

**Deg- und SppA-Proteasen als  
Komponenten langfristiger physiologischer  
Anpassung des Photosyntheseapparates**

Dissertation

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

vorgelegt von

**Irina Sterr**

aus München

München

25.Oktober 2006

1. Gutachter: PD Dr. A. Sokolenko

2. Gutachter: Prof. Dr. R.G. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2006

**INHALTSVERZEICHNIS**

ABKÜRZUNGEN.....	VII
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Endosymbiontentheorie.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Der Chloroplast.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Die Thylakoidmembran als Ort der Photosynthese.....	3
1.2.2 Der thylakoidäre Energietransport.....	5
1.2.3 Das Photosystem II.....	6
1.2.4 Der Cytochrom <i>b<sub>6</sub>/f</i> -Komplex.....	6
1.2.5 Das Photosystem I.....	7
1.2.6 Die ATP-Synthase.....	7
1.2.7 Antennenkomplexe bei höheren Pflanzen und Cyanobakterien.....	8
1.2.8 Der Xanthophyllzyklus.....	9
<b>1.3 Anpassung der Thylakoidmembran an Stressbedingungen.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Kurzzeitanpassung von Thylakoidmembranen.....	9
1.3.1.1 „state transitions“.....	10
1.3.1.2 Phosphorylierung.....	11
1.3.2 Langzeitanpassung der Thylakoidmembranen.....	12
1.3.2.1 Bildung von Schutzproteinen.....	13
1.3.2.2 Photoinhibierung.....	13
1.3.3 Nährstoffmangel.....	15
<b>1.4 Enzym- und „chaperon“-Funktion von Proteasen.....</b>	<b>15</b>
1.4.1 Die Clp-Peptidasefamilie.....	16
1.4.2 Die FtsH-Peptidasefamilie.....	17
1.4.3 Die Deg-Peptidasefamilie.....	18
1.4.4 Die SppA-Peptidasefamilie.....	18
<b>1.5 <i>Arabidopsis</i> als Modellorganismus.....</b>	<b>19</b>
<b>1.6 <i>Synechocystis</i> als Modellorganismus.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Ziel der Arbeit.....</b>	<b>20</b>

<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	21
<b>2.1 Material</b> .....	21
2.1.1 Chemikalien und Enzyme.....	21
2.1.2 Molekulargewichtsmarker.....	21
2.1.3 Vektoren und Bakterienstämme.....	22
2.1.4 Antisera.....	22
2.1.5 Oligonukleotide.....	23
2.1.6 Puffer und Medien.....	25
2.1.6.1 Puffer.....	25
2.1.6.2 Medium für Bakterienkultur.....	27
2.1.6.3 Medium zur Anzucht von Cyanobakterien.....	28
2.1.6.4 Medium zur Kultivierung von <i>Arabidopsis</i> .....	29
2.1.7 Transfermembranen.....	30
2.1.8 Pflanzenmaterial.....	30
<b>2.2 Methoden</b> .....	31
2.2.1 Sequenzanalysen.....	31
2.2.2 Wachstumsbedingungen von <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	31
2.2.3 Konstruktion von HhoA- und HhoB-Komplementärmutanten.....	32
2.2.3.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	32
2.2.3.2 Transformation von Plasmid-DNS in kompetente Zellen.....	32
2.2.3.3 Konjugation transformierter Zellen mit <i>Synechocystis</i> .....	32
2.2.4 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Selektion transformierter Pflanzen.....	33
2.2.5 DNS- und RNS-Analysen.....	34
2.2.5.1 DNS-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
2.2.5.2 DNS-Isolierung aus <i>Synechocystis</i> .....	34
2.2.5.3 Plasmid-DNS-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	35
2.2.5.4 PCR-Analyse.....	35
2.2.5.5 RNS-Isolierung aus <i>Arabidopsis</i> .....	36
2.2.5.6 RNS-Isolierung aus <i>Synechocystis</i> .....	36
2.2.5.7 Analyse der Genexpression.....	37
2.2.5.7.1 RT-PCR.....	37
2.2.5.7.2 Northern-Analyse.....	37
2.2.6 Überexpression von Proteinen.....	38
2.2.7 Pigmentanalyse von <i>Synechocystis</i> .....	39
2.2.7.1 Bestimmung der Chlorophyll <i>a</i> -Konzentration.....	39
2.2.7.2 Bestimmung der Carotinoidkonzentration.....	39
2.2.7.3 Bestimmung der Phycocyaninkonzentration.....	40
2.2.8 Zellzahlbestimmung bei <i>Synechocystis</i> .....	40
2.2.9 Proteinanalysen.....	40
2.2.9.1 Proteinextraktion aus <i>Synechocystis</i> .....	40
2.2.9.2 Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis</i> .....	41
2.2.9.2.1 Extraktion von Thylakoiden aus intakten Chloroplasten.....	41
2.2.9.2.2 Extraktion lumenaler Proteine.....	42
2.2.9.3 Konzentrationsbestimmungen.....	42

2.2.9.4 Trennung photosynthetischer Komplexe mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	43
2.2.9.4.1 Saccharose-Dichtegradienten mit MOPS-Puffer für <i>Synechocystis</i> .....	43
2.2.9.4.2 Saccharose-Dichtegradienten mit TMK-Puffer für <i>Arabidopsis</i> .....	44
2.2.9.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	44
2.2.9.5.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	44
2.2.9.5.2 Blau-native Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow (1991).....	46
2.2.9.6 Färbung von PAA-Gelen.....	47
2.2.9.6.1 Imidazol-Zinkfärbung.....	47
2.2.9.6.2 Silbernitratfärbung.....	48
2.2.9.6.3 Coomassiefärbung.....	48
2.2.9.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	49
2.2.9.7.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose/PVDF-Membranen..	49
2.2.9.7.2 Western-Analyse mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörpern.....	50
2.2.9.7.3 Western-Analyse mit Anti-[HA]-Peroxidase.....	51
2.2.9.8 <i>in vivo</i> -Proteinmarkierung mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin bei <i>Synechocystis</i> .....	51
2.2.10 Sauerstoffmessung mit der Clark-Elektrode.....	52
2.2.11 Fluoreszenzmessungen.....	52
2.2.11.1 77K Fluoreszenzmessung.....	52
2.2.11.2 Fluoreszenzmessung mit PAM.....	52
2.2.12 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	53
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1 Charakterisierung und funktionelle Analyse von <i>Synechocystis</i> <math>\Delta hhoA</math>- und <math>\Delta hhoB</math>-Mutanten.....</b>	<b>55</b>
3.1.1 Herstellung der $\Delta hhoA$ - und $\Delta hhoB$ -„knock out“-Mutanten.....	55
3.1.2 Analyse des Genotyps.....	55
3.1.3 Herstellung von $\Delta hhoA$ - und $\Delta hhoB$ -Komplementationsmutanten.....	56
3.1.4 Phänotypische Charakterisierung.....	59
3.1.4.1 Wachstumsrate.....	60
3.1.4.2 Pigmentkonzentrations- und Zellzahlbestimmung.....	61
3.1.5 Spektroskopische Charakterisierung.....	62
3.1.5.1 Absorptionsspektren.....	62
3.1.5.2 77K Fluoreszenzspektren.....	63
3.1.6 Biochemische Analysen von $\Delta hhoA$ - und $\Delta hhoB$ -Mutanten.....	65
3.1.6.1 Proteinüberexpression und Antikörperherstellung.....	65
3.1.6.2 Abbau photosynthetischer Proteine unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel.....	66
3.1.6.3 Isolierung photosynthetischer Membrankomplexe durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	68
3.1.7 Biophysikalische Analysen.....	70

3.1.8 <i>in vivo</i> -Proteinmarkierung von Wildtyp und $\Delta hhoB$ .....	73
3.1.8.1 <i>in vivo</i> -Analyse der Proteindegradierung.....	73
3.1.8.2 <i>in vivo</i> -Analyse der Proteinsyntheserate.....	77
<b>3.2 Lokalisierung der HhoA- und HhoB-Proteine.....</b>	<b>78</b>
<b>3.3 Analyse von Deg- und SppA-Proteasen in <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>81</b>
3.3.1 Lokalisierung der Deg- und SppA-Proteasen im Chloroplasten.....	81
3.3.2 Lokalisierung der Deg-Proteine innerhalb der Thylakoidmembran.....	82
<b>3.4 T-DNS-Insertionslinien von <i>Arabidopsis thaliana</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>3.5 PCR- Analysen der T-DNS-Insertionslinien.....</b>	<b>85</b>
<b>3.6 Transkriptions- und Western-Analysen von <math>\Delta degP2</math>-, <math>\Delta degP5</math>- und <math>\Delta sppA</math>- Mutanten.....</b>	<b>88</b>
<b>3.7 Wachstumsanalysen.....</b>	<b>89</b>
3.7.1 Phänotypische Charakterisierung unter Standardbedingungen.....	89
3.7.2 Phänotypische Charakterisierung unter Starklicht.....	91
<b>3.8 Biophysikalische Analysen.....</b>	<b>95</b>
3.8.1 Sauerstoffmessung mit Hilfe der Clark-Elektrode.....	95
3.8.2 77K Fluoreszenzmessungen.....	97
3.8.3 PAM-Fluoreszenzmessungen.....	98
<b>3.9 Biochemische Analysen vom Wildtyp und <math>\Delta degP2</math>- und <math>\Delta degP5</math>-Mutanten.....</b>	<b>103</b>
3.9.1 Degradierung des D1-Proteins.....	103
3.9.2 Trennung photosynthetischer Komplexe durch 2D-PAGE.....	104
3.9.3 Trennung photosynthetischer Komplexe durch Saccharose-Dichtegradienten- zentrifugation.....	105
<b>3.10 Untersuchungen von „state transitions“ in <math>\Delta degP2</math>- und <math>\Delta degP5</math>-Mutanten..</b>	<b>109</b>
<b>3.11 HPLC-Messungen.....</b>	<b>112</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1 Charakterisierung und funktionelle Analyse von HhoA und HhoB in <i>Synecho-</i> <i>cystis</i>.....</b>	<b>115</b>
4.1.1 Lokalisierung von HhoA und HhoB.....	115
4.1.2 Funktionsanalyse von HhoA und HhoB.....	116
4.1.2.1 Phänotypische Analysen von <i>Synechocystis</i> - $\Delta sll1427$ - und - $\Delta sll1679$ - Mutanten.....	116

4.1.2.2 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren von Wildtyp, $\Delta sll1427$ - und $\Delta sll1679$ -Mutanten.....	117
4.1.2.3 Western-Analysen des Wildtyps und der $\Delta sll1427$ -Mutante.....	118
4.1.2.4 Saccharose-Dichtegradienten von Thylakoidlysaten des Wildtyps und der $\Delta sll1427$ -Mutante.....	119
4.1.2.5 <i>in vivo</i> -Analyse der Degradierungs- und Syntheserate von Wildtyp und $\Delta sll1427$ -Mutante.....	120
<b>4.2 Charakterisierung und funktionelle Analyse von DegP2 und DegP5 in <i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>124</b>
4.2.1 Lokalisierung der Deg-Proteasen im Chloroplasten.....	124
4.2.2 Funktionsanalyse von DegP2 und DegP5.....	125
4.2.2.1 Phänotypische Analysen von <i>Arabidopsis</i> - $\Delta degP2$ - und - $\Delta degP5$ -Mutanten.....	126
4.2.2.1.1 Wachstumsanalysen unter Standardbedingungen und Starklicht.....	126
4.2.2.1.2 Sauerstoff- und 77K Fluoreszenzmessungen.....	127
4.2.2.1.3 PAM-Fluoreszenzmessungen.....	128
4.2.2.2 Biochemische Charakterisierung.....	129
4.2.2.3 Charakterisierung der nicht-photochemischen Löschung (NPQ).....	130
4.2.2.3.1 Photoinhibierung.....	131
4.2.2.3.2 „state transitions“.....	132
4.2.2.3.3 „de-excitation quenching“.....	132
<b>4.3 Charakterisierung von SppA in <i>Arabidopsis</i>.....</b>	<b>135</b>
4.3.1 Lokalisierung der SppA-Protease im Chloroplasten.....	135
4.3.2 Phänotypische Analysen von $\Delta sppA$ .....	136
<b>4.4 Vergleichsanalysen von plastidären Proteasen in <i>Arabidopsis</i> und <i>Synechocystis</i>.....</b>	<b>137</b>
4.4.1 Die Deg-Peptidasen.....	137
4.4.2 Die SppA-Peptidasen.....	139
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>141</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>143</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>165</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>167</b>

**ABKÜRZUNGEN**

APC	Allophycocyanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Arabidopsis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ökotyp Columbia
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BASTA	Ammonium-Glufosinat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
Chl	Chlorophyll
Cm	Chloramphenicol
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid
DCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
DCMU	Dichlorophenyldimethylharnstoff
DegP/Q/S	Degradierungsprotease P/Q/S
DMSO	Dimethylsulfoxid
DL	Dämmerlicht
DNase	Desoxyribonuclease I
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Eisen(III)Na-Salz
EtBr	Ethidiumbromid
Gm	Gentamycin
HEPES	N-[Hydroxyethyl]piperazin-N`-[2-Ethansulfonsäure]
HhoA/B	HtrA-Homolog A/B
HL	Starklicht
HtrA	„high temperature requirement“ A
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LHC	Lichtsammelkomplex
LL	Schwachlicht



---

mA	Milliampere
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
nm	Nanometer
NTP	Nukleosid-5'-Triphosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phycobilisomen
PC	Phycocyanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
RC	Reaktionszentrum
RNase	Ribonuclease
RNS	Ribonucleinsäure
rRNS	ribosomale RNS
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SppA	Signalpeptid-Protease A
SSC	Standard-„saline citrate“
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricine	N-Tris[Hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp

## 1. EINLEITUNG

Die Fähigkeit, Photosynthese auf Basis von Pigmenten zu betreiben und Sonnenlicht als Energiequelle zu nutzen, geht ursprünglich auf Entwicklungen von Eubakterien, wie Schwefel- und Purpurbakterien, zurück. Ihre anaerob arbeitenden Photosyntheseapparate besitzen nur ein Reaktionszentrum. Cyanobakterien hingegen besitzen eine oxygene Photosynthesemaschinerie mit zwei Reaktionszentren. Im Laufe der Evolution sind in diesem „modernen“ Photosyntheseapparat nur unwesentliche Veränderungen vorgenommen worden.

Die Proteinkomplexe der eukaryontischen Photosynthese, wie Antennen, Reaktionszentren und Cytochrom-Komplexe als Elektronenüberträger sowie die ATP-Synthase sind nicht eigenständig von Grünalgen oder höheren Pflanzen hervorgebracht worden. Vielmehr sind auch sie bakteriellen Ursprungs. Die Träger der Photosyntheseapparate sind Thylakoidmembranen, die in Eukaryonten im Chloroplasten kompartimentiert sind (Mereschkowsky, 1905; Herrmann, 1997; Douglas, 1998; Martin *et al.*, 1998; McFadden, 2004).

### 1.1 Die Endosymbiontentheorie

Nach der heute allgemein anerkannten Theorie sind photoautotrophe Eukaryonten durch die Phagozytose eines photosynthesekompetenten Cyanobakteriums vor ca. 2 Mrd. Jahren entstanden (Mereschkowsky, 1905; Herrmann, 1997; Douglas, 1998; Martin *et al.*, 1998; McFadden, 2004). Durch Vergleiche der den Photosyntheseproteinen zugeordneten Gensequenzen und der oft übereinstimmenden Anordnung von Gengruppen im cyanobakteriellen und eukaryontischen Genom gilt als gesichert, dass dieses Ereignis einmalig erfolgreich in der Evolution stattgefunden hat (McFadden, 2004). Damit stellen alle Grünalgen und höheren Landpflanzen eine monophyletische Gruppe dar.

$\alpha$ -Purpurbakterien wurden davor schon in vergleichbarer Weise in die Eukaryonten-Vorläuferzelle inkorporiert und entwickelten sich zu den heutigen Mitochondrien (Mereschkowski, 1905; Raven und Allen, 2003). Beide Prozesse, die als primäre Endosymbiosen bezeichnet werden, sind Voraussetzung des Eukaryotismus (Herrmann, 1997; Martin und Herrmann, 1998). Bei mehreren Pflanzenlinien, wie z. B. Rotalgen und Braunalgen, fand diese Endosymbiose mehrfach gestaffelt statt. Man spricht dann von sekundärer bzw. tertiärer Endosymbiose (Herrmann, 1997; Douglas, 1998; Palmer, 2003; Forth und McFadden, 2003).

Nach der Phagocytose des photosynthetischen Prokaryonten wurde dieser nicht katabolisiert, sondern im Zellinneren domestiziert. Selbst die Zellmembran des aufgenommenen Bakteriums blieb erhalten und bildet heute die innere Hüllmembran des Chloroplasten. Die äußere Hüllmembran entstand beim phagocytotischen Einschluss des Bakteriums aus Membranteilen der Wirtszelle.

Neben der Kompartimentierung in den Chloroplasten sind das Vorhandensein von Plastiden- und Mitochondriengenomen – dem sogenannten Plastom bzw. Chondriom – und die Kontinuität des Organells Belege für die Endosymbiontentheorie. Kontinuität des Organells bedeutet, dass Plastiden nie *de novo* synthetisiert werden, sondern immer durch Teilung entstehen (Butterfass, 1980) und immer uni- oder biparental, nicht-mendelnd an die Tochterzellgenerationen weitergegeben werden (Hagemann, 1992; Birky, 2001). Darüber hinaus sind die Ribosomen in Chloroplasten vom eubakteriellen 70S-Typ. Plastidäre DNS-Abschnitte sind nicht mit Histonen oder anderen Proteinen assoziiert (Nultsch, 2001).

Durch die Endosymbiose entstand ein völlig neues System eines kooperativen Metabolismus. Das Cyanobakterium profitierte vom Schutz der Wirtszelle und lieferte durch Lichtenergie viel effektiver synthetisierte Stoffwechselverbindungen.

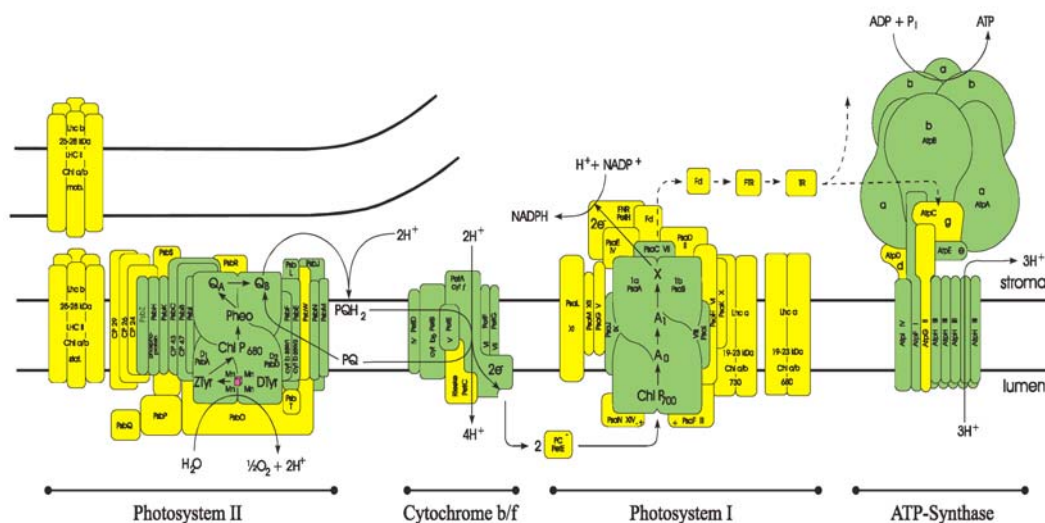
Im Laufe der Evolution kam es auch auf der genetischen Ebene zu einem erheblichen Umbau. Von den ca. 5000 ursprünglichen Genen des Cyanobakteriums sind lediglich 87 im Plastom verblieben (Pesaresi *et al.*, 2001). Es ist nicht bekannt, dass vom eukaryontischen Wirt genetische Information ins Plastiden-Genom abgegeben wurde. Bis zu 95% der jetzt im Kern kodierten Plastidenproteine müssen, um in den Chloroplasten gelangen zu können, importiert werden. D. h., dass die im Cytosol translatierten Proteine mit einem N-terminalen Transitpeptid ausgestattet sein müssen, das nach dem Transfer in die Plastide abgespalten wird (Schleiff und Soll, 2000). Durch den massiven interzellulären Genfluss zwischen Organell und Wirtskern entstand ein integriertes genomisches System, in dem keine der Komponenten mehr autonom existieren kann (Martin und Herrmann, 1998). Der Gentransfer aus dem Plastom in das Wirtsgenom erklärt auch den mosaikartigen Aufbau der Photosyntheseapparate aus einerseits kernkodierten und andererseits plastomkodierten Proteinen (Häder, 1999).

## 1.2 Der Chloroplast

Der Chloroplast höherer Pflanzen besitzt eine elliptische Form und hat einen Durchmesser von 4 - 8 µm. Die Anzahl der Chloroplasten in Pflanzenzellen ist sehr unterschiedlich. Während Mesophyllzellen im Durchschnitt etwa 50 bis 100 Chloroplasten enthalten, findet man in den Schließzellen der Spaltöffnungen meist weniger als 10 Chloroplasten, in Wurzelzellen hingegen gar keine, dafür aber Leucoplasten. Die wichtigste Funktion der Chloroplasten ist die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Fixierung. Thylakoidmembranen als Träger der photosynthetischen Proteinkomplexe unterliegen, egal ob kompartimentiert in den Chloroplasten oder frei in der Cyanobakterienzelle, einer Strukturierung. Bei höheren Pflanzen unterscheidet man Granathylakoide von Stroma-thylakoiden, wobei erstere in Stapeln übereinander vorliegen und durch einzelne, das Stroma durchziehende Stromathylakoide verbunden werden.

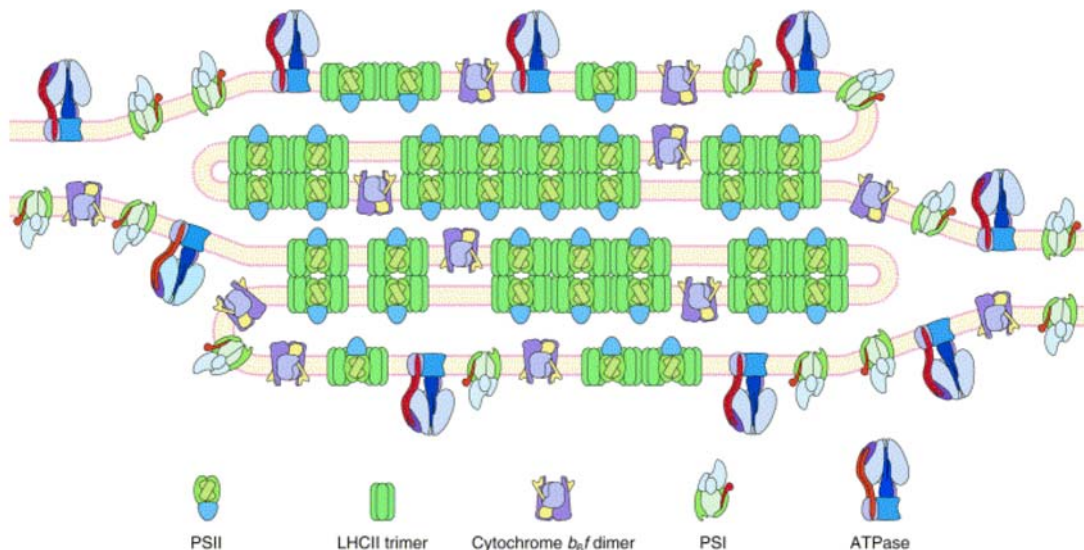
### 1.2.1 Die Thylakoidmembran als Ort der Photosynthese

Thylakoidmembranen sind vesikuläre Strukturen, bestehend aus einer allseits geschlossenen Lipiddoppelschicht, welche den Intramembranraum, das Lumen, vom Stroma abtrennt. Die Komplexe der Photosynthese- und Redoxsysteme sind dabei in die Membran eingebettet. Sie bilden die Elektronentransportkette der Photosynthese, die durch die drei Komplexe PSII, Cytochrom *b*<sub>6</sub>/*f*-Komplex und PSI gebildet werden und durch die löslichen Komponenten Plastochinon und Plastocyanin miteinander verbunden sind. Die ATP-Synthase speichert das im Protonengradienten aufgebaute Potential in energiereichen Bindungen (Abb. 1.1).



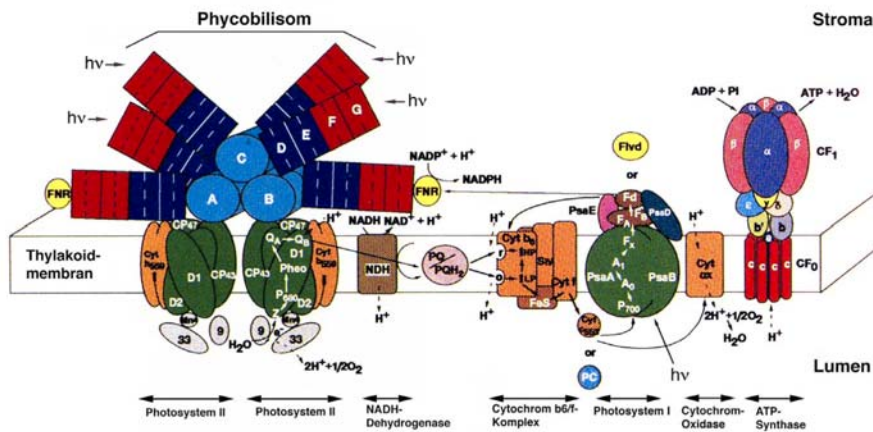
**Abb. 1.1: Schematisches Diagramm der Thylakoidmembran von höheren Pflanzen.** Sowohl die Proteinkomplexe als auch die in der Photosynthese involvierten Elektronen-, „carrier“ sind dargestellt (modifiziert nach Herrmann 1996).

Nicht nur die Gestalt der Thylakoidmembranen, auch die Verteilung der Proteinkomplexe auf der Membran lässt deutliche Unterschiede erkennen. Mit Hilfe der Gefrierbruchanalyse konnte gezeigt werden, dass mehr als 85% des Photosystems II in den Granathylakoiden lokalisiert ist, hingegen nur 15% in den Stromathylakoiden. Mit dem Photosystem I verhält es sich genau entgegengesetzt. Der als Elektronenüberträger dienende Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex ist auf beide Membrandomänen gleichmäßig verteilt, während die ATP-Synthase, die das elektrochemische Potential in energiereichen Bindungen speichert, wegen ihres in das Stroma ragenden  $CF_1$ -Köpfchens nur in den Stromathylakoiden zu finden ist (Häder, 1999; Abb. 1.2). Im Stroma liegen alle Enzyme, die zur  $CO_2$ -Fixierung, zur Synthese von Zuckerbausteinen und für den Calvin-Zyklus notwendig sind, vor. Mit Hilfe der Pigmente Chlorophyll *a* und *b* (Chlorophyll *a*, *b*) wird bei höheren Pflanzen Licht in Energie umgewandelt.



**Abb.1.2: Schematische Abbildung der Thylakoidmembran.** Gezeigt wird ein Granastapel und die entsprechende Verteilung der photosynthetischen Komplexe (nach Allen und Forsberg, 2001).

Bei den Cyanobakterien liegen die Thylakoide unkompartimentiert, d.h. frei in der Zelle vor, bilden aber meist ein konzentrisch angeordnetes Netzwerk. Als Photosynthesepigment wird, anders als bei höheren Pflanzen und Grünalgen, nur Chlorophyll *a* genutzt, dafür besitzen Cyanobakterien noch Biliproteine wie Phycocyanin, Allophycocyanin und Phycoerythrin. Diese Pigmente sind löslich und mit Phycobiliproteinen gebunden, die als Lichtsammelfallen peripher auf der Thylakoid-membran aufsitzen und mit dem Photosystem II verbunden sind. Licht wird von hier aus konzentriert an die Reaktionszentren weitergeleitet. Diese Anordnung der Lichtsammelfallen könnte erklären, warum die Membranen nicht gestapelt, sondern frei vorliegen müssen (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:** Schematische Ansicht der Thylakoidmembran von Cyanobakterien (nach Bryant, 1994).

### 1.2.2 Der thylakoidäre Energietransport

Die Komplexe der Photosynthese sind in die Thylakoidmembran eingebettet und durchspannen diese mit ihren Membrandomänen. Idealerweise erfolgt die Energieübertragung vom PSII über den Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex zum PSI, die über die löslichen Komponenten Plastochinon (PQ) und Plastocyanin (PC) miteinander verbunden sind (Hervas *et al.*, 2003). Dabei wird das Reaktionszentrum von PSII durch die durch die Antennen eingefangene Lichtenergie angeregt und ein Elektron auf das stromal gelegene Plastoquinon übertragen. Das oxidierte PSII holt sich das zur Reduktion benötigte Elektron vom Wasserspaltungsapparat. Hier wird Wasser an der lumenalen Seite von PSII in Protonen und molekularen Sauerstoff gespalten. Zur Ladungsstabilisierung nimmt das Plastochinon zwei Elektronen vom PSII und zwei Protonen von der stromalen Seite auf und produziert hierbei Plastoquinol. Plastoquinol transferiert sowohl Elektronen als auch Protonen auf den Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex und regeneriert somit wieder zu PQ, welches wieder in den PQ-„pool“ übergeht. Die Protonen werden ans Lumen entlassen und die Elektronen werden einzeln über Cytochrom *f* und dem Rieske-Protein, welches ein 4Fe-4S-Zentrum enthält, auf den zweiten mobilen Energieträger Plastocyanin übertragen. Plastocyanin löst sich von seiner Bindestelle am Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex und wird auf das oxidierte PSI übertragen (Hope, 2000). Das angeregte PSI gibt das Elektron an Ferredoxin (Fd) auf der stromalen Seite weiter. Dieses reduzierte Ferredoxin wird durch die Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) wieder oxidiert, wobei NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert wird. Der bei diesem Prozess an der Thylakoidmembran entstehende Protonengradient wird genutzt, indem mit Hilfe der ATP-Synthase energiereiches ATP gebildet wird (Sacksteder *et al.*, 2000).

### 1.2.3 Das Photosystem II

Das Photosystem II besteht aus dem D1/D2-Heterodimer, den Membranproteinen Cytochrom  $b_{559}$ , CP43, CP47 und PsbI, die zusammen das sogenannte Herz oder auch Reaktionszentrum bilden (Ferreira *et al.*, 2004). Dazu kommen noch einige andere Proteine, die zur Sauerstoffgewinnung, zum thylakoidalen Elektronentransport und zum Schutz benötigt werden. Die Bündelung der auftreffenden Lichtenergie erfolgt durch die Carotinoid- und Chlorophyllmoleküle, welche die Energie zum aktiven Zentrum (PSII) weiterleiten. Dort katalysiert das PSII die Oxidation von Wasser zu atmosphärischem Sauerstoff, wobei frei werdende Elektronen auf das Plastochinon übertragen werden. Die Struktur des PSII wurde in *Thermosynechococcus elongatus* bis zu einer Auflösung von etwa 3,5 Å durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Zouni *et al.*, 2001; Loll *et al.*, 2005). Zusammen mit der hochauflösenden Elektronenmikroskopie von Chloroplasten bis zu 6 Å (Rhee, 2001) konnte gezeigt werden, dass die Struktur des PSII bei Cyanobakterien und höheren Pflanzen sehr ähnlich ist. Unterschiede konnten nur bei einigen peripheren PSII-Untereinheiten, der Zusammensetzung und Lage der Antennen und des Wasserspaltungsapparates beobachtet werden (Barber und Nield, 2002; Kashino *et al.*, 2002). Die Proteine PsbL, PsbM und PsbT<sub>c</sub> des PSII sollen dabei an der Dimer-Bildung des PSII beteiligt sein (Ferreira *et al.*, 2004).

### 1.2.4 Der Cytochrom $b_6/f$ -Komplex

Der Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex besteht aus vier großen Untereinheiten, dem Cytochrom  $f$  (PetA), dem Cytochrom  $b_6$  (PetB), dem Rieske Fe-S-Protein (PetC) und der Untereinheit IV (PetD) und fünf kleinen Untereinheiten, den PetG-, L-, M-, N- und O-Proteinen (Stroebel *et al.*, 2003). Die 15,2 kDa große Untereinheit PetO wurde in *Chlamydomonas reinhardtii* entdeckt und soll aufgrund ihrer reversiblen Phosphorylierung bei der Signaltransduktion während der redoxkontrollierten Anpassung des Photosyntheseapparates eine Rolle spielen (Hamel *et al.*, 2000).

Der Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex bildet eine Schnittstelle zwischen PSII und PSI und fungiert hier als Sensor für den Redox-Zustand des Plastochinon-„pools“, der das Verhältnis zwischen linearem und zyklischem Elektronentransport reguliert (Stroebel *et al.*, 2004; Finazzi *et al.*, 2002).

### 1.2.5 Das Photosystem I

Das PSI besteht analog zum PSII aus den zwei zentralen Proteinen PsaA und PsaB, die ebenfalls ein Heterodimer bilden. Die Struktur des PSI wurde in *Thermosynechocystis elongatus* mit einer Auflösung von 2,5 Å aufgeklärt (Jordan *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2003). Neben vielen strukturellen und stabilisierenden Untereinheiten bilden die Untereinheiten PsaN und PsaF die Plastocyanin-Bindestelle (Haldrup *et al.*, 1999; Hankamer *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2003) und PsaE und PsaG die Ferredoxin-Bindestelle. PSI fungiert als Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase. Lichtenergie wird durch die LHCI- (Byrdin *et al.*, 2002) und die mobilen LHCII-Proteine (Lunde *et al.*, 2000) auf das zentrale Chlorophyll  $\alpha$ -Dimer transferiert und das Reaktionszentrum P700 geht dabei in einen angeregten Zustand über (Byrdin *et al.*, 2002). Ein Elektron wird dabei über eine Serie von Elektronenakzeptoren auf das lösliche Protein Ferredoxin auf der stromalen Seite übertragen. Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) reduziert hier  $\text{NADP}^+$  zu NADPH. PSI kann durch Belichtung mit blauem Licht (480 nm) in den „state 2“-Zustand und durch Belichtung mit dunkelrotem Licht (700 nm) in den „state 1“-Zustand übergehen (Ikegami *et al.*, 2000). Durch Belichtung mit dunkelrotem Licht kann gezielt PSI angeregt werden, da die Intensität des Lichtes für das PSII nicht ausreichend ist.

### 1.2.6 Die ATP-Synthase

Die ATP-Synthase ist ein Proteinkomplex, der das während der Photosynthese aufgebaute elektrochemische Potential  $\Delta\Psi$  zur Synthese von ATP aus ADP nutzt (Pedersen und Amzel, 1993; Mitchell, 1975). Sie besteht aus zwei Subkomplexen, dem membrandurchspannenden  $\text{CF}_0$ -Komplex und dem peripher gelegenen  $\text{CF}_1$ -Komplex. Der hydrophobe  $\text{CF}_0$ -Komplex, der aus vier Untereinheiten (a, b, b', c) besteht, bildet einen Protonenkanal durch die Thylakoidmembran. Der hydrophile  $\text{CF}_1$ -Komplex besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) und erzeugt durch Diffusion dreier Protonen aus ADP und  $\text{P}_i$  ATP (Sabbert *et al.*, 1996; Senior *et al.*, 2002). Die plastidäre ATP-Synthase gehört zu einer großen Enzymfamilie, deren Mitglieder auch in den Membranen von Mitochondrien (Godinot und Di Pietro, 1986) und der Vakuole (Kluge *et al.*, 2003) zu finden sind. Die Organisation, Struktur und Zusammensetzung der ATP-Synthase ist bei Eubakterien, Mitochondrien und den Plastiden stark konserviert, wohingegen die Regulierung der enzymatischen Aktivität sich bei höheren Pflanzen und Grünalgen grundsätzlich von der in Prokaryoten und Mitochondrien unterscheidet (Strotmann *et al.*, 1998; Groth und Pohl, 2001).



### 1.2.7 Antennenkomplexe bei höheren Pflanzen und Cyanobakterien

#### LHCII und LHCI

Die Lichtsammelkomplexe (LHC) von höheren Pflanzen sind komplexer gebaut als die von Cyanobakterien. Die Lichtsammelkomplexe grüner Pflanzen sind wie auch die Reaktionszentren in die Thylakoidmembran integriert. Dabei hat jedes Photosystem eigene Antennen, welche entsprechend als LHCI und LHCII bezeichnet werden, die sich jedoch im grundsätzlichen Aufbau mit kern- und peripherer Antenne ähnlich sind. LHCII tritt nativ als Trimer auf und bindet ca. 50% der gesamten Chlorophylle des PSII. In *Arabidopsis* existieren mindestens vier verschiedene LHCII- Trimere, ein Lhcb<sub>13</sub>-Homotrimer und Lhcb<sub>12</sub>-Lhcb<sub>2</sub>- sowie und Lhcb<sub>12</sub>-Lhcb<sub>3</sub>- und Lhcb<sub>1</sub>-Lhcb<sub>2</sub>-Lhcb<sub>3</sub>-Heterotrimer (Jackowski *et al.*, 2001). Diese lagern sich in zwei Ebenen um PSII an (Spangfort und Andersson, 1998). Die äußere Schicht kann bei Lichtanpassungsprozessen dissoziieren bzw. assoziieren (Larsson *et al.*, 1987). Die Chlorophylle dienen hauptsächlich der Lichtsammlung und Weiterleitung. Grünalgen und Gefäßpflanzen besitzen sowohl Chlorophyll *a* (Absorptionsmaxima bei 430 nm und 680 nm) als auch Chlorophyll *b* (460 nm und 650 nm), wobei ersteres häufiger vorkommt und außerdem zum Transfer der Elektronen ins aktive Zentrum dient. Zusätzlich enthalten höhere Pflanzen noch Carotinoide als Antennenpigmente. Diese dienen ebenfalls der Lichtsammlung. Wesentlich wichtiger jedoch ist ihre Funktion als Schutzpigmente, welche Überschussenergie unschädlich machen, und somit photooxidative Schäden verhindern (Häder, 1999).

#### Die Phycobilisomen

Die Lichtsammelkomplexe der Cyanobakterien sind nicht in die Thylakoidmembran integriert, sondern sitzen dieser auf der cytoplasmatischen Seite auf, was eine Stapelung der Membranen zu Granathylakoiden unmöglich macht. Sie können außerdem in aufgeschlossenen Zellen mit einem Puffer leicht von der Membran abgelöst werden. Die Phycobilisomen (PBS) sind hauptsächlich aus Biliproteinen aufgebaut, welche von Linkerpolypeptiden zusammengehalten werden, und bilden den Antennenkomplex des PSII (MacColl, 1998). Das PSI von Cyanobakterien besitzt keinen eigenen Antennenkomplex (Lange *et al.*, 1990; Bald *et al.*, 1996). Die Lichtsammelpigmente sind in das Reaktionszentrum integriert (Häder, 1999). PBS können zudem unterschiedliche Strukturen aufweisen. Die häufigsten sind der hemidiskoidale Typ, der z. B. bei *Rhodella violacea* (Mörschel *et al.*, 1977, Koller *et al.*, 1978) zu finden ist, und der hemiellipsoidale Typ, der z. B. bei *Porphyridium cruentum* (Gantt, 1981) vorkommt. Die für die Lichtsammlung ver-

antwortlichen Pigmente sind neben Chlorophyll *a* und verschiedenen Carotinoiden, Phycocyanin (Absorptionsmaximum bei 620 nm) und Allophycocyanin (Absorptionsmaximum bei 650 nm). Diese zusätzlichen Pigmente der Cyanobakterien absorbieren in der Grünlücke der anderen vorhandenen Pigmente und decken somit den restlichen Spektralbereich des sichtbaren Lichtes ab. Durch diese Pigmente erhalten die PBS außerdem ihre kräftige blaue Färbung (Häder, 1999).

### 1.2.8 Der Xanthophyllzyklus

Alle photosynthetischen Komplexe enthalten neben Chlorophyllen auch Carotinoide als Pigmente. Die Photosysteme enthalten dabei hauptsächlich  $\beta$ -Carotin, in den Antennenkomplexen findet man dagegen hauptsächlich Lutein, aber auch Xanthophylle wie Neoxanthin und Violaxanthin. Diese tragen ebenfalls zur Lichtsammlung bei und besitzen außerdem besondere Funktionen zum Schutz des Photosyntheseapparates vor photooxidativen Schäden. Carotinoide können durch schnelle Relaxation Energie in Wärme umwandeln und somit Überschussenergie vernichten (Häder, 1999). Im sogenannten Xanthophyllzyklus, der bei Starklichtbedingungen aktiviert wird, stehen Violaxanthin und Zeaxanthin in einem enzymatisch kontrollierten Gleichgewicht. Unter Schwachlichtbedingungen fungiert Violaxanthin als Lichtsammelpigment und transferiert Elektronen auf Chlorophyll, welches ein geringeres Energieniveau als Violaxanthin hat. Unter erhöhter Lichtintensität hingegen wird Violaxanthin über die Violaxanthin-de-epoxidase (VDE) zu Zeaxanthin umgewandelt. Dessen Energieniveau liegt unter dem des Chlorophylls und es kann somit Elektronen vom Chlorophyll aufnehmen. Diese überschüssige Anregungsenergie kann nun als Teil der nicht-photochemischen Löschung (NPQ, „nonphotochemical quenching“) in thermische Energie umgesetzt werden (Holt *et al.*, 2004). Der Nachweis für einen Zusammenhang zwischen dem Violaxanthin/Zeaxanthin-Zyklus und der NPQ gelang Niyogi *et al.*, (1997) mit der Identifizierung von *Chlamydomonas reinhardtii* Violaxanthin-de-epoxidase-Mutanten, die ein verändertes NPQ aufwiesen.

## 1.3 Anpassung der Thylakoidmembran an Stressbedingungen

### 1.3.1 Kurzzeitanpassung von Thylakoidmembranen

In der natürlichen Umgebung befinden sich die äußeren Bedingungen von Pflanzen und Cyanobakterien in einem ständigem Wechsel, was zu einem Ungleichgewicht im Elektronenfluss an den Photosystemen führen kann. So existieren z. B. unterschiedliche

Lichtqualitäten, die je nach ihrer Wellenlänge entweder von PSII oder von PSI bevorzugt werden. Die Thylakoidmembranen von Pflanzen bzw. Cyanobakterien müssen sich an diese oft schnell wechselnden Umweltbedingungen anpassen. Dabei unterscheidet man zwischen Langzeit (im Stunden- bis Tagebereich) und Kurzzeitanpassung (im Sekunden- bis Minutenbereich). Der wichtigste Prozess der Kurzzeitanpassung ist die als „state transitions“ bezeichnete Wanderung der LHCII-Antennen bzw. PBS zwischen den Photosystemen (Müller *et al.*, 2001).

### 1.3.1.1 „state transitions“

In Anpassung an wechselnde Lichtbedingungen kann es in den Chloroplasten zur Reduzierung des Plastochinon-„pools“ (Horton *et al.*, 1981) und/oder des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes (Gal *et al.*, 1988) kommen. Eine durch diese Redoxprozesse aktivierte thylakoidgebundene Kinase (Allen *et al.*, 1981) trägt zur Phosphorylierung von LHCII-Proteinen bei, welche eine Wanderung der LHCII-Antennen zwischen den Photosystemen bewirkt. Diese Wanderung wird als Zustandsveränderung („state transitions“) bezeichnet und wurde erstmals von Bonaventura und Myers (1969) und Murata (1969) identifiziert. Dieser Vorgang dient der angemessenen Verteilung der Anregungsenergie auf die beiden Photosysteme. Im „state 1“- Zustand wird die Lichtenergie hauptsächlich auf PSII übertragen, im „state 2“- Zustand auf die Reaktionszentren des PSI; d.h. im phosphorylierten Zustand können die äußeren LHCII- Antennen auf das PSI wandern und die gesammelte Energie direkt auf das PSI übertragen (Abb. 1.4).

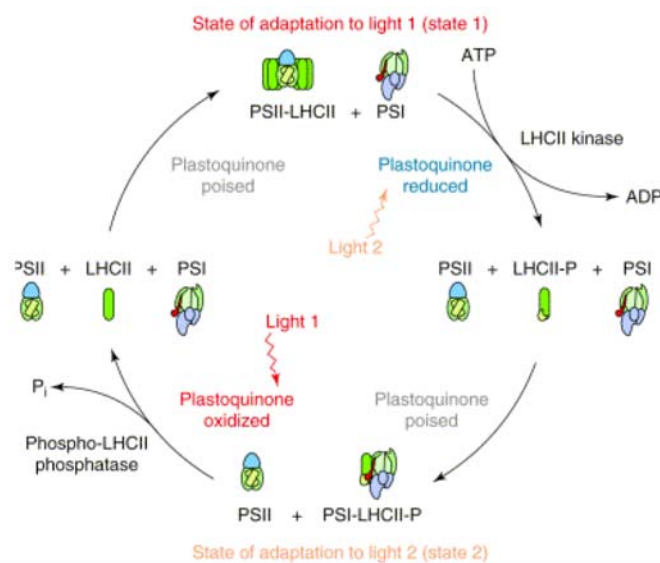


Abb. 1.4: Schematische Präsentation des „state transitions“-Zyklus in höheren Pflanzen (nach Allen und Forsberg, 2001)

In höheren Pflanzen wandern zwischen 15 und 20% der LHCII-Antennen (Allen, 1992), in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* dagegen bis zu 85% (Delosome *et al.*, 1996). Der „state transition“-Mechanismus bei Cyanobakterien und Rotalgen ist noch nicht abschließend aufgeklärt. In diesen Organismen sind die PBS eng an das PSII gekoppelt. Dagegen ist in PBS-haltigen Thylakoiden der größte Teil des Chlorophyll *a* an PSI gebunden, um die ungleiche Energieabsorption auszugleichen (Häder, 1999). Früher ist man davon ausgegangen, dass PBS nur an das PSII gebunden sind. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sich PBS sehr schnell auf der Thylakoidmembran fortbewegen können (Mullineaux *et al.*, 1997; Sarcina *et al.*, 2001) und sowohl mit PSI interagieren, als auch Energie auf das PSI übertragen können (Mullineaux, 1992, 1994). Dieses „state transition“-Modell wird als „mobile“ Modell bezeichnet und geht von einer ähnlichen Verteilung der Antennen wie bei Pflanzen aus. Die PBS können dabei also zwischen den Photosystemen wandern (Allen *et al.*, 1985; Allen und Holmes, 1986; Sanders und Allen, 1987; Sanders *et al.*, 1989). Im „spill-over“-Modell, welches ursprünglich von Murata (1969) entwickelt wurde, geht man davon aus, dass PBS ihre absorbierte Energie nur an PSII weiterleiten. Reicht die Energieversorgung des PSI nicht aus, so kann PSII Anregungsenergie auf PSI übertragen. Eine weitere Möglichkeit zeigt das „detachment“-Modell, bei dem man von der Ablösung einiger PBS vom PSII bei Anregung mit PSII-Licht ausgeht. PBS sind also am „state transition“-Prozess beteiligt. Jedoch gibt es noch kontroverse Meinungen darüber, ob dieser Prozess aufgrund eines elektrochemischen Gradienten um die Photosysteme aktiviert wird (Sato und Fork, 1983) oder durch den Redoxzustand des Plastochinon-„pools“ über den Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex gesteuert wird (Mullineaux und Allen, 1990).

### 1.3.1.2 Phosphorylierung

Ein Hauptmechanismus der Kurzzeitanpassung ist die Phosphorylierung von Proteinen der Thylakoidmembran. Die Phosphorylierung von Serin-, Threonin-, Histidin- oder Tyrosin-Aminosäureresten eines Proteins kann mit dessen grundlegender Veränderung der Konformation einhergehen. Proteine können durch Phosphorylierung Ladungsänderungen erfahren, welche ihre Sekundärstruktur und damit ihre Funktion verändern. Solche Veränderungen können die Aktivität der katalytischen Bindungsstelle, die Stabilität des Proteins und die Fähigkeit von Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen. Durch diese Modellierungsfähigkeit spielt die reversible Proteinphosphorylierung in der Thylakoidmembran eine wichtige Rolle bei der Anpassung an Umweltbedingungen, so hauptsächlich bei Lichtstress, und bei Reparaturprozessen.

Im Chloroplasten höherer Pflanzen werden hauptsächlich Proteinuntereinheiten des LHCII und des PSII-Reaktionszentrums, D1, D2, CP43 und PsbH, phosphoryliert (Bennett, 1977). Zum Schutz vor hohen Lichtintensitäten wird LHCII durch eine Redoxkinase phosphoryliert und somit vom PSII-Reaktionszentrum gelöst. Dadurch wird PSII kurzfristig vom Energiefluss abgekoppelt (Allen *et al.*, 1981). In *Arabidopsis* konnte die Kinase, die LHCII phosphoryliert, identifiziert werden (Bellafiore *et al.*, 2005). Es handelt sich dabei um das plastidäre STN7-Protein, welches spezifisch LHCII phosphoryliert und zur TAK (thylakoid associated kinase)-Familie gehört (Snyders und Kohorn, 1999).  $\Delta$ *stn7*-Mutanten sind aufgrund fehlender Phosphorylierung der LHCII-Antennen nicht fähig, „state transitions“ zu betreiben (Bonardi *et al.*, 2005).

Phosphorylierung ist ein reversibler Prozess und kann durch Phosphatasen rückgängig gemacht werden. LHCII wird dabei von einer stromalen Phosphatase (Hammer *et al.*, 1997) und D1, D2 und CP43 wurden von einer intrinsischen Phosphatase (Vener *et al.*, 1999; Rokka *et al.*, 2000) dephosphoryliert.

Anders als bei Grünalgen und höheren Pflanzen sind bei Cyanobakterien die Proteine der Antenne und des PSII-Reaktionszentrum nicht phosphoryliert (Biggins *et al.*, 1984). Es konnte lediglich die Phosphorylierung der  $\beta$ -Phycocyanin-Untereinheit von PBS (Allen *et al.*, 1985; Sanders und Allen, 1987; Sanders *et al.*, 1989) und kürzlich die Phosphorylierung von Linkerproteinen der PBS (Piven *et al.*, 2005) gezeigt werden. Diese Phosphorylierung ist mit dem Abbau der PBS verbunden.

### 1.3.2 Langzeitanpassung der Thylakoidmembranen

Pflanzen und Cyanobakterien müssen sich auch an wechselnde Lichtquantitäten anpassen. Unter Schwachlichtbedingungen erhöhen Cyanobakterien die Konzentrationen an Chlorophyll *a* und Phycocyanin und vergrößern ihre Antennen, indem die Anzahl der Phycobilisomen-Segmente erhöht wird (Hihara *et al.*, 1998; He *et al.*, 2001; Havaux *et al.*, 2003). Dagegen werden unter Starklichtbedingungen diese Phycobilisomen-Segmente und die Pigmentkonzentrationen drastisch reduziert. Die Reduktion von Chlorophyll *a* und Phycocyanin z. B. erfolgt innerhalb von 3 Std. (E. Pojidaeva, Doktorarbeit, 2004). Der Anteil an Carotinoiden wird moderat abgesenkt.

Grundsätzlich kann der Abbau der Antennen- und Photosystemkomplexe über zwei Wege bewerkstelligt werden: erstens wird die Expression von Genen, die zur Biosynthese der strukturellen Komponenten des PBS dienen, reduziert (Lorimier, 1991, Hihara, 2001),

wobei die Transkription von Pigmentgenen - nachgewiesen für Allophycocyanin - stark zurückgefahren wird, hingegen die der Linkerproteine in etwa konstant bleibt (Lorimier, 1991); zweitens werden die Photosystemkomplexe aktiv von Proteasen degradiert.

### 1.3.2.1 Bildung von Schutzproteinen

Eine wichtige Rolle unter Proteasen spielen sogenannte hochlichtinduzierte Proteine Hlips (high light induced proteins; Adamska *et al.*, 1999, Funk und Vermaas, 1999, He *et al.*, 2001). Hlips, die in ihrer Struktur LHC-Proteinen ähneln, gliedern sich in 5 Gene *hliA*, *-B*, *-C*, *-D* und *hemH* (auch HlipE). Sie akkumulieren während der Akklimationsphase unter Starklichtbedingungen. Beim Übergang zu Schwachlichtbedingungen geht diese Akkumulation wieder zurück. Während die Funktion der Hlips beim Transfer von Chlorophyllen aus degradierten zu neu synthetisierten Pigment-Proteinkomplexen feststeht, ist ihre Rolle beim Elektronentransport („state transitions“) zwischen den Photosystemen noch unklar (He *et al.*, 2001, Havaux *et al.*, 2002). Auch bei höheren Pflanzen reicht die simple Abkopplung der Antennen vom PSII nicht zum Schutz vor hohen Lichtintensitäten aus, sondern die Pflanze schützt sich durch eine dauerhafte Reduzierung der Antennengröße. Die beim Abbau der Antennen frei werdenden Chlorophyllmoleküle können für die Pflanzenzelle jedoch schnell ein toxisches Niveau erreichen. ELIP-Proteine können diese Chlorophyllmoleküle binden, was sie höchstwahrscheinlich für die Zelle unschädlich macht (Adamska *et al.*, 1992a; Adamska, 1999). ELIP-Proteine werden erst bei gesteigerten Lichtintensitäten gebildet und sind unter diesen Bedingungen stabil (Adamska *et al.*, 1992a; Heddan und Adamska, 2000). Bei Rückkehr zu „normalen“ Lichtbedingungen werden die ELIP-Proteine spezifisch durch eine bei diesen Lichtintensitäten aktivierte Protease abgebaut (Adamska *et al.*, 1993; Adamska *et al.*, 1996).

### 1.3.2.2 Photoinhibierung

In einer Pflanze herrschen bei normalen Lichtbedingungen hohe Redoxpotentiale, die in Energieäquivalente umgesetzt werden. Bei Starklicht jedoch können diese Potentiale dauerhaft ein hohes Ausmaß erreichen und die Spannung über die Thylakoidmembran auf über 1 Volt erhöhen (Barber und Anderson, 1992; Race *et al.*, 1999). Dies kann für eine Pflanzenzelle gefährliche Ausmaße annehmen, denn selbst optimal funktionierende Komponenten werden überbeansprucht und können beschädigt werden. Das D1-Protein ist dafür ein gutes Beispiel. Es besitzt die höchste Umsatzrate aller Proteine der Thylakoidmembran (Aro *et al.*, 1993). Es wird ständig, durch Überbeanspruchung be-

schädigt, abgebaut und neu synthetisiert (Mattoo *et al.*, 1984). Jedoch existiert für das D1-Protein ein sehr effizientes Reparatursystem. Die reversible Phosphorylierung des D1-Proteins soll Voraussetzung für den Auf- und Abbau des D1 Proteins nach der Photoinhibierung des PSII sein (Baena-González *et al.*, 1999). Nach der Phosphorylierung von D1 unter Starklicht wandert das PSII-Reaktionszentrum in die Stromalamellen. Phosphoryliertes D1 ist resistent gegen Proteolyse. Erst in den Stromalamellen wird D1 wieder dephosphoryliert und kann anschließend abgebaut und neusynthetisiertes D1-Protein wieder in das PSII eingebaut werden (Rintamäki *et al.*, 1996). Jedoch konnte bei Bonardi *et al.* (2005) gezeigt werden, dass die D1-Synthese- und -Abbauraten in deren Kinase-Mutanten  $\Delta stn7$  und  $\Delta stn8$  mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Die Phosphorylierung des D1-Proteins scheint also doch nicht Voraussetzung für dessen Abbau und die Reparatur des PSII zu sein. Wenn die Abbauraten des photooxidativ geschädigten D1 dessen Neusyntheserate übersteigt, spricht man von Photoinhibition (Anderson, 1986).

Hitzestress kann zu ähnlichen Schädigungen des D1-Proteins führen wie Lichtstress. Die durch Hitze beschädigten Proteine können durch spezifische Proteasen, die sowohl Peptidase- als auch Chaperonfunktion besitzen, wie z.B. HtrA, abgebaut oder neugefaltet werden (Strauch *et al.*, 1989; Lipinska *et al.*, 1990; Spiess *et al.*, 1999). Selbst UV-Licht, welches photosynthetisch nicht nutzbar ist, kann bei Absorption durch die Thylakoidmembran zu Schädigungen von D1 und anderen Proteinen führen (Barbato *et al.*, 1995). Der durch UV B-Licht induzierte Abbau von D1 unterscheidet sich bei höheren Pflanzen von dem durch sichtbares Licht. Der erste Schnitt beim Abbau unter sichtbarem Licht soll zwischen den Transmembranhelices IV und V stattfinden und ein 23 kDa großes N-terminales und ein ca. 10 kDa großes C-terminales Abbauprodukt liefern (Shipton und Barber, 1991; Lindahl *et al.*, 2000). Im Falle der UV-induzierten Proteolyse fand der erste Schnitt im Transmembransegment II statt, welches in einem 13 kDa großem N-terminalen und 20 kDa großem C-terminalen Teil resultierte (Barbato *et al.*, 1995). Während lange Zeit unklar war, welche Proteasen eine Rolle beim Abbau durch sichtbares Licht spielten, geht man heute von einer Beteiligung der in Stromathylakoiden lokalisierten FtsH-Protease aus, die das 23 kDa große Abbauprodukt weiter degradiert (Lindahl *et al.*, 2000). Außerdem wird die an der Stromaseite assoziierte DegP2-Protease als das Enzym beschrieben, welches den ersten Schnitt beim Abbau von D1 ausführt (Haussuhl *et al.*, 2001). Beim UV-induzierten Abbau konnten bislang noch keine einzelnen Proteasen identifiziert werden. Man geht jedoch von einer Beteiligung der unter Starklicht gebildeten ELIP-Proteine aus (Adamska *et al.*, 1992b).

### 1.3.3 Nährstoffmangel

Auch das Fehlen wichtiger Nährstoffe, wie z. B. Kupfer, Eisen, Stickstoff oder Phosphor, wird in der Zelle als Stress wahrgenommen und kann massive Auswirkungen auf das Proteinspektrum der Zelle haben. Proteine werden abgebaut, um sich ihrer Bausteine zu bedienen, die Transkription oder Translation wird eingeschränkt, um Ressourcen einzusparen. Um ihr Überleben zu sichern, schaltet die Zelle auf einen Sparmodus. Sehr gut sind dabei bereits einige Abbauprozesse unter Nährstoffmangel in Cyanobakterien untersucht, wie z. B. der Abbau von Phycobilisomen bei fehlendem Stickstoff oder Phosphor (Collier und Grossman, 1992; Sauer *et al.*, 2001) oder die Degradierung von Plastocyanin unter Kupfermangel (Li und Merchant, 1995). Eisen spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen energetischen Prozessen. Es ist bei der Bildung von Chlorophyll beteiligt und dient als Träger von Sauerstoff bei der Zellatmung als Katalysator. Es dient als Cofaktor in Cytochrom und anderen Enzymen, wie der Peroxidase und Katalase. Unter Eisenmangel zeigen Cyanobakterien einen schnelleren Abbau von Phycobilisomen und Proteinen des PSI (Guikema und Sherman, 1983). Der Abbau dieser pigmenttragenden Proteine resultiert in einem Mangel an Chlorophyll *a* und Phycocyanin/Allophycocyanin. Die Zellen bleichen aus. Ein Zustand, den man als Chlorose bezeichnet. Andere Gene, die der Zelle zum Schutz vor Eisenmangel dienen, werden hochreguliert, wie z. B. *isiA*, *-B* oder *idiA*. Diese können sich ringförmig um die Photosysteme anordnen und deren Abbau hinauszögern oder verhindern (Boekema *et al.*, 2001).

### 1.4 Enzym- und „chaperon“-Funktion von Proteasen

Proteasen sind verantwortlich für einen ausgeglichenen Zellhaushalt und für einige zelluläre Prozesse. Alte, schadhafte und überflüssige Proteine werden durch Proteasen verdaut und dem Metabolismus wieder zur Verfügung gestellt. Dies geschieht auch in der Anpassung einer Pflanze oder eines Bakteriums an biotische Umwelteinflüsse. Die Degradierung von Proteinen spielt eine wichtige Rolle insbesondere bei der Adaptation an Stressbedingungen, bei der Genexpression, bei der Regulation der Proteinqualität, aber auch bei der Apoptose und Seneszenz.

Proteasen sind aber nicht nur für den Abbau von inkorrekt gefalteten oder beschädigten Proteinen durch Spaltung von Peptidbindungen verantwortlich, sondern auch für die korrekte Zusammensetzung der Komplexe. Dies geschieht durch eine große Anzahl an „chaperon“-Proteinen (Hippler *et al.*, 2002), wobei einige Proteasen beide Funktionen vereinen (Spiess *et al.*, 1999). Die Spaltung von bestimmten Proteinen an definierten Stellen



der Aminosäuresequenz ermöglicht erst die Faltung der freigewordenen Polypeptide zu spezifisch funktionierenden Proteinen. Dabei binden die „chaperone“ in einem ersten Schritt an die freien Proteinuntereinheiten oder Cofaktoren und sichern deren korrekte Zusammensetzung. Erst wenn das Protein stabil im Komplex eingebaut ist, löst sich das „chaperon“ wieder ab (Plücken *et al.*, 2002; Lezhneva *et al.*, 2004).

Eine zweite Aufgabe von „chaperonen“ ist, Proteine vor proteolytischem Abbau zu schützen. Die „chaperone“ besetzen die Proteasebindestelle des Proteins und blockieren den proteolytischen Angriff (Choquet und Vallon, 2000). Proteasen bestimmen also je nach Funktion das Gleichgewicht in der Zelle, indem sie die Syntheserate von funktionellen Proteinen beeinflussen oder für den Abbau derselben verantwortlich sind. Letztere ist dabei besonders wichtig für die D1-Untereinheit des PSII-Komplex, welche die am häufigsten umgesetzte Untereinheit des photosynthetischen Apparates ist. Darüber hinaus haben Proteasen aber noch andere Funktionen, die für die Biogenese und Instandhaltung der photosynthetischen Komplexe von großer Bedeutung sind: Sie entfernen Transitpeptide von importierten Vorstufenproteinen (Robinson *et al.*, 2001), sie stellen durch Prozessierungsprozesse reife Untereinheiten her (Zak *et al.*, 2001) und sie bauen Proteine ab, deren Bindungspartner fehlt (Choquet *et al.*, 2003).

Durch Sequenzanalyse konnte eine große Anzahl an Proteasen identifiziert und miteinander verglichen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass in Organismen mit unterschiedlicher Lebensform und Zellstruktur dennoch ein ähnliches Grundspektrum an Peptidasen vorhanden ist. Überraschend war jedoch, dass der prozentuale Anteil von Genloci, die Peptidasen kodieren, am Gesamtgenom bei *Synechocystis* mit 1,8% fast doppelt so hoch ist wie bei *Arabidopsis thaliana*, bei der nur 1,2% des Genoms für Peptidasen kodieren. Die bekanntesten Proteasefamilien sind dabei die ATP-abhängigen Clp- und FtsH-Familien und die ATP-unabhängige DegP-Proteasefamilie.

