.** (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* **14**, S401-417.
- Santos, J.A., Logarinho, E., Tapia, C., Allende, C.C., Allende, J.E., und Sunkel, C.E.** (1996). The casein kinase 1 alpha gene of *Drosophila melanogaster* is developmentally regulated and the kinase activity of the protein induced by DNA damage. *J Cell Sci* **109 (Pt 7)**, 1847-1856.

- Schagger, H., und von Jagow, G.** (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**, 223-231.
- Schein, A.I., Kissinger, J.C., und Ungar, L.H.** (2001). Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res* **29**, E82.
- Schimper, A.F.W.** (1983). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner". *Botan. Z.* **41**, 102-113.
- Schnarrenberger, C., und Kruger, I.** (1986). Distinction between cytosol and chloroplast fructose-bisphosphate aldolases from Pea, Wheat, and Corn leaves. *Plant Physiol.* **80**, 301-304.
- Schneider, G., und Fechner, U.** (2004). Advances in the prediction of protein targeting signals. *Proteomics* **4**, 1571-1580.
- Schreiber, U., Schliwa, U., und Bilger, W.** (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth res* **10**, 51-52.
- Schreiber, U., Klughammer, C., und Neubauer, C.** (1988). Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulation system. *Z Naturforsch* **43c**, 686-698.
- Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C., und Shokat, K.M.** (1997). Engineering unnatural nucleotide specificity for *Rous sarcoma* virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3565-3570.
- Shah, K., und Shokat, K.M.** (2002). A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway. *Chem Biol* **9**, 35-47.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., und Meisinger, C.** (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13207-13212.
- Silva-Filho, M.C.** (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 589-595.
- Sitbon, F., Edlund, A., Gardeström, P., Olsson, O., und Sandberg, G.** (1993). Compartmentation of indole-3-acetic acid metabolism in protoplasts isolated from leaves of wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants. *Planta* **191**, 274-279.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., und Mireau, H.** (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* **38**, 265-277.

- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., und Lurin, C.** (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* **4**, 1581-1590.
- Snyders, S., und Kohorn, B.D.** (1999). TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J Biol Chem* **274**, 9137-9140.
- Snyders, S., und Kohorn, B.D.** (2001). Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **276**, 32169-32176.
- Soll, J., und Buchanan, B.B.** (1983). Phosphorylation of chloroplast ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit by an envelope bound protein kinase insitu. *J Biol Chem* **258**, 6686-6689.
- Soll, J., und Bennett, J.** (1988). Localization of a 64-kDa phosphoprotein in the lumen between the outer and inner envelopes of Pea chloroplasts. *Eur J Biochem* **175**, 301-307.
- Soll, J., Fischer, I., und Keegstra, K.** (1988). A guanosine 5'-triphosphate-dependent protein kinase is localized in the outer envelope membrane of Pea chloroplasts. *Planta* **176**, 488-496.
- Soll, J.** (1988). Purification and characterization of a chloroplast outer-envelope-bound, ATP-dependent protein kinase. *Plant Physiol* **87**, 898-903.
- Soll, J., und Schleiff, E.** (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 198-208.
- Sprenger, J., Fink, J.L., und Teasdale, R.** (2006). Evaluation and comparison of mammalian subcellular localization prediction methods. *BMC Bioinformatics* **7**, S3.
- Steffen, R.** (2003). Time-resolving spectroscopic investigation of photosystem II. Dissertation (Berlin: Technische Universität).
- Stengel, A., Soll, J., und Bölter, B.** (2007). Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol Chem* **388**, 765-772.
- Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K., und Börner, T.** (2007). High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* **277**, 725-734.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Sasabe, M., und Machida, Y.** (2004). A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *J Biochem* **136**, 127-132.
- Tang, D., und Innes, R.W.** (2002). Overexpression of a kinase-deficient form of the EDR1 gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**, 975-983.
- Tantoso, E., und Li, K.B.** (2008). AAIndexLoc: predicting subcellular localization of proteins based on a new representation of sequences using amino acid indices. *Amino Acids* **35**, 345-353

- Testi, M.G., Croce, R., Polverino-De Laureto, P., und Bassi, R.** (1996). A CK2 site is reversibly phosphorylated in the photosystem II subunit CP29. *FEBS Lett* **399**, 245-250.
- Tetlow, I.J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C.G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M.K., und Emes, M.J.** (2004). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* **16**, 694-708.
- Tikkanen, M., Nurmi, M., Suorsa, M., Danielsson, R., Mamedov, F., Styring, S., und Aro, E.M.** (2008). Phosphorylation-dependent regulation of excitation energy distribution between the two photosystems in higher plants. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 425-432
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., und Martin, W.** (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* **5**, 123-135.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tregear, J.W., Jouannic, S., Schwebel-Dugué, N., und Kreis, M.** (1996). An unusual protein kinase displaying characteristics of both the serine/threonine and tyrosine families is encoded by the *Arabidopsis thaliana* gene ATN1. *Plant Sci* **117**, 107-119.
- Truscott, K.N., Brandner, K., und Pfanner, N.** (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol* **13**, R326-337.
- Tsuwamoto, R., Fukuoka, H., und Takahata, Y.** (2008). GASSHO1 and GASSHO2 encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in *Arabidopsis* embryos. *Plant J* **54**, 30-42.
- Vainonen, J.P., Hansson, M., und Vener, A.V.** (2005). STN8 protein kinase in *Arabidopsis thaliana* is specific in phosphorylation of photosystem II core proteins. *J Biol Chem* **280**, 33679-33686.
- Vainonen, J.P., Sakuragi, Y., Stael, S., Tikkanen, M., Allahverdiyeva, Y., Paakkarinen, V., Aro, E., Suorsa, M., Scheller, H.V., Vener, A.V., und Aro, E.M.** (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., und Leister, D.** (2000). Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth. *Plant J* **22**, 115-124.
- Vener, A.V., Harms, A., Sussman, M.R., und Vierstra, R.D.** (2001). Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **276**, 6959-6966.

