

Der Einfluss von *Tetratricopeptide Repeat* Proteinen auf die Chlorophyllbiosynthese und Chloroplastenbiogenese

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der
Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

M. Sc. Josephine Herbst

Präsidentin der Humboldt Universität zu Berlin
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Iris Finkemeier
2. Prof. Ph. D. Thomas Buckhout
3. Prof. Dr. Bernhard Grimm

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2019

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1. Chlorophyll - Das grüne Blut der Erde	7
1.1.1. Bedeutung der Tetrapyrrole	7
1.1.2. Funktion und Bedeutung von Chlorophyllen	8
1.2. Die Tetrapyrrolbiosynthese in höheren Pflanzen	9
1.2.1. Die Synthese von ALA	9
1.2.2. Die Porphyrinsynthese	10
1.2.3. Der Hämzweig	11
1.2.4. Der Chlorophyllzweig	12
1.2.5. Der Chlorophyllzyklus	14
1.2.6. Räumliche Organisation der TBS-Enzyme	15
1.3. Expression und Struktur der Glutamyl-tRNA-Reduktase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
1.4. Expression und Struktur der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
1.5. Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese	19
1.5.1. Regulation der ALA-Synthese	19
1.5.1.1. Transkriptionelle Regulation	19
1.5.1.2. Posttranslationale Kontrolle	20
1.5.1.2.1. Komplexbildung mit GSAT	21
1.5.1.2.2. Feedback-Inhibierung durch Häm	21
1.5.1.2.3. Feedback-Inhibierung durch FLU	22
1.5.1.2.4. Stabilisierung durch GBP	23
1.5.1.2.5. Anpassung des GluTR-Gehalts durch molekulare Chaperonen	23
1.5.1.2.6. Spatiotemporale Organisation der GluTR-Interaktionen	24
1.5.2. Regulation von POR	26
1.5.2.1. Transkriptionelle Regulation	26
1.5.2.2. Posttranslationale Kontrolle	26
1.5.2.2.1. Posttranslationale Modifikationen von POR	26
1.5.2.2.2. Stabilisierung von POR durch LIL3	27
1.5.2.2.3. Stabilisierung von POR durch CPP1	27
1.5.2.2.4. Stabilisierung von POR durch Pitt	28
1.6. <i>Tetratricopeptide Repeat</i> Proteine	29
1.6.1. Tandem-Repeat-Proteine - Eine Übersicht	29
1.6.2. TPR-Proteine - Aufbau und Struktur	29
1.6.3. TPR-Proteine - Liganden und Interaktionspartner	30
1.6.4. TPR-Proteine in Photosynthese-betreibenden Organismen	31
1.6.4.1. An der Assemblierung der Photosysteme beteiligte TPR-Proteine	32
1.6.4.2. An der Chlorophyllbiosynthese beteiligt TPR-Proteine	33
1.7. Etiolierung und Deetiolierung	34
1.7.1. Aufbau und Funktion des Prolamellarkörpers	34
1.7.2. Die Ausbildung der thylakoidalen Membranen	35
1.7.3. Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten	36
1.8. Oxidativer Stress in Chloroplasten	38
1.9. Ziel der Arbeit	40

2. Ergebnisse	41
2.1. Auswahl der TPR Proteine	41
2.1.1. Auswahl der Kandidaten für die weiterführenden Arbeiten	41
2.1.2. Interaktionsanalysen der ausgewählten Kandidaten	43
2.1.2.1. Split-Ubiquitin-Interaktionsanalysen ausgewählter TPR-Proteine	43
2.1.2.2. BiFC-Interaktionsanalysen ausgewählter TPR-Proteine	45
2.1.3. Phylogenetische Analyse und Auswahl der TPR-Proteine	48
2.2. Untersuchung von TPR1 als mögliches Pitt-Homolog	50
2.2.1. Phylogenetische Analyse der Pitt-Proteinsequenz	50
2.2.2. Produktion eines spezifischen TPR1-Antikörpers	53
2.2.3. Charakterisierung von TPR1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
2.2.4. TPR1 ist ein chloroplastidäres, membranständiges Protein	56
2.2.5. Selektion von <i>tpr1</i> Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
2.2.6. Auswirkungen des TPR1-Verlustes auf die photosynthetische Leistung	59
2.2.7. Auswirkungen des TPR1-Verlustes auf die Tetrapyrrolbiosynthese	60
2.2.8. TPR1 beeinflusst die Lokalisation von GluTR1	62
2.2.9. Analysen der Dunkelinaktivierung der Tetrapyrrolbiosynthese in <i>tpr1</i> -Linien	63
2.2.10. Der Einfluss von TPR1 auf die Lokalisation der Tetrapyrrolbiosynthese-Enzyme	65
2.2.11. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten	66
2.2.12. Analyse des Lipidstoffwechsels und der Vesikelausbildung in <i>tpr1</i> Mutanten	67
2.2.13. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies in adulten Pflanzen	69
2.2.14. Analyse der <i>tpr1</i> -Linien unter erhöhten Lichtintensitäten	70
2.2.15. Einfluss von TPR1 auf die Etiolierung und Ergrünung von Keimlingen	71
2.2.16. Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies während der Deetiolierung	74
2.2.17. Untersuchung von TPR1-haltigen Proteinkomplexen in den Thylakoidmembranen	80
2.2.18. Einfluss von TPR1 auf die Ausbildung von Komplexen in den Thylakoidmembranen	82
2.2.19. TPR1 in verschiedenen Mutanten des Tetrapyrrolbiosynthese-Weges	83
2.2.20. Analyse des TBS-Weges über den Verlauf eines Standardkurztages in den <i>tpr1</i> -Linien	84
2.2.21. Analyse des Einflusses der Tageslänge auf die <i>tpr1</i> -Linien	86
2.2.22. Die Auswirkungen von erhöhten ALA-Konzentrationen auf die Entwicklung und Pigmentierung von <i>tpr1</i> -Keimlingen	89
2.2.23. Die Auswirkungen von erhöhten ALA-Konzentrationen auf die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in den <i>tpr1</i> -Keimlingen	92
2.2.24. Der Einfluss von dunkelrotem Licht auf die <i>tpr1</i> -Linien	95
2.2.25. Virus-induziertes Gen-Silencing von <i>TPR1</i>	98
2.2.26. Initiale Charakterisierung von <i>TPR1</i> -Komplementationslinien	101
2.2.27. Analyse von <i>TPR1</i> -Deletionskonstrukten	105
2.3. Weitere TPR-Proteine mit Einfluss auf die TBS	106
2.3.1. <i>SLOW GREEN 1</i> im Zusammenhang mit der Tetrapyrrole-Biosynthese	106
2.3.1.1. Rekombinante Expression von SG1	106
2.3.1.2. Analyse der <i>SG1</i> -Expression in <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp-Pflanzen	108
2.3.1.3. Selektion und Charakterisierung einer <i>sg1</i> -Mutante in <i>Arabidopsis thaliana</i>	109
2.3.2. TPR7 im Zusammenhang mit der Tetrapyrrolbiosynthese	113
2.3.3. TPR9 als Faktor der plastidären Antwort auf kontinuierliches Starklicht	118
2.3.3.1. Produktion eines spezifischen TPR9- Antikörpers	118
2.3.3.2. Charakterisierung von TPR9 in <i>Arabidopsis thaliana</i>	119
2.3.3.3. Selektion und Charakterisierung einer <i>tpr9</i> -Linie in <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
2.3.3.4. Analyse der <i>tpr9</i> -Mutante unter erhöhten Lichtbedingungen	124
2.3.3.5. Analyse der <i>tpr9</i> -Linie in kontinuierlichem Starklicht	126

2.3.3.6.	Untersuchung der photosynthetischen Leistung in Abhängigkeit zur Lichtintensität	128
2.3.3.7.	Akkumulation von Anthocyanen in Abhängigkeit der Lichtintensität	130
2.3.3.8.	Analyse der transkriptionellen Auswirkungen im Starklicht	131
2.3.3.9.	Untersuchung des retrograden Signalweges unter Norflurazon-Behandlung	133
2.3.3.10.	Untersuchung des retrograden Signalweges unter Starklicht-Bedingungen	134
2.3.3.11.	<i>State transition</i> und Phosphorylierung der photosynthetischen Untereinheiten unter verschiedenen Lichtbedingungen	135
2.3.3.12.	Initiale Charakterisierung von <i>TPR9-HA</i> -Komplementationslinien	137
3.	Diskussion	141
3.1.	Identifikation des potenziellen Pitt-Homologs in <i>A. thaliana</i>	141
3.2.	TPR1 - ein Regulator der Chlorophyllbiosynthese	142
3.2.1.	Alignment zwischen verschiedenen Pitt-Homologen	142
3.2.2.	Die Genexpression von <i>TPR1</i> korreliert nicht mit der Genexpression von Enzymen der TBS	143
3.2.3.	TPR1 ist ein integraler Bestandteil der Thylakoidmembranen	144
3.2.4.	TPR1 - eine Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes?	146
3.2.4.1.	TPR1 interagiert mit den Enzymen des FLU-Inaktivierungskomplexes	146
3.2.4.2.	TPR1 beeinflusst die Lokalisation und Stabilität von GluTR1	147
3.2.4.3.	Der Einfluss von TPR1 auf die Lokalisation und Aktivität von CHL27 und PORB	148
3.2.4.4.	Die Funktionalität von FLU ist durch TPR1 in Dunkelheit nicht beeinträchtigt	149
3.2.4.5.	TPR1 und FLU haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von GluTR1	150
3.2.4.6.	Die Rolle von TPR1 in TBS-Mutanten	150
3.2.4.7.	TPR1 im Zusammenhang mit der schnellen Inaktivierung der TBS	151
3.2.4.8.	Die Funktion von TPR1 im Verlauf des Tages	152
3.2.5.	Die Funktion von TPR1 in etioliertem und deetioliertem Gewebe	154
3.2.5.1.	TPR1 beeinflusst die Ausbildung des oligomeren POR-NADPH-PChlid-Komplexes während der Etiolierung	154
3.2.5.2.	Die fehlende Ausbildung des oligomeren POR-NADPH-PChlid-Komplexes führt zur Produktion von ROS während der Deetiolierung	155
3.2.5.3.	Der Verlust von FLU oder TPR1 verursacht die Bildung von unterschiedlichen ROS während der Deetiolierung	156
3.2.5.4.	Die Produktion von ROS ist in der <i>tpr1</i> -Mutante abhängig von der Lichtintensität	156
3.2.6.	TPR1 im Zusammenhang mit der Anreicherung von ROS in adultem Gewebe	157
3.2.7.	Der Einfluss von TPR1 auf die plastidären Membranen	158
3.2.7.1.	Der Verlust von TPR1 führt zur Ausbildung von stromalen Vesikelclustern	158
3.2.7.2.	TPR1 hat einen Einfluss auf den Lipidumsatz im Plastiden	159
3.2.7.3.	Der Zusammenhang zwischen Lipid-Umsatz und ROS	160
3.2.8.	Das Fehlen von TPR1 erhöht die Sensitivität gegenüber ALA	161
3.2.9.	Die Auswirkungen von dunkelrotem Licht auf die <i>tpr1</i> -Linien	162
3.2.10.	TPR1 -Zusammenfassung und Ausblick	163
3.3.	SG1 - ein Faktor der plastidären Nukleoide	164
3.3.1.	Die Rolle von SG1 für die Verbindung zwischen der TBS und den plastidären Nukleoiden	164
3.3.2.	SG1 und TPR1 - partiell redundant?	165

3.3.3.	SG1 - Zusammenfassung und Ausblick	166
3.4.	TPR7 ist nicht das Pitt-Homolog höherer Pflanzen	167
3.5.	TPR9 - eine Komponente der Starklicht-Akklimatisierung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	167
3.5.1.	Der Verlust von TPR9 beeinflusst die Assemblierung des PSII unter Standard-Kurztagbedingungen	167
3.5.2.	TPR9 ist in die Akklimatisierung unter kontinuierlichen Starklichtbedingungen involviert	168
3.5.3.	TPR9 ist keine <i>gun</i> -Mutante	170
3.5.4.	TPR9 und Anthocyane	170
3.5.5.	TPR9 ist involviert in die Phosphorylierung der PSII-Kernuntereinheiten	172
3.5.6.	TPR9 ein Faktor des plastidären Redoxstatus?	173
3.5.7.	TPR9 - Ein Model	174
3.5.8.	TPR9 - Zusammenfassung und Ausblick	175
4.	Material und Methoden	177
4.1.	Anzucht von Organismen	177
4.1.1.	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> Kulturen	178
4.1.2.	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Kulturen	178
4.1.3.	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kulturen	178
4.1.4.	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	178
4.1.4.1.	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	178
4.1.4.2.	Sterilanzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	178
4.1.5.	Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i>	178
4.2.	Transformationstechniken	179
4.2.1.	Chemische Transformation von <i>Escherichia coli</i>	179
4.2.2.	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	179
4.2.3.	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	179
4.2.4.	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	180
4.2.5.	Transiente Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	180
4.2.6.	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i>	181
4.3.	Molekularbiologische Methoden	181
4.3.1.	DNA	181
4.3.1.1.	Extraktion von DNA aus Blattgewebe	181
4.3.1.2.	Extraktion von DNA aus Zellkulturen	181
4.3.1.3.	Analyse von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion	181
4.3.1.4.	DNA Gelelektrophorese	182
4.3.2.	RNA	183
4.3.2.1.	Extraktion von RNA	183
4.3.2.2.	RNA-Gelelektrophorese	183
4.3.2.3.	DNase-Verdau und reverse Transkription	183
4.3.2.4.	Analyse von Genexpression mittels qPCR	184
4.3.3.	Klonierung	185
4.3.3.1.	Erzeugte und verwendete Vektoren	185
4.3.3.2.	Restriktionsenzym-vermittelte Klonierung	186
4.3.3.2.1.	Erstellung des Ausgangsfragmentes	186
4.3.3.2.2.	Ligation in pJET2.1	186
4.3.3.2.3.	Sequenzierung	187
4.3.3.2.4.	Restriktionsverdau	187
4.3.3.2.5.	Ligation in den Zielvektor	187