#### **1.4.1 Die Clp-Peptidasefamilie**

Die Clp-Peptidasefamilie gehört zu den ATP-abhängigen Serinproteasen und sowohl in Prokaryonten als auch im Chlorplasten zu den am besten untersuchten Proteasefamilien. Sie sind im Stroma lokalisierte, lösliche Proteinkomplexe, die aus zwei Typen von Untereinheiten aufgebaut sind (Gottesman *et al.*, 1990). Ein typischer Clp-Komplex, wie er auch gleichnamig in *E. coli* vorkommt, besteht aus einer proteolytisch aktiven Peptidase, ClpP genannt, die jedoch auch in katalytisch inaktiver Form, ClpR, vorkommt, und aus einer regulatorischen, ATP-abhängigen Komponente: ClpA, ClpC, ClpD oder

ClpX unterscheiden sich anhand der Anzahl ihrer ATP-Bindedomänen (Schirmer *et al.*, 1996; Turgay *et al.*, 1998) und kontrollieren die proteolytische Aktivität. Clp-Proteasen haben somit eine proteolytische, als auch eine regulatorische Funktion. Zur Ausübung der proteolytischen Funktion ist die Assoziation mit einer ATPase-Untereinheit, meistens ClpC, notwendig. Die regulatorische ATPase-Untereinheit übt vermutlich eine „chaperon“-artige Funktion aus (Squires und Squires, 1992; Schirmer *et al.*, 1996; Gottesman *et al.*, 1997a, b), die gleichzeitig für die Substraterkennung sowie für dessen Konformationsänderung sorgt (Wang und Tsou, 1998).

Clp-Proteasen werden durch unterschiedliche Stressarten induziert, wie z. B. Nährstoffmangel, Starklicht, aber auch Kälte- bzw. Hitzestress. Darüber hinaus können sie als „chaperone“ missgefaltete oder beschädigte Proteine erkennen und abbauen (Frees und Ingmer, 1999; Krüger *et al.*, 2000). Außerdem sind Clp-Proteasen in verschiedenen Organismen auch in kritischen Prozessen wie der Sporenbildung (Msadek *et al.*, 1998; Nanamiya *et al.*, 1998), der Zellteilung (Jenal und Fuchs, 1998) und der Proteintranslation beteiligt (Flynn *et al.*, 2001). Die Proteasen der Clp-Familie sind weit verbreitet, jedoch ist die Anzahl der *clp*-Gene in photosynthetischen Organismen unterschiedlich (Sokolenko *et al.*, 1998; Clarke 1999). In *Synechocystis* gibt es acht *clp*-Gene. Vier davon kodieren proteolytische (ClpP1, ClpP2, ClpP3 und ClpR) und vier regulatorische Untereinheiten (ClpC, ClpB1, ClpB2 und ClpX). *Arabidopsis* besitzt 26 Clp-Proteasen, von denen 15 im Chloroplasten lokalisiert sind, die teilweise eine hohe Ähnlichkeit (bis zu 52% bei ClpP) zu *Synechocystis* Clp-Proteinen zeigen (Sokolenko *et al.*, 2002). Ein *clp*-Gen (ClpP1) ist plastomkodiert, während alle anderen kernkodiert sind. Pflanzliche Clp-Komplexe sind also von zweierlei genetischer Herkunft (Adam *et al.*, 2001; Peltier *et al.*, 2001).

#### 1.4.2 Die FtsH-Peptidasefamilie

Die FtsH-Peptidasefamilie wird in *Synechocystis* durch 4 Genloci und in *Arabidopsis* durch 16 homologe Gene repräsentiert. Verglichen mit der Clp-Familie weist die FtsH-Familie einige Mitglieder auf, die zwar eine ATP-Bindestelle, jedoch keine Zn-Bindestelle, die für die proteolytische Aktivität nötig ist, besitzen (Leonhard *et al.*, 1996). Diese proteolytisch inaktiven Proteasen wurden als FtsHi-Proteine bezeichnet (Sokolenko *et al.*, 2002). Ihre genaue Funktion ist noch unbekannt, aber man vermutet, sie könnten „chaperon“-Funktion besitzen oder als Strukturproteine in thylakoidären FtsH-Komplexen dienen. Diese proteolytisch inaktiven Formen wurden nicht in *Synechocystis* gefunden und wohl erst später durch Genduplikation gebildet. Bis auf wenige Ausnahmen (FtsH3,

FtsH4, FtsH10; Sakamoto *et al.*, 2003) sind alle FtsH- und FtsHi-Proteine in *Arabidopsis* in Chloroplastenmembranen lokalisiert. Anfangs wurde FtsH eine Beteiligung am Abbau von nichtassemblierten Proteinen der Thylakoidmembran zugesprochen (Ostersetter und Adam, 1997). Erst später fand man durch *in vitro*- und *in vivo*-Versuche heraus, dass FtsH2 (Lindahl *et al.*, 2000; Bailey *et al.*, 2002) und FtsH5 (Nixon *et al.*, 2005) am weiteren Abbau des D1-Proteins des PSII beteiligt ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die FtsH6-Protease in *Arabidopsis* LHCII während dunkelinduzierter Seneszenz und Starklichtakklimatisierung abbaut (García-Lorenzo *et al.*, 2005). In *Synechocystis* zeigte die FtsH-Mutante eine Veränderung ihrer Pigmentation und eine Beeinträchtigung der PSII-Biogenese (Mann *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass FtsH2 in *Synechocystis*, genau wie sein Homologes in *Arabidopsis*, in den Abbau des D1-Proteins involviert ist.

#### 1.4.3 Die Deg-Peptidasefamilie

Deg-Peptidasen sind ATP-abhängige Serinproteasen, die sowohl in Eukaryoten als auch in Bakterien vorhanden sind. In *Arabidopsis thaliana* sind 14 Mitglieder der Deg Familie (DegP1 - P14) bekannt. Fünf davon sind im Chloroplasten lokalisiert (Adam *et al.*, 2001). DegP1, P5 und P8 sind mit der lumenalen Seite der Thylakoidmembran assoziiert, DegP2 ist an der stromalen Seite gebunden (Itzhaki *et al.* 1998; Lensch *et al.*, 2002). Die genaue Lokalisierung von DegP14 ist noch nicht abschließend geklärt.

Die Deg-Familie, auch HtrA-Familie genannt, von Cyanobakterien und Bakterien besteht aus nur 3 Peptidasen; DegP (HtrA), DegQ (HhoA) und DegS (HhoB). HhoA und HtrA sind lösliche Proteine und im Bakterienperiplasma lokalisiert. HtrA fungiert in *E. coli* als Hitzeschockprotease. Durch Hitze denaturierte Proteine, die zur Bildung von Aggregaten neigen, werden abgebaut (Kim *et al.*, 1999). HtrA kann unter normalen Bedingungen auch „chaperon“-Funktion besitzen, und somit für die korrekte Faltung von Proteinen sorgen (Lipinska *et al.*, 1990). HhoB ist kleiner und ein membrangebundenes Protein, wobei die katalytische Seite zur periplasmatischen Seite zeigt (Alba *et al.*, 2001). HhoB wird unter Stressbedingungen hochreguliert und kontrolliert den  $\sigma^E$ -spezifischen Anti-Sigmafaktor RseA bei der Stressantwort (Spiess *et al.*, 1999).

#### 1.4.4 Die SppA-Peptidasefamilie

Die Mitglieder der SppA-Familie sollen bei der Anpassung der Thylakoidmembranen an veränderte Lichtbedingungen involviert sein. In Bakterien und Cyanobakterien sind dabei zwei SppA Proteasen bekannt, welche in *Synechocystis* die Namen SppA1 und SppA2

tragen, wobei die kürzere Protease SppA2 Homologie zum C-terminalen Teil von SppA1 zeigt. In *Arabidopsis* hingegen ist nur ein Mitglied bekannt, SppA, welches Homologien zu SppA1 aus Bakterien zeigt.

SppA-Peptidasen sind Membranproteine, die an die stromale/cytoplasmatische Seite der Thylakoidmembran gebunden sind. Unter Starklichtbedingungen wird die Expression der *sppA*-Gene erhöht, was dafür spricht, dass SppA eine Rolle bei der Akklimatisierung an veränderte Lichtbedingungen spielt (Lensch *et al.*, 2001). In *Synechocystis* konnte dies bereits anhand von SppA1- und SppA2-„knock out“-Linien gezeigt werden. SppA1 ist dabei in der Anpassung an steigende Lichtintensitäten und SppA2 in die Anpassung von Stark- zu Schwachlichtbedingungen involviert (Pojidaeva *et al.*, 2004). Beide Peptidasen benutzen unterschiedliche Substrate und können somit das Fehlen der anderen Peptidase nicht kompensieren.

### **1.5 *Arabidopsis* als Modellorganismus**

Die zur Familie der *Brassicaceen* gehörende *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) wurde in den letzten Jahren zu einem sehr populären Modellorganismus für biochemische und molekularbiologische Studien. Die Möglichkeit diese Pflanze trotz räumlicher und zeitlicher Begrenzungen einfach zu kultivieren, war durch die gut handhabbare Größe, die Fähigkeit zur Selbstbestäubung, die kurze Generationszeit von 6 - 8 Wochen und die große Samenausbeute gegeben. Das relativ kleine Genom (125 Mbp) der Pflanze ist auf 5 Chromosomen verteilt. Das *Arabidopsis thaliana*-Genom wurde als erstes Genom einer höheren Pflanze vollständig sequenziert (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Es enthält ca. 25.500 Gene, welche für Proteine aus 11.000 Familien kodieren. Von nur etwa 50% der Gene ist auch die Funktion bekannt. Die Funktionen wurden entweder durch Sequenzhomologien mit Genen bereits bekannter Funktion oder als Ergebnis experimenteller Forschung gefunden.

Um z. B. die Funktionsweise von Chloroplasten besser zu verstehen, gibt es die Möglichkeit anhand von „knock out“-Linien die entsprechende Funktion zu finden. *Arabidopsis thaliana* ist mit *Agrobacterium tumefaciens* leicht transformierbar und es steht eine große Auswahl an Mutantenlinien zur Verfügung (SALK, GABI, etc.).

## 1.6 *Synechocystis* als Modellorganismus

Cyanobakterien, wie *Synechocystis*, sind einzellige gram-negative Bakterien, die zur oxidativen Photosynthese fähig sind. Da der Chloroplast nach der Endosymbiontentheorie eine phagozitierte, den Cyanobakterien verwandte Zelle gewesen ist, liegt es nahe, Cyanobakterien für die Analyse des photosynthetischen Apparates der eukaryotischen Zelle heranzuziehen. In dieser Arbeit wurde *Synechocystis* sp. PCC 6803 als Modellorganismus verwendet, dessen gesamtes Genom sequenziert ist. Das Genom hat eine Größe von ca. 3,57 Mbp und kodiert 3168 Proteine (Kaneko *et al.*, 1996). Es kann leicht durch homologe Rekombination transformiert werden, was die Erzeugung von „knock out“-Linien für spezifische Gene erleichtert und das Einfügen von Antibiotikaresistenzkassetten ermöglicht. Die Fähigkeit sowohl photoautotroph als auch photoheterotroph zu wachsen, erleichterte die Untersuchung photosynthetischer Mutantenlinien.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung einiger Deg- und SppA-Insertionsmutanten von *Arabidopsis* bzw. *Synechocystis* unter verschiedenen Stressbedingungen (Starklicht, Eisenmangel). Dabei sollten einerseits die genaue Lokalisierung der Proteine innerhalb der Thylakoidmembran erörtert werden und andererseits das Substrat der entsprechenden Proteasen aufgefunden werden. Zudem war interessant herauszufinden, ob die Funktionen der Deg- und SppA-Proteine in *Arabidopsis* homolog zu denen in *Synechocystis* waren. Die *Arabidopsis* Mutanten  $\Delta degP2$ ,  $\Delta degP5$  und  $\Delta sppA$  und die *Synechocystis*-Mutanten  $\Delta hhoA$  und  $\Delta hhoB$  waren die Hauptuntersuchungsobjekte dieser Arbeit.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien hatten p. a. Qualität und wurden von folgenden Herstellern bzw. Firmen bezogen: Biomol GmbH, Hamburg; Difco Laboratories, Detroit/USA; Merck AG, Darmstadt; Serva Feinbiochemika, Heidelberg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; Sigma Chemie GmbH, München.

Radioaktiv markierte Isotope ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP und  $^{35}\text{S}$ -Methionin) wurden von Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, bezogen.

DNS-Polymerase I	Eppendorf, Hamburg
DNase I	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Klenow-Fragment	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase A	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies
Shrimp Alkaline Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
T4-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Die folgenden Restriktionsendonukleasen wurden von MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, und New England Biolabs GmbH, Schwalbach, bezogen: *Bam*HI, *Hind*III, *Sma*I, *Xho*I.

#### 2.1.2 Molekulargewichtsmarker

##### RNS- und DNS-Längenstandards

Als RNS-Längenstandard für die Elektrophorese wurde die 0,24 - 9,5 kB RNS-Leiter von Gibco/BRL, Karlsruhe verwendet (Größen 0,24/ 1,35/ 2,37/ 4,4/ 7,46 und 9,49 kB). Für die DNS-Gelelektrophorese diente die  $\lambda$ -*Eco*RI/*Hind*III-Leiter (Größen 564/ 831/ 947/ 1375/ 1584/ 1904/ 2027/ 3530/ 4268/ 4973/ 5148/ 21226 Bp) und die 1 kB-Leiter (Größen ca. 300/ 350/ 400/ 500/ 1000/ 1600 und 2000- 12000 Bp im Abstand von je 1000 Bp) von Gibco/BRL, Karlsruhe, als Längenstandard.

##### Protein-Molekulargewichtsmarker

Als Marker für die Bestimmung von Molekulargewichten bei der Proteingelelektrophorese diente der SDS 7-Marker (Größen 14/ 20/ 24/ 29/ 36/ 45/ und 66 kDa) von Sigma

Chemikalien, München, der peqGOLD-Hochmolekulargewichtsmarker (Größen 14,3/ 18,4/ 25/ 35/ 45/ 66 und 116 kDa) und der vorgefärbte peqGOLD-Proteinmarker (Größen 19/ 26/ 34/ 45/ 86 und 119 kDa) von PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen.

### 2.1.3 Vektoren und Bakterienstämme

#### Verwendete Vektoren

pIVEX2.6d (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Switzerland)

pVZ323 (Zinchenko *et al.*, 1999)

#### Verwendete Bakterien und Cyanobakterienstämme

*E. coli* DH 5 $\alpha$  (Hanahan, 1985)

*E. coli* C600 (Appleyard, 1954)

*E. coli* C41 DE3

*E. coli* C43 DE3

*E. coli* R751 (Zinchenko *et al.*, 1999)

Wildtyp *Synechocystis* sp. PCC 6803

### 2.1.4 Antiseren

Antikörper gegen PSI-Untereinheiten (PsaA, PsaB und PsaD), PSII-Untereinheiten (CP43 und CP47), gegen Untereinheiten des Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplexes (Cytochrom *b<sub>6</sub>*, Cytochrom *f*, Rieske und Untereinheit IV) und der ATP-Synthase ( $\alpha$ -,  $\beta$ -Untereinheiten) wurden aus der Sammlung von Prof. Herrmann zur Verfügung gestellt.

#### Primäre Antikörper

Anti-hemagglutinin-tag (HA-); konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Fa. Roche, Basel)

#### Sekundäre Antikörper

Polyklonales Anti-Kaninchen-IgG aus Ziegen; konjugiert mit Meerrettichperoxidase      Sigma Chemikalien, München

Polyklonales Anti-Chicken-IgG aus Kaninchen; konjugiert mit Meerrettichperoxidase      Sigma Chemikalien, München

Polyklonales Anti-Ziege-IgG aus Mäusen konjugiert mit Meerrettichperoxidase      Sigma Chemikalien, München

### 2.1.5 Oligonukleotide

Unten aufgelistete Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) als Lyophilisate bezogen. Sie wurden in sterilem bidestilliertem Wasser gelöst. Die daraus resultierende Stammlösung (100 pmol/µl) wurde zu einer 10 pmol/µl Arbeitslösung verdünnt.

#### ***Arabidopsis*-genspezifische Oligonukleotide**

##### Sequenzspezifische Oligonukleotide für SppA:

SppA_F	5'- CGT CTT CAT TCT CCG TAC AAT -3'
SppA_F3	5'- CTC TTG TAA GAA CCT ATA GGT -3'
SppA_F4	5'- GTT AAG GGT CCA TTA AGC AC -3'
SppA_F5	5'- GAC AGT CCA GGA GGT GAT G -3'
SppA_for2	5'- CGA CAA GAT GGA AGA AGT TG -3'
SppA_R	5'- CCT CGG TGA TTG TTA ATT CGT C -3'
SppA_R2	5'- GTT CTG TCA ACT CCA ATC ACC -3'
SppA_R3	5'- GCT GTG CAG ACT TCT CAA AC -3'
SppA_R4	5'- GCC AGT AGT TTG ATC TCC CTC -3'
SppA_KOC	5'- CAT CTG AGA GAG CTG AGG TAA TCT -3'

##### Sequenzspezifische Oligonukleotide für DegP1, DegP2, DegP5, DegP8 und DegP11:

DegP1_for	5'- CGG TAC AAA AGT CTC TAA CG -3'
DegP1_for1	5'- GGC CGT CGA CAA GCT TTC AC -3'
DegP1_rev	5'- AAT ATG ACC TTG CTT ATC CCA CAC -3'
DegP1_R1	5'- CCT TGT GAT CGC CTC TTA GAA CC -3'
DegP2_for1	5'- GCT TTT ATG ATT GGA GAT GG -3'
DegP2_F2	5'- CAC TTC TCT CTG TAG TTA GTG -3'
DegP2_F3	5'- GTC GAG GTC TGA TTC ACC ATC -3'
DegP2_rev	5'- GCC ACA TAC TTT CGA TCA TCT -3'
DegP5_for1	5'- GGT TGG GAA GAG AGA TAC CTT -3'
DegP5_for2	5'- CGT CAT TGA TCG GAG AAG AAG -3'
DegP5_F	5'- CGA AAT TTG TGT TAG CTT GCT -3'
DegP5_rev1	5'- GGC CCT CCA GAA TTG C -3'
DegP5_rev2	5'- GTG TTC ACA CCT ATG GTA TGG C -3'
DegP5_R1	5'- CAC GTC CCT CAG TTT CAA T -3'
DegP5_R2	5'- CAC AGC TAG ATC ATT ATC TGG -3'
DegP8_F1	5'- ACC CAC CCG TTT CTT CTG TC -3'



DegP8_R1	5'- GAA TCG AGC AGA GGA CCT CC -3'
DegP11_F	5'- GGC CGT GTG TTC ATA CGG TGG -3'
DegP11_R	5'- AAC GAC TTT GTT TCC CAT AAT CAC C -3'

Sequenzspezifische Oligonukleotide für T-DNS-Insertionen:

SAIL LB1	5'- GAA ATG GAT AAA TAG CCT TGC TTC C -3'
LB reverse	5'- ATT GAC GCT TAG ACA ACT TAA T -3'
GABI LB	5'- ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC -3'
GABI RB	5'- GTG GAT TGA TGT GAT ATC TCC -3'

**Synechocystis-genspezifische Oligonukleotide**

Sequenzspezifische Oligonukleotide für HhoA:

sll1679_for2	5'- AAG TTT GCT TGG GCT AGT CTA -3'
sll1679_for3	5'- TTG GGC TAG TCT ATT GCC CAC -3'
sll1679_for4	5'- CGA TAC GGA GAC AGT GGT AAC -3'
sll1679_rev	5'- TTA ACT GGT GGG ATT ACG AAG -3'
sll1679_rev1	5'- GTT ACC ACT GTC TCC GTA TCG -3'
sll1679_rev2	5'- GGT GAG AAT AAT GCC ACT GTT G -3'
sll1679_forw_compl	5'- GTT GAG TCA ATC CAT CCC AAG -3'
sll1679_for2_compl	5'- GTA AAT AGG GCG GTT TAG TAG -3'

Sequenzspezifische Oligonukleotide für HhoB:

sll1427_forw	5'- ATG GCA ATC CAT CTG AAG GCA -3'
sll1427_rev	5'- TTA TTG ACC CAA ATC TTC GGG -3'
sll1427_rev1	5'- CAG ACT TTG GGG ACT GGT GGT G -3'
sll1427_compl_forw	5'- CAA GCT GGA TGA ATA ACT TAG C -3'
sll1427_compl_for2	5'- GTT GAT CCA GGG GAT GCC AC -3'
sll1427_compl_rev	5'- CTT TAT TGA CCC AAA TCT TCG G -3'

Sequenzspezifische Oligonukleotide für RT-PCR:

psaC_forw1	5'- GTC CCA TAG TGT AAA AAT TTA CG -3'
psaC_rev1	5'- TAG TAA GCT AAA CCC ATA CTG C -3'
psaC_rev2	5'- CCA ACA CAA TCC TCG GTT CTA -3'
isiA_for1	5'- GCA AAC CTA TGG CAA CGA CAC C -3'
isiA_rev1	5'- GCT ACT GAT GCT GGC AAA ATG G -3'
isiA_rev2	5'- CCT GGT CTC CCA TGG CCT GG -3'

16S_syn1_forw	5'- AAT GGA GAG TTT GAT CCT GGC T -3'
16S_syn1_rev	5'- AGG TGA TCC AGC CAC ACC TTC -3'
16S_syn1_rev1	5'- CAG TCG TTT CCA ACT GTT GTC -3'
cp47_forw1	5'- CTA CCT TGG TAT CGC GTT CAT AC -3'
cp47_rev1	5'- GTT AAG CAC AGC ATC GCT GGA G -3'
cpcA_fwd	5'- ATG AAA ACC CCT TTA ACT G -3'
cpcA_for1	5'- CGG TAT TGA TGA AAT CAA CCG C -3'
cpcA_rev	5'- CTA GCT CAG AGC ATT GAT GG -3'
apcA_fwd	5'- ATG AGT ATC GTC ACG AAA TC -3'
apcA_rev	5'- CTA GCT CAT TTT TCC GAT AAC -3'

## 2.1.6 Puffer und Medien

### 2.1.6.1 Puffer

<u>TE-Puffer</u>	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
<u>STET-Puffer</u>	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	8%	Saccharose
	5%	Triton X-100
	50 mM	EDTA
<u>10 x TBE</u>	1,0 M	Tris
	0,5 M	Borsäure
	0,02 M	EDTA
<u>20 x SSC</u>	3,0 M	NaCl
	0,3 M	Na <sub>3</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,2
<u>20 x SSPE</u>	3,6 M	NaCl
	0,2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	0,02 M	EDTA, pH 7,4
<u>100 x Denhards Lösung</u>	2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	2% (w/v)	Rinderserumalbumin
	2% (w/v)	Ficoll 400

<u>10 x MOPS</u>	0,2 M	MOPS-NaOH, pH 7,0
	50 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA, pH 8,0

<u>TMK-Puffer</u>	10 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	KCl

<u>10 x PBS</u>	750 mM	NaCl
	30 mM	KCl
	45 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,3	

Lösungen für Plasmidisolierung nach Birnboim & Doly (1979):

<u>Lösung I</u>	50 mM	Glukose
	10 mM	EDTA, pH 8,0
	25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	4 mg/ml	Lysozym aus Hühnereiweiß

<u>Lösung II</u>	0,2 N	NaOH
	1%	SDS

<u>Lösung III</u>	3,0 M	K-Acetat
	1,8 M	Ameisensäure

Puffer zur Isolierung von Proteinen aus *Synechocystis*:

<u>Puffer A</u>	50 mM	HEPES-NaOH, pH 7,0
	0,5 M	Saccharose
	15 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	Proteinase-Inhibitor Cocktail (PMSF, DPF, EDTA)

<u>Puffer B</u>	10 mM	Tricine-NaOH, pH 7,5
	6%	Saccharose

	30 mM	DTT
	1 mM	Proteinase-Inhibitor Cocktail (PMSF, DPF, EDTA)
<u>Homogenisierungsmedium</u> (HM-Medium)	2 mM	Na-EDTA
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	MnCl <sub>2</sub>
	50 mM	HEPES-KOH, pH 7,6
	330 mM	Sorbit
	5 mM	Na-Ascorbat
<u>CTAB-Puffer</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1,4 M	NaCl
	20 mM	EDTA
	2% (w/v)	CTAB
<u>Denaturierungspuffer</u>	0,5 M	NaOH, pH 13,0
	1,5 M	NaCl
<u>Neutralisierungspuffer</u>	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,0
	3,0 M	NaCl

### 2.1.6.2 Medium für Bakterienkultur

<u>LB</u>	10 g	Bacto-Pepton
	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	pH 7,0 mit	NaOH
	auf 1 l	Wasser
<u>LBG</u>	10 g	Bacto-Pepton
	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
	4 g	Glukose
	pH 7,0 mit	NaOH
	auf 1 l	Wasser

Alle Medien wurden vor der Verwendung bei 121°C für 20 Min. autoklaviert. Für feste Medien wurden 15 g Agar pro Liter vor dem Autoklavieren zugegeben. Zusätze wie Glukose wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren in entsprechender Menge den Medien zugegeben. Antibiotika zur Selektion (100 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Chloramphenicol) wurden ebenfalls nach dem Autoklavieren, aber erst bei Abkühlung der Medien auf 50°C zugesetzt.

#### Antibiotika- Stammlösungen:

Ampicillin	100 mg/ml (in 50% Ethanol)
Chloramphenicol	25 mg/ml (in 50% Ethanol)

#### **2.1.6.3 Medium zur Anzucht von Cyanobakterien**

Für die Anzucht von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde das BG11-Medium nach Rippka (1988) verwendet. Makro- und Mikroelemente wurden im Verhältnis 1:1000 gemischt, auf 1 l mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und bei 121°C autoklaviert. Für festes Medium wurde 1% Agar (Difco; Detroit, USA) vor dem Autoklavieren zugegeben. Zusätze wie Glukose (5 mM), MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O und CaCl<sub>2</sub> x 7 H<sub>2</sub>O wurden sterilfiltriert und erst nach dem Autoklavieren zugegeben. Für BG11-Medium ohne Eisen wurde Eisenammoniumcitrat ohne Zugabe eines Ersatzes weggelassen. Zur Selektion der Mutanten wurden entsprechende Antibiotika (*ΔhhoA*: Gm 2 µg/ml; *ΔhhoAKompl*: Gm 2 µg/ml und Cm 20 µg/ml; *ΔhhoB*: Km 25 µg/ml; *ΔhhoBKompl*: Km 25 µg/ml und Cm 20 µg/ml) zugesetzt.

<u>Makroelemente (1 x)</u>	NaNO <sub>3</sub>	1,5 g/l
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04 g/l
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,075 g/l
	CaCl <sub>2</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,036 g/l
	Zitronensäure	0,006 g/l
	Eisenammoniumcitrat	0,006 g/l
	EDTA (Dinatriumsalz)	0,001 g/l
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02 g/l
<u>Mikroelemente (1000 x)</u>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/l
	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1,81 g/l
	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,222 g/l
	NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,39 g/l

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,079 g/l
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,049 g/l

Antibiotika-Stammlösungen:

Gentamycin	10 mg/ml (in Wasser)
Kanamycin	100 mg/ml (in Wasser)
Chloramphenicol	25 mg/ml (in 50% Ethanol)

**2.1.6.4 Medium zur Kultivierung von *Arabidopsis***

Zur Anzucht und Selektion von *Arabidopsis*-Wildtyp und von mit Resistenzen versehenen Mutanten wurden Platten mit MS-Salzen nach Murashige & Skoog (1962) hergestellt. Die jeweiligen Zusätze zur Selektion (Cefotaxim Na-Salz, Glufosinatammoniumpestanal und Sulfadiazin) wurden nach dem Autoklavieren des Mediums bei 121°C und Abkühlen auf 50°C steril zugegeben.

<u>Makro MS (1 x)</u>	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,65 g/l
	$\text{KNO}_3$	1,9 g/l
	$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0,22 g/l
	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,37 g/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,17 g/l

<u>Mikro MS (1000 x)</u>	KJ	0,83 g/l
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2 g/l
	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	22,3 g/l
	$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6 g/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g/l
	$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g/l
	EDTA Fe(III) Na-Salz	40 g/l

<u>B5 Vitamine MS (1000 x)</u>	Inosit	100 g/l
	Pyridoxin-HCl	0,5 g/l
	Thiamin-HCl	0,1 g/l
	Glycin	2 g/l
	Nikotinsäure	0,5 g/l

<u>Selektionsmedium für</u>	0,5 x	MS-Salze
<u>SAIL Linien</u>	1 x	MS B5-Vitamine
	1,5%	Saccharose
	200 µg/ml	Cefotaxim Na-Salz (Fa. Merck, Darmstadt)
	30 µg/ml	Glufosinatammoniumpestanal (Fa. Riedel de Haen, Seelze)
	0,8%	Agar
	pH 5,8 mit KOH	

<u>Selektionsmedium für</u>	0,5 x	MS-Salze
<u>GABI Linien</u>	1 x	MS-Vitamine
	1,5%	Saccharose
	11,25 µg/ml	Sulfadiazin
	0,8%	Agar
	pH 5,8 mit KOH	

### 2.1.7 Transfermembranen

Für den Transfer von Nukleinsäuren wurden Hybond Nitrozellulosemembranen von Amersham (Braunschweig) verwendet. Der Transfer von Proteinen fand auf PVDF-Membranen der Fa. Amersham und auf PROTRAN-Nitrozellulosemembranen ( $\varnothing$  0,45 µm) der Fa. Whatman/Schleicher & Schuell (Dassel) statt.

### 2.1.8 Pflanzenmaterial

Für einige biochemische Analysen wurde Pflanzenmaterial von Tabak (*Nicotiana tabacum*) von Dr. A. Sokolenko zur Verfügung gestellt.

*Nicotiana tabacum* Wildtyp

*Nicotiana tabacum*; Zerstörung des Gens *psbA*

*Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia)

*Arabidopsis thaliana*; SAIL T-DNS- „knock out“-Linie: Zerstörung des Gens *sppA*

*Arabidopsis thaliana*; SAIL T-DNS- „knock out“-Linie: Zerstörung des Gens *degP2*

*Arabidopsis thaliana*; SAIL T-DNS- „knock out“-Linie: Zerstörung des Gens *degP5*

*Arabidopsis thaliana*; SAIL T-DNS- „knock out“-Linie: Zerstörung des Gens *degP1*

*Arabidopsis thaliana*; GABI T-DNS- „knock out“-Linie: Zerstörung des Gens *degP11*

## 2.2 Methoden

Einige verwendete molekularbiologische Standardmethoden wurden unverändert nach Sambrook *et al.* (1989) oder nach Herstelleranweisung durchgeführt und daher nicht gesondert aufgeführt:

- Anlagen von Bakterienstammkulturen
- Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren
- Dephosphorylierung und Ligation von DNS
- Konzentrationsbestimmung von RNS und DNS
- Sequenzierung von DNS nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977)
- Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosemembranen
- Verdauung von Nukleinsäuren mit DNase I oder RNase A
- Verdauung von DNS mit Restriktionsenzymen

### 2.2.1 Sequenzanalysen

Genomsequenzen wurden von *Arabidopsis*- (<http://www.mips.biochem.mpg.de/>) und *Synechocystis*-Datenbanken (<http://www.kazusa.or.jp./cyano/>) heruntergeladen.

Analysen zur Protein- und Genhomologie wurden mit Hilfe des „BLAST Search“-Services von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) durchgeführt.

### 2.2.2 Wachstumsbedingungen von *Synechocystis* sp. PCC 6803

*Synechocystis*, Wildtyp und Mutantenlinien, wurden in BG11-Medium bei 30°C und Schwachlicht mit der Intensität 50  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Bei Wachstum unter Dämmerlicht wurde Licht mit der Intensität 10  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , bei Wachstum unter Hochlicht, Licht mit der Intensität 350  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verwendet. Für Wachstum unter Eisenmangel wurden Wildtyp und Mutanten unter normalen Bedingungen angezogen. Die Zellen wurden nach dem Erreichen der log-Phase auf eine Extinktion (E) von 0,3 verdünnt und bis zu einer  $E_{750}$  von 0,9 bis 1,0 wachsen gelassen. Die Kulturen wurden bei 2.500 x g und 25°C für 15 Min. zentrifugiert und nach einem Waschschrift in BG11-Medium ohne Eisen resuspendiert. Mit einer Ausgangsextinktion von 0,5 wurden die Zellen nochmals für eine Periode von acht Tagen wachsen gelassen. Mutantenlinien wurden in BG11-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika (siehe Abschnitt 2.1.6.3) angezogen.



### 2.2.3 Konstruktion von HhoA- und HhoB-Komplementärmutanten

Für die Konstruktion von *Synechocystis*-Komplementärmutanten wurden die *E. coli*-Stämme C600 und DH5 $\alpha$ , sowie das Plasmid pVZ323 verwendet. Das Plasmid musste zur Vermehrung in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert werden. Dazu mussten die Zellen mit Hilfe von CaCl<sub>2</sub> kompetent gemacht werden.

#### 2.2.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden die *E. coli*-Stämme C600 und DH5 $\alpha$  verwendet. 30 ml LB Medium wurden mit 300  $\mu$ l einer 3 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer E<sub>546</sub> von 0,5 bis 0,6 wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 2.500 x g und 4°C 5 Min. zentrifugiert und das Sediment vorsichtig in 15 ml kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach 60 Min. Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder zentrifugiert und in 3 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach weiteren 60 Min. auf Eis waren die kompetenten Zellen einsatzbereit. Für eine Transformation wurden 150  $\mu$ l benötigt.

#### 2.2.3.2 Transformation von Plasmid-DNS in kompetente Zellen

Für eine Transformation benötigte man 150  $\mu$ l frische kompetente Zellen und 10  $\mu$ l Plasmid-DNS. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis und 90 Sek. bei 42°C im Wasserbad wurden die Zellen wieder auf Eis schockgekühlt. Nach Zugabe von 800  $\mu$ l LB-Medium wurde die Transformation für 1 - 3 Std. bei 37°C geschüttelt und positive Transformanten über Nacht bei 37°C auf einer LB-Platte mit dem dem Plasmid entsprechenden Antibiotikum (pVZ323: 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol; pIVEX2.6d: 100 $\mu$ g/ml Ampicillin) selektiert.

#### 2.2.3.3 Konjugation transformierter Zellen mit *Synechocystis*

Für die Konstruktion komplementärer Mutanten sollten die fehlenden *Synechocystis-hhoA*- und *-hhoB*-Gene wieder in Zelle eingebracht werden, um dort exogenomisch auf dem Plasmid wieder ihre Funktion auszuüben. Dazu wurden die Gene und ihre Promotorregion (300 Bp zusätzlich) mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert und anschließend aufgereinigt, um restliche Nukleotidsequenzen zu entfernen. Die Konzentration wurde mit Hilfe der  $\lambda$ -*EcoRI/HindIII*-Leiter auf einem Agarosegel abgeschätzt. Die pVZ323-Plasmid-DNS wurde mit der Methode nach Birnboim & Doly (siehe Abschnitt 2.2.4.1.3) aus den *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen extrahiert und 3 Std. bei 30°C mit der Restriktionsendonuklease *SmaI* verdaut. Da *SmaI* die Nukleotidsequenz gerade aufschneidet, wird die DNS zusätzlich 1 Std. bei 37°C mit Hilfe der

„shrimp-alkaline“-Phosphatase dephosphoryliert. Somit wird verhindert, dass das Plasmid mit sich selbst wieder ligieren kann. Um die vollständige Verdauung und die Konzentration der Plasmid-DNS zu überprüfen, wurden 1 - 2 µl zusammen mit 1 µl λ- *EcoRI/HindIII*-Leiter auf einem 1%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNS-Menge wurde abgeschätzt. Für die Ligation des pVZ323-Plasmids mit den Promotor-Genfragmenten wurden 100 ng Plasmid eingesetzt. Die Ligation fand 1 Std. bei 16°C mit Hilfe der T4-Ligase statt. Die fertigen Plasmid-Gen Konstrukte wurden in *E. coli*-C600-Zellen transformiert.

*Synechocystis-ΔhhoA*- und *-ΔhhoB*-Mutanten wurden bis zu einer  $E_{750}$  von 1,0 wachsen gelassen. 3 ml der Zellkulturen wurden zentrifugiert und in 1 ml BG11-Medium aufgenommen. *E. coli*-Zellen, die das pVZ323-Plasmid mit Konstrukt und solche, die das R751-Helferplasmid enthielten, wurden über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Je 200 µl wurden mit den Cyanobakterienzellen gemischt, die Zellen einmal in BG11-Medium gewaschen, kurz zentrifugiert und in 100 µl BG11-Medium resuspendiert. Die *Synechocystis-E. coli*-Mischung wurde auf einen Nitrozellulosefilter (Ø1 cm), der mittig auf einer Petrischale, das eine Mischung aus festem BG11- und 5% LB-Medium enthielt, aufgetragen. Nach einem Tag bei 10 µmol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  und 25°C wurde der Filter abgezogen mit 100 µl BG11-Medium abgewaschen. Die Zellsuspension wurde auf festem BG11-Medium mit Antibiotika zur Selektion konjugierter *Synechocystis*-Zellen (*ΔhhoA*: 5 µg/ml Cm und 2 µg/ml Gm; *ΔhhoB*: 5 µg/ml Cm und 25 µg/ml Km) ausplattiert.

#### **2.2.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und Selektion transformierter Pflanzen**

Für die Anzucht auf MS-Medium, mussten die *Arabidopsis*-Samen sterilisiert werden. Die Samen wurden dazu in einer Lösung aus 5% Dimamin und 0,02% Triton für eine Minute geschüttelt, anschließend mindestens dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und dann möglichst einzeln liegend auf dem festen Medium verteilt. Für Samen der F1-Generation transgener Pflanzen wurde dabei ein Selektionsmedium (mit Glufosinatammoniumpestanal bzw. Sulfadiazin) verwendet. Um die Keimungsrate zu erhöhen, wurden die ausgelegten Samen 48 Std. dunkel und kühl gestellt. Zum Keimen wurden die Platten in eine Anzuchtammer (22°C, Beleuchtung mit 100 µmol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  für 14 Std. pro Tag) überführt.

Etwa 14 Tage nach dem Ausbringen der Samen hatten die Keimlinge ein gut entwickeltes Wurzelsystem und bereits zwei Paar Sekundärblätter ausgebildet. Diese wurden einzeln auf Erde pikiert und im Gewächshaus bis zur Samenreife herangezogen (F2-Generation). Dabei

wurden die Pflänzchen in den ersten zwei Wochen nach Ausbringung auf Erde nochmals mit einer 0,1%-igen BASTA-Lösung (Fa. Agrevo) zur weiteren Selektion besprüht.

Die Samen der F<sub>2</sub>-Generation wurden nach der gleichen Methoden ausgesät und selektiert. Mit Hilfe der PCR wurden homozygote Transformanten herausgesucht.

## 2.2.5 DNS- und RNS-Analysen

### 2.2.5.1 DNS-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*

2 - 3 kleine, in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Blätter wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Hilfe eines motorisierten Mini-Pistills (Fa. Janke und Kunkel) erst pulverisiert und dann mit 250 µl Extraktionspuffer (CTAB-Puffer) homogenisiert. Nach erfolgter Homogenisation wurden noch 250 µl Extraktionspuffer zugegeben, das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform zur Extraktion von Proteinen und gründlichem Schütteln wurde 15 Min. bei 20°C und 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,8 x Volumen eiskaltem Isopropanol versehen. Die DNS wurde 10 Min. bei Raumtemperatur präzipitiert. Nach Zentrifugation für 15 Min. bei 13.000 UpM wurde der Überstand verworfen, das Sediment zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Rücklösung des Niederschlags erfolgte in 20 µl sterilem bidestillierten Wasser.

### 2.2.5.2 DNS-Isolierung aus *Synechocystis*

Zur Extraktion chromosomaler DNS wurden 3 - 5 ml *Synechocystis*-Kultur einer E<sub>750</sub> von 1,0 zentrifugiert, mit 1 ml TE- Puffer gewaschen und in 270 µl STET- Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Chloroform wurde die Zellsuspension für 5 Min. geschüttelt und anschließend 30 Min. bei 37°C zusammen mit Lysozym (20 mg/ml) inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl 10%-igem SDS wurde die Suspension bei 65°C 50 Min. lang lysiert und weitere 10 Min. nach Zugabe von 100 µl 5 M NaCl inkubiert. Die Proteine wurden mit Hilfe von Chloroform entfernt, die DNS wurde mit Isopropanol ausgefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in sterilem Wasser rückgelöst.

### 2.2.5.3 Plasmid-DNS-Isolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen gibt es zwei unterschiedliche Methoden: die STET-Methode, die mit nur einem Puffer arbeitet und die Methode nach Birnboim & Doly (1979), die auf einem 3-Puffersystem basiert.

#### STET-Methode

3 ml einer Bakterienkultur wurden 10 Min. bei 5.000 x g zentrifugiert, mit 350 µl STET-Puffer und 25 µl Lysozym (4 mg/ml) versehen und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einminütigem Kochen bei 100°C zur vollständigen Lyse der Bakterienzellwand wurde die Zellsuspension für 30 Min. bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol 20 Min. bei Raumtemperatur ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 15.000 x g wurde das Sediment mit 70%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl bidestilliertem Wasser rückgelöst.

#### Methode nach Birnboim & Doly (1979)

Diese Methode unterscheidet sich von obiger nur darin, dass die zentrifugierten Bakterienzellen in 150 µl Lösung 1 und 30 µl Lysozym (4 mg/ml) aufgenommen und 30 Min. auf Eis inkubiert werden. Nach Zugabe von 150 µl von Lösung 2 wurde die Suspension 5 Min. bei Raumtemperatur und nach Zugabe von 150 µl von Lösung 3 wieder 15 Min. auf Eis inkubiert. Nach dieser Prozedur zur Lyse der Zellwand wurde die Suspension zentrifugiert und die Ausfällung der DNS erfolgte wie oben beschrieben.

### 2.2.5.4 PCR-Analyse

Die Amplifikation von Genen erfolgte mittels PCR-Analyse. Dazu wurde 0,1 µg gereinigte DNS aus *Synechocystis*, *Arabidopsis* oder *E. coli* eingesetzt. Das Programm zur Amplifizierung unterschied sich nur in der Wahl der Reassoziations- und der Dauer der Elongationszeit. Erstere war abhängig von der Wahl der Oligonukleotidpaare (Länge der Oligonukleotide, Anzahl der enthaltenen GC Basen) und letztere von der Größe des zu amplifizierenden Produkts (als Faustregel gilt 1 Sek. pro zu amplifizierende 10 Bp).

### 2.2.5.5 RNS-Isolierung aus *Arabidopsis*

Etwa 5 g Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff fein zermörsert, mit 500 µl TRIZOL-Reagenz (Fa. GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) homogenisiert und kurz geschüttelt. Nach 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben, gut geschüttelt und wieder für 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde 15 Min. bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,7-fachem Volumen an Isopropanol gemischt und wieder 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNS wurde durch 15 Min. Zentrifugation bei 15.000 x g sedimentiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Rücklösung erfolgte in 20 µl RNase-freiem Wasser bei 4°C. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

### 2.2.5.6 RNS-Isolierung aus *Synechocystis*

Gesamt RNS wurde aus einer sich in der mittleren log-Phase ( $E_{750}$  bei 0,5 bis 0,8) befindlichen Kultur isoliert. Die Cyanobakterienzellen wurden bei 4°C und 12.000 x g für 15 Min. zentrifugiert und das Sediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem Mörser wurden die Zellen zusammen mit 1 ml TRIZOL-Reagenz (GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe) aufgeschlossen. Die Proben wurden 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um den Zerfall von Nukleo-Proteinkomplexen zu erhöhen. Ein diesem Startvolumen gleiches Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Fa. Ambion) wurde zugegeben und nochmals 5 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde 5 Min. bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Zehntel vom Volumen an 3 M Na-Acetatlösung wurde hinzugegeben und einige Sekunden lang geschüttelt. Die Suspension wurde dann wieder mit einem Startvolumen an Azid-Phenol/Chloroform (Fa. Ambion) gemischt, nochmals für 5 Min. bei 4°C inkubiert und zentrifugiert. RNS aus der oberen wässrigen Phase wurde ausgefällt, indem in einem neuen Reaktionsgefäß ein gleiches Volumen an Isopropanol zugegeben wurde.

Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNS durch Zugabe eines gleichen Volumens an Isopropanol für 30 Min. bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation der Mischung für 30 Min. bei 4°C und 12.000 x g wurde das daraus resultierende Sediment mit 70%-igem Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser rückgelöst. Die Konzentration der RNS wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt.

## 2.2.5.7 Analyse der Genexpression

### 2.2.5.7.1 RT-PCR

Vor dem Einsatz der RNS in eine RT-PCR wurden eventuell noch vorhandene Reste an DNS mit Hilfe von DNase I verdaut. Um die erfolgreiche Verdauung zu überprüfen, wurde 1 µl RNS in eine PCR-Reaktion mit Oligonukleotiden zur Amplifikation des 16S rRNS-Gens eingesetzt. Die anschließende RT-PCR wurde in zwei Schritten ausgeführt. Dabei wurde aus 1 µg Gesamt-RNS unter Verwendung einer Hexamer-Oligonukleotid-Mischung (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) und Reverser Transkriptase (Invitrogen, Life Technologies) einzelsträngige cDNS nach Anleitung des Herstellers synthetisiert. Aus diesem Ansatz wurden 2 µl in eine übliche PCR eingesetzt.

### 2.2.5.7.2 Northern-Analyse

Gesamt-RNS (15 µg pro Spur) wurde in einem 1,2%-igen Formaldehyd-MOPS-Agarosegel unter Beseitigung von Sekundärstrukturen der Länge nach aufgetrennt.

<u>MOPS-Gel (50 ml)</u>	5	ml	10 x MOPS-Puffer
	0,6	g	Agarose
	7	ml	Formaldehyd
	2	µl	Ethidiumbromid
<u>Laufpuffer (100 ml)</u>	10	ml	10 x MOPS-Puffer
	10	ml	Formaldehyd
<u>RNS-Probenpuffer (500 µl)</u>	300	µl	Formamid
	100	µl	Formaldehyd
	60	µl	10 x MOPS-Puffer
	2	µl	Ethidiumbromid
	0,016%		Bromphenolblau

Über Nacht wurde die denaturierte RNS durch Saugströmung auf Biotinylated Nylon-Membranen (Porengröße 0,2 µm) transferiert und durch UV-Licht kovalent an die Membran gebunden.

<u>Methylenblau-Lösung</u>	0,03%	Methylenblau
	0,3 M	NaOAc, pH 5,2

Die RNS auf Nylonmembranen konnte vor der Hybridisierung mit Methylenblau gefärbt werden. Dazu wurde die Membran für 1 Min. in Methylenblaulösung gelegt und anschließend solange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis sich die blau gefärbten RNS-Banden vom Hintergrund abhoben.

Genspezifische DNS-Sonden wurden aus PCR-Produkten hergestellt.

<u>Hybridisierungslösung</u>	5 x	SSC
	5 x	Denhardt-Lösung
	0,2% (w/v)	SDS
	200 µg/ml	Heringssperma-DNS

<u>Waschlösung I</u>	2 x	SSC
	0,2% (w/v)	SDS

<u>Waschlösung II</u>	1 x	SSC
	0,2% (w/v)	SDS

RNS-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 2 Std. in Hybridisierungslösung bei 42°C in einem Drehofen vorhybridisiert, anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der bei 100°C denaturierten Sonde unter gleichen Bedingungen für 1 - 2 Std. unspezifisch oder nicht gebundene Radioaktivität bzw. die nicht gebundene radioaktiv markierte Sonde wurde durch mehrere Waschschrte entfernt. Dazu wurde 3 mal 10 Min. mit Waschlösung I bei Raumtemperatur gewaschen, wobei nach jedem Waschschrte die Radioaktivität auf der Membran mit einen Geiger-Müller-Zähler gemessen wurde. Bei anhaltend starker Strahlung wurde zusätzlich noch 30 Min. mit Waschlösung II bei 42°C gewaschen.

### 2.2.6 Überexpression von Proteinen

Zur Überexpression von Proteinen in *E. coli*-Zellen wurde die vollständige DNS-Sequenz gewünschter Gene in den pIVEX2.6d-Vektor kloniert. Dabei sollte das Leseraster des Gens

nicht zerstört werden. Der Vektor mit dem gewünschten Gen wurde in *E. coli*-C41 DE3- und -C43 DE3-Zellen transformiert. Erfolgreich transformierte Zellen wurden auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C selektiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 3 ml LBG-Medium, welches ebenfalls 100 µg/ml Ampicillin enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde mit frischem LBG-Medium 1:100 verdünnt und bei 37°C bis zu einer  $E_{660}$  von 0,7 bis 0,8 wachsen gelassen. 1 ml Kultur wurde entnommen und auf 4°C gestellt. Sie diente als negative Kontrolle (keine Expression). Bei der restlichen Kultur wurde die Expression des Gens auf dem Vektor durch Zugabe von IPTG (1 mM) bei 37°C induziert. Es wurden jeweils 1 ml-Proben nach 15 Min., 30 Min., 1 Std., 3 Std. und 24 Std. entnommen und bei 10.000 x g und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in 4 x Laemmlis-Probenpuffer resuspendiert, 5 Min. bei 100°C denaturiert und auf einem Polyacrylamidgel analysiert.

### 2.2.7 Pigmentanalyse von *Synechocystis*

Wachstum und Entwicklung der Pigmentkonzentrationen (Chlorophyll a, Carotinoide, PC) wurden über mehrere Tage unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durch Messung mit einem UV/VIS-Spektrophotometer beobachtet. Zur Messung wurden die Zellkulturproben auf eine  $E_{750}$  von 0,3 verdünnt.

#### 2.2.7.1 Bestimmung der Chlorophyll a-Konzentration

1 ml einer *Synechocystis*-Zellkultur wurde bei 12.000 x g und 4°C für 10 Min. abzentrifugiert und das Sediment mit 90%-igem Methanol für 1 Std. bei -20°C extrahiert. Denaturierte Proteine wurden für 10 Min. bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert und die Extinktion der in Lösung verbliebenen Chlorophyllpigmente bei 652 und 665 nm gemessen. Die Chlorophyllkonzentration wurde anhand folgender Gleichung berechnet:

$$[\text{Chl } (\mu\text{g/ml})] = 16,82 \times E_{665} - 9,28 \times E_{652}$$

#### 2.2.7.2 Bestimmung der Carotinoidkonzentration

Carotinoidkonzentrationen wurden anhand der Extinktion bei 470 nm und der Chlorophyllkonzentration bestimmt:

$$[\text{Carot } (\mu\text{g/ml})] = (1000 \times E_{470} - 1,91 \times [\text{Chl}]) / 225$$



### 2.2.7.3 Bestimmung der Phycocyaninkonzentration

Der Anteil an Phycobilisomen wurde nach Grossman *et al.* (1993) bestimmt. Von je 1 ml für 10 Min. bei 75°C erhitzter und nicht erhitzter Zellsuspension wurde die Extinktion bei 620 und 750 nm gemessen. Daraus konnte der Phycocyaningehalt wie folgt berechnet werden:

$$[\text{PC } (\mu\text{g/ml})] = [E_{620} - E_{750} (\text{nicht erhitzt})] - [E_{620} - E_{750} (\text{erhitzt})]$$

### 2.2.8 Zellzahlbestimmung bei *Synechocystis*

Das Wachstum von *Synechocystis*-Zellen wurde anhand der Zelldichte, die bei einer Extinktion von 750 nm gemessen wurde, bestimmt. Die Extinktionsspektren wurden anhand des Programms „Origin“ (Version 6.1) analysiert und verglichen. Die Anzahl der Zellen pro gemessener Zelldichte-Extinktion wurde mit einer Malassez-Zählkammer bestimmt.

### 2.2.9 Proteinanalysen

#### 2.2.9.1 Proteinextraktion aus *Synechocystis*

Gesamtzellextrakt und Thylakoidmembranproteine wurden nach einer Methode von Shukla *et al.* (1992) extrahiert. 50 ml Zellkultur wurden bei 4°C und 5.000 x g für 15 Min. zentrifugiert, in 600 µl Puffer A resuspendiert und mit 0,5-fachem Volumen an Glasperlen 2 Min. „gevortext“. Die Probe wurde etwa 1 Min. auf Eis gestellt, ehe sie wieder „gevortext“ wurde. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, dann wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß möglichst ohne Mitnahme von Glasperlen überführt. Noch intakte Zellen wurden durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert. Die Thylakoide im Überstand wurden durch Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 30 Min. gesammelt. Der Überstand enthält das Cytosol der Zelle, welches durch die von den Thylakoidmembranen abgelösten Phycobilisomen blau gefärbt ist. Das Thylakoidmembransediment wurde zweimal in 500 µl Puffer A gewaschen, um restliches Cytosol zu entfernen und dann in 500 µl Puffer B resuspendiert.

## 2.2.9.2 Proteinextraktion aus *Arabidopsis*

### 2.2.9.2.1 Extraktion von Thylakoiden aus intakten Chloroplasten

5 g Blattmaterial werden in einem vorgekühlten Mixer zusammen mit 35 ml Homogenisationsmedium 2 x 10 Sek. homogenisiert. Die Suspension wird durch doppelt gelegtes Miracloth (Fa. Calbiochem/BMP Biosciences, La Jolle, USA) in ein 30 ml Corex-Glasröhrchen gefiltert, um grobes Pflanzenmaterial zurückzuhalten, und anschließend bei 5.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Dabei wird die Zentrifuge (Rotor JA 25.50) mit maximaler Geschwindigkeit für einige Sekunden hochgefahren und danach ohne die Bremse zu aktivieren, gestoppt. Die Zentrifuge läuft ohne Bremswirkung aus. Der Überstand wird verworfen und das Sediment durch vorsichtiges Schwenken in 300 µl HM-Medium resuspendiert. Durch die Scherkräfte des Pipettierens und durch osmotischen Schock würden die Chloroplasten sonst zerstört. Da im Sediment nicht nur intakte Chloroplasten, sondern auch Zellinhalte und zerstörte Chloroplasten vorliegen, werden diese Bruchstücke von den intakten Chloroplasten durch Auftragen auf einen Percoll-Gradienten getrennt.

<u>PBF-Percoll-Lösung</u>	3% (w/v)	PEG 6000
	1% (w/v)	BSA
	1% (w/v)	Ficoll 400
	Percoll auf 40 ml	

<u>45%-Percoll</u>	330 mM	Sorbit
	50 mM	HEPES-KOH, pH 7,6
	2 mM	Na-EDTA, pH 8,0
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	45%	PBF-Percoll

<u>85%-Percoll</u>	330 mM	Sorbit
	50 mM	HEPES-KOH, pH 7,6
	2 mM	Na-EDTA, pH 8,0
	1 mM	MgCl <sub>2</sub>
	85%	PBF-Percoll

In einem 30 ml Corex-Glasröhrchen wurden 10 ml 85%-Percoll vorgelegt und 12 ml 45%-Percoll vorsichtig drübergeschichtet, so dass sich die beiden Phasen nicht vermischen. Die Chloroplasten/Zellbruchstück-Suspension wurde vorsichtig darauf gegeben und 10 Min. bei

12.000 x g und 4°C zentrifugiert. An der Phasengrenze sammeln sich die intakten Chloroplasten (untere grüne Bande im Gradienten). Diese Bande wurde vorsichtig abgezogen, zweimal mit HM-Medium gewaschen und in 1 ml HM-Medium aufgenommen. Zum Aufbrechen der Chloroplasten wurde ein gleiches Volumen an TMK-Puffer dazugegeben und 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 12.000 x g, 4°C für 10 Min. befinden sich im Sediment die Thylakoidmembranen und im Überstand das Stroma des Chloroplasten. Die Thylakoide wurden einmal in 10 mM HEPES-Sorbit Puffer (pH 8,0) gewaschen, um restliches Stroma zu entfernen und in HEPES-Sorbit Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurden 5 µl Thylakoidlösung in 80% Aceton gegeben. Denaturierte Proteine wurden für 10 Min. bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert und die Extinktion der in Lösung verbliebenen Chlorophyllpigmente wurde spektrophotometrisch bei 645 und 662 nm gemessen. Die Chlorophyllkonzentration wurde anhand folgender Gleichung berechnet:

$$[\text{Chl } (\mu\text{g/ml})] = [(E_{645} \times 20,2) + (E_{662} \times 8,02) \times V]$$

V: Verdünnungsfaktor

#### **2.2.9.2.2 Extraktion lumenaler Proteine**

Die Thylakoidlösung wurde auf eine Chlorophyllkonzentration von 1 µg/ml eingestellt. Mit einem Ultraschallgerät (Stufe 5, 5 Watt) wurde die Thylakoidmembran in 10 Zyklen á 20 Sek. zertrümmert. Die Lösung stand dabei immer auf Eis. Anschließend wurde die Lösung 1 Std. bei 60.000 x g und 4°C ultrazentrifugiert (Rotor: TLA 100.3). Der gelbliche Überstand besteht aus Thylakoidlumen, das Sediment aus den zertrümmerten Thylakoidmembranen, welche wieder in 10 mM HEPES-KOH-Puffer aufgenommen wurden.

#### **2.2.9.3 Konzentrationsbestimmungen**

##### **Bestimmung anhand der Chlorophyllkonzentration**

Die Bestimmung erfolgte anhand der Messung der Chlorophyllkonzentration für *Synechocystis* (siehe Abschnitt 2.2.6.1) oder *Arabidopsis* (siehe Abschnitt 2.2.8.2.1). Die Proteinmenge wurde anhand der einfache Formel abgeschätzt:

150 µg Protein = ca. 10 µg Chl.

**Bestimmung mit der Lowry-Methode (nach Markwell und Haas, 1978)**

<u>Reagenz A</u>	2%	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,4%	NaOH
	0,16%	Na <sub>2</sub> -tartrat x 2 H <sub>2</sub> O
	1%	SDS

<u>Reagenz B</u>	4%	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
------------------	----	--

<u>Reagenz C</u>	Reagenz A/ Reagenz B	(100 : 1)
------------------	----------------------	-----------

Die Lowry-Methode dient der Bestimmung der Proteinmengen in löslichen oder Membranproteinproben. Dazu wurden 0,1 ml einer Proteinprobe, die in etwa 10 - 100 µg Protein enthalten sollte, mit 2,5 mM EDTA und 1 ml Reagenz C versetzt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde 0,1 ml frisch in Wasser (1 : 1) verdünntes Folin-Reagenz zugegeben und nochmals für 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen. Um den Proteingehalt abschätzen zu können, wurde das gleiche Verfahren mit einer BSA-Verdünnungsreihe mit bekannten Proteinkonzentrationen (0 - 1000 µg/ml) durchgeführt, welche später als Eichkurve diente.

**2.2.9.4 Trennung photosynthetischer Komplexe mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation****2.2.9.4.1 Saccharose-Dichtegradienten mit MOPS-Puffer für *Synechocystis***

<u>SMN-Puffer</u>	0,4 mM	Saccharose
	10,0 mM	NaCl
	50,0 mM	MOPS, pH 7,0

Die Isolierung photosynthetischer Komplexe erfolgte nach der Methode von Sun *et al.* (1998). *Synechocystis*-Kulturen der späten Exponentialphase wurden zentrifugiert und die Zellen in SMN-Puffer mit 0,2 mM PMSF und 5 mM Benzamidin resuspendiert. Durch Mischen der Zellen mit Glassperlen wurden diese geöffnet und die Thylakoidmembranen durch Zentrifugieren bei 22.000 x g für 30 Min. sedimentiert. Die Thylakoidmembranen (200 µg Chlorophyll) wurden 30 Min. bei Raumtemperatur mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> in SMN-Puffer inkubiert. Nach Zugabe von Dodecyl-β-D-Maltosid (1,5% Endkonzentration) wurden die Membranen 15 Min. bei 4°C auf einem Rollinkubator solubilisiert. Unlösliches Material wurde

anschließend bei 22.000 x g und 4°C für 15 Min. abzentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten Membrankomplexen wurde auf einen 12 - 30% Saccharosegradienten (Saccharose in 10 mM MOPS-Puffer, pH 7,0 und 0,05% Dodecyl-β-D-Maltosid) in 12 ml Plastikröhrchen aufgetragen und bei 36.000 UpM (SW40 Ti Rotor) und 4°C für 16 Std. zentrifugiert.

#### **2.2.9.4.2 Saccharose-Dichtegradienten mit TMK-Puffer für *Arabidopsis***

Die Extraktion von Thylakoidmembranen erfolgte wie in Absatz 2.2.9.2.1 beschrieben. Thylakoidmembranen (400 µg Chlorophyll) wurden 5 Min. bei 4°C und 8.000 x g zentrifugiert, das Sediment zweimal in 500 µl TMK-Puffer gewaschen und anschließend in 350 µl TMK-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10% Dodecyl-β-D-Maltosid (1,5% Endkonzentration) wurden die Membranen 15 Min. bei 4°C auf einem Rollinkubator solubilisiert. Unlösliches Material wurde anschließend bei 22.000 x g und 4°C für 15 Min. abzentrifugiert. Die im Überstand befindlichen solubilisierten Membrankomplexe wurden auf einen linearen 0,1 bis 1 M Saccharosegradienten (Saccharose in 1 x TMK-Puffer, pH 6,8 und 0,05% Dodecyl-β-D-Maltosid) in einem 12 ml Plastikröhrchen aufgetragen und bei 36.000 UpM (SW40 Ti Rotor) und 4°C für 16 Std. zentrifugiert.

#### **2.2.9.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

##### **2.2.9.5.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese**

##### **Gelelektrophorese nach Laemmli *et al.* (1970)**

40% Acrylamid-Stammlösung (29 : 1)

<u>Trenngel</u>	zwischen 10 und 18% Acrylamid (oder auch Gradient)
	375 mM Tris-HCl, pH 8,8
	0,1% SDS
	0,06% APS
	0,006% TEMED
<u>Sammelgel</u>	5% Acrylamid
	125 mM Tris-HCl, pH 6,8
	0,1% SDS
	0,08% APS
	0,008% TEMED

<u>10 x Laufpuffer nach Laemmli (1970)</u>	0,25 M	Tris-HCl, pH 8,5
	1,92 M	Glycin
	1%	SDS
<u>4 x Probenpuffer nach Laemmli (1970)</u>	0,25 M	Tris-HCl, pH 6,8
	8%	SDS
	40%	Glycerin
	20%	$\beta$ -Mercaptoethanol
	0,016% (w/v)	Bromphenol-Blau

Die Gele wurden in 1 bzw. 1,5 mm Dicke gegossen und meist über Nacht polymerisiert. Proteinproben wurden vor dem Auftragen nach ihrem Proteingehalt bzw. Chlorophyllgehalt (*Synechocystis*: 4  $\mu$ g Chlorophyll pro Spur; *Arabidopsis*: 10  $\mu$ g Chlorophyll pro Spur) standardisiert, mit Laemmli-Probenpuffer (mindestens 1 x) versehen und 10 Min. bei 80°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte in 1 x Laemmli-Laufpuffer über Nacht. Zur Kontrolle der Laufweite diente die blaue Bromphenol-Lauffront und der vorgefärbte peqGOLD-Proteinmarker (15  $\mu$ l pro Spur).