- Vener, A.V.** (2007). Environmentally modulated phosphorylation and dynamics of proteins in photosynthetic membranes. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 449-457.
- Vielhaber, E., und Virshup, D.M.** (2001). Casein Kinase I: From obscurity to center stage. *IUBMB Life* **51**, 73-78.
- Villarejo, A., Buren, S., Larsson, S., Dejardin, A., Monne, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L., und Samuelsson, G.** (2005). Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* **7**, 1224-1231.
- Wang, Y., Schramek, H., und Dunn, M.J.** (1996). Cytosolic and nuclear mitogen-activated protein kinases are regulated by distinct mechanisms. *Exp Cell Res* **225**, 382-388.
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., und Chory, J.** (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380-383.
- Weber, P., Fulgosi, H., Piven, I., Müller, L., Krupinska, K., Duong, V.H., Herrmann, R.G., und Sokolenko, A.** (2006). TCP34, a nuclear-encoded response regulator-like TPR Protein of higher plant chloroplasts. *J Mol Biol* **357**, 535-549.
- Welchman, R.L., Gordon, C., und Mayer, R.J.** (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 599-609.
- Williams, D.L.** (1985). Molecular biology in arteriosclerosis research. *Arteriosclerosis* **5**, 213-227.
- Wolschin, F.** (2006). Characterisation of protein phosphorylation in *Arabidopsis thaliana* and *Chlamydomonas reinhardtii* based on affinity chromatography and mass spectrometry. Dissertation, In Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics (Heidelberg: Ruperto-Carola-University)
- Zhang, T., Liu, Y., Yang, T., Zhang, L., Xu, S., Xue, L., und An, L.** (2006). Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem* **44**, 274-283.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., und Grissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.
- Zimmermann, P., Hennig, L., und Grissem, W.** (2005). Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci* **10**, 407-409.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., Boller, T., und Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.

**Zolnierowicz, S., und Bollen, M.** (2000). Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *EMBO J* **19**, 483-488.



## 10. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Leister für die Möglichkeit bedanken, an seinem Lehrstuhl die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation durchzuführen und für die Überlassung des interessanten Themas.

Weiterhin möchte ich mich bei allen bedanken, die durch experimentelle Unterstützung am Fortgang dieses Projektes beteiligt waren: Anja Rödiger und Elena Aseeva bei *in vitro* Import-Versuchen, Dr. Andrea Kandlbinder für Array-Analysen, Angie Dietzmann für die Unterstützung bei der Mikroskopie, Dr. Bernd Müller und Youlia Davidova für massenspektrometrische Untersuchungen, Elisabeth Gerick für die Unterstützung bei der Genotypisierung.

Deweiteren möchte ich mich bei Dr. Tatjana Kleine, Dr. Ulrike Oster, Dr. Anja Schneider, Christian Voigt, Dr. Martin Weigel und natürlich allen Kollegen für hilfreiche Diskussionen rund um das Thema der Dissertation bedanken.

Meiner Familie und vor allem Birgit danke ich für einen festen familiären Rückhalt, ohne den für mich ein konzentriertes Arbeiten undenkbar wäre.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Informationen

---

- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch
- Geboren am 23.09.1977
- Geburtsort: Halle/Saale

### Ausbildung

---

- |                         |   |             |
|-------------------------|---|-------------|
| 11/2005 – vorr. 09/2008 | Ludwig-Maximilians-Universität<br>Lehrstuhl für Botanik Prof. Dr. Dario Leister   | München     |
|                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wissenschaftlicher Angestellter</li> <li>• Fortsetzung der Dissertation zum Thema: <i>Functional Genomics of Proteinphosphorylation in Arabidopsis Chloroplasts</i></li> </ul> |             |
| 01/2005 – 10/2005       | Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung<br>Arbeitsgruppe <i>Genetics and Genomics of Photosynthesis</i> - Prof. Dr. Dario Leister  | Köln        |
|                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wissenschaftlicher Angestellter</li> <li>• Beginn der Dissertation zum Thema: <i>Functional Genomics of Proteinphosphorylation in Arabidopsis Chloroplasts</i></li> </ul>      |             |
| 11/2003 – 09/2004       | Martin-Luther-Universität<br>Institut für Pflanzenphysiologie<br>Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen   | Halle/Saale |
|                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diplomarbeit zum Thema: Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit verminderter TatA-Expression</li> <li>• Hochschulabschluss Diplom-Biologe: 1,3</li> </ul>        |             |
| 11/1998 - 10/2004       | Martin-Luther-Universität<br>Studium der Biologie   | Halle/Saale |
| 10/1997 - 10/1998       | Martin-Luther-Universität   | Halle/Saale |
|                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Studium der Rechtswissenschaften</li> </ul>  |             |

11/1996 – 09/1997	Wehrdienst	Homberg/Efze
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kraftfahrer</li> </ul>	
09/1991 – 09/1996	Trotha-Gymnasium Hanns Eisler	Halle/Saale
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allgemeine Hochschulreife: 2,1</li> </ul>	
09/1884 – 08/1991	Polytechnische Oberschule	Wallwitz

## Erfahrung

11/2005 – heute	Ludwig-Maximilians-Universität Lehrstuhl für Botanik Prof. Dr. Dario Leister	München
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wissenschaftlicher Angestellter</li> <li>• Projektkoordination bei der Analyse von Promotoren photosynthetischer Gene</li> </ul>	
07/2002 – 09/2002	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung	Gatersleben
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betriebspraktikum zum Thema Methoden der Proteomanalysen</li> </ul>	

## Publikation(en)

I Schliebner, M Pribil, J Zülke, A Dietzmann, D Leister, 2008: A Survey of Chloroplast Protein Kinases and Phosphatases in *Arabidopsis thaliana*; *Curr. Genomics*; 9(3), 184-190

## Poster

I Schliebner, E Gerick, A Dietzmann, D Leister: Functional Genomics of Protein Phosphorylation in Arabidopsis Chloroplasts. 3rd Tri-national Arabidopsis meeting , Tübingen (Deutschland), 26. – 29.09.2006

I Schliebner, V Bonardi, A Dietzmann, D Leister: Functional Genomics of Protein Phosphorylation in Arabidopsis Chloroplasts. 2nd Tri-national Arabidopsis meeting , Neuchatel (Schweiz), 24. – 27.08.2005

## Tätigkeiten neben dem Studium

2003 – 2003	Martin-Luther-Universität Institut für Pflanzenphysiologie Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen	Halle/Saale
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wissenschaftliche Hilfskraft</li> </ul>	
1998 – 2002	GEHE-Pharmahandel	Halle/Saale
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Courierfahrer/ Lagerist</li> </ul>	

## **12. Ehrenwörtliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Der Autor hat zuvor nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder sich einer Doktorprüfung zu unterziehen. Die Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt.