4.3.3.3.	GATEWAY®vermittelte Klonierung	188
4.3.3.3.1.	Erstellung des Zielfragmentes mittels <i>two step</i> PCR	188
4.3.3.3.2.	Erzeugung des GATEWAY®Eingangsvektors	189
4.3.3.3.3.	Erzeugung des GATEWAY®Zielvektors	189
4.4.	Proteinbiochemische Methoden	190
4.4.1.	Expression von rekombinanten Proteinen	190
4.4.2.	Aufreinigung der rekombinant erzeugten Proteine unter nativen Bedingungen	190
4.4.3.	Herstellung von Antikörpern	191
4.4.4.	Aufreinigung der hergestellten Antiseren	191
4.4.5.	Analyse von Proteinextrakten	192
4.4.5.1.	Gewinnung von Proteingestamtexttrakten	192
4.4.5.2.	Gewinnung von fraktionierten Proteinextrakten	192
4.4.5.3.	Analyse der Proteinextrakte mittels Polyacrylamidgelen	192
4.4.5.4.	Western Blot und Immundetektion	193
4.4.5.5.	Färbung mit Coomassie	195
4.5.	Enzymaktivitäten	195
4.5.1.	ALA-Synthesekapazität	195
4.5.2.	ALAD-Aktivitätsmessung	196
4.5.3.	POR-Aktivitätsmessung	196
4.6.	Analyse von plastidären Proteinkomplexen	196
4.6.1.	Isolation von Thylakoidmembranen	196
4.6.2.	Blau-Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese	197
4.6.3.	Subfraktionierung von Thylakoidmembranen	198
4.6.4.	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	198
4.6.5.	Chloroplastenisolation	199
4.6.6.	Solubilisierung von intakten Chloroplasten	199
4.6.7.	Fraktionierung von Chloroplasten	199
4.7.	Methoden zur Analyse funktioneller Chloroplasten	200
4.7.1.	Tieftemperatur-Chlorophyllfluoreszenz	200
4.7.2.	Transmissionselektronenmikroskopie	200
4.7.3.	Pulsamplitudenmodulation (PAM)	200
4.8.	Extraktionen von Metaboliten	201
4.8.1.	Analyse von Anthocyanen	201
4.8.2.	ALA Konzentrationen	201
4.8.3.	Extraktion von Pigmenten und TBS-Intermediaten	201
4.8.4.	Photometrische Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoiden	202
4.8.5.	Analyse von Pigmenten mittels HPLC	202
4.8.6.	Analyse von MgP und MgProtoME mittels HPLC	202
4.8.7.	Analyse von PChlid und Chlid mittels HPLC	203
4.8.8.	Analyse von PChlid mittels Fluoreszenzmikroskopie	203
4.8.9.	Extraktion von Häm	203
4.8.10.	Analyse von Häm mittels HPLC	204
4.9.	Färbungen	204
4.9.1.	Nitroblautetrazoliumchlorid-Färbung	204
4.9.2.	3,3'-Diaminobenzidin-Färbung	204
4.9.3.	<i>Singlet Oxygen Sensor Green</i> -Färbung	205
4.10.	Interaktionsstudien	205
4.10.1.	Split Ubiquitin System	205
4.10.1.1.	<i>Mating</i> der <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kulturen	205
4.10.1.2.	Selektion von Interaktionen	206

Inhaltsverzeichnis

4.10.2. Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementation	206
4.11. <i>in silico</i> Untersuchungen	207
Literaturverzeichnis	207
Anhang	235
I. Zusätzliche Daten	235
II. Primer	240
Publikationsliste	243
Danksagung	245
Sebstständigkeitserklärung	247

Zusammenfassung

Chlorophyll spielt eine unabdingbare Rolle für die lichtabhängige Reaktion der Photosynthese. Die adäquate Versorgung der photosynthetischen Komplexe mit Chlorophyll wird dabei durch die Tetrapyrrolbiosynthese (TBS) gewährleistet. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, welche an der Anpassung der TBS an wechselnde (a)biotische Wachstumsbedingungen der Pflanze beteiligt sind. Allerdings konnte bislang nicht zweifelsfrei geklärt werden, wie die TBS mit der Integration von Chlorophyllen in die Photosysteme koordiniert wird. Vor einigen Jahren wurde ein Interaktionspartner der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) in *Synechocystis* identifiziert, welcher als potenzieller Faktor dieser Koordination in Frage kommt. Das POR-INTERACTING TPR-Protein (Pitt) stabilisiert POR an der Thylakoidmembran und interagiert auch mit dem Vorstufenprotein des D1. Somit könnte Pitt den effizienten Einbau von Chlorophyllen in die naszierenden plastidenkodierte photosynthetischen Untereinheiten vermitteln. Pitt gehört zur Familie der *tetratricopeptide repeat* (TPR) Proteine, deren Vertreter vorrangig für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zuständig sind. Aus diesem Grund war, neben der Identifikation des potenziellen Pitt-Homologs im Modelorganismus *Arabidopsis thaliana*, die Analyse von anderen Vertretern dieser Proteinklasse ein vielversprechender Ansatz bei der Identifikation von weiteren Regulatoren der TBS oder Photosynthese.

Von den fünf ausgewählten TPR-Proteinen aus *Arabidopsis thaliana* mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu Pitt waren vier in der Lage, physisch mit POR zu interagieren. Von diesen vier Kandidaten ist das durch das Gen *At1g78915* kodierte, membranintegrale TPR-Protein (TPR1) der beste Kandidat des putativen Pitt-Homologs in Arabidopsis. Vergleichbar zu Pitt interagiert TPR1 mit POR und stabilisiert das Enzym an den plastidären Membranen. Die Stabilisierung von POR durch TPR1 spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle während der Etiolierung und ermöglicht schnelle Ergrünung von Keimlingen. Neben dem Einfluss auf POR konnte im Zuge dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass TPR1 mit den Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes interagiert und dadurch im Zusammenhang mit der schnellen Inaktivierung der 5-Aminolävulinäuresynthese steht, dem ersten Teil der TBS. Darüber hinaus ist TPR1 an die Vermeidung von reaktive Sauerstoffspezies beteiligt.

Ein weiteres vielversprechendes TPR-Protein, welches an der Regulation der TBS beteiligt sein könnte, ist SLOW-GREEN 1 (SG1). Für SG1 wurde bereits eine Funktion in der Regulation der Chloroplastenbiogenese beschrieben. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SG1 dabei eine Verbindung zwischen der TBS und plastidären Transkriptionsmaschinerie vermitteln könnte. Darüber hinaus haben TPR1 und SG1 eine vergleichbare Auswirkung auf die Inaktivierung der TBS und üben somit womöglich partiell redundante Funktionen aus. Die zwei weiteren untersuchten TPR-Proteine (TPR7 und TPR9) konnten als Pitt-Homologe ausgeschlossen werden. Allerdings zeigte sich, dass TPR9 bei der Anpassung der Photosysteme an hohe Lichtintensitäten involviert ist, da das Fehlen von TPR9 in kontinuierlichem Starklicht zur Schädigung der PSII-Untereinheiten führte. TPR9 ist an der Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten und der Veränderung des Redoxstatus beteiligt, zwei essentiellen Mechanismen für die Reparatur und Regeneration des Reaktionszentrums von PSII.

Abstract

Chlorophyll plays an indispensable role in the light reaction of the photosynthesis. The adequate supply of chlorophyll for the photosynthetic subunits is ensured by tetrapyrrole biosynthesis (TBS). Within the last decades, multiple proteins were identified, which are involved in adjusting the TBS-pathway to changing (a)biotic plant growth conditions. Nevertheless, it is not fully understood how the TBS-pathway is coordinated parallel to the assembly of the photosystems and the integration of chlorophylls into the pigment-binding subunits of the photosystems. Several years ago, an interaction partner of the protochlorophyllide-oxidoreductase (POR) was identified in *Synechocystis* which was proposed to be involved in the coordination of these mechanisms. The POR-INTERACTING TPR-Protein (Pitt) binds and stabilizes POR at the thylakoid membranes. Additionally, Pitt interacts with the precursor of D1. Therefore, Pitt could facilitate the efficient incorporation of chlorophylls into the plastid-encoded nascent photosynthetic subunits. Pitt belongs to the tetratricopeptide repeat (TPR) protein family, whose members mediate protein-protein-interactions and stabilize larger protein complexes. Besides the identification of the potential Pitt-homolog in the model organism *Arabidopsis thaliana*, analysis of additional members of the TPR-protein superfamily was a promising approach for the identification of further posttranslational regulators of TBS and photosynthesis.

Five *Arabidopsis thaliana* TPR-proteins with a high sequence similarity to Pitt were selected. Four of those proteins are able to interact physically with POR. Among them, the TPR-protein encoded by the gene *At1g78915* (TPR1) was the best candidate to represent a putative Pitt-homolog in *Arabidopsis*. Similar to Pitt, TPR1 is a plastid-localized integral membrane protein, which interacts with POR at the thylakoid membranes and stabilizes the enzyme. The stabilizing effect of TPR1 on POR is especially needed during (de)etioliation and enables a rapid greening process. Besides the influence on POR, it was shown in this thesis that TPR1 interacts with components of the FLU-inactivation-complex and is required for a rapid inactivation of the 5'-aminolevulinic acid synthesis, the first part of the TBS pathway. Moreover, TPR1 is needed for the prevention of reactive oxygen species in seedlings and adult plants.

Another promising TPR-protein in *Arabidopsis thaliana* which might be involved in the regulation of the TBS is SLOW GREEN1 (SG1). SG1 was previously identified as an essential factor for chloroplast biogenesis. In this thesis it was shown that SG1 is involved in the connection of TBS with the plastid transcription machinery. Besides, SG1 and TPR1 have a similar impact on the inactivation of the TBS and it is proposed that they fulfil partially redundant functions. The two additionally investigated TPR-Proteins (TPR7 and TPR9) were excluded as Pitt-homologs. Nevertheless, TPR9 was shown to be involved in the response of *Arabidopsis* to high light stress. The lack of TPR9 leads to the damage of PSII subunits and chlorophyll depletion under continuous high light conditions. TPR9 was shown to be involved in modulating the plastid redox state and the phosphorylation of PSII core proteins. These are two processes, which are essential for the repair cycle of the PSII reaction centre.

Abkürzungsverzeichnis

AAA+	ATPases Associated with diverse cellular Activities
ALB3	ALBINO3
ALA	5'-Aminolävulinsäure
ALAD	5'-Aminolävulinsäure-Dehydratase
ATP	Adenosintriphosphat
APR	aggregation prone regions
BN	Blau-Nativ
CAO	Chlorophyll a-Oxygenase
CBR	Chlorophyll b-Reduktase
CCA1	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
CDF	CELL GROWTH DEFECT FACTOR-1
CHL27	Magesium-Protoporphyrin IX-Monomethylester-Cyclase
CHLG	Chlorophyll a-Synthase
Chlid	Chlorophyllid
CHLM	Magesium-Protoporphyrin IX-Methyltransferase
CHLP	Geranylgeranyl Reduktase
CLD1	Chlorophyll-Dephytylase
Clp	caseinolytische Protease
COP1	constitutive photomorphogenic1
CoProIII	Coproporphyrinogen III
CPO	Coproporphyrinogen III-Oxidase
CPP1	CHAPERONE OF POR-PROTEIN 1
cpSRP43	CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 43
CURT	CURVATURE THYLAKOID
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DPOR	dark operative POR
DVR	Divinyl-Reduktase
EIN3	ETHYLEN-INSENSITIVE 3
EIL1	EIN3-LIKE 1
EMS	Ethylmethansulfonat
FAR1	FAR-RED IMPAIRED RESPONSE1
FBD	FLU-Bindedomäne
FC	Ferrochelatase
FHY3	FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3
FLU	FLUORESCENT IN BLUE LIGHT
FLP	FLU-LIKE PROTEIN
FNR1	Ferredoxin-NADPH-Reduktase1
GBP	GluTR-Bindeprotein
GLK	GOLDEN2-LIKE
GluTR	Glutamyl-tRNA-Reduktase
GluRS	Glutamyl-tRNA-Synthase
GUN	GENOMES UNCOUPLED
GSA	Glutamyl-Semialdehyd
GSAT	Glutamyl-Semialdehyd-Aminotransferase
HA	Hämagglutinin-Streptavidin
HBD	Häm-Bindedomäne
HCAR	Hydroxymethyl-Chlorophyll a-Reduktase
HMB	Hydroxymethylbilan

Abkürzungsverzeichnis

HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HO	Hämoxygenase
HY5	HYPOCOTYL 5
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LHC	light-harvesting complex
LHCP	light-harvesting complex Proteine
LIL3	LIGHT-HARVESTING-LIKE 3
LPA1	LOW PSII AKKUMULATION1
MET1	MESOPHYLL-ENRICHED THYLAKOID PROTEIN 1
MgCh	Magnesium-Chelatase
MDGD	Monogalactosyldiacylglycerin
MgProtoME	Magesium-Protoporphyrin IX-Monomethylester
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NOL	NON-YELLOW COLORING1-like
NPQ	Nicht-Photochemisches-Quenching
NTRC	NADPH-abhängige Thioredoxin Reduktase C
NYC1	NON-YELLOW COLORING1
PBG	Porphobilinogen
PChlid	Protochlorophyllid
pD1	precursor of D1
PDM	PratA-definierten Membran
PIF	PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR
Pitt	POR-INTERACTING TPR-Protein
PLB	Prolamellarkörper
POR	NADPH: Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
PPH	putatives Pitt-Homolog
PPO	Protoporphyrinogen IX-Oxidase
PratA	PROCESSING ASSOCIATED TPR PROTEIN A
PRIN2	PLASTID REDOX INSENSITIVE 2
ProtoIX	Protoporphyrin IX
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PTM	posttranslationale Modifikationen
RVE1	REVEILLE1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDR	short-chain dehydrogenases/reductases
SDS	sodium dodecyl sulfate
SG1	SLOW GREEN 1
STN	Serine/Threonine Protein Kinase
TBS	Tetrapyrrolbiosynthese
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i>
UroIII	Uroporphyrinogen III
UROS	Uroporphyrinogen III-Synthase
UROD	Uroporphyrinogen III-Decarboxylase
YCF	HYPOTHETICAL CHLOROPLAST OPEN READING FRAME
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
VIGS	<i>Virus induced gene silencing</i>
VIPP1	VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS1

1. Einleitung

1.1. Chlorophyll - Das grüne Blut der Erde

Das in unserem Blut befindliche Häm fließt durch unsere Adern und versorgt alle Zellen mit lebenswichtigem Sauerstoff. Vergleichsweise dazu versorgt Chlorophyll alles Leben auf Erden mit molekularem Sauerstoff. Nur durch die einzigartige Fähigkeit von Chlorophyll, Licht zu absorbieren und so dessen Energie für die Photosynthese nutzbar zu machen, ist dies möglich.