### **Gelelektrophorese mit dem Invitrogen NuPAGE® Novex Midi Gel System**

NuPAGE® Novex Bis-Tris Midi Gele mit 12 + 2 oder 20 Taschen (Trenngel: 4 – 12% Acrylamid, Sammelgel 4% Acrylamid, 1 mm Dicke)

20 x NuPAGE® MES-SDS-Laufpuffer (Trennung von Proteinen niederer Molekulargewichte)

20 x NuPAGE® MOPS-SDS-Laufpuffer (Trennung von Proteinen mittlerer Molekulargewichte)

4 x NuPAGE® LDS (Lithiumdodecylsulfat)-Probenpuffer

10 x NuPAGE® Reduzierungslösung (500 mM DTT)

Proteinproben wurden vor dem Auftragen nach ihrem Proteingehalt bzw. Chlorophyllgehalt (*Synechocystis*: 4  $\mu$ g Chlorophyll pro Spur; *Arabidopsis*: 10  $\mu$ g Chlorophyll pro Spur) standardisiert. Die Probe wurde mit 2,5  $\mu$ l 4 x NuPAGE®-LDS-Probenpuffer, 1  $\mu$ l 10 x NuPAGE®-Reduzierungslösung versehen, auf 10  $\mu$ l mit entionisiertem Wasser aufgefüllt und 10 Min. bei 70°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte in 1 x NuPAGE®-MES- bzw. -MOPS-Laufpuffer (Auf-

trennung von Proteinen über einen Bereich von 1 – 200 kDa) für 40 - 55 Min. bei 200 V. Zur Kontrolle der Laufweite diente der vorgefärbte peqGOLD-Proteinmarker (10 µl pro Spur).

### 2.2.9.5.2 Blau-native Gelelektrophorese nach Schagger and von Jagow (1991)

Dieses Gelelektrophorese-System basiert auf einer Methode nach Schagger und von Jagow (1991). Proteinkomplexe sollen hierbei in ihrer „nativen“ Form und nicht als denaturierte Untereinheiten aufgetrennt werden.

30% Acrylamid- Stammlösung (30 : 0,8)

<u>6 x Gelpuffer</u>	3	M	ε-Aminocapronsäure
	0,3	M	Bis-Tris-HCl, pH 7,0

<u>Trenngel</u>	Acrylamidgradient von 5% bis 12 bzw. 15%		
	20%		Glycerin (bei Acrylamidkonzentrationen von 12 bzw. 15%)
	1 x		Gelpuffer
	0,2%		APS
	0,05%		TEMED

<u>Sammelgel</u>	4 bzw. 5%		Acrylamid
	1 x		Gelpuffer
	0,6%		APS
	0,12%		TEMED

<u>10 x Kathodenpuffer 1</u>	500	mM	Tricine
	150	mM	Bis-Tris-HCl, pH 7,0
	0,02%		Coomassie Serva G 250

<u>10 x Kathodenpuffer 2</u>	500	mM	Tricine
	150	mM	Bis-Tris-HCl, pH 7,0

<u>10 x Anodenpuffer</u>	500	mM	Bis-Tris-HCl, pH 7,0
--------------------------	-----	----	----------------------

<u>ACA-Puffer</u>	750	mM	ε-Aminocapronsäure
	50	mM	Bis-Tris-HCl, pH 7,0

	0,5 mM	EDTA
<u>1 x Ladepuffer</u>	750 mM	$\epsilon$ -Aminocapronsäure
	5% (w/v)	Coomassie Serva G 250
<u>1 x Denaturierungspuffer</u>	2% (w/v)	SDS
	66 mM	DTT
	66 mM	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

Thylakoidfraktionen von *Synechocystis* (12  $\mu$ g Chlorophyll pro Spur), *Arabidopsis* oder Tabak (je 30  $\mu$ g Chlorophyll pro Spur) wurden 3 Min. bei 8.000 x g und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 80  $\mu$ l (Pflanzen) bzw. 50  $\mu$ l (Cyanobakterien) ACA-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 9  $\mu$ l (Pflanzen) bzw. 10  $\mu$ l (Cyanobakterien) 10% Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid wurden die Proben 10 Min. auf Eis solubilisiert. Unsolubilisiertes Material wurde bei 15.000 x g und 4°C für 15 Min. abzentrifugiert und der Überstand mit 5  $\mu$ l Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde üblicherweise in einer Dicke von 0,75 bis 1 mm gegossen und über Nacht bei 100 V, 10°C und mit 1 x Kathodenpuffer 1 laufen gelassen. Sobald die blaue Lauf-front die Mitte des Gels erreicht hatte, wurde der Kathodenpuffer 1 durch 1 x Kathodenpuffer 2 ersetzt und der Gellauf bei 300 V fortgesetzt bis die Komplexe separiert waren.

Für die 2. Dimension wurden einzelne Gelstreifen abgeschnitten, für 20 Min. bei Raumtemperatur in 1 x Denaturierungspuffer inkubiert und auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen, welches stets dicker gegossen wurde, als der Gelstreifen dick war.

## 2.2.9.6 Färbung von PAA-Gelen

### 2.2.9.6.1 Imidazol-Zinkfärbung

0,2 M	Imidazol
0,3 M	Zinksulfat

Diese reversible Färbemethode wurde angewendet, um Proteinbanden vor dem Transfer quantitativ sichtbar zu machen. Dabei wurde das Gel 10 Min. bei Raumtemperatur in 0,2 M Imidazol-Lösung geschüttelt und dann solange in 0,3 M Zinksulfat-Lösung inkubiert bis transparente Proteinbanden auf milchig weißem Hintergrund sichtbar wurden. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt. Das Gel konnte im gefärbten Zustand bei 4°C bis zum Transfer



aufbewahrt werden. Zum Entfärben wurde das Gel solange in 10 x Transferpuffer gelegt, bis die milchige Verfärbung komplett entfernt war.

### 2.2.9.6.2 Silbernitratfärbung

<u>Fixierlösung</u>	50% (v/v)	Ethanol
	12% (v/v)	Essigsäure
	0,05% (v/v)	Formaldehyd (37%)
<u>Imprägnierlösung</u>	0,2% (w/v)	Silbernitrat
	0,075% (v/v)	Formaldehyd (37%)
<u>Entwickler</u>	6% (w/v)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,05% (v/v)	Formaldehyd (37%)
	0,4% (w/v)	Natriumthiosulfat
<u>Stopplösung</u>	50% (v/v)	Ethanol
	12% (v/v)	Essigsäure

Der nicht-quantitative Nachweis von Proteinen erfolgte durch Silbernitratfärbung nach Blum *et al.* (1987). Zum Fixieren der Proteine wurde das Gel 1 Std. in Fixierlösung inkubiert. Um die Essigsäure vollständig zu entfernen, wurde anschließend dreimal 20 Min. in 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einminütigem Baden des Gels in einer 0,02% (w/v) Natriumthiosulfatlösung und dreimal 30 Sek. Waschen in destilliertem Wasser wurde das Gel für 30 Min. im Dunkeln imprägniert. Restliche Imprägnierlösung wurde durch zweimal 30 Sek. Waschen in destilliertem Wasser entfernt und die Proteine wurden im Gel mit Hilfe von Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Nach zufriedenstellender Anfärbung der Proteinbanden wurde die Färbung nach Entfernung der Entwicklerlösung und unmittelbarer Zugabe von Stopplösung beendet.

### 2.2.9.6.3 Coomassiefärbung

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	45% (v/v)	Ethanol
	9% (v/v)	Essigsäure
	0,2% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
<u>Entfärber</u>	45% (v/v)	Ethanol
	9% (v/v)	Essigsäure

Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel 30 Min. in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend so lange entfärbt bis sich die blauen Proteinbanden vom entfärbten Hintergrund abhoben.

### 2.2.9.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen

#### 2.2.9.7.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose/PVDF-Membranen

Proteine können mit Hilfe von Gleichstrom aufgrund ihrer negativen Ladung aus einem Polyacrylamidgel auf eine Polymerschicht übertragen werden. Dazu wurden unterschiedliche Membranen (Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran) mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  und unterschiedliche Transfersysteme verwendet.

#### Western-Transfer in einer Nasszelle

<u>10 x Transferpuffer</u>	1,5	M	Glycin
	0,2	M	Tris-HCl, pH 8,0
	(12 % (v/v)		Methanol)

Für dieses Transfersystem benötigte man vier Whatman-Filterpapiere und eine Transfermembran in der Größe des Gels. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei 45 V für 2 Std. zwischen je zwei Whatman-Filterpapiere in 1 x Transferpuffer in einer Nass-transferapparatur. Zur Erhöhung der Transfereffizienz der Hochmolekulargewichtsproteine konnte dem Transferpuffer 12% Methanol zugesetzt werden.

#### Western-Transfer in einer Halbtrockenzelle

<u>Anode I Puffer</u>	0,3	M	Tris-HCl, pH 8,0
<u>Anode II Puffer</u>	0,025	M	Tris-HCl, pH 8,0
<u>Kathodenpuffer</u>	0,04	M	$\epsilon$ -Aminocapronsäure

Diese Methode wurde unter Verwendung einer diskontinuierlichen Puffersystems (modifiziert nach Khyse-Andersen, 1984) durchgeführt. Das Polyacrylamidgel und die Nitrozellulose-transfermembran wurden 10 Min. in Anode II Puffer vorinkubiert. Drei Lagen in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere wurden auf die Kathodenseite einer Halbtrockenzelle

(PHASE GmbH, Lübeck) gelegt. Darauf wurde luftblasenfrei das Gel platziert und mit der Transfermembran bedeckt. Abschließend wurden zwei mit Anode II Puffer getränkte und drei mit Anode I-Puffer getränkte Whatman-Filterpapiere aufgelegt und darauf die Anodenseite der Halbtrockenzelle platziert. Der Transfer wurde für 2 Std. bei 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Gel ausgeführt.

Zur Fixierung der Proteine wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Transfer für 10 Min. bei 80°C getrocknet. PVDF-Membranen wurden vor dem Transfer in 100% Methanol präinkubiert und mussten nach dem Transfer unbedingt feucht gehalten werden. Eine Fixierung der Proteine über Hitze erfolgte hier nicht.

### 2.2.9.7.2 Western-Analyse mit Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörpern

<u>Blockierungspuffer</u>	1 x	PBS
	5% (w/v)	Magermilchpulver
	1% (v/v)	Tween 20
<u>Waschpuffer</u>	1 x	PBS
	1% (v/v)	Tween 20
<u>Entwicklungslösung I</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	2,5 mM	Luminol (in DMSO)
	0,4 mM	β-Cumarinsäure (in DMSO)
<u>Entwicklungslösung II</u>	100 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	5,4 mM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Zum Absättigen unspezifischer Bindestellen wurde die Membran mind. 1 Std. in Blockierungspuffer auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde die Membran in frischen Blockierungspuffer mit dem spezifischen Antiserum (aus Kaninchen) überführt. Der Antikörper wurde je nach Bindungsaffinität unterschiedlich verdünnt (1 : 1.000 bis 1 : 5.000) und 2 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Zum Entfernen ungebundenen Antikörpers wurde die Membran 4 mal 10 Min. gewaschen und dann für 1 Std. in 1 : 30.000 verdünntem sekundären Antikörper (Meerrettichperoxidase-anti-Kaninchen-Konjugat) hybridisiert. Der sekundäre Antikörper bindet dabei nur an den primären, aus Kaninchen stammenden Antikörper. Auch hier wurde überflüssiger Antikörper durch 4 mal 10 Min. waschen in Waschpuffer entfernt. Zur Entwicklung der Chemilumines-

zuzugabe wurden die beiden Entwicklungslösungen 1 : 1 gemischt und die Membran wurde 1 Min. darin gebadet. Der peroxidase-markierte Antikörper katalysiert die Oxidation des in der Entwicklungslösung I enthaltenen Luminols. Die dabei entstehende Lumineszenz-Signale wurden mit einem Röntgenfilm detektiert. Die Membran wurde dafür in eine transparente Folie gehüllt und der Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Life Science, Freiburg) aufgelegt. Je nach Stärke des Signals dauerte die Exposition wenige Sekunden bis 30 Min. Danach verblasen die Lumineszenz-Signale.

### 2.2.9.7.3 Western-Analyse mit Anti-[HA]-Peroxidase

Bei Verwendung des Anti-[HA]-Peroxidase-Konjugats (Verdünnung 1 : 1.000; Roche Diagnostics, Basel) war ein sekundärer Nachweisschritt nicht notwendig, da der Antikörper direkt mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war. Ansonsten wurde analog zu Abschnitt 2.2.8.6.2 vorgegangen.

### 2.2.9.8 *in vivo*-Proteinmarkierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin bei *Synechocystis*

Zur Analyse der Synthese und Degradierung von cyanobakteriellen Proteinen wurden *Synechocystis*-Kulturen *in vivo* radioaktiv mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert (> 1000 Ci/mmol, Amersham, Freiburg). Dazu wurden die *Synechocystis*-Zellen in flüssigem BG11-Medium bis zu einer Extinktion bei 750 nm von 0,3 bis 0,5 angezogen. Die *Synechocystis*-Kulturen wurden bei 20°C und 5.000 x g 15 Min. abzentrifugiert und in eisenfreiem bzw. eisenhaltigem BG11-Medium resuspendiert (je 40 ml Kultur 250 µl BG11-Medium). Pro 250 µl Zellkultur wurde 12,5 µl (ca. 189 µCi) [<sup>35</sup>S]-Methionin zugegeben und die Zellen wurden bei 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und 30°C für 25 Min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal in BG11-Medium gewaschen, um nicht eingebaute Radioaktivität zu entfernen. Die Zellen wurden in 50 ml eisenhaltiges bzw. eisenfreies BG11-Medium resuspendiert und bei 30°C und 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf dem Schüttelinkubator weiterwachsen gelassen. Nach unterschiedlichen Perioden wurden 5 ml Proben abgenommen, zentrifugiert und zum Stoppen der Reaktion das Sediment sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus den Proben wurden Thylakoidmembranen isoliert und die Proteine durch SDS-PAGE separiert. Nach dem Lauf wurden die Proteine im Gel getrocknet oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Exposition der Radioaktivität erfolgte durch Auflegen einer „phosphoimage“-Platte (Fuji GmbH, Düsseldorf) auf das getrocknete Gel selbst oder auf die Membran. Die „phosphoimage“-Platten wurden mit einem TLA 3000-Phosphoimager gelesen und mit Hilfe der AIDA-Software (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt) bearbeitet.

### 2.2.10 Sauerstoffmessung mit der Clark-Elektrode

Die Fähigkeit photosynthetischer Membranen von *Arabidopsis* zur Bildung von Sauerstoff wurde mit Hilfe der Clark-Elektrode (Hansatech Instruments Ltd., Reutlingen) gemessen. Dazu wurde 0,03 g an Schwachlicht adaptiertes Blattmaterial in kleine Quadrate geschnitten und die Bildung von Sauerstoff unter kontinuierlichem Rühren bei unterschiedlichen Lichtbedingungen (LL:  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; HL:  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Temperaturbedingungen (10, 25 und  $30^\circ\text{C}$ ) gemessen. Vor Beginn jeder Messung wurde die Elektrode kalibriert. Dazu wurde der Nullpunkt der Sauerstoffsynthese durch Berechnung der Differenz von sauerstofffreiem Wasser (Zugabe von Natriumdithionit) zu sauerstoffgesättigtem Wasser bestimmt.

### 2.2.11 Fluoreszenzmessungen

#### 2.2.11.1 77K Fluoreszenzmessung

Zur Analyse der 77K Fluoreszenz wurde ein SPEX Fluorolog-2 Modell F212- Spektrofluorometer (Industries, Inc., USA) verwendet. Unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gewachsenen *Synechocystis*-Zellen wurden auf eine Chlorophyllkonzentration von  $2 \mu\text{g/ml}$  verdünnt, 10 Min. im Dunkeln inkubiert, in eine Kapillare gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Bestimmung der Verteilung der photosynthetischen Komplexe (PSI, PSII) und der Phycobilisomen, bzw. ihrer Energie wurden Emissionsspektren (650 - 800 nm) unter Anregung bei 440 nm (Chlorophyll *a*) und 580 nm (Phycocyanin/ Allophycocyanin) erstellt. Als Referenz diente Wasser bzw. BG11-Medium. Die Parameter für Auflösung (0,1) und Integrationszeit (0,1) wurden innerhalb einer Messperiode beibehalten.

Für die Messungen der Antennenwanderung („state transitions“) bei *Arabidopsis* wurden die Pflanzen 15 Min. mit Blaulicht bzw. Dunkelrotlicht bestrahlt. Thylakoidmembranen wurden in NaF (Inhibitor der Proteinphosphatase) enthaltenem HM-Medium extrahiert und auf eine Chlorophyllkonzentration von  $2 \mu\text{g/ml}$  verdünnt, in Kapillaren gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

#### 2.2.11.2 Fluoreszenzmessungen mit PAM

Für Chlorophyll *a*-Fluoreszenzanalysen wurden Pflanzen gleichen Alters und mit gleichen Wachstumsbedingungen verwendet. Die Messungen der *in vivo*-Chlorophyll *a*-Fluoreszenz wurden bei Raumtemperatur und mittels eines Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometers

(PAM) durchgeführt (Schreiber *et al.*, 1986). Zur Analyse der Daten diente ein PC mit der Wincontrol (Version 1.72)-Software. Für Messungen an Pflanzenmaterial wurden einzelne Blätter für einige Minuten dunkel adaptiert. Nach Belichtung mit aktinischem Licht ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklichtimpulsen ( $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurde die Löschung der Chlorophyllfluoreszenz dokumentiert und anhand verschiedener Parameter der Anteil der photochemischen und der nichtphotochemischen Löschung quantifiziert. Die Grundfluoreszenz wurde durch gepulstes Messlicht angeregt. Durch Auslösen eines sättigenden Weißlichtpulses von  $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurde die maximale Fluoreszenz  $F_m$  ermittelt. Nach 40 Sek. wurde aktinisches Licht zugeschaltet und es wurden 13 sättigende Lichtpulse mit 2 Sekunden Dauer und im 20 Sekunden Intervall gegeben, um die Fluoreszenzparameter zu bestimmen:

$$qP \text{ (photochemische Löschung)} = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0)$$

$$NPQ \text{ (nichtphotochemische Löschung)} = (F_m - F_m') / F_m'$$

$$F_v/F_m \text{ (maximale Quantenausbeute)} = (F_m - F_0) / F_m$$

Diese Fluoreszenzmessung lässt Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand des Photosyntheseapparates der Pflanze zu.  $F_v/F_m$  und  $qP$  geben Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des PSII. Die nichtphotochemische Löschung, NPQ, setzt sich aus drei Teilen zusammen:  $qE$  („de-excitation quenching“);  $qT$  („state transitions“) und  $qI$  (Photoinhibierung). Angeregte Chlorophyllmoleküle können in einen Triplettzustand übergehen und in dieser Form als Radikale auf die Zelle einwirken.  $qE$  dient dazu, die Pflanze durch Bildung des Carotinoids Zeaxanthin (Radikalfänger) vor lichtinduzierten Schäden zu schützen. Überflüssige Energie wird hier als Hitze an die Umgebung abgegeben.  $qT$  umfasst die reversible Phosphorylierung von Proteinen des Lichtsammelkomplexes und damit die Verteilung der Lichtenergie zwischen den Photosystemen.  $qI$  beinhaltet die Inhibierung des PSII durch langfristige starke Energieeinwirkung, wobei es zum Abbau des D1-Proteins kommt.

### 2.2.12 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Herstellung der Pigmentproben und der Laufmittel erfolgte nach Gilmore und Yamamoto (1991).

Lösung A: Acetonitril – Methanol – 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 (72 : 8 : 3)

Lösung B: Methanol – n-Hexan (4 : 1)

Vor der Pigmentextraktion wurden die Pflanzen unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Zur Reduzierung der Zeaxanthinmengen wurden die Pflanzen 12 Std. dunkeladaptiert. Zur lichtinduzierten Zeaxanthinbildung wurden die Pflanzen für 20 Min. bis 4 Std. bei  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Pigmentextraktion erfolgte unter Schwachlicht. 2 – 3 Blätter von jungen Pflanzen wurden in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Hilfe eines motorisierten Mini-Pistills (Fa. Janke und Kunkel) unter Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  100% Methanol (HPLC-rein) homogenisiert. Noch vorhandenes Blattmaterial wurde für 15 Min. bei  $4^\circ\text{C}$  und  $15.000 \times g$  abzentrifugiert. Der Chlorophyll-Gehalt des Pigmentüberstandes wurde in 100% Methanol anhand folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Chlorophyll a: } C_a = 16,72 * E_{665} - 9,16 * E_{652}$$

$$\text{Chlorophyll b: } C_b = 34,09 * E_{652} - 15,28 * E_{665}$$

Alle Messungen wurden mit einer C 18 Brom-Sil 120 ODS-5ST-Säule (Grom Analytik + HPLC GmbH, Rottenburg-Hailfingen) durchgeführt. Die Flussrate von 1,2 ml/Min. und das Injektionsvolumen 20  $\mu\text{l}$  blieben bei allen Messungen konstant.

#### Programm:

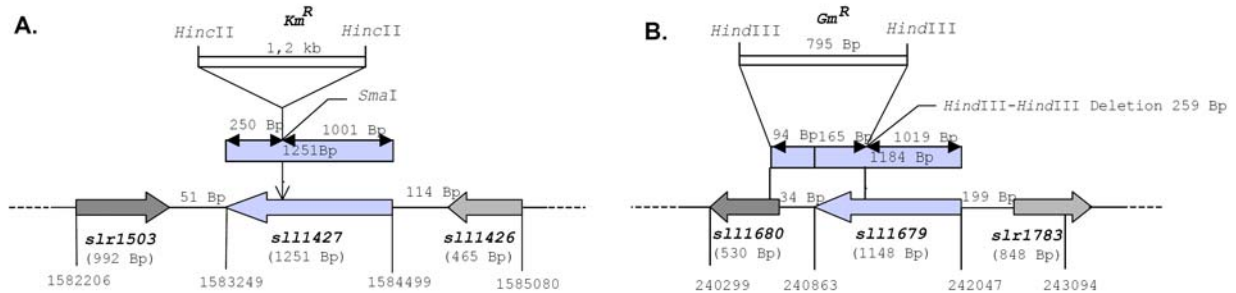
4 Min.	Lösung A	isokratisch
15 Min.	Lösung B	linearer Gradient von 0 – 100%
1 Min.	Lösung B	konstant
4 Min.	Lösung A	Rückspülen von Lösung B auf A
6 Min.	Lösung A	konstant

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Charakterisierung und funktionelle Analyse von *Synechocystis* $\Delta hhoA$ - und $\Delta hhoB$ -Mutanten

##### 3.1.1 Herstellung der $\Delta hhoA$ - und $\Delta hhoB$ -„knock out“-Mutanten

Die Deg-Familie von *Synechocystis* besteht aus drei Mitgliedern: DegP (HtrA), DegQ (HhoA) und DegS (HhoB). Homozygote  $\Delta hhoA$  (*sll1679*)- und  $\Delta hhoB$  (*sll1427*)-Mutanten wurden im Labor von Prof. Dr. S. V. Shestakov (Moskau, Russland) hergestellt. Dabei wurden die Antibiotika-Resistenzkassetten in die entsprechende Peptidase-kodierende Genregion eingefügt und somit die „knock out“-Mutanten erzeugt. Das *sll1427*-Gen wurde durch Insertion einer 1,2 kb großen Kanamycin-Resistenzkassette in die *SmaI*-Restriktionstelle 250 Bp nach dem ATG Startcodon unterbrochen (Abb. 3.1A). Aus dem *sll1679*-Gen wurde der Bereich zwischen zwei *HindIII*-Schnittstellen, die sich 94 Bp vor und 165 Bp nach dem ATG-Startcodon befinden, herausgeschnitten und stattdessen eine 0,8 kb große Gentamycin-Resistenzkassette in diese Schnittstelle eingefügt (Abb. 3.1B). Vom *htrA*-Gen konnte im Labor von Prof. S. V. Shestakov keine homozygote Mutante hergestellt werden. Die Transformation von *Synechocystis*-Zellen mit Insertion- bzw. Deletionskonstrukten ist nach der Methode von Ivleva (2000) durchgeführt worden.



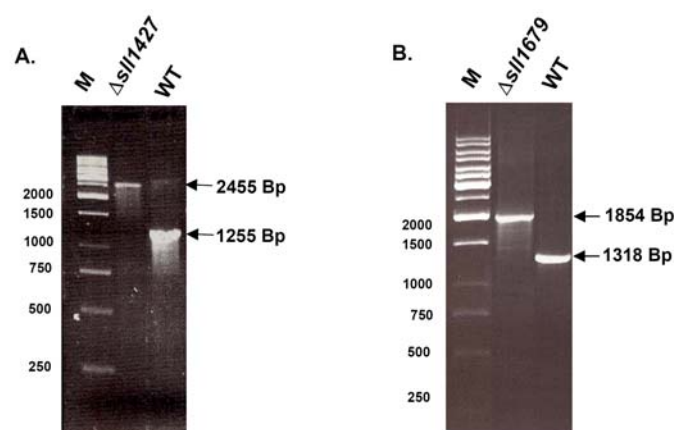
**Abb. 3.1:** „Knock out“-Konstrukte der  $\Delta hhoB$ - (A) und  $\Delta hhoA$ - (B) Mutanten. Die  $\Delta hhoB$  (*sll1427*)-Mutante enthielt eine 1, 2 kb große Kanamycinresistenz-Insertion 250 Bp vor dem Stoppkodon des *sll1427*-Wildtyp-Gens. Zur Konstruktion der  $\Delta hhoA$ -Mutante wurde eine Gentamycin-Resistenzkassette zwischen zwei *HindIII*-Schnittstellen, die sich vor und innerhalb des *sll1679*-Wildtyp-Gens befanden, eingefügt.

##### 3.1.2 Analyse des Genotyps

Zur Überprüfung der Insertion und der Position der Resistenzgenkassetten in den  $\Delta sll1679$ - und  $\Delta sll1427$ -Mutanten wurde jeweils genomische DNS aus Wildtyp und Mutanten mit identischen Oligonukleotidpaaren über den Insertionspunkt hinweg amplifiziert. Wie unter Punkt



3.1.1 beschrieben ist die  $\Delta sll1427$ -Mutante eine reine Insertionsmutante. Bei ihr liegen sowohl Forward (*sll1427\_forw*)- als auch Revers-Oligonukleotid (*sll1427\_rev*) innerhalb des Genbereichs und amplifizieren ein 1255 Bp großes Produkt für den Wildtyp bzw. ein 2455 Bp großes Produkt für die Mutante (Abb. 3.2A).  $\Delta sll1679$  ist eine Deletionsmutante. Da durch die Deletion das Startkodon mit herausgeschnitten wurde, liegt das verwendete Forward-Oligonukleotid *sll1679\_for3* 110 Bp vor dem Genbereich. Zusammen mit dem Revers-Oligonukleotid *sll1679\_rev* ergibt sich ein Amplifikationsprodukt von 1854 Bp (Mutante) bzw. 1318 Bp (Wildtyp, Abb. 3.2B). Bei anschließender Sequenzierung der Amplifikationsprodukte konnte eine vollständige Übereinstimmung mit der vorgegebenen Konstruktsequenz ermittelt werden.



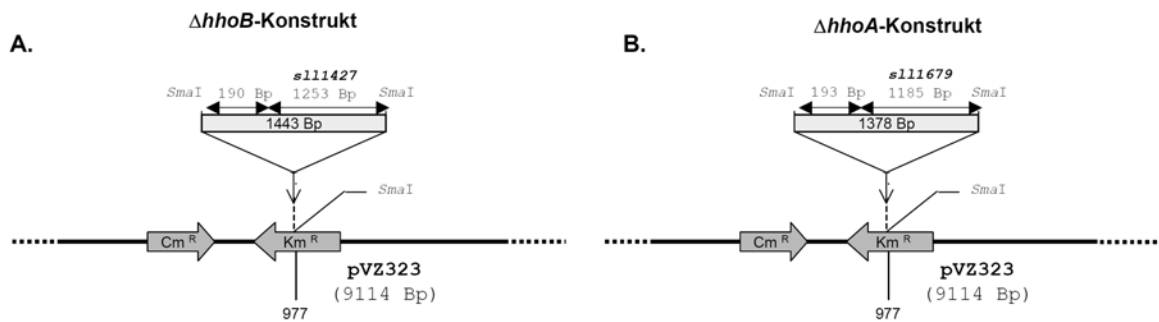
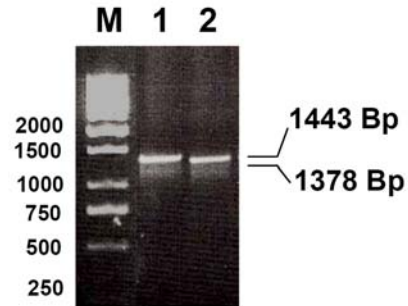
**Abb. 3.2: PCR-Analysen mit DNS der  $\Delta sll1427$ - (A) und  $\Delta sll1679$ - (B) „knock out“-Mutanten.** (A) Das Amplifikationsprodukt der  $\Delta sll1427$ -Mutante war 2455 Bp groß, das Wildtyp-Produkt 1255 Bp. (B) Das Amplifikationsprodukt der  $\Delta sll1679$ -Mutante war 1854 Bp groß, das Wildtyp-Produkt 1318 Bp.

### 3.1.3 Herstellung von $\Delta hhoA$ - und $\Delta hhoB$ -Komplementationsmutanten

Die Deletion eines Gens kann auch Einfluss auf die Expression benachbarter Gene haben. Um sicherzugehen, dass der Phänotyp wirklich von der Deletion des gewünschten Gens und nicht als Nebeneffekt aus Über- oder Unterexpression anderer beeinflusster Gene hervorgeht, wurde eine Komplementationsmutante hergestellt. Dabei wurde das *sll1427*-Gen mit Hilfe des Oligonukleotidpaares *sll1427\_compl\_forw/sll1427\_compl\_rev* (1443 Bp) und das *sll1679*-Gen mit Hilfe des Oligonukleotidpaares *sll1679\_forw\_compl/sll1679\_rev* (1378 Bp) aus genomischer DNS amplifiziert (Abb. 3.3). Das amplifizierte Produkt enthielt die gesamte kodierende Sequenz des gewünschten Gens und noch zusätzlich ca. 190 Bp der 5'-Genregion, welche den Promotorbereich des Gens enthält. Für die PCR wurde eine Pfu-Polymerase verwendet, welche eine saubere Verdoppelung des Komplementärstrangs garantiert und keine zusätzlichen Adeninreste an das 3'-Ende des amplifizierten Gens anhängt. Das Promotor-Genprodukt wurde in die *SmaI*-Schnittstelle des selbst-replizierenden pVZ323 Vektors (mit Cm- und Km-Resistenzgenen) kloniert, womit das

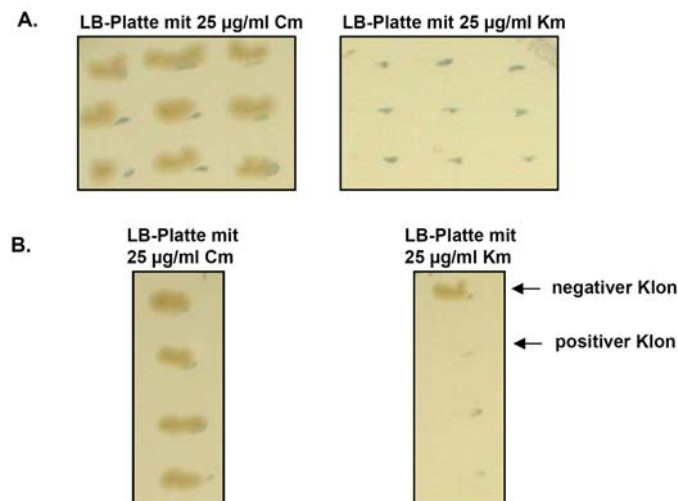
Kanamycin-Resistenzgen unterbrochen wurde (Abb. 3.4A, B) und wie unter Material und Methoden (siehe Abschnitt 2.2.3) beschrieben mit Hilfe eines Helferplasmids in die „knock out“-Mutante konjugiert.

**Abb. 3.3: Amplifikation der *sll1427*- (1) und *sll1679*- (2) Wildtypgene.** Die 1443 Bp und 1378 Bp großen Produkte enthielten die gesamte kodierende Sequenz der Gene und deren Promotorbereich.



**Abb. 3.4: Konstruktion der Komplementations-Vektoren für  $\Delta hhoB$ - (A) und  $\Delta hhoA$ - (B) Mutanten.** Das 1443 Bp große *sll1427* bzw. 1378 Bp große *sll1679*-Wildtypgen mit Promotorbereich wurde aus genomischer DNS amplifiziert und in die *SmaI*-Schnittstelle der Kanamycin-Resistenzkassette des pVZ323-Plasmids kloniert.

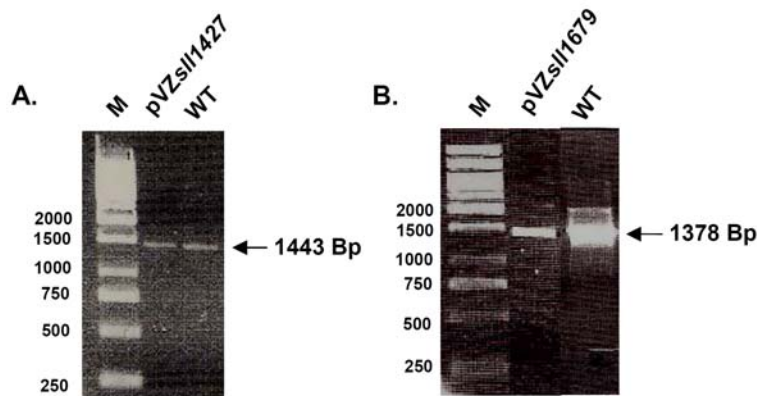
Positive Klone waren Chloramphenicol-resistent und Kanamycin-sensitiv (Abb. 3.5A, B).



**Abb. 3.5: Selektion positiver Klone.** Positive *sll1427*- (A) und *sll1679*- (B) *E. coli* C600-Transformanten wuchsen auf Chloramphenicol-Medium und waren Kanamycin-sensitiv.

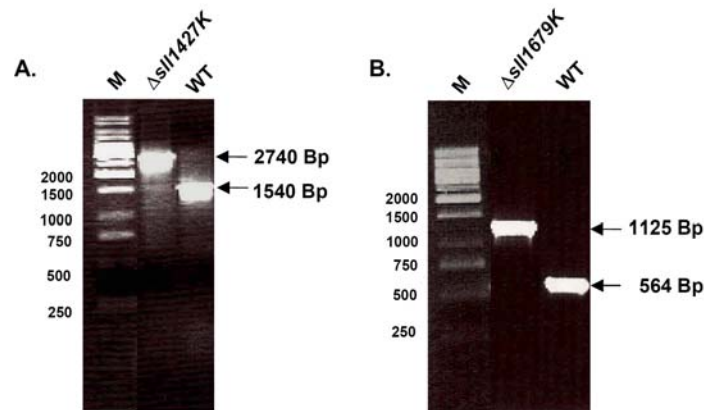
Die Plasmid-DNS positiver Klone wurde mit den oben genannten Oligonukleotidpaaren auf das Vorhandensein der gewünschten Promotor-Genprodukte getestet. Als Kontrolle diente

*Synechocystis*-Wildtyp-DNS (Abb. 3.6A, B). Die Identität der amplifizierten Produkte wurde durch eine Sequenzanalyse verifiziert.



**Abb. 3.6: Amplifikation der *sll1427*- (A) und *sll1679*- (B) Wildtypgene aus den Komplementationskonstrukten *pVZsll1427* und *pVZsll1679*.** Die Größe der PCR-Produkte zeigte, dass die klonierten Genprodukte vollständig im *pVZ323*-Plasmid enthalten waren.

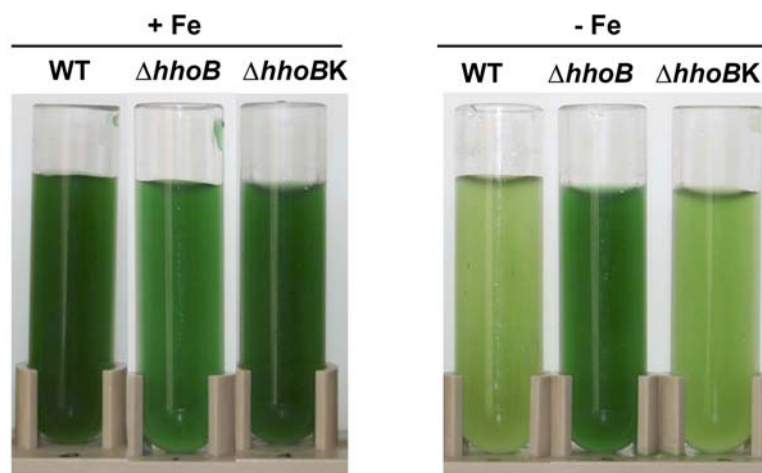
Nach Konjugation des jeweiligen Plasmid-Genkonstruktes in die *Synechocystis-Δsll1427*- bzw. *-Δsll1679*-Mutanten wurde die Komplementation des „knock out“-Gens überprüft. Das neu in die *Synechocystis*-Mutante eingebrachte intakte Gen sollte nicht über homologe Rekombination in das Genom eingebaut werden (Abb. 3.7A, B). Dazu wurde die DNS der *Δsll1427*-Komplementationsmutante mit dem *sll1427\_compl\_for2/sll1427\_compl\_rev* und die *Δsll1679*-Komplementationsmutante mit dem *sll1679\_for2\_compl/sll1679\_rev1* Oligonukleotidpaar amplifiziert. Die Forward-Oligonukleotide können nur an genomische DNS binden, denn sie liegen außerhalb des Bereichs, der in das Plasmid kloniert wurde. Ist die Kanamycin- bzw. Gentamycin-Resistenzkassette noch auf dem Genom vorhanden, dann werden Produkte mit 2740 Bp (für *Δsll1427*) und 1125 Bp (für *Δsll1679*) Größe erwartet. Als Kontrolle wurde Wildtyp-DNS mit den gleichen Oligonukleotiden amplifiziert. Hier werden Produkte mit 1540 Bp (für *Δsll1427*) und 564 Bp (für *Δsll1679*) erwartet (Abb. 3.7A, B).



**Abb. 3.7: PCR-Analyse der *Synechocystis*-Komplementationsmutanten *Δsll1427K* (A) und *Δsll1679K* (B).** Die verwendeten „primer“ konnten nur genomische DNS amplifizieren. Die PCR-Produktgrößen von 2740 Bp bzw. 1125 Bp zeigten, dass die Resistenzkassetten noch im Genom der Komplementationsmutanten *Δsll1427K* bzw. *Δsll1679K* vorhanden waren. Im Wildtyp wurden nur Produkte von 1540 Bp bzw. 564 Bp amplifiziert.

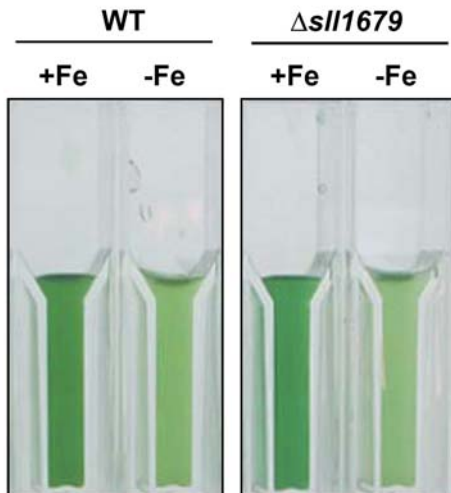
### 3.1.4 Phänotypische Charakterisierung

Um den Einfluss von Nährstoffmangel auf den Phänotyp von Wildtyp und Peptidase-„knock out“-Mutanten zu bestimmen, wurden einfache Wachstumsanalysen unter Fehlen verschiedener Nährstoffe von E. Pojidaeva (2004) durchgeführt. Dabei blieb die  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel grün, während der Wildtyp unter gleichen Bedingungen ausbleicht (Sokolenko *et al.*, 2002). Der Phänotyp von Wildtyp,  $\Delta sll1679$ - ( $\Delta hhoA$ ) und  $\Delta sll1427$ - ( $\Delta hhoB$ ) Mutanten wurde unter Standardbedingungen (BG11-Medium,  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ) und unter Eisenmangel (BG11-Medium ohne Eisen,  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ) genauer analysiert. Bei Wachstum unter Standardbedingungen konnten optisch keine signifikanten phänotypischen Unterschiede erkannt werden. Nach sieben Tagen Wachstum unter Eisenmangel zeigten der Wildtyp und die  $\Delta sll1427$ -Komplementationsmutante im Gegensatz zur  $\Delta sll1427$ -Mutante jedoch ein Ausbleichen der Zellkultur. Das Ausbleichen der  $\Delta sll1427$ -Komplementationsmutante spricht dafür, dass der Phänotyp vom gewünschten ausgeschalteten Gen (*sll1427*) resultiert (Abb. 3.8).

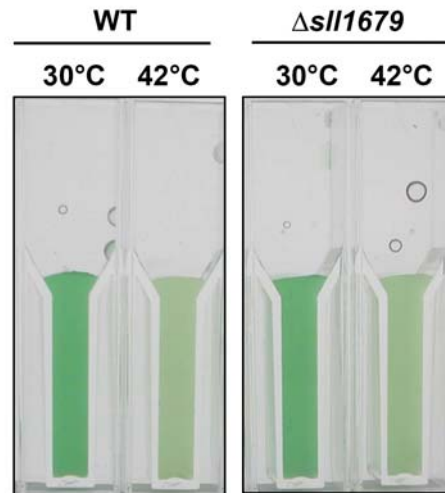


**Abb. 3.8: Phänotypische Charakterisierung des Wildtyps und der  $\Delta sll1427$ -Mutante ( $\Delta hhoB$ ) und Komplementationsmutante ( $\Delta hhoBK$ ).** Phänotyp von *Synechocystis*-Wildtyp und -Mutantenzellen nach Wachstum unter Standardbedingungen (+Fe) bzw. nach sieben Tagen Eisenmangel (-Fe).

Die  $\Delta sll1679$ -Mutante zeigte keinerlei Phänotyp unter Eisenmangel (Abb. 3.9). Da jedoch die bakteriellen Deg-Mitglieder Hitzeschockproteasen sind, wurde die  $\Delta sll1679$ -Kultur unter Hitzestress kultiviert (Abb. 3.10). Jedoch konnte bei der Kultivierung von Wildtyp und  $\Delta sll1679$ -Mutante unter Hitzestress ( $40^\circ\text{C}$ ; 2 Tage) keine phänotypischen Unterschiede nachgewiesen werden. In Abbildung 3.10 ist das Ausbleichen beider Kulturen zu sehen. Experimente unter Hitzestress wurden nicht weiter fortgeführt.



**Abb. 3.9: Phänotypanalysen unter Eisenmangel.** Vergleich des Phänotyps von Wildtyp und  $\Delta sll1679$ -Mutante nach Wachstum unter Standardbedingungen (+Fe) und nach sieben Tagen Eisenmangel (-Fe).



**Abb. 3.10: Phänotypanalysen unter Hitzestress.** Vergleich des Phänotyps von Wildtyp und  $\Delta sll1679$ -Mutante nach Wachstum unter Standardbedingungen (30°C) und nach zwei Tagen Hitzestress (42°C).

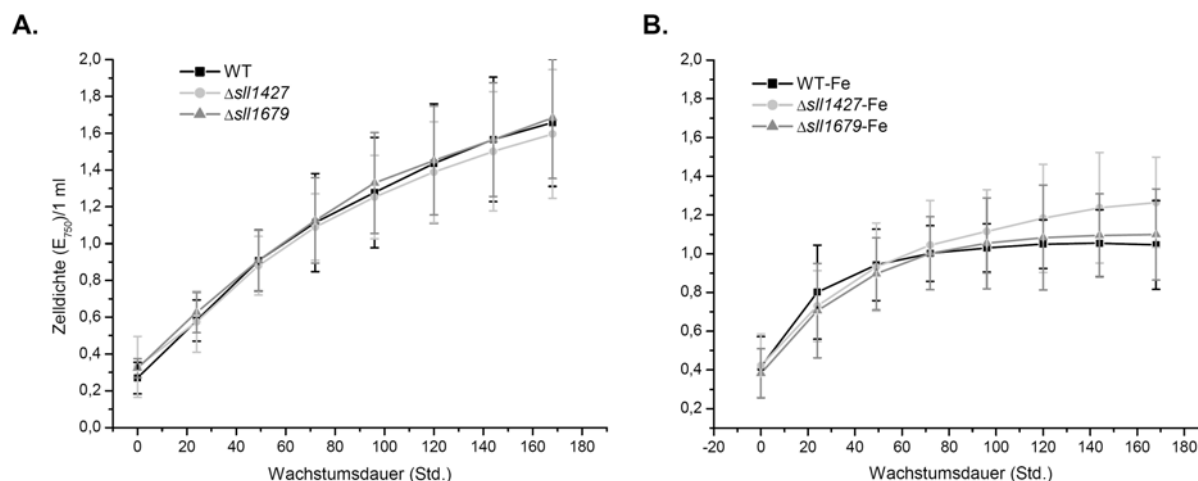
### 3.1.4.1 Wachstumsrate

Unter Standardbedingungen zeigten sowohl Wildtyp, als auch beide Mutanten keinen Unterschied hinsichtlich der Wachstumsrate. Nach sieben Tagen Wachstum in BG11-Medium erreichten alle Kulturen eine Extinktion ( $E_{750}$ ) von ca. 1,6. Die Verdopplungszeit innerhalb der log-Phase lag beim Wildtyp bei 20,5 Std. und bei der  $\Delta sll1679$ -Mutante bei 23,8 Std. Bei der  $\Delta sll1427$ -Mutante war sie mit 31 Std. 1,5-fach höher als beim Wildtyp (Tabelle 3.1). Die  $\Delta sll1427$ -Mutante benötigte für die Verdopplung in der log-Phase mehr Zeit, erreichte aber nach acht Tagen Wachstum nahezu die gleiche Extinktion wie der Wildtyp und die  $\Delta sll1679$ -Mutante (Abb. 3.11A).

Bei Wachstum unter Eisenmangel zeigten alle Kulturen unterschiedliche Ergebnisse. Während die Verdopplungszeiten der log-Phase bei Wildtyp und  $\Delta sll1679$ -Mutante um 34 bzw. 28% anstiegen, stiegen sie bei der  $\Delta sll1427$ -Mutante lediglich um 19% an. Der Wildtyp hatte mit 27,5 Std. die schnellste Verdopplungszeit (Tabelle 3.1). Nach 48 Std. ging das Wachstum von Wildtyp und  $\Delta sll1679$ -Mutante in eine Plateauphase über und kam nur knapp über eine  $E_{750}$  von 1,0 bzw. 1,1 hinaus. Nach 6 Tagen Wachstum in BG11-Medium ohne Eisen sank die  $E_{750}$  leicht ab. Zellen wurden bereits abgebaut (Abb. 3.11B). Die  $\Delta sll1427$ -Mutante wuchs nach dem dritten Tag in eisenfreiem Medium schneller als der Wildtyp und erreichte nach sieben Tagen eine Extinktion von 1,3. Der Wildtyp und die  $\Delta sll1679$ -Mutante zeigten im Vergleich zu der  $\Delta sll1427$ -Mutante hinsichtlich Wachstumsrate und Verdopplungszeit eine sehr starke Anpassung an das eisenfreie Medium.

**Tabelle 3.1. Phänotypische Charakterisierung von Wildtyp und Mutantenlinien.** Bestimmung der Verdopplungszeit, Zellzahl und Pigmentkonzentration von Wildtyp,  $\Delta sll1427$ - und  $\Delta sll1679$ -Linien unter Standardbedingungen und nach 7 Tagen Eisenmangel (-Fe).

nach 8 Tagen Wachstum	Verdopplungszeit (in Std.)	Zellzahl (in 1 ml bei $E_{750}$ 1,0)	Phycocyanin ( $\mu\text{g/ml}$ bei $E_{750}$ 1,0)	Chlorophyll a ( $\mu\text{g/ml}$ bei $E_{750}$ 1,0)	Carotinoide ( $\mu\text{g/ml}$ bei $E_{750}$ 1,0)
Wildtyp	20,5	$3,82 \times 10^7$	$0,18 \pm 0,03$	$5,36 \pm 0,89$	$1,87 \pm 0,17$
Wildtyp -Fe	27,5	$3,61 \times 10^7$	$0,10 \pm 0,05$	$2,55 \pm 1,00$	$1,14 \pm 0,29$
$\Delta sll1427$	31	$2,85 \times 10^7$	$0,16 \pm 0,09$	$4,89 \pm 0,60$	$1,87 \pm 0,16$
$\Delta sll1427$ -Fe	37	$3,80 \times 10^7$	$0,14 \pm 0,09$	$4,15 \pm 1,30$	$1,54 \pm 0,23$
$\Delta sll1679$	23,8	$3,10 \times 10^7$	$0,17 \pm 0,04$	$4,77 \pm 1,67$	$1,71 \pm 0,10$
$\Delta sll1679$ -Fe	30,5	$3,34 \times 10^7$	$0,09 \pm 0,06$	$2,36 \pm 1,05$	$1,13 \pm 0,25$



**Abb. 3.11: Wachstumsrate von Wildtyp,  $\Delta sll1427$ - und  $\Delta sll1679$ -Mutanten unter Standardbedingungen und Eisenmangel.** Die Zellen wuchsen sieben Tage unter Standardbedingungen (A) bzw. unter Eisenmangel (B). Alle 24 Std. wurde die Zelldichte bei 750 nm gemessen.

### 3.1.4.2 Pigmentkonzentrations- und Zellzahlbestimmung

Die Phycocyanin- und Carotinoidkonzentrationen waren in allen Kulturen vergleichbar. Lediglich die Chlorophyll a-Konzentration war im Wildtyp unter Standardbedingungen etwas höher als bei den Mutanten, woraus eine intensivere Grünfärbung des Wildtyps resultierte (Abb. 3.8). Unter Eisenmangel zeigte sich sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta sll1679$ -Mutante ein vergleichbarer Abbau an Phycocyanin, Chlorophyll a und Carotinoiden (Tabelle 3.1). Die Chlorophyll a- und Phycocyaninkonzentration wurde bei beiden nahezu halbiert. Die Carotinoidkonzentration sank um 40% beim Wildtyp und um 34% bei der  $\Delta sll1679$ -Mutante. Die Pigmentkonzentrationen der  $\Delta sll1427$ -Mutante veränderten sich im Vergleich zu denen

unter Standardbedingungen kaum. Hier nahmen die Konzentrationen lediglich um 12 bis 17% ab.

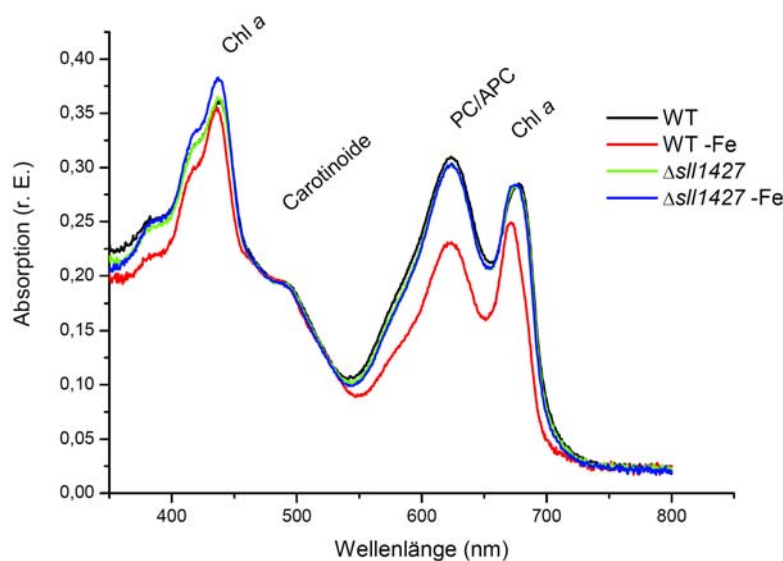
Die in Tabelle 3.1 aufgeführte Anzahl an Zellen in 1 ml-Kultur bei einer  $E_{750}$  von 1,0 gibt Aufschluss über die Größe der Zellen in einer Kultur. Weniger Zellen bei gleicher  $E_{750}$  und gleichem Volumen sprechen für einen größeren Zelldurchmesser. Die Zellen wurden jeweils nach sieben Tagen Wachstum in eisenfreiem bzw. eisenhaltigem BG11-Medium gezählt. Die Zellzahl des Wildtyps und der  $\Delta sll1679$ -Mutante wurde dabei kaum durch den Mangelstress beeinflusst. Hingegen nahm die Anzahl der Zellen bei der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel drastisch zu (Tabelle 3.1).

### 3.1.5 Spektroskopische Charakterisierung

#### 3.1.5.1 Absorptionsspektren

Die Proteine der Photosynthesemembran binden unterschiedliche Pigmente. Phycocyanin und Allophycocyanin sind die Pigmente der cyanobakteriellen Lichtsammelfallen, der Phycobilisomen. Carotinoide und Chlorophyll *a* sind in unterschiedlichen Mengen an die Proteine der Photosysteme gebunden und wirken hier zusätzlich als Sammler und Weiterleiter von Lichtenergie, aber ebenso als Licht-„Quencher“ (Carotinoide), welche Überschussenergie unschädlich machen. Pigmente absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und besitzen daher die unterschiedlichsten Farben. Werden Proteine abgebaut, dann werden die Pigmente ins Cytosol entlassen, wo sie relativ zügig gebunden und abgebaut werden, um ein toxisches Niveau in der Zelle zu vermeiden. Anhand von Absorptionsspektren lassen sich die unterschiedlichen Mengen an Pigmenten und ihr Verhältnis zueinander bestimmen. Die Absorptionsspektren von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante wurden unter Standardbedingungen und nach Wachstum unter Eisenmangel gefahren und auf die Zelldichte (gemessen anhand der Extinktion bei 750 nm) normalisiert (Abb. 3.12). Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigte das Absorptionsspektrum der  $\Delta sll1427$ -Mutante keine reproduzierbaren signifikanten Unterschiede gegenüber dem des Wildtyps. Nach sieben Tagen Wachstum unter Eisenmangel zeigte der Wildtyp (WT-Fe) im Vergleich zur Mutante ( $\Delta sll1427$ -Fe) einen starken Pigmentabbau. Die Pigmente der Phycobilisomen, Phycocyanin und Allophycocyanin, waren davon am stärksten betroffen. Auch der Chlorophyll *a*-Gehalt war deutlich gesunken, was an beiden Absorptionsmaxima für Chlorophyll *a* bei 435 und 675 nm zu erkennen war. Das Carotinoid-Maximum ist in beiden Wildtypen (+/- Fe) gleich, was für einen langsameren Abbau der Carotinoide unter Eisenmangel sprechen könnte. Zudem war in Abb. 3.12 eine Verschiebung des 675 nm-

Chlorophyll *a*-Maximums bei Wildtyp unter Eisenmangel um 5 nm in den kurzwelligen Bereich zu erkennen (Guikema und Sherman, 1983b). Bei dem Maximum der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel ( $\Delta sll1427$ -Fe) fehlt eine solche Verschiebung in den kurzwelligen Bereich. Das restliche Absorptionsspektrum der eisenfrei gewachsenen  $\Delta sll1427$ -Mutante unterschied sich kaum von dem der unter Standardbedingungen gewachsenen. Das Chlorophyll *a*-Maximum bei 435 nm war in der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel im Vergleich zur im vollen BG11-Medium gewachsenen  $\Delta sll1427$ -Mutante etwas erhöht. Die Mutante baute unter Eisenmangel innerhalb von sieben Tagen keine Pigmente ab. Dies konnte schon bei der Bestimmung der Pigmentkonzentrationen (siehe Punkt 3.1.3.2, Tabelle 3.1) gezeigt werden.



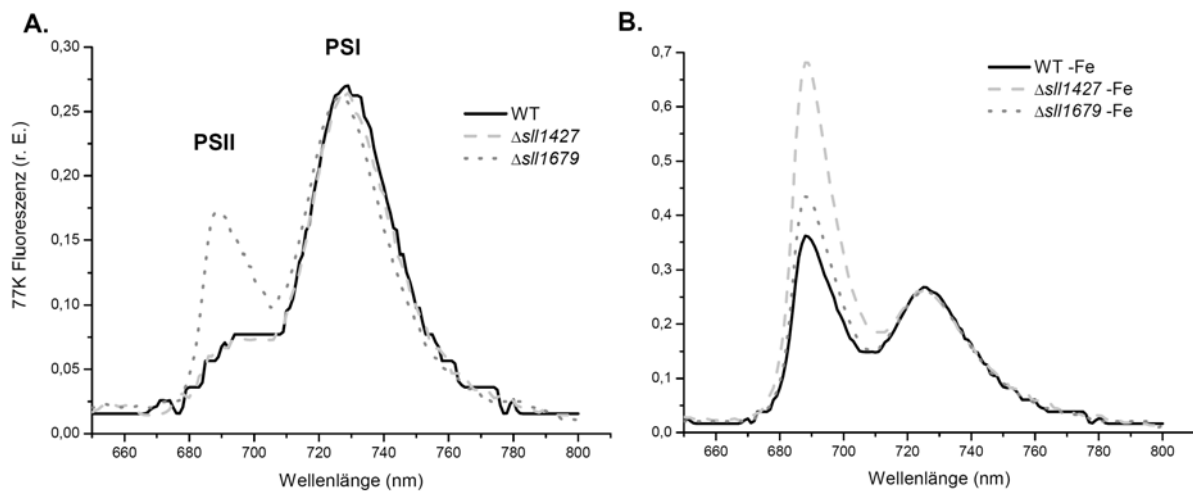
**Abb. 3.12: Absorptionsspektren von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante.** Die *Synechocystis*-Zellen wurden nach sieben Tagen Wachstum unter Standardbedingungen bzw. Eisenmangel auf eine  $E_{750}$  von 0,5 verdünnt und die Pigmentabsorption von 350 bis 800 nm gemessen. Die Spektren wurden auf die Zelldichte bei 750 nm normalisiert.

### 3.1.5.2 77K Fluoreszenzspektren

Die Funktionalität der Photosysteme I und II hinsichtlich ihres Energietransfers und der Verteilung ihrer Antennen wurde in Wildtyp und beiden Mutanten durch 77K Fluoreszenzmessungen analysiert. Die *Synechocystis*-Zellen ( $2 \mu\text{g Chl./ml}$ ) wurden in Glaskapillaren in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 440 nm (Chlorophyll *a*) angeregt. Das Fluoreszenz-Emissionsspektrum zeigte drei typische Maxima bei 685 nm (Chlorophyll-Antenne von PSII), 695 nm (CP47 des PSII) und 725 nm (PSI Chlorophyll-Proteinkomplex) (Liu *et al.*, 2005; Abb. 3.13A, B). Das Maximum bei 695 nm ist dabei oft nur als Schulter der Maxima bei 685 nm erkennbar. Diese Maxima zeigen die Fluoreszenzemission der PSII (685 und 695 nm) und PSI (725 nm) (Nakatani *et al.* 1984; van Dorssen *et al.* 1987; Haag *et al.*, 1993). Die Emissions-Fluoreszenzspektren wurden unter Standardbedingungen (Abb. 3.12A) und nach



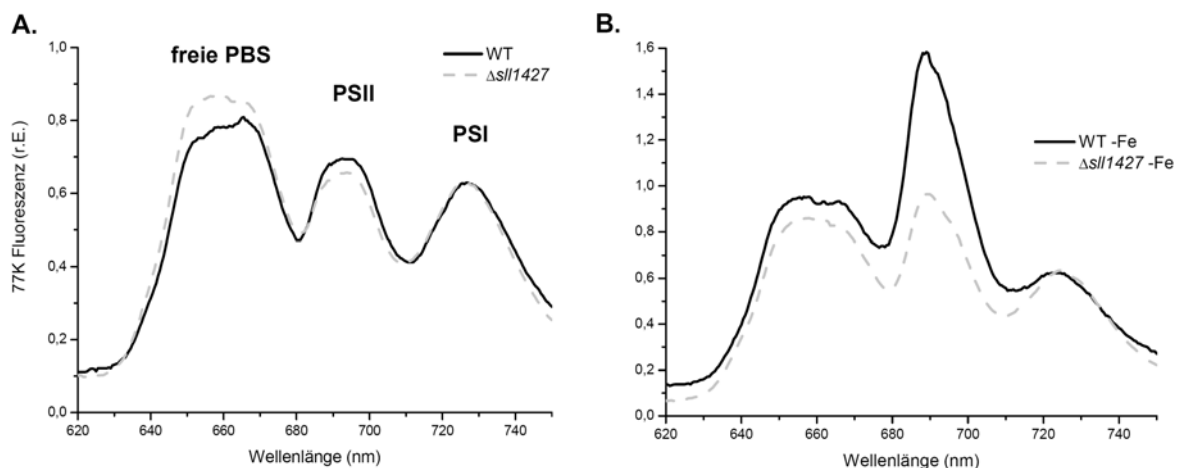
Wachstum unter Eisenmangel (Abb. 3.13B) durchgeführt und auf das PSI-Maximum normalisiert. Das Emissionsspektrum der  $\Delta sll1679$ -Mutante zeigte ein höheres PSII-Maximum im Verhältnis zu PSI als der Wildtyp und die  $\Delta sll1427$ -Mutante bei Wachstum unter Standardbedingungen. Das könnte auf eine höhere Menge an PSII aber auch einer geringeren Menge an PSI hinweisen (Abb. 3.13A). Für die Emissionsspektren unter Eisenmangel wurden *Synechocystis*-Zellen sieben Tage in BG11-Medium ohne Eisen kultiviert und vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff 10 Min. dunkel adaptiert. Die Anregung erfolgte ebenfalls bei 440 nm. Alle Kulturen zeigten eine höhere PSII/PSI-Fluoreszenzrate als bei Wachstum unter normalen Bedingungen (Abb. 3.13B). Unter Eisenmangel zeigte die  $\Delta sll1427$ -Mutante ein doppelt so hohes PSII-Fluoreszenzmaximum wie der Wildtyp.



**Abb. 3.13: 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren von Wildtyp,  $\Delta sll1427$ - und  $\Delta sll1679$ -Mutanten nach Anregung bei 440 nm (Chlorophyll a).** Die Zellen wurden sieben Tage unter Standardbedingungen (A) bzw. Eisenmangel (B) kultiviert. Die Kulturen wurden auf eine Chlorophyllkonzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Spektren wurden auf das PSI-Maximum (bei 725 nm) normalisiert.

Die Verteilung der Phycobilisomen in einer Zellkultur kann durch Anregung der PC/APC bei 580 nm bestimmt werden. Die Spektren wurden dabei auf das PSI-Maximum normalisiert (Abb. 3.14A, B). Das Emissionsspektrum besteht aus drei deutlichen Einzel-Maxima: wie bereits beschrieben resultieren zwei der Maxima von der Emission der an PSII (695 nm) und PSI (725 nm) gebundenen Phycobilisomen. Der dritte, zusätzliche Maximum von 650 bis 670 nm resultiert von der Emission der freien, nicht an PSII oder PSI gebundenen Phycobilisomen. Die Emissionsspektren von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante zeigten, dass die meiste Lichtenergie von den freien, nicht an Photosysteme gebundene Phycobilisomen emittiert wurde (Abb. 3.14A). Darüber hinaus schien der Energietransfer der Antennen auf das PSII im Wildtyp etwas höher zu sein als in der  $\Delta sll1427$ -Mutante. Analog dazu zeigte die Mutante eine stärkere Fluoreszenz der freien Phycobilisomen als der Wildtyp (Abb. 3.14A). Die gleichen Spektren wurden von Kulturen, die sieben Tage unter Eisenmangel kultiviert

wurden, gemessen (Abb. 3.14B). Das Fluoreszenzverhältnis von PSII zu PSI ist in beiden Kulturen gestiegen, wobei die Wildtypkultur ein höheres PSII-Maximum relativ zu PSI zeigte. Das PSI ist stärker vom Abbau betroffen. Unter Eisenmangel ist die Fluoreszenz von PSII und der PBS relativ zu PSI im Wildtyp verglichen mit der Mutante gestiegen. Die Zunahme des PSII/PSI-Verhältnisses kann für eine Zunahme der PSII-Menge bzw. Abnahme der PSI-Menge an sich sprechen oder aber für eine Zunahme (Abnahme) der an PSII (PSI) gebundenen PBS. Eine Zunahme der freien PBS wird ausgeschlossen, da in Tabelle 3.1 im Wildtyp ein Abbau der Phycobilisomen unter Eisenmangel verzeichnet ist. Bei Anregung unter 440 nm zeigten Wildtyp und  $\Delta slI1427$ -ohne Eisen eine deutliche Zunahme des PSII-Maximums (Abb. 3.12B). Jedoch kann man daraus nicht eine wirkliche Zunahme der PSII-Menge ermitteln, da das Maximum durch die IsiA-Absorption überdeckt wird. Ein Vergleich der Spektren bei 580 nm und 440 nm ist somit hinsichtlich des PSII/PSI-Mengenverhältnisses nicht möglich.