München,  
September 2008

Ivo Schliebner

### 13. Anhang

**Tabelle A-1: Ergebnisse der Vorhersage der untersuchten Proteinkinasen durch neun unterschiedliche Vorhersagealgorithmen für subzelluläre Lokalisationen. Eine „0“ kennzeichnet eine nicht-chloroplastidäres Vorhersageergebnis für die entsprechende Proteinkinase, wohingegen chloroplastidäre Vorhersage durch eine „1“ gekennzeichnet ist.**

AGI	Klasse	Predotar	TargetP	ProteinPr owler	AAIndexL OC	PredSL	SLP-Local	WolfPSORT	PCLR	MULTILOCC	Anzahl der Hits
cTP konnte bestätigt werden											
At1g51170	4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	8
At2g23070	4	1	1	1	1	0	1	1	1	0	7
At2g34180	4	1	1	1	0	0	1	1	1	0	6
cTP konnte <b>nicht</b> bestätigt werden											
At2g17220	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
At2g31500	4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	8
At3g24550	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	7
At3g27580	4	0	1	1	0	1	1	1	1	1	7
At5g38560	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	7
At1g68690	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	7
At4g36950	4	0	1	1	0	1	1	0	1	1	6
At4g32710*	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	5
At3g24400	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	5

**Tabelle A- 2: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine einer Thylakoidpreparation aus der Insertionslinie *ppk10-2* des Gelbereiches 3C**

Nummer	AGI	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	Anzahl der detektierten Peptide
3	AT5G54270.1	64,90	28688,45	120
4	ATCG00480.1	63,10	53900,17	73
6	AT3G54890.1	36,50	25979,3	81
7	AT3G54890.4	41,30	23246,88	81
8	AT1G06680.1	63,90	28077,94	96
9	AT4G10340.1	48,60	30137,68	51
12	AT3G01500.2	47,80	37426,16	47
13	AT3G01500.1	61,50	29485,17	47
14	AT5G20720.1	57,30	26785,46	59
15	AT5G20720.2	57,30	26785,46	59
16	AT3G01500.3	46,40	36121,4	46
17	AT3G01500.4	60,20	28180,41	46
19	AT1G61520.1	30,80	29163,02	58
20	AT1G61520.2	38,10	23730,99	58
21	AT3G54890.2	33,80	22066,32	37
22	AT3G54890.3	42,70	17529,97	37
23	AT3G11630.1	37,60	29073,96	29
24	AT5G06290.1	36,60	29761,24	29
25	AT3G08940.2	34,50	31174	25
26	AT3G04790.1	39,90	29287,41	27

27	AT2G21170.1	31,40	33325,16	19
28	AT2G21170.2	32,40	32286,69	19
30	AT2G34430.1	32,71	28152,16	37
31	AT3G61470.1	43,58	27768,33	21
32	AT4G20360.1	14,71	51597,68	12
33	ATCG00490.1	21,50	52921,67	23
38	AT1G29910.1	41,57	28209,2	36
39	AT1G29920.1	41,57	28209,2	36
40	AT1G29930.1	41,57	28223,25	36
41	AT2G34420.1	30,94	28036,12	35
43	ATCG00120.1	21,30	55294,12	20
44	AT1G44575.1	24,53	27990,28	23
45	ATCG00800.1	43,58	25172,54	19
46	AT3G63190.1	42,91	30403,38	16
47	AT3G56650.1	55,34	28612,23	14
49	AT2G05070.1	36,60	28602,44	32
50	AT3G27690.1	36,47	28784,48	32
51	AT1G44575.2	23,90	21966,87	19
52	AT4G02770.1	47,12	22583,76	14
53	AT5G23060.1	17,57	41259,8	14
54	AT5G14740.1	27,79	36591,55	33
55	AT5G14740.2	35,52	28326,37	33
56	AT2G20890.1	28,33	33774,53	15
57	AT1G14410.1	39,16	29040,01	12
58	ATCG00270.1	21,53	39521,91	12
59	AT1G03130.1	40,20	22292,67	12
60	ATCG00020.1	21,25	38911,45	16
61	AT5G14740.3	22,73	36504,55	27
62	AT5G14740.4	22,73	36462,5	27
63	AT5G14740.5	24,19	34404,28	27
64	AT4G21280.1	32,29	23780,68	8
65	AT5G38660.1	23,43	31417,41	8
66	AT3G47470.1	30,28	27716,13	14
71	AT2G39730.1	15,19	51947,95	10
72	AT2G39730.2	16,14	49068,71	10
73	AT2G39730.3	16,33	48469,42	10
74	AT1G15820.1	29,07	27505,07	17
75	AT2G30790.1	13,79	28164,21	31
76	AT4G37925.1	33,64	24779,09	7
77	AT4G21280.2	22,77	23851,72	6
78	AT5G66570.1	22,89	35120,64	9
79	ATCG00680.1	10,43	56001,5	7
80	AT5G66190.1	16,39	40300,65	8
81	AT5G66190.2	22,52	29665,03	8
82	AT2G02740.1	28,36	29709,44	7
83	AT2G02740.2	28,46	29622,41	7
84	AT1G28140.1	13,57	30260,03	9