1.1.1. Bedeutung der Tetrapyrrole

Häm und Chlorophyll gehören zur Stoffklasse der Tetrapyrrole, einer aus vier Pyrrolen aufgebauten organischen Verbindung. Die vier enthaltenen Heteroaromaten sind dabei entweder in linearer oder zyklischer Form angeordnet. Weitere Vertreter der Tetrapyrrole sind Phytychromobilin, Sirohäm und nicht-fluoreszierende Chlorophyll Katabolite. Als eines der linearen Tetrapyrrole bildet Phytychromobilin die prosthetische Gruppe der Phytyochrome, Photorezeptoren für die Absorption von rotem und dunkelrotem Licht, und reguliert somit die lichtabhängige pflanzliche Entwicklung [1, 2]. Sirohäm bildet die prosthetische Gruppe der Nitrit- und Sulfitreduktasen höherer Pflanzen und ist somit ein essentieller Faktor für die Assimilation von Stickstoff und Schwefel [3]. Die Abbauprodukte von Chlorophyll werden als nicht-fluoreszierende Chlorophyll Katabolite bezeichnet und akkumulieren vor allem während der Seneszenz [4]. Häm, einer der wohl bekanntesten Co-Faktoren ist, gebunden an Hämoglobin, unabdingbar für die Bindung und den Transport von Sauerstoff in vielen höheren heterotrophen Organismen [5]. Darüber hinaus ist Häm eine wichtige prosthetische Gruppe verschiedener Enzyme, wie Oxidasen und Peroxidase. In photoautotrophen Organismen ist Häm gebunden an Cytochrom b_6f und $b559$ ein wichtiger Bestandteil der photosynthetischen Elektronentransportkette [6, 7]. Chlorophylle liegen in photoautotrophen Organismen eingebettet in großen Protein-Pigment-Komplexen vor, den Photosystemen. In diesen absorbieren sie das Sonnenlicht und wandeln dieses in chemische Energie um. Vergleicht man den molekularen Aufbau von Häm und Chlorophyll, so werden die großen strukturellen Ähnlichkeiten deutlich: Beide bestehen aus einem Makrozyklus, in dessen Zentrum ein Metall-Ion chelatiert ist (Abb. 1.1).

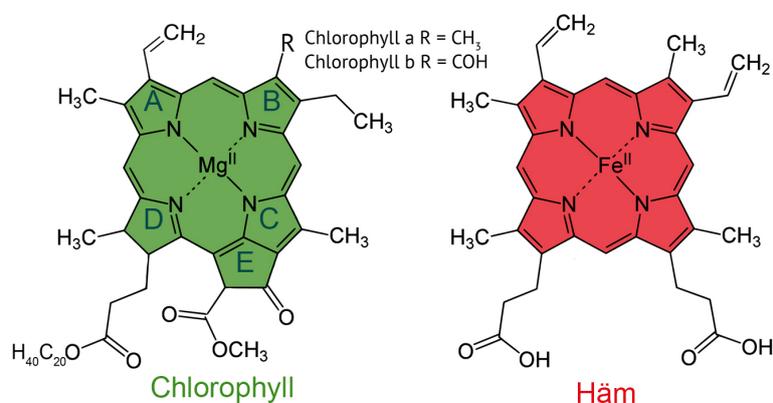


Abbildung 1.1. – Struktur von Chlorophyll und Häm. Die beiden primären Photopigmente höherer Pflanzen, Chlorophyll a und b, unterscheiden sich lediglich hinsichtlich einer Seitenkette (R). Chlorophyll a besitzt an dieser Position eine Methylgruppe, Chlorophyll b eine Aldehydgruppe. Repräsentativ für Häm wurde die Struktur von Häm b (Protohäm) angegeben.

Im Fall von Chlorophyll bildet Magnesium (Mg^{2+}) das zentrale Metall-Ion, während Häm zweiwertiges Eisen bindet. Neben der Anzahl und Struktur der Seitengruppen unterscheidet sich Chlorophyll außerdem durch den fünften isozyklischen Ring von Häm (Abb. 1.1). Diese strukturellen Abweichungen führen zu einem individuellen Absorptionsspektrum beider Moleküle. Chlorophyll absorbiert vor allem im blauen und roten Spektralbereich des sichtbaren Lichts. Licht des grünen Spektralbereichs wird hingegen reflektiert und verursacht somit die charakteristische grüne Färbung von Chlorophyll. Häm hingegen absorbiert hauptsächlich Licht des blauen Spektralbereichs und reflektiert vor allem rotes Licht, wodurch die rote Färbung unseres Blutes erzeugt wird.

1.1.2. Funktion und Bedeutung von Chlorophyllen

Die primären Photopigmente in höheren Pflanzen sind Chlorophyll a und Chlorophyll b, welche sich durch eine Seitenkette des B-Rings unterscheiden (Abb. 1.1). Aufgrund der konjugierten Doppelbindungen liegen im zentralen Pyrrolring der Chlorophylle frei bewegliche Elektronen vor, welche durch die Absorption von Lichtquanten einer bestimmten Wellenlänge in einen höheren energetischen Zustand überführt werden. Diese Energie kann in kinetische Energie umgewandelt, durch Resonanz-Energietransfer auf ein Nachbarmolekül übertragen oder durch Photooxidation auf ein Akzeptormolekül transferiert werden. Durch die Oxidation eines Akzeptormoleküls kann die absorbierte Energie der Elektronentransportkette der oxygenen Lichtreaktion zugeführt werden. Zu Beginn dieser erfolgt die Ladungstrennung an den beiden zentralen Chlorophyll a Molekülen (Special Pair) des Photosystems II (PSII) und die Weiterleitung der Elektronen an Plastoquinone. Durch die Photolyse von Wasser am PSII-gebundenen Wasserspaltungskomplex werden, neben molekularem Sauerstoff und Protonen, Elektronen erzeugt, welche die entstandene Elektronenlücke des Special Pairs auffüllen. Die Plastoquinone leiten ihrerseits die Elektronen über den Cytochrom b_6/f Komplex an Plastocyanin weiter. Eine zweite Ladungstrennung erfolgt am Special Pair des Photosystems I (PSI). Die dabei freiwerdenden Elektronen werden an Ferredoxin weitergeleitet und schlussendlich durch die Ferredoxin-NADPH-Reduktase (FNR) auf den intermediären Elektronenakzeptor $NADP^+$ übertragen. Die entstandene Elektronenlücke am Special Pair des PSI wird durch die Weitergabe der Elektronen von Plastocyanin ausgeglichen. Neben der Produktion von molekularem Sauerstoff und NADPH bewirkt die Elektronentransportkette den Aufbau eines Protonengradienten, welcher zur Synthese von ATP durch die ATP-Synthase genutzt wird. Die chemische Energie in Form von ATP und NADPH wird in der anschließenden Dunkelreaktion verwendet, um Kohlendioxid zu fixieren und Kohlenhydrate zu erzeugen. Jeweils ein Reaktionszentrum sowie mehrere assoziierte Antennenkomplexe (*light-harvesting complex*; LHC) bilden die Photosysteme, in welchen eine Vielzahl von Pigmenten gebunden sind. In den Photosystemen liegt Chlorophyll a sowohl in den Kernkomplexen als auch in den LHCs vor und ist unmittelbar an der Lichtreaktion beteiligt. Im Vergleich dazu ist Chlorophyll b ausschließlich in den LHCs zu finden und agiert dort als akzessorisches Pigment um das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a zu erweitern. Neben den Chlorophyllen enthalten die Photosysteme auch Carotinoide, welche ebenfalls eine akzessorische Funktion erfüllen. Insgesamt binden beide Photosysteme des Modelorganismus *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) zusammen 559 Chlorophylle und 132 Carotinoide [8]. Die Sicherung des immensen Bedarfs an Chlorophyll erfolgt über die Tetrapyrrolbiosynthese (TBS), dem gemeinsamen Syntheseweg aller Tetrapyrrole in Photosynthese-betreibenden Organismen.

1.2. Die Tetrapyrrobbiosynthese in höheren Pflanzen

Die TBS kann in vier Abschnitte unterteilt werden: Beginnend mit der Synthese des Vorläufermoleküls 5'-Aminolävulinsäure (ALA) (1) erfolgt anschließend die Produktion von Protoporphyrin IX (ProtoIX) (2), innerhalb welcher sich die Synthese von Sirohäm abspaltet. Durch die anschließende Insertion des zentralen Metall-Ions in den ProtoIX-Porphyrinring teilt sich der Syntheseweg in den Hämzweig (3) und den Chlorophyllzweig (4) auf.

1.2.1. Die Synthese von ALA

Die raten-limitierende Synthese von ALA erfolgt in drei enzymatischen Schritten, ausgehend von der Aminosäure Glutamat. In Archaeen, den meisten Bakterien, Algen und Pflanzen wird ALA über den C5-Weg synthetisiert [9] (Abb. 1.2). Dieser zeichnet sich durch die Produktion von Intermediaten mit einem C5-Kohlenstoffgerüst aus. Im Vergleich dazu synthetisieren photosynthetisch aktive Nichtschwefelpurpurbakterien, Hefen und Säugetiere ALA über den Shemin-Weg (C4-Weg). Hierbei entsteht das Intermediat Succinyl-Coenzym A, dessen Rückgrat aus vier Kohlenstoffatomen besteht [10, 11].

Im ersten Reaktionsschritt des C5-Synthesewegs wird Glutamat verestert und mit der dazugehörigen tRNA^{Glu} beladen [12, 13]. Die Glutamyl-tRNA-Synthetase (GluRS) katalysiert diesen Reaktionsschritt in Abhängigkeit von ATP und Mg²⁺ [14]. Die benötigte tRNA^{Glu} wird als einzige Komponente der gesamten TBS im Chloroplasten kodiert [15]. GluRS übt dabei eine Doppelfunktion aus, da sie sowohl Substrate für die Proteinbiosynthese als auch die TBS bereitstellt [15–17]. Im nächsten Schritt reduziert die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR) Glutamyl-tRNA^{Glu} zu Glutamyl-Semialdehyd (GSA) in zwei Teilschritten. Zuerst bildet sich, unter Freisetzung der intakten tRNA^{Glu}, ein Thioester aus, auf welchen anschließend ein Hydrid von NADPH übertragen wird [18, 19]. GluTR ist dabei das erste Enzym, welches ausschließlich an der TBS beteiligt ist. Im dritten und letzten Schritt der ALA-Synthese katalysiert die Glutamyl-Semialdehyd-Aminotransferase (GSAT) die Isomerisierung von GSA zu ALA durch die intramolekulare Übertragung einer Aminogruppe [20, 21]. Diese Isomerisierung kann bei physiologischem pH allerdings auch nicht-enzymatisch erfolgen, da GSA mit einer Halbwertszeit von ca. 3 min bei pH 8.0 ein sehr instabiles Molekül ist [22].

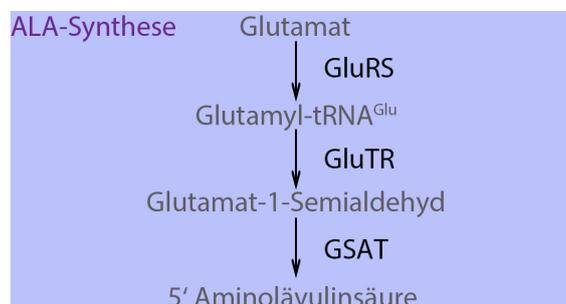


Abbildung 1.2. – Übersicht über die enzymatischen Schritte der ALA-Synthese in höheren Pflanzen. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

1.2.2. Die Porphyrinsynthese

Im nächsten Abschnitt der TBS erfolgt die Synthese von ProtoIX (Abb. 1.3). Im ersten Reaktionsschritt katalysiert die ALA-Dehydratase (ALAD) die asymmetrische Kondensation zweier ALA Moleküle zu dem Monopyrrole Porphobilinogen (PBG) [23]. In Pflanzen bindet ALAD zwei Mg-Ionen pro Monomer als Co-Faktoren [24]. In Arabidopsis wurden zwei ALAD Isoformen identifiziert, welche durch *HEMB1* und *HEMB2* kodiert werden. Da der *knockout* von *HEMB1* embryonal ist und *HEMB2* kaum exprimiert wird, handelt es sich bei ALAD1 aller Wahrscheinlichkeit nach um die Hauptisoform [25].