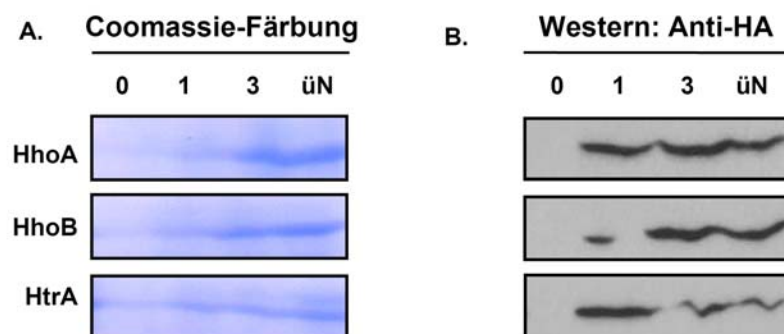
**Abb. 3.14: 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren von Wildtyp und  $\Delta slI1427$ -Mutante nach Anregung bei 580 nm (Phycocyanin).** Die Zellen wurden sieben Tage unter Standardbedingungen (A) bzw. Eisenmangel (B) kultiviert. Die Kulturen wurden auf eine Chlorophyllkonzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Spektren wurden auf das PSI-Maximum (bei 725 nm) normalisiert.

### 3.1.6 Biochemische Analysen von Wildtyp und $\Delta hhoB$ - und $\Delta hhoA$ -Mutanten

#### 3.1.6.1 Proteinüberexpression und Antikörperherstellung

Um die Funktion eines Proteins beschreiben zu können, wurde als erstes dessen Lokalisierung bestimmt. Um die genaue Lokalisierung der HhoA-, HhoB- und HtrA-Proteine festzustellen, sollten spezifische Antiseren hergestellt werden. Dazu wurden die Gensequenzen in einen Vektor (pIVEX2.6d) kloniert, der in *E. coli*-Zellen transformiert wurde. Der Vektor enthielt einen eigenen T7-Promoter und ein „Hemagglutinin (HA)-Tag“. Nach Zugabe von IPTG konnte die Expression des Vektors induziert werden. Das gewünschte Protein wurde in

den *E. coli*-Zellen überexprimiert (siehe Material und Methoden). Das zusammen mit dem gewünschten Protein abgelesene „HA-Tag“ diente der späteren Identifizierung. Das Protein wurde aus *E. coli* extrahiert und auf einer SDS-PAGE getrennt. Ein Teil des Gels wurde für eine Western-Analyse auf eine Membran transferiert, der andere Teil mit Coomassie gefärbt. Bereits nach einer Stunde war das überexprimierende Protein in der Coomassie-Färbung sichtbar und die Proteinmenge stieg im weiteren Verlauf stetig an (Abb. 3.15A). Um sicher zu gehen, dass es sich wirklich um das gewünschte Protein handelte, wurde eine Western-Analyse durchgeführt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran konnte das Protein über Anti-[HA]-Antikörper lokalisiert werden (Abb. 3.15B). Die Größe des Proteins veränderte sich durch die zusätzliche Ablesung des „HA-Tags“ (80 Bp) nicht.



**Abb. 3.15: Überexpression der HhoA-, HhoB- und HtrA-Proteine.** Die Sequenzen der entsprechenden Gene wurden in den pVEX2.6-Vektor kloniert und die Ablesung der Gene mit IPTG induziert. Proben wurden nach 1, 3 und 16 Std. genommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Überexpression wurde mittels Coomassiefärbung (A) bzw. Western-Analyse mit Anti-[HA]-Antikörper (B) sichtbar gemacht.

Da die Aufreinigung der Proteine und die Anfertigung von spezifischen Antisera recht zeitaufwendig ist, wurden die Antikörper gegen proteinspezifische *in vitro* synthetisierte Peptide für HhoA, HhoB und HtrA bei der Fa. Pineda hergestellt.

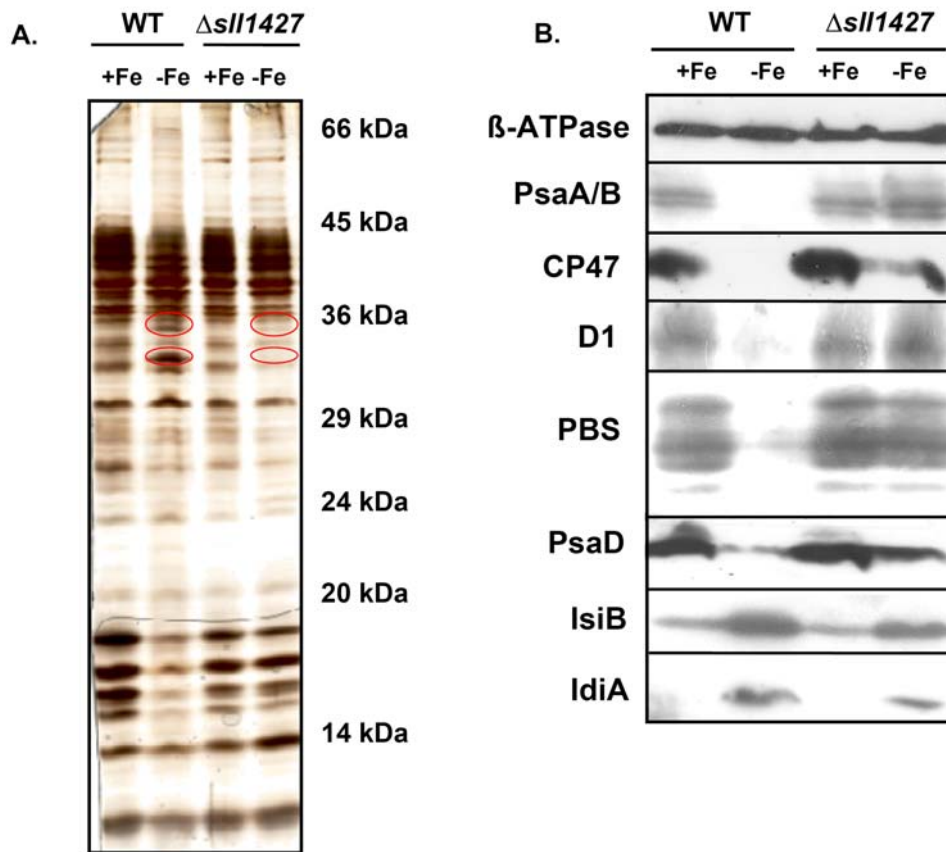
### 3.1.6.2 Abbau photosynthetischer Proteine unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel

Die Pigmentkonzentrationsbestimmungen und 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren haben gezeigt, dass sich die  $\Delta sll1427$ -Mutante vom Wildtyp bei Wachstum unter Eisenmangel stark unterscheidet. Unter Eisenmangel blieben die Pigmentkonzentrationen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp nahezu unverändert (Tabelle 3.1), was für einen fehlenden Abbau der pigmentbindenden Proteine der Photosysteme I und II sprach. Außerdem zeigte das 77K Emissionsspektrum der Mutante unter Eisenmangel ein stark erhöhtes PSII-Maximum (Abb. 3.13B), der aus der Bildung von IsiA resultieren könnte. Jedoch fehlte im Absorptionsspektrum der Mutante unter Eisenmangel die typische Blau-Verschiebung des Chlorophyll *a*-

Maximums in den kurzweiligen Bereich bei Anwesenheit von IsiA (Abb. 3.12). Sowohl die Menge von PSI und II und der Antennen, als auch die Anwesenheit von IsiA wurden immunologisch mit verschiedenen Antisera, die gegen Untereinheiten von PSI, PSII und der Antennen und gegen IdiA- und Flavodoxin- (IsiB) Proteine angefertigt wurden, bestimmt. Flavodoxin ist ein lösliches Protein, dessen Gen zusammen mit dem *isiA*-Gen in einem Operon lokalisiert ist, und durch den gleichen Repressor reguliert wird. IdiA ist ein Membranprotein, welches bereits unter schwacher Eisenlimitierung hochreguliert wird und das PSII so modifiziert, dass die Akzeptorseite geschützt wird.

Thylakoidmembranen von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel wurden in einem 12%-igen SDS-PAGE separiert und die aufgetrennten Proteine mit Silbernitrat angefärbt. Wie zu erwarten ging die Proteinkonzentration, wie z. B. die der Phycobilisomen, im Wildtyp nach sieben Tagen Eisenmangel allgemein zurück. Dagegen wurden einzelne Proteine im Wildtyp unter Eisenmangel gezielt stärker exprimiert, während dieselben Proteine in der Mutante nicht oder nur schwach detektierbar waren (Abb. 3.16A).

Zur Immunodetektion wurden Thylakoidmembranen und Cytoplasma von Wildtyp und der  $\Delta sll1427$ -Mutante, die unter normalen Bedingungen und unter Eisenmangel gewachsen waren, extrahiert und durch eine 12,5%-ige SDS-PAGE separiert. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper immunologisch detektiert (Abb. 3.16B). Die Western-Analysen haben gezeigt, dass unter Eisenmangel in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp photosynthetische, pigmenttragende Proteine nicht oder weniger stark abgebaut wurden. Von PSI wurden drei Proteine, PsaA/B und PsaD, getestet. PsaD wurde bei der  $\Delta sll1427$ -Mutante zu ca. 50% abgebaut, PsaA/B dagegen erfährt keinen sichtbaren Abbau. Ähnlich verhielt es sich bei Proteinen des PSII: D1 wurde bei der Mutante nicht sichtbar abgebaut, CP47 hingegen wiederum zu 50%. Im Wildtyp waren nach sieben Tagen Eisenmangel nahezu alle getesteten Proteine unter die Nachweisgrenze abgebaut. Lediglich PsaD war nur um 80% reduziert (Abb. 3.16B). Als Mengenkontrolle für den Auftrag diente die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, die bei Eisenmangel normalerweise nicht vom Abbau betroffen ist. Diese immunologischen Analysen zeigten nur die momentanen Mengen der photosynthetischen Proteine, gaben aber keine Auskunft über Proteinsynthese oder deren Degradierung. Das IsiB-Protein war unter Eisenmangel sowohl bei Wildtyp als auch Mutante stark hochreguliert, wurde aber auch unter Standardbedingungen in geringer Menge gebildet (Abb. 3.16B). Die Mutante hat also keine Probleme mit der Bildung von IsiA, was auch das 77K Emissionsspektrum aus Abb. 3.13B zeigt. Ebenso funktioniert die Synthese des IdiA-Proteins zum Schutz des PSII in Wildtyp und Mutante.

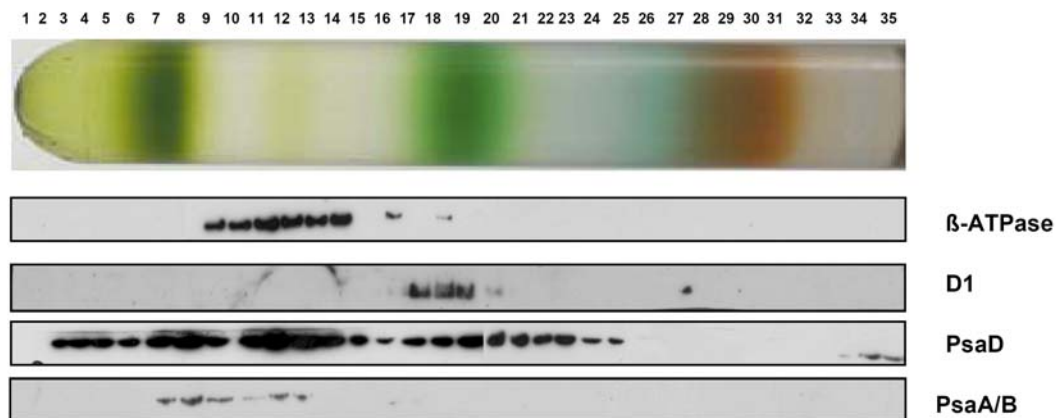


**Abb. 3.16: Silberfärbung (A) und Western-Analyse (B) von Wildtyp- und  $\Delta sll1427$ -Thylakoidmembranen bzw. -Zellextrakten.** *Synechocystis*-Zellen wurden sieben Tage unter Standardbedingungen und Eisenmangel kultiviert. (A) Thylakoidmembranen wurden extrahiert und mittels SDS-PAGE separiert und mit Silber gefärbt. Die roten Markierungen bezeichnen Proteine, die unter Eisenstress (-Fe) im WT induziert werden, während sie unter Standardbedingungen und Eisenstress in der Mutante nicht vorhanden sind. (B) In einer SDS-PAGE aufgetrennte Zellextrakte aus WT und Mutanten wurden mit entsprechenden Antikörpern die  $\beta$ -ATPase-, PsaA/B-, CP47-, D1-, PBS-, PsaD-, IsiB- und IsiA-Proteine nachgewiesen.

### 3.1.6.3 Isolierung photosynthetischer Membrankomplexe durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Um eventuell Unterschiede in der Migration und Stärke photosynthetischer Komplexe von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und Eisenmangel zu sehen, wurden solubilisierete Thylakoidmembranen von Wildtyp und  $\Delta sll1427$  in der ersten Dimension auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen. In diesem Fall erfolgte die Auftrennung der Komplexe über die Zentrifugalkraft und war somit nicht nur vom Molekulargewicht, sondern auch vom Sedimentationsverhalten der Komplexe abhängig. Thylakoidmembranen von *Synechocystis*-Wildtyp und  $-\Delta sll1427$ -Mutante, die unter Standardbedingungen und acht Tage unter Eisenmangel gewachsen waren, wurden mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und auf einen linearen 12 - 30%-igen Saccharosegradienten aufgetragen. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Gradient in 35 Fraktionen zu je 400  $\mu$ l ge-

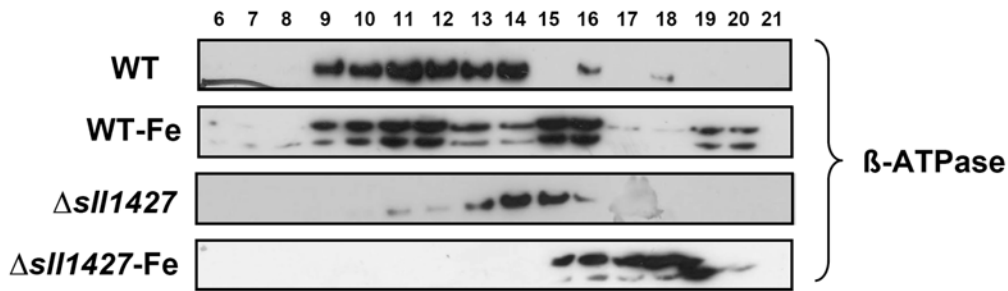
sammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden unter Vakuum lyophilisiert und in 100  $\mu$ l SMN-Puffer resuspendiert, um die Proteinkonzentration in 20  $\mu$ l Auftragsvolumen zu erhöhen. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Lage der photosynthetischen Komplexe im Wildtyp wurde über eine Western-Analyse mit Antikörpern gegen D1 (PSII), PsaD, PsaA/B (PSI) und die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase bestimmt (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Auftrennung photosynthetischer Komplexe von *Synechocystis*-Wildtyp in einem Saccharose-Dichtegradienten.** Die Thylakoidmembranen wurden aus frischen Zellen isoliert und mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und auf einen 12 - 30%-igen, linearen Saccharosegradienten aufgetragen. Die photosynthetischen Komplexe wurden durch Ultrazentrifugation separiert. Der Gradient wurde in 35 Fraktionen zu je 400  $\mu$ l gesammelt und auf ein SDS-PAG aufgetragen. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Antikörpern gegen  $\beta$ -ATPase, D1, PsaD und PsaA/B behandelt.

Das PSII-Monomer, anhand des D1-Antikörpers nachgewiesen, zeigte sein Maximum in den Fraktionen 18 bis 20. Das PSII-Dimer war in Abb. 3.17 leider nicht zu sehen. Eventuell war die Auftragsmenge zu gering, um ein immunologisches Signal zu bekommen. Das mit Hilfe der PsaD- und PsaA/B-Antikörper detektierte PSI zeigte drei Maxima: das PSI-Trimer in den Fraktionen 7, 8 und 9, das PSI-Dimer in den Fraktionen 11 bis 14 und das Maximum des PSI-Monomer-Signals in den Fraktionen 18 bis 21. Das Maximum der ATP-Synthase wurde im Wildtyp (+/- Fe) mit Hilfe des Antikörpers gegen die  $\beta$ -Untereinheit in den Fraktionen 11 und 12 angezeigt (Abb. 3.18). Die gleichen Western-Analysen wurden mit den Fraktionen des Wildtyps unter Eisenmangel und der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel durchgeführt. Die Signalmaxima der PSI- und PSII-Komplexe lagen hier in den gleichen Fraktionen wie im Wildtyp vor (Daten nicht gezeigt). Während der Wildtyp unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel das Maximum der ATP-Synthase in den gleichen Fraktionen zeigte, waren die Maxima der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase in der Mutante verschoben. Unter Standardbedingungen war das Maximum in die Fraktionen 13 bis 15 verschoben. Die ATP-Synthase der Mutante war durch eventuell fehlende Untereinheiten oder den Verlust von normalerweise assoziierten Proteinen leichter. Dieser Effekt verstärkte sich unter Eisenmangel noch mal erheblich. Das Maximum verschob sich um weitere zwei

Fraktionen in den niedermolekularen Bereich und lag somit in den Fraktionen 17, 18 und 19 vor (Abb. 3.18).

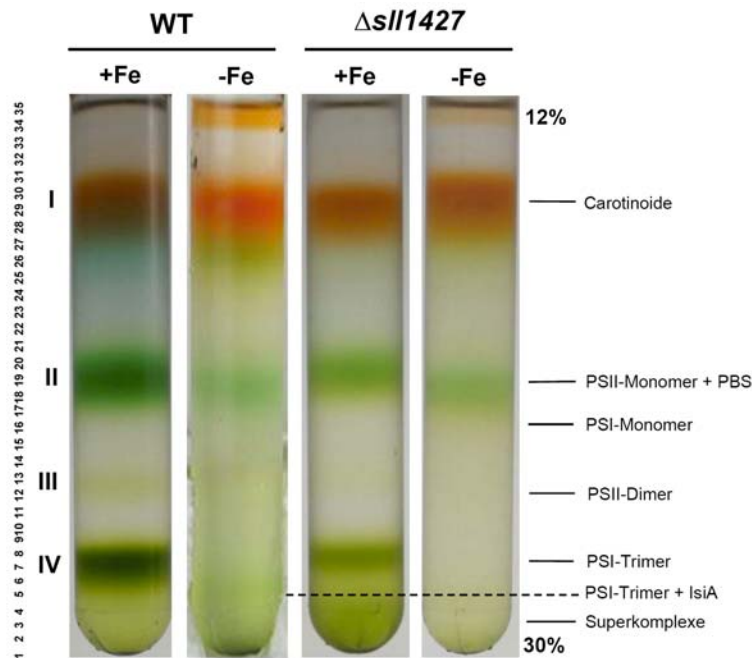


**Abb. 3.18: Auftrennung der ATP-Synthase von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante im Saccharose-Dichtegradienten.** *Synechocystis*-Wildtyp- und - $\Delta sll1427$ -Mutantenkulturen wurden sieben Tage unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel kultiviert. Thylakoidmembranen wurden isoliert, mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und auf einem 12 - 30%-igen, linearen Saccharosegradienten separiert. 400  $\mu$ l Fraktionen wurden gesammelt und auf ein SDS-PAG aufgetragen. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem  $\beta$ -ATPase-Antikörper behandelt.

### 3.1.7 Biophysikalische Analysen

Mit Hilfe der Western-Analyse wurde die grobe Lokalisierung der photosynthetischen Komplexe des Wildtyps im Saccharosegradienten bestimmt (Abb. 3.17). Die Sichtbarkeit der einzelnen Komplexe unterschied sich jedoch in den Gradienten von Wildtyp (+/- Fe) und  $\Delta sll1427$ -Mutante (+/- Fe) je nach Auftragsmenge (Abb. 3.19). Unter Standardbedingungen konnten vier Banden (I - IV) detektiert werden. Gut sichtbar waren die stark orange gefärbte Fraktion der freien Carotinoide/PBS (I) und zwei weitere durch Chlorophyll stark grün gefärbte Banden (II, IV). Außerdem konnte noch eine schwächere grüne Bande (III) zwischen Bande II und IV ausgemacht werden. Mit Hilfe der Western-Analyse ließen sich diese Komplexe zuordnen. Komplex II bestand aus PSI/PSII-Monomer, Komplex III aus PSI- und PSII-Dimer und Komplex IV aus PSI-Trimer (Abb. 3.19). Lagen Komplexe in kleineren Mengen vor, so befanden sie sich unterhalb der immunologischen Nachweisgrenze. Im Saccharosegradienten deutlich zu sehen, war das Fehlen des PSI-Trimers in der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel, was eventuell durch die verminderte Auftragsmenge hervorgerufen wurde. Die in Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen stark grün gefärbte Bande am unteren Ende des Gradienten zeigte die aktive Form des PSI in Cyanobakterien. Unter Eisenmangel wurde diese aktive Form des PSI durch die Bildung eines IsiA-Ringes geschützt. Im Wildtyp unter Eisenmangel war diese PSI-Trimer + IsiA-Bande aufgrund der etwas verminderten Auftragsmenge nur schwach zu sehen. Durch die Assoziation mit den IsiA-Proteinen war das Molekulargewicht dieses Komplexes erhöht und lag im Gradienten unterhalb des PSI-Trimers (Abb. 3.19). Das PSI/PSII-Dimer konnte im Gradienten der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel nicht detektiert werden, was aber keine Aussage über dessen Anwesenheit erlaubt, da diese Bande auch in den anderen Gradienten

kaum sichtbar war und selbst durch Western-Analyse im Wildtyp nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.17).



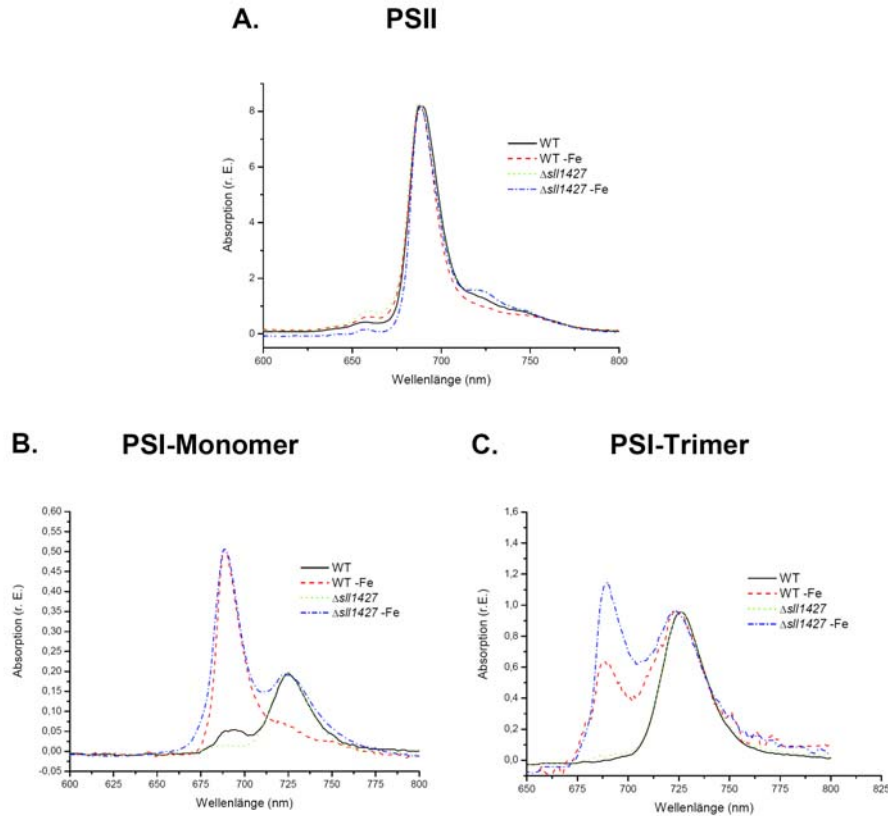
**Abb. 3.19: Saccharose-Dichtegradienten von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel.** *Synechocystis*-Wildtyp- und  $\Delta sll1427$ -Mutantenkulturen wurden sieben Tage unter Standardbedingungen (+Fe) und unter Eisenmangel (-Fe) kultiviert. Thylakoidmembranen wurden isoliert, mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und auf einem 12 - 30%-igen, linearen Saccharosegradienten separiert. Die Banden I - IV waren unter Standardbedingungen gut sichtbar. (I) Fraktion der freien Carotinoide und PBS, (II) PSII-Monomer + PBS-Komplex, (III) PSI/PSII-Dimer-Komplex, (IV) PSI-Trimer-Komplex.

Um festzustellen, welche Komplexe eine Bande enthielten, wurden bestimmte Fraktionen mit Wasser auf eine Konzentration von 2  $\mu\text{g}$  Chlorophyll/ml verdünnt und in einer Kapillare in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit Hilfe der 77K Fluoreszenzanalyse lässt sich das PSI/PSII-Verhältnis selbst aus geringsten Proteinmengen bestimmen. Da eine Bande sich nach dem Aliquotieren des Gradienten auf mehrere Fraktionen verteilte, wurden jeweils die drei Fraktionen, die das Maximum enthielten, zusammengenommen. Um die Vergleichbarkeit der Gradienten zu gewährleisten, wurden von jedem Gradienten jeweils die gleichen Fraktionen abgenommen. Von Bande II wurden die Fraktionen 18, 19 und 20, von Bande III die Fraktionen 11, 12 und 13 und von Bande IV die Fraktionen 6, 7 und 8 von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante bzw. die Fraktionen 4, 5 und 6 von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel für die Messungen gemischt. Die Fluoreszenzmessungen wurden analog zu Punkt 3.1.5.2 durchgeführt. Anregungsenergie war 440 nm für Chlorophyll a, um die Menge an PSI und PSII, welche Chlorophylle binden, bestimmen zu können.

In Abb. 3.20A ist das Emissionsspektrum der Bande II aller Gradienten zu sehen. Sehr deutlich war hier nur ein Maximum bei 685 nm zu erkennen. Das Maximum zeigte die



Fluoreszenz der inneren PSII-Antennen und war unter Standardbedingungen und Eisenmangel für Wildtyp und  $\Delta sl1427$ -Mutante identisch. Lediglich die Mutante zeigte unter beiden Bedingungen ein schwaches PSI-Maximum bei 725 nm, das jedoch nur als Schulter wahrzunehmen war.



**Abb. 3.20: 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren von Wildtyp und  $\Delta sl1427$ -Mutante nach Anregung bei 440 nm (Chlorophyll a).** Für die Fluoreszenz-Emissionsanalysen wurden einzelne Fraktionen der Saccharosegradienten aus Abb. 3.19 verwendet. (A) Fraktionen 18, 19 und 20 aus Bande II, (B) Fraktionen 11, 12 und 13 aus Bande III, (C) Fraktionen 6, 7 und 8 aus Bande IV. Die drei Fraktionen wurden jeweils gemischt, auf eine Chlorophyllkonzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  verdünnt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Spektren von (A) wurden auf das PSII-Maximum (bei 685 nm) normalisiert. Die Spektren von (B) und (C) wurden auf das PSI-Maximum (bei 725 nm) normalisiert.

Die Western-Analyse hatte bei den Fraktionen 18, 19 und 20 deutlich gezeigt, dass sowohl PSII als auch PSI darin vorhanden waren (Abb. 3.17). Die Menge an PSII überwiegte in diesen Fraktionen über der an PSI. Die Bande III aller Gradienten ist in Abb. 3.20B dargestellt. Unter Eisenmangel enthielten Wildtyp und Mutante mehr PSII-Dimer relativ zu PSI-Dimer. Unter Standardbedingungen verhielt es sich genau umgekehrt, das PSI/PSII-Verhältnis war größer. Außerdem enthielt die Mutante unter Standardbedingungen in Fraktion 11, 12 und 13 weniger PSII-Dimer als der Wildtyp unter gleichen Bedingungen. Ähnliches war bei der Mutante  $\Delta sl1427$  ohne Eisen zu sehen. Sie enthielt bei gleicher PSII-Menge mehr PSI als der Wildtyp ohne Eisen. Bande III schien eine Mischbande aus PSII und PSI zu sein. Die Anteile an PSII waren eventuell zu wenig, um ein immunologisches Signal in der Western-Analyse zeigen zu können (Abb. 3.17).

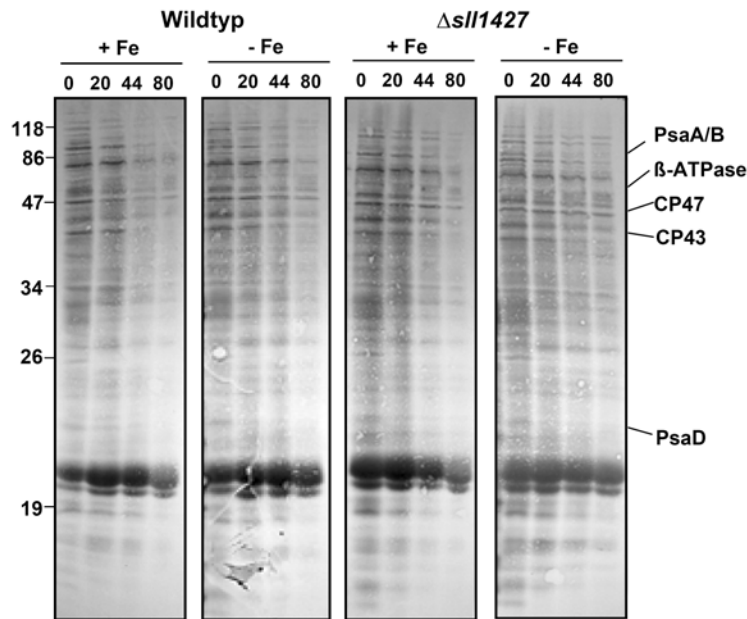
Wildtyp und Mutante zeigten unter Standardbedingungen die gleiche Menge an PSI in Bande IV, jedoch kein PSII-Maximum (Abb. 3.20C). Unter Eisenmangel erschien bei gleichbleibendem PSI-Maximum ein zusätzliches Maximum auf der Höhe von 685 nm. Dieses Maximum resultierte aus der Bildung des IsiA-Proteins, welches ebenfalls Chlorophyll bindet, und bei gleicher Wellenlänge wie PSII absorbierte. Bei  $\Delta sll1427$  ohne Eisen war dieses Maximum im Vergleich zu dem PSI-Maximum höher als bei Wildtyp ohne Eisen. Dies konnte auch schon in Punkt 3.1.5.2 (siehe Abb. 3.13B) für  $\Delta sll1427$  ohne Eisen gezeigt werden.

### 3.1.8 *in vivo*-Proteinmarkierung von Wildtyp und $\Delta hhoB$

#### 3.1.8.1 *in vivo*-Analyse der Proteindegradierung

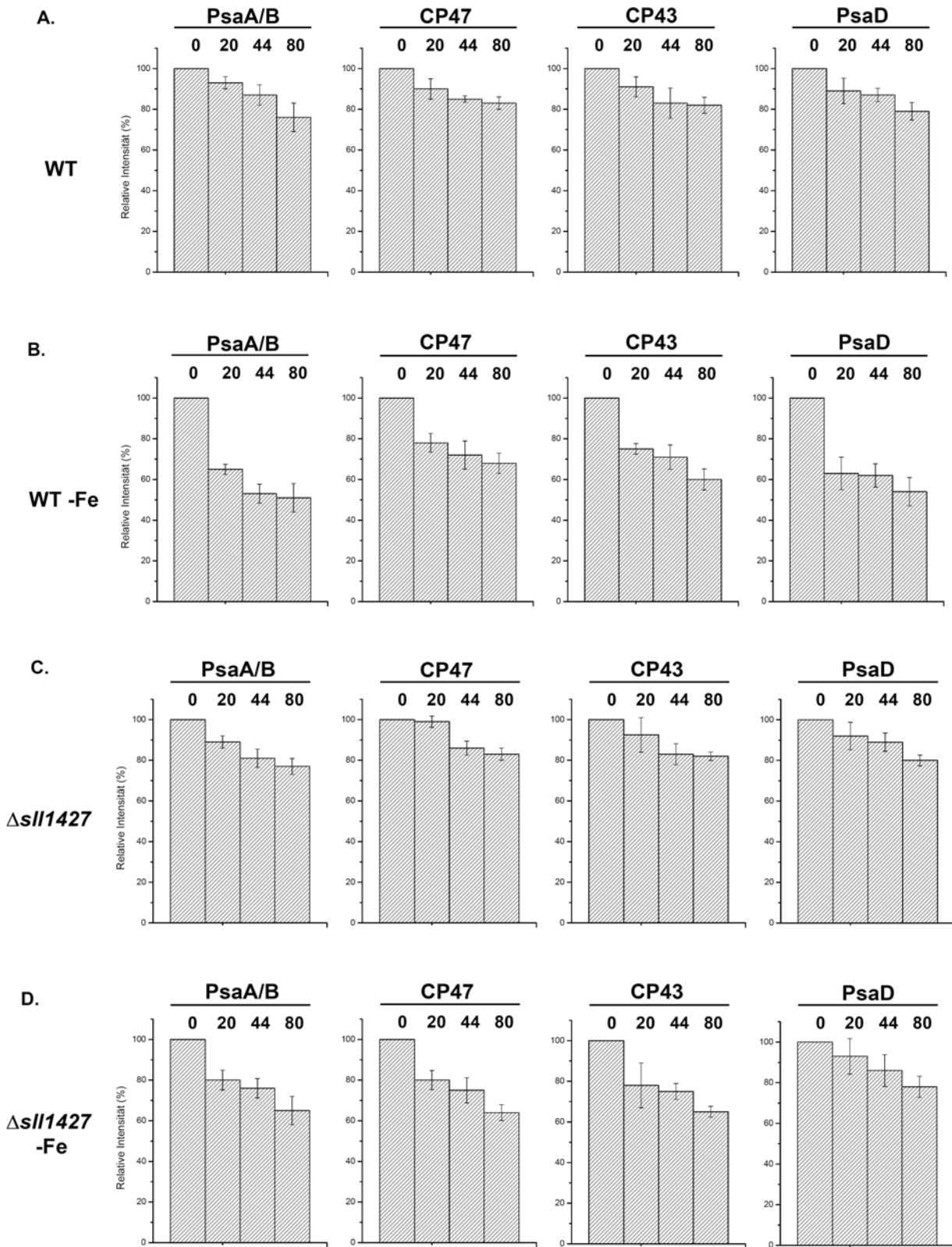
Western-Analysen haben gezeigt, dass *Synechocystis*-Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante nach sieben Tagen Wachstum unter Standardbedingungen keinerlei Unterschiede in der Menge photosynthetischer Proteine aufwiesen. Jedoch nach sieben Tagen Wachstum unter Eisenmangel zeigte sich ein Abbau photosynthetischer Proteine. Der Proteinabbau war im Wildtyp wesentlich höher als in der Mutante. Western-Analysen können jedoch nur einen momentanen „Protein-Ist“-Wert, der in einer Zelle vorliegt, beschreiben. Sie können nichts über die Synthese- bzw. Degradierungsraten aussagen. Mit Hilfe radioaktiver Markierung kann die Abbaugeschwindigkeit der Proteine unter Standardbedingungen und Eisenmangel analysiert werden. Junge *Synechocystis*-Zellen mit einer  $E_{750}$  von ca. 0,5 wurden 25 Min. mit [ $^{35}$ S]-Methionin, wie in Material und Methoden (Punkt 2.2.9.7) beschrieben, radioaktiv markiert. Um die Funktionalität von *Synechocystis*-Zellen zu gewährleisten, müssen ständig beschädigte Proteine abgebaut und durch neusynthetisierte ausgetauscht werden. Während der Markierung wurde das [ $^{35}$ S]-Methionin in neusynthetisierte Proteine eingebaut. Anschließend wurde die nicht eingebaute Radioaktivität durch mehrmaliges Waschen mit BG11-Medium entfernt, und die Zellen wurden in BG11-Medium mit und ohne Eisen resuspendiert. Nun verwendeten die Zellen wieder unmarkiertes Methionin für die Proteinsynthese. Proben wurden nach 0, 20, 44 Std. und 80 Std. entnommen und die Reaktion durch Einfrieren der Zellen in flüssigen Stickstoff gestoppt. Thylakoidmembranen wurden aus den Zellen extrahiert, mittels 10%-iger SDS-PAGE separiert und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Western-Analysen mit Antikörpern gegen PsaA/B, die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, CP47, CP43 und PsaD erleichterten die Identifizierung der für die Analyse gewünschten Proteinbanden (nicht gezeigt). Die Kinetik der Degradierung konnte mit einer „Phospho-Image“-Platte detektiert werden (Abb. 3.21). Die Abbauraten von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante konnten so unter Standardbedingungen und unter Eisen-

mangel beobachtet werden. Die Evaluierung der Proteinintensitäten wurde mit Hilfe des Programms TINA 2.01 durchgeführt.



**Abb. 3.21:** *in vivo*-Proteinmarkierung von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel. *Synechocystis*-Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und 25 Min. mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert (0 Std.). Nach der Entfernung des nichteingebauten [ $^{35}$ S]-Methionin wurde der Proteinabbau unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel für 20, 44 und 80 Std. beobachtet. Die Thylakoidmembranen wurden extrahiert und auf einem 10%-igen, 4 M Harnstoff enthaltendem SDS-PAG separiert. Die Proteine, die für die Degradierungskinetik herangezogen wurden, sind in der Abbildung rechts markiert.

Der Abbau wurde anhand des Verlassens des radioaktiven Signals abgeschätzt und anhand des Signals der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase normalisiert. Der [ $^{35}$ S]-Methionin-gehalt in den Kulturen wurde aufgrund ihres Weiterwachsens nach der radioaktiven Markierung stetig verdünnt. Ein Wachstumskoeffizient wurde anhand der Verdoppelungszeit der einzelnen Kulturen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und des Probenentnahmepunkts ermittelt. In allen Abbildungen ist der Wachstumskoeffizient bereits berücksichtigt. Wildtyp und Mutante zeigten unter Standardbedingungen ein relativ ähnliches Abbaumuster (Abb. 3.22A/C). PsaA/B und PsaD bauten nach 3,5 Tagen meist konstant zu 20 bis 24% ab. Der Abbau von CP47 und CP43 lag bei beiden Kulturen lediglich bei 17%. Das CP47-Protein der  $\Delta sll1427$ -Mutante baute nach einem Tag so gut wie gar nicht ab (1%). Nach dem zweiten Tag jedoch zeigte sich eine Abbaurrate wie beim Wildtyp, die bei 15% lag.



**Abb. 3.22: Analyse der Proteindegradierungsrate in Wildtyp und  $\Delta sil1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel.** Der Abbau der PsaA/B-, CP47-, CP43- und PsaD-Proteine wurde mit Hilfe der TINA 2.01 Software evaluiert und auf den jeweiligen Startpunkt (0 Std.), der auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Unter Eisenmangel zeigte der Wildtyp eine schnellere Abbaukinetik. Bereits nach dem ersten Tag waren die Proteine des PSI (PsaA/B und PsaD) zu ca. 40% abgebaut. Dieser Wert

änderte sich in den nachfolgenden Tagen unter Eisenmangel bei PsaD nur schwach und stieg nach dem 3. Tag bei beiden Proteinen auf ca. 50%. Die Proteine des PSII (CP47 und CP43) zeigten einen etwas langsameren Abbau. Am ersten Tag war lediglich ein Abbau von 22 bzw. 25% zu verzeichnen, der auf 32 bzw. 40% am dritten Tag anstieg. Die Proteine des PSII bauten sowohl langsamer als auch weniger stark ab als die des PSI (Abb. 3.22B).

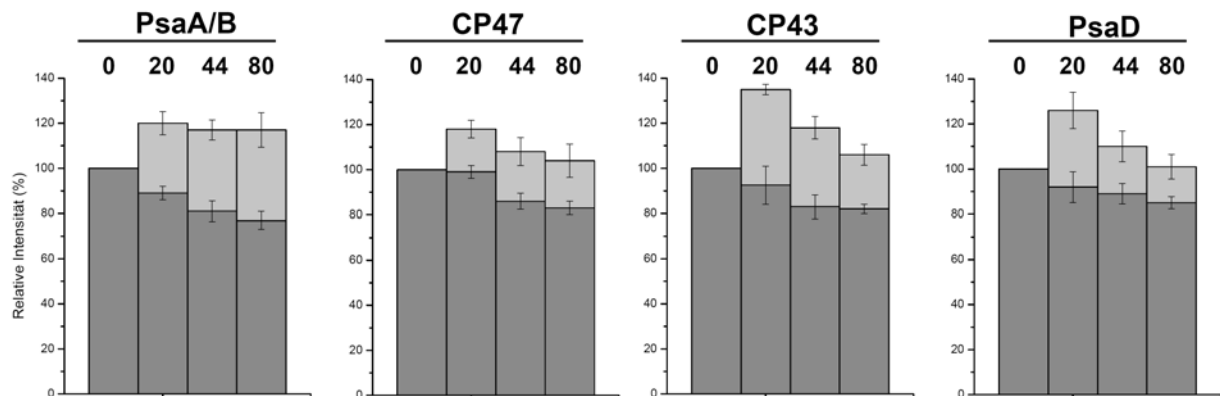
Die Mutante unter Eisenmangel zeigte für die Proteine PsaA/B, CP43 und CP47 eine gleiche Abbaukinetik, die mit der der PSII-Proteine des Wildtyps vergleichbar war. Nach 20% Abbau nach dem ersten Tag und ca. 25% Abbau nach dem zweiten Tag, folgte nach Tag 3 ein Abbau von 35%. Das PsaD-Protein des PSI zeigte in der Mutante unter Eisenmangel einen langsameren und schwächeren Abbau. Dieser lag am ersten Tag bei 7% und nahm jedoch bis zum dritten Tag unter Eisenmangel auf 22% zu (Abb. 3.22D).

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Abbaurate nach 3,5 Tagen Wachstum unter Standardbedingungen in beiden Kulturen ähnlich war. Unter Eisenmangel hingegen sprach der Wildtyp schneller auf die Mangelbedingungen an und baute entsprechend Proteine ab, um das Überleben zu sichern und die Stressbedingungen zu überdauern. Dabei bauten vor allem die Proteine des PSI vorzeitig ab. Die  $\Delta sll1427$ -Mutante reagierte bei den Proteinen des PSI langsamer mit dem Abbau, und konnte auch nicht die gleiche Intensität erreichen. Jedoch war der Abbau der untersuchten PSII Proteine im Wildtyp und der Mutante unter Eisenmangel ähnlich.

Unter Standardbedingungen konnte also die „normale“ Abbaugeschwindigkeit photosynthetischer Proteine beobachtet werden. Dieser Abbau ist als Proteingrundumsatz einer Zelle zu betrachten, der durch Neusynthese kompensiert wurde und damit im Western nicht sichtbar war (Abb. 3.16B). Unter Eisenmangel zeigte der Wildtyp einen stärkeren und schnelleren Abbau als unter Standardbedingungen, weshalb nach sieben Tagen unter Eisenmangel kaum mehr photosynthetische Proteine im Western nachweisbar waren (Abb. 3.16B). Jedoch konnte in der Mutante unter Eisenmangel ebenfalls ein stärkerer Abbau als unter Standardbedingungen erkannt werden. Dennoch waren in der Western-Analyse nach sieben Tagen Eisenmangel noch photosynthetische Proteine nachweisbar. Ist es die im Vergleich zum Wildtyp etwas schwächere Abbaudynamik der Mutante unter Eisenmangel, die weiterhin Proteinsignale im Western erzeugt (Abb. 3.16B) oder muss man von einer erhöhten Proteinsyntheserate der Mutante unter Eisenmangel ausgehen? Dies konnte durch die Analyse der Syntheserate *in vivo* unter Standardbedingungen und Eisenmangel überprüft werden.

### 3.1.8.2 *in vivo*-Analyse der Proteinsyntheserate

*Synechocystis*-Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Zellen wurden in BG11-Medium bis zu einer  $E_{750}$  von 0,5 wachsen gelassen. Vor dem Transfer der Kulturen in BG11-Medium ohne Eisen wurde eine 0-Probe entnommen und anschließend jeweils nach 20, 44 und 80 Stunden. Direkt nach der Entnahme der Proben wurden diese 25 Min. mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert. Somit konnte die momentan in der Zellkultur vorhandene Syntheserate festgehalten werden. Die Reaktion wurde durch Einfrieren der Zellen in flüssigen Stickstoff gestoppt. Die Thylakoidmembranen wurden aus den Zellen extrahiert und durch eine 10%-ige SDS-PAGE separiert. Das Gel wurde getrocknet und anschließend über Nacht auf einer „phosphoimage“-Platte exponiert. Die Syntheserate von Wildtyp und  $sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel konnte somit beobachtet werden. Die Syntheserate wurde anhand der Zunahme/Abnahme des radioaktiven Signals in % abgeschätzt und anhand des Signals der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase normalisiert. Der Wildtyp ist in Abbildung 3.23 in dunkelgrau dargestellt, die Mutante wurde aufgrund ihrer höheren bzw. gleichhohen Werte in hellgrau dahinter gelegt.



**Abb. 3.22: Analyse der Proteinsyntheserate in Wildtyp (dunkelgrau) und  $\Delta sll1427$ -Mutante (hellgrau) unter Eisenmangel.** *Synechocystis*-Zellen wurden unter Standardbedingungen bis zu einer  $E_{750}$  von 0,5 kultiviert. Proben wurden vor (0 Std.) und 20, 44 und 80 Std. nach dem Transfer in eisenfreies Medium entnommen. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme 25 Min. mit [ $^{35}$ S]-Methionin radioaktiv markiert. Die Thylakoidmembranen wurden extrahiert und auf einem 10%-igen, 4 M Harnstoff enthaltendem SDS-PAG separiert. Die Synthese der PsaA/B-, CP47-, CP43- und PsaD-Proteine wurde mit Hilfe der TINA 2.01 Software evaluiert und auf den jeweiligen Startpunkt (0 Std.), der auf 100% gesetzt wurde, normalisiert.

Die Syntheserate des Wildtyps nahm mit der Zeit stetig ab. Die Synthese der PsaA/B-Proteine nahm kontinuierlich um etwa 20% nach 80 Std. unter Eisenmangel ab. Die Proteinsyntheseraten von CP47, CP43 und PsaD nahmen jeweils um 15% nach 80 Std. Eisenmangel ab. Jedoch war die Syntheserate des CP47-Proteins nach 20 Std. Eisenmangel immer noch stabil. Erst nach 44 Std. fiel sie um etwa 13%, nach 80 Std. nur noch um weitere 3%. Die Syntheserate der  $\Delta sll1427$ -Mutante lag in allen Fällen über der des Wildtyps. Die Syntheserate der PsaA/B-Proteine stieg nach 20 Std. auf den Maximalwert von 120%,

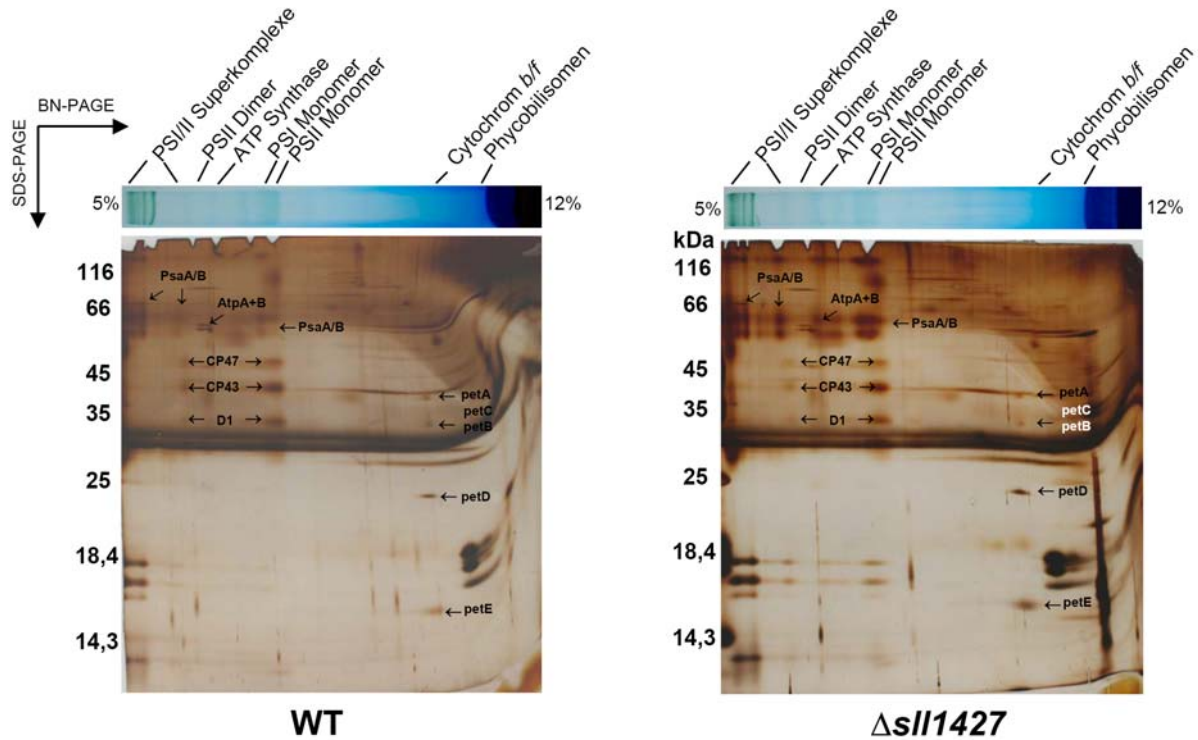
um sich anschließend auf etwa 118% einzupendeln. Die Synthese des CP47-Proteins stieg nach 20 Std. ebenfalls auf 118% an, fiel jedoch nach 44 Std. langsam wieder ab und war nach 80 Std. Eisenmangel bei 105% und lag immer noch höher als die Syntheserate des Wildtyps. Die Synthese des CP43-Proteins stieg in den ersten 20 Std. enorm an (135%), fiel jedoch genauso stark wieder ab und erreichte nach 80 Std. ebenfalls einen Wert von 105%. Die PsaD-Syntheserate zeigte einen ähnlichen Verlauf. Nach starkem Ansteigen der Synthese (125%) in den ersten 20 Std., fiel diese in den nächsten 60 Std. unter Eisenmangel stark herab auf lediglich 103%. Fast alle quantifizierten Proteine der  $\Delta sll1427$ -Mutante zeigten eine starke Syntheserate zu Beginn der Stressbedingungen und pendelten sich anschließend auf einen geringeren Wert ein. Lediglich die Syntheserate der PsaA/B-Proteine konnte den Wert nach 20 Std. halten (Abb. 3.23). Außerdem war bei allen Proteinen der  $\Delta sll1427$ -Mutante die Syntheserate höher als im Wildtyp unter den gleichen Bedingungen. Im Western-Filter unter Eisenmangel konnte in der  $\Delta sll1427$ -Mutante kein Fehlen der photosynthetischen Proteine festgestellt werden (Abb. 3.16B). Das könnte bedeuten, dass die Mutante eventuell genauso vom Proteinabbau unter Eisenmangel betroffen war wie der Wildtyp, jedoch diesen Abbau durch die effizientere Neusynthese beschädigter Proteine ausgleichen konnte.

### 3.2 Lokalisierung der HhoA- und HhoB-Proteine

Um die Lokalisierung der Proteine genau zu bestimmen wurde eine blau-native/SDS-PAGE durchgeführt. Damit ließ sich feststellen, ob die Proteine spezifisch an einen photosynthetischen Komplex der Thylakoidmembranen gebunden waren. Für die erste Dimension wurden Thylakoidmembranen mit einem milden Detergenz solubilisiert. Proteinkomplexe sollten sich aus der Membran herauslösen ohne in ihre Untereinheiten zerlegt zu werden. Diese Komplexe wurden durch eine 4 - 12% BN-PAGE aufgetrennt. Die Proteinzusammensetzung der einzelnen Komplexe ließ sich in einer zweiten Dimension (2D) und anschließender Silberfärbung aufklären (Abb. 3.24).

In der ersten Dimension konnte in Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante sowohl die Monomer- als auch die Dimer-Form des PSII gefunden werden. Das PSII-Monomer war dabei aber nur als Intermediat der PSII-Dimerassemblierung zu sehen (Komenda *et al.*, 2004). PSI konnte als Monomer oder als Trimer vorliegen (Herranen *et al.*, 2004). In der Silberfärbung von Wildtyp und  $\Delta sll1427$  konnten sowohl PSI-Monomer als auch -Trimer sowie einige PSI-Superkomplexe detektiert werden. Ebenso konnte das PSII in seiner Monomer- und Dimerform nachgewiesen werden. Der Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex und die Phycobilisomen sind Komplexe mit niedrigerem Molekulargewicht und wanderten daher in der ersten Dimension nur knapp

vor der Fraktion der freien Proteine (Abb. 3.24). Sowohl in der ersten, als auch zweiten Dimension, konnten zwischen Wildtyp und Mutante keine sichtbaren Unterschiede, mit Ausnahme der erhöhten Proteinauftragsmenge bei  $\Delta sll1427$ , festgestellt werden.

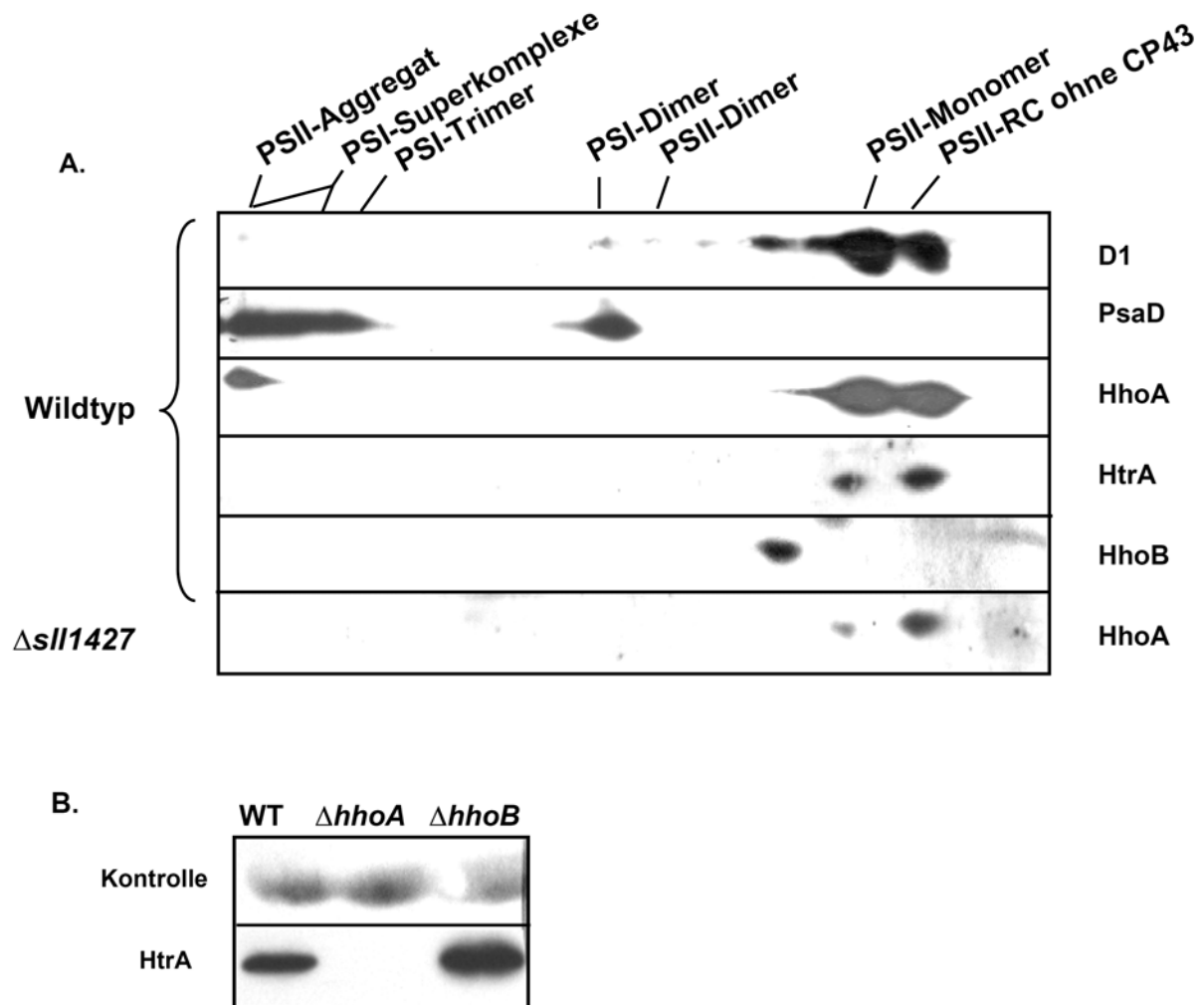


**Abb. 3.24: Auftrennung photosynthetischer Komplexe von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante durch blaunative PAGE (erste Dimension) und SDS-PAGE (zweite Dimension).** Thylakoidmembranen von *Synechocystis*-Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante wurden mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und das Lysat auf einem 4 - 12% Polyacrylamidgel ohne SDS separiert. Die Untereinheiten photosynthetischer Komplexe wurden anschließend auf einem 12,5% SDS-PAG getrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Mit Pfeilen sind die Proteine markiert, die nach Herranen *et al.* (2004) identifiziert werden konnten.

Um die genaue Lokalisierung der HhoA-, HhoB- und HtrA-Proteine im *Synechocystis*-Wildtyp zu bestimmen, wurde eine Western-Analyse mit proteinspezifischen Antikörpern in der zweiten Dimension durchgeführt. Um herauszufinden, ob die cyanobakteriellen Deg-Proteine mit photosynthetischen Komplexen assoziiert waren, wurden die Membranen sowohl für Antikörper gegen die Proteine HhoA, HhoB und HtrA, als auch für Antikörper gegen D1 und PsaD verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl HhoA als auch HtrA hauptsächlich mit PSII-Komplexen assoziiert waren und im 2D-PAG exakt auf einer Höhe liefen. (Abb. 3.25A). Das HhoB-Protein war weder mit PSII- noch mit PSI-Komplexen assoziiert. Es lief zwischen dem PSII-Monomer und dem PSII-Dimer. Eine Assoziation oder Komigration von HhoB mit anderen photosynthetischen Komplexen (Cytochrom  $b_{6f}$  -Komplex oder ATP-Synthase) konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Jedoch war es sehr wahrscheinlich, dass die Proteine HhoA und HhoB nicht zusammen agierten. Das HhoA-Protein läuft im 2D-PAG der  $\Delta sll1427$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp an unveränderter Position (Abb. 3.25A unten). Umgekehrt konnte jedoch gezeigt werden, dass der  $\Delta sll1679$ -Mutante



sowohl das HhoA-Protein, als auch das HtrA-Protein fehlte. In der  $\Delta sll1427$ -Mutante war das HtrA-Proteins trotz Fehlens des HhoB-Proteins vorhanden (Abb. 3.25B).

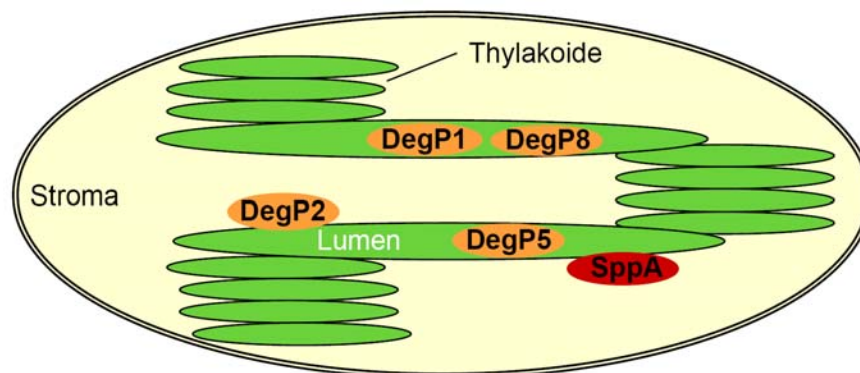


**Abb. 3.25: Lokalisierung der cyanobakteriellen Deg-Proteine in *Synechocystis*-Wildtyp und -Mutanten.** (A) Thylakoidmembranlysate wurden in einer blau-nativen/SDS-PAGE separiert und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit spezifischen Antikörpern gegen D1, PsaD, HhoA, HtrA und HhoB behandelt. Die Antikörper D1, PsaD und HhoA wurden auf nur einer Membran angewendet. Aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts der Proteine HhoA, HhoB und HtrA, wurden für die Antikörper gegen HhoB und HtrA separate Membranen verwendet. (B) Thylakoidmembranen von Wildtyp,  $\Delta sll1427$ - und  $\Delta sll1679$ -Mutanten wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Antikörper gegen HtrA inkubiert. Die Kontrolle zeigte das unspezifische Signal eines Proteins auf derselben Membran und diente als Beweis für die korrekte Beladung des Gels.

### 3.3 Analyse von Deg- und SppA-Proteasen in *Arabidopsis thaliana*

#### 3.3.1 Lokalisierung der Deg- und SppA-Proteasen im Chloroplasten

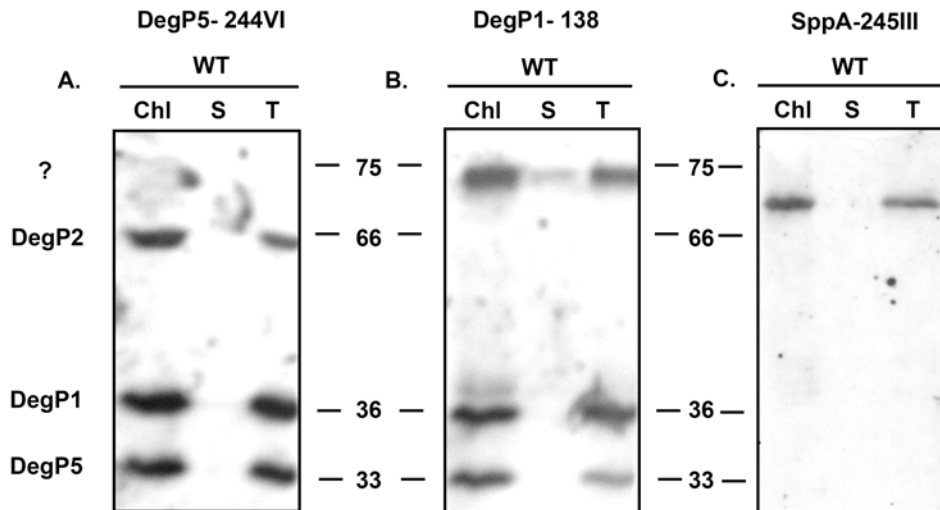
Von den 14 Mitgliedern der Deg-Peptidasefamilie konnten vier eindeutig dem Chloroplasten zugeordnet werden (Adam *et al.*, 2001). Dabei sollte DegP2 an der stromalen Seite der Thylakoidmembran aktiv sein (Adam *et al.*, 2001), während DegP1, P5 und P8 durch Proteomanalysen dem Thylakoidlumen zugeordnet werden konnten (Schubert *et al.*, 2002; Abb. 3.26). Proteinsequenzanalysen und ein *in vitro*-Importansatz haben gezeigt, dass die *Arabidopsis*-SppA-Peptidase ein membrangebundenes Protein ist, welches mittels einer amphipatischen Helix mit der Oberfläche der Lipiddoppelschicht interagiert. Das Protein kann als Homotetramer an die Thylakoidmembran assoziiert sein (Lensch *et al.*, 2001; Abb. 3.26).