85	AT3G08740.1	17,37	26211,33	8
87	AT3G25760.1	18,90	27784,28	4
88	AT4G01310.1	32,06	28326,06	7
89	AT4G09650.1	23,93	25652,72	7
90	AT3G08940.1	22,03	24985,8	15
91	AT2G05100.1	13,58	28632,41	24
92	AT3G61870.1	19,12	29567,81	4
93	AT3G61870.2	20,47	27786,83	4
94	AT2G37220.1	10,38	30699,18	3
95	AT1G71500.1	15,68	31707,53	6
96	AT3G14110.2	18,53	25702,59	10
97	AT3G14110.1	13,61	34565,16	10
98	AT3G25770.1	13,83	27618,02	4
99	AT3G50820.1	18,73	34997,66	5
100	AT4G05180.1	20,87	24628,06	6
101	ATCG00280.1	9,51	51834,71	4
102	ATCG00540.1	11,88	35334,77	5
103	AT3G52150.1	18,97	27731,38	3
104	AT3G52150.2	18,97	27731,38	3
105	AT5G17170.1	18,82	28441,11	5
106	AT5G17170.2	22,77	23873,8	5
107	AT5G01530.1	20,34	31120,99	4
108	AT4G17040.1	11,15	33419,43	8
110	AT5G61410.1	12,46	29989,71	7
111	AT5G61410.2	12,46	29989,71	7
112	AT1G31330.1	25,34	24157,83	7
113	AT4G03280.1	33,19	24350,38	6
114	AT4G03280.2	36,19	22518,47	6
115	AT1G08640.1	10,54	32881,18	2
116	AT5G38940.1	17,49	23635,53	5
118	ATCG00430.1	13,33	25349,98	3
119	AT1G13280.1	8,27	27792,05	3
120	AT5G28450.1	17,34	18936,08	7
121	ATCG00130.1	38,59	21043,94	4
122	ATCG00720.1	15,81	24136,57	4
123	AT5G08670.1	8,63	59634,18	5
124	AT5G08680.1	8,59	59822,27	5
125	AT5G08690.1	8,63	59676,23	5
126	AT1G20020.1	11,92	41141,7	7
127	AT1G20020.2	12,57	39207,72	7
128	AT1G20020.3	11,92	41140,75	7
130	ATCG00340.1	3,95	82423,05	6
131	ATCG00160.1	23,73	26887,12	5
132	AT4G32260.1	15,53	23902,71	5
134	AT3G25480.1	6,82	28993,09	3
135	ATCG00380.1	11,94	23225,72	6
136	AT4G04640.1	9,12	40885,6	4

137	AT1G67090.1	17,22	20202,95	3
138	AT1G07660.1	21,36	11402,4	5
139	AT1G07820.1	21,36	11402,4	5
140	AT1G07820.2	21,36	11402,4	5
141	AT2G28740.1	21,36	11402,4	5
142	AT3G45930.1	21,36	11402,4	5
143	AT3G53730.1	21,36	11402,4	5
144	AT3G46320.1	21,36	11402,4	5
145	AT5G59690.1	21,36	11402,4	5
146	AT5G59970.1	21,36	11402,4	5
147	AT1G78630.1	10,79	26772,04	5
148	AT1G12900.1	6,52	42820,17	4
149	AT1G12900.2	8,20	34311,05	4
150	AT3G26650.1	6,57	42463,04	4
151	AT1G45474.1	12,50	27784,41	4
152	AT1G45474.2	12,50	27784,41	4
153	AT1G66580.1	10,41	24914,19	3
154	AT1G14320.1	10,45	24902,16	3
155	AT1G26910.1	10,41	24893,14	3
156	AT1G07920.1	4,68	49470,82	3
157	AT1G07930.1	4,68	49470,82	3
158	AT1G07940.1	4,68	49470,82	3
159	AT1G07940.2	4,68	49470,82	3
160	AT1G07930.2	5,65	41347,66	3
161	AT5G60390.1	4,68	49470,82	3
162	AT5G60390.2	5,25	44327,98	3
163	AT1G12410.1	7,89	31188,98	5

**Tabelle A- 3: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine einer Thylakoidpreparation aus dem Wildtyp des Gelbereiches 4C.**

Nummer	AGI	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	Anzahl der detektierten Peptide
1	AT5G54270.1	71,70	28688,45	283
3	AT3G54890.1	45,60	25979,3	142
4	AT3G54890.4	41,80	23246,88	137
7	AT3G54890.2	44,00	22066,32	59
9	AT3G54890.3	42,70	17529,97	54
10	AT4G10340.1	54,30	30137,68	65
11	ATCG00480.1	39,80	53900,17	37
13	AT1G06680.1	58,60	28077,94	112
15	AT1G29910.1	53,90	28209,2	110
16	AT1G29920.1	53,90	28209,2	110
17	AT1G29930.1	53,90	28223,25	110
18	AT2G34430.1	45,10	28152,16	108



19	AT1G61520.1	35,90	29163,02	56
20	AT1G61520.2	45,00	23730,99	56
21	AT2G34420.1	43,40	28036,12	106
22	AT3G01500.2	30,80	37426,16	27
23	AT3G01500.1	40,40	29485,17	27
24	AT3G01500.3	32,40	36121,4	27
25	AT3G01500.4	42,10	28180,41	27
26	AT5G20720.1	48,60	26785,46	22
27	AT5G20720.2	48,60	26785,46	22
29	AT3G08940.2	42,90	31174	29
30	AT2G05070.1	48,70	28602,44	107
31	AT3G27690.1	48,50	28784,48	107
32	AT5G23060.1	22,70	41259,8	20
34	ATCG00120.1	18,50	55294,12	15
35	AT3G61470.1	28,80	27768,33	17
36	AT5G14740.1	19,90	36591,55	21
37	AT5G14740.2	25,50	28326,37	21
38	AT3G56650.1	44,30	28612,23	14
39	AT4G37925.1	33,60	24779,09	19
40	AT1G71500.1	24,40	31707,53	18
41	AT5G66570.1	32,20	35120,64	14
42	AT2G20890.1	13,70	33774,53	18
43	AT4G03280.1	40,60	24350,38	12
44	AT4G03280.2	44,30	22518,47	12
45	AT3G50820.1	28,70	34997,66	12
46	AT5G14740.3	14,80	36504,55	17
47	AT5G14740.4	14,80	36462,5	17
48	AT5G14740.5	15,80	34404,28	17
49	AT1G15820.1	12,80	27505,07	12
50	AT3G11630.1	14,70	29073,96	7
51	AT5G06290.1	19,40	29761,24	7
52	ATCG00680.1	12,40	56001,5	11
53	AT3G25770.1	26,10	27618,02	10
54	AT5G66190.1	20,30	40300,65	9
55	AT5G66190.2	27,90	29665,03	9
56	ATCG00130.1	33,20	21043,94	7
57	AT5G38660.1	19,60	31417,41	11
58	ATCG00020.1	13,30	38911,45	10
60	ATCG00270.1	17,80	39521,91	11
61	AT3G04790.1	22,10	29287,41	9
62	AT1G44575.1	17,70	27990,28	10
63	AT1G44575.2	22,90	21966,87	10
64	AT3G63190.1	27,30	30403,38	5
65	AT2G30790.1	8,40	28164,21	34
66	AT1G03130.1	29,40	22292,67	8
67	AT4G02770.1	28,80	22583,76	8
68	AT5G01600.1	18,80	28160,19	8