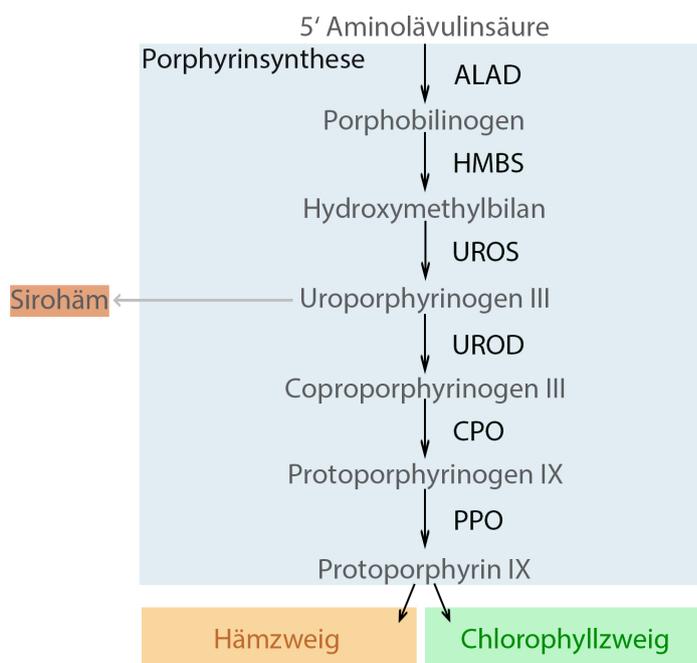


Abbildung 1.3. – Übersicht über die enzymatischen Reaktionsschritte der Porphyrinsynthese in höheren Pflanzen. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Im zweiten Reaktionsschritt der Porphyrinsynthese werden vier PBG Moleküle zu Hydroxymethylbilan (HMB) durch die HMB-Synthase (HMBS) polymerisiert. Die Ausbildung des HMBS-Holokomplexes setzt die Bindung des Co-Faktors Dipyrrolemethan voraus, welcher aus zwei unüblich kondensierten PBG-Molekülen besteht [26]. Anschließend wird schrittweise PBG an diesen Co-Faktor addiert [27–29]. Da HMB sehr instabil ist, erfolgt direkt im Anschluss die Invertierung des D-Ringes sowie der Ringschluss durch die Uroporphyrinogen-III-Synthase (UROS) [30]. Es entsteht der erste Makrozyklus Uroporphyrinogen III (UroIII). In Arabidopsis wird UROS durch *HEMD* kodiert [31]. UroIII ist das letzte gemeinsame Intermediat aller Tetrapyrrole, da sich anschließend die Synthese von Sirohäm abspaltet (Abb. 1.3). Die UroIII-Decarboxylase (UROD) decarboxyliert sequenziell die Acetatreste der vier ursprünglichen PBG-Moleküle, wodurch Coproporphyrinogen III (CoProIII) entsteht. Diese Decarboxylierung verläuft hochgradig geordnet, beginnend am D-Ring des Porphyrin-Makrozyklus und fortlaufend im Uhrzeigersinn [32, 33]. Durch die anschließende oxidative Decarboxylierung zweier Propionat-Seitenketten der Ringe A und B, welche durch die CoProIII-Oxidase (CPO) katalysiert wird, entsteht Protoporphyrinogen IX [34, 35]. Obwohl CPO keine Co-Faktoren benötigt, wird die enzymatische Aktivität durch Eisen und Mangan induziert [34, 36]. Im letzten Schritt der Porphyrinsynthese überträgt die Protoporphyrinogen IX Oxidase (PPO) sechs Elektronen aus molekularem Sauerstoff auf

Protoporphyrinogen IX, was die Produktion von ProtoIX zur Folge hat. Dafür nutzt PPO FAD als Co-Faktor [37]. Die Produktion von ProtoIX markiert den Übergang von nicht fluoreszenten Produkten zu fluoreszenten Produkten, welche ein größeres Risiko der Photooxidation innehaben. In Arabidopsis wurden zwei PPO Isoformen nachgewiesen (PPO1 und PPO2) [38]. Ein *knockout* von *PPO1* ist letal, da *ppo1*-Keimlinge nicht in der Lage sind, Primärblätter auszubilden [39]. Aufgrund dieser Beobachtung und weiteren molekular-phylogenetischer Analysen handelt es sich bei PPO1 wahrscheinlich um die Hauptisoform in photosynthetisch aktivem Gewebe [40]. Interessanterweise ist PPO1 zusätzlich an der RNA-Editierung von Transkripten, welche hauptsächlich für plastidären NADH-Dehydrogenase-Untereinheiten kodieren, beteiligt [39]. ProtoIX markiert den letzten gemeinsamen Schritt in der Synthese von Häm und Chlorophyll.

1.2.3. Der Hämzweig

Die Ferrochelatase (FC) inseriert zweiwertiges Eisen in den Porphyrinring von ProtoIX und synthetisiert somit Häm b (Proto-Häm) (Abb. 1.4). Als Co-Faktor für diese Reaktion nutzt die FC ein gebundenes Eisen-Schwefel-Cluster [41]. In Arabidopsis konnten zwei FC-Isoformen (FC1 und FC2) identifiziert werden [42, 43], welche sich hinsichtlich ihres Expressionsmusters und ihrer Lokalisation unterscheiden [44–46]. FC2 ist die Hauptisoform in photosynthetisch aktivem Gewebe [44]. FC1 spielt vor allem während der Embryogenese und unter Stressbedingungen eine entscheidende Rolle [46, 47]. Die nachfolgende Hämoxygenase (HO) kann freierwerdendes Häm stereospezifisch in lineares Biliverdin IX α spalten. In Arabidopsis wird HO durch eine kleine Genfamilie, bestehend aus vier Mitgliedern (*HO1-HO4*), kodiert, wobei HO1 als Haupt-Isoform identifiziert wurde [48, 49]. Anschließend kann Biliverdin IX α durch die Phytochromobilin-Synthase zu Phytochromobilin (P ϕ B) reduziert werden. Dies geschieht in Abhängigkeit von Ferredoxin [50]. In Arabidopsis ist eine Isoform der P ϕ B-Synthase bekannt, welche durch *HY2* kodiert wird [51].

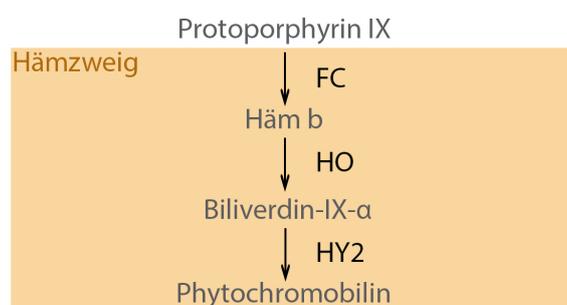


Abbildung 1.4. – Übersicht über die enzymatischen Schritte des Hämzweigs. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

1.2.4. Der Chlorophyllzweig

Im ersten Schritt des Chlorophyllzweiges inseriert die Mg-Chelatase (MgCh) Mg^{2+} unter Verbrauch von ATP als Zentral-Ion in den Porphyrinring und führt zur Produktion von Mg-ProtoIX (MgP) (Abb. 1.5). Im Gegensatz zur komplementären durch FC katalysierten Reaktion, ist die MgCh ein Multiprotein-Komplex, welcher aus drei essentiellen Untereinheiten (CHLI, CHLH und CHLD) aufgebaut ist [52–54]. CHLI und CHLD sind AAA+ ATPasen (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) und hydrolysieren das für die Reaktion benötigte ATP [55]. Sowohl CHLI als auch CHLD bilden jeweils, in Abhängigkeit von ATP und Mg^{2+} , einen hexameren Ring aus [56]. Diese beiden Ringe bilden zusammen den dodecameren Motor der MgCh [56, 57]. Die katalytische Untereinheit der MgCh (CHLH) bindet anschließend als Monomer an den assemblierten dodecameren Motor [58]. Von den beiden in Arabidopsis bekannten CHLI Isoformen (CHLI1 und CHLI2) wurde erstere als Hauptisoform identifiziert, während CHLI2 den Aufbau des hexameren CHLI-Ringes stabilisiert [40, 59]. CHLD und CHLH sind hingegen jeweils nur durch ein einzelnes Gen kodiert [60, 61]. Neben den drei essentiellen Untereinheiten kann GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) durch die Bindung an den MgCh-Komplex die Chelatase-Aktivität stimulieren [62]. *In vitro* verfügte GUN4 über eine hohe Affinität zu ProtoIX und MgP, weswegen vermutet wird, dass GUN4 die Akkumulation dieser Intermediate wahrnimmt und daraufhin die MgCh-Aktivität modifiziert [63, 64]. Die GUN4-Kristallstrukturen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und *Thermosynechococcus elongatus* zeigten, dass GUN4 die gebundenen Porphyrine partiell gegen die Umgebung abschirmt [63]. GUN4 ist zusammen mit CHLH/GUN5 eine Komponente des retrograden Signalweges, in welchen durch plastidäre Signale die Expression verschiedener kernkodierter Gene gesteuert wird [65]. Im nächsten Reaktionsschritt überträgt die Mg-ProtoIX-Methyltransferase (CHLM) einen Methylrest des Co-Faktors S-Adenosyl-L-Methionin auf die C13-Propionatgruppe des C-Ringes. Als Produkt entsteht hierbei Mg-ProtoIX Monomethylester (MgProtoME). Durch Analyse der Kristallstruktur von *Synechocystis* CHLM wurden zwei hoch flexible Arme identifiziert, welche unabhängig voneinander für die Bindung von Substrat und Co-Faktor zuständig sind und zudem die Interaktion zu CHLH vermitteln können [66]. Die direkte Interaktion beider Enzyme stimuliert dabei die CHLM-Aktivität möglicherweise aufgrund der dadurch induzierten Substrat-Weiterleitung von MgP [66, 67].

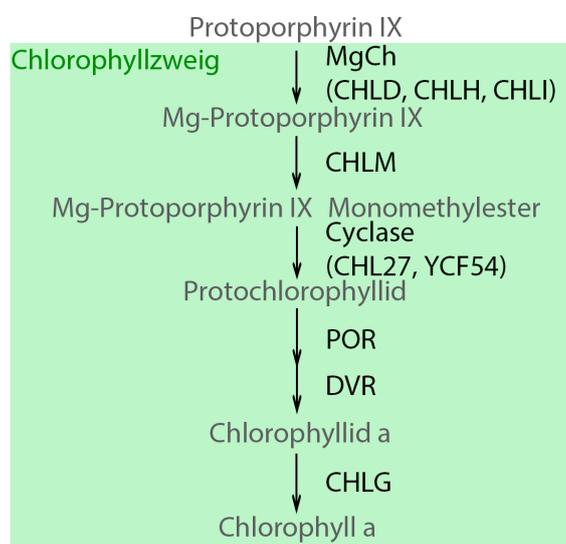


Abbildung 1.5. – Übersicht über die enzymatischen Reaktionen des Chlorophyllzweiges in höheren Pflanzen. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

CHLM ist ein hoch-reaktives Protein, dessen Aktivität in Arabidopsis der Redox-Kontrolle durch die NADPH-abhängige Thioredoxin Reduktase C (NTRC) unterliegt, welche die konservierten Cysteine von CHLM reduzieren kann und somit dessen Aktivität *in vitro* stimuliert [68]. Die Lage der Cysteine innerhalb der CHLM-Struktur lässt vermuten, dass die Reduktion dieser Cysteine für die optimale Konformation der Co-Faktor-Bindetasche nötig ist [66]. Die nachfolgende Synthese von Protochlorophyllid (PChlid) und die damit verbundene Bildung des fünften isozyklischen Ringes (E-Ring) erfolgt durch die MgProtoME-Cyclase in drei Teilschritten: (1) Die Übertragung einer Hydroxylgruppe auf das C13 β -Methylpropionat. (2) Die Oxidation der entstandenen Hydroxylgruppe zu einem Ketopropionat. (3) Die Ligation des gebildeten β -Ketomethylpropionat an die γ -Meso-Brücke des zwischen dem C- und D-Ring gelegenen C15-Atoms des zentralen Porphyrins [69]. Während des ersten Zwischenschrittes wird molekularer Sauerstoff verbraucht, die beiden folgenden Teilreaktionen führen zur Freisetzung von insgesamt sechs Elektronen [69]. Der Cyclase-Komplex besteht aus mindestens drei Untereinheiten, welche zum Teil in der löslichen, zum Teil in der membranassoziierten Fraktion vorliegen [70, 71]. Die Aktivität der katalytischen Untereinheit CHL27 ist abhängig von molekularem Sauerstoff und NADPH [72, 73]. Darüber hinaus stabilisiert HYPOTHETICAL CHLOROPLAST OPEN READING FRAME54 (YCF54)/ LOW CHLOROPHYLL ACCUMULATION A den Cyclase-Komplex, ohne direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität zu nehmen [74–76]. Außerdem interagiert YCF54 mit FNR1, welche als putativer Elektronendonator der Cyclase-Reaktion in Frage kommt [76]. Die daran anschließende Transreduktion einer Doppelbindung des D-Ringes von PChlid führt zur Synthese von Chlorophyllid (Chlid). Hierbei wird das Hydrid des Co-Faktors NADPH durch die NADPH:PChlid-Oxidoreduktase (POR) übertragen [77]. Dieser Syntheseschritt wird in Abschnitt 1.4 genauer beleuchtet. Im vorletzten Schritt des Chlorophyllzweiges reduziert die Divinyl-Reduktase (DVR) die 8-Vinyl-Gruppe des B-Ringes unter Verbrauch von NADPH als Reduktionsäquivalent zu einer Ethylgruppe. Dies führt zur Umsetzung von Divinyl-Chlid zu Monovinyl-Chlid [78]. DVR besitzt *in vitro* ein breites Substratspektrum und ist ebenfalls in der Lage, die Vinyl-Gruppe von MgProtoME, PChlid und Chlid zu reduzieren [79, 80]. Aufgrund der hohen Affinität zu Chlid findet die Reduktion der Vinylgruppe höchstwahrscheinlich nach der durch POR katalysierten Reaktion statt [80]. Die Chlorophyll a Synthase (CHLG) verestert im letzten Syntheseschritt des Chlorophyllzweiges den C17-Propionatrest mit einem langkettigen Phytyl-Pyrophosphat und synthetisiert somit Chlorophyll a. Als alternative Substrate kann CHLG Geranylgeranyl-Pyrophosphat und Chlid b mit geringerer Spezifität verwenden [81]. Unabhängig vom verwendeten Substraten dient NADP⁺ als Elektronenakzeptor dieser Reaktion [81].