**Abb. 3.26: Schematische Darstellung eines Chloroplasten.** Die Proteine DegP1, DegP5 und DegP8 (orange) sind im Thylakoidlumen lokalisiert. Die Proteine DegP2 (orange) und SppA (rot) sind mit der stromalen Seite der Thylakoidmembran assoziiert.

Um die Lage der Deg-Proteine und des SppA-Proteins innerhalb des Chloroplasten zu bestätigen, und um die Spezifität der Antikörper zu bestimmen wurde eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt. Dazu wurden aus *Arabidopsis*-Wildtyp intakte Chloroplasten mittels Percoll-Gradient extrahiert. Nachdem das Cytoplasma durch mehrmaliges Waschen entfernt worden war, wurden die Chloroplasten durch osmotischen Schock geöffnet. Die Probe enthielt nur noch Bestandteile des Chloroplasten, welche aus Stroma und Thylakoidmembranen bestanden. Durch Zentrifugation konnten Stroma und Thylakoidmembranen voneinander getrennt werden. Um herauszufinden, wo sich die Deg/SppA-Proteine im Chloroplasten befanden, wurden jeweils eine totale Chloroplasten-, eine Stroma- und eine Thylakoidfraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen, anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit Antikörpern gegen Deg- und SppA-Proteine behandelt. Der DegP5-244IV-Antikörper (Lensch, 2000) erkannte dabei das DegP5-Protein (33 kDa) und unspezifisch noch zwei weitere Deg-Proteine: DegP2 (66 kDa) und

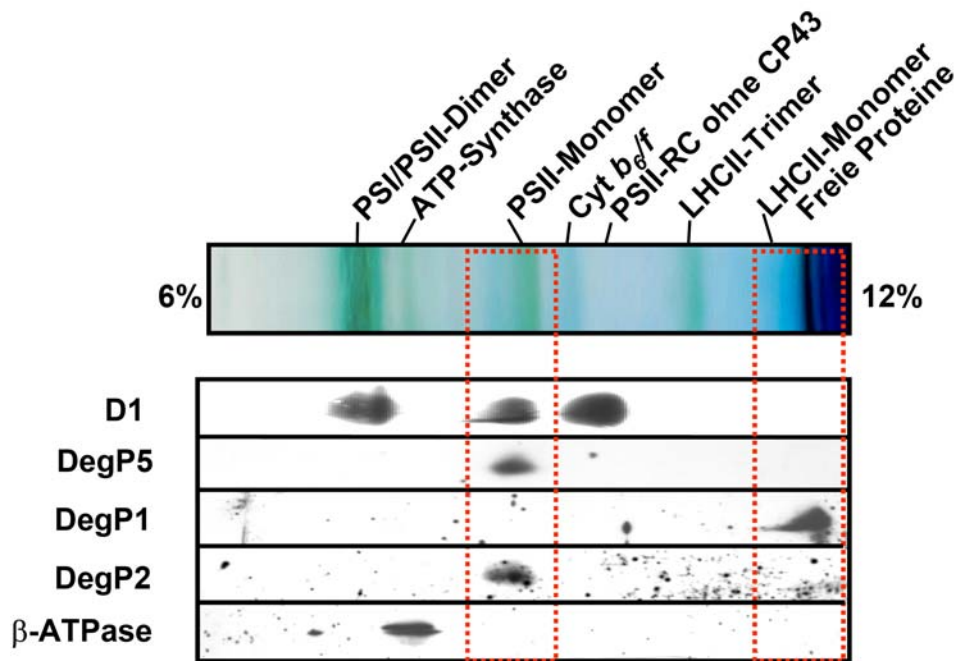
DegP1 (36 kDa; Abb. 3.27A). Der Antikörper DegP1-138 (Lensch, 2000) erkannte spezifisch das DegP1-Protein, unspezifisch das DegP5-Protein sowie ein weiteres Protein mit 75 kDa Molekulargewicht, dessen Identität nicht geklärt werden konnte (Abb. 3.27B). Der SppA-245III-Antikörper erkannte spezifisch das SppA-Protein, mit einem Molekulargewicht von etwa 67 kDa in den Thylakoidmembranen des Chloroplasten (Abb. 3.27C).



**Abb. 3.27: Lokalisierung der Deg- und SppA-Proteine im Chloroplasten.** In einem 12,5%-igen SDS-Gel wurden jeweils Gesamtchloroplasten (Chl), Stroma- (S) und Thylakoidfraktionen (T) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen DegP5 (A), DegP1 (B) und SppA (C) inkubiert. Der Antikörper DegP5-244VI erkannte die Deg-Proteine P1, P2 und P5, die jeweils in der Thylakoidfraktion vorhanden waren. Der Antikörper DegP1-138 erkannte zusätzlich zu DegP1 und P5 ein ca. 75 kDa großes, in allen Fraktionen vorhandenes Protein, dessen Identität noch unklar ist. Der SppA-145III Antikörper erkannte spezifisch das SppA Protein, welches ebenfalls nur in der Thylakoidfraktion vorhanden war.

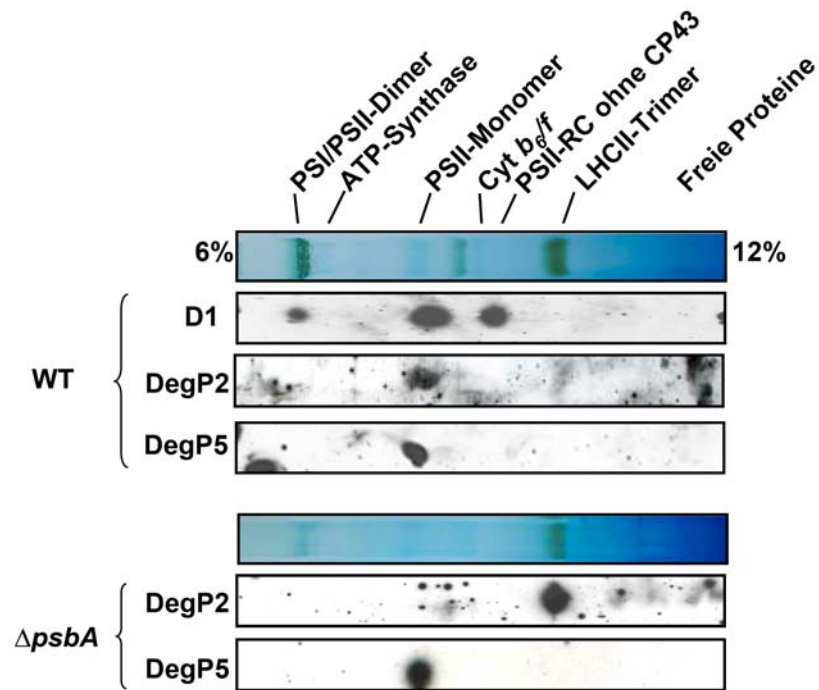
### 3.3.2 Lokalisierung der Deg-Proteine innerhalb der Thylakoidmembran

Um die Lage der Deg-Proteine innerhalb der Thylakoidmembran genauer bestimmen zu können, wurde eine blau-native/SDS-PAGE Analyse durchgeführt. In der ersten Dimension wurden Thylakoidmembranen von *Arabidopsis*-Wildtyp mit dem Detergenz Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert. Die aus der Thylakoidmembran herausgelösten photosynthetischen Komplexe wurden durch eine 4 - 12% blau-native PAGE aufgetrennt. Die Proteine, die zu einem Komplex gehörten, wurden mittels einer zweiten Dimension (SDS-PAGE) getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Lokalisierung der einzelnen Komplexe und der Deg-Proteine wurde immunologisch mit Antikörpern gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, das D1-Protein des PSII und Deg-Proteine getestet (Abb. 3.28). Die Western-Analysen zeigten für DegP1 ein Signal im Bereich der freien Proteine und für DegP2 und DegP5 Signale im Bereich des PSII-Monomers.



**Abb. 3.28: Lokalisierung der *Arabidopsis*-Deg-Proteine nach Auftrennung in einer 2D-Gelelektrophorese.** Die in einer blau-nativen/SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen D1, DegP5, DegP1, DegP2 und  $\beta$ -ATPase behandelt. Rot markiert sind die Positionen der Deg-Proteine im blau-nativen Gel.

Komigration zweier Proteine in einer blau-nativen PAGE heißt nicht unbedingt, dass diese Proteine zu demselben Komplex gehören. Um zu klären, ob das DegP2- und das DegP5-Protein mit dem PSII-Monomer assoziiert waren oder nur mit diesem komigrierten, wurde eine blau-native/SDS-PAGE mit Tabak-Wildtyp und der  $\Delta psbA$ -Mutante durchgeführt. Der Mutante fehlte das D1 Protein und konnte somit kein intaktes PSII bilden. Erste und zweite Dimension wurden analog zu dem Versuch mit *Arabidopsis* durchgeführt. Es interessierte nur die Lage der PSII-Komplexe, die mit Hilfe des D1-Antikörper lokalisiert wurden. Im Tabak-Wildtyp waren die Proteine DegP2 und DegP5 genau wie im *Arabidopsis*-Wildtyp auf Höhe des PSII-Monomers zu finden (Abb. 3.29 oben). Das Signal der DegP5-Protease blieb in der  $\Delta psbA$ -Mutante, unabhängig vom Vorhandensein des PSII-Monomers, an der gleichen Stelle wie im Tabak-Wildtyp. In der  $\Delta psbA$ -Mutante jedoch zeigte sich eine deutliche Verschiebung des DegP2 Signals auf Höhe des LHCII Trimers. Freies DegP2-Protein und LHCII-Trimer besaßen ein ähnliches Molekulargewicht (66 kDa) und liefen daher im BN-Gel auf einer Höhe. (Abb. 3.29 unten). Diese Signalverschiebung in der  $\Delta psbA$ -Mutante könnte für eine Assoziation des DegP2-Proteins mit dem PSII-Monomer sprechen.



**Abb. 3.29: Lokalisierung der Deg-Proteine in Tabak-Wildtyp und  $\Delta psbA$ -Mutante nach Auftrennung durch eine 2D-Gelelektrophorese.** Die in einer blau-nativen/SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen D1, DegP2 und DegP5 behandelt.

### 3.4 T-DNS-Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana*

Samen von T-DNS-Insertionslinien der Gene *sppA*, *degP2* und *degP5* wurden von Syngenta Biotechnology bezogen (Inc. Research Triangle Park, North Carolina 27709), Samen für die *degP1*-T-DNS-Insertionslinie bei GABI-Kat (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam). Die Insertionslinien wurden aus dem *Arabidopsis*-Ökotyp Columbia hergestellt. Um die Orientierung der T-DNS und den Insertionspunkt zu bestimmen, wurden Sequenzanalysen mit Hilfe des spezifischen Oligonukleotids SAIL\_LB1 bzw. GABI\_LB durchgeführt. Dabei wurde aus der „left border“ der T-DNS in das betroffene Gen hineingelesen. Mit Hilfe der Sequenzierung und anschließendem „BLAST-Search“ konnte sowohl der genaue Insertionspunkt als auch die Orientierung der T-DNS bestimmt werden. Diese kann entweder in plus/plus-Richtung (Leseraster der T-DNS entspricht dem Leseraster des „sense“ DNS-Stranges des betroffenen Gens) oder in plus/minus-Richtung eingebaut sein. Die verschiedenen T-DNS-Linien, die für eine weitere Analyse verwendet wurden, sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Drei Linien, 561\_F04, 1297\_F11 und 1252\_H02, trugen T-DNS-Insertionen in ihrem 5' und 3' nicht codierenden Bereich. Eine Linie (414\_D04) enthielt die T-DNS-Insertion im 1. Exon und vier Linien, 136\_A09, 645\_D07, 713\_F04 und 355\_E03, trugen die T-DNS-Insertionen im 2., 4., 8. bzw. 12. Intron (Abb. 3.30). Da sich die T-DNS-Insertionen der

Linien 1297\_F11, 1252\_H02 und 136\_A09 weit außerhalb des codierenden Genbereichs befanden, wurden diese drei Linien nicht für weitere Analysen in Betracht gezogen.

**Tabelle 3.2: *Arabidopsis*-T-DNS-Insertionslinien der *sppA*- und *deg*-Gene.**

Gen	Linie	T-DNS Vektor	Selektionsmarker	T-DNS Orientierung
<i>sppA</i>	355_E03	pCSA110	BASTA	Plus/plus
<i>sppA</i>	136_A09	pCSA110	BASTA	Plus/Plus
<i>degP1</i>	414_D07	pAC161	Sulfadiazin	Plus/plus
<i>degP1</i>	1253_H02	pDAP101	BASTA	Plus/plus
<i>degP2</i>	561_F07	pDAP101	BASTA	Plus/plus
<i>degP5</i>	645_D07	pDAP101	BASTA	Plus/minus
<i>degP5</i>	1297_F11	pDAP101	BASTA	Plus/plus
<i>degP11</i>	713_F04	pAC161	Sulfadiazin	Plus/plus

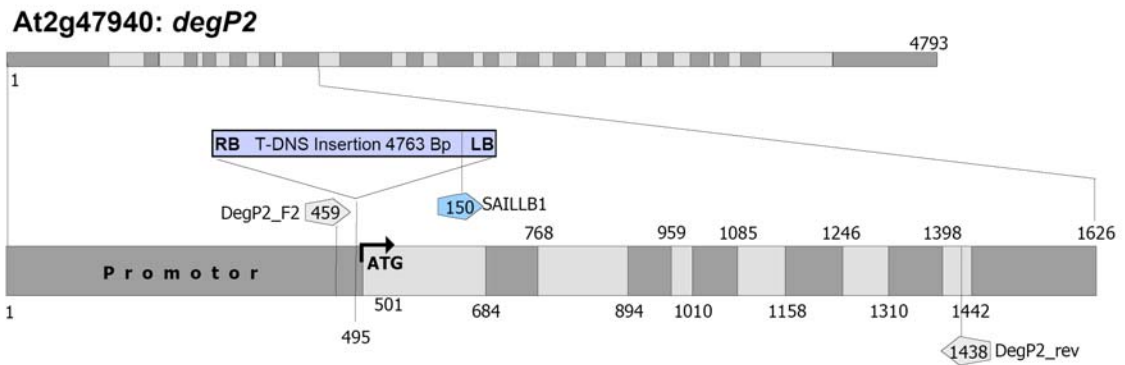
### 3.5 PCR-Analysen der T-DNS-Insertionslinien

Gesamt-DNS wurde aus jungen Blättern von *Arabidopsis*-Wildtyp und den Mutantenlinien extrahiert. Mit Hilfe einer PCR-Analyse wurde die genaue Lokalisierung der T-DNS-Insertion und die Homozygotie überprüft. Die PCR der T-DNS-Insertionslinien wurde mit drei verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt, zwei genspezifischen und einem T-DNS-spezifischen Oligonukleotid (Abb. 3.30). So konnte die Anwesenheit der T-DNS im gewünschten Gen und die Abwesenheit des Wildtyp-Gens analysiert werden.

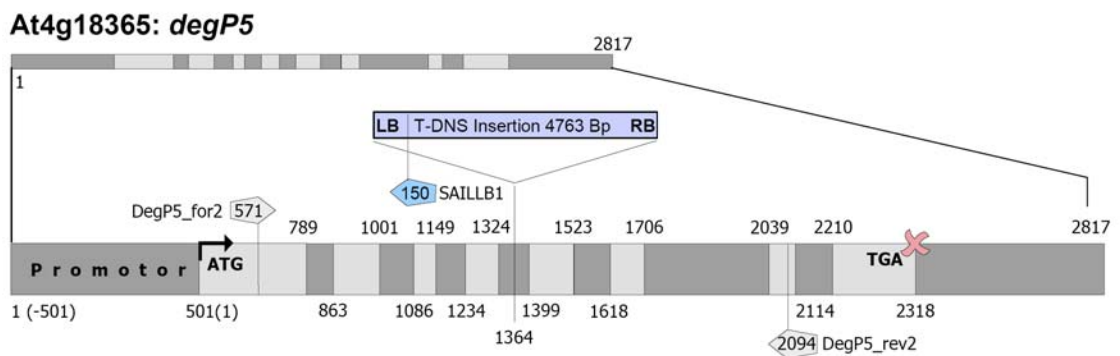
Das T-DNS-Fragment hatte ein Molekulargewicht von 7541 Bp (für pCSA110 Vektor), 4763 Bp (für pDAP101-Vektor) bzw. 5777 Bp (für pAC161). Bei erfolgreichem Einbau der hochmolekularen T-DNS in das gewünschte Gen konnte mit den genspezifischen Oligonukleotiden kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die genspezifischen Oligonukleotide und die erwarteten Längen der PCR-Produkte sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

A.  $\Delta degP2$ : 561\_F07

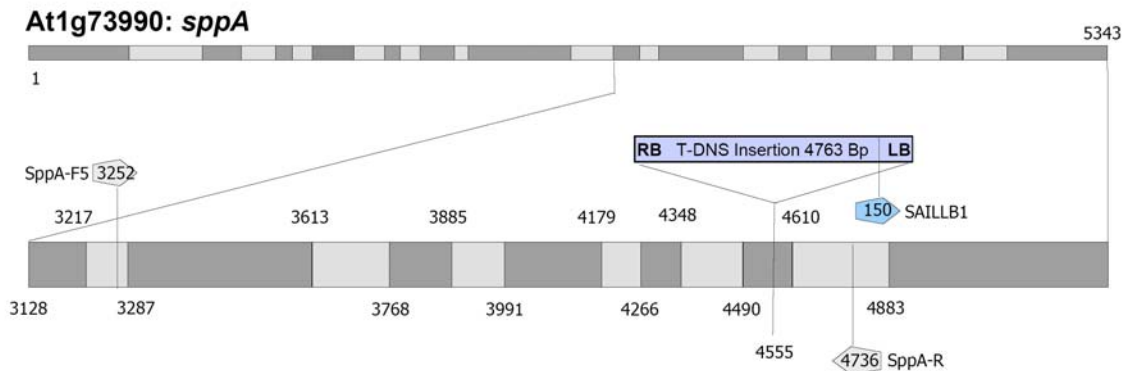
Genomische DNA: Introns Exons



B.  $\Delta degP5$ : 645\_D07



C.  $\Delta sppA$ : 355\_E03



**Abb. 3.30: Schematische Darstellung der T-DNS-Insertionen der *Arabidopsis*- $\Delta degP2$  (A),  $-\Delta degP5$  (B) und  $-\Delta sppA$  (C)-Linien.** Introns sind hellgrau, Exons dunkelgrau gefärbt. Die Länge der hellblau gefärbten T-DNS ist nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Oligonukleotide, die für die PCR-Reaktionen verwendet wurden, sind als Pfeilsymbole abgebildet.

Tabelle 3.3: Länge der Amplifikationsprodukte der *sppA*- und *deg*- Wildtyp-Gene und T-DNS-Linien.

Gen	Linie	Oligonukleotide	Ohne T-DNS (Wildtyp-Gen)	Mit T-DNS
<i>sppA</i>	355_E03	SppA_F5/SppA_R/SAIL LB1	1446 Bp	291 Bp
<i>degP1</i>	414_D07	DegP1_for1/DegP1_rev/GABI LB	440 Bp	514 Bp
<i>degP2</i>	561_F07	DegP2_F2/DegP2_rev/SAIL LB1	979 Bp	1093 Bp
<i>degP5</i>	645_D07	DegP5_for2/DegP5_rev2/SAIL LB1	1483 Bp	894 Bp
<i>degP11</i>	713_F04	DegP11_F/DegP11_R/GABI LB	1011 Bp	493 Bp

In Abbildung 3.31 sind die PCR-Produkte von Pflanzen der dritten Generation der Linien 355\_E03, 561\_F07 und 645\_D07 gezeigt. Alle drei Linien zeigten in der dritten Generation bereits Homozygotie.

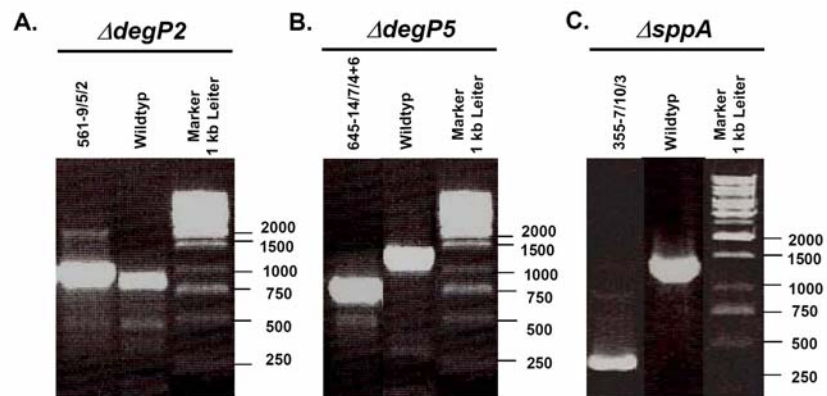


Abb. 3.31: PCR-Analysen der  $\Delta degP2$ - (A),  $\Delta degP5$ - (B) und  $\Delta sppA$ - (C) T-DNS-Insertionslinien. Die Amplifikationsprodukte der Wildtyp- und T-DNS-Insertionslinien entsprachen den aus Tabelle 3.3 erwarteten Größen.

Die Linien 414\_D07 und 713\_F04 waren erst in der zweiten Generation ausgesät und trugen die T-DNS-Insertion immer noch heterozygot.

Um die exakte Position der T-DNS im Gen zu bestimmen, wurden die PCR-Produkte, die aus einem genspezifischen und einem T-DNS-spezifischen Oligonukleotid erhalten wurden, sequenziert. Die Sequenzanalysen haben ergeben, dass sich die T-DNS-Insertion der Linie 561\_F07 im Promotor-Bereich des *degP2*-Gens 6 Basen vor dem ATG-Startkodon befand. Die Insertion der Linie 645\_D07 befand sich 31 Basen hinter dem vierten Exon und die der Linie 355\_E03 54 Basen vor dem letzten Exon.



### 3.6 Transkriptions- und Western-Analysen von $\Delta degP2$ -, $\Delta degP5$ - und $\Delta sppA$ -Mutanten

Der totale Gen-„knock out“ der homozygot getesteten  $\Delta degP2$ -,  $\Delta degP5$ - und  $\Delta sppA$ -Mutanten durch die T-DNS-Insertion wurde durch Transkriptionsanalyse und Western-Analyse überprüft. Die Linie 561\_F07 trug die T-DNS-Insertion in der Promotorregion und nicht im Genbereich selbst. Hier musste überprüft werden, ob das Gen wirklich zerstört worden war oder ob nur die Transkriptionsrate verändert war. Dazu wurde Wildtyp- und Mutanten-RNS aus jungen homozygoten *Arabidopsis*-Pflanzen extrahiert, mit DNase I verdaut und mit Hilfe Reverser Transkriptase in cDNS übersetzt. Diese cDNS wurde anschließend in eine PCR eingesetzt. Als Kontrolle diente Wildtyp-cDNS, die auf jeden Fall ein Transkript des jeweiligen Gens zeigen sollte. Das Vorhandensein und die Funktionalität der cDNS der Mutanten wurde außerdem in einer PCR mit Oligonukleotiden gegen ein intaktes Gen sichergestellt (Kontrolle (K); Abb. 3.32). In Tabelle 3.4 sind die erwarteten PCR-Produktgrößen aufgelistet. Allen homozygoten Mutanten fehlte das Transkript des „knock out“-Gens (Abb. 3.32).

Tabelle 3.4: Länge der Amplifikationsprodukte der cDNS der *deg*- und *sppA*-Wildtypgene und T-DNS-Linien.

Gen	Linie	Oligonukleotide	Kontrolle (K) Mutanten cDNS	WT cDNS (ohne Introns)	WT DNS (mit Introns)
<i>degP2</i>	561_F07	DegP2_F3/DegP2_rev	735 Bp mit <i>degP5</i> Oligon.	369 Bp	795 Bp
<i>degP5</i>	645_D07	DegP5_for2/DegP5_rev2	369 Bp mit <i>degP2</i> Oligon.	735 Bp	1483 Bp
<i>sppA</i>	355_E03	SppA_F5/SppA_R	735 Bp mit <i>degP5</i> Oligon.	655 Bp	1484 Bp

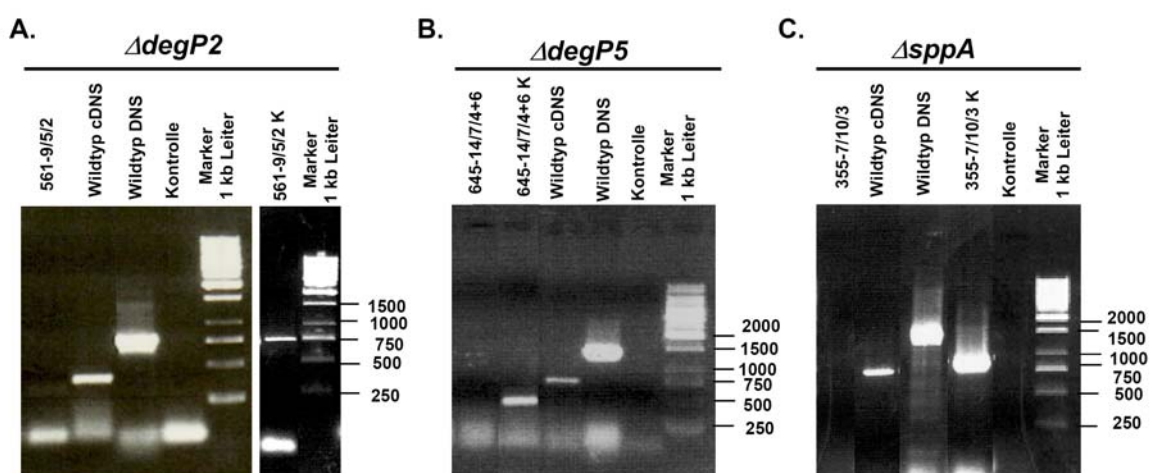
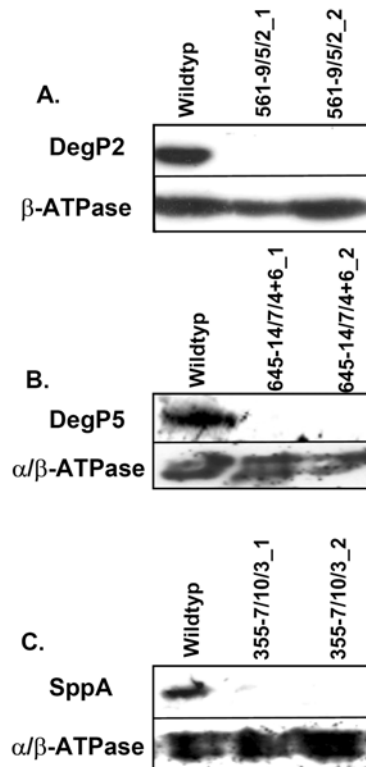


Abb. 3.32: Test auf „knock out“ der Transkription der *degP2*- (A), *degP5*- (B) und *sppA*-Gene (C) in den T-DNS-Insertionslinien. 561-9/5/2, 645-14/7/4+6 und 355-7/10/3 bezeichnen die jeweiligen „knock out“-Linien in der dritten Generation. Die Kontrolle war ein PCR-Ansatz ohne DNS. Die Qualität der cDNS der Mutantenlinien wurde mit einem alternativen Oligonukleotidpaar getestet und in der Abbildung mit einem zusätzlichen K bezeichnet. Die Amplifikationsprodukte des Wildtyps und der T-DNS Insertionslinien entsprachen den aus Tabelle 3.4 erwarteten Größen.

Außerdem wurde die Expression der Gene auch auf Proteinebene überprüft. Wildtyp und Mutanten sind unter normalen Bedingungen gewachsen. Die Thylakoidmembranen wurden extrahiert, durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Anwesenheit des intakten Proteins wurde mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen DegP2, DegP5 und SppA überprüft. Als Kontrolle diente ein Antikörper gegen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten der ATP-Synthase. Die Produkte der ausgeschalteten Gene der homozygot getesteten Mutanten konnten immunologisch ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.33).



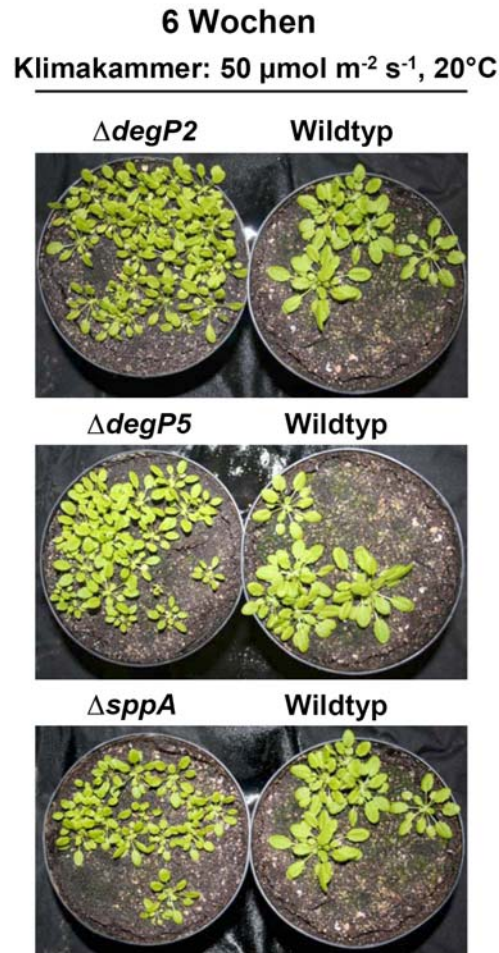
**Abb. 3.33: Test auf „knock out“ der T-DNS-Insertionslinien  $\Delta degP2$  (A),  $\Delta degP5$  (B) und  $\Delta sppA$  (C) auf Proteinebene.** Für jede Western-Analyse wurden je eine Wildtyp-Pflanze und je zwei Pflanzen (1, 2) einer Insertionslinie getestet. Als Kontrolle gleicher Auftragsmenge diente ein Ansatz mit  $\alpha/\beta$ -ATPase-Antikörper.

### 3.7 Wachstumsanalysen

#### 3.7.1 Phänotypische Charakterisierung unter Standardbedingungen

Das Wachstum von *Arabidopsis*-Wildtyp und -Mutantenlinien wurde unter verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen analysiert. Zuerst wurden die Pflanzen unter stets gleichbleibenden Bedingungen einmal im Gewächshaus ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $25^\circ\text{C}$ ) und einmal in einer Klimakammer ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Tag-Nachtrhythmus 10 : 14 Std.,  $20^\circ\text{C}$ ) angezogen und beobachtet. Für Wachstumsanalysen wurde auf das Sprühen mit BASTA verzichtet, da dieses sich kurzfristig negativ auf die Wachstumsgeschwindigkeit auswirkt.

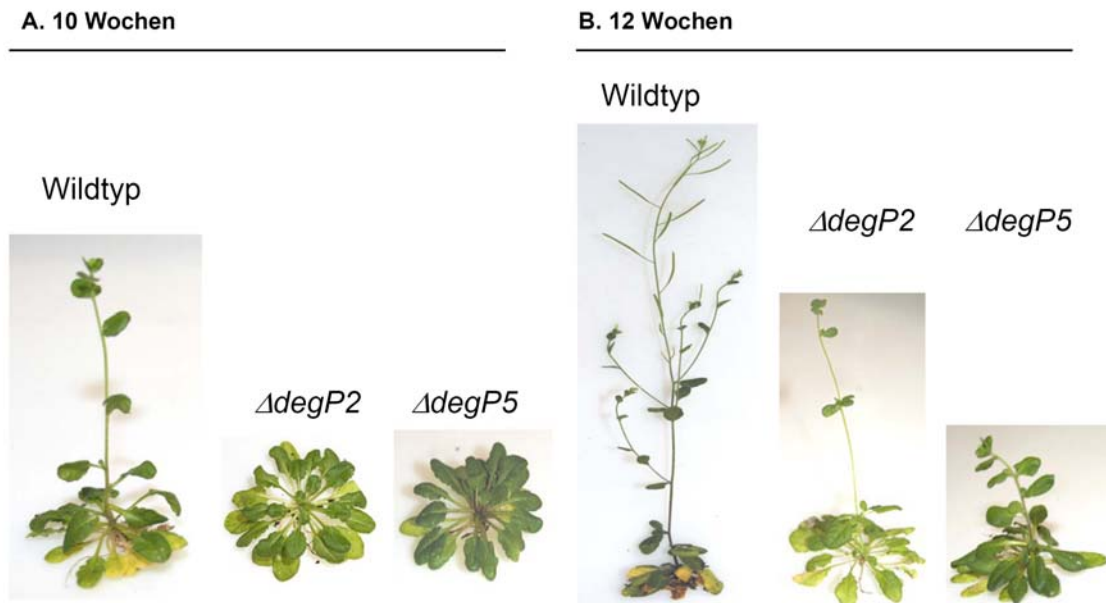
Um sicherzugehen, dass die Pflanzen dennoch homozygot waren, wurden zur Anzucht nur Samen einer einzelnen homozygot getesteten Pflanze verwendet. In einer Klimakammer mit stets gleichbleibenden Bedingungen zeigte der Wildtyp nach sechs Wochen ein etwas schnelleres Wachstum als die Mutanten  $\Delta degP2$ ,  $\Delta degP5$  und  $\Delta sppA$  (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Phänotypische Charakterisierung der Pflanzen der T-DNS-Insertionslinien  $\Delta degP2$ ,  $\Delta degP5$  und  $\Delta sppA$ .** Wildtyp- und Mutantepflanzen wurden 6 Wochen in der Klimakammer bei  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $20^\circ\text{C}$  kultiviert.

Im Gewächshaus unterliegen Bedingungen wie Temperatur und auch Licht stets Schwankungen, die jedoch in einem Bereich liegen, der noch nicht als Stress für die Pflanzen empfunden wird. Im Gewächshaus waren stärkere Lampen ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) als in der Klimakammer ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) installiert. Die Temperatur lag meist bei  $25^\circ\text{C}$ , was für *Arabidopsis*, die für die Entwicklung  $20 - 22^\circ\text{C}$  bevorzugen, etwas zu warm ist. Bei den Deg-Mutanten konnte eine Entwicklungsverzögerung beobachtet werden. Nach 10 Wochen startete der Wildtyp bereits die Stängelbildung (ca. 8 cm). Die beiden Mutanten lagen immer noch in der Rosettenform vor. Die Größe und Anzahl der Rosettenblätter waren bei  $\Delta degP2$  (ca. 24) und  $\Delta degP5$  (ca. 22) annähernd gleich. Sie unterschieden sich

jedoch von der Größe und Anzahl der Rosettenblätter des Wildtyps, die zwar etwas größer, jedoch in geringerer Menge (ca. 45%) vorhanden waren (Abb. 3.35A).



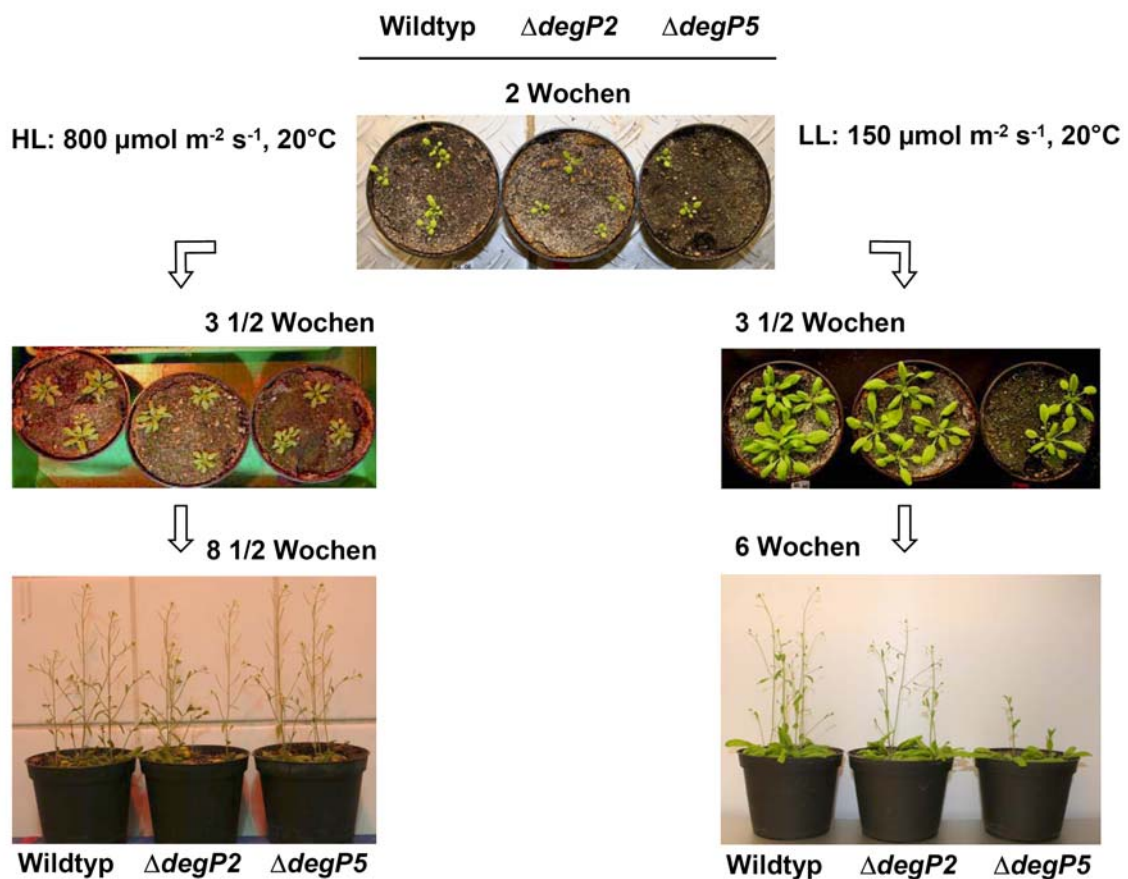
**Abb. 3.35: Charakterisierung des Wachstumsverhaltens des Wildtyps und der T-DNS-Insertionslinien  $\Delta degP2$  und  $\Delta degP5$ .** Wildtyp- und Mutantpflanzen wurden 10 (A) bzw. 12 Wochen (B) im Gewächshaus bei  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  kultiviert.

Nach 12 Wochen war die Anzahl der Rosettenblätter bei Wildtyp und beiden Mutanten zu etwa 50% zurückgegangen. Die Größe der Blätter unterschied sich auch kaum mehr. Der Wildtyp hatte die Blütenbildung abgeschlossen und trug bereits Schoten.  $\Delta degP2$  befand sich in dem Stadium der Stängelbildung (ca. 9 cm), die der Wildtyp bereits nach 10 Wochen erreicht hatte. Die  $\Delta degP5$ -Mutante zeigte im Vergleich zur  $\Delta degP2$ -Mutante eine noch stärkere Verzögerung in der Entwicklung. Der Stängel war hier erst 3 cm lang (Abb. 3.35B). Für die vollständige Entwicklung bis zur Schotenbildung brauchte die  $\Delta degP2$ -Mutante weitere zwei Wochen, die  $\Delta degP5$ -Mutante weitere drei Wochen (Daten nicht gezeigt).

### 3.7.2 Phänotypische Charakterisierung unter Starklicht

Um zu überprüfen, ob der unter normalen Bedingungen gezeigte Phänotyp auch unter anderen Bedingungen gezeigt wurde, wurden Wachstumsexperimente unter Starklicht (HL:  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durchgeführt. Wildtyp-,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Samen wurden auf Erde ausgesät und zwei Wochen unter Standardbedingungen ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Tag-Nachtrhythmus 10 : 14 Std.,  $20^\circ\text{C}$ ) wachsen gelassen, bevor sie unter Starklicht gestellt wurden. Als Kontrolle dienten parallel unter Standardbedingungen gewachsene Wildtyp- und Mutantpflanzen, die unter denselben Bedingungen weiterwuchsen (Abb. 3.36).

Nach 3 1/2 Wochen unter Schwachlicht war zwischen Wildtyp- und  $\Delta degP2$ -Mutante kaum ein Unterschied hinsichtlich der Größe zu erkennen. Lediglich die  $\Delta degP5$ -Mutante wuchs etwas langsamer, hatte kleinere und weniger Blätter. Die Pflanzen, die gleichzeitig unter Starklicht gewachsen waren, waren insgesamt viel kleiner und außerdem viel dichter gewachsen. Die Blätter standen ganz eng aneinander und besaßen kaum Blattstiele. Untereinander zeigten die Mutanten keine Unterschiede im Wachstum. Nur der Wildtyp besaß etwas größere Blätter und damit einen etwas größeren Rosetten-durchmesser (ca. 3,5 cm) als beide Mutanten (je ca. 2,8 cm; Abb. 3.36 Mitte).



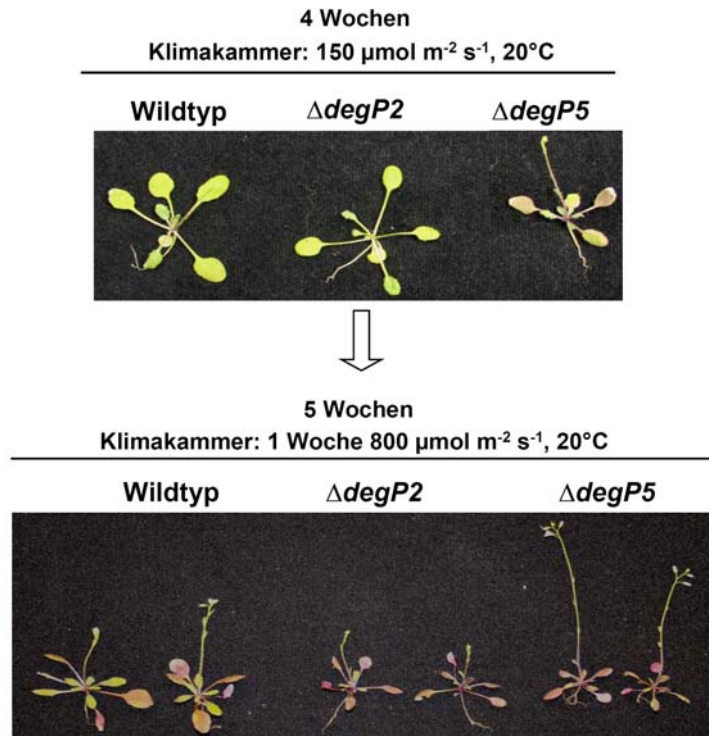
**Abb. 3.36: Phänotypische Charakterisierung von *Arabidopsis*-Wildtyp, - $\Delta degP2$ - und - $\Delta degP5$ -Mutanten unter Starklichtbedingungen.** Wildtyp- und Mutantepflanzen wurden in der Klimakammer bei  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $20^\circ\text{C}$  (LL) kultiviert. Nach 2 Wochen wurde ein Teil der Pflanzen unter  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht (HL) gestellt, während der andere Teil als Kontrolle unter LL Bedingungen weiterkultiviert wurde.

Nach 6 Wochen unter Schwachlicht zeigten Wildtyp und Mutanten ein bereits aus Abbildung 3.35B bekanntes Wachstumsmuster. Der Wildtyp war bereits voll entwickelt (Länge: 19 cm), trug Blüten und einige Schoten, während die  $\Delta degP2$ -Mutante noch kürzere Stängel (14 cm) besaß und nur wenige Blüten. Die  $\Delta degP5$ -Mutante lag in der Entwicklung noch weiter zurück. Die Stängellänge betrug lediglich 6 bzw. 3 cm und die Blüten lagen nur in Knospenform vor. Für die vollständige Entwicklung bis zur Schoten-

bildung brauchte die  $\Delta degP2$ -Mutante noch etwa 4 Tage, die  $\Delta degP5$ -Mutante noch 1 1/2 Wochen.

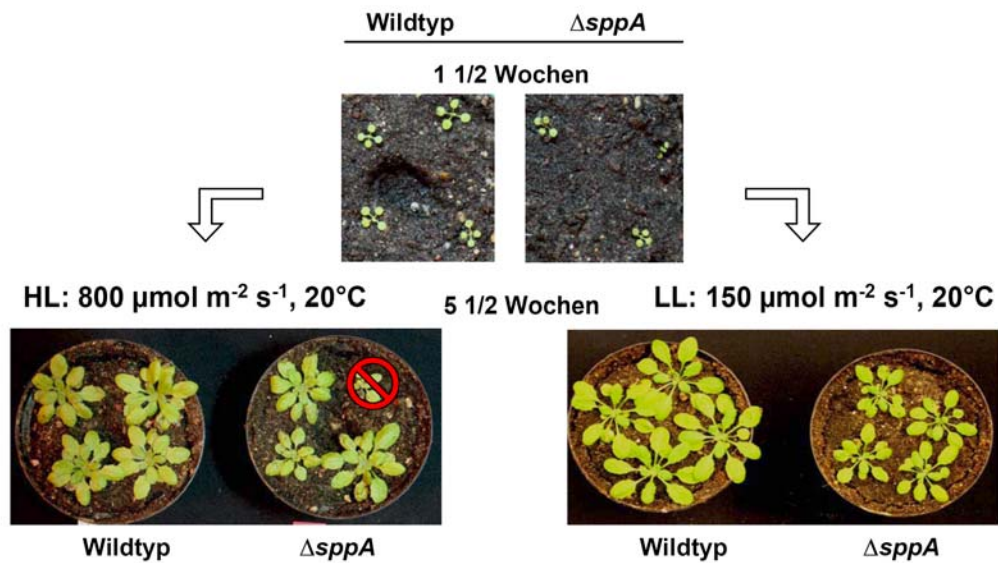
Die Pflanzen, die unter Starklicht gewachsen waren, brauchten für die Entwicklung wesentlich länger. Erst nach 8 1/2 Wochen hatten alle Pflanzen gut entwickelte Stängel (ca. 18 cm) und trugen einige Blüten. Schoten waren jedoch noch keine vorhanden. Sie haben erst nach 8 1/2 Wochen das Stadium erreicht, das der Wildtyp unter Schwachlicht bereits nach knapp 6 Wochen erreichte. Die Wachstumsunterschiede, die Wildtyp und Mutanten unter Schwachlicht zeigten, waren hier nicht mehr vorhanden. Der Phänotyp war unter Starklicht verschwunden (Abb. 3.36 unten).

Der Starklichtversuch wurde in einer anderen Klimakammer wiederholt. Das Licht dieser Klimakammer hatte deutlich mehr Rotlichtanteile als das Licht der vorigen Versuche (Weißlicht). Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten wuchsen vier Wochen unter Standardbedingungen ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Tag-, Nachtrhythmus 14 : 10 Std.,  $20^\circ\text{C}$ ), bevor sie unter Starklicht gestellt wurden (Abb. 3.37). Der Wildtyp hatte etwas größere Blätter als die Mutanten. Die Blattgröße der Mutanten untereinander war annähernd gleich, jedoch hatte die  $\Delta degP5$ -Pflanze kürzere Blattstängel und unter diesen Lichtbedingungen bereits Anthocyane gebildet, welche die Blätter leicht rötlich gefärbt haben. Außerdem war bei der  $\Delta degP5$ -Mutante bereits ein kleiner Stängelansatz (2 cm) zu erkennen, der beim Wildtyp und der  $\Delta degP2$ -Mutante noch komplett fehlten (Abb. 3.37 oben). Die Pflanzen wurden dann für eine Woche unter Starklicht ( $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gestellt, wobei in den ersten drei Tagen kein Tag-/Nachtrhythmus geschaltet war, d. h. die Pflanzen standen durchgehend unter Starklicht. Nach einer Woche war bei allen Pflanzen die Anthocyanbildung an den rötlich gefärbten Blättern zu erkennen. Der Wildtyp hatte größere Blätter und durchschnittlich 10 Stück an der Rosette, während die Mutanten kleinere Blätter hatten und nur ca. 8 an der Rosette trugen. Wildtyp und  $\Delta degP2$ -Mutante zeigten nun auch einen Stängelansatz, den die  $\Delta degP5$ -Mutante bereits unter Standardbedingungen gezeigt hatte. Beim Wildtyp war dieser etwas länger (ca. 3 - 3,5 cm) als bei der  $\Delta degP2$ -Mutante (2 - 2,5 cm). Der Stängel der  $\Delta degP5$ -Mutante war im Vergleich zu dem unter Standardbedingungen weitergewachsen (5,5 - 7 cm) und trug bereits erste Blütenknospen, jedoch nur sehr wenige und winzig kleine Blätter (Abb. 3.37 unten). Die  $\Delta degP5$ -Mutante zeigte einen zu den vorigen Versuchen paradoxen Phänotyp. War die Entwicklung der  $\Delta degP5$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp in den anderen Wachstumsversuchen unter Standardbedingungen verzögert (Abb. 3.35B und 3.36) bzw. unter Starklichtbedingungen gleichschnell (Abb. 3.36), so war sie in diesem Versuch fortgeschrittener (Abb. 3.37). Der Phänotyp von Wildtyp und  $\Delta degP5$ -Mutante hatte sich umgekehrt.



**Abb. 3.37: Wachstumsuntersuchungen von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten unter Starklichtbedingungen.** Wildtyp und Mutantepflanzen wurden in der Klimakammer bei  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $20^\circ\text{C}$  (LL) kultiviert. Nach 4 Wochen wurden die Pflanzen unter  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht (HL), welches mehr Rotlichtanteile als das in Abb.3.36 enthielt, gestellt.

Im letzten Wachstumsversuch sollte der Phänotyp der  $\Delta sppA$ -Mutante unter Starklicht untersucht werden. Samen von Wildtyp und  $\Delta sppA$ -Mutanten wurden auf Erde ausgesät und 1 1/2 Wochen unter Standardbedingungen in einer Klimakammer ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Tag-, Nachtrhythmus 14 : 10,  $20^\circ\text{C}$ ) wachsen gelassen, bevor sie unter Starklicht ( $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gestellt wurden (Abb. 3.38). Unter Standardbedingungen zeigte der Wildtyp eine schnellere Keimung und eine schnellere Entwicklung als die Mutante. Im Schnitt trug der Wildtyp nach 5 1/2 Wochen ca. 11 Blätter an der Rosette, die Mutante im Schnitt 10 Blätter. Die Blätter des Wildtyps waren auch etwas größer als die der Mutante, was zu einem Rosettendurchmesser von ca. 5,5 cm beim Wildtyp und 3,5 cm bei der Mutante führte (Abb. 3.38 rechts). Unter Starklichtbedingungen zeigten sowohl Wildtyp als auch Mutante eine langsamere Entwicklung. Die Blätter hatten kürzere Stängel und saßen somit näher an der Rosette. Jedoch war die Größe und Anzahl der Blätter und der Rosettendurchmesser zwischen Wildtyp (ca. 12 Blätter; 4,5 cm) und Mutante (9 - 12 Blätter, 3,5 - 4,5 cm) annähernd gleich (Abb. 3.38 links). Auch hier schaffte es die Mutante, den Phänotyp, der unter Standardbedingungen gezeigt wurde, durch die langsamere Entwicklung unter Starklichtbedingungen auszugleichen.



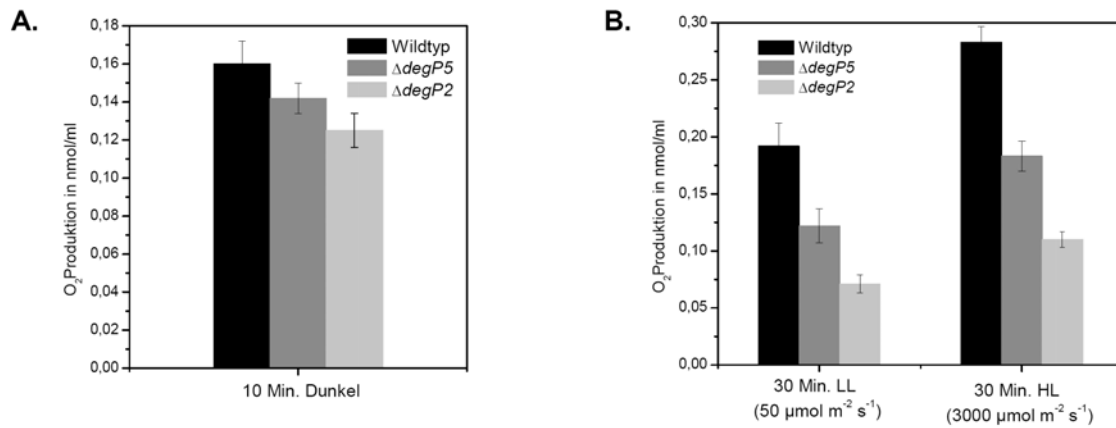
**Abb. 3.38: Phänotypische Charakterisierung von *Arabidopsis*-Wildtyp und  $\Delta$ *sppA*-Mutante unter Starklichtbedingungen.** Wildtyp- und Mutantepflanzen wurden in der Klimakammer bei  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und  $20^\circ\text{C}$  (LL) kultiviert. Nach ca.  $1 \frac{1}{2}$  Wochen wurde ein Teil der Pflanzen unter  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht (HL) gestellt, während der andere Teil als Kontrolle unter LL Bedingungen weiterkultiviert wurde. Später gekeimt Pflanzen wurden nicht berücksichtigt ( $\otimes$ ).

### 3.8 Biophysikalische Analysen

#### 3.8.1 Sauerstoffmessung mit Hilfe der Clark-Elektrode

Um festzustellen, ob die DegP2- und DegP5-Proteine die Aktivität der photosynthetischen Membranen beeinflussten, wurde die Sauerstoff-Produktion von Wildtyp,  $\Delta$ *degP2*- und  $\Delta$ *degP5*-Mutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen mittels einer Clark-Elektrode gemessen und miteinander verglichen. Die Pflanzen wurden unter Standardbedingungen ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ) etwa 3 - 4 Wochen herangezogen. Für die Messungen wurden 0,05 g Blattmaterial geerntet und mit einer Rasierklinge in kleine Quadrate geschnitten. Vor der Bestrahlung mit Schwachlicht (LL:  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bzw. Starklicht (HL:  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurden die Blattquadrate für 10 Min. dunkeladaptiert. Der Sauerstoffgehalt nahm in diesen ersten 10 Min. ab, was als Dunkelatmung bezeichnet wird (Abb. 3.39A). Nach der Bestrahlung mit Licht wurde die Photosynthese aktiviert, was anhand der Sauerstoffproduktion gemessen wurde (Abb. 3.39B). Bestrahlt wurde für 30 Min. mit Schwachlicht bzw. 30 Min. mit Starklicht. Die Messwerte wurden aus der Differenz von Sauerstoffmenge nach der Dunkeladaptation und Sauerstoffmenge nach 30 Min. Lichtbestrahlung berechnet. Wildtyp und Mutanten zeigten bereits unterschiedliche Werte bei der Dunkelatmung. Die Atmung beider Mutanten war um 12% ( $\Delta$ *degP5*) bzw. 22% ( $\Delta$ *degP2*) geringer als die des Wildtyps (Abb. 3.39A).





**Abb. 3.39: Sauerstoffproduktion von Wildtyp, ΔdegP2- und ΔdegP5-Mutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen.** Je 0,05 g Blattmaterial von jungen *Arabidopsis*-Pflanzen wurde für die Messungen in kleine Quadrate geschnitten. Die Atmungsaktivität wurde für 10 Min. im Dunkeln gemessen (A). Die Sauerstoffproduktion wurde bei konstanter Temperatur von 25°C für je 30 Min. unter Schwachlicht (LL) bzw. Starklicht (HL, B) gemessen.

Auch bei der Bestrahlung mit Schwachlicht zeigten sich beide Mutanten stark betroffen. Die Sauerstoffproduktion der ΔdegP5-Mutante lag um ca. 35%, die der ΔdegP2-Mutante sogar um über 60% unter dem Wert des Wildtyps (Tabelle 3.5). Diese Werte unter Schwachlicht waren zu erwarten, da beide Mutanten in der Entwicklung unter Schwachlicht Verzögerungen zeigten (Abb. 3.34). Bei der Bestrahlung mit Starklicht zeigten Wildtyp und Mutanten ähnliche Unterschiede wie unter Schwachlicht. Insgesamt war die Sauerstoffproduktion höher als unter Schwachlicht (Abb. 3.39B). Die photosynthetische Aktivität unter Starklicht, gemessen an der Sauerstoffproduktion, war jedoch bei der ΔdegP5-Mutante wieder um 35% und bei der ΔdegP2-Mutante wieder um etwa 60% im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Tabelle 3.5). Jedoch schien die erhöhte Sauerstoffproduktion unter Starklicht auszureichen, um die Wachstumsverzögerung zwischen Wildtyp und Mutanten auszugleichen (Abb. 3.36).

**Tabelle 3.5: Photosynthetische Aktivität gemessen anhand der Sauerstoffproduktion.**

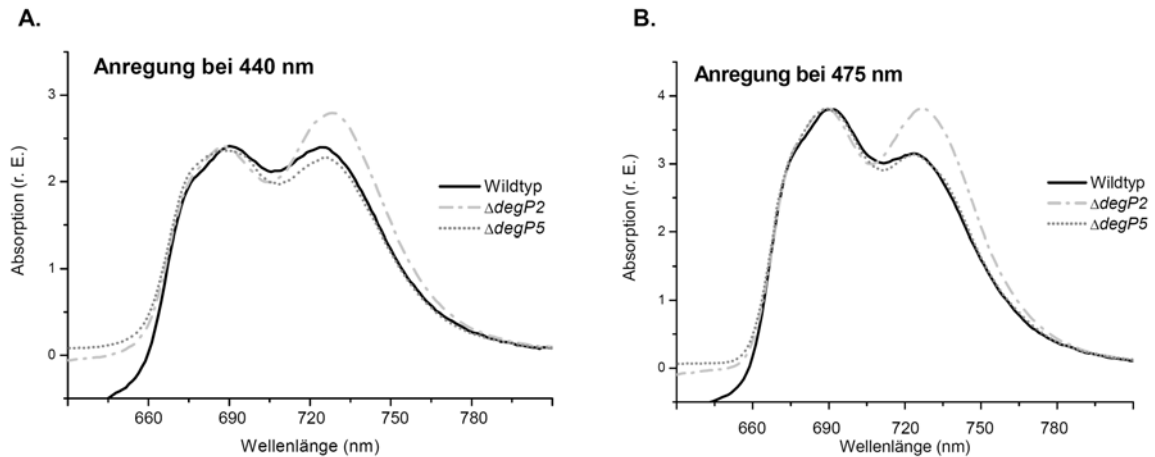
	Wildtyp	ΔdegP5	ΔdegP2
Dunkel	100%	88%	78%
LL	100%	64%	37%
HL	100%	65%	39%

Das Reaktionszentrum des PSII war unter allen hochmolekularen Thylakoidkomplexen das lichtsensitivste. Die Bestrahlung mit sehr starkem Licht resultierte in einer Photoinaktivierung, was meist mit der Beschädigung und dem Abbau des D1-Proteins zu tun hatte. Durch diese Beschädigung geht auch die photosynthetische Aktivität zurück, was zu einer geringeren Sauerstoffproduktion führt. Um das PSII wieder funktionstüchtig zu

machen, musste das alte, beschädigte D1-Protein abgebaut werden und ein neu-synthetisiertes wieder eingebaut werden. Die verminderte Sauerstoffbildung unter beiden Lichtbedingungen könnte ein Indiz für eine schwächere Funktionalität des PSII beider Mutanten sein.

### 3.8.2 77K Fluoreszenzmessungen

Die Funktionalität beider Photosysteme und die Verteilung ihrer Antennen wurde in Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten durch 77K Fluoreszenzmessungen analysiert. Aus unter Standardbedingungen ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ) gewachsenen Wildtyp-, und Mutantepflanzen wurden Thylakoidmembranen extrahiert, 10 Min. dunkeladaptiert und in Kapillaren in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Anregung der *Arabidopsis*-Thylakoide bei 440 nm (Chlorophyll *a*) bzw. 475 nm (Chlorophyll *b*) zeigte ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum mit drei typischen Maxima bei 689 nm, 699 nm (PSII) und 735 nm (PSI). Diese Maxima zeigten die Emission von Chlorophyll *a*, welches mehr an die PSI/PSII-Reaktionszentren, bzw. Chlorophyll *b*, welches hauptsächlich an die PSI/PSII-Antennen gebunden war. Alle Spektren wurden auf das PSII-Maximum bei 699 nm normalisiert. Das Emissionsspektrum der  $\Delta degP2$ -Mutante zeigte sowohl bei Anregung mit 440 nm (Chlorophyll *a*) als auch bei Anregung mit 475 nm (Chlorophyll *b*) ein höheres PSI/PSII-Verhältnis als der Wildtyp und die  $\Delta degP5$ -Mutante (Abb. 3.40A und B). Während bei Anregung mit 440 nm Wildtyp und  $\Delta degP5$ -Mutante für PSI und PSII je gleich hohe Maxima zeigten (Abb. 3.40A), war bei Anregung mit 475 nm jeweils das PSII-Maximum höher als das PSI-Maximum (Abb. 3.40B). Möglicherweise war mehr Chlorophyll *a* an die Reaktionszentren der Photosysteme gebunden als an die Antennen, was einen geringeren Unterschied zwischen PSI und PSII ergab als bei Anregung mit Chlorophyll *b*. Bei ausgewählten Lichtbedingungen („state 1“) sind die LHCII-Antennen großteils mit dem PSII assoziiert. Die  $\Delta degP2$ -Mutante zeigte ein umgekehrtes Verhalten. Hier war das PSI-Maximum bei Anregung mit 440 nm höher als das PSII Maximum. Bei Anregung mit 475 nm waren PSI- und PSII-Maximum jedoch gleichgroß (Abb. 3.40A und B).