69	AT4G21280.1	26,50	23780,68	7
70	AT2G39730.1	12,70	51947,95	7
71	AT2G39730.2	13,50	49068,71	7
72	AT2G39730.3	13,60	48469,42	7
73	AT3G47470.1	21,50	27716,13	12
74	ATCG00540.1	10,90	35334,77	7
80	AT3G08940.1	22,00	24985,8	19
81	AT2G05100.1	13,60	28632,41	93
82	AT1G31330.1	17,60	24157,83	9
83	AT4G21280.2	17,00	23851,72	5
84	AT3G25760.1	10,60	27784,28	6
85	AT4G12800.1	21,00	23037,13	11
86	AT3G14110.2	18,50	25702,59	11
87	AT3G14110.1	13,60	34565,16	11
88	AT5G01530.1	14,10	31120,99	3
89	AT1G50250.1	6,15	76711,89	5
90	AT5G42270.1	6,96	75185,03	5
91	AT2G21170.1	11,43	33325,16	4
92	AT2G21170.2	11,76	32286,69	4
93	AT4G05180.1	20,87	24628,06	5
94	AT1G18170.1	14,57	26512,86	6
95	AT1G28140.1	9,29	30260,03	5
96	AT1G14410.1	17,49	29040,01	6
99	AT4G01310.1	11,83	28326,06	7
100	ATCG00430.1	17,78	25349,98	3
101	AT1G08640.1	10,54	32881,18	3
102	AT5G28450.1	17,34	18936,08	10
103	AT1G20020.1	11,11	41141,7	4
104	AT1G20020.2	11,71	39207,72	4
105	AT1G20020.3	11,11	41140,75	4
106	AT5G43750.1	21,70	23730,71	3
107	ATCG00720.1	15,81	24136,57	3
108	ATCG00280.1	6,34	51834,71	4
109	ATCG00340.1	3,95	82423,05	8
110	AT1G44920.1	9,69	27697,67	3
111	ATCG00490.1	10,23	52921,67	2
112	AT1G07660.1	29,13	11402,4	3
113	AT1G07820.1	29,13	11402,4	3
114	AT1G07820.2	29,13	11402,4	3
115	AT2G28740.1	29,13	11402,4	3
116	AT3G45930.1	29,13	11402,4	3
117	AT3G53730.1	29,13	11402,4	3
118	AT3G46320.1	29,13	11402,4	3
119	AT5G59690.1	29,13	11402,4	3
120	AT5G59970.1	29,13	11402,4	3
121	AT4G04640.1	6,17	40885,6	3
125	AT3G08740.1	11,86	26211,33	3

126	AT3G46780.1	5,49	54325,48	3
127	AT3G23400.1	11,62	30435,9	3
130	AT5G42650.1	6,37	58160,46	2

**Tabelle A- 4: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine einer Thylakoidpreparation aus der Insertionslinie *pppk10-2* des Gelbereiches 3D**

Nummer	AGI	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	Anzahl der detektierten Peptide
4	AT1G06680.1	63,90	28077,94	314
5	AT3G61470.1	52,10	27768,33	88
7	AT1G61520.1	46,90	29163,02	94
8	AT1G61520.2	51,80	23730,99	91
15	AT4G02770.1	48,10	22583,76	49
16	AT1G44575.1	37,40	27990,28	61
17	ATCG00480.1	33,50	53900,17	32
20	AT1G15820.1	36,00	27505,07	48
21	AT1G03130.1	47,10	22292,67	45
23	AT1G44575.2	27,80	21966,87	52
24	AT3G54890.1	32,00	25979,3	28
25	AT3G54890.4	36,20	23246,88	28
26	AT3G47470.1	42,60	27716,13	37
27	AT4G03280.1	35,40	24350,38	22
28	AT4G03280.2	38,60	22518,47	22
29	AT2G34430.1	23,30	28152,16	24
30	ATCG00800.1	27,50	25172,54	20
31	ATCG00490.1	15,90	52921,67	24
32	AT3G50820.1	29,00	34997,66	14
33	AT5G66570.1	24,70	35120,64	18
34	AT1G29910.1	21,30	28209,2	23
35	AT1G29920.1	21,30	28209,2	23
36	AT1G29930.1	21,30	28223,25	23
37	AT2G34420.1	21,50	28036,12	23
38	AT4G10340.1	29,30	30137,68	17
39	AT1G12250.1	39,60	30045,85	17
40	AT1G12250.2	53,90	21754,69	17
41	AT3G11630.1	37,60	29073,96	30
42	AT1G78630.1	37,30	26772,04	24
43	AT5G38660.1	23,80	31417,41	21
44	AT5G23060.1	22,70	41259,8	12
45	AT5G54270.1	30,60	28688,45	23
46	AT5G06290.1	25,30	29761,24	18
47	ATCG00120.1	16,00	55294,12	13
48	AT3G01500.2	17,60	37426,16	20
49	AT3G01500.1	22,60	29485,17	20