1.2.6. Räumliche Organisation der TBS-Enzyme

Ein wichtiger Punkt bei der effektiven Umsetzung von TBS-Intermediaten ist die räumliche Organisation der beteiligten Enzyme. Aufgrund des hydrophilen Charakters der frühen Intermediate liegen die korrespondierenden Enzyme der ALA- und Porphyrin-Synthese vorrangig im Stroma vor [92]. Eine Ausnahme bildet hierbei GluTR, welche sowohl in der löslichen als auch membrangebundenen Fraktion detektiert werden konnte [93]. Das erste Enzym der TBS, welches ausschließlich in der Membranfraktion vorliegt, ist PPO. Alle Enzyme des sich anschließenden Chlorophyllzweiges konnten ebenfalls, in Übereinstimmung mit der deutlich höheren Hydrophobizität der späten TBS-Intermediate, hauptsächlich in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der größtenteils löslichen MgCh-Untereinheiten wurde für alle weiteren Enzyme des Chlorophyllzweiges eine duale Lokalisation sowohl an der inneren Chloroplasten-Hüllmembran als auch an den Thylakoidmembranen beobachtet [92, 94]. Masuda und Fujita postulierten drei mögliche Funktionen dieser dualen Lokalisation [92]: (1) Der Import der kernkodierte TBS-Enzyme findet in Abhängigkeit der Intermediat-Konzentration statt, wie dies beispielsweise für PORA postuliert wurde [95]. (2) Durch die Lokalisation der Enzyme des Chlorophyllzweiges an der inneren Hüllmembran wird die Versorgung der importierten Apoproteine des photosynthetischen Apparates mit Chlorophyll gewährleistet, welches für die korrekte Faltung und Assemblierung dieser benötigt wird. Die Lokalisation der TBS-Enzyme an der Thylakoidmembran gewährleistet hingegen die Aufrechterhaltung der Photosynthese durch die Versorgung der photosynthetischen Untereinheiten mit Chlorophyll während der Reparaturmechanismen. (3) Das Vorhandensein der TBS-Intermediate an der inneren Hüllmembran sind ein Bestandteil des retrograden Signalweges.

Interessanterweise verfügt nur CHLG über transmembrane Bereiche und ist somit ein integraler Bestandteil der plastidären Membranen. Alle anderen Enzyme des Chlorophyllzweiges sind lediglich an der Membran assoziiert. Im Falle der MgCh sind die einzelnen Untereinheiten unterschiedlich abundant in den verschiedenen Subkompartimenten. Während die katalytische Untereinheit CHLH zu gleichen Teilen im Stroma und der Hüllmembran zu finden ist [94, 96, 97], liegen CHLD und CHLI in *Pisum sativum* größtenteils im Stroma vor [98]. Im Kontrast zu den Untersuchungen in *Pisum sativum* wurde CHLD in Proteom-Analysen von Arabidopsis Chloroplasten zu gleichen Teilen im Stroma und in den Thylakoidmembranen nachgewiesen [94]. Die Assoziation von CHLH an der Hüllmembran wird durch GUN4 vermittelt [97], derweil ist unbekannt, welche Faktoren die Lokalisierung von CHLD und CHLI beeinflussen. Ebenso unbekannt ist, welche konkrete Funktion die unterschiedliche Membranlokalisierung der MgCh-Untereinheiten hat. Obwohl für CHLM zwei Transmembrandomänen vorhergesagt wurden, konnte das Enzym in Arabidopsis durch 0,1 M NaOH von isolierten Membranen gewaschen werden und ist somit kein membranintegrales Enzym [99]. CHL27 und POR verfügen über keine vorhergesagten transmembranen Bereiche, wurden allerdings nur zu einem vernachlässigbaren Anteil im Stroma nachgewiesen [100]. Zwar enthält die Proteinsequenz von POR einen stark hydrophoben Bereich unmittelbar nach dem Transitpeptid, welcher POR an der Membran stabilisieren könnte, die genaue Funktion dieses Bereiches wurde allerdings bisher nicht näher charakterisiert [101, 102].

1.3. Expression und Struktur der GluTR-Reduktase in *Arabidopsis thaliana*

In *Arabidopsis thaliana* wird GluTR durch eine kleine Genfamilie kodiert, welche aus drei Mitgliedern besteht (*HEMA1-HEMA3*) [47]. *HEMA1* kodiert hierbei die Hauptisoform (GluTR1) in grünem, photosynthetisch aktivem Gewebe und wird durch Licht induziert [49, 103]. Im Vergleich dazu wird *HEMA2* vor allem in nicht photosynthetisch aktivem Gewebe exprimiert, sodass die durch *HEMA2* kodierte GluTR2 vermutlich überwiegend für die Aufrechterhaltung der Häm-Synthese zuständig ist [104]. In photosynthetisch aktivem Gewebe wird die Expression von *HEMA2* unter oxidativem Stress induziert, vermutlich um die Bereitstellung von Häm für defensive Hämproteine zu gewährleisten [104]. Lediglich in *Arabidopsis* wurde durch Homologie-Analysen eine dritte Isoform (*HEMA3*) identifiziert. Da die Expression von *HEMA3* vernachlässigbar gering ist, handelt es sich hierbei vermutlich um ein Pseudogen [49].

Sowohl die Analyse der Kristallstruktur als auch die funktionelle Charakterisierung von GluTR1 führten zur Unterteilung der Protein-Sequenz in fünf Domänen (Abb. 1.7). Am Aminoterminus der GluTR-Sequenz befindet sich die Häm-Bindedomäne (HBD), welche für die Inaktivierung der GluTR durch Häm nötig ist [105]. Die sich anschließende katalytische Domäne enthält die Substrat-Bindetasche [106]. Durch die Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials wurde hier ein Bereich mit durchgehender positiver Ladung identifiziert, welcher deckungsgleich zur L-Form der tRNA und somit für die spezifische Erkennung der tRNA^{Glu} zuständig ist [19]. In der Mitte der GluTR-Sequenz befindet sich die NADPH-Bindedomäne, welche homolog zur Superfamilie der NAD(P)-bindenden Domäne ist. Am carboxyterminalen Ende schließen sich die Dimerisierungsdomäne sowie die FLU-Bindedomäne (FBD) an (Abb. 1.7). Die GluTR-Kristallstruktur zeigte, dass die katalytische Domäne, die NADPH-Bindedomäne sowie die Dimerisierungsdomäne entlang einer gemeinsamen Achse orientiert sind [106]. Die einzelnen Domänen sind dabei durch eine spinale α -Helix miteinander verbunden, welche eine hohen Flexibilität der Gesamtstruktur verursacht [106]. Eine Verdrehung dieses Rückgrats ermöglicht die Rotation der NADPH-Bindedomäne (Abb. 1.7), welche dadurch die verschiedenen Domänen räumlich miteinander verbindet [19]. Diese Rotation ist für den Transfer des Hydrids von NADPH zu Glutamat nötig [19]. Das durch die Dimerisierungsdomäne vermittelte Homodimer weist eine ungewöhnlichen V-Form auf, welche eine Vielzahl von verschiedenen Interaktionen zulässt (Abschnitt 1.5.1.2) [106].

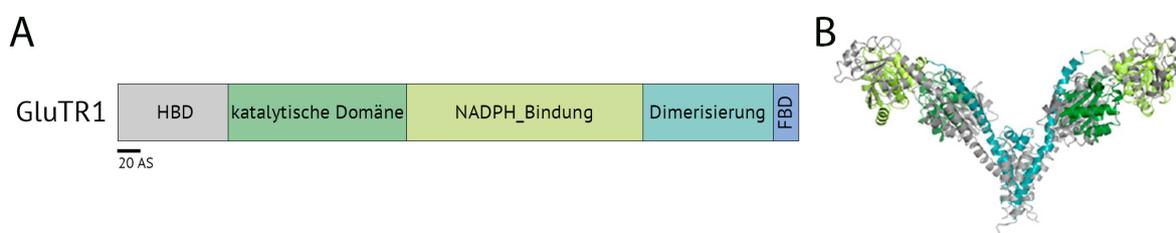


Abbildung 1.7. – Darstellung der fünf funktionellen Domänen sowie der Kristallstruktur von GluTR1. (A) Schematische Darstellung der fünf Domänen, welche für das vollständig prozessierte GluTR1-Protein, ohne das vorhergesagte Transitpeptid, postuliert wurden. Am Aminoterminus befindet sich die Häm-Bindedomäne (HBD, grau), gefolgt von der katalytischen Domäne (grün) und der NADPH-Bindedomäne (hellgrün). Am Carboxyterminus schließen sich die Dimerisierungsdomäne (hellblau) und die FLU-Bindedomäne (FBD, blau) an. (B) Vergleich der Kristallstrukturen der GluTR1-Dimere aus *Methanopyrus kandleri* (grau) und *Arabidopsis thaliana* (farbig). Entnommen und modifiziert aus Zhao *et al.* [19].

1.4. Expression und Struktur der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase in *Arabidopsis thaliana*

Die Aktivität sehr weniger Enzyme ist strikt an das Vorhandensein von Licht gekoppelt. Eines dieser Enzyme ist die lichtabhängige POR, welche somit während Dunkelphasen inhibiert ist und demnach keine Substrate für die Synthese von Chlorophyll bereitstellt. Die Photonen des Lichts induzieren dabei die Übertragung des Hydrids von NADPH auf die C17-C18 Doppelbindung von PChlid, wodurch Chlid produziert wird (Abb. 1.8A). Anoxygene Photosynthese-betreibenden Bakterien, Cyanobakterien, Algen und niederen Landpflanzen verfügen zusätzlich über eine lichtunabhängige POR (*dark operative POR*, DPOR), welche die Synthese von Chlid in Dunkelheit gewährleistet. Die plastidenkodierte DPOR ging in Angiospermen verloren. Unabhängig von DPOR ist die lichtabhängige POR häufig durch zwei Gene, selten durch ein einzelnes Gen, kodiert [107]. Eine Ausnahme hierbei bildet *Arabidopsis* mit drei POR kodierende Genen (*PORA-PORC*), welche sich vor allem hinsichtlich ihres Expressionsmusters unterscheiden. *PORA* wird vor allem während der Skotomorphogenese, der Entwicklung von Keimlingen in Dunkelheit, aktiv exprimiert und ist in adultem Gewebe kaum nachweisbar [108]. *PORB* hingegen wird sowohl während der Skotomorphogenese als auch in adultem, photosynthetisch aktivem Gewebe aktiv exprimiert [108]. Die Expression der dritten, ausschließlich in *Arabidopsis* identifizierten Isoform *PORC* kann nur in photosynthetisch aktivem Gewebe nachgewiesen werden und wird darüber hinaus durch Starklicht induziert [109, 110]. In adultem photosynthetisch aktivem Gewebe sind die Funktionen von *PORB* und *PORC* redundant, weswegen *porb* und *porc* Einzelmutanten nur eine geringfügig reduzierte Pigmentierung aufwiesen [111–113]. Im Kontrast dazu ist die *porB x porC* Doppelmutante letal und führt aufgrund einer nahezu vollständig inhibierten Chlorophyllbiosynthese zum Absterben der Keimlinge im Kotyledonen-Stadium [112].

Während *PORA* und *PORB* ein Molekulargewicht von 36 kDa aufweisen, ist *PORC* mit 38 kDa etwas größer [108, 112, 114, 115]. Sequenzanalysen der drei *Arabidopsis* POR-Isoformen zeigten, dass 79 % der prozessierten Proteinsequenz identisch sind [115]. Die größten Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen konnten dabei in dem direkt an das Transitpeptid anschließenden hydrophoben Bereich nachgewiesen werden [115]. Da POR wahrscheinlich durch diesen Bereich mit den plastidären Membranen interagiert [101, 102], könnte dies eine unterschiedliche Stabilität der drei Isoformen an der Membran verursachen. Aufgrund von Sequenzhomologie gehört POR zur Proteinfamilie der *Short-Chain Dehydrogenases/Reductases* (SDRs), welche zur Superfamilie der NAD(P)-bindenden Domänen zählt [115]. Charakteristisch für die SDR-Proteinfamilie ist sowohl ein stark konserviertes Glycin-reiches Motiv innerhalb der NADPH-Bindedomäne, welches an der Bindung des Dinukleotids von NADPH beteiligt ist [116], als auch ein konserviertes katalytisches Motiv (YxxxK) [115]. Beide Motive wurden in allen drei POR-Isoformen nachgewiesen [115]. Die mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie und Homologie-Modellierung aufgelöste Struktur von POR entspricht der eines kugelförmigen, löslichen Proteins mit leicht abgeflachter Rotationsellipse [102, 115, 117, 118] (Abb. 1.8B). Anders als andere SDR-Enzyme verfügt POR über eine 33 Aminosäuren-lange Schlaufe, welche sich kurz vor dem katalytischen YxxxK-Motiv befindet. Die Funktion dieser Schlaufe ist bislang unbekannt. Allerdings wird vermutet, dass diese die spezifische Bindung von PChlid und/oder Interaktionspartnern vermittelt [117].

Beim Vergleich der modellierten Strukturen aller drei Arabidopsis POR-Isoformen wurden nur geringfügige Unterschiede identifiziert, welche hauptsächlich im Bereich der zusätzlichen Schlaufe vorlagen (Abb. 1.8B, grau unterlegt) [115]. Die hohe strukturelle Ähnlichkeit ist in Übereinstimmung mit einer vergleichbaren katalytischen Aktivität aller drei Isoformen *in vitro* [115]. Allerdings ist die katalytische Effizienz von PORC im Vergleich zu PORA und PORB während kurzer Belichtungsphasen deutlich geringer [115].