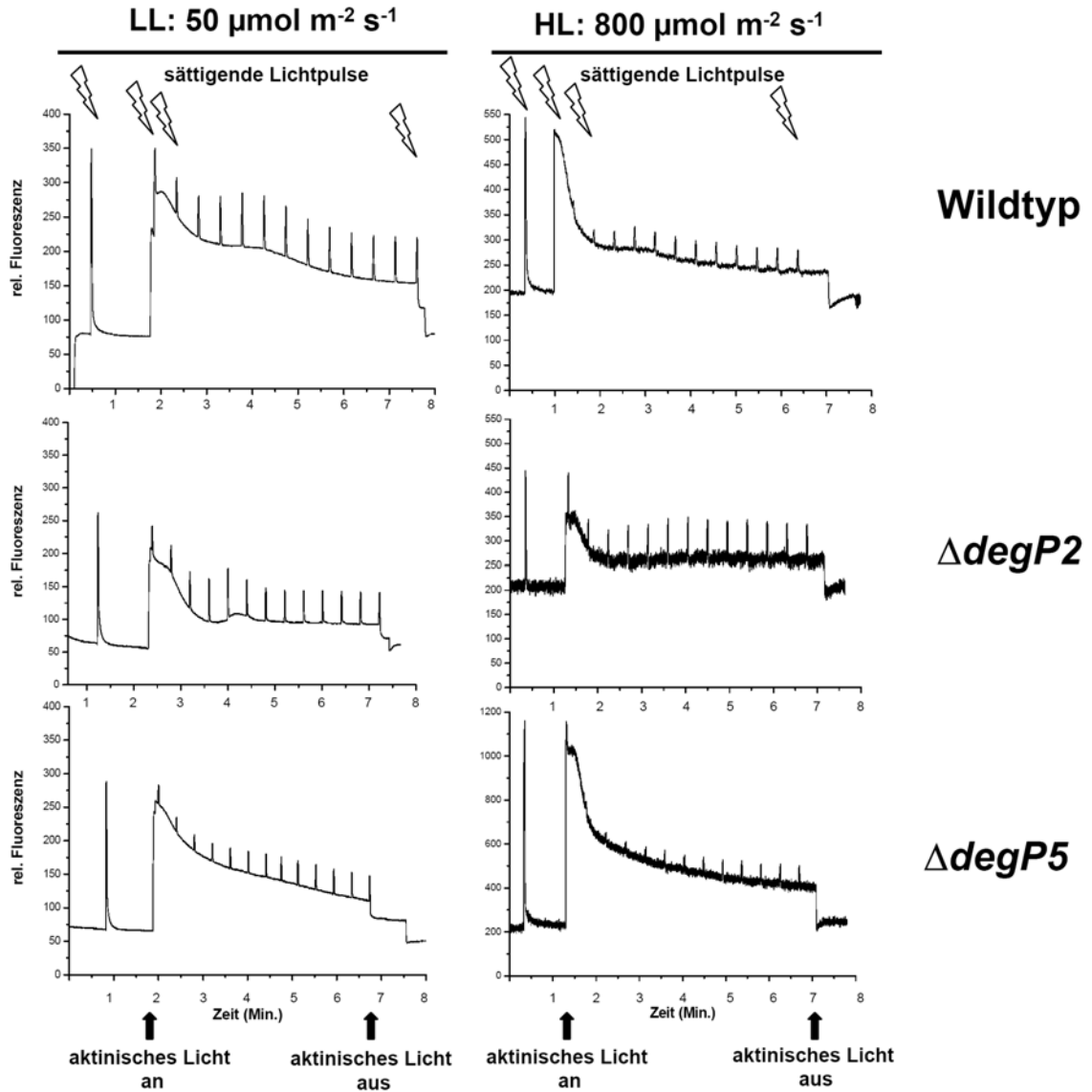
**Abb. 3.40: 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten.** Thylakoidmembranen wurden frisch extrahiert, auf eine Chlorophyllkonzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Emissionsspektren wurden bei Anregung mit 440 nm (Chlorophyll a, A) bzw. 475 nm (Chlorophyll b, B) gemessen. Die Spektren wurden auf das PSII-Maximum bei 685 nm normalisiert.

### 3.8.3 PAM-Fluoreszenzmessungen

Als Indikator für die potentielle Kapazität des PSII wurde das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz durch Bestrahlung des PSII mit gesättigten Lichtpulsen gemessen. Das Verhältnis  $F_v/F_m$  zeigt die photosynthetische Aktivität einer Pflanze und lässt Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand des Photosyntheseapparates zu. In einem ersten Versuch sollten die Auswirkungen der *degP2*- und *degP5*-Mutation auf die Photosyntheseleistungen nach Anwachsen (3 Wochen) unter Standardbedingungen (LL:  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und unter Starklicht (1 Woche HL:  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bewertet werden. Nach Belichtung dunkeladaptierter (max. 30 Min.) Blätter mit aktinischem Licht ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklichtimpulsen ( $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurde die Abnahme (= Löschung) der Chlorophyllfluoreszenz dokumentiert und die Anteile der photochemischen und nicht-photochemischen Löschung an der Gesamtlöschung berechnet (Abb. 3.41A).

Wie zu erwarten war, war die photosynthetische Aktivität  $F_v/F_m$  bei Wildtyp und  $\Delta degP2$ -Mutante, die unter Starklicht (HL) angewachsen waren, geringer. Das Anwachsen unter  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht schien jedoch für die  $\Delta degP5$ -Mutante hinsichtlich der photosynthetischen Aktivität keine Auswirkungen zu haben.  $F_v/F_m$  war hier sogar höher als bei der  $\Delta degP5$ -Mutante, die unter Schwachlicht (LL) gewachsen war. Ebenso betroffen war die photochemische Löschung, die bei allen HL-Pflanzen geringer war als bei den LL-Pflanzen. Analog dazu stieg der Wert der nicht-photochemischen Löschung (NPQ) bei unter HL gewachsenen Wildtyp und  $\Delta degP5$ -Pflanzen an. Die unter HL gewachsene  $\Delta degP2$ -Pflanze zeigte jedoch auch eine schwächere NPQ, die unter derjenigen der LL

gewachsenen  $\Delta degP2$ -Pflanze lag. Die NPQ der  $\Delta degP5$ -Pflanze lag sowohl bei LL als auch bei HL gewachsenen Pflanzen über dem Wert der anderen Pflanzen. Mehr Energie wird hier als NPQ abgegeben (Tabelle 3.6).

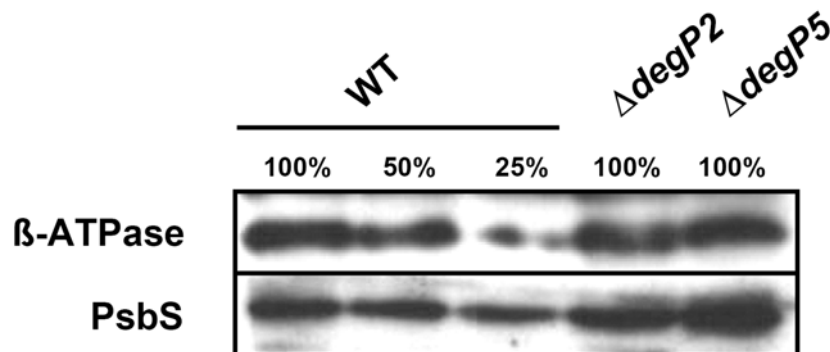


**Abb. 3.41A: PAM-Fluoreszenzmessungen von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten unter Schwachlicht und Starklicht.** Die Pflanzen wurden zwei Wochen unter Standardbedingungen (LL) kultiviert und anschließend für eine Woche unter Starklicht (HL) gestellt. Einzelne Blätter wurden erst mit einem sättigenden Lichtpuls ( $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und anschließend 13 sättigenden Lichtpulsen unter aktinischem Licht bestrahlt. Pfeile markieren das Zu- und Abschalten des aktinischen Lichtes. Die sättigenden Lichtimpulse sind durch Blitzsymbole gekennzeichnet.

Tabelle 3.6: Daten der PAM-Fluoreszenzmessungen.

	qP photochemische Löschung	NPQ nicht-photochemische Löschung	$\Phi_{PSII}$ Quantenausbeute PSII	Fv/Fm max. Quantenausbeute
Wildtyp LL	0,726	0,584	0,462	0,77
Wildtyp HL	0,477	0,936	0,146	0,64
$\Delta degP2$ LL	0,896	0,845	0,486	0,752
$\Delta degP2$ HL	0,542	0,342	0,197	0,527
$\Delta degP5$ LL	0,872	0,94	0,459	0,756
$\Delta degP5$ HL	0,366	1,29	0,211	0,806

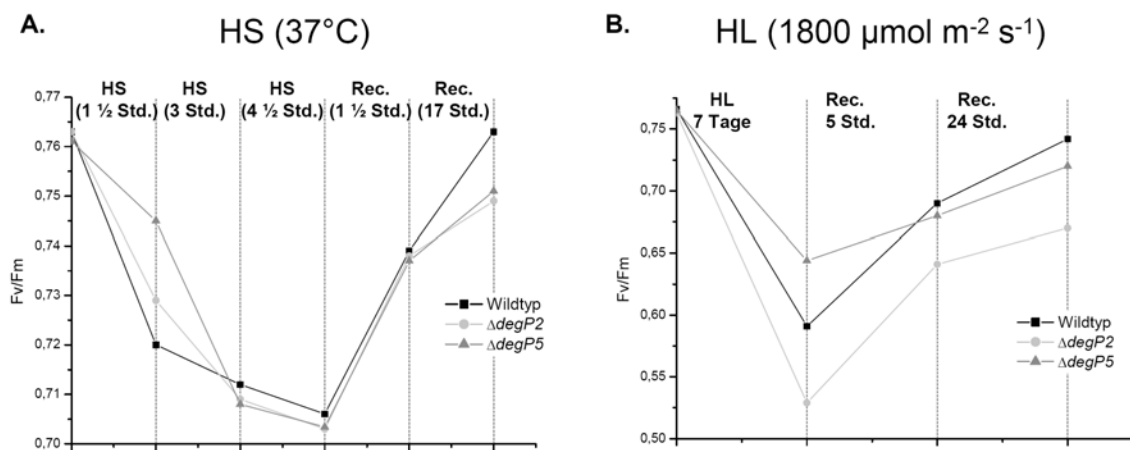
Das NPQ besteht aus drei Komponenten, der Photoinhibierung, durch den Koeffizienten qI beschrieben, der „state transition“ qT und dem „de-excitation quenching“ qE. qE ist dabei abhängig von der Anwesenheit des Proteins PsbS (Li *et al.*, 2000), de-epoxydierten Xanthophyllen (Demming-Adams *et al.*, 1989) und einem niedrigen pH Wert im Lumen (Müller *et al.*, 2001). In weiteren Versuchen musste überprüft werden, ob die Photoinhibierung und die „state transition“ funktionierte und ob das PsbS-Protein in gleicher Menge wie im Wildtyp vorhanden war. Dazu wurden Thylakoidmembranen von Wildtyp (100%, 50% und 25%),  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutante (je nur 100%) mittels SDS-PAGE getrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen PsbS inkubiert (Abb. 3. 41B).



**Abb. 3.41B : Nachweis des PsbS-Proteins in Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten unter Standardbedingungen.** Thylakoidmembranen von *Arabidopsis*-Wildtyp und -Mutanten wurden durch eine SDS-PAGE getrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde das PsbS-Protein immunologisch nachgewiesen. Um das PsbS-Protein quantitativ in  $\Delta degP2$  und  $\Delta degP5$  nachweisen zu können, wurden Wildtyp-proteine in verschiedenen Mengen aufgetragen (100%, 50%, 25%). Als Kontrolle der Auftragsmenge diente der Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase.

In der  $\Delta degP2$ -Mutante konnte das PsbS-Protein in gleicher Menge wie im Wildtyp nachgewiesen werden. Die  $\Delta degP5$ -Mutante zeigte bei gleich starkem Signal der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase ein stärkeres PsbS-Signal.

In einem zweiten PAM-Versuch wurden Wildtyp-,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Pflanzen auf MS-Platten ausgelegt und für etwa 2 Wochen unter Standardbedingungen ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ) angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen einem Lichtstress ( $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bzw. Hitzestress ( $37^\circ\text{C}$ ) ausgesetzt. Der Hitzestressversuch wurde durchgeführt, da DegP in Bakterien eine Hitzeschockpeptidase ist. Eventuell ist die Funktion in Pflanzen ähnlich. Hitze beeinträchtigte die photosynthetische Aktivität in Wildtyp und Mutanten. Fv/Fm wurde dabei mit einem einzelnen gesättigtem Lichtpuls ( $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) vor jedem Versuch gemessen (N, LL), nach 7 Tagen Starklicht (HL 7 Tage), nach 5 Std. Erholung (Rec. 5 Std.) und 24 Std. Erholung (Rec. 24 Std.) bei  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , und außerdem nach 1 1/2, 3 und 4 1/2 Std. Hitzestress (HS) und nach 1 1/2 und 17 Std. Erholung (Rec.) bei  $20^\circ\text{C}$ . Unter Standardbedingungen lag das Fv/Fm-Verhältnis bei allen Pflanzen bei 0,765. Unter Hitzestress ging das Fv/Fm-Verhältnis anfänglich (nach 1,5 Std.), besonders bei der  $\Delta degP5$ -Mutante, nur langsam zurück. Jedoch sank der Wert mit der Dauer des Hitzestresses bei allen Pflanzen und fiel nach 4,5 Std. bei beiden Mutanten auf 0,703 und beim Wildtyp auf 0,706. Nach 1,5 Std. Erholungsphase (Rec.) bei  $20^\circ\text{C}$  stieg das Fv/Fm-Verhältnis bei allen gleichmäßig wieder auf etwa 0,738 an. Nach weiteren 15,5 Std. Erholung erreichte der Wildtyp seinen Ausgangswert von 0,765 wieder. Beide Mutanten lagen mit etwa 0,75 noch etwas darunter (Abb. 3.42A).



**Abb. 3.42: PAM-Fluoreszenzmessungen von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen.** *Arabidopsis*-Pflanzen wurden zwei Wochen unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend unter Hitzestress (HS, A) bzw. Starklicht (HL, B) gestellt. Die photosynthetische Aktivität Fv/Fm wurde vor und während den Stressbedingungen und nach unterschiedlich langen Erholungsphasen (Rec.) gemessen.

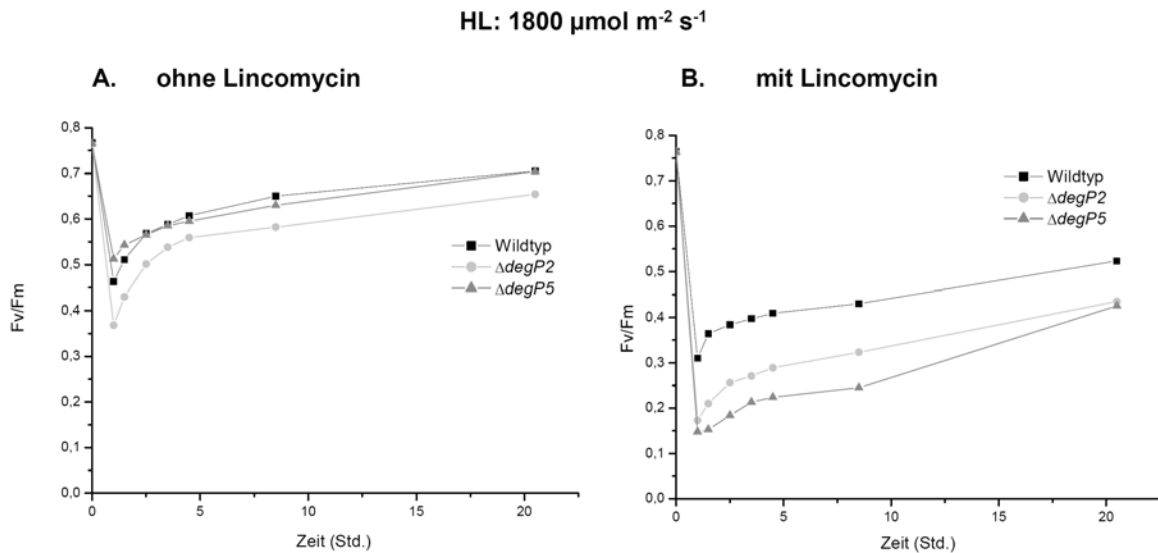
Unter Starklicht war die photosynthetische Aktivität bei allen Pflanzen wesentlich stärker betroffen als unter Hitze. Nach 7 Tagen unter Starklicht ( $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) war das Fv/Fm-Verhältnis beim Wildtyp vom 0,765 auf 0,591 gesunken, bei der  $\Delta degP2$ -Mutante auf 0,527 und bei der  $\Delta degP5$ -Mutante lediglich auf 0,64. Die  $\Delta degP5$ -Mutante schien

weniger anfällig gegen Lichtstress zu sein als der Wildtyp,  $\Delta degP2$  dagegen mehr. Dies konnte bereits im ersten PAM-Fluoreszenzversuch, der unter  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht durchgeführt wurde, dokumentiert werden (Tabelle 3.6). Während Wildtyp und  $\Delta degP2$ -Mutante bei  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ein ähnliches Erholungsmuster zeigten, verlief die Erholung bei  $\Delta degP5$  langsamer. Nach 24 Std. Erholung unter Schwachlicht lag der Fv/Fm-Wert der  $\Delta degP5$ -Mutante (0,721) sogar unter dem Wert des Wildtyps (0,743; Abb. 3.42B).

Das verglichen mit dem Wildtyp starke Abfallen der photosynthetischen Aktivität (Fv/Fm) der  $\Delta degP2$ -Mutante unter HL konnte eine gestörte Funktionalität des PSII sein. Mögliche Erklärungen dafür könnten eine ineffiziente Reparatur des beschädigten PSII (das D1 Protein wird eventuell nicht abgebaut) oder eine höhere Beschädigungsrate des PSII der Mutante sein. Ebenso kann das verglichen mit dem Wildtyp weniger starke Abfallen der photosynthetischen Aktivität der  $\Delta degP5$ -Mutante unter HL für eine effizientere Reparatur des PSII oder einer geringeren Beschädigungsrate des PSII sprechen. Um diese Alternativen zu überprüfen, wurde der Versuch unter  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht unter Anwesenheit von Lincomycin wiederholt. Lincomycin blockiert die Proteintranslation. Nach der Zugabe von Lincomycin kann das beschädigte PSII nicht mehr repariert werden. 2 - 3 Blätter von ca. 3 Wochen alten Pflanzen wurden für 1 Std. in ein Reaktionsgefäß mit bzw. ohne Lincomycin gestellt und mit  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht bestrahlt. Der Fv/Fm-Wert wurde zu Versuchsbeginn (vor der Lincomycinzugabe) gemessen, nach 1 Std. Starklicht und nach unterschiedlich langen Erholungsphasen (1/2, 1 1/2, 2 1/2, 3 1/2, 7 1/2 und 19 1/2 Std.). Der Versuch wurde einmal mit und einmal ohne Lincomycin durchgeführt (Abb. 3.43). Die Ergebnisse der Negativkontrolle (ohne Lincomycinzugabe) waren mit obigem PAM-Fluoreszenzversuch unter Starklicht vergleichbar (Abb. 3.42B). Die  $\Delta degP5$ -Mutante zeigte sich auch hier (1 Std. Starklicht) weniger lichtsensitiv als der Wildtyp.

Die  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten zeigten eine ähnliche Beschädigungsrate unter Photoinhibierungsbedingungen, dennoch war in der Negativkontrolle (ohne Lincomycin) die photosynthetische Aktivität der  $\Delta degP2$ -Mutante nach Starklicht geringer als in der  $\Delta degP5$ -Mutante. Möglicherweise besitzt diese Mutante ein ineffizientes Reparatursystem und kann daher die Beschädigung nicht so effizient wie z. B. der Wildtyp bzw. die  $\Delta degP5$ -Mutante ausgleichen. Die photosynthetische Aktivität der  $\Delta degP2$ -Mutante war stärker beeinflusst als im Wildtyp (Abb. 3.43A). Im Versuch mit Lincomycin, das als Proteintranslationsinhibitor verwendet wurde, war der Fv/Fm-Wert nach 1 Std. Starklicht bei allen Pflanzen geringer als in der Negativkontrolle (Abb. 3.43B). Diese Differenz kann als Reparaturrate betrachtet werden. Die größte Differenz zeigte die  $\Delta degP5$ -Mutante, die somit das effizientere PSII-Reparatursystem besitzt. Das D1-Protein des PSII war das

unter Starklicht am stärksten betroffene Protein mit der höchsten Umsatzrate. Falls beschädigtes D1-Protein in der  $\Delta degP2$ -Mutante nicht abgebaut und somit nicht durch ein neues D1-Protein ersetzt werden konnte, schlug sich das ebenfalls auf die photosynthetische Aktivität nieder.



**Abb. 3.43: PAM-Fluoreszenzmessungen von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten unter Starklicht.** *Arabidopsis*-Pflanzen wurden drei Wochen unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend unter Starklicht (HL) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Lincomycin gestellt. Die photosynthetische Aktivität Fv/Fm wurde vor, nach 1 Std. Starklicht und nach unterschiedlich langen Erholungsphasen gemessen.

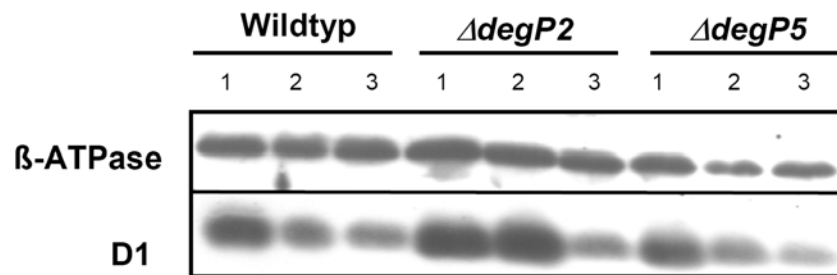
### 3.9 Biochemische Analysen von Wildtyp und $\Delta degP2$ - und $\Delta degP5$ -Mutanten

#### 3.9.1 Degradierung des D1-Proteins

Um herauszufinden, ob die DegP2- und DegP5-Proteasen in den Abbau des D1-Proteins involviert waren, wurde der D1-Abbau unter Starklicht in Wildtyp und beiden Mutanten immunologisch untersucht. Dazu wurden je 4 - 5 Blätter von jungen, unter Schwachlicht gewachsenen *Arabidopsis*-Pflanzen geerntet und 3 Std. in Lincomycin inkubiert, ehe sie für eine Std. unter Starklicht ( $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gestellt wurden. Als Kontrolle dienten Blätter, die parallel unter Schwachlicht ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) blieben und Blätter, die 3 Std. in Lincomycin unter Schwachlicht ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert wurden. Anschließend wurden Thylakoide extrahiert, auf einer SDS-PAGE separiert und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Der Abbau des D1-Proteins wurde immunologisch mit Antikörper gegen D1 nachgewiesen. Als Kontrolle für eine gleichbleibende Auftragsmenge diente ein Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase. Bei Wildtyp und beiden Mutanten war deutlich ein Abbau des D1-Proteins unter Starklicht zu erkennen (Abb. 3.44). Diese



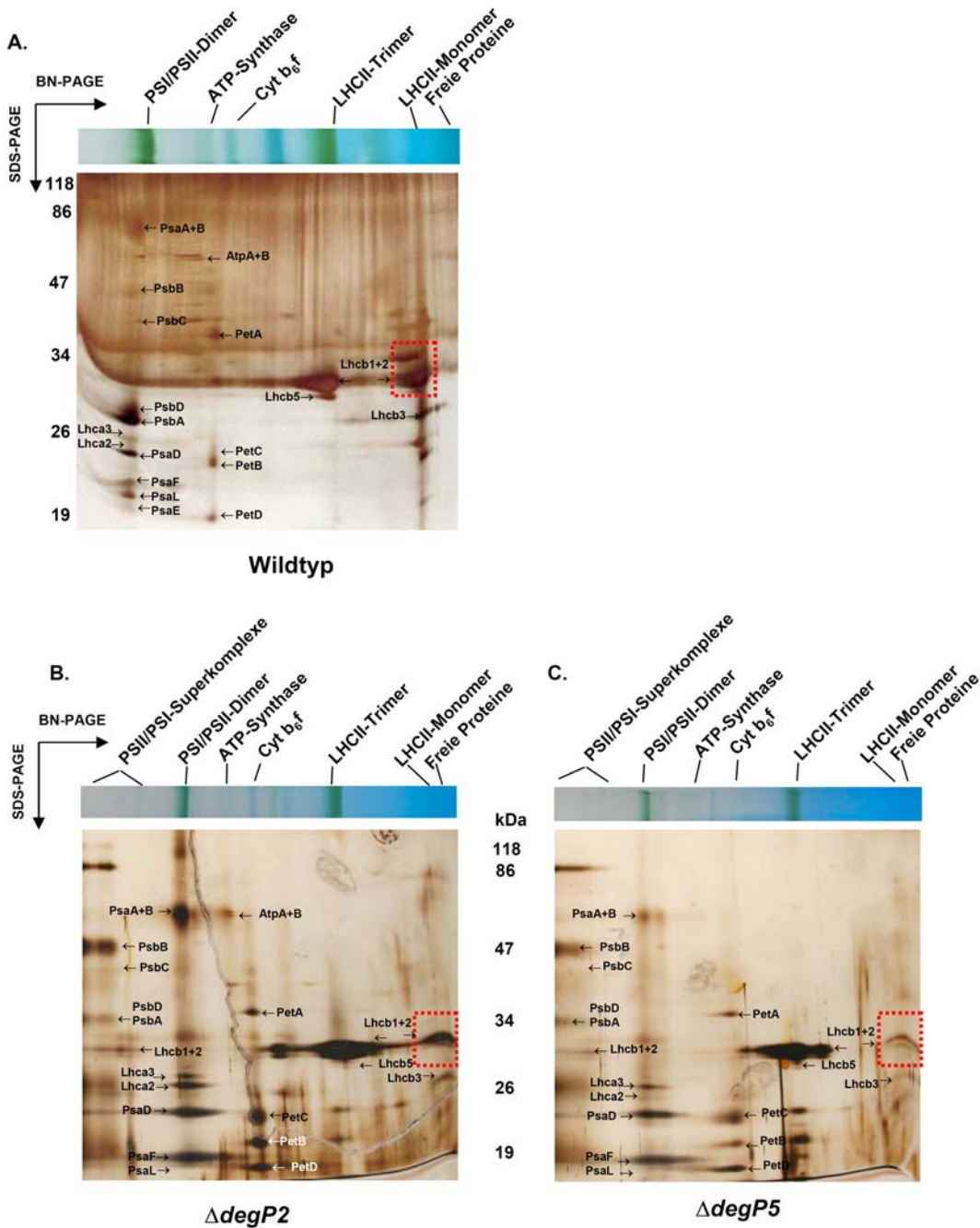
Western-Analysen zeigten die stationäre Menge des D1-Proteins, konnten aber nichts über die Abbaugeschwindigkeit des Proteins aussagen.



**Abb. 3.44: Degradierung des D1-Proteins in Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutante unter Starklichtbedingungen.** (1) 3 Wochen unter LL ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gewachsene *Arabidopsis*-Pflanzen. (2) wie (1) und zusätzlich 3 Std. in Lincomycin inkubiert. (3) wie (2) und zusätzlich 1 Std. HL ( $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Zur Detektion des D1-Abbaus diente der D1-Antikörper. Als Kontrolle der Auftragsmenge diente der Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase.

### 3.9.2 Trennung photosynthetischer Komplexe durch 2D-PAGE

Vorangegangene Analysen haben gezeigt, dass die  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Probleme mit der Sauerstoffproduktion hatten und ein verzögertes Wachstum zeigten. Gleichzeitig konnte eine Assoziation des DegP2-Proteins mit dem PSII-Monomer gezeigt werden. Zudem zeigte die  $\Delta degP5$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter Schwachlicht ein höheres NPQ als qP. Die Mutante hatte Probleme mit dem Abfließen der Elektronen auf das PSI. Um zu klären, ob die durch die Mutationen ausgelösten Probleme sich auf die Verteilung und Bildung der photosynthetischen Komplexe auswirkten, wurde eine blau-native/SDS-PAGE durchgeführt. Thylakoidmembranen von Wildtyp und Mutantenlinien wurden von Pflanzen, die unter Standardbedingungen ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gewachsen waren, extrahiert, mit Hilfe von Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und in einer blau-native/SDS-PAGE separiert. Die Proteine wurden mit Hilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Silberfärbung ist eine qualitative Färbemethode. Je länger gefärbt wird, desto größer und dunkler werden die Proteinsignale. Mengenunterschiede zwischen zwei Proteinen können daher nur innerhalb eines Gels verglichen werden. Die  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten zeigten wesentlich weniger LHCII-Monomer als LHCII-Trimer (Abb. 3.45B+C). Im Wildtyp hingegen war das LHCII-Monomersignal annähernd stark wie das des LHCII-Trimers (Abb. 3.45A). In der Verteilung der PSI- und PSII-Komplexe der  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten konnten verglichen mit dem Wildtyp keine Unterschiede festgestellt werden.



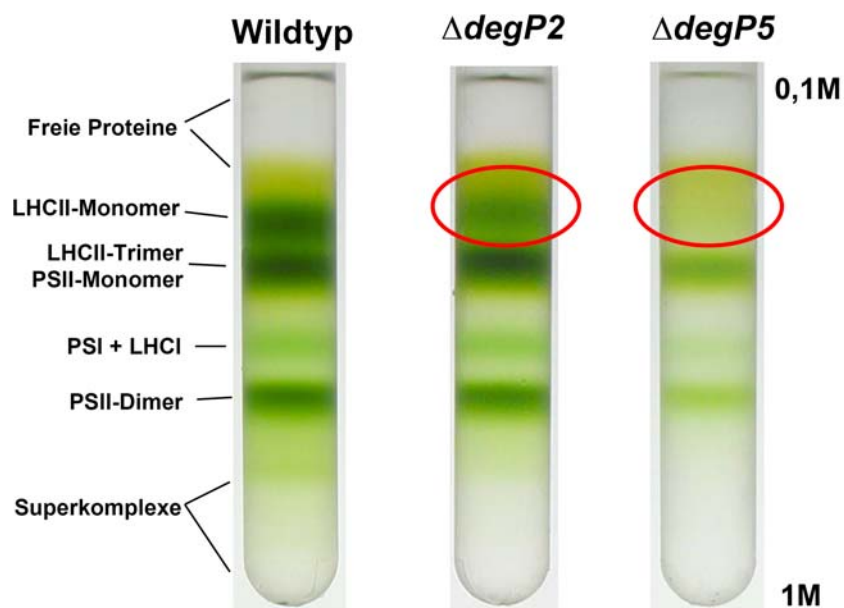
**Abb. 3.45** Trennung photosynthetischer Komplexe von Wildtyp (A),  $\Delta degP2$ - (B) und  $\Delta degP5$ -Mutanten (C) mittels blau-nativer (erste Dimension) und SDS-PAGE (zweite Dimension). Für die erste Dimension wurden Thylakoidmembranen mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und auf ein 4 - 12%-iges PAG geladen. Die Untereinheiten der photosynthetischen Komplexe wurden in einem 12,5%-igen SDS-PAG aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt. Proteine, die identifiziert werden konnten, sind in den Gelen markiert. Die rote Umrandung zeigt die Position der LHCII-Monomeruntereinheiten.

### 3.9.3 Trennung photosynthetischer Komplexe durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Um die Ergebnisse der blau-native/SDS-PAGE von Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutante zu bestätigen, wurden solubilisierte Thylakoidmembranen (400  $\mu$ g Chlorophyll) von Wildtyp und Mutanten in der ersten Dimension auf einen linearen (0,1 - 1 M) Saccharose-

gradienten aufgetragen. Die Auftrennung der Komplexe erfolgte über die Zentrifugalkraft und war somit nicht nur vom Molekulargewicht, sondern auch von der Dichte und dem Sedimentationsverhalten der Komplexe abhängig.

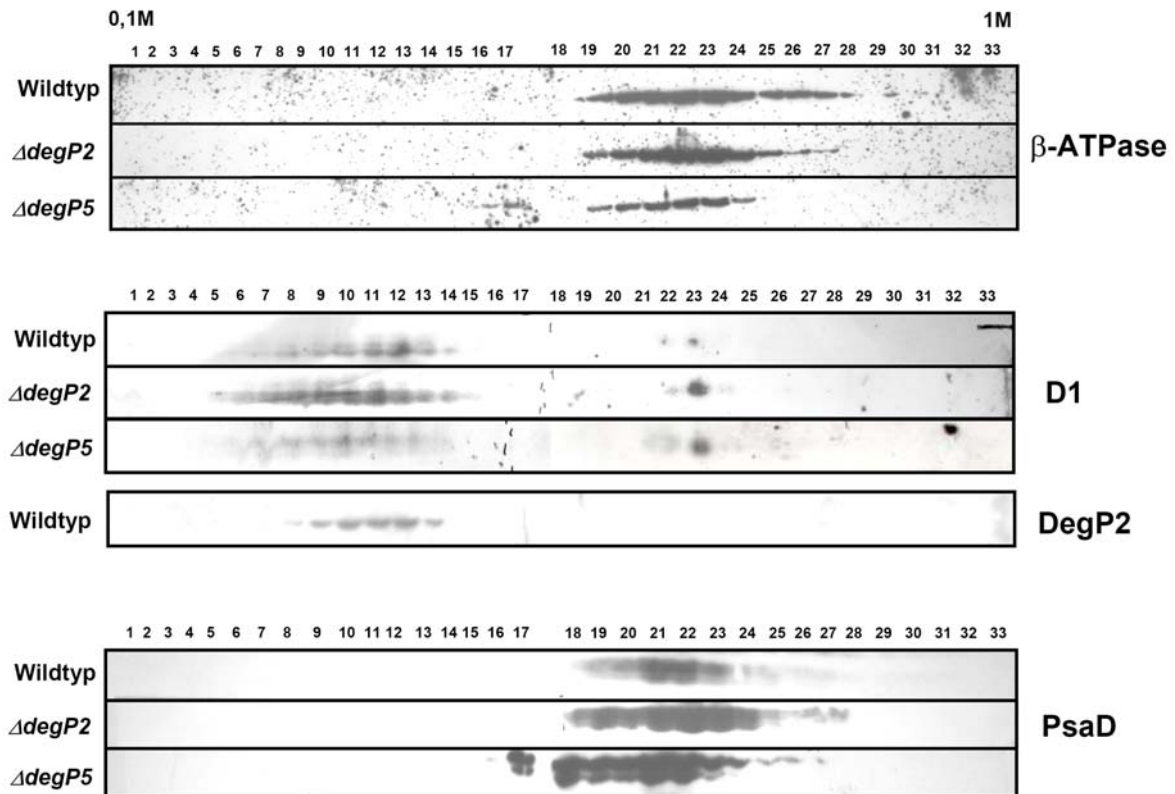
Der Gradient der  $\Delta degP5$ -Mutante war insgesamt weniger grün. Dieser Effekt trat bei allen Wiederholungen dieses Versuches redundant auf. Hier funktionierte die Solubilisierung der Thylakoidmembranen nicht gut und daher konnten stets nur etwa 200  $\mu\text{g}$  Chlorophyll auf den Gradienten geladen werden. Dennoch konnte ein deutlicher Unterschied in der Stärke der LHCII-Monomer- und LHCII-Trimerbande gesehen werden (Abb. 3.46 rechts). LHCII-Monomer und -Trimer bildeten im Gradienten des Wildtyps zwei gleichstark grüne Banden (Abb. 3.46 links), wobei die Bande des LHCII-Trimers mit der des PSII-Monomers verschwamm. In der  $\Delta degP5$ -Mutante war die LHCII-Monomerbande, ähnlich wie in der 2D-PAGE (Abb. 3.45C) nicht zu sehen, die LHCII-Trimer/PSII-Monomerbande jedoch schon. Das Fehlen der LHCII-Monomerbande hatte hier nichts mit der verminderten Auftragsmenge zu tun, da die normalerweise gleichstarke LHCII-Trimer/PSII-Monomerbande immer noch sichtbar war. Im Gradienten der  $\Delta degP2$ -Mutante war die LHCII-Trimer/PSII-Monomerbande genauso stark wie im Wildtyp, jedoch war auch hier die LHCII-Monomerbande wesentlich schwächer (Abb. 3.46 Mitte), was bereits in der Silberfärbung des blau-nativen/SDS-Gels zu sehen war (Abb. 3.45B). Bei allen anderen sichtbaren photosynthetischen Komplexen konnten anhand der Gradienten keine Unterschiede detektiert werden.



**Abb. 3.46 Trennung photosynthetischer Komplexe von Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.** Thylakoidmembranen wurden mit Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid solubilisiert und auf einen 0,1 M bis 1 M Saccharosegradienten geladen. Die sichtbaren Proteinkomplexe sind links beschriftet. Die rote Umrandung zeigt die Position der LHCII-Monomer-Untereinheiten.

Nach der Ultrazentrifugation wurden die Gradienten in 33 Fraktionen zu je 330  $\mu$ l gesammelt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden mit Antikörper gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, D1 und PsaD behandelt. Die Wildtyp-Membran wurde zusätzlich mit einem Deg-Antikörper inkubiert.

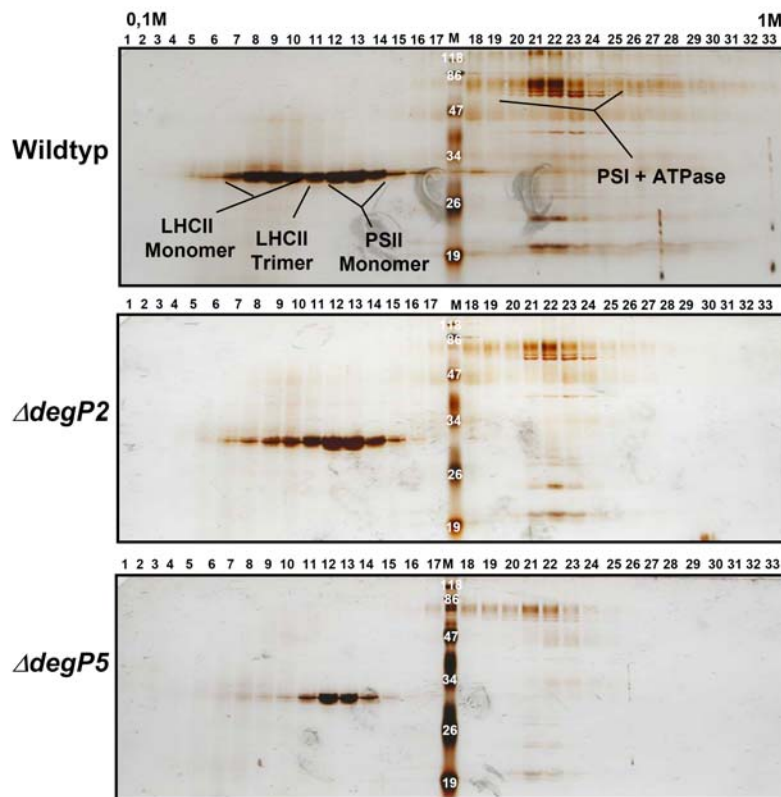
Das Signal der ATP-Synthase-Untereinheit  $\beta$  diente nur als Kontrolle für korrekt gesammelte Fraktionen. Das Maximum der ATP-Synthase sollte bei allen Gradienten in den gleichen Fraktionen liegen, damit Verschiebungen von photosynthetischen Komplexen wirklich als gegeben angenommen werden konnten. Das Maximum der ATP-Synthase lag bei allen Gradienten in den Fraktionen 21, 22 und 23 (Abb. 3.47 oben). Mit Hilfe des D1-Proteins wurde das PSII-Monomer wie auch das PSII-Dimer detektiert. Das PSII-Monomer der  $\Delta degP2$ -Mutante war im Vergleich zum Wildtyp schwach in den niedermolekularen Bereich verschoben. Das Signalmaximum der  $\Delta degP2$ -Mutante lag in den Fraktionen 9, 10 und 11, das des Wildtyps in den Fraktionen 11, 12, und 13. Das konnte in der Silberfärbung der 2D-PAGE nicht erkannt werden. Das PSII-Dimer hingegen war nicht verschoben und hatte das Signalmaximum in Fraktion 23, genau wie der Wildtyp (Abb. 3.47 Mitte). Die PSII-Signale von  $\Delta degP5$  waren durch die verminderte Auftragsmenge schwächer zu sehen, zeigten jedoch keine Verschiebung. Mit Hilfe des PsaD-Antikörpers konnte die Lage des PSI angezeigt werden. Das Maximum lag im Wildtyp und in der  $\Delta degP2$ -Mutante in den Fraktionen 21, 22 und 23. Das PSI der  $\Delta degP5$ -Mutante war leicht in den niedermolekularen Bereich verschoben. Das Maximum lag in den Fraktionen 20, 21 und 22 (Abb. 3.47 unten). Die Wildtyp-Membran wurde zusätzlich mit einem DegP2-Antikörper inkubiert. Deutlich sichtbar wurde das Signal der DegP2-Protease, welches auch im Saccharosegradienten im Bereich des PSII-Monomers anzutreffen war. Das Signalmaximum lag analog zum PSII-Monomer in den Fraktionen 10, 11 und 12 (Abb. 3.47 Mitte). Diese Komigration konnte bereits durch Western-Analyse des 2D-PAG gezeigt werden (Abb. 3.28).



**Abb. 3.47: Western-Analyse von Thylakoidmembranen von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten, die im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt wurden.** Die Gradienten aus Abb. 3.46 wurden in 33 Fraktionen zu je 400  $\mu$ l gesammelt und in zweiter Dimension auf ein SDS-PAG aufgetragen. Die Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Antikörpern gegen die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, D1, PsaD und DegP2 behandelt.

Ein zweites SDS-Gel, welches mit den gleichen Fraktionen beladen war, wurde mit Silbernitrat angefärbt. Die Untereinheiten Lhcb1 und -2 des LHCII waren im Wildtyp in der ersten Gelhälfte sichtbar. In den Fraktionen 7 bis 10 waren die Untereinheiten dem LHCII-Monomer zuzuordnen, ab der Fraktion 11 bis 15 dem LHCII-Trimer sowie dem PSII-Monomer, die als Bande im Gradienten ineinander übergehen und daher nicht sauber getrennt werden konnten (Abb. 3.48 oben). In der Silberfärbung konnte sehr gut das Fehlen der LHCII-Monomerbande in der  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutante gesehen werden (Abb. 3.48 Mitte und unten). Außerdem konnten die Ergebnisse der Western-Analyse aus Abbildung 3.47 noch einmal bestätigt werden. Das PSII-Monomer der  $\Delta degP2$ -Mutante war schwach in den niedermolekularen Bereich verschoben. Das Maximum befand sich in den Fraktionen 12 und 13, während es im Wildtyp in den Fraktionen 12, 13 und 14 lag. Der Unterschied der Maxima war weniger offensichtlich wie bei der Western-Analyse (Abb. 3.47 Mitte), jedoch zog sich das Signal des PSII-Monomer weit in den niedermolekularen Bereich hinein (Abb. 3.48 Mitte). Durch die verminderte Auftragsmenge der  $\Delta degP5$ -Mutante konnte nur ein schwaches PSI-Signal detektiert werden. Die Ver-

schiebung des Signals in den niedermolekularen Bereich konnte dennoch gesehen werden (Abb. 3.48 Unten).



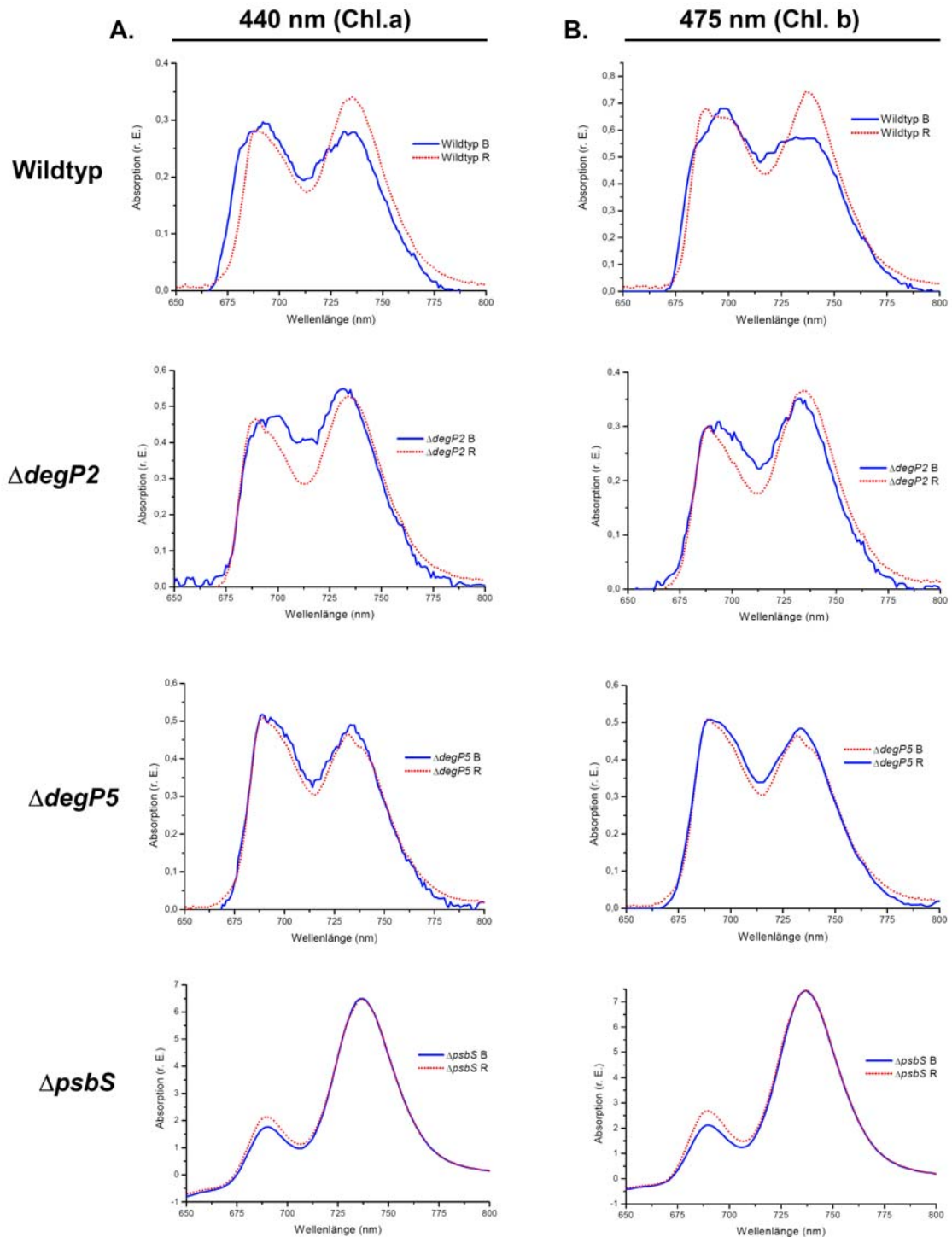
**Abb. 3.48 Silberfärbung der Fraktionen der Saccharose-Dichtegradienten von *Arabidopsis*-Wildtyp, - $\Delta degP2$ - und - $\Delta degP5$ -Mutanten.** Die Gradienten aus Abb. 3.46 wurden in 33 Fraktionen zu je 400  $\mu$ l gesammelt und in zweiter Dimension auf ein SDS-PAG aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silbernitrat gefärbt. Identifizierte Komplexuntereinheiten wurden beschriftet.

### 3.10 Untersuchungen von „state transitions“ in $\Delta degP2$ - und $\Delta degP5$ -Mutanten

Western-Analysen der  $\Delta degP2$ -Mutante hatten gezeigt, dass das PSII leicht in den niedermolekularen Bereich verschoben war (Abb. 3.47). Zudem hatten 77K Fluoreszenzmessungen unter Standardbedingungen ergeben, dass mehr LHCII-Antennen an das PSI gebunden sein könnten (Abb. 3.40). Western-Analysen und Silberfärbung konnten zeigen, dass das PSI der  $\Delta degP5$ -Mutante leicht in den niedermolekularen Bereich verschoben war und dass insgesamt weniger LHCII-Antennen vorhanden waren (Abb. 3.45C; 3.47). Eventuell war die Wanderungsfähigkeit der LHCII-Antennen in beiden Mutanten beeinträchtigt, was die Verringerung des Molekulargewichts der Photosysteme ebenfalls erklären könnte. Um die Wanderung der LHCII-Antennen („state transitions“) zwischen den Photosystemen genauer zu bestimmen, wurden die Pflanzen diesmal mit PSII-spezifischem Blaulicht bzw. PSI-spezifischem Dunkelrotlicht bestrahlt. Unter PSII-Licht liegt der Plastochinon-„pool“ oxidiert vor und die LHCII-Antennen sind an das PSII assoziiert, was als „state 1“ bezeichnet wird. Unter sich ändernden Lichtbedingungen

(PSI-Licht), wird der Plastochinon-„pool“ reduziert, eine LHCII-Kinase wird aktiviert und die LHCII-Antennen werden phosphoryliert. Zwei Untereinheiten des LHCII (Lhcb1 und 2) wandern daraufhin an das PSI, was als „state 2“ bekannt ist (Vener *et al.*, 1997; Wollmann, 2001 ).

Für die Messungen wurden junge *Arabidopsis*-Pflanzen 15 Min. mit monochromatischem Blaulicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) der Wellenlänge 455 nm bzw. Dunkelrotlicht ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) der Wellenlänge 730 nm bestrahlt. Die Thylakoidmembranen wurden extrahiert, in Glas-kapillaren in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 440 nm (Chlorophyll *a*) angeregt. Die Emissions-Fluoreszenzspektren wurden auf das PSII-Maximum normalisiert (Abb. 3.49A). Das Emissionsspektrum des Wildtyps unter Blaulicht zeigte, dass mehr LHCII-Antennen an das PSII gebunden waren, was den „state 1“ repräsentierte. Unter Dunkelrotlicht war das PSI-Maximum deutlich höher als das PSII-Maximum. Die LHCII-Antennen waren an das PSI gewandert („state 2“). In der  $\Delta\text{degP2}$ -Mutante konnte sowohl unter Blaulicht als auch unter Rotlicht ein stets höheres PSI-Maximum festgestellt werden. Die Antennen konnten unter Blaulicht offenbar nicht auf das PSII wandern, wodurch die  $\Delta\text{degP2}$ -Mutante im „state 2“ blockiert war. Im Gegensatz dazu zeigte die  $\Delta\text{degP5}$ -Mutante unter beiden Lichtbedingungen stets ein höheres PSII-Maximum. Unter Dunkelrotlicht sollten die Antennen jedoch wie im Wildtyp vermehrt auf PSI wandern. Die Mutante war im „state 1“ blockiert. Als Kontrolle, ob wirklich die „state transitions“-Fähigkeit der  $\Delta\text{degP2}$ - und  $\Delta\text{degP5}$ -Mutanten betroffen war, diente die *Arabidopsis*- $\Delta\text{psbS}$ -Mutante. Die nicht-photochemische Löschung (NPQ), zu der auch „state transitions“ gehören, dieser Mutante war betroffen. Messungen unter 475 nm-Anregung (Chlorophyll *b*) ergaben entsprechende Ergebnisse (Abb. 3.49B).



**Abb. 3.49: Messungen der „state transitions“ von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ -,  $\Delta degP5$ - und  $\Delta psbS$ -Mutanten.** Junge Pflanzen wurden 15 Min. mit monochromatischem Rotlicht (rot) bzw. Blaulicht (blau) bestrahlt. Die Thylakoidmembranen wurden isoliert, auf eine Chlorophyllkonzentration von 2  $\mu\text{g/ml}$  eingestellt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Anregung erfolgte bei 440 nm (Chlorophyll a, A) bzw. 475 nm (Chlorophyll b, B). Die Maxima von Wildtyp,  $\Delta degP2$  und  $\Delta degP5$  wurden auf PSII (bei 685 nm) normalisiert, die  $\Delta psbS$ -Maxima wurden auf PSI (bei 725 nm) normalisiert.



### 3.11 HPLC-Messungen

Bei PAM Fluoreszenzmessungen zeigte die  $\Delta degP2$ -Mutante eine geringere NPQ unter Starklicht als unter Schwachlicht (Tabelle 3.6). Bei Wildtyp und der  $\Delta degP5$ -Mutante verhielt es sich genau umgekehrt. Unter erhöhten Lichtbedingungen wurde vermehrt Violaxanthin in Zeaxanthin umgewandelt. Durch das geringere Energieniveau des Zeaxanthin ist dieses fähig, Elektronen vom Chlorophyll aufzunehmen. Diese überschüssige Energie wird als Teil der NPQ in Form von Wärme abgegeben. Die Xanthophyllmengen von Wildtyp und Mutanten unter verschiedenen Lichtbedingungen wurden mit der HPLC bestimmt. Junge *Arabidopsis*-Pflanzen wurden 12 Std. dunkelinkubiert bzw. 4 Std. auf  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Starklicht gestellt, bevor die Pigmente nach Gilmore und Yamamoto (1991) extrahiert wurden und über eine HPLC-Säule aufgetrennt wurden. Die dreidimensionalen Maxima wurden mit Hilfe der Spectralys Software dargestellt. Für die zweidimensionale Darstellung der Elutionsprofile wurde eine Wellenlänge von 440 nm gewählt (Abb. 3.50).

Die Auswertung der zweidimensionalen Darstellung erfolgte mit der „origin Software“. Zur Berechnung der Xanthophyllkonzentrationen wurde folgende Gleichung verwendet (Lagarde *et al.*, 2000):

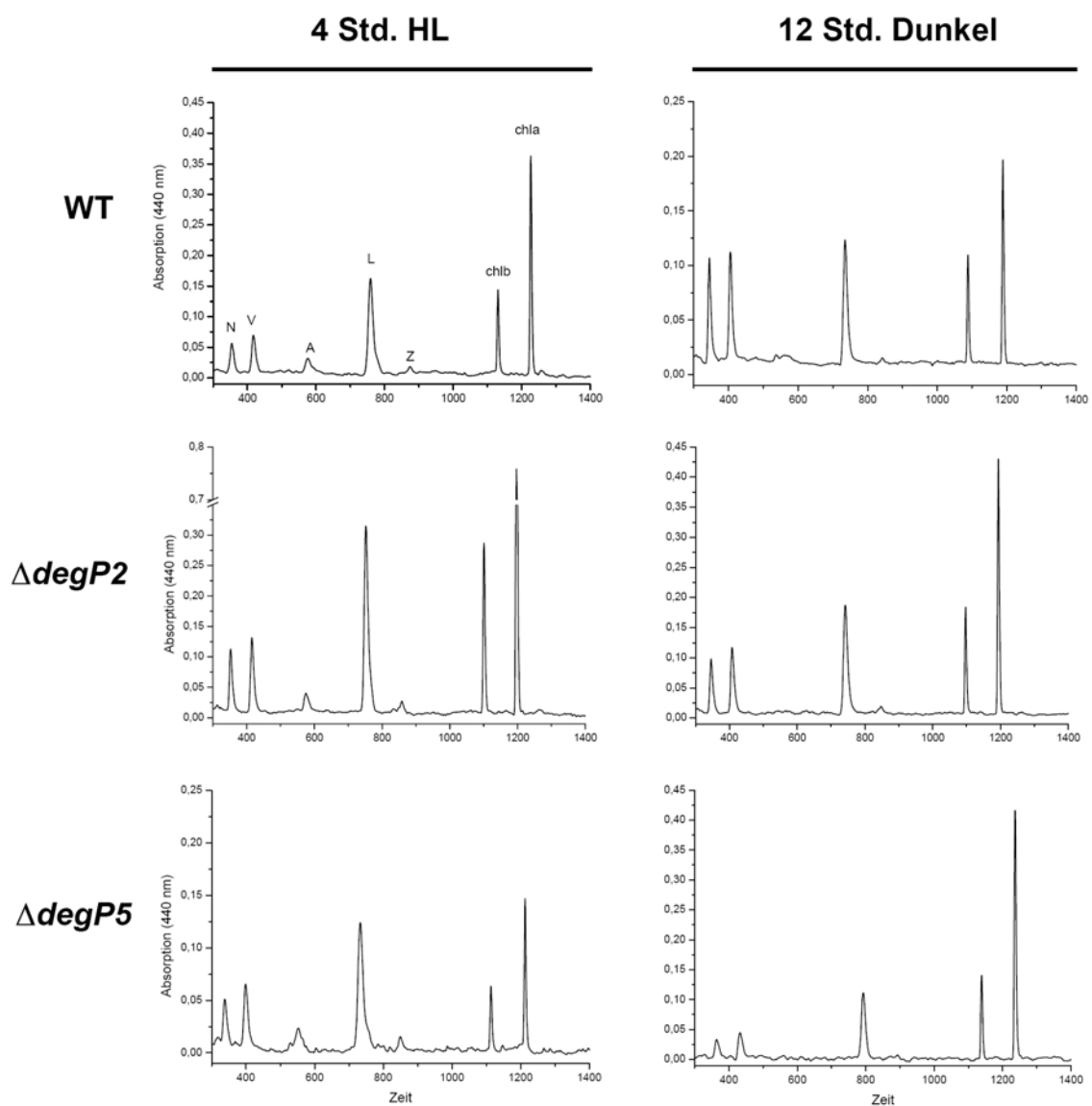
$$C_{\text{car}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = C_{\text{chl}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] \times [(\epsilon_{\text{chl}} [\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}] \times E_{\text{car}}) / ((\epsilon_{\text{car}} [\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}] \times E_{\text{chl}})]$$

In die Gleichung wurden stets die Extinktions- und Konzentrationswerte des Chlorophyll *a* eingesetzt. Die Werte der Extinktionskoeffizienten der Xanthophylle und des Chlorophyll *a* wurden von Mantoura und Llewellyn (1983) übernommen.

Die Konzentrationen von Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b*, Lutein, Violaxanthin, Neoxanthin und Zeaxanthin sind in Tabelle 3.7 dargestellt. Alle Werte sind auf Chlorophyll *a* normalisiert.

Bei gleichen Chlorophyll *a*-Werten waren die Chlorophyll *b*-Werte der dunkelinkubierten Pflanzen höher als die der lichtinkubierten Pflanzen. Im Dunkel produzieren Pflanzen zuerst mehr Chlorophyll *a*. Nach dem Transfer zu stärkerem Licht steigt die Konzentration von Chlorophyll *b* (Woitsch *et al.*, 2003). Nach sehr starkem Licht wird Chlorophyll *b* wieder reduziert. Generell waren die Xanthophyllkonzentrationen des Wildtyps relativ zum Chlorophyll *a* im Dunkeln höher als unter Starklicht. Die  $\Delta degP2$ -Mutante zeigte sowohl unter Starklicht als auch im Dunkeln für alle vier bestimmten Xanthophylle fast stets geringere Werte als der Wildtyp unter gleichen Bedingungen. Jedoch waren auch hier

stets die Xanthophyllkonzentrationen der dunkelinkubierten  $\Delta degP2$ -Pflanzen höher als die der lichtinkubierten. Die Konzentrationsdifferenzen waren insgesamt aber geringer als im Wildtyp. Bei der  $\Delta degP2$ -Mutante traten also kaum Anpassungen der Xanthophyllmengen bei veränderten Lichtbedingungen auf. Die  $\Delta degP5$ -Mutante zeigte kontroverse Daten. Hier waren alle Konzentrationswerte der Starklichtpflanzen höher als die der dunkelinkubierten. Die Xanthophyllkonzentrationen der  $\Delta degP5$ -Pflanzen unter Starklicht waren höher und die der dunkelinkubierten  $\Delta degP5$ -Pflanzen niedriger als beim Wildtyp unter gleichen Bedingungen. Hier waren die Konzentrationsdifferenzen also höher als im Wildtyp.



**Abb. 3.50: HPLC-Messungen von *Arabidopsis*-Wildtyp,  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten.** Die Pigmente junger Pflanzen wurden nach 4 Std. Inkubation unter Starklicht (HL) bzw. 12 Std. Inkubation im Dunkeln extrahiert und über eine HPLC-Säule aufgetrennt. Die zweidimensionale Darstellung erfolgte bei 440 nm. (N) Neoxanthin, (V) Violaxanthin, (A) Antheraxanthin, (L) Lutein, (Z) Zeaxanthin, (chl b) Chlorophyll b, (chl a) Chlorophyll a.

**Tabelle 3.7: Chlorophyll- und Xanthophyllkonzentrationen der HPLC-Messungen.** Die Werte wurden auf Chlorophyll a normalisiert.

	Chl a (µg/µl)	Chl b (µg/µl)	Lutein (µg/µl)	Violaxanthin (µg/µl)	Neoxanthin (µg/µl)	Zeaxanthin (µg/µl)	V/Z- Verhältnis	V/A- Verhältnis
Wildtyp HL	0,135	0,041	0,0175	0,007	0,006	0,0024	2,9	2,1
Wildtyp D	0,135	0,059	0,0243	0,021	0,021	0,0040	5,3	6,3
$\Delta degP2$ HL	0,135	0,043	0,0161	0,009	0,006	0,0018	5,0	3,2
$\Delta degP2$ D	0,135	0,057	0,0172	0,015	0,009	0,0021	7,1	10,4
$\Delta degP5$ HL	0,135	0,036	0,0326	0,016	0,014	0,0053	3,0	2,7
$\Delta degP5$ D	0,135	0,058	0,0106	0,004	0,003	0,0010	4,0	7,5

Der Wildtyp enthielt weniger Zeaxanthin unter Starklicht, was ungewöhnlich ist, denn es wird unter höheren Lichtbedingungen ein Ansteigen der Zeaxanthinkonzentration erwartet. Dies kann man jedoch durch die Bildung von Antheraxanthin erklären. Antheraxanthin wird als Intermediat bei der Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin gebildet. Unter Starklicht ist die Antheraxanthinkonzentration immer höher als unter Schwachlicht, da hier vermehrt Violaxanthin in Zeaxanthin umgewandelt wird und daher auch vermehrt die Intermediatsform auftritt. In der Tabelle 3.7 wurde dies durch das V/A-Verhältnis dargestellt. In den dunkelinkubierten Pflanzen war das V/A-Verhältnis erhöht, was für eine geringere vorhandene Menge an Antheraxanthin spricht. Das niedrigere V/A-Verhältnis der lichtinkubierten Pflanzen zeigte die Bildung von Antheraxanthin.

Das Verhältnis V/Z in Tabelle 3.7 gibt an, wie viel mehr Violaxanthin im Vergleich zu Zeaxanthin in einer Pflanze vorhanden war. Die dunkelinkubierten Wildtyp und Mutantpflanzen enthielten stets mehr Violaxanthin als die lichtinkubierten Pflanzen.

Die  $\Delta degP2$ -Mutante und die  $\Delta degP5$ -Mutante enthielten weniger Violaxanthin als der Wildtyp nach der Dunkelinkubation. Nach Inkubation unter Starklicht war das V/Z-Verhältnis von Wildtyp und  $\Delta degP5$ -Mutante gleich, das der  $\Delta degP2$ -Mutante immer noch etwas höher. Das V/Z-Verhältnis der  $\Delta degP5$ -Mutante war in dunkel- und starklichtinkubierten Pflanzen stets niedriger als in der  $\Delta degP2$ -Mutante. Die  $\Delta degP5$ -Mutante enthielt also wesentlich mehr Zeaxanthin im Verhältnis zu Violaxanthin als die  $\Delta degP2$ -Mutante.

Lutein spielt genau wie Zeaxanthin eine Rolle im Schutz gegen starkes Licht. In der  $\Delta degP2$ -Mutante änderte sich die Luteinkonzentration von Schwachlicht zu Starklicht kaum, während sie bei der  $\Delta degP5$ -Mutante unter Starklicht etwa um das dreifache anstieg. Ähnliches war auch bei der Konzentration von Neoxanthin erkennbar. Beide Xanthophylle können die Fluoreszenz des PSII verstärken (Avital *et al.*, 2006), was jedoch hier nicht erkennbar war.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Charakterisierung und funktionelle Analyse von HhoA und HhoB in *Synechocystis*

#### 4.1.1 Lokalisierung von HhoA und HhoB

In *E. coli* konnten drei Mitglieder der Deg/HtrA-Familie identifiziert werden: DegP (HtrA), DegQ (HhoA) und DegS (HhoB). Experimente mit diesem Bakterium haben gezeigt, dass HhoA und HtrA lösliche Proteine sind und im bakteriellen Periplasma lokalisiert sind (Waller und Sauer, 1996). DegP ist hier eventuell für den Abbau beschädigter und nicht-funktioneller Proteine verantwortlich (Strauch und Beckwith, 1988). Die *in vivo*-Funktion von DegQ ist jedoch nicht bekannt (Waller und Sauer, 1996). Das homologe HhoB ist ein kleineres, membrangebundenes Protein, dessen katalytische Bindungsstelle in den periplasmatischen Raum hineinragt (Alba *et al.*, 2001). DegS spielt eine Rolle bei der Regulation des Anti-Sigmafaktors RseA und bei der extracytoplasmatischen Stressantwort, welches durch das  $\sigma^E$ -Protein kontrolliert ist (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001).