50	AT3G01500.3	18,20	36121,4	20
51	AT3G01500.4	23,60	28180,41	20
52	AT1G45474.1	25,40	27784,41	18
53	AT1G45474.2	25,40	27784,41	18
54	AT4G09650.1	29,90	25652,72	17
55	AT4G21280.1	33,60	23780,68	14
56	AT1G33140.1	37,10	22004,87	12
57	AT1G33120.1	37,10	22003,87	12
59	AT4G04640.1	15,00	40885,6	14
60	ATCG00380.1	30,30	23225,72	16
61	AT2G05070.1	15,80	28602,44	21
62	AT3G27690.1	15,80	28784,48	21
63	ATCG00020.1	18,70	38911,45	9
64	AT5G14740.1	13,60	36591,55	18
65	AT5G14740.2	17,40	28326,37	18
66	AT4G21280.2	24,10	23851,72	12
67	AT3G56650.1	31,30	28612,23	11
68	AT3G61870.1	19,10	29567,81	12
69	AT4G02520.1	26,90	24113,6	11
70	AT2G05100.1	10,60	28632,41	17
71	AT1G12410.1	16,85	31188,98	13
72	AT3G54890.2	37,20	22066,32	11
73	AT3G54890.3	36,59	17529,97	11
74	AT2G30790.1	21,46	28164,21	50
75	AT1G77090.1	27,31	28483,68	8
76	ATCG00680.1	12,01	56001,5	8
77	AT4G32260.1	30,59	23902,71	12
78	AT5G14740.3	8,48	36504,55	15
79	AT5G14740.4	8,48	36462,5	15
80	AT5G14740.5	9,03	34404,28	15
81	AT2G30695.2	31,16	22247,49	7
82	AT2G30695.1	31,16	22246,49	7
83	AT4G15510.1	27,18	32245,42	9
84	AT4G15510.3	38,05	23562,98	9
85	ATCG00130.1	38,59	21043,94	11
87	ATCG00270.1	17,56	39521,91	8
88	AT5G28450.1	24,86	18936,08	19
89	AT3G04790.1	17,03	29287,41	5
90	AT1G67090.1	21,11	20202,95	5
91	AT4G05180.1	25,65	24628,06	8
92	AT5G17170.1	18,82	28441,11	9
93	AT5G17170.2	22,77	23873,8	9
94	AT2G39730.1	10,76	51947,95	7
95	AT2G39730.2	11,43	49068,71	7
96	AT2G39730.3	11,56	48469,42	7
97	ATCG00540.1	19,69	35334,77	7
98	AT1G28140.1	13,57	30260,03	6

99	ATCG00280.1	11,84	51834,71	6
100	AT3G26070.1	22,73	27146,52	5
101	AT4G12800.1	21,00	23037,13	6
102	AT4G33350.1	25,00	30086,61	6
103	AT4G28750.1	40,56	14957,77	3
105	AT5G20720.1	19,37	26785,46	7
106	AT5G20720.2	19,37	26785,46	7
107	AT4G20360.1	8,40	51597,68	4
108	AT1G07660.1	31,07	11402,4	5
109	AT1G07820.1	31,07	11402,4	5
110	AT1G07820.2	31,07	11402,4	5
111	AT2G28740.1	31,07	11402,4	5
112	AT3G45930.1	31,07	11402,4	5
113	AT3G53730.1	31,07	11402,4	5
114	AT3G46320.1	31,07	11402,4	5
115	AT5G59690.1	31,07	11402,4	5
116	AT5G59970.1	31,07	11402,4	5
119	AT2G40300.1	15,06	29010,88	4
120	AT3G08940.2	16,72	31174	14
123	AT1G31330.1	22,17	24157,83	8
125	AT3G25480.1	15,91	28993,09	4
126	ATCG00720.1	25,12	24136,57	6
127	AT4G25100.1	16,51	23775,96	9
128	AT4G25100.3	16,51	23775,96	9
129	AT4G25100.2	16,51	23775,96	9
130	AT4G25100.4	18,82	21084,59	9
133	AT1G12900.1	10,78	42820,17	4
134	AT1G12900.2	13,56	34311,05	4
135	AT3G26650.1	10,86	42463,04	4
142	AT3G25760.1	14,17	27784,28	4
143	AT1G02560.1	9,40	32335,27	3
145	AT2G02930.1	16,04	24105,66	6
146	AT2G02740.1	17,16	29709,44	3
147	AT2G02740.2	17,23	29622,41	3
150	AT1G02920.1	8,61	23583,38	3
151	AT1G02930.1	8,65	23471,22	3
155	AT3G08940.1	11,00	24985,8	12
156	AT3G46060.1	5,10	23820,19	4
157	AT3G09900.1	5,00	24279,39	4
158	AT3G46060.2	5,10	23820,19	4
159	AT5G03520.1	5,10	24022,26	4
160	AT5G59840.1	5,10	23819,23	4
161	AT5G03520.2	5,30	22976,68	4

**Tabelle A- 5: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine einer Thylakoidpreparation aus dem Wildtyp des Gelbereiches 4D**

Nummer	AGI	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	Anzahl der detektierten Peptide
2	AT1G61520.1	52,40	29163,02	169
3	AT1G06680.1	64,30	28077,94	563
4	AT1G61520.2	58,30	23730,99	162
6	AT3G61470.1	57,20	27768,33	114
11	AT4G02770.1	47,10	22583,76	28
12	AT3G54890.1	35,30	25979,3	33
13	AT1G44575.1	30,60	27990,28	47
14	AT2G30790.1	17,60	28164,21	61
15	AT3G54890.4	31,90	23246,88	32
16	AT1G03130.1	40,70	22292,67	23
17	AT1G44575.2	27,80	21966,87	40
18	AT1G15820.1	24,40	27505,07	33
19	AT5G38660.1	22,00	31417,41	28
20	AT3G47470.1	44,20	27716,13	18
22	AT1G45474.1	25,40	27784,41	21
23	AT1G45474.2	25,40	27784,41	21
24	ATCG00480.1	18,30	53900,17	13
25	AT4G09650.1	30,30	25652,72	18
26	AT4G04640.1	19,30	40885,6	16
29	AT1G12250.1	28,60	30045,85	12
30	AT1G12250.2	38,80	21754,69	12
31	ATCG00120.1	16,20	55294,12	10
32	AT3G50820.1	26,30	34997,66	17
33	AT5G66570.1	28,60	35120,64	19
34	AT5G23060.1	17,30	41259,8	16
35	AT1G78630.1	42,70	26772,04	16
39	AT2G34430.1	19,90	28152,16	14
40	AT5G54270.1	21,50	28688,45	14
41	AT5G28450.1	26,60	18936,08	27
42	AT1G77090.1	23,50	28483,68	11
43	AT3G56650.1	31,30	28612,23	12
44	AT4G21280.1	33,20	23780,68	9
45	AT3G11630.1	28,20	29073,96	9
47	AT4G10340.1	16,10	30137,68	10
48	AT1G29910.1	18,00	28209,2	13
49	AT1G29920.1	18,00	28209,2	13
50	AT1G29930.1	18,00	28223,25	13
51	AT2G05070.1	18,90	28602,44	12
52	AT2G34420.1	18,10	28036,12	13
53	AT3G27690.1	18,80	28784,48	12
54	AT4G03280.1	27,10	24350,38	11