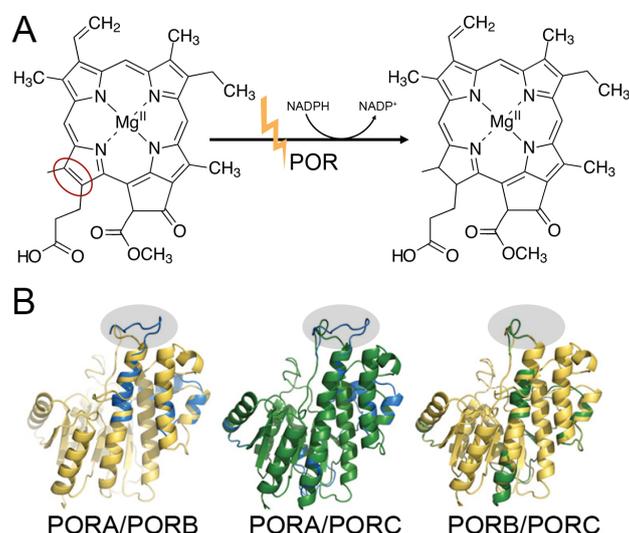


Abbildung 1.8. – Die lichtabhängige durch POR katalysierte Reaktion sowie das Strukturmodell von POR. (A) POR katalysiert unter Belichtung die Reduktion von PChlid zu Chlid durch die Übertragung des Hydrids von NADPH auf PChlid (rot umrandet). (B) Vergleich der modellierten Struktur der drei in Arabidopsis bekannten Isoformen: PORA (blau), PORB (gelb) und PORC (grün). Die POR-spezifische Schlaufe wurde grau unterlegt. Die Abbildung der Strukturen wurde entnommen und modifiziert aus Gabruk *et al.* [115]

Die durch POR katalysierte Synthese von Chlid verläuft hochgradig geordnet. Die eingangs stattfindende Bindung von NADPH ist mit mehreren drastischen Konformationsänderungen verbunden, welche Voraussetzung für die anschließende Bindung von PChlid sind und nicht als Teil der katalytischen Umsetzung gewertet werden [119]. Die darauf folgende Interaktion zwischen PChlid und POR geht ebenfalls mit einigen Konformationsänderungen einher und führt zur Ausbildung des ternären POR-PChlid-NADPH-Komplexes [119]. Dieser Komplex fungiert als Photorezeptor für die nachfolgende Reduktion von PChlid [118, 120]. Die Reaktion wird durch den Austausch von NADP⁺ mit NADPH vollendet, was abermals von Konformationsänderungen begleitet ist und Voraussetzung für die Freigabe von Chlid ist [119]. Der intermediäre POR-Chlid-NADPH-Komplex ist darüber hinaus ein starker Energiequencher, welcher Chlid vor Photooxidation schützt [121, 122]. Dabei führt die Absorption von Licht durch Chlid zur Oxidation von NADPH zu NADP⁺, möglicherweise unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff [107]. Daraufhin wird NADP⁺ wieder reduziert oder durch NADPH ausgetauscht [107]. Dieser als Chlid-Microzyklus beschriebene Prozess kann dabei die Ausbildung von Triplett-Chlid verhindern [107]. Obwohl der katalytische Prozess der PChlid-Reduktion detailliert aufgeklärt wurde, ist vor allem die Regulation von POR weiterhin ein spannendes Thema mit vielen offenen Fragen. Einige der Interaktionspartner, welche für POR identifiziert wurden, werden in Abschnitt 1.5.2 vorgestellt.

1.5. Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese

Der Bedarf an Chlorophyll verändert sich stetig mit den wechselnden abiotischen und biotischen Bedingungen. Die Anpassung der TBS an diesen Bedarf ist somit von essentieller Bedeutung. Vor allem die Akkumulation von ungebundenen Intermediaten kann zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen, welche vielfältige Schäden in der Zelle auslösen können. Zwei der wichtigsten Angriffspunkte für die Regulation der TBS sind zum einen das Schlüsselenzym der raten-limitierenden ALA-Synthese GluTR, zum anderen die lichtabhängige POR. Die Regulation beider Enzyme findet hierbei vor allem auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene statt.

1.5.1. Regulation der ALA-Synthese

1.5.1.1. Transkriptionelle Regulation

Die Expression von *HEMA1* ist lichtinduziert und wird durch blaues, rotes und dunkelrotes Licht reguliert [49, 123]. Darüber hinaus unterliegt die *HEMA1*-Expression diurnaler und circadianer Kontrolle und co-exprimiert mit *LHCB6* [49]. Eine wichtige Rolle bei der Induktion der *HEMA1*-Expression spielen Phytochrom- und Cryptochrom-vermittelte Signalwege. Sobald Licht von diesen Photorezeptoren wahrgenommen wird, führt dies zum Abbau verschiedener reprimierender Faktoren. Ein Beispiel hierfür ist der Repressor der Photomorphogenese, die E3 Ubiquitin-Protein Ligase *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1* (COP1), welche in Dunkelheit konstitutiv exprimiert und im Licht reprimiert wird [124]. Die Repression von COP1, welche durch Phytochrom und Cryptochrom vermittelt wird, führt zur Aufhebung des negativen Einflusses auf *HYPOCOTYL 5* (HY5), woraufhin HY5 akkumuliert [124]. HY5 gehört zur Familie der basischen Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren und ist ein wichtiger Positivregulator verschiedener TBS-Gene [124, 125]. Die Akkumulation von HY5 ist entscheidend für die lichtinduzierte Expression von *HEMA1*, obwohl *HEMA1* in Chromatin-Immünpräzipitationsanalysen nicht als direktes Zielgen von HY5 nachgewiesen werden konnte [126]. Weitere Faktoren der lichtinduzierten *HEMA1*-Expression sind die PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs), welche zur Familie der Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren zählen [127]. In Dunkelheit akkumuliert PIF3 im Zellkern, bindet an den Promotor von *HEMA1* und reprimiert so dessen Expression [128]. Durch dunkelrotes und rotes Licht werden Phytochrome aktiviert, binden an PIF3 und lösen damit dessen Phosphorylierung aus. Phosphoryliertes PIF3 wird proteolytisch abgebaut, weswegen der reprimierende Effekt auf *HEMA1* aufgehoben wird [127]. In *pi3*-Linien führt die fehlende Repression von *HEMA1* und weiteren TBS-Genen zur Akkumulation von PChlid während der Skotomorphogenese [128]. Neben der Koordination der Photomorphogenese ist PIF3 zusammen mit PIF1 für den circadianen Rhythmus der *HEMA1*-Expression verantwortlich [127]. Eine *pi1 x pi3* Doppelmutante wies beispielsweise eine veränderte Phase und Amplitude der circadianen Oszillation auf [127]. Zwei weitere Komponenten des Phytochrom-vermittelten Signalweges sind die beiden Transposase-abgeleiteten Transkriptionsfaktoren FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3 (FHY3) und FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1 (FAR1). In *fhy3 x far1* Mutanten ist die Expression von *HEMA1* deutlich reduziert [126]. Mittels Chromatin-Immünpräzipitation wurde *HEMA1* als direktes Zielgen von FHY3 in dunkelrotem Licht identifiziert [129]. Da *HEMB1* ein weiteres direktes Zielgen von FHY3/FAR1 ist, liegt die Vermutung nahe, dass beide Transkriptionsfaktoren an der Induktion der Photomorphogenese beteiligt sind

[25]. Ebenso binden die GOLDEN2-LIKE (GLK) Transkriptionsfaktoren direkt an den Promoter von *HEMA1* und induzieren dadurch die Expression von *HEMA1* als Reaktion auf verschiedene abiotische Faktoren [125, 130]. Darüber hinaus sind weitere direkte Zielgene der GLKs verschiedene LHC-Proteine (LHCs) [131]. Aus diesem Grund wird vermutet, dass GLKs die Expression ihrer Zielgene synchronisieren und somit die photosynthetische Kapazität unter verschiedenen Bedingungen koordinieren [130].

1.5.1.2. Posttranslationale Kontrolle

In den letzten Jahrzehnten wurden insgesamt sechs verschiedene posttranslationale Regulationsmechanismen identifiziert, welche die Stabilität, Lokalisation und/oder Aktivität von GluTR1 beeinflussen: (1) Die Stimulation durch Komplexbildung mit GSAT. (2) Die Feedback-Inhibierung durch Häm. (3) Die Feedback-Inhibierung durch den FLU-Inaktivierungskomplex. (4) Die Stabilisierung durch das GluTR-Bindeprotein (GBP). (5) Die Verhinderung von Aggregation durch CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 43 (cpSRP43). (6) Der Abbau durch die caseinolytische Protease (Clp). Eine Zusammenfassung dieser Mechanismen ist in Abbildung 1.9 zu sehen.

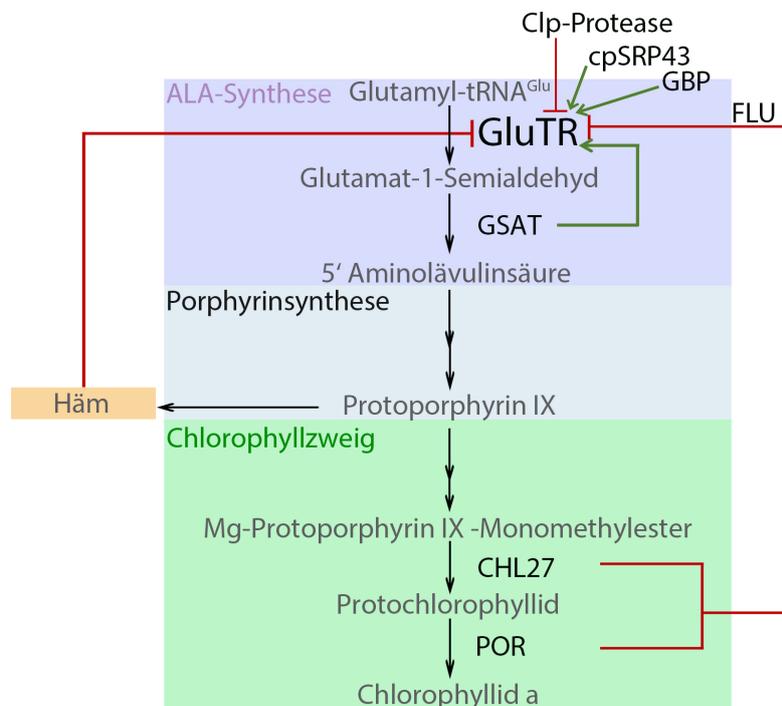


Abbildung 1.9. – Zusammenfassung der posttranslationalen Kontrolle von GluTR1. Sechs verschiedene GluTR1 Interaktionspartner, welche einen Einfluss auf die Stabilität, Lokalisation und/oder Aktivität haben, wurden bislang identifiziert. Interaktionen mit einem positivem Einfluss auf GluTR1 wurden durch grüne Pfeile, Interaktionen mit einem negativen Einfluss durch rote Verbindungen dargestellt. Für nähere Informationen siehe Text.

1.5.1.2.1. Komplexbildung mit GSAT

Die Ausbildung eines stabilen GluTR-GSAT-tRNA-Komplexes konnte *in vitro* für die korrespondierenden Enzyme aus *Escherichia coli* und *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt werden [18, 132, 133]. In *A. thaliana* gelang dies bisher möglicherweise aufgrund der erhöhten Flexibilität beider Enzyme in Arabidopsis nicht [134]. In einem gekoppelten *in vitro* Aktivitätsassay beeinflusste eine Komplexbildung von *C. reinhardtii* GluTR und GSAT die GSAT-Aktivität nicht, stimulierte allerdings die Glutamyl-tRNA abhängige Oxidation von NADPH durch GluTR [133]. Die Modellierung der Interaktion erfolgte unter Zuhilfenahme der Kristallstrukturen aus *Methanopyrus kandleri* (GluTR) und *Synechococcus* (GSAT) [106, 132]. Das dimere GSAT bindet in der V-förmigen Vertiefung zwischen den beiden GluTR-Dimeren [106]. Das postulierte aktive Zentrum jedes GSAT-Monomers liegt dabei direkt gegenüber der Glutamat-Bindetasche, welche sich innerhalb der katalytischen Domäne von GluTR befindet [132]. Die Ausbildung des GluTR-GSAT-Komplexes würde somit eine zügige Weitergabe des labilen Semialdehyds gewährleisten, ohne dieses der wässrigen Umgebung auszusetzen [132].

1.5.1.2.2. Feedback-Inhibierung durch Häm

Die Inhibierung der GluTR Aktivität durch Häm ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Unter Zuhilfenahme von verschiedenen *in vitro* Analysen hinsichtlich der Häm-Sensitivität zeigte sich beispielsweise, dass GluTR aus *Chlorobium vibrioforme* lediglich dann durch die Zugabe von Hämin inhibiert werden konnte, wenn das Enzym in Häm-abgereicherter Umgebung exprimiert wurde [135]. Die Aktivität von GluTR war dabei reziprok proportional zur Konzentration von Hämin [135]. Darüber hinaus war die Inhibierung von rekombinant exprimierter GluTR aus *C. reinhardtii* durch Hämin nur dann möglich, wenn löslicher Chlamydomonas Zellextrakt zu dem *in vitro* Assay hinzugefügt wurde [58]. Dementsprechend vermittelt eine lösliche Komponente die Häm-Sensitivität in Chlamydomonas. Ferner zeigte rekombinant exprimierte GluTR aus *Hordeum vulgare* eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Hemin als das *in planta* aufgereinigte Enzym [14, 105]. In Mutanten mit einem gestörten Häm-Abbau führte die erhöhte Konzentration von Häm zur Inhibierung der GluTR-Aktivität und infolge dessen zu einem reduzierten PChlid-Gehalt [136]. Für die Häm-Bindung ist dabei ein 31-34 Aminosäuren langer, in Pflanzen stark konservierter Bereich am Aminoterminus der GluTR-Sequenz zuständig, welcher aus diesem Grund als HBD bezeichnet wird [105]. In Übereinstimmung damit führt das Fehlen der HBD *in vitro* zu einer reduzierten Wirkung von Hämin auf GluTR [137]. Allerdings wurde erst kürzlich nachgewiesen, dass GluTR aus *Arabidopsis thaliana* Häm nicht direkt bindet, sondern dass die Häm-Sensitivität durch GBP vermittelt wird [138]. Hierbei inhibiert GBP-gebundenes Häm die Interaktion zwischen GBP und GluTR im Bereich der HBD, wodurch diese frei wird [138]. Infolge dessen wird GluTR durch das Clp-Proteasom abgebaut [138](siehe Abschnitt 1.5.1.2.4 und 1.5.1.2.5). Bislang konnte aufgrund der hohen Flexibilität des Aminoterminus die HBD in der Kristallstruktur von GluTR nicht aufgelöst werden [19].