Im einzelligen Cyanobakterium *Synechocystis* konnten drei Deg-Proteasen homolog zu denen in *E. coli* gefunden werden: DegP/HtrA (*slr1204*), DegQ/HhoA (*sll1679*) und DegS/HhoB (*sll1427*) (Kaneko *et al.*, 1996). Hydropathieanalysen haben ergeben, dass HtrA und HhoA sehr hydrophil sind, was für lösliche Proteine spricht. Beide besitzen einen N-terminalen hydrophoben Bereich mit dem typischen Ala-X-Ala-Prozessierungsmotiv, das während der Translokation durch Membranen von Prozessierungspeptidasen erkannt wird. Mit Hilfe von Proteomanalysen konnte tatsächlich nachgewiesen werden, dass HhoA im Periplasma lokalisiert ist (Fulda *et al.*, 2000) und HtrA in der äußeren Hüllmembran (Huang *et al.*, 2004). Dies würde auch die dieser Protease zugesprochenen physiologische Funktion stützen, welche die HtrA-Protease als Schlüsselfaktor für den Abbau falschgefalteter Proteine der Zellhülle sieht (Clausen *et al.*, 2002). Sequenzanalysen von HhoB haben eine N-terminale hydrophobe Transmembrandomäne und kein Ala-X-Ala-Prozessierungsmotiv ergeben. Das spricht wohl eher für ein membrangebundenes Protein, beweist dieses jedoch nicht (Alba *et al.*, 2001). In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde vermutet, dass alle drei Mitglieder der HtrA-Familie zusammen am Schutz der *Synechocystis*-Zellen gegen Lichtstress und an der Reparatur des PSII involviert sein sollen (Silva *et al.*, 2002).

Im Western-Filter eines 2D-Gels konnte gezeigt werden, dass HtrA und HhoA zusammen im blau-nativen Gel laufen. Die Signale, die über proteinspezifische Antikörper erzielt wurden, liefen zudem auf einer Höhe mit verschiedenen PSII-Komplexen, die über das D1-Protein nachgewiesen wurden. Es wurde gezeigt, dass HhoA im Periplasma und HtrA in der äußeren Membran von *Synechocystis* lokalisiert sind (Fulda *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004). Trotz Komigration der HtrA- und HhoA-Proteine mit PSII-Komplexen können wir die Lokalisation dieser Komponente in diesem Komplex ausschliessen. Es wird vermutet, dass HtrA und HhoA die Bestandteile eines heteromeren Komplexes sind. Nahezu ausgeschlossen werden konnte jedoch ein Zusammenlagern der Proteine HhoA und HhoB. Auf dem Western-Filter des 2D-Gels befand sich das HhoB-Protein etwas oberhalb des PSII-Monomers. Im Vergleich mit dem 2D-Gel von Aro *et al.* (2004) könnte HhoB mit dem PSI-Monomer komigrieren. Dieses konnte jedoch mit dem PsaD-Antikörper nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.25A). Eventuell war die Menge des PSI-Monomers unterhalb der immunologischen Nachweisgrenze. In der  $\Delta sll1427$ -Mutante befand sich das HhoA-Protein trotz Fehlen des HhoB-Proteins an unveränderter Position. Auch eine Verbindung von HhoB- und HtrA-Protein ist unwahrscheinlich, da das HtrA-Protein in der  $\Delta sll1427$ -Mutanten unverändert vorhanden war, in der  $\Delta sll1679$ -Mutante jedoch gar nicht mehr. Eventuell wird das HtrA-Protein, bei Fehlen des Aktionspartners abgebaut oder gar nicht erst synthetisiert.

#### 4.1.2 Funktionsanalyse von HhoA und HhoB

##### 4.1.2.1 Phänotypische Analysen von *Synechocystis*- $\Delta sll1427$ - und - $\Delta sll1679$ - Mutanten

Homozygote  $\Delta sll1427$  ( $\Delta hhoB$ )- und  $\Delta sll1679$  ( $\Delta hhoA$ )-Mutanten wurden auf Unterschiede in Wachstumsrate und Pigmentkonzentration nach Wachstum unter Standardbedingungen und Eisenmangel analysiert. Eisen ist in eine Vielzahl energetischer Prozesse involviert (Ferreira *et al.*, 1994). So dient es als Kofaktor in Cytochromen und Enzymen, wie Peroxidase und Katalase, außerdem auch als Katalysator, z. B. als Sauerstoffträger während der Atmung. Zudem ist die Chlorophyllsynthese von Eisen abhängig. Eisen ist selbst zwar kein Bestandteil des Chlorophylls, aber an der Synthese einer Chlorophyllvorstufe beteiligt. Fehlt den Cyanobakterien Eisen, resultiert dies in einem Rückgang photosynthetischer Proteine (Guikema und Sherman, 1983a; Sherman und Sherman, 1983) und damit zwangsläufig auch in einem Rückgang der daran gebundenen Pigmente. Dies wird auch als Chlorose bezeichnet. Jedoch hilft dieser Zustand der Zelle, sich vorübergehend den Stressbedingungen anzupassen. Die  $\Delta sll1427$ -Mutante zeigte in den

hier durchgeführten Untersuchungen eine viel geringere Anpassung an die Stressbedingungen als der Wildtyp und die  $\Delta s//1679$ -Mutante. Die Menge der Pigmente Chlorophyll *a*, Phycocyanin und der Carotinoide blieb nach sieben Tagen unter Eisenmangel nahezu konstant. Dies zeigte sich auch in der intensiveren Grünfärbung nach sieben Tagen Eisenmangel. Absorptionsspektren von Wildtyp und der  $\Delta s//1427$ -Mutante unter Standardbedingungen und unter Eisenmangel bestätigten dieses Ergebnis (Abb. 3.12). Die Verdoppelungszeit der  $\Delta s//1427$ -Mutante unter Eisenmangel stieg weniger stark an als bei Wildtyp und  $\Delta s//1679$ -Mutante, d. h. die  $\Delta s//1427$ -Mutante verdoppelte sich trotz Eisenmangels in normalem Tempo weiter. Die Zellzahl der  $\Delta s//1427$ -Mutante bei gleicher Extinktion war unter Standardbedingungen wesentlich geringer als unter Eisenmangel, was für ein größeres Volumen der Zellen unter Standardbedingungen als unter Eisenmangel spricht.

Die  $\Delta s//1679$ -Mutante zeigte weder einen Phänotyp unter Eisenmangel, noch unter Hitzestress. Somit konnte eine Funktion als Hitzeschockprotease, vergleichbar mit der HtrA-Peptidase in *E. coli* (Lipinska *et al.*, 1988; Strauch und Beckwith, 1988) ausgeschlossen werden.

Im Absorptionsspektrum (Abb. 3.12) des Wildtyps unter Eisenmangel ist eine Verschiebung des 675 nm-Chlorophyll *a*-Maximums um 5 nm in den kurzwelligen Bereich zu erkennen. Dies resultiert von der Bildung von IsiA, einem Protein, das unter Eisenmangel einen Ring um das PSI-Trimer bildet und als zusätzliche PSI-Antenne dient (Park *et al.*, 1999; Aspinwall *et al.*, 2004). Bei dem Maximum der  $\Delta s//1427$ -Mutante unter Eisenmangel fehlte eine solche Verschiebung in den kurzwelligen Bereich. Eventuell war die Bildung des IsiA-Proteins hier behindert.

#### **4.1.2.2 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren von Wildtyp und $\Delta s//1427$ - und $\Delta s//1679$ -Mutante**

Die Funktionalität beider Photosysteme hinsichtlich des Energietransfers und der Verteilung der Antennen wurde durch 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren analysiert (Abb. 3.13 und 3.14). Die Spektren wurden jeweils auf das PSI-Maximum normalisiert. Der unter Eisenmangel enorme Anstieg des 77K Fluoreszenzmaximums bei 685 nm könnte von dem unter Eisenmangel gebildetem IsiA resultieren, einem CP43-Homolog (Burnap *et al.*, 1993; Ferreira und Straus 1994; Falk *et al.*, 1995), welches bei gleicher Wellenlänge wie PSII absorbiert und das PSII-Maximum überlagert (Bibby *et al.*, 2001a), oder von den im langwelligen Bereich absorbierenden Phycobilinen des Phyco-

bilisomenzentrums (Glazer, 1984). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass IsiA, welches einen Ring um das PSI-Trimer bildet, sowohl in *Synechocystis* PCC 6803 (Bibby *et al.*, 2001a, b) als auch in *Synechococcus* PCC 7942 (Boekema *et al.*, 2001) als neue PSI-Antenne fungiert. Unter Eisenmangel zeigte die  $\Delta sll1427$ -Mutante ein doppelt so hohes PSII-IsiA-Fluoreszenzmaximum wie der Wildtyp. Eventuell ist die  $\Delta sll1427$ -Mutante stärker durch den Eisenmangel betroffen und wandelt einen größeren Anteil der PSI-Trimere in PSI-IsiA-Superkomplexe um als das beim Wildtyp und der  $\Delta sll1679$ -Mutante der Fall ist (Tölle *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von IsiA in der  $\Delta sll1427$ -Mutante eventuell doch nicht behindert ist. Das enorme Maximum konnte nicht in den unter Standardbedingungen gewachsenen Zellen gesehen werden, die nur das PSI-Maximum bei 725 nm und das wesentlich schwächere Maximum des PSII bei 695 nm zeigten (Mullineaux, 1994).

Die Verteilung der PBS in einer cyanobakteriellen Zelle kann durch Anregung der PC/APC bei 580 nm bestimmt werden (Abb. 3.14). Die Spektren wurden auf das PSI-Maximum normalisiert. Unter Standardbedingungen wurde die meiste Lichtenergie von den freien PBS emittiert. Unter Eisenmangel jedoch war das PSII-Maximum des Wildtyps sehr viel höher als das PSI-Maximum bzw. das Maximum der freien PBS, während das PSII-Maximum der Mutante nur schwach die anderen überragte. Im Wildtyp war das PSI eventuell stärker vom Abbau betroffen als das PSII. Das geringere PBS-Maximum resultierte von einer verminderten Transkription der PBS unter Eisenmangel (Singh *et al.*, 2003). Das Spektrum der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel war vergleichbar mit dem unter Standardbedingungen. Auch hier zeigte die Mutante kaum Anpassung an die Stressbedingungen.

#### 4.1.2.3 Western-Analysen des Wildtyps und der $\Delta sll1427$ -Mutante

Die momentane Menge eines Proteins in einem Organismus kann durch Western-Analyse extrahierter Proteine bestimmt werden. Der in der  $\Delta sll1427$ -Mutante fehlende Rückgang der Pigmentkonzentrationen würde auf einen fehlenden Abbau photosynthetischer Proteine hinweisen. Dies ist sowohl in der Silberfärbung, als auch in der Western-Analyse zu erkennen. Die Proteinmenge des Wildtyps war teilweise stark zurückgegangen, wohingegen sich die der  $\Delta sll1427$ -Mutante kaum veränderte. In der Silberfärbung konnten zwei Proteine detektiert werden, die im Wildtyp unter Eisenmangel hochreguliert waren. In der  $\Delta sll1427$ -Mutante jedoch konnte nur eines dieser Proteine detektiert werden. Das fehlende Protein in der Mutante hatte eine Größe von etwa 37 kDa, welches der Größe des IsiA-Proteins entsprechen würde. Jedoch konnte im Western-Filter ein IsiB-Signal

sowohl im Wildtyp als auch in der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel ausgemacht werden. Unter Eisenmangel werden solche Proteine, die Eisen als Kofaktor brauchen, durch solche ersetzt, die keine Eisen-Kofaktoren besitzen, wie z. B. Ferredoxin durch Flavodoxin (Guikema und Sherman, 1983; Laudenbach und Straus, 1988; Laudenbach *et al.*, 1988; Straus, 1994). Somit wird das IsiB-Protein, welches auch als Flavodoxin bekannt ist, unter Eisenmangel hochreguliert. Da IsiB in einem Operon mit dem IsiA-Protein sitzt, werden also entweder beide Gene abgelesen oder gar keines. Das würde in diesem Fall heißen, dass die Ablesung des *isiA*-Gens in der  $\Delta sll1427$ -Mutante nicht behindert ist. Jedoch sagt dies nichts über die Stabilität des IsiA-Proteins in der Mutante aus. Da kein IsiA-Antikörper für die Western-Analysen zur Verfügung stand, konnte die Anwesenheit des IsiA-Proteins in der Mutante so nicht überprüft werden. Das in der Silberfärbung aus Abbildung 3.16 fehlende Protein mit der Größe des IsiA-Proteins und die fehlende Blauverschiebung des roten Chlorophyll *a*-Maximums in den Absorptionsspektren könnten ein Hinweis für die fehlende Stabilität des Proteins in der  $\Delta sll1427$ -Mutante sein. Allerdings zeigten die 77K Fluoreszenzmessungen ein stark erhöhtes PSII-Maximum. Das könnte aus der Bildung des IsiA-Proteins herrühren, welches bei gleicher Wellenlänge wie PSII absorbiert.

#### **4.1.2.3 Saccharose-Dichtegradienten von Thylakoidlysaten des Wildtyps und der $\Delta sll1427$ -Mutante**

Falls das IsiA-Protein wirklich vorhanden sein sollte, jedoch eventuell nicht sehr stabil ist oder keinen stabilen Komplex bilden kann, müsste die Bildung des PSI-IsiA-Trimerkomplexes in der  $\Delta sll1427$ -Mutante gestört sein. Um die Komplexe aufzutrennen, wurden solubilisierete Thylakoidmembranen auf einen Saccharosegradienten aufgetragen und durch Ultrazentrifugation getrennt. Die in Cyanobakterien funktionelle Form des PSI ist die Trimerform. Diese ist relativ schwer und wandert im Gradienten von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante weit (Abb. 3.19). Unter Eisenmangel wird IsiA gebildet und formt aus 18 Untereinheiten einen Ring um das Trimer (Bibby *et al.*, 2001a, b). Dieses wird dadurch noch schwerer und befindet sich im Gradienten unterhalb des PSI-Trimers. Im Wildtyp unter Eisenmangel war eine schwache PSI-IsiA-Bande zu sehen, in der Mutante hingegen nicht. Die PSI-IsiA-Trimerbande des Wildtyps war jedoch nicht mehr so stark grün gefärbt wie unter Standardbedingungen. Nicht alle PSI-Trimerkomplexe können durch IsiA geschützt werden. Wie in Punkt 4.1.2.1 erklärt, werden unter Eisenmangel photosynthetische Proteine abgebaut. Um die Funktionalität der Zelle aufrechtzuerhalten, werden die noch restlich vorhandenen Proteine vor dem Abbau geschützt, z. B. durch IsiA, aber auch durch IdiA, welches z. B. in *Synechococcus* die Akzeptorseite des PSII unter



Eisenmangel schützt (Michel *et al.*, 1996; Exss-Sonne *et al.*, 2000) und von dem in *Synechocystis* eine ähnliche Funktion vermutet wird (Tölle *et al.*, 2002). In der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel konnte keine PSI-IsiA-Trimerbande ausgemacht werden, aber auch keine PSI-Trimerbande. Jedoch war dies kein Beweis dafür, dass das Trimer wirklich fehlte. Bei den Kulturen unter Eisenmangel gab es häufiger Probleme mit der Solubilisierung. Um herauszufinden, ob ein PSI-IsiA-Komplex vorhanden war, wurden die gleichen Fraktionen, die vom Wildtyp unter Eisenmangel genommen wurden, auch von der Mutante genommen. 77K Fluoreszenz-Emissionsmessungen gaben Aufschluß über die Anwesenheit von PSI und IsiA. Sowohl in Wildtyp, als auch in der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel waren PSI- und PSII-Maxima vorhanden (Abb. 3.20). Da im Saccharosegradienten die photosynthetischen Komplexe aufgetrennt werden und in den für diese Messungen genommenen Fraktionen des PSI-Trimers kein PSII erwartet wurde, konnte man davon ausgehen, dass das Maximum bei 685 nm von dem IsiA-Protein resultierte und nicht vom PSII. In Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Standardbedingungen hingegen war zur Kontrolle kein PSII-Maximum vorhanden. Man kann also davon ausgehen, dass die Bildung und Stabilität des IsiA-Proteins dort nicht gestört ist.

#### **4.1.2.4 *in vivo*-Analyse der Degradierungs- und Syntheserate von Wildtyp und $\Delta sll1427$ -Mutante**

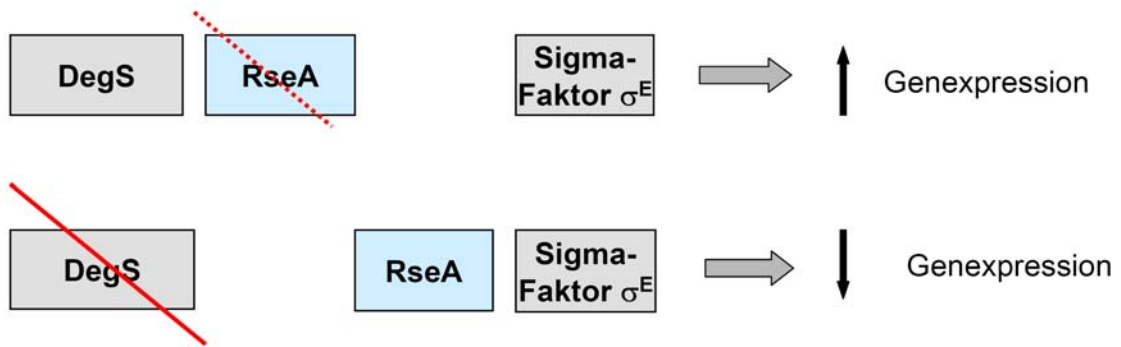
Western-Analysen und Silberfärbung haben ergeben, dass weniger Proteine im Wildtyp nach sieben Tagen Eisenmangel vorhanden waren als in der  $\Delta sll1427$ -Mutante. Mit solchen Analysemethoden konnte nur eine momentan in der Zelle vorhandene Proteinmenge detektiert werden. Sie konnten nichts über die Synthese- bzw. Degradierungsraten der Proteine aussagen. Mit Hilfe der radioaktiven Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin konnten Aussagen über die Synthese- und Degradierungskinetik getroffen werden.

Unter Standardbedingungen war in Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante nur ein leichter Proteinabbau zu erkennen. Dies ist die normale Abbaurate von Proteinen, die in der Zelle in einem Gleichgewicht mit der Proteinsyntheserate steht, was auch als Proteinumsatz bezeichnet wird. Unter Eisenmangel waren die Abbauraten im Wildtyp, aber auch in der  $\Delta sll1427$ -Mutante erhöht. Am stärksten und auch am schnellsten bauten die Proteine des PSI im Wildtyp ab (Abb. 3.22B). Dies konnte auch schon in den 77K Fluoreszenz-Emissionsspektren der Abbildungen 3.14B und 3.20B beobachtet werden. Bei gleicher PSII-Menge (Normalisierung der Spektren auf das PSII-Maximum) war im Wildtyp unter Eisenmangel stets weniger PSI vorhanden als in der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisen-

mangel. Die Abbauraten der untersuchten PSII-Proteine waren im Wildtyp und der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel ähnlich.

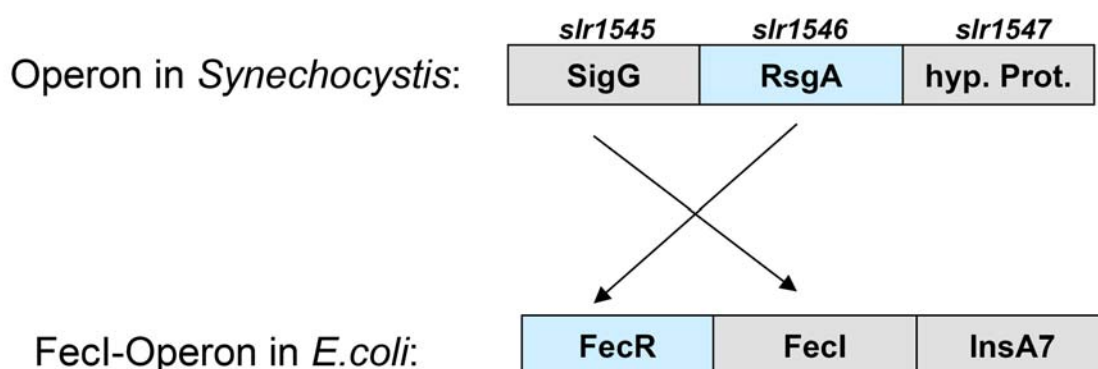
Trotz der ähnlichen Abbauraten von Wildtyp und  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel waren im Western-Filter nach sieben Tagen Eisenmangel noch photosynthetische Proteine in der  $\Delta sll1427$ -Mutante nachweisbar. Ob dies durch eine erhöhte Proteinsyntheserate verursacht wurde, wurde ebenfalls mittels radioaktiver Markierung untersucht. Die Syntheserate des Wildtyps unter Eisenmangel nimmt mit Dauer der Stresseinwirkung ab. Die Syntheserate der  $\Delta sll1427$ -Mutante hingegen ist durchgehend höher als im Wildtyp, wobei die Syntheserate zu Beginn der Stressbedingungen meist sehr stark ansteigt und danach gleich bleibt bzw. schwächer wird, jedoch über der des Wildtyps bleibt (Abb. 3.22). Die  $\Delta sll1427$ -Mutante war also genauso vom Proteinabbau unter Eisenmangel betroffen wie der Wildtyp, konnte aber diesen Abbau durch effizientere Neusynthese ausgleichen.

In *E. coli* ist die HhoB-Protease in die Regulation des  $\sigma^E$ -spezifischen Anti-Sigmafaktor RseA und in die extracytoplasmatische Stressantwort, die durch das  $\sigma^E$ -Protein kontrolliert wird, involviert (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001). Stressbedingungen, die die Akkumulierung falschgefalteter Proteine auslösen, induzieren speziell eine Stressantwort über den Sigmafaktor  $\sigma^E$  (Mecsas *et al.*, 1993; Raina *et al.*, 1995; Missiakas *et al.*, 1996). Zwei Hauptregulatoren des  $\sigma^E$ -Proteins konnten identifiziert werden: RseA und RseB. Die cytoplasmatische Seite des RseA bindet an  $\sigma^E$  und verhindert somit die  $\sigma^E$ -regulierte Transkription. Das Fehlen bzw. die Inaktivierung des RseA führte zu einer maximalen Induktion des  $\sigma^E$ -Proteins, das Fehlen des RseB-Proteins lediglich zu einem schwachen Ansteigen der  $\sigma^E$ -Aktivität (De Las Peñas *et al.* 1997a; Missiakas *et al.*, 1997). Die Serinprotease DegS ist hierbei verantwortlich für den regulierten Abbau des RseA-Proteins unter verschiedenen Stressbedingungen (De Las Peñas *et al.* 1997b; Ades *et al.*, 1999), welches dabei den Sigmafaktor  $\sigma^E$  zur direkten Genexpression freisetzt (Alba *et al.*, 2001). In der  $\Delta degS$ -Mutante von *E. coli* ist RseA durch fehlende Regulation ständig an den Sigmafaktor  $\sigma^E$  gebunden und die Genexpression wird herunterreguliert (Ades *et al.*, 1999; Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Regulation des Sigmafaktors  $\sigma^E$  in *E. coli* durch DegS.** Bei Anwesenheit des DegS-Proteins unterliegt der  $\sigma^E$ -spezifische Anti-Sigmafaktor RseA einem regulierten Abbau (rot, gestrichelte Linie). Der Sigmafaktor  $\sigma^E$  wird aktiviert und die Transkription kann stattfinden. Bei „knock out“ des DegS-Proteins (rote, durchgehende Linie) wird RseA gar nicht mehr degradiert und bindet somit ständig an den Sigmafaktors  $\sigma^E$ . Die Genexpression ist dauerhaft herunterreguliert. Regulatorische Proteine sind hellblau dargestellt.

In *Synechocystis* wurde ein Operon entdeckt, welches starke Ähnlichkeit zu einem Operon in *E. coli* hatte (K. Tanaka, im Vortrag). Das *fecI*-Operon in *E. coli* besteht aus drei Genen, von denen zwei, *fecI* und *fecR*, regulatorische Funktion besitzen. Sie sind im Genom oberhalb der *fec*-Transportgene lokalisiert und werden durch ihren eigenen Promotor reguliert (Wriedt *et al.*, 1995). *FecI* kodiert einen Sigmafaktor, der für die Expression von Genen des Eisencitrattransportes verantwortlich ist. Die Transportgene *fecABCDE* kodieren für Proteine des Eisencitrat-Transportes und werden durch das *fecI*-Operon reguliert (Enz *et al.*, 2000). Das von K. Tanaka in *Synechocystis* gefundene Operon weist eine ähnliche Architektur auf. Es enthält drei Gene, von denen eines ebenfalls für einen Sigmafaktor, SigG, codiert und eines für ein Protein, RsgA, welches durch Bindung an SigG dieses reguliert. Die Funktion des dritten Gens ist noch unbekannt (Abb. 4.2).



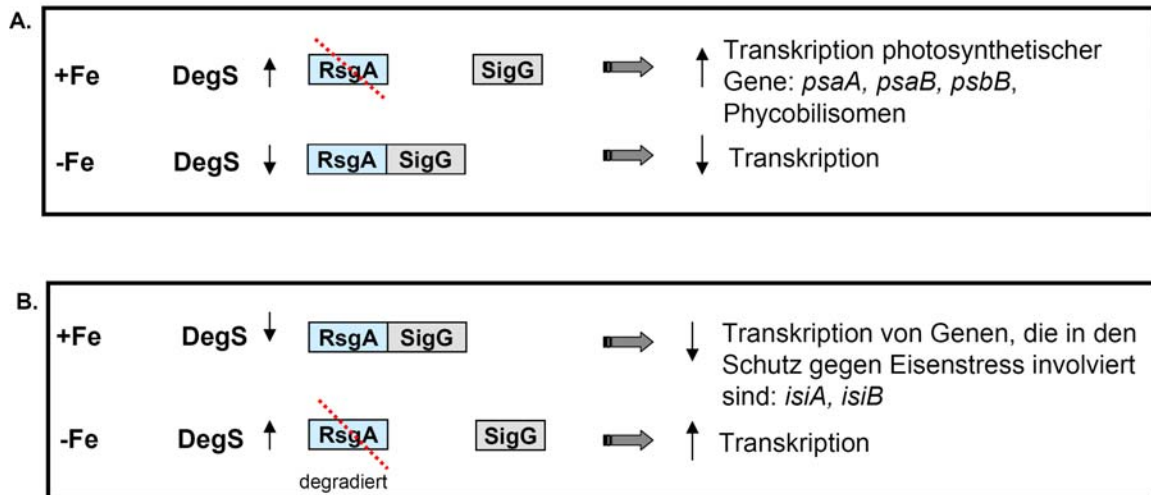
**Abb. 4.2: Operon-Vergleich von *Synechocystis* und *E. coli*.** Das Operon in *Synechocystis* besteht aus den Genen *sigG*, welches einen Sigmafaktor codiert, *rsgA*, welches den Sigmafaktor reguliert und einem Gen für ein hypothetisches Protein, dessen Funktion unbekannt ist. Das *fecI*-Operon in *E. coli* besitzt *FecR* als regulatorisches Protein und *FecI* als Sigmafaktor, welches die Genexpression der Eisencitrat-Transportgene induziert. Die regulatorischen Proteine sind hellblau dargestellt.

Das DegS-Protein könnte in *Synechocystis* eine ähnliche Funktion übernehmen wie in *E. coli*. Wenn man die Proteine des *Synechocystis*-Operons nun in gleicher Weise wie in *E.*

*coli* aus Abbildung 4.1 anordnet, kann man eine Übereinstimmung überprüfen, hier in Abbildung 4.3 dargestellt. Bei Anwesenheit bzw. Hochregulation des DegS-Proteins unter normalen Bedingungen wird der negative Regulator RsgA kontrolliert abgebaut. Dieser Abbau führt zu einer Freisetzung des Sigmafaktors SigG, der die Transkription bestimmter Gene induziert. Bei Fehlen oder Abregulation des DegS-Proteins z. B. bei Eisenmangel, wird RsgA nicht bzw. weniger stark abgebaut und der Sigmafaktor bleibt verstärkt an RsgA gebunden. Die Transkription der Gene wird so herunterreguliert. Die Regulation des DegS-Proteins ist allerdings noch nicht bekannt.

In Abbildung 4.3A ist gezeigt, dass eventuell die Transkription photosynthetischer Gene bei Abwesenheit bzw. Abregulation von DegS oder dessen Proteinaktivität ebenfalls herunterreguliert wird. Dies konnte leider nicht in den Experimenten dieser Arbeit gesehen werden. Im *in vivo*-Markierungsversuch mit [<sup>35</sup>S]-Methionin war die Syntheserate photosynthetischer Proteine in der  $\Delta sll1427$ -Mutante unter Eisenmangel im Gegenteil sogar stärker als im Wildtyp. Die Abwesenheit von DegS kann nach dem Schema von *E. coli* aus Abbildung 4.1 nicht direkt im Zusammenhang mit der Hochregulation der photosynthetischen Gene in der Mutante unter Eisenmangel stehen. Laut Abbildung 4.3B vermutet man eine Abregulation des DegS-Proteins unter Standardbedingungen und damit eine Herunterregulation von Genen, die in Eisenstress involviert sind, wie z.B. *isiA* und *isiB*. Umgekehrt würde unter Eisenmangel DegS hochreguliert und damit auch die Ablesung der Gene, die in Eisenmangel involviert sind, induziert. Bei „knock out“ von DegS, wie in der  $\Delta sll1427$ -Mutante, würden selbst unter Eisenmangel keine Schutzproteine bzw. Proteine, die in Eisenmangel involviert sind, gebildet. Auch dies konnte leider nicht in den Experimenten dieser Arbeit gesehen werden. In Western-Analysen (Abb. 3.16) konnte die Bildung von IsiB und IdiA nachgewiesen werden und bei 77K Fluoreszenz-Emissionsmessungen (Abb. 3.13 und 3.20) die Anwesenheit von IsiA. Der Transkriptionsfaktor der Gene, die in Eisenmangel involviert sind, war nicht betroffen.

Die beiden genannten Möglichkeiten der Genregulation, die denen in *E. coli* ähneln, können ausgeschlossen werden. Das DegS (HhoB)-Protein besitzt in *Synechocystis* vermutlich eine andere Funktion als in *E. coli*. Da die Hochregulation von Genen in  $\Delta sll1427$  unter Eisenmangel intakt ist (*IsiA*, Flavodoxin, photosynthetische Proteine), gibt es möglicherweise Probleme mit einem Regulator, der herunterregulieren soll.



**Abb. 4.3: Mögliche Regulation der Genexpression bei *Synechocystis*-Wildtyp und  $\Delta sl1427$ -Mutante unter Eisenmangel.** Bei Anwesenheit bzw. Hochregulation (Pfeil nach oben) des DegS-Proteins unterliegt der Anti-Sigmafaktor RsgA einem regulierten Abbau (rot, gestrichelte Linie). Der Sigmafaktor SigG wird aktiviert und die Gentranskription kann stattfinden. Bei Abwesenheit oder Runterregulation des DegS-Proteins (Pfeil nach unten) wird RsgA gar nicht mehr degradiert und bindet somit ständig an den Sigmafaktor SigG. Die Genexpression ist dauerhaft herunterreguliert. A. DegS regelt die Transkription photosynthetischer Gene. B. DegS reguliert die Transkription von Genen, die bei Eisenmangel involviert sind. Regulatorische Proteine sind hellblau dargestellt.

## 4.2 Charakterisierung und funktionelle Analyse von DegP2 und DegP5 in *Arabidopsis*

### 4.2.1 Lokalisierung der Deg-Proteasen im Chloroplasten

Im Genom von *Arabidopsis* konnten 14 Gene entdeckt werden, die für Proteine der Deg-Peptidasefamilie kodieren. Obwohl sie alle die katalytische Triade aus His-Asp-Ser enthalten, unterscheiden sie sich in der Anzahl ihrer PDZ-Domänen. Vier Deg-Proteasen konnten eindeutig dem Chloroplasten zugeordnet werden (Adam *et al.* 2001a). Proteomanalysen konnten dabei drei Proteasen (DegP1, DegP5 und DegP8) dem Lumen der Thylakoidmembran zuordnen (Schubert *et al.*, 2002), wobei DegP1 stark an die Thylakoidmembran assoziiert ist (Itzhaki *et al.*, 1998). Die DegP2-Peptidase befindet sich auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran (Adam *et al.*, 2001a). Noch unklar ist, ob sich die Proteasen alle in einem Komplex befinden, was für ähnliche Funktionen der einzelnen Proteasen sprechen würde, oder in verschiedenen. Um dies herauszufinden, wurden spezifische Antikörper gegen Deg-Proteasen hergestellt (Lensch, 2002).

In einer Western-Analyse mit Gesamtchloroplasten, Stroma und Thylakoidfraktionen konnte bestätigt werden, dass DegP1, P2 und P5 nicht im Stroma vorlagen, sondern nur in der Thylakoidfraktion. Obwohl DegP2 als stromale Peptidase deklariert ist, fanden sich keine auf immunologische Weise detektierbare Spuren in der stromalen Fraktion (Abb.

3.27A). Das spricht für eine sehr starke Assoziation der Protease an die Thylakoidmembran, da sie sich während der Arbeitsschritte zur Extraktion der Thylakoide nicht davon ablöste.

Interessant wäre zu wissen, woran die Proteasen in der Thylakoidmembran gebunden sind und, ob sie in einem oder verschiedenen Komplexen vorliegen. Daher wurde eine blau-native PAGE durchgeführt. Die Komplexe der Thylakoidmembran blieben dabei in ihrer nativen Form erhalten, zusammen mit eventuell daran gebundenen externen Proteinen. In einer zweiten Dimension wurden die nativen Komplexe in ihre Untereinheiten zerlegt. Mit geeigneten Antikörpern konnten die photosynthetischen Komplexe lokalisiert werden und ebenso die gesuchten Proteasen. In Abb. 3.28 konnte gezeigt werden, dass DegP1 in der Fraktion der freien Proteine zu finden war. So ist DegP1 zwar stark an die Thylakoidmembran gebunden (Itzhaki *et al.*, 1998), und wenn überhaupt, dann jedoch nur lose mit einem Komplex assoziiert. Die Proteine DegP2 und DegP5 liefen auf einer Höhe mit einem Hochmolekularkomplex, der mit Hilfe des D1-Antikörpers als PSII-Monomer identifiziert werden konnte. Falls beide Proteasen wirklich zusammen mit dem PSII-Monomer assoziiert sind, könnte man von einer ähnlichen Funktion der Proteasen ausgehen.

Um zu überprüfen, ob dies wirklich eine Assoziation mit diesem Komplex war oder lediglich eine Komigration, wurde dieser Versuch mit Tabak-Wildtyp und  $\Delta psbA$ -Mutante wiederholt. Die Tabakmutante konnte kein D1-Protein bilden und enthielt somit keinerlei PSII-Komplexe. Bei fehlendem PSII-Monomer lief die DegP2-Protease auf einer Höhe mit dem LHCII-Trimer, welches ein dem DegP2 ähnliches Molekulargewicht von etwa 66 kDa hatte, und nicht mehr auf Höhe des PSII-Monomers. Eine Assoziation von DegP2 mit dem PSII-Monomer ist daher wahrscheinlich. Die DegP5-Protease hingegen lief unabhängig vom Vorhandensein des PSII-Monomers auf gleicher Höhe wie im Wildtyp (Abb. 3.29). Die DegP5- und die DegP2-Proteasen laufen also nicht in einem Komplex zusammen.

#### 4.2.2 Funktionsanalyse von DegP2 und DegP5

Samen von  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -„knock out“-Pflanzen wurden von Syngenta Biotechnology (Inc. Research Triangle Park, North Carolina 27709) bestellt. Mit Hilfe von PCR- und Sequenzierungsanalysen konnte die genaue Insertionsstelle der T-DNS im Gen bestimmt werden. In der  $\Delta degP2$ -Mutante befand sich die Insertion im Promotorbereich des Gens, 6 Basen vor dem ATG-Startkodon. Hier bestand die Gefahr, dass das Gen nicht vollständig ausgeschaltet war, sondern nur in der Expression gestört bzw. verändert war. Die

$\Delta degP5$ -Mutante trug die T-DNS-Insertion relativ mittig im 4. Intron, 31 Bp vom davorliegenden Exon entfernt. Auch hier wäre es theoretisch möglich, dass die Insertion bei der Transkription herausgeschnitten wurde, da sie sich in einem nicht-kodierenden Bereich befand. In beiden Fällen, wäre die entsprechende mRNA des Gens vorhanden und es könnte ein intaktes Protein gebildet werden. Um dies auszuschließen, wurden Western-Analysen durchgeführt. In den Mutanten konnte auf Proteinebene bei Anwesenheit des Proteins im Wildtyp unter gleichen Bedingungen keine Produkte detektiert werden. Jedoch war es möglich, dass Gene so minimal exprimiert wurden, dass sie sich als Proteine immunologisch unter der Nachweisgrenze befanden. Ihre tatsächliche Anwesenheit konnte jedoch mittels RT-PCR-Analyse überprüft werden. Selbst geringste mRNA-Mengen können so amplifiziert werden, dass sie später auf einem Gel sichtbar sind. Auch auf Transkriptionsebene ließen sich bei beiden Mutanten keine Transkripte nachweisen. Beide Mutanten waren also echte „knock out“-Mutanten.

#### 4.2.2.1 Phänotypische Analysen von *Arabidopsis*- $\Delta degP2$ - und - $\Delta degP5$ -Mutanten

##### 4.2.2.1.1 Wachstumsanalysen unter Standardbedingungen und Starklicht

Die Photosynthese ist stark abhängig von den Umweltbedingungen. Änderungen in den äußeren Bedingungen können phänotypische Unterschiede verursachen. Daher wurden Wachstumsanalysen unter verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Bei Wachstum unter Standardbedingungen konnten stets Wachstumsverzögerungen von  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Abb. 3.34 und 3.35). Dabei war die Höhe der Temperatur (20°C bzw 25°C) und die Lichtstärke (50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bzw. 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) unwesentlich. Bei höherer Temperatur und Lichtstärke war der Phänotyp der Mutanten lediglich deutlicher und schneller zu sehen (Abb. 3.35). Unter Starklicht jedoch hob sich der Effekt auf. Wildtyp und Mutante wuchsen zwar noch langsamer als unter Standardbedingungen, jedoch zeigten sie untereinander keine Unterschiede mehr. Der Phänotyp war unter Starklicht verschwunden. Zufällig wurde jedoch bei einer Wiederholung dieses Versuches, der in einer anderen Klimakammer stattgefunden hatte, ein neuer Phänotyp bei der  $\Delta degP5$ -Mutante entdeckt. Diese andere Klimakammer enthielt Lampen, die deutlich mehr Rotlichtanteile aufwiesen als zuvor. Während Wildtyp und  $\Delta degP2$ -Mutante wieder die, aus Abbildung 3.36 bekannte, annähernd gleiche Wachstumsgeschwindigkeit zeigten, war die  $\Delta degP5$ -Mutante deutlich schneller in der Entwicklung. Bei deutlich kleinerer Rosette und Blattgröße und geringerer Anzahl an Blättern, war die Stängel- und Blütenbildung dennoch weiter in der Entwicklung. Der Phänotyp der  $\Delta degP5$ -Mutante hatte sich im Ver-

gleich zu Standardbedingungen einmal umgekehrt. Aus der Mutante mit den stärksten Entwicklungsverzögerungen wurde dann diejenige, die die schnellste Entwicklung zeigte. Eventuell sind die Proteasen in die Akklimatisierung an Lichtstressbedingungen involviert.

#### 4.2.2.1.2 Sauerstoff- und 77K Fluoreszenzmessungen

Die Lokalisierung von DegP2 und DegP5 in bzw. an der Thylakoidmembran und die Komigration von DegP2 mit dem PSII-Monomer könnten dafür sprechen, dass diese Proteasen in einem photosynthetischen Prozess involviert sind. Um Änderungen der photosynthetischen Aktivität zu messen, wurden kleingeschnittene Blattquadrate von Wildtyp und Mutanten jeweils mit Schwachlicht ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklicht ( $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bestrahlt, und es wurde die Sauerstoffentwicklung verfolgt.

In *Synechococcus* konnte gezeigt werden, dass das Minimum der zur Sauerstoffproduktion notwendigen Proteine, die Proteine des PSII-Reaktionszentrums (CP43, CP47, D1, D2), PsbO und Cytochrome  $b_{559}$  sind. Daher sind sowohl das PSII-Monomer wie auch das PSII-Dimer zur Sauerstoffbildung fähig (Rögner *et al.*, 1987). Es ist bekannt, dass Starklicht das PSII beschädigt. Besonders betroffen ist dabei das D1-Protein des Reaktionszentrums (Mattoo *et al.*, 1984; Ohad *et al.*, 1985; Aro *et al.*, 1993). Um das PSII zu reparieren, muss das beschädigte D1 entfernt werden und durch ein neu synthetisiertes ersetzt werden (Kyle *et al.*, 1984; Ohad *et al.*, 1984; Andersson und Aro, 2001). Funktioniert dies nicht, dann schlägt sich das negativ auf die Sauerstoffentwicklung nieder. Die Sauerstoffproduktion unter Schwachlicht und unter Starklicht entsprach bei  $\Delta degP5$  jeweils etwa 2/3 des Wildtyps, und bei  $\Delta degP2$  aber nur etwa 1/3 des Wildtyps. Die Reduktionen in der Sauerstoffproduktion bei beiden Mutanten unter beiden Lichtbedingungen sprechen für einen Defekt in der Photosynthese, in erster Linie einer schwächeren Funktionalität des PSII durch fehlenden Austausch des D1-Proteins. Eventuell waren die DegP2- und DegP5-Proteasen in einen photosynthetischen Prozess, möglicherweise in den Abbau des D1-Proteins, involviert.

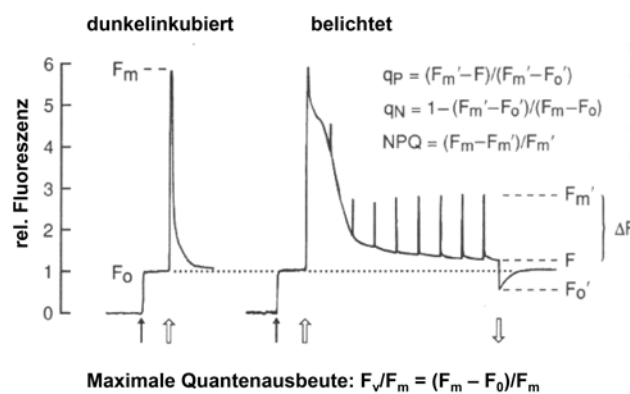
Zur Analyse der Funktionalität der Photosysteme und der Verteilung der Antennen, wurden 77K Fluoreszenz-Emissionsmessungen durchgeführt (Abb. 3.40). Wildtyp und  $\Delta degP5$ -Mutante zeigten unter Anregung bei 440 nm (Chlorophyll *a*) gleichhohe Maxima für PSI und PSII, während unter Anregung bei 475 nm (Chlorophyll *b*) das PSII-Maximum höher war als das des PSI. Möglicherweise war mehr Chlorophyll *a* an die Reaktionszentren der Photosysteme gebunden als an die Antennen. Antennenwanderungen zwischen den Photosystemen fielen daher nicht so stark ins Gewicht. Das erklärt den



geringeren Unterschied zwischen den PSI- und PSII-Maxima im Vergleich zur Anregung mit Chlorophyll *b*. Die  $\Delta degP2$ -Mutante jedoch zeigte bei beiden Anregungswellenlängen ein höheres PSI-Maximum als der Wildtyp und die  $\Delta degP5$ -Mutante. Das kann für eine geringere Menge an (aktivem) PSII sprechen, was zumindest die verminderte Sauerstoffproduktion der  $\Delta degP2$ -Mutante erklären würde, oder dafür, dass mehr LHCII-Antennen an PSI gebunden waren.

#### 4.2.2.1.3 PAM-Fluoreszenzmessungen

Als Indikator für die potentielle Kapazität des PSII wurde das Verhältnis von variabler zu maximaler Fluoreszenz durch Bestrahlung des PSII mit gesättigten Lichtpulsen gemessen. Das Verhältnis  $F_v/F_m$  zeigte die photosynthetische Aktivität einer Pflanze und ließ Rückschlüsse auf den physiologischen Zustand des Photosyntheseapparates zu (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Fluoreszenz-„quenching“-Analyse.** Bestimmung von variabler und maximaler Fluoreszenz des PSII mittels der „saturation pulse method“. Angegeben sind die Definitionen der „quenching“-Parameter und die Grundfluoreszenzparameter (nach Schreiber *et al.*, 1998).

Die Messungen wurden an Pflanzen durchgeführt, die unter Standardbedingungen ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bzw. unter Starklicht ( $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert wurden (Abb. 3.41). Die photosynthetische Aktivität der  $\Delta degP5$ -Mutanten war unter Starklicht nicht betroffen, jedoch war die nicht-photochemische Löschung (NPQ) unter beiden Lichtbedingungen stark erhöht (Tabelle 3.6). Es wurde also mehr Energie als NPQ abgegeben. PSII und der Plastochinon-„pool“ schienen ständig reduziert zu sein und konnten keine weiteren Elektronen aufnehmen. Dies erklärte auch die verminderte Sauerstoffproduktion der  $\Delta degP5$ -Mutante unter beiden Lichtbedingungen (Abb. 3.39).

Die  $\Delta degP2$ -Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen normalen Abfall der photosynthetischen Aktivität  $F_v/F_m$  und einen Rückgang der photochemischen Löschung  $q_P$  unter Starklichtbedingungen. Während der Anteil der nicht-photochemischen Lö-

schung an der Gesamtlöschung bei der  $\Delta degP2$ -Mutante unter Schwachlichtbedingungen höher als im Wildtyp war, war er unter Starklichtbedingungen niedriger.

In einem zweiten Versuch wurde die photosynthetische Aktivität unter Starklicht und während unterschiedlich langen Erholungsphasen überprüft (Abb. 3.43). Auch hier zeigte sich die  $\Delta degP5$ -Mutante weniger stark betroffen als der Wildtyp. Die photosynthetische Aktivität der  $\Delta degP2$ -Mutante hingegen fiel im Vergleich zum Wildtyp wesentlich stärker ab. Eventuell besaß die  $\Delta degP5$ -Mutante ein effizienteres Reparatursystem oder wurde nicht so stark beschädigt wie der Wildtyp. Für die  $\Delta degP2$ -Mutante wurde Entgegen-gesetztes vermutet. Dies konnte durch Zugabe von Lincomycin, einem Proteintrans- lationsinhibitor, überprüft werden. Da beide Mutanten eine gleichstarke Photoinhibierung im Versuch mit Lincomycin zeigten, konnte eine unterschiedlich starke Beschädigung aus- geschlossen werden. Jedoch waren beide Mutanten stärker als der Wildtyp von der Photoinhibierung betroffen.

Trotz Inkubation mit Lincomycin konnte in den Phasen nach der Starklichteinwirkung eine starke Erholung des PSII dokumentiert werden (Abb. 3.43B). Durch die Bestrahlung mit hoher Lichtenergie wird das D1-Protein des PSII zerstört. Die Aktivität des PSII fällt ab. Um sich zu erholen, müsste neues D1 synthetisiert und eingebaut werden. Dies ist jedoch durch die Zugabe von Lincomycin blockiert. Eine andere Erklärung für die ansteigende Aktivität in den Erholungsphasen könnte ein von Finazzi *et al.* (2001) beschriebener Prozess bei *Chlamydomonas reinhardtii* sein. Unter Starklicht wird nicht sofort jedes D1 abgebaut, sondern PSII wird teilweise vom Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex getrennt. Obwohl PSII nicht mehr am Elektronenfluss beteiligt ist, ist es dennoch fähig, die noch an PSII gebundenen  $Q_a$ - und Plastochinon-Moleküle zu reduzieren. Nach längerer Starklicht- einwirkung wird  $Q_a$  überreduziert und der PQ-„pool“ ist an das PSII nur noch in PQH<sub>2</sub>- Form gebunden. Das erklärt den Verlust der photosynthetischen Aktivität, obwohl das D1- Protein nicht abgebaut wird. Dieser Prozess ist reversibel und unabhängig von der Synthese neuer Proteine. Eventuell sah man daher bei Wildtyp und Mutanten ein An- steigen der photosynthetischen Aktivität nach der Lichteinwirkung trotz Anwesenheit von Lincomycin.

#### 4.2.2.2 Biochemische Charakterisierung

Sowohl  $\Delta degP2$ - als auch  $\Delta degP5$ -Mutante zeigten unter Starklicht Probleme in der Sauerstoffentwicklung. Bei fehlendem Austausch des unter Starklicht am schnellsten und häufigsten beschädigten D1-Proteins (Mattoo *et al.*, 1984; Ohad *et al.*, 1985; Aro *et al.*,

1993), ist das PSII nicht mehr fähig, Sauerstoff zu bilden. Es wurde vermutet, dass die DegP2-Protease in den Abbau des D1-Proteins involviert ist. *In vitro* konnte dies bei Haußühl *et al.* (2001) bereits nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte jedoch ein im Vergleich zum Wildtyp normaler Abbau des D1-Proteins in der entsprechenden Mutante beobachtet werden. Als Kontrolle der Auftragsmenge diente das Signal der  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase. Trotz der etwas geringeren Auftragsmenge der Proben 2 und 3 der  $\Delta degP5$ -Mutante konnte eindeutig ein Abbau des D1-Proteins nachgewiesen werden, da das D1-Signal in Probe 3 nochmals geringer war als in Probe 2 (Abb. 3.44). Es wurde daher ausgeschlossen, dass DegP2 und DegP5 in den D1-Abbau involviert sind. Während dieser Arbeit wurde bekannt, dass die Veröffentlichung von Haußühl *et al.* (2001) erst kürzlich zurückgezogen worden war.

Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $\Delta degP2$  mit dem PSII-Monomer komigriert. Ob sich der Verlust der DegP2- und DegP5-Proteasen auf die Bildung und Migration der photosynthetischen Komplexe auswirkt, wurde in Saccharose-Dichtegradienten und blau-nativer Gelelektrophorese überprüft. Sowohl in der zweiten Dimension der BN-PAGE, als auch im Saccharosegradienten selbst konnte eine geringere Menge an LHCII-Monomer in beiden Mutanten erkannt werden. Gleichzeitig war in der  $\Delta degP2$ -Mutante eine leichte Verschiebung des PSII-Monomers in den niedermolekularen Bereich zu sehen. Diese Verschiebung war allerdings nicht in der  $\Delta degP5$ -Mutante zu sehen. Somit hatte die Verschiebung wohl nichts mit der geringeren Menge an LHCII zu tun und einem dadurch leichteren PSII-Monomer. Jedoch konnte zu Beginn gezeigt werden, dass DegP2 im Wildtyp mit dem PSII-Monomer komigriert. Möglicherweise ist das PSII-Monomer durch das Fehlen der Protease leichter. Dies würde tatsächlich für eine Assoziation des DegP2-Proteins an das PSII-Monomer, nicht jedoch zu dessen Vorstufe RC47, sprechen. In der DegP5-Mutante war lediglich eine Verschiebung des PSI in den niedermolekularen Bereich zu erkennen. Dies lag nicht am fehlenden DegP5-Protein, da zu Beginn im Wildtyp eine Assoziation des DegP5-Proteins mit PSI ausgeschlossen werden konnte. Hier konnte sein, dass weniger Antennen an PSI gebunden waren oder dass die wenigen vorhandenen LHCII-Antennen stärker an PSII gebunden waren.

#### 4.2.2.3 Charakterisierung der nicht-photochemischen Löschung (NPQ)

Pflanzen haben einige Mechanismen entwickelt, um sich selbst vor hohen Lichtmengen und -intensitäten zu schützen. Ein wichtiger Mechanismus ist die Bildung von Antioxidantien und deren Enzyme, welche die Pflanze vor reaktiven Sauerstoffspezies (RSS),

die unter Starklicht vermehrt gebildet werden, schützen. Die Hauptantioxidantien in Pflanzen sind das wasserlösliche Ascorbat und Glutathion (Nocter und Foyer, 1998), sowie die fettlöslichen Tocopherole und Carotinoide. Ascorbat wird im Xanthophyllzyklus als Kofaktor der Violaxanthin-de-epoxidase (VDE) für die Produktion von Zeaxanthin (Z) benötigt. Ein anderer wichtiger Mechanismus der vor Starklicht schützt, ist die Energieabgabe in Form von nicht-photochemischer Löschung (NPQ). NPQ besteht aus den drei Komponenten Photoinhibierung  $q_i$ , „state transitions“  $q_T$  und dem „de-excitation quenching“  $q_E$ .

Die PAM-Fluoreszenzmessungen der  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten ergaben teilweise kontroverse Daten für NPQ (Tabelle 3.6). Im Wildtyp wurde unter Starklicht mehr Energie den Komponenten der NPQ zugeführt als der photochemischen Löschung  $q_P$ . Unter Schwachlicht verhielt es sich umgekehrt. Unter Starklicht waren also die NPQ-Werte höher und die  $q_P$ -Werte niedriger als unter Schwachlicht. Die NPQ-Werte der  $\Delta degP5$ -Mutante zeigten die gleiche Tendenz wie im Wildtyp, jedoch waren die NPQ-Werte bei im Vergleich zum Wildtyp gleichbleibender  $q_P$  insgesamt stark erhöht. Im Vergleich zum Wildtyp floss also mehr Energie in die nicht-photochemische Löschung. Bei der  $\Delta degP2$ -Mutante hingegen waren die NPQ-Werte unter Starklicht niedriger als unter Schwachlicht. Jedoch blieben die Werte für  $q_P$  vergleichbar mit denen des Wildtyps. Bei beiden Mutanten wurden Schwierigkeiten mit der Regulierung der NPQ vermutet. NPQ besteht aus mehreren Komponenten. Bei PAM-Messungen kann NPQ jedoch nur als Gesamtwert bestimmt werden. Die Komponenten mussten daher einzeln untersucht werden.

#### 4.2.2.3.1 Photoinhibierung

Die Löschung von Energie über die Photoinhibierung erfolgt meist dann, wenn der Lichtstress länger als 30 - 40 Min. anhält (Schreiber und Bilger, 1987; Horton und Hague, 1988). Wie genau der Mechanismus von  $q_i$  funktioniert, wird noch kontrovers diskutiert. Ein Vorschlag beinhaltet die Bildung beschädigter PSII-Reaktionszentren, welche die eintreffende Anregungsenergie in thermische Energie umwandeln (Cleland, 1988; Giersch und Krause, 1991). Dies resultiert in einer niedrigeren photosynthetischen Aktivität  $F_v/F_m$ . Untersuchungen zum D1-Abbau (Abb. 3.44) hatten ergeben, dass beide Mutanten in der Lage sind, D1 unter Starklicht abzubauen. Der Mechanismus der Photoinhibierung funktionierte in beiden Mutanten. Das Sonderbare dabei war, dass die  $\Delta degP5$ -Mutante trotz Starklicht keine Unterdrückung von  $F_v/F_m$  zeigte (Tabelle 3.6).

#### 4.2.2.3.2 „state transitions“

Trifft kurzfristig viel Licht auf das PSII, so kann die überschüssige Anregungsenergie durch Wanderung der äußeren LHCII-Antennen an das PSI abgegeben werden. In höheren Pflanzen werden dabei nur etwa 20 - 25% der Antennen transferiert. Die Verteilung der Anregungsenergie zwischen den beiden Photosystemen wird durch Phosphorylierung (Bennett, 1991; Allen, 1992) und Dephosphorylierung von LHCII reguliert, was auch als „state 2“ und „state 1“ bezeichnet wird (Williams und Allen, 1987; Allen, 1995). Phosphoryliertes LHCII löst sich vom PSII und assoziiert mit PSI. Dies resultiert in einer Abnahme der PSII-Anregung und einer Zunahme der PSI-Anregung (Allen, 1992). Dunkeladaptierte Blätter befinden sich in „state 1“ und wechseln nach Belichtung teilweise zu „state 2“. Der Wechsel ist reversibel, je nachdem ob mit PSI oder PSII favorisiertem Licht angeregt wird. In 77K-Proben ist in „state 2“ das PSII/PSI-Verhältnis um 10 - 30% niedriger als in „state 1“. Dafür ist meist eine geringere PSII-Emission verantwortlich (Schreiber *et al.*, 1998). Bei 77K-Messungen von Wildtyp,  $\Delta degP2$ -,  $\Delta degP5$ - und  $\Delta psbS$ -Mutanten konnten starke Unterschiede detektiert werden. Während im Wildtyp der Unterschied zwischen „state 1“ und „state 2“ deutlich zu sehen war, war dies in den Mutanten nicht der Fall. Auf den ersten Blick sah es so aus, als wären die  $\Delta degP2$ - und die  $\Delta psbS$ -Mutante in „state 2“ blockiert. Die  $\Delta degP2$ -Mutante hatte unter Schwachlicht ein höheres NPQ als unter Starklicht (Tabelle 3.6). Es wurde bereits nachgewiesen, dass  $q_I$  als Teil der NPQ nicht betroffen ist (Abb. 3.44). Möglich jedoch wäre ein Defekt in  $q_E$ . Das heißt, weniger Energie an PSII wird als Hitze abgegeben. Diese Möglichkeit wäre denkbar, da die  $\Delta psbS$ -Mutante, welche nicht fähig ist  $q_E$  zu machen, ein ähnliches Spektrenmuster sowohl unter Rot- wie Blaulichtbedingungen zeigte.

Bei der  $\Delta degP5$ -Mutante sah es aus, als wäre sie in „state 1“ blockiert. Das heißt, alle LHCII-Antennen befinden sich ständig an PSII. Die Spektren zeigten sich genau umgekehrt zu denen der  $\Delta psbS$ -Mutante. Zudem konnte ein insgesamt erhöhtes NPQ bei dieser Mutante nachgewiesen werden (Tabelle 3.6). Wenn  $q_I$  nicht betroffen war und auch  $q_T$  eventuell nicht involviert war, dann könnte ein erhöhtes  $q_E$  für die hohen NPQ-Werte speziell unter Starklicht sprechen.

#### 4.2.2.3.3. „de-excitation quenching“

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der vor Starklicht schützt, ist die als Komponente der nicht-photochemischen Löschung (NPQ) bekannte Energieabgabe in Form von Hitze ( $q_E$ ; Horton *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2001). Obwohl NPQ aus mehreren Teilen besteht, ist  $q_E$

in Pflanzen der Hauptbestandteil der NPQ und wird durch seine schnelle Induktions-, aber auch Relaxationskinetik, die sich im Sekunden bis Minutenbereich befindet, charakterisiert. Ein Abnehmen der Intensität der Chlorophyllfluoreszenz führt zu einer Zunahme der thermischen Energieabgabe  $q_E$  (Gilmore *et al.*, 1995). Es konnte bereits gezeigt werden, dass  $q_E$  durch das Verhindern einer Überreduzierung von Akzeptoren des Elektronentransportes eine wichtige Rolle bei kurzfristigem Lichtstress spielt (Li *et al.*, 2002). Allerdings ist immer noch unklar, ob  $q_E$  auch langfristig gegen Starklicht schützt oder bei der Langzeitanpassung an Lichtstress involviert ist. Drei Komponenten sind für  $q_E$  notwendig: die Umwandlung von Violaxanthin (V) über Antheraxanthin (A) zu Zeaxanthin (Z) über den Xanthophyllzyklus (Demming-Adams *et al.*, 1989), die Anwesenheit des Proteins PsbS (Li *et al.*, 2000) und die Bildung eines Protonengradienten an der Thylakoidmembran (Müller *et al.*, 2001), die durch einen niedrigen pH-Wert im Thylakoidlumen erreicht wird.

Die Xanthophylle, die in  $q_E$  bei Pflanzen involviert sind, werden über den Xanthophyllzyklus gebildet. Bei Starklicht wird Violaxanthin enzymkatalysiert durch die lumenale Violaxanthin-de-epoxidase (VDE) über Antheraxanthin zu Zeaxanthin umgewandelt und bei Schwachlicht über die stromale Zeaxanthin-Epoxidase zurück zu Violaxanthin (Yamamoto *et al.*, 1999).

PsbS ist eine 22 kDa große Proteinuntereinheit des PSII, welche zu der LHC-Proteinsuperfamilie gehört (Kim *et al.*, 1992; Wedel *et al.*, 1992). Anhand von *Arabidopsis*-„knock out“-Mutanten konnte gezeigt werden, dass PsbS essentiell für die Anwesenheit von  $q_E$  ist (Li *et al.*, 2000).

Das dritte Element, welches wichtig für  $q_E$  ist, ist ein niedriger pH-Wert im Lumen der Thylakoide. Unter Starklicht erhöht sich der  $\Delta pH$  an der Thylakoidmembran durch ein Abfallen des pHs im Lumen sehr stark. Ein niedriger pH-Wert aktiviert die Violaxanthin-de-epoxidase (Yamamoto *et al.*, 1999) und sorgt für die Protonierung von PsbS (Li *et al.*, 2002) und einiger anderer PSII-Proteine (Horton *et al.*, 1996). Die dadurch verursachte Konformationsänderung der Proteine (Horton *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 2001) geht einher mit der Änderung des Energiezustandes von ein bis zwei gebundenen Zeaxanthinmolekülen pro PSII (Ruban *et al.*, 2002). Man glaubt, dass die Chlorophylle des PSII ihre überschüssige Energie auf Zeaxanthin übertragen, welches selbst durch Abgabe der Energie in Form von Hitze in seinen Grundzustand zurückkehren kann (Demming-Adams, 1990; Ma *et al.*, 2003). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass unter allen Xanthophyllen Zeaxanthin und Antheraxanthin als Intermediat für Zeaxanthin die einzigen

sind welche speziell nur unter Starklichtbedingungen durch die De-epoxidierung von vorhandenem Violaxanthin, akkumulieren (Eskling *et al.*, 1997).

Ein Zusammenhang von niedriger NPQ mit einem Defekt in qE, wie er in  $\Delta degP2$  vermutet wurde, konnte durch Überprüfung der Anwesenheit von PsbS und des Carotinoids Zeaxanthin geklärt werden. Die Anwesenheit von PsbS konnte zu 100% in beiden Mutanten nachgewiesen werden (Abb. 3.41B). Mittels HPLC-Messungen konnte auch die Anwesenheit und Mengen der einzelnen Xanthophylle bestimmt werden (Tabelle 3.7). Die  $\Delta degP5$ -Mutante enthielt unter beiden Lichtbedingungen mehr Zeaxanthin relativ zu Violaxanthin als die  $\Delta degP2$ -Mutante. Die erhöhte Zeaxanthinmenge wirkte sich positiv auf die nicht-photochemische Löschung aus. Mehr überschüssige Energie konnte durch Zeaxanthin „gequencht“ werden. Dies erklärte auch die durchgehend erhöhten NPQ Werte der  $\Delta degP5$ -Mutante. Eventuell war in dieser Mutante das Enzym Violaxanthin-de-epoxidase, welches unter Starklicht Violaxanthin zu Zeaxanthin umwandelt stärker aktiviert als im Wildtyp (Yamamoto *et al.*, 1999). Möglicherweise diene die DegP5-Protease, welche auf der lumenale Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist, als Regulator der von der lumenale Seite agierenden Violaxanthin-de-epoxidase.