55	AT4G03280.2	29,50	22518,47	11
56	AT3G54890.2	32,40	22066,32	10
57	AT4G21280.2	23,70	23851,72	7
58	ATCG00540.1	11,90	35334,77	11
59	AT4G15510.1	10,80	32245,42	11
60	AT4G15510.3	15,10	23562,98	11
62	ATCG00020.1	13,30	38911,45	5
65	ATCG00130.1	25,00	21043,94	4
66	AT3G61870.1	15,10	29567,81	7
67	AT2G05100.1	13,60	28632,41	9
68	ATCG00270.1	15,00	39521,91	10
69	AT3G54890.3	30,50	17529,97	9
70	AT1G31330.1	13,10	24157,83	11
72	AT5G06290.1	16,10	29761,24	4
73	ATCG00280.1	9,50	51834,71	5
74	AT1G28140.1	9,30	30260,03	9
75	ATCG00720.1	21,40	24136,57	5
76	ATCG00490.1	4,20	52921,67	3
77	AT5G43750.1	21,70	23730,71	7
78	AT2G39730.1	3,20	51947,95	7
79	AT2G39730.2	3,40	49068,71	7
80	AT2G39730.3	3,40	48469,42	7
81	AT3G25480.1	11,00	28993,09	4
82	AT5G17170.1	12,50	28441,11	5
83	AT5G17170.2	15,20	23873,8	5
84	AT5G62140.1	13,30	26422,68	4
85	AT4G05180.1	9,10	24628,06	2
86	AT3G26070.1	10,30	27146,52	3
87	AT1G20020.1	8,40	41141,7	3
88	AT1G20020.2	8,90	39207,72	3
89	AT1G20020.3	8,40	41140,75	3
90	AT3G01500.2	9,20	37426,16	4
91	AT3G01500.1	11,90	29485,17	4
92	AT3G01500.3	9,50	36121,4	4
93	AT3G01500.4	12,40	28180,41	4
94	AT5G14740.1	9,70	36591,55	4
95	AT5G14740.2	12,40	28326,37	4
96	AT4G32260.1	12,30	23902,71	7
97	AT3G25760.1	10,60	27784,28	6
99	AT5G01530.1	7,90	31119,98	4
100	AT2G20890.1	4,70	33774,53	2
101	ATCG00340.1	4,00	82423,05	5
102	AT1G12410.1	3,90	31188,98	2
103	AT1G07660.1	21,40	11402,4	4
104	AT1G07820.1	21,40	11402,4	4
105	AT1G07820.2	21,40	11402,4	4
106	AT2G28740.1	21,40	11402,4	4

107	AT3G45930.1	21,40	11402,4	4
108	AT3G53730.1	21,40	11402,4	4
109	AT3G46320.1	21,40	11402,4	4
110	AT5G59690.1	21,40	11402,4	4
111	AT5G59970.1	21,40	11402,4	4
112	ATCG00680.1	2,40	56001,5	3

**Tabelle A- 6: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine einer phosphoprotein-angereicherten Stromafraction der Insertionsmutante *pppk10-2* im Größenbereich von 50-60kDa. In Fettschrift dargestellt, sind Identifizierungen dieser Probe, die im Wildtyp nicht detektiert werden konnte.**

Nummer	AGI	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	Anzahl der detektierten Peptide
1	ATCG00490.1	71,4	52921,67	202
3	AT1G55490.1	56,3	63769,78	122
4	AT2G28000.1	58,7	62033,95	98
9	AT3G58610.1	47,2	63772,49	49
10	AT5G52920.1	45,6	63481,45	69
11	AT2G35040.1	46	64866,01	57
12	AT1G18500.1	46,4	68633,29	44
13	AT4G34200.1	36,3	63285,73	43
14	AT3G48560.1	33,3	72539,36	31
15	ATCG00120.1	33,3	55294,12	34
16	AT5G13030.1	26,1	71052,59	24
17	AT1G70820.1	32,7	67269,79	23
18	AT3G22960.1	28	65090,21	23
19	AT3G45140.1	18	101982,2	18
20	AT4G04770.1	30	61828,9	16
21	AT2G47940.1	24,4	66760,2	15
22	AT2G15620.1	24,2	65463,73	17
23	AT2G39730.1	33,5	51947,95	16
24	AT1G12900.1	36,6	42820,17	13
25	AT2G41680.1	25,5	57913,48	12
26	AT5G35630.1	34,4	47381,04	14
27	AT3G60750.1	21,2	79918,35	13
28	AT4G26300.1	19,2	72341,3	13
29	AT1G70570.1	22,4	65183,55	12
30	AT3G55400.1	19,8	69230,26	12
31	AT1G42970.1	19,9	47629,61	14
33	AT1G67090.1	42,8	20202,95	20
34	AT1G32440.1	17,7	62575,31	13
35	AT5G51820.1	16,4	67946,59	9
36	AT3G06350.1	18,6	65754,91	10
37	AT5G56500.1	20,3	63202,36	8
38	AT2G31170.1	14,4	63873,64	7