1.5.1.2.3. Feedback-Inhibierung durch FLU

In Angiospermen kommt es in Dunkelheit zur Inhibierung der TBS, um eine übermäßige Anreicherung von PChlid und die damit einhergehende Produktion von ROS bei Wiederbelichtung zu vermeiden. In Arabidopsis Keimlingen findet diese Inaktivierung bereits 30 - 60 min nach dem Transfer in Dunkelheit statt [139]. In der durch Ethylmethansulfonat (EMS) erzeugten *fluorescent in blue light (flu)*-Mutante bleibt diese Inaktivierung aus, wodurch PChlid während Dunkelphasen massiv akkumuliert [140]. Dies führt wiederum bei Wiederbelichtung zur explosionsartigen Freigabe von ROS und infolge dessen zum programmierten Zelltod [140]. Dementsprechend ist die *flu*-Linie nur unter kontinuierlichen Lichtbedingungen überlebensfähig [140]. Selbiges trifft für das FLU-Ortholog in *Hordeum vulgare* (TRIGINA d) zu [141]. Unerwarteterweise scheint die Funktion von FLU evolutionär konserviert zu sein, da auch *C. reinhardtii* über ein FLU-Ortholog (*FLU-LIKE PROTEIN*; FLP) verfügt. Zellen mit defizienter FLP-Expression akkumulieren ebenfalls PChlid während Dunkelphasen. Dies führte allerdings nur unter anschließender Inkubation in Starklicht zum Absterben der Zellen, bei geringerer Lichtintensität sind *flp*-Linien hingegen auch im Tag-Nacht-Rhythmus überlebensfähig [142]. Dies unterstreicht die Bedeutung der GluTR-Inaktivierung durch FLU, unabhängig vom Vorhandensein der DPOR.

FLU ist ein untypisches *tetratricopeptide repeat* (TPR) Protein mit drei carboxyterminal gelegenen, nicht-kanonischen TPR-Motiven. Durch eine aminoterminal Transmembranhelix ist FLU in den plastidären Membranen verankert und liegt dort als Dimer vor [143, 144]. Interaktionsstudien belegten, dass FLU mit GluTR1, CHL27 und POR einen quaternären Komplex ausbilden kann, welcher essentiell für die Inaktivierung der TBS in Dunkelheit ist [143]. Dieser FLU-Inaktivierungskomplex bildet sich als Reaktion auf die Anreicherung von POR-gebundenem PChlid aus [143]. Dabei wechseln die beiden FLU-Protomere in ihre aktive Form und binden das GluTR1-Dimer an die Membran, was eine sterische Blockade der Substratbindetasche von GluTR1 zur Folge hat [144]. Für die Interaktion sind hierbei die TPR-Motive 1 und 3 von FLU sowie die letzten 43 Aminosäuren (FBD) von GluTR1 erforderlich [144, 145]. Interessanterweise fehlt die FBD in der Sequenz von GluTR2, wodurch diese nicht durch FLU inaktiviert werden kann [146]. Zu Beginn der Lichtphase sinkt die Konzentration von POR-gebundenem PChlid durch die Umsetzung zu Chlid ab. Dies führt zur Freisetzung von GluTR1 und demzufolge zur Aktivierung der ALA-Synthese [143]. Neben der Repression von GluTR1 in Dunkelheit spielt FLU ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Anpassung der ALA-Syntheserate an wechselnde Lichtbedingungen [147]. Während unter kontinuierlichen Lichtbedingungen die *flu*-Linie makroskopisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden ist, führt der Transfer in fluktuierendes Licht zur Ausbildung von Chlorosen in den sich neu entwickelnden Blättern [147]. Eine Ursache für diese Chlorosen ist die Akkumulation von PChlid, welches sich aufgrund der fehlenden Inhibierung der ALA Synthese durch FLU anreichert und mit der Produktion von ROS einhergeht [147]. Dies unterstreicht die Funktion von FLU für die Feinabstimmung der TBS [147].

1.5.1.2.4. Stabilisierung durch GBP

Durch die gezielte Suche nach weiteren GluTR-Interaktionspartnern wurde mittels cDNA basierten Hefe-2-Hybrid Analysen GBP identifiziert, welches zuvor unter dem Namen PROTON GRADIENT REGULATION 7 charakterisiert wurde [148]. Das kernkodierte Protein verfügt über keine Transmembrandomänen, liegt aber sowohl im Stroma als auch an den plastidären Membranen vor [93, 149]. GBP ist keine Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes und somit vermutlich durch einen bisher unbekanntem Faktor an der Membran verankert [149]. Darüber hinaus ist GBP ein strukturelles Homolog von HugZ, welches dem HO-Ortholog in *Helicobacter pylori* entspricht und am Häm-Abbau beteiligt ist [19, 150]. Sowohl HugZ als auch GBP sind in der Lage, Häm zu binden [19, 138]. Dabei vermittelt GBP die Häm-Sensitivität von GluTR (Abschnitt 4.28) [138]. Die *gbp*-Punktmutante zeichnet sich durch einen reduzierten Häm-Gehalt aus, welcher auf die Destabilisierung von GluTR1 zurückzuführen ist [149]. Vor allem in längeren Dunkelperioden unterliegt GluTR1 in einer *gbp*-Mutante einer erhöhten Abbaurate [146]. *In vitro* Aktivitätsanalysen bestätigten darüber hinaus, dass die Präsenz von GBP die Aktivität von GluTR steigern kann und damit antagonistisch zu FLU agiert [19, 144]. Die Co-Kristallisation von GluTR und GBP zeigte, dass GBP mit seiner carboxyterminal gelegenen *Domain of unknown function*₂₄₇₀ (DUF2470) mit der katalytischen Domäne von GluTR interagiert [19]. Da dies ebenfalls die postulierte Bindestelle von GSAT ist, kann die Ausbildung eines trimeren GluTR-GSAT-GBP-Komplexes ausgeschlossen werden. Die Interaktion von GSAT und GBP muss somit sequenziell stattfinden [19]. Die Bindung von GBP führt darüber hinaus zur Stabilisierung der spinalen Helix von GluTR, welche die einzelnen Domänen des GluTR-Monomers verbindet [19]. Es konnte zwar gezeigt werden, dass GBP die Häm-Sensitivität von GluTR vermittelt, indem es durch die Bindung an die HBD von GluTR das Enzym vor proteolytischem Abbau schützt [138, 151], allerdings ist unklar, inwiefern GBP abseits dessen weitere Funktionen übernimmt. Diesbezüglich wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt [19, 134, 149]. (1) Die Bindung von GBP unterstützt die Konformationsänderungen von GluTR und inhibiert so die GluTR-Esteraseaktivität, welche bei Abwesenheit von NADPH zur Bildung von Glutamat führen würde. (2) Durch die Bindung von dimerem GBP wird die V-Form des GluTR-Dimers stabilisiert. (3) Durch die Bindung von GBP an die katalytische Domäne von GluTR wird GSA fixiert, bevor GSAT binden kann. (4) GBP stabilisiert GluTR für die Aufrechterhaltung der ALA-Synthese in Dunkelheit, um den Bedarf an Häm während der Nacht zu decken.

1.5.1.2.5. Anpassung des GluTR-Gehalts durch molekulare Chaperonen

Die ALA-Synthesekapazität oszilliert über einen Zeitraum von 24 h mit einem Maximum im Übergang von Dunkelheit zum Licht und einem Minimum 12 h später [152]. Damit einhergehend ist eine Oszillation der *HEMA1*-Expression und der GluTR-Stabilität. Für die korrekte Anpassung des GluTR-Gehalts wurden in den letzten Jahren zwei entscheidende Faktoren identifiziert: die Clp-Protease und cpSRP43.

Die ATP-abhängige Clp-Protease ist das abundanteste Proteasesystem in Plastiden mit einer Vielzahl von Zielproteinen. Das Clp-Proteasom besteht aus einem AAA+-Chaperonen-Ring (ClpC), welcher für die Entfaltung und Translokation der Zielproteine in Richtung des Protease Kernkomplexes zuständig ist [153]. Der Kernkomplex wiederum besteht aus einem heptameren und einem hexameren Peptidase-Ring [153]. Für die Erkennung und Anlieferung der Zielprotei-

ne sind spezifische Substratselektoren und Adapterproteine verantwortlich. Durch Affinitätsaufreinigung mit rekombinantem ClpS1, einem Substratselektor, konnte GluTR1 als Zielprotein des Clp-Proteasoms in *A. thaliana* identifiziert werden [154]. Dabei bindet ClpS1 im Bereich der HBD an GluTR und liefert das Enzym anschließend zum Clp-Proteasom. Dort angekommen, interagiert GluTR1 mit der ClpC1-Untereinheit des AAA+-Chaperonen-Rings, wodurch GluTR in den Kernkomplex des Clp-Proteasoms transloziert wird und der proteolytische Abbau beginnt [146]. In *hemA1*-Linien, die mit der GluTR1-Sequenz ohne die HBD komplementiert wurden, war GluTR1 deutlich stabiler als im vergleichbaren Wildtyp [146]. Dies wurde vor allem nach einer verlängerten Dunkelphase von drei Tagen deutlich. Während drei Tage in Dunkelheit im Wildtyp zum Abbau von GluTR1 führten, war dies in der HBD-Deletionsmutante nicht der Fall [146]. Der fehlende Abbau von GluTR1 führt dabei zur Akkumulation von PChlid, was die Ausbildung von Nekrosen zur Folge hatte. Der Abbau von GluTR durch das Clp-Proteasom ist somit, neben FLU, für die Inaktivierung der ALA-Synthese in Dunkelheit verantwortlich.

Die Überexpression von GluTR1 in *Nicotiana tabacum* führte interessanterweise nicht zu einer erhöhten ALA-Syntheserate, sondern löste die Bildung von Nekrosen aus [155]. Dies konnte auf die Ausbildung von unlöslichen, inaktiven GluTR-Aggregaten zurückgeführt werden [155]. Sequenzanalysen zeigten, dass GluTR zwei *aggregation prone regions* (APRs) in der katalytischen Domäne aufweist [151]. Im Fall der korrekten Faltung sind diese APRs im Inneren der GluTR-Struktur verborgen. Eine inkorrekte Faltung führt zur Exposition dieser APRs an die Proteinoberfläche und löst so die Bildung von Aggregaten aus [151]. *In vitro* ist cpSRP43 in der Lage, die exponierten APRs zu erkennen, zu binden und durch die intrinsische Chaperon-Aktivität bei der korrekten Faltung zu unterstützen [151]. Dies trägt synergistisch mit GBP zur Stabilisierung von GluTR bei [151]. Darüber hinaus ist cpSRP43 für die Translokation der importierten LHC-Proteine (LHCPs) von der inneren Hüllmembran zur Thylakoidmembran zuständig [156]. Dies legt die Vermutung nahe, dass cpSRP43 eine Verbindung zwischen der Integration von LHCPs und der Regulation der Chlorophyllbiosynthese auf Ebene der ALA-Synthese herstellt. Diese Verbindung würde die Versorgung der LHCPs mit Chlorophyll gewährleisten [151].

1.5.1.2.6. Spatiotemporale Organisation der GluTR-Interaktionen

Die Gesamtheit der identifizierten Interaktionspartner sorgt für die Feinabstimmung des GluTR-Gehalts und die Anpassung dessen an wechselnde Umweltbedingungen. Das Äquilibrium zwischen den verschiedenen Interaktionen ist hierbei abhängig von der Lichtintensität und dem Lichtregime. Der Anteil von löslicher GluTR steigt unter Kurztagbedingungen beispielsweise proportional zur Lichtintensität an [93]. Der Anteil von membrangebundener GluTR1 ist hingegen abhängig von der Tageslänge, da die Anzucht im Langtag zu einem erhöhten Anteil von GluTR an der Membran führte [93]. Unter kontinuierlichen Lichtbedingungen hingegen besteht ein ausgeglichenes GluTR-Verhältnis zwischen beiden Fraktionen [93]. Innerhalb der Lichtphase liegt der Hauptteil von GluTR in der löslichen Fraktion vor und ist dabei entweder durch GSAT oder GBP gebunden [93]. Der lösliche Anteil von GluTR ist hochgradig aktiv und deckt den Bedarf an ALA für die Synthese von Chlorophyll und Häm während der Belichtungsphase (Abb. 1.10). In Dunkelphasen und bei geringer Lichtintensität wird GluTR1 durch FLU an die Membran gebunden und inaktiviert [143, 144]. Die Ausbildung des FLU-CHL27-POR-Komplexes ist sowohl im Licht als auch in Dunkelheit möglich [143]. Um während der Dunkelphasen den Bedarf an

ALA für die Synthese von Häm zu decken, liegt ein geringer Anteil von aktiver GluTR durch GBP an der Membran gebunden vor [149]. GBP besitzt *in vitro* hierbei eine höhere Affinität zu GluTR als FLU [134]. Die Interaktion zwischen GluTR und GBP führt nicht nur zur Aufrechterhaltung der ALA-Synthese in Dunkelheit, sondern schützt GluTR ebenso wie cpSRP43 vor proteolytischem Abbau durch das Clp-Proteasom [146, 151]. Sollte die HBD nicht durch andere Interaktionspartner okkupiert sein, können Substratselektor (ClpS1) und Adapterprotein (ClpF) des Clp-Proteasoms binden und so den proteolytischen Abbau von GluTR induzieren [146]. Der Abbau von GluTR findet vor allem während der Dunkelphasen statt und führt somit zu einer zusätzlichen Inhibierung der ALA-Synthese. Neben dem Schutz vor proteolytischem Abbau verhindert cpSRP43 die Aggregation von GluTR, indem es fehlerhaft gefaltete Proteine erkennt und bindet [151]. Ob diese Interaktion abhängig von einer bestimmten abiotischen Bedingung ist, bleibt zu ermitteln.

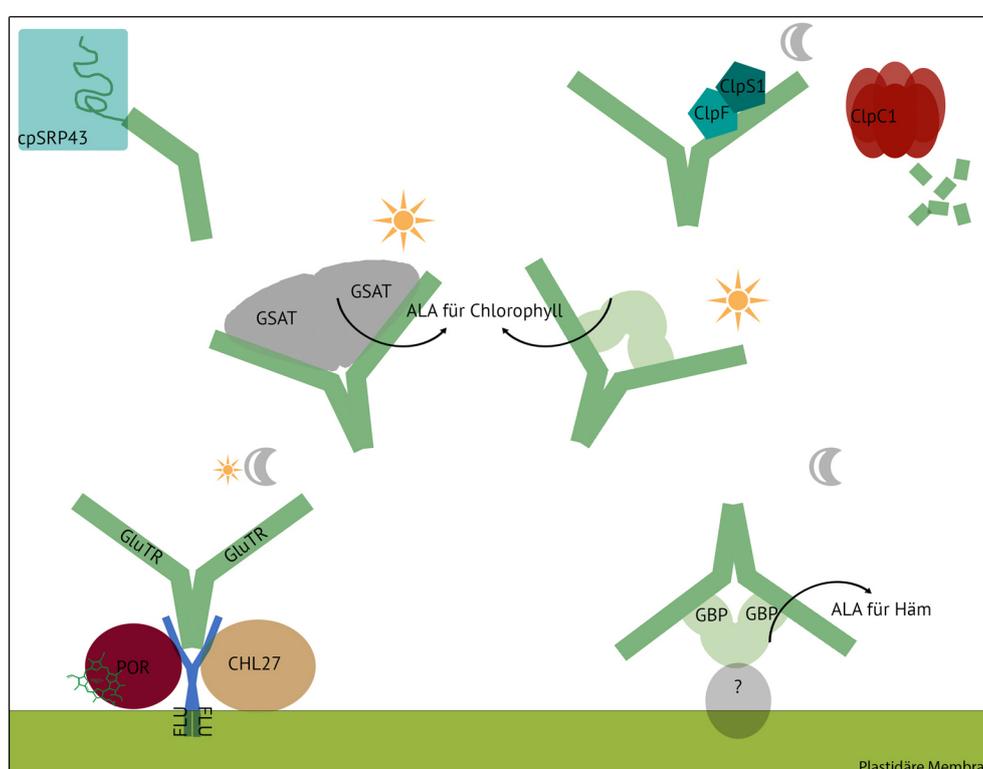


Abbildung 1.10. – Übersicht über die spatiotemporale Organisation von GluTR. Für alle Interaktionen, mit Ausnahme von cpSRP43 und ClpS1/ClpC1, wurde die Interaktion zum GluTR-Dimer nachgewiesen. Einige Interaktionen finden bevorzugt während der Lichtphase (Sonne) statt, wohingegen andere Interaktionen vorrangig in Dunkelheit (Mond) zu finden sind. Die jeweiligen positiven Effektoren decken dabei den Bedarf an ALA für unterschiedliche Endprodukte (Häm oder Chlorophyll). Für weitere Erläuterungen siehe Text.

1.5.2. Regulation von POR

1.5.2.1. Transkriptionelle Regulation

Im Unterschied zu allen anderen TBS-Genen werden *PORA* und *PORB* aktiv während der Skotomorphogenese exprimiert und die Expression von *PORA* wird durch Licht reprimiert [49, 108]. In adultem Gewebe unterliegen *PORA* und *PORB* circadianer und diurnalen Kontrolle, wobei die maximale Genexpression von *PORA* und *PORB* um ca. vier Stunden zur maximalen Genexpression von *HEMA1* und weiteren TBS-Genen verschoben ist [49]. Im Kontrast dazu ist die Expression von *PORC* lichtinduziert und unterliegt lediglich der diurnalen Kontrolle [49]. COP1 spielt eine zentrale Rolle in der aktiven Expression von *PORA* und *PORB* während der Skotomorphogenese, da COP1 die Akkumulation von ETHYLEN-INSENSITIVE 3 (EIN3), EIN3-LIKE 1 (EIL1) und PIF1 positiv beeinflusst [157]. EIN3 und EIL1 sind pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren, welche direkt an die Promoter von *PORA* und *PORB* binden und so deren Expression induzieren [157]. Darüber hinaus reprimiert EIN3 die Expression verschiedener TBS-Gene [157]. Im Vergleich zu EIN3/EIL1 reguliert PIF1 die Expression von *PORA* und *PORB* indirekt, bindet allerdings direkt an den Promoter von *PORC* und induziert somit die *PORC*-Expression [158]. *PORC* wird vor allem in adultem Gewebe exprimiert wird, sodass angenommen wird, dass PIF1 für den Tag-Nacht-Rhythmus der *PORC*-Expression verantwortlich ist [158]. Durch Licht wird COP1 abgebaut und der positive Einfluss auf die *POR*-Expression wird aufgehoben [157]. Infolgedessen sinkt die Expression von *PORA* und *PORB* unmittelbar nach Belichtungsbeginn stark ab. An der circadianen Kontrolle von *PORA* und *PORB* ist darüber hinaus CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) beteiligt. CCA1 reprimiert die Expression von *PORA* und *PORB* durch die direkte Bindung an deren Promoter [159]. Da die Abundanz von CCA1 vor allem im Übergang zwischen Dunkelheit und Licht zunimmt, führt dies zu einer zusätzlichen Repression der *PORA*- und *PORB*-Expression in den frühen Morgenstunden [160]. Ein weiterer Regulator von *PORA* ist REVEILLE1 (RVE1), ein Myb-ähnlicher, circadian-regulierter Transkriptionsfaktor [161]. RVE1 induziert die *PORA*-Expression durch direkte Interaktion zu dessen Promoter [161]. Eine fehlende Induktion der *PORA*-Expression, wie beispielsweise in Arabidopsis *rve1 knockout*-Linien führte zu einer reduzierten Ergrünungsrate der betroffenen Mutante, während eine gesteigerte Induktion der *PORA*-Expression in der *RVE1*-Überexpressionslinie eine schnellere Ergrünung im Vergleich zum Wildtyp hervorrief [161].

1.5.2.2. Posttranslationale Kontrolle

Die Stabilität und Aktivität von POR wird zum einen durch posttranslationale Modifikationen (PTM), zum anderen durch Interaktion zu verschiedenen Proteinen beeinflusst. Darüber hinaus ist POR eine wichtige Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes (Abschnitt 1.5.1.2.3).

1.5.2.2.1. Posttranslationale Modifikationen von POR

Die reversible Übertragung eines Phosphatrestes auf spezifische Aminosäuren ist eine der am besten charakterisierten PTM in Pflanzen. Mittels Phosphoproteomanalysen, welche auf Massenspektrometrie und Peptid-Microarrays basierten, wurde eine Phosphorylierungsstelle im aminoterminalen Bereich der *PORB*-Sequenz identifiziert [162]. *In vitro* kann die Phosphorylierung von *PORB* den POR-PChlid-NADPH-Komplex in isolierten Etioplastenmembranen stabilisieren, während die Dephosphorylierung von *PORB* die Auflösung dieses Komplexes induziert [163]. Die Relevanz der Phosphorylierung *in planta* konnte bisher allerdings nicht

zweifelsfrei geklärt werden. Darüber hinaus ist PORC ein Ziel für Lysin-Methylierung [164]. Die Analyse der Methylierungsstelle ergab, dass diese aus der Oberfläche der PORC-Struktur herausragt und somit zugänglich für putative Methyltransferasen ist [164]. Die physiologische Funktion der Methylierung ist allerdings unbekannt. Weiterhin wurde die S-Nitrosylierung von Cysteinen innerhalb der PORB-Sequenz nachgewiesen [165]. Mutanten mit reduzierter S-Nitrosoglutathion-Reduktase und somit erhöhtem Gehalt an nitrosylierter PORB bildeten in Folge einer potenziell verringerten POR-Aktivität Chlorosen aus [165]. In Übereinstimmung damit verursache eine erhöhte Nitrosylierung von PORB während der Etiolierung, welche durch die Behandlung von Keimlingen mit Natrium-Nitroprussid ausgelöst wurde, in *Hordeum vulgare* und *Arabidopsis* die Anreicherung von PChlid [166]. Die beiden vorhergesagten Nitrosylierungsstellen von PORA und PORB befinden sich an der Proteinoberfläche, wodurch die Nitrosylierung die Bindung von PChlid inhibieren oder die Ausbildung von Dimeren und Oligomeren verhindern könnte [166].

1.5.2.2.2. Stabilisierung von POR durch LIL3

LIGHT-HARVESTING-LIKE 3 (LIL3) wurde als wichtiger Interaktionspartner für alle drei in *Arabidopsis* vorhandenen POR-Isoformen identifiziert [113]. LIL3 gehört zur LHCP-Superfamilie und verfügt über zwei transmembrane Helices, welche beide das LHCP-charakteristische Chlorophyll-Bindemotiv aufweisen. In *Arabidopsis* sind zwei LIL3-Isoformen (LIL3.1 und LIL3.2) bekannt, deren Funktionen partiell redundant sind [167]. Ein Fehlen beider LIL3 Isoformen, wie beispielsweise in der *lil3.1 x lil3.2* Doppelmutante oder einer *LIL3.1 LIL3.2 Virus induced gene silencing* (VIGS) Linie, führt zu einer drastischen Reduktion des POR Proteingehalts und infolgedessen zur Inhibierung der Chlorophyllsynthese [113, 168]. Neben dem stabilisierenden Einfluss auf POR besitzt LIL3 *in vitro* eine hohe Affinität zu PChlid und agiert möglicherweise als lokaler Speicher für dieses Intermediat [113]. Darüber hinaus könnte die Anlieferung von PChlid durch LIL3 die Akkumulation des ungebundenen Intermediats verhindern [113]. Durch das enthaltene Chlorophyll-Bindemotiv ist LIL3 ebenfalls in der Lage, Chlorophylle zu binden [169]. LIL3 agiert außerdem als Membrananker der Geranylgeranyl Reduktase (CHLP) und gewährleistet so die Funktionalität dieses Enzyms [168, 170]. Aus diesem Grund liegt in der *lil3.1 x lil3.2* Doppelmutante kaum phytyliertes Chlorophyll vor [168]. Da sowohl POR als auch CHLP die Substrate für CHLG anliefern, wird durch die Interaktion zu LIL3 der Fluss der Intermediate sowie die Synthese von Chlorophyll reguliert [113].

1.5.2.2.3. Stabilisierung von POR durch CPP1

Ursprünglich wurde CELL GROWTH DEFECT FACTOR 1 (CDF1) als Faktor für die Induktion des programmierten Zelltods in *Arabidopsis* identifiziert [171]. In weiterführenden Analysen zeigte sich, dass CDF1 ein Chaperon von POR ist, was zur Umbenennung des Proteins in CHAPERONE OF POR-PROTEIN 1 (CPP1) führte [172]. CPP1 gehört zur Familie der DnaJ-ähnlichen Proteine, welche häufig als Co-Chaperone agieren [173]. CPP1 konnte in allen oxygenen Photosynthesebetreibenden Organismen nachgewiesen werden und weist stets mehrere transmembrane Helices auf, wodurch es ein integraler Bestandteil der plastidären Membranen ist [172, 174]. Der *knockout* von *CPP1* in *Arabidopsis* hemmt die Embryonalentwicklung ab dem globulären Stadium und verhindert die Ausbildung lebensfähiger Keimlinge [175]. Aufgrund der Embryoletalität wurde die Funktion von CPP1 in adultem Gewebe mittels diverser Silencing-Ansätze in *Ara-*

bidopsis thaliana und *Nicotiana benthamiana* charakterisiert. In beiden Organismen löste die Reduktion von *CPP1* die Bildung von Chlorosen aus, welche durch die Destabilisierung von POR verursacht wurden [172]. Weitere Interaktionsstudien verifizierten, dass CPP1 direkt mit PORA und PORB interagiert und diese Enzyme vor Aggregation vor allem unter Bedingungen, welche hohen oxidativem Stress verursachen, schützt [172, 174]. Diese Ergebnisse untermauerten die Relevanz von CPP1 als Holdase von POR und damit für die Aufrechterhaltung der geregelten TBS. Interessanterweise verfügen monokotyle Pflanzen über zwei CPP1 Isoformen [174]. Die Duplikation des *CPP1*-Gens scheint hierbei ein spezifisches Charakteristikum von Gräsern zu sein. In *Oryza sativa* besitzen beiden Isoformen eine vergleichbare funktionelle Aktivität, unterscheiden sich allerdings hinsichtlich ihres Expressionsmusters [174]. So ist eine Isoform abundanter in frühen Entwicklungsstadien, während die andere vor allem in adultem, photosynthetisch aktivem Gewebe nachgewiesen werden konnte [174].

1.5.2.2.4. Stabilisierung von POR durch Pitt

In Hochdurchsatz Hefe-2-Hybrid Analysen, welche auf *Synechocystis* cDNA basierten, wurde ein weiterer Interaktionspartner von POR ausfindig gemacht [176]. Das durch *slr1644* kodierte Protein gehört zur Familie der TPR-Proteine, woraus sich die Bezeichnung des neuen Faktors als POR-INTERACTING TPR-Protein (Pitt) ableitet. Die Interaktion zwischen POR und Pitt wurde durch Co-Migration in *Synechocystis* Membranfraktionen bestätigt [177]. In *Synechocystis pitt* Zelllinien ist POR stark destabilisiert und infolgedessen ist die Chlid-Konzentration reduziert [177]. Durch eine aminoternale Transmembranhelix ist Pitt in den plastidären Membranen verankert und unterstützt so die subzelluläre Lokalisation von POR, was wiederum die Stabilität des Enzyms beeinflusst [177, 178]. Darüber hinaus co-migrierte Pitt mit dem unprozessierten D1-Vorläuferprotein (*precursor of D1*; pD1), welches im Plastiden kodiert ist und co-translational in die Thylakoidmembranen integriert wird [178]. Die Stabilität von D1 ist dabei abhängig vom Vorhandensein von Chlorophyll [179]. Die Interaktion zwischen Pitt, POR und pD1 liefert somit einen Ansatz auf die Frage, wie die Synthese von Chlorophyll und die Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten miteinander koordiniert sind. Pitt könnte hierbei für die räumliche Nähe beider Prozesse verantwortlich sein und so die Integration der Chlorophylle in die Apoproteine der photosynthetischen Kern- und Antennenkomplexe begünstigen (Abb. 1.11) [178]. In *Synechocystis* findet dieser Prozess in