In der  $\Delta degP2$ -Mutante war ein zu der  $\Delta degP5$ -Mutante umgekehrter Effekt zu sehen. Während unter Standardbedingungen die NPQ-Werte leicht erhöht waren, wurde unter Starklicht nur sehr wenig Energie nicht-photochemisch gelöscht. Die Violaxanthin-de-epoxidase wird unter Starklichtbedingungen aktiviert und wandelt Violaxanthin zu Zeaxanthin um (Yamamoto *et al.*, 1999), welches wiederum überschüssige Anregungsenergie als thermische Energie abgeben kann. War die Violaxanthin-de-epoxidase aufgrund der fehlenden DegP2-Protease nicht im Lumen vorhanden wirkte sich das negativ auf die Bildung von Zeaxanthin und auf die NPQ aus, wie das in der  $\Delta degP2$ -Mutante der Fall war. Die DegP2-Protease ist im Stroma der Thylakoidmembran lokalisiert und konnte nicht direkt im Lumen mit Violaxanthin-de-epoxidase interagieren. Die Violaxanthin-de-epoxidase ist durch ein kern-lokalisiertes Gen kodiert, und das Protein wird aus dem Kern in den Chloroplasten durch Hüll- und Thylakoidmembran transloziert. Ist diese Translokation betroffen, z. B. durch eine fehlende Komponente der Importmaschinerie, wird die Violaxanthin-de-epoxidase nicht ins Lumen importiert. Hier könnte man einen Einfluss der DegP2-Protease auf die Violaxanthin-de-epoxidase-Translokation vermuten.

Der unterschiedliche Xanthophyllgehalt der  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten kann außerdem die beobachteten phänotypischen Merkmale erklären. Außer bei Violaxanthin und

Zeaxanthin haben die analysierten Mutanten auch Unterschiede im Gehalt von Lutein und Neoxanthin gezeigt. Die  $\Delta degP2$ -Mutante zeigte eine erniedrigte Konzentration von Lutein im Dunkeln und unter Starklicht. Es ist bekannt, dass Lutein eine Photoschutzrolle unter Starklicht spielt und sich eine Mutante ohne Lutein sehr langsam entwickelt (Kalituho *et al.*, 2006). Langsameres Wachstum wurde auch in der  $\Delta degP2$ -Mutante beobachtet. Die  $\Delta degP5$ -Mutante jedoch zeigte unter Starklicht einen erhöhten Gehalt an Lutein und unter Starklicht auch ein schnelleres Wachstum als der Wildtyp. Aufgrund seiner Photoschutzrolle kann Lutein in niedriger Konzentration auch die Photoinhibierung des PSII beeinflussen. So könnte die Empfindlichkeit der  $\Delta degP2$ -Mutante gegen starkes Photoinhibierungslicht mit der niedrigeren Konzentration des Lutein erklärt werden. In der  $\Delta degP5$ -Mutante war die Photoinhibierung wegen der erhöhten Konzentration des Luteins vermindert (Abb. 3.42 und 3.43A).

### 4.3 Charakterisierung von SppA in *Arabidopsis*

Die Sequenz der in *Arabidopsis* gefundenen SppA-Protease zeigte sich zu 22% identisch mit einer Serin-Protease des Typs IV (SppA) aus *E. coli* und zu 27% identisch mit der SppA1-Protease aus *Synechocystis*, jedoch fehlten ihr die N-terminalen Transmembransegmente, die in der *E. coli*-Sequenz bestimmt werden konnten (Lensch *et al.*, 2001). SppA1 und vermutlich auch SppA2 sind in *Synechocystis* in die Anpassung an verschiedene Lichtbedingungen involviert (Pojidaeva *et al.*, 2004).

SppA ist eine lichtinduzierbare Protease (Lensch *et al.*, 2001), deren Substrat jedoch noch unbekannt ist. Es ist möglich, dass diese im Chloroplasten lokalisierte Protease am lichtabhängigen Umsatz der Proteine der Thylakoidmembran beteiligt sein könnte. Damit wäre sie neben der FtsH-Protease (Lindahl *et al.*, 1996), welche in den weiteren Abbau des D1-Proteins involviert ist (Lindahl *et al.*, 2000), ein weiteres Beispiel für eine lichtinduzierbare Protease. SppA könnte also in den lichtinduzierbaren Abbau von Proteinen des PSII (Salter *et al.*, 1992; De Las Rivas *et al.*, 1993), aber auch der LHCII-Antennen involviert sein (Lindahl *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998). Denn in beiden Prozessen sollen Serin-Endopeptidasen beteiligt sein (Lindahl *et al.*, 1995).

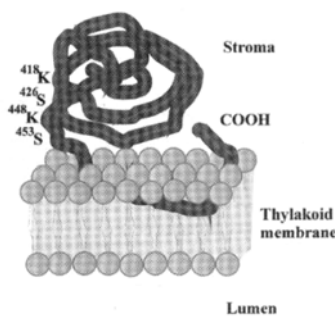
#### 4.3.1 Lokalisierung der SppA-Protease im Chloroplasten

Die Lokalisierung der SppA-Protease in *Arabidopsis* wurde bereits durch ein *in organello*-Importexperiment, welches auf einem *in vitro*-Expressionssystem basiert, und durch Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern bestimmt (Lensch *et al.*, 2001). Durch



Fraktionierung des Chloroplasten in seine Untereinheiten, konnte gezeigt werden, dass SppA von stromaler Seite ausschließlich mit Thylakoidmembranen, hauptsächlich den Stromalamellen, assoziiert und ein Teil eines 270 kDa großen Proteinkomplexes ist (Lensch *et al.*, 2001).

Die Lokalisierung der SppA-Protease im Chloroplasten höherer Pflanzen wurde durch Auftragen von Chloroplastenfraktionen auf ein SDS-Gel nochmals untersucht. Nach dem Transfer der Proteine und Immunodetektion mit einem SppA-Antikörper konnte die Lokalisierung der SppA-Protease an der Thylakoidmembran bestätigt werden. Da in der stromalen Fraktion keine Spuren des SppA-Proteins erkennbar waren, geht man von einer äußerst festen Verankerung der Protease in der Thylakoidmembran aus. Jedoch wurde noch kein Beweis dafür gefunden, dass SppA-Proteindomänen auch der lumenalen Seite zugewandt wären (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Mögliche monotope Anordnung der SppA-Protease innerhalb der Thylakoidmembran.** K (Lysin) und S (Serin) geben die hypothetischen katalytischen Aminosäurereste an (nach Lensch *et al.*, 2001).

Monotope Proteine lassen sich normalerweise leicht durch chaotrope Salze aus der Membran herauslösen. Trotz seiner peripheren Lage verhält sich SppA wie ein intrinsisches Membranprotein (Lensch *et al.*, 2001).

#### 4.3.2 Phänotypische Analysen von $\Delta sppA$

Die SppA-Protease soll eine Rolle in der Anpassung an veränderte Lichtbedingungen spielen. Durch Wachstumsanalysen unter Standardbedingungen ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklicht ( $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sollte herausgefunden werden, ob das Fehlen der SppA-Protease sich negativ auf die Entwicklung der Pflanzen auswirkt. Unter Standardbedingungen wuchs der Wildtyp schneller als die  $\Delta sppA$ -Mutante. Unter Starklichtbedingungen wuchsen Wildtyp und Mutante insgesamt langsamer, zeigten hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit jedoch keine Unterschiede. Sollte die Protease wirklich am Abbau von Proteinen des PSII bzw. der LHCII-Antennen involviert sein, könnte das langsamere Wachstum unter Standardbedingungen am fehlenden Abbau beschädigter Proteine liegen, was als normale Proteinumsatzrate bezeichnet wird. Die photosyn-

thetische Aktivität nahm dadurch ab, was sich negativ auf das Wachstum auswirkte. Unter Starklichtbedingungen traf viel mehr Licht auf die Photosysteme, mehr Proteine wurden beschädigt, die Photosyntheserate und damit auch das Wachstum gingen zurück. Durch die stärkere Stimulierung der Photosysteme konnte kurzfristig mehr Photosynthese betrieben werden und das Wachstum zwischen Wildtyp und Mutante war somit ähnlich. Bei längerer Exposition der Pflanzen unter Starklicht wurde eine stärkere Entwicklungsverzögerung der  $\Delta sppA$ -Mutante durch den fehlenden „turn-over“ an Proteinen vermutet. Die Wachstumsexperimente wurden jedoch hier nicht weiter fortgesetzt.

Bisher durchgeführte biochemische Analysen haben noch keine Differenzen zwischen Wildtyp und  $\Delta sppA$ -Mutante gezeigt. Jedoch wurde eine zu *Synechocystis* unterschiedliche Funktion für SppA angenommen. Erst kürzlich wurde vermutet, dass SppA in *Arabidopsis* als Hilfsregulator der ClpR2-Protease agiert (Rudella *et al.*, 2006). Ob SppA und ClpR2 sich gegenseitig kompensieren können, sollte in einer  $\Delta sppA/clpR2$ -Doppelmutante untersucht werden. Dazu wurden homozygote  $\Delta sppA$ -Pflanzen mit homozygoten  $\Delta clpR2$ -Pflanzen gekreuzt und deren Samen nach homozygoten  $\Delta sppA/clpR2$ -Doppelmutanten selektiert. Weitere Versuche mit der Doppelmutante sollen von der Gruppe von K. J. van Wijk (Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA) durchgeführt werden.

#### **4.4 Vergleichsanalysen von plastidären Proteasen in *Arabidopsis* und *Synechocystis***

##### **4.4.1 Die Deg-Peptidasen**

Die Deg-Peptidasefamilie enthält eine Vielzahl von ATP-abhängigen Serin-Peptidasen, die unter Bakterien und Eukaryoten weitverbreitet sind. In Bakterien sind drei Mitglieder aus dieser HtrA-Familie bekannt: HtrA (DegP), HhoA (DegQ) und HhoB (DegS). HtrA dient in *E. coli* als Hitzestressprotease, welche im Periplasma (Kim *et al.*, 1999; Sassoon *et al.*, 1999) beschädigte Proteine der Zellmembran oder des Periplasmas (Strauch und Beckwith, 1988; Kim *et al.*, 1999) degradiert. Es wird somit für die Funktionstüchtigkeit der Zelle unter erhöhten Temperaturen und oxidativem Stress gebraucht (Strauch *et al.*, 1989; Skorko-Glonek *et al.*, 1997, 1999). Bei niedrigen Temperaturen kann HtrA auch „chaperon“-Funktion haben, welches für die korrekte Faltung von Proteinen verantwortlich ist. Seine proteolytische Aktivität wird erst bei erhöhten Temperaturen aktiviert (Spiess *et al.*, 1999).

HhoA und HtrA sind lösliche Proteine und im Periplasma lokalisiert (Waller und Sauer, 1996), während HhoB membrangebunden ist, jedoch seine katalytische Seite auf die periplasmatische Seite exponiert (Alba *et al.*, 2001). HhoB ist an der Regulation des  $\sigma^E$ -spezifischen Anti-Sigmafaktors RseA beteiligt (Ades *et al.*, 1999; Alba *et al.*, 2001).

In *Synechocystis* hat man unter 62 vermuteten Peptidasen (Sokolenko *et al.*, 2002) drei potentielle Mitglieder der DegP/HtrA-Familie gefunden, welche die gleiche Nomenklatur wie in *E. coli* besaßen. Mit Hilfe von Hydropathieanalysen konnte gezeigt werden, dass HtrA und HhoA stark hydrophil sind und daher wie in *E. coli* lösliche Proteine sein könnten. Sie besitzen N-terminal eine hydrophobe Domäne mit einem typischen Prozessierungsmotiv (Ala-X-Ala), welches bei der Translokation durch Peptidasen erkannt wird. Tatsächlich konnte von HhoA bereits die Lokalisierung im Periplasma nachgewiesen werden (Fulda *et al.*, 2000). In Sequenzanalysen von HhoB hat man eine potentielle hydrophobe Transmembrandomäne ohne Prozessierungsmotiv gefunden, was für eine Membranlokalisierung, ähnlich zu der in *E. coli*, sprechen würde (Alba *et al.*, 2001).

In *Arabidopsis* wurden 14 Gene gefunden, die für Proteine der Deg-Familie kodieren: DegP1-DegP14 (Adam *et al.*, 2001; Sokolenko *et al.*, 2002). Vier davon (DegP1, P2, P5 und P8) konnten eindeutig dem Chloroplasten zugeordnet werden, wo sie in verschiedenen Kompartimenten verteilt sind (Adam *et al.*, 2001). Von DegP14 ist die Lokalisierung im Chloroplasten noch nicht eindeutig nachgewiesen. DegP1, P5 und P8 sind lumenale Peptidasen (Schubert *et al.*, 2002), von denen DegP1 stark an die Thylakoidmembran assoziiert ist (Itzhaki *et al.*, 1998; Lensch, 2002). DegP2 ist von der stromale Seite her an die Thylakoidmembran gebunden.

Trotz einiger Proteinhomologien zwischen den cyanobakteriellen und plastidären pflanzlichen Deg-Proteasen, konnte nicht eindeutig festgelegt werden, welche Deg-Peptidase in *Synechocystis* homolog zu der in *Arabidopsis* war. Auch über Anwesenheit und Anzahl der PDZ-Domänen, welche wichtig für die Substraterkennung sind, konnten keine Aussagen hinsichtlich der Homologie gemacht werden. Ohne funktionelle Analyse der einzelnen Deg-Peptidasen kann nicht gesagt werden, welche von ihnen homolog zueinander waren.

Bei Lokalisierungsversuchen konnte in *Arabidopsis* eine Assoziation der DegP2-Peptidase mit dem PSII-Monomer gezeigt werden. Diese Assoziation konnte mit Hilfe einer PSII-„knock out“-Mutante von Tabak bestätigt werden. Die HtrA- und HhoA-Proteasen aus *Synechocystis* komigrierten ebenfalls mit PSII, jedoch nicht ausschließlich mit dem Mono-

mer. Dennoch wäre eine ähnliche Funktion denkbar. Jedoch wurde die Assoziation mit dem PSII nicht mittels einer PSII-Mutante bestätigt. Die Versuche mit den  $\Delta degP2$ - und  $\Delta degP5$ -Mutanten in dieser Arbeit zeigten deutliche Unterschiede hinsichtlich der Anpassung der Mutanten an Starklichtbedingungen. Jedoch konnten weder in den *Arabidopsis*- $\Delta degP2$ - und  $-\Delta degP5$ -Mutanten noch in einer *Synechocystis*- $\Delta htrA/hhoA/hhoB$ -Dreifachmutante (Nixon *et al.*, 2005), eine essentielle Beteiligung der entsprechenden Peptidasen an der Reparatur des PSII und an dem Abbau des D1-Proteins nachgewiesen werden. Versuche mit  $\Delta hhoA$ - und  $\Delta hhoB$ -Mutanten unter verschiedenen Stressbedingungen (Pojidaeva, 2004) haben gezeigt, dass die betroffenen Peptidasen nicht an der Anpassung an Lichtstress beteiligt sind. Jedoch zeigte die  $\Delta hhoB$ -Mutante einen Phänotyp unter Nährstoffmangel. Bei Eisenmangel fehlte das typische Ausbleichen (Chlorose) der Zellkultur nach einigen Tagen Wachstum. In *Arabidopsis* wurden keine ähnlichen Versuche unter Eisenmangel durchgeführt. Falls hier ein Phänotyp gezeigt werden würde, so könnte dieser allenfalls aus einer zusätzlichen Funktion der Peptidase resultieren, da die Hauptfunktion die Anpassung an Lichtstress beinhaltet.

Die bisher in *Arabidopsis* untersuchten plastidären Peptidasen zeigten eine Beteiligung an der Anpassung an Lichtstress (DegP2 und DegP5), wohingegen in *Synechocystis* bisher nur die  $\Delta hhoB$ -Mutante einen Phänotyp, diesen jedoch unter Eisenmangel, zeigte. Man kann also davon ausgehen, dass die bisher in *Arabidopsis* untersuchten plastidären Deg-Peptidasen (DegP1, DegP2 und DegP5) eine unterschiedliche Funktion zu den drei Deg-Peptidasen in *Synechocystis* haben, die weder eine Anpassung an Lichtstress, noch an Hitzestress zeigten. Eine gemeinsame Funktion kann nicht komplett ausgeschlossen werden, jedoch wurde sie in dieser Arbeit nicht gefunden.

#### 4.4.2 Die SppA-Peptidasen

In *Synechocystis* konnten zwei Gene identifiziert werden, die zur SppA-Familie gehören: *sppA1* und *sppA2*. Beide besitzen unterschiedliches Molekulargewicht, wobei das kürzere Gen für das Protein SppA2 kodiert (30 kDa) und zu 22% identisch ist mit dem C-terminalen Bereich des längeren Gens, welches das SppA1-Protein (60 kDa) kodiert (Lensch *et al.*, 2001). In *Arabidopsis* konnte nur eine SppA-Peptidase gefunden werden, welche Homologie zur SppA1-Peptidase aus *Synechocystis* zeigte. In experimentellen Analysen konnte gezeigt werden, dass SppA ein membrangebundenes, eventuell monotopes Protein ist, welches von der stromalen Seite über eine amphipatische Helix mit der Oberfläche der Thylakoidmembran interagiert (Lensch *et al.*, 2001). Über eine Lokalisierung der SppA1-Peptidase in *Synechocystis* kann bisher nur spekuliert werden.

Jedoch wird aufgrund der Homologie mit *Arabidopsis* ebenfalls eine membranintegrierte Lokalisierung vermutet (Lensch *et al.*, 2001). In *Synechocystis* spielt SppA1 eine Rolle in der Anpassung an Starklichtbedingungen (Pojidaeva *et al.*, 2004). Analysen der SppA2-Peptidase, welche nur in prokaryotischen Organismen gefunden wurde, zeigten, dass SppA2 in der Membran einen Hochmolekulargewichtskomplex formte, der jedoch nicht mit photosynthetischen Komplexen wie PSI, PSII, Cytochrom *b<sub>6</sub>/f*-Komplex und ATP-Synthase assoziiert war. Von SppA2 wurde vermutet, dass es nach der Erholung von dem Starklicht kleine Polypeptide abbaut, die unter Starklichtbedingungen akkumuliert wurden (Pojidaeva, 2004). In den bisher in *Arabidopsis* durchgeführten biochemischen Analysen konnte keinerlei ähnliche Funktion von SppA zu SppA1 bzw. SppA2 aus *Synechocystis* detektiert werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Unterschiedliche Stressbedingungen wie Starklicht, Hitze oder Nährstoffmangel können zu einem Abbau photosynthetischer Komplexe wie dem Photosystem I, dem Photosystem II oder Antennenproteinen führen. Dieser Abbau wird durch spezifische Proteasen durchgeführt. Die Proteasen können dabei direkt am Abbau der Strukturproteine beteiligt sein oder aber die Translation oder Transkription von Strukturproteinen oder solchen, die am Schutz photosynthetischer Proteine unter Stressbedingungen beteiligt sind, beeinflussen. Eisenmangel kann z. B. in Pflanzen und in Cyanobakterien zu Chlorose führen. Eisen ist an der Bildung von Chlorophyll beteiligt und kann in Form eines Sauerstoffträgers als Katalysator bei der Atmung agieren. Zudem ist Eisen als Kofaktor von Cytochromen und einigen Enzymen, wie Peroxidase und Katalase, für deren Funktionalität essentiell.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Deg- und SppA-Proteasen aus *Synechocystis* und *Arabidopsis* bei der Anpassung an verschiedene Stressbedingungen analysiert. Die plastidären Deg-Peptidasen werden durch vier Mitglieder, drei lumenale Enzyme (DegP1, DegP5 und DegP8) und einem stromalen Enzym (DegP2), vertreten. In *Synechocystis* besteht die Deg-Familie aus drei Komponenten, HtrA (DegP), HhoA (DegQ) und HhoB (DegS).

Die HhoB (DegS)-Protease, die im *Synechocystis*-Genom durch das *sll1427*-Gen kodiert wird, ist in die Anpassung an Eisenstress involviert. Die  $\Delta hhoB$ -Mutante zeigte sich unter Eisenmangel weniger angepasst und blieb auch nach längerer Stresseinwirkung grün. Die Mutante bildete sehr wohl die zum Schutz vor Eisenmangel benötigten Proteine, jedoch war die Expression von photosynthetischen Genen unter Stressbedingungen nicht wie im Wildtyp herabreguliert. Es wird vermutet, dass HhoB, ähnlich zu der DegS-Protease aus *E. coli*, an der Regulation der Genexpression beteiligt ist. Jedoch anders als bei *E. coli* wird bei Abwesenheit des DegS-Proteins die Expression nicht herabreguliert, sondern hochreguliert.

Die DegP2- und DegP5-Proteasen aus *Arabidopsis* sind bei der Anpassung an Lichtstress involviert. Sie sind dabei aber nicht an der Reparatur des PSII oder am Abbau des D1-Proteins beteiligt. Die  $\Delta degP2$ -Mutante zeigte unter Lichtstress eine geringere nicht-photochemische Löschung (NPQ), die  $\Delta degP5$ -Mutante eine höhere NPQ. Die NPQ besteht aus drei Komponenten, der Photoinhibierung qI, der „state transition“ qT und dem „de-excitation quenching“ qE, wobei die ersten beiden nicht betroffen waren. Dass qE betroffen war, wurde anhand des Verhältnisses der Xanthophylle Violaxanthin und Zea-

xanthin bestimmt. Zeaxanthin wirkt sich positiv auf die NPQ aus. Die  $\Delta degP5$ -Mutante enthielt mehr Zeaxanthin relativ zu Violaxanthin als die  $\Delta degP2$ -Mutante. Beide Proteasen, DegP5 und DegP2, könnten Regulatoren der luminalen Violaxanthin-depoxidase, welche Violaxanthin zu Zeaxanthin umwandelt, sein. Die DegP2- und die DegP5-Protease agieren als Gegenspieler bei der Löschung überschüssiger Anregungsenergie.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

**Adam, Z., Adamska, I., Nakabayashi, K., Ostersetzer, O., Haussuhl, K., Manuell, A., Zheng, B., Vallon, O., Rodermeil, S. R., Shinozaki, K., Clarke, A. K. (2001a):** Chloroplast and mitochondrial proteases in *Arabidopsis*. A proposed nomenclature. *Plant Physiol* 125, 1912-1918

**Adam, Z., Ostersetzer, O. (2001b):** Degradation of unassembled and damaged thylakoid proteins. *Biochem Soc Trans* 29, 427-430

**Adamska, I., Ohad, I., Kloppstech, K. (1992a):** Synthesis of the early-light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2610-2613

**Adamska, I., Kloppstech, K., Ohad, I. (1992b):** UV Stress Induces the Synthesis of the Early Light-inducible Protein and Prevents Its Degradation. *J Biol Chem* 267 (34), 24732-24737

**Adamska, I., Kloppstech, K., Ohad, I. (1993):** Early Light-inducible Protein in Pea Is Stable during Light Stress but Is Degraded during Recovery at Low Light Intensity. *J Biol Chem* 268 (8), 5438-5444

**Adamska, I., Lindahl, M., Roobol-Bóza, M., Andersson, B. (1996):** Degradation of the light-stress protein is mediated by an ATP-independent, serine-type protease under low-light conditions. *Eur J Biochem* 236, 591-599

**Adamska, I., Roobol-Róza, M., Lindahl, M., Andersson, B. (1999):** Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem* 260, 453-460

**Ades, S.E., Connolly, L.E., Alba, B.M., Gross, C.A. (1999):** The *Escherichia coli* sigma(E)-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti-sigma factor. *Genes Dev* 13, 2449-2461

**Alba, B. M., Zhong, H. J., Pelayo, J. C., Gross, C. A. (2001):** *DegS (hhoB)* is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide sigma activity. *Mol Microbiol* 40, 1223-1233

**Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E., Arntzen, C.J. (1981):** Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291, 25-29

**Allen, J.F., Sanders, C.E., Holmes, N.G. (1985):** Correlation of membrane protein phosphorylation with excitation energy distribution in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *FEBS Lett* 193, 271-275



**Allen, J.F., Holmes, N.G. (1986):** A general model for regulation of photosynthetic unit function by protein phosphorylation. *FEBS Lett* 202, 175-181

**Allen, J.F. (1992):** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1098 (3), 275-335

**Allen, J.F. (1995):** Thylakoid protein phosphorylation, state 1-state 2 transitions, and photosystem stoichiometry adjustment: redox control at multiple levels of gene expression. *Physiol Plant* 93, 196-205

**Allen, J.F., Forsberg, J. (2001):** Molecular recognition in thylakoid structure and function. *TRENDS in Plant Science* 6, 317-326

**Anderson, J.M. (1986):** Photoregulation of the Composition, Function and Structure of Thylakoid Membranes. *Annu Rev Plant Physiol* 37, 93-136

**Andersson, B., Aro, E.M. (2001):** Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In *Regulation of Photosynthesis*, E.M. Aro and B. Andersson, eds Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (The Netherlands), 377-393

**Appleyard, R.K. (1954):** Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from *Escherichia coli*. *Genetics* 39, 440-452

**Aro, E.M., Virgin, I., Andersson, B. (1993):** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143, 113-134

**Aspinwall, C.L., Duncan, J., Bibby, T., Mullineaux, C.W., Barber, J. (2004):** The trimeric organisation of photosystem I is not necessary for the iron-stress induced CP43' protein to functionally associate with this reaction centre. *FEBS Letters* 574, 126-130

**Avital, S., Brumfeld, V., Malkin, S. (2006):** A micellar model system for the role of zeaxanthin in the non-photochemical quenching process of photosynthesis – chlorophyll fluorescence quenching by the xanthophylls. *Biochim Biophys Acta* 1757, 798-810

**Baena-González, E., Barbato, R., Aro, E.-M. (1999):** Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta* 208, 196-204

**Bailey, S., Thompson, E., Nixon, P.J., Horton, P., Mullineaux, C.W., Robinson, C., Mann, N.H. (2002):** A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystemII repair cycle in vivo. *J Biol Chem* 277, 2006-2011

- Bald, D., Kruij, J., Rogner, M. (1996):** Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: how is the phycobilisome connected with the photosystems? *Photosynthesis Res* 49, 103-118
- Barbato, R., Frizzo, A., Friso, G., Rigoni, F., Giacometti, G.M. (1995):** Degradation of the D1 protein of photosystemII reaction centre by ultraviolet-B radiation requires the presence of functional manganese on the donor side. *Eur J Biochem* 227, 723-729
- Barber, J., Andersson, B. (1992):** Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem Sci* 17, 61-66
- Barber, J., Nield, J. (2002):** Organization of transmembrane helices in photosystem II: comparison of plants and cyanobacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357 (1426), 1329-1335
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., Rochaix, J.D. (2005):** State transition and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433, 892-895
- Bennett, J. (1977):** Phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Nature* 269, 344-346
- Bennett, J. (1991):** Protein phosphorylation in green plant chloroplast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 281-311
- Bibby, T.S., Nield, J., Barber, J. (2001a):** Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature* 412, 743-745
- Bibby, T.S., Nield, J., Barber, J. (2001b):** Three-dimensional model and characterization of the iron-stress-induced CP43'-photosystem I supercomplex isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 276, 43246-43252
- Biggins, J., Campbell, C.L., Bruce, D. (1984):** Mechanism of the light state transition in photosynthesis. II. Analysis of phosphorylated polypeptides in the red alga *Porphyridium cruentum*. *Biochim Biophys Acta* 767, 138-144
- Birky, C.W. Jr. (2001):** The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annu Rev Genet* 35, 125-148
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1524

**Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987):** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 8, 93-99

**Boekema, E.J., Hifney, A., Yakushevskaya, A.E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K.P., Pistorius, E.K., Kruip, J. (2001):** A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* 412, 745-748

**Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P., Leister, D. (2005):** Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* 437 (7062), 1179-1182

**Bonaventura, C., Myers, J. (1969):** Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta* 189, 366-383

**Bryant D. A. (1994):** The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers

**Burnap, R., Troyan, T., Sherman, L.A. (1993):** The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC 7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. *Plant Physiol* 103, 893-902

**Butterfass, T. (1980):** The continuity of plastids and the differentiation of plastid populations. In: Results and problems in cell differentiation. Vol. 10. Chloroplasts (Reinert, J., ed.). Berlin: Springer, pp. 29-44

**Byrdin, M., Jordan, P., Krauss, N., Fromme, P., Stehlik, D., Schlodder, E. (2002):** Light harvesting in photosystem I: modeling based on the 2.5-A structure of photosystem I from *Synechococcus elongatus*. *Biophys J* 83 (1), 433-457

**Choquet, Y., Vallon, O. (2000):** Synthesis, assembly and degradation of thylakoid membrane proteins. *Biochimie* 82, 615-634

**Choquet, Y., Zito, F., Wostrikoff, K., Wollman, F.A. (2003):** Cytochrome f translation in *Chlamydomonas* chloroplast is autoregulated by its carboxyl-terminal domain. *Plant Cell* 15, 1443-1454

**Clarke, A.K. (1999):** ATP-dependending Clp proteases in photosynthetic organism – a cut above the rest. *Ann Bot* 83, 593-599

**Clausen, T., Southan, C., Ehrmann, M. (2002):** The HtrA family of proteases: Implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell* 10, 443-455

**Cleland, R.E. (1988):** Molecular events of photoinhibitory inactivation in the reaction centre of photosystem II. *Austr J Plant Physiol* 15, 135-150

**Collier J.L., Grossman, A.R. (1992):** Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* 174, 4718-4726

**De Las Peñas, A., Connolly, L., Gross, C.A (1997a):**  $\sigma^E$  is an essential sigma factor in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179, 6862-6864

**De Las Peñas, A., Connolly, L., Gross, C.A (1997b):** The  $\sigma^E$ -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA und RseB, two negative regulators of  $\sigma^E$ . *Mol Microbiol* 24, 373-385

**De Las Rivas, J., Shipton, C.A., Ponticos, M., Barber J. (1993):** Acceptor side mechanism of photoinduced proteolysis of the D1 protein in photosystem II reaction centers. *Biochemistry* 32, 6944-6950

**Delosome, R., Olive, J., Wollman, F.A. (1996):** Changes in light energy distribution upon state transitions: an *in vivo* photoacoustic study of wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1273, 150-158

**Demming-Adams, B., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F-C. (1989):** Light response of carbon dioxide assimilation dissipation of excess excitation energy and zeaxanthin content of sun and shade leaves. *Plant Physiol* 84, 218-224

**Demming-Adams, B. (1990):** Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020, 1-24

**Douglas, S.E. (1998):** Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8, 655-661

**Enz, S., Mahren, S., Stroehler, U.H., Braun, V. (2000):** Surface signalling in ferric citrate transport gene induction: Interaction of the FecA, FecR and FecI regulatory proteins. *J Bacteriol* 182, 637-646

**Eskling, M., Arvidsson, P.-O., Akerlund, H.-E. (1997):** The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol Plant* 100, 806-816

**Exss-Sonne, P., Tölle, J., Bader, K.P., Pistorius, E.K., Michel, K.-P. (2000):** The IdiA protein of *Synechococcus* sp. PCC 7942 functions in protecting the acceptor side of photosystem II under oxidative stress. *Photosynth Res* 63, 145-157

**Falk, S., Samson, G., Bruce, D., Huner, N.P.A., Laudenbach, D.E. (1995):** Functional analysis of the iron-stress induced CP43' polypeptide of PSII in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Photosynth Res* 45, 51-60

**Ferreira F., Straus, N.A. (1994):** Iron deprivation in cyanobacteria. *J Appl Phycol* 6, 199-210

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

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

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

**Flynn, J.M., Levchenko, I., Seidel, M., Wickner, S.H., Sauer, R.T., Baker, T.A. (2001):** Overlapping recognition determinants within the *ssrA* degradation tag allow modulation of proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10584-10589

**Foth, B.J., McFadden, G.I. (2003):** The apicoplast: A plastid in *Plasmodium falciparum* and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* 224, 57-110

**Frees, D., Ingmer, H. (1999):** ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 31, 79-87

**Fulda, S., Huang, F., Nilsson, F., Hagemann, M., Norling B. (2000):** Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. *Eur J Biochem* 267, 5900-5907

**Funk, C., Vermaas, W. (1999):** A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry* 38, 9397-9404

**Gal, A., Schuster, G., Fird, D., Canaani, O., Schwieger, H.G., Ohad, I. (1988):** Role of cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex in the redox controlled activity of *Acetabularia* thylakoid protein kinase. *J Biol Chem* 263, 7785-7791

**Gantt, E. (1981):** Phycobilisomes. *Ann Rev Plant Physiol* 32, 327-47

**García-Lorenzo, M., Zelisko, A., Jackowski, G., Funk, C. (2005):** Degradation of the main photosystem II light-harvesting complex. *Photochem Photobiol Sci* 4, 1065-1071

**Giersch, C., Krause, G.H. (1991):** A simple model relating photoinhibitory fluorescence quenching in chloroplasts to a population of altered photosystem II reaction centers. *Photosyn Res* 30, 115-121

**Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. (1991):** Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-endcapped, lightly carbon-loaded C<sub>18</sub> high-performance liquid chromatographic column. *J Chromat* 543, 137-145

**Gilmore, A.M., Hazlett, T.L., Govindjee (1995):** Xanthophyll cycle-dependent quenching of photosystem II chlorophyll *a* fluorescence: formation of a quenching complex with a short fluorescence lifetime. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 2273-2277

**Glazer A.N. (1984):** Phycobilisome: a macromolecular complex optimised for light energy transfer. *Biochem Biophys Acta* 768, 29-51

**Godinot, C., Di Pietro, A. (1986):** Structure and function of the ATPase- ATP synthase complex of mitochondria as compared to chloroplast and bacteria. *Biochimie* 68 (3), 367-374

**Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., Mattick, J.S., Dalrymple, B., Kuramitsu, H., Shiroza, T., Foster, T. (1990):** Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (9), 3513-3517

**Gottesman, S., Maurizi, M.R., Wickner, S. (1997a):** Regulatory subunits of energy-dependent peptidases. *Cell* 91, 435-438

**Gottesman, S., Wickner, S., Maurizi, M.R. (1997b):** Protein quality control: triage by chaperones and peptidases. *Genes Dev* 11, 815-823

**Grossman, A.R., Schaefer, M.R., Chiang, G.G., Collier, J.L. (1993):** The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* 57, 725-749

**Groth, G., Pohl, E. (2001):** The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J Biol Chem* 276 (2), 1345-1352

**Guikema J.A., Sherman, L.A. (1983a):** Chlorophyll-protein organization of membranes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Arch Biochem Biophys* 220, 155-166

**Guikema J.A., Sherman, L.A. (1983b):** Organization and function of chlorophyll in membranes of cyanobacteria during iron starvation. *Plant Physiol* 73, 250-256

**Haag, E., Eaton-Rye, J., Renger, G., Vermaas, W.J. (1993):** Functionally important domains of the large hydrophilic loop of CP47 as probed by oligonucleotide-directed mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 32, 4444-4454

**Häder, D. - P. (1999):** Photosynthese. Thieme Verlag, Stuttgart

**Hagemann, R. (1992):** Plastid genetics in higher plants. In: Plant gene research. Vol. 6 (Herrmann, R.G., ed.). Wien, New York: *Springer*, pp. 65-96

**Haldrup, A., Naver, H., Scheller, H.V. (1999):** The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant J* 17, 689-698

**Hamel, P., Olive, J., Pierre, Y., Wollmann, F.A., de Vitry, C. (2000):** A new subunit of cytochrome  $b_6/f$  complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J Biol Chem* 275 (22), 17072-17079

**Hammer, M.F., Markwell, J., Sarath, G. (1997):** Purification of a protein phosphatase from chloroplast stroma capable of dephosphorylating the light-harvesting-complex-II. *Plant Physiol* 113, 227-233

**Hanahan, D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580

**Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Carne, A., Barber, J. (2001):** Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Lett* 504, 142-151

**Haußühl, K., Andersson, B., Adamska, I. (2001):** A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *EMBO J* 20 (4), 713-722

**Havaux, M., Guedeney, G., He, Q., Grossman, A.R. (2003):** Cyanobacterial high light inducible polypeptides (HLIPs) of eukaryotic chlorophyll a/b-binding protein family function as light energy dissipators. *Biochim Biophys Acta* 1557, 21-33

**He, Q., Doganov, O., Björkman, O., Grossman, A.R. (2001):** The high-light inducible polypeptides in *Synechocystis* PCC 6803. Expression and function in high light. *J Biol Chem* 276, 306-314

- Heddad, M., Adamska, I. (2000):** Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll a/b-binding gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3741-3746
- Herranen, M., Battchikova, N., Zhang, P., Graf, A., Sirpiö, S., Paakkari, V., Aro, E.M. (2004):** Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* 134, 470-481
- Herrmann, R.G. (1997):** Eukaryotism, towards a new interpretation. In: *Eukaryotism and symbiosis* (Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E., Schwemmler, W., eds). Heidelberg, New York: Springer, pp. 73-118
- Hervas, M., Navarro, J.A., De La Rosa, M.A. (2003):** Electron transfer between membrane complexes and soluble proteins in photosynthesis. *Acc Chem Res* 36, 798-805
- Hihara, Y., Sonoike, K., Ikeuchi, M. (1998):** A novel gene, pmgA, specifically regulates photosystem stoichiometry in the cyanobacterium *Synechocystis* species PCC 6803 in response to high light. *Plant Physiol* 117, 1205-1216
- Hihara, Y., Kamei, A., Kanehisa, M., Kaplan, A., Ikeuchi, M. (2001):** DNA microarray analysis of cyanobacterial gene expression during acclimation to high light. *Plant Cell* 13, 793-806
- Hipler, D., Rimbault, B., Takahashi, Y. (2002):** Photosynthetic complex assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* 153, 197-220
- Holt, N.E., Fleming, G.R., Niyogi, K.K. (2004):** Toward an understanding of the mechanism of non-photochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43 (26), 8281-8289
- Hope, A.B. (2000):** Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1456 (1), 5-26
- Horton, P., Allen, J.F., Black, M.T., Bennet, J. (1981):** Regulation of phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides by the redox state of plastoquinone. *FEBS Lett* 125, 193-196
- Horton, P., Hague, A. (1988):** Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim Biophys Acta* 932, 107-115
- Horton, P., Ruban, A.V., Walters, R.G. (1996):** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 655-684



- Huang, F., Hedman, E., Funk, C., Kieselbach, T., Schroeder, W.P., Norling, B. (2004):** Isolation of outer membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its proteomic characterization. *Mol Cell Proteomics* 3, 586-595
- Ikegami, I., Itoh, S., Iwaki, M. (2000):** Selective extraction of antenna chlorophylls, carotenoids and quinones from photosystem I reaction center. *Plant Cell Physiol* 41 (10), 1085-1095
- Itzhaki, H., Naveh, L., Lindahl, M., Cook, M., Adam, Z. (1998):** Identification and characterization of DegP, a serine protease associated with the luminal side of the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 273 (12), 7094-7098
- Jackowski, G., Kacprzak, K., Jansson, S. (2001):** Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochim Biophys Acta* 1504, 340-345
- Jenal, U., Fuchs, T. (1998):** An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J* 17, 5658-5669
- Jensen, P.E., Haldrup, A., Rosgaard, L., Scheller, H.V. (2003):** Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function. *Physiol Plant* 119, 313-321
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., Krauss, N. (2001):** Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, 909-917
- Kalituho, L., Rech, J., Jahns, P. (2006):** The roles of specific xanthophylls in light utilization. *Planta*
- Kaneko T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S. (1996):** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* 3, 109-136
- Kashino, Y., Koike, H., Yoshio, M., Egashira, H., Ikeuchi, M., Pakrasi, H.B., Satoh, K. (2002):** Low-molecular-mass polypeptide components of a photosystem II preparation from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus vulcanus*. *Plant Cell Physiol* 43, 1366-1373
- Khyse-Andersen J. (1994):** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to Nitrocellulose. *J Biochem Biophys Met* 10, 203-209

**Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N.R., Aebersold, R., Green, B.R., Vlahakis, S., Yocum, C.F., Pichersky, E. (1992):** Characterization of a spinach psbS cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS Lett* 314, 67-71

**Kim, K. I., Park, S. C., Kang, S. H., Cheong, G. W., Chung, C. H. (1999):** Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalizing HtrA peptidase, a periplasmic heat stress protein in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 294, 1363-1374

**Kluge, C., Lahr, J., Hanitzsch, M., Bolte, S., Gollmack, D., Dietz, K. J. (2003):** New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 35 (4), 377-388

**Koller, K.P., Wehrmeyer, W., Mörschel, E. (1978):** Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. On the molecular composition of energy- transferrin complexes (Tripartite units) forming the periphery of the phycobilisome. *Eur J Biochem* 91, 57-63

**Komenda, J., Reisinger, V., Müller, B.C., Dobakova, M., Granvogl, B., Eichacker, L.A. (2004):** Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 279, 48620-48629

**Krüger, E., Witt, E., Ohlmeier, S., Hanschke, S., Hecker, M. (2000):** The Clp peptidases of *Bacillus subtilis* are directly involved in degradation of misfolded proteins. *J Bacteriol* 182, 3259-3265

**Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685

**Lagarde, D., Beuf, L., Vermaas, W. (2000):** Increased production of zeaxanthin and other pigments by application of genetic engineering techniques to *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* 66, 64-72

**Lange, W., Wilhelm, C., Wehrmeyer, W., Mörschel, E. (1990):** The supramolecular structure of photosystem II-phycobilisome-complexes of *Porphyridium cruentum*. *Bot Acta* 103, 250-257

**Larsson, U.K., Anderson, J.M., Andersson, B. (1987):** Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. *Biochim Biophys Acta* 894, 69-75

**Laudenbach, D.E., Reith, M.E., Straus, N.A. (1988):** Isolation, sequence analysis and transcriptional studies of the flavodoxin gene from *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* 170, 258-165

**Laudenbach, D.E., Straus, N.A. (1988):** Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to psbC. *J Bacteriol* 170, 5018-5026

**Lensch, M., Herrmann, R. G., Sokolenko, A. (2001):** Identification and characterization of SppA, a novel light-inducible chloroplast protease complex associated with thylakoid membranes. *J Biol Chem* 276, 33645-33651

**Lensch, M. (2002):** Identifizierung und Charakterisierung von Proteasen der Photosynthesemembran. Doktorarbeit, LMU, München

**Leonhard, K., Herrmann, J.M., Stuart, R.A., Mannhaupt, G., Neupert, W., Langer, T. (1996):** AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surface comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J* 15, 4218-4229

**Lezhneva, L., Amann, K., Meurer, J. (2004):** The universally conserved HCF101 protein is involved in assembly of [4Fe-4S]- cluster-containing complexes in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant J* 37, 174-185

**Li, H.H., Merchant, S. (1995):** Degradation of plastocyanin in copper-deficient *C. reinhardtii*: evidence for a protease-susceptible conformation of the apoprotein and a regulated proteolysis. *J Biol Chem* 270, 23504-23510

**Li, X-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000):** A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403, 391-395

**Li, X-P., Gilmore, A.M., Niyogi, K.K. (2002a):** Molecular and global time-resolved analysis of a *psbS* gene dosage effect on pH- and xanthophylls cycle-dependent non-photochemical quenching in photosystem II. *J Biol Chem* 277, 33590-33597

**Li, X-P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A.A., Niyogi, K.K. (2002b):** PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from Photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15222-15227

**Lindahl, M., Yang, D.H., Andersson, B. (1995):** Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur J Biochem* 231, 503-509

- Lindahl, M., Tabak, S., Cseke, L., Pichersky, E., Andersson, B., Adam Z. (1996):** Identification, characterization and molecular cloning of a homologue of the bacterial FtsH protease in chloroplasts of higher plants. *J Biol Chem* 271, 19329-19334
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z., Andersson, B. (2000):** The Thylakoid FtsH Protease Plays a Role in the Light-Induced Turnover of the PhotosystemII D1 Protein. *Plant Cell* 12, 419-431
- Lipinska, B., Sharma, S., Georgopoulos, C. (1988):** Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res* 16, 10053-10067
- Lipinska, B., Zylitz, M., Georgopoulos, C. (1990):** The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J Bacteriol* 172, 1791-1791
- Liu, X., Zhao, J., Wu, Q. (2005):** Biogenesis of Chlorophyll-Binding Proteins under Iron Stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 71, S101-S104
- Loll, B., Kern, J., Zouni, A., Saenger, W., Biesiadka, J., Irrgang, K.D. (2005):** The antenna system of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* at 3,2 Å resolution. *Photosynth Res* 86, 175-184
- Lorimier, R.M., Smith R.L. Jr, Stevens S.E. (1991):** Regulation of phycobilisomes structure and gene expression by light intensity. *Plant Physiol* 98, 1003-1010
- Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951):** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Lunde, C., Jensen, P.E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H.V. (2000):** The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* 408 (6812), 613-615
- Ma, Y.Z., Holt, N.E., Li, X.-P., Niyogi, K.K., Fleming, G.R. (2003):** Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4377-4382
- MacColl, R. (1998):** Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol* 124, 311–334
- Mann, N.H., Novac, N., Mullineaux, C.W., Newman, J., Bailey, S., Robinson, C. (2000):** Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystemI in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett* 479, 72-77

**Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A. (1983):** The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 151, 297-314

**Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. (1978):** A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87, 206-210

**Martin, W., Herrmann, R.G. (1998):** Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* 118, 9-17

**Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M., Kowallik, K.V. (1998):** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162-165

**Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marder, J.B., Edelman, M. (1984):** Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolised 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1380-1384

**McFadden, G.I., van Dooren, G.G. (2004):** Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol* 14, 514-516

**Meccas, J., Rouviere, P.E., Erickson, J.E., Donohue, T.J., Gross, C.A. (1993):** The activity of  $\sigma^E$ , an *Escherichia coli* heat-inducible sigma factor, is modulated by the expression of outer membrane proteins. *Genes Dev* 7, 2618-2628

**Mereschkowsky, C. (1905):** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* 25, 593 – 604. [English translation in: Martin, W. and 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

**Michel, K.-P., Thole, H.H., Pistorius, E.K. (1996):** IdiA, a 34 kDa protein in the cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 6301 and PCC 7942, is required for growth under iron and manganese limitations. *Microbiology* 142, 2635-2645

**Missiakas, D., Mayer, M.P., Lemaire, M., Georgopoulos, C., Raina, S. (1997) :** Modulation of the *Escherichia coli*  $\sigma^E$  (RpoE) heat shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol Microbiol* 24, 355-371

**Mitchell, P. (1975):** A chemiosmotic molecular mechanism of the cytochrome  $bc_1$  complex in the respiratory chain: proton motive ubiquinone cycle. *FEBS Lett* 56, 1-6

- Mörschel, E., Koller, K. P., Wehrmeyer, W., Schneider, H. (1977):** Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. I. Electron microscopy of phycobilisomes *in situ* and analysis of their architecture after isolation and negative staining. *Cytobiol* 16, 118-129
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M. L., Denizot, F., Rapoport, G. (1998):** ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol Microbiol* 27, 899-914
- Müller, P., Li, X.P., Niyogi, K. K. (2001):** Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol* 125,1558-1566
- Mullineaux, C.W., Allen, J.F. (1990):** State 1- state 2 transitions in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 are controlled by the state of electron carriers between Photosystem I and II. *Photosynth Res* 23, 297-311
- Mullineaux, C.W. (1992):** Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium. *Biochim Biophys Acta* 1100, 285-292
- Mullineaux, C.W. (1994):** Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1184, 71-77
- Mullineaux C.W., Tobin, M.J., Jones, G.R. (1997):** Mobility of photosynthetic complexes in thylakoid membranes. *Nature* 390, 421-424
- Murashige, T., Skoog, F. (1962):** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologica Plantarum* 15, 473-497
- Murata, N. (1969):** Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim Biophys Acta* 172, 242-251
- Nakatani H. Y., Ke, B., Dolan, E., Arntzen, C. J. (1984):** Identity of the photosystem II reaction center polypeptide. *Biochim Biophys Acta* 765, 347-352
- Nanamiya, H., Ohashi, Y., Asai, K., Moriya, S., Ogasawara, N., Fujita, M., Sadaie, Y., Kawamura, F. (1998):** ClpP regulates the fate of a sporulation initiation sigma factor, sigmaH protein, in *Bacillus subtilis* at elevated temperatures. *Mol Microbiol* 29, 505-513
- Nixon, P.J., Barker, M., Boehm, R., de Vries, R., Komenda, J. (2005):** FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *J Exp Bot* 56, 357-363

- Niyogi, K.K., Bjorkman, O., Grossman, A.R. (1997):** The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14162-14167
- Nocter, G., Foyer, C.H. (1998):** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 249-279
- Nultsch, W. (2001):** Allgemeine Botanik, Thieme Verlag, Stuttgart
- Ostersetzer, O., Adam, Z. (1997):** Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease. *Plant Cell* 9, 957-965
- Ohad, I., Kyle, D.J., Arntzen, C.J. (1984):** Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32-kilodaltons polypeptides in chloroplast membranes. *J Cell Biol* 270, 14919-14927
- Ohad, I., Kyle, D.J., Hirschberg, J. (1985):** Light-dependent degradation of the Q<sub>B</sub>-protein in isolated pea thylakoids. *EMBO J* 4, 1655-1659
- Park, Y.I., Sandstrom, S., Gustafsson, P., Oquist, G. (1999):** Expression of the *isiA* gene is essential for the survival of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. 7942 by protecting photosystem II from excess light under iron limitation. *Mol Microbiol.* 32, 123-129
- Pedersen, P.L., Amzel, L.M. (1993):** ATP synthases. Structure, reaction centre, mechanism and regulation of one of nature's most unique machines. *J Biol Chem* 268, 9937-9940
- Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P., van Wijk, K. J. (2001):** Identification of a 350 kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplast of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276, 16318-16327
- Pesaresi, P., Varotto, C., Richly, E., Kurth, J., Salamini, F., Leister, D. (2001):** Functional genomics of *Arabidopsis* photosynthesis. *Plant Physiol Biochem* 39, 285-294
- Piven, I., Ajlani, G., Sokolenko, A. (2005):** Phycobilisome linker proteins are phosphorylated in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 280, 21667-21672
- Plücker, H., Müller, B., Grohmann, D., Westhoff, P., Eichacker, L. A. (2002):** The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 532, 85-90
- Pojidaeva, E., Zinchenko, V., Shestakov, S.V., Sokolenko, A. (2004):** Involvement of the SppA1 peptidase in acclimation to saturating light intensities in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 86 (12), 3991-3999

- Pojidaeva, E. (2004):** Functional analysis of peptidases from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Doktorarbeit, LMU, München
- Race, H.L., Herrmann, R.G., Martin, W. (1999):** Why have organelles retained genomes? *Trends in Genetics* 15 (9), 364-370
- Raina, S., Missiakas, D., Georgopoulos, C. (1995):** The *rpoE* gene encoding the  $\sigma^E$  ( $\sigma^{24}$ ) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J* 15(5), 1043-1055
- Rhee, K.H. (2001):** Photosystem II: the solid structural era. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30, 307-328
- Rintamäki, E., Kettunen, R., Aro, E.-M. (1996):** Differential D1 phosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers. Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1. *J Biol Chem* 271, 14870-14875
- Rippka, R. (1988):** Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* 167, 3-27
- Robinson, C., Thompson, S. J., Woolhead, C. (2001):** Multiple pathways used for the targeting of thylakoid proteins in Chloroplasts. *Traffic* 2, 245-251
- Rokka, A., Aro, E.M., Herrmann, R.G., Andersson, B., Vener, A.V. (2000):** Dephosphorylation of photosystem II reaction centre proteins in plant photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiol* 123, 1525-1535
- Rögner, M., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Witt, H.T. (1987):** Size, shape and mass of oxygen-evolving photosystem II complex from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. *FEBS Lett* 219, 207-211
- Ruban, A.V., Pascal, A.A., Robert, B., Horton, P. (2002):** Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J Biol Chem* 277, 7785-7789
- Rudella, a., Friso, G., Alonso, J.M., Ecker, J.R., van Wijk, K.J. (2006):** Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1704-1721
- Sabbert, D., Engelbrecht, S., Junge, W. (1996):** Intersubunit rotation in active F-ATPase. *Nature* 381, 623-625



**Sacksteder, C.A., Kanazawa, A., Jacoby, M.E., Kramer, D.M. (2000):** The proton to electron stoichiometry of steady-state photosynthesis in living plants: A proton-pumping Q cycle is continuously engaged. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14283-14288

**Sakamoto, W., Zaltsman, A., Adam, Z., Takahashi, Y. (2003):** Coordinated regulation and complex formation of yellow variegated1 and yellow variegated2, chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell* 15, 2843-2855

**Salter, A.H., Virgin, I., Hagman, A., Andersson, B. (1992):** On the molecular mechanism of light-induced D1 protein degradation in photosystem II core particles. *Biochemistry* 31, 3990-3998

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989):** Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.*

**Sanders, C.E., Allen, J.F. (1987):** The 18.5 kDa phosphoprotein of the cyanobacterium *Synechococcus* 6301: a component of the phycobilisomes. In *Progress in Photosynthesis Research*, Ed. Biggins J Martinus Njiohoff, Dordrecht Vol II, pp. 761-764

**Sanders, C.E., Melis, A., Allen, J.F. (1989):** *In vivo* phosphorylation of proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 after chromatic acclimation to Photosystem I or Photosystem II light. *Biochim Biophys Acta* 976, 168-172

**Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467

**Sarcina, M., Tobin, M.J., Mullineaux, C.W. (2001):** Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* 7942. Effects of phycobilisome size, temperature and membrane lipid composition. *J Biol Chem* 276, 46830-46834

**Satoh, K., Fork, D. C. (1983):** A new mechanism for adaptation to changes in light intensity and quality in red alga: *Phorphyra perforata*. I. Relation to state 1- state 2- transitions. *Biochem Biophys Acta* 722, 190-196

**Sauer, J., Schreiber, U., Schmid, R., Volker, U., Forchhammer, K. (2001):** Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942. Low- level photosynthesis as a mechanism of long- term survival. *Plant Physiol* 126, 233-243

**Schägger, H., Jagow, G. (1991):** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231

- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A., Lindquist, S. (1996):** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci* 21, 289-296
- Schleiff, E., Soll, J. (2000):** Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* 211, 449-456
- Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986):** Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10, 51-62
- Schreiber, U., Bilger, W. (1987):** Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In *plants response to stress – Functional analysis in mediterranean ecosystems. NATO advanced science institute series*, ed. J.D. Tenhunen, F.M. Catarino, O.L. Lange, W.C. Oechel, 27-53. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag
- Schreiber, U., Bilger, W., Hormann, H., Neubauer, C. (1998):** Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In *Photosynthesis*, ed. A.S. Raghavendra, 320-336. Cambridge University Press (UK)
- Schubert, M., Petersson, U.A., Haas, B.J., Funk, C., Schroder, W.P., Kieselbach, T. (2002):** Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277, 8354-8365
- Senior, A.E., Nadanaciva, S., Weber, J. (2002):** The molecular mechanism of ATP synthesis by  $F_1F_0$ -ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1553 (3), 188-211
- Sherman, D.M., Sherman, L.A. (1983):** Effect of iron deficiency and iron restoration on ultrastructure of *anacystis nidulans*. *J Bacteriol* 156, 393-401
- Shipton, C.A., Barber, J. (1991):** Photoinduced degradation of the D1 polypeptide in isolated reaction centers of photosystemII: Evidence for an autoproteolytic process triggered by the oxidizing side of the photosystem. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6691-6695
- Shukla V.K., Stanbekova, G.E., Shestakov, S.V., Pakrasi, H.B. (1992):** The D1 protein of the photosystem II reaction-center complex accumulates in the absence of D2: analysis of a mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 lacking cytochrome b559. *Mol Microbiol* 6, 947-956
- Silva, P., Choi, Y.J., Hassan, H.A., Nixon, P.J. (2002):** Involvement of the HtrA family of proteases in the protection of *Synechocystis* from light stress and in the repair of photosystem II. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 1461-1467

- Singh, A.K., McIntyre, L., Sherman, L.A. (2003):** Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* 132, 1825-1839
- Skorko-Glonek, J., Lipinska, B., Krzewski, K., Zolase, G., Bertoli, E., Tanfani, F. (1997):** HtrA heat stress peptidase interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes. *J Biol Chem* 272, 8974-8982
- Skorko-Glonek, J., Zurawa, D., Kuczvara, E., Wozniak, M., Wypych Z., Lipinska, B. (1999):** The *Escherichia coli* heat stress peptidase HtrA participates in defence against oxidative stress. *Mol Gen Genet* 262, 342-350
- Snyders, S., Kohorn, B.D. (1999):** TAKs, Thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J Biol Chem* 274, 9137-9140
- Sokolenko, A., Lerbs-Mache, S., Altschmied, L., Herrmann, R.G. (1998):** Clp peptidase complexes and their diversity in chloroplasts. *Planta* 207, 286-295
- Sokolenko, A., Poijedaeva, E., Zinchenko, V., Glaser, V. M., Herrmann, R. G., Shestakov, S. V. (2002):** The gene complement for proteolysis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Current Genet* 41, 291-310
- Spangfort, M., Andersson, B. (1989):** Subpopulations of the main chlorophyll a/b light-harvesting complex of photosystem II – isolation and biochemical characterisation. *Biochim Biophys Acta* 977, 163-170
- Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M. (1999):** A temperature-dependent Switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347
- Squires, C., Scuire, C. L. (1992):** The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol* 174, 1081-1085
- Strauch, K. L., Beckwith, J. (1988):** An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 1576-1580
- Strauch, K.L., Johnson, K., Beckwith, J. (1989):** Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J Bacteriol* 171, 2689-2696

**Straus, N.A. (1994):** Iron deprivation: physiology and gene regulation. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, ed. D.A. Bryant. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 731-750

**Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J. L., Picot, D. (2003):** An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* 426 (6965):413-418.

**Strotmann, H., Shavit, N., Leu, S. (1998):** Assembly and function of the chloroplast ATP synthase. In: *Advances in Photosynthesis* (Govindjee ed.), volume 'Molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas'

**Sun, J., Ke, A., Jin, P., Chitnis, V.P., Chitnis, P.R. (1998):** Isolation and functional study of photosystem I subunit in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Methods in Enzym* 297, 124-126

**The Arabidopsis Genome Initiative (2000):** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815

**Tölle, J., Michel, K.-P., Kruij, J., Kahmann, U., Preisfeld, A., Pistorius, E. K. (2002):** Localization and function of the IdiA homologue Slr1295 in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* 148, 3293-3305

**Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., Dubnau, D. (1998):** Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J* 17, 6730-6738

**Van Dorssen, R. J., Breton, J., Plijter, J. J., Satoh, K., van Gorkom, H. J., Amesz, J. (1987):** Spectroscopic properties of the reaction center and of the 47 kDa chlorophyll protein of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 893, 267-274

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

**Vener, A. V., Rokka, A., Fulgosi, H., Andersson, B., Herrmann, R. G. (1999):** A cyclophilin-regulated PP2A-like protein phosphatase in thylakoid membranes of plant chloroplasts. *Biochemistry* 38, 14955-14965

**Waller, P. R. H., Sauer, R. T. (1996):** Characterization of degQ and degS, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. *J Bacteriol* 178, 1146-1153

**Wang, C.C., Tsou, C.L. (1998):** Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Lett* 425, 382-384

**Wedel, N., Klein, R., Ljungberg, U., Andersson, B., Herrmann, R.G. (1992):** The single-copy gene *psbS* codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. *FEBS Lett* 314, 61-66

**Williams, W.P., Allen, J.F. (1987):** State 1/state 2 changes in higher plant and algae. *Photosyn Res* 13, 19-45

**Wriedt, K., Angerer, A., Braun, V. (1995):** Transcriptional regulation from the cell surface: conformational changes in the transmembrane protein FecR lead to altered transcription of the ferric citrate transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177, 3320-3322

**Woitsch, S., Römer, S. (2003):** Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol* 132, 1508-1517

**Wollmann, F.-A. (2001):** State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J* 20, 3623-3630

**Yamamoto, H. Y., Bugos, R. C., Hieber, A. D. (1999):** In *The Photochemistry of Carotenoids*, eds. Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G., Cogdell, R.J. (Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands), 293-303

**Yang, D. H., Webster, J., Adam, Z., Lindahl, M., Andersson, B. (1998):** Induction of acclimative proteolysis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II in response to elevated light intensities. *Plant Physiol* 118, 827-834

**Zak, E. Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B., Pakrasi, H. B. (2001):** The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 13443-13448

**Zinchenko, V.V., Piven, I.V., Melnik, V.A., Shestakov, S.V. (1999):** Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Mol Genet* 35, 228-232

**Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001):** Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8 Å resolution. *Nature* 409, 739-743

**DANKSAGUNG**

Die vorliegende Dissertation wurde am Botanischen Institut (Department Biologie I) der Ludwig-Maximilians-Universität unter Leitung von Frau Priv.-Doz. Dr. Anna Sokolenko am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. R. G. Herrmann durchgeführt. Ihm gilt mein besonderer Dank für das Bereitstellen von Arbeitsplatz und die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Anna Sokolenko möchte ich für die Betreuung und Korrektur meiner Arbeit, Einführung in die Thematik, wissenschaftliche Unterstützung und dem großen „Pool“ an „background“-Wissen danken.

Spezieller Dank gilt Katrin für die stete Zuführung von Klatsch und Tratsch, die Versüßung des Arbeitsalltags und für diverse „Zum Pizza essen nach Italien“-Ausflüge.

Ich möchte mich außerdem bei Manfred für seine wertvollen Tipps zu DNS und RNS Analysen und seine Hilfe und Geduld beim Zusammenschreiben bedanken.

Außerdem möchte ich den „Mädels“ aus meinem Labor Gabi, Lena, Irina und besonders Giusy für die stets gute Arbeitsatmosphäre danken.

Vielen Dank an Jörg Dandler aus der Arbeitsgruppe von Prof. Scheer für geduldige Hilfestellung bei diversen Messungen: Absorptionsspektren, 77K, HPLC.

Abschließend möchte ich meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich während der Promotion in praktischer, theoretischer und moralischer Hinsicht unterstützt und sehr viel Verständnis gezeigt haben.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Einen früheren Promotionsversuch habe ich nicht unternommen.

München, den 02.10.2006

Irina Sterr

**LEBENS LAUF**

**Name:** Irina Nadja Sterr, geb. Gerold  
**Geburtsdatum:** 05.01.1979  
**Geburtsort:** München  
**Familienstand:** verheiratet  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Schulbildung:**

Sept. 1985 – Juli 1989 Besuch der Grundschule München Nord  
Sept. 1989 – Juli 1994 Besuch des Gymnasiums München-Moosach  
Sept. 1994 – Juni 1998 Besuch des Rupprecht Gymnasiums München  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**Hochschulausbildung:**

Okt. 1998 – März 2003 Studium der Biologie an der Technischen Universität München (TU) mit den Schwerpunkten Technische Biologie (Hauptfach) sowie Botanik, Ökotoxikologie und technischer Umweltschutz

Okt. 2002 – März 2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie in Weihenstephan bei Prof. Dr. R. Vogel.  
Thema: „*Optimierung der Bedingungen zur Genomgrößenbestimmung von Laktobazillen mit der PFGE-Technik*“

27. März 2003 Verleihung des akademischen Grades als Diplom-Biologin Univ.

ab 01. Mai 2003 Doktorand am Lehrstuhl für Botanik I der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München bei Prof. Dr. R. G. Herrmann. Betreuung der Arbeit durch PD Dr. A. Sokolenko