39	AT3G19480.1	16,2	62083,35	9
40	AT5G05730.1	16,5	66269,57	10
43	AT3G01510.1	14,9	65699,71	8
44	AT2G29630.2	16	71941,08	7
45	AT3G13470.1	13,4	63302,5	11
46	AT2G37690.1	11,7	69707,77	10
47	AT5G17530.1	12,2	62836,57	7
48	AT3G04870.1	11,6	61594,76	6
49	AT5G35790.1	10,4	65386,6	5
50	AT3G23940.1	10,4	64871,75	6
51	AT1G66530.1	8,8	66404,34	4
52	AT5G24300.1	9,2	72053,02	4
<b>53</b>	<b>AT1G48520.2</b>	<b>11,2</b>	<b>52475,82</b>	<b>4</b>
54	AT1G56190.1	12,1	49907,88	6
55	AT2G45290.1	6,7	79872,23	4
56	AT1G15060.1	8,8	63634,73	4
57	AT4G18440.1	9,1	59719,76	5
58	AT5G38420.1	16	20337,1	8
59	AT5G38430.1	16,6	20273,11	9
60	AT5G22510.1	6,2	69195,98	3
<b>61</b>	<b>AT4G24620.1</b>	<b>5,9</b>	<b>67006,29</b>	<b>3</b>
62	AT3G12780.1	8,3	50080,81	4
64	AT1G26230.1	5,4	66754,9	4
65	AT1G74040.1	6,8	68093,98	3
<b>66</b>	<b>AT5G18820.1</b>	<b>5</b>	<b>61154,64</b>	<b>2</b>
67	AT5G59750.1	5,1	56110,49	2
<b>68</b>	<b>AT1G36280.1</b>	<b>5,1</b>	<b>58778,54</b>	<b>2</b>
69	AT5G48960.1	3,4	72845,84	2
<b>70</b>	<b>AT4G13430.1</b>	<b>5,1</b>	<b>54978,63</b>	<b>2</b>
<b>71</b>	<b>AT5G64300.1</b>	<b>5,2</b>	<b>59019,36</b>	<b>2</b>
72	AT4G19170.1	3,9	65560,46	2
73	AT4G29840.1	5,3	57740,13	2
<b>74</b>	<b>AT1G17745.1</b>	<b>3,2</b>	<b>66412,9</b>	<b>2</b>
<b>75</b>	<b>AT2G22910.1</b>	<b>3</b>	<b>67136,67</b>	<b>2</b>
<b>76</b>	<b>AT3G48730.1</b>	<b>6,8</b>	<b>50109,46</b>	<b>2</b>
<b>77</b>	<b>AT1G66200.1</b>	<b>6,5</b>	<b>39182,55</b>	<b>4</b>
78	AT4G17300.1	3,9	63658,39	2
79	AT5G11670.1	3,9	64372,38	2

**Tabelle A- 7: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine einer phosphoprotein-angereicherten Stromafraktion des Wildtyps im Größenbereich von 50-60kDa. In Fettschrift dargestellt, sind Identifizierungen dieser Probe, die in der Insertionslinie *pppk10-2* nicht detektiert werden konnte.**

Nummer	AGI	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	Anzahl der detektierten Peptide
1	ATCG00490.1	73,9	52921,67	236
2	AT2G28000.1	52,9	62033,95	76
6	AT3G58610.1	47,9	63772,49	54
7	AT1G55490.1	59,2	63769,78	104
8	AT5G52920.1	50,8	63481,45	61
10	AT2G35040.1	51	64866,01	57
11	AT1G18500.1	45	68633,29	44
12	ATCG00120.1	42,6	55294,12	41
14	AT2G15620.1	36,5	65463,73	28
15	AT4G34200.1	39	63285,73	43
16	AT3G45140.1	24,7	101982,2	21
17	AT5G13030.1	29,9	71052,59	22
18	AT1G70820.1	28,5	67269,79	25
19	AT1G70570.1	28,4	65183,55	17
20	AT4G26300.1	23,7	72341,3	20
21	AT3G48560.1	25,7	72539,36	19
22	AT3G60750.1	21,2	79918,35	16
23	AT3G22960.1	30,2	65090,21	19
24	AT2G47940.1	23,9	66760,2	16
26	AT4G04770.1	31,1	61828,9	13
27	AT2G39730.1	28,3	51947,95	12
28	AT1G67090.1	33,9	20202,95	26
30	AT2G29630.2	21,7	71941,08	12
31	AT5G05730.1	20	66269,57	15
33	AT3G19480.1	20,6	62083,35	11
35	AT3G23940.1	17,9	64871,75	8
36	AT3G55400.1	15,9	69230,26	9
37	AT5G48960.1	18,4	72845,84	7
38	AT1G42970.1	17,4	47629,61	10
39	AT4G19170.1	11,9	65560,46	10
40	AT5G11670.1	16	64372,38	8
41	AT5G51820.1	16,1	67946,59	8
42	AT1G32440.1	11,9	62575,31	11
43	AT1G12900.1	23,3	42820,17	8
44	AT3G04870.1	13,6	61594,76	7
45	AT2G37690.1	12,1	69707,77	6
46	AT5G35630.1	21,6	47381,04	7
47	AT3G13470.1	12,1	63302,5	8
48	AT5G56500.1	13,3	63202,36	6
50	AT5G17530.1	12,2	62836,57	5
51	AT5G24300.1	10,7	72053,02	5

52	AT1G15060.1	10,6	63634,73	6
53	AT3G06350.1	11,8	65754,91	6
54	AT2G41680.1	8,3	57913,48	5
55	AT5G38420.1	16	20337,1	8
56	AT1G66530.1	8,8	66404,34	4
57	AT5G38430.1	22,1	20273,11	13
58	AT1G56190.1	10,3	49907,88	5
59	AT2G45290.1	6,7	79872,23	7
<b>61</b>	<b>AT2G44160.1</b>	<b>6,6</b>	<b>66759,56</b>	<b>5</b>
62	AT5G22510.1	9,2	69195,98	4
<b>63</b>	<b>AT3G59970.1</b>	<b>11,2</b>	<b>47228,05</b>	<b>3</b>
<b>65</b>	<b>AT1G20620.2</b>	<b>8,2</b>	<b>48867,57</b>	<b>3</b>
67	AT3G01510.1	6,4	65699,71	4
68	AT1G26230.1	5,4	66754,9	6
<b>69</b>	<b>AT5G62530.1</b>	<b>6,3</b>	<b>61733,75</b>	<b>4</b>
70	AT4G17300.1	5,8	63658,39	3
72	AT5G59750.1	6,1	56110,49	4
73	AT1G74040.1	5,2	68093,98	2
74	AT5G35790.1	4,7	65386,6	2
75	AT2G31170.1	4,8	63873,64	2
76	AT3G12780.1	6	50080,81	2
77	AT3G14390.1	4,5	53523,68	3
<b>78</b>	<b>AT1G48520.1</b>	<b>4,4</b>	<b>60902,6</b>	<b>2</b>
79	AT4G29840.1	4,4	57740,13	3
<b>80</b>	<b>AT3G26650.1</b>	<b>6,1</b>	<b>42463,04</b>	<b>3</b>
<b>81</b>	<b>AT5G60600.1</b>	<b>2,8</b>	<b>82204,55</b>	<b>2</b>
82	AT4G18440.1	4,1	59719,76	2
83	AT2G33210.1	4,1	61939,56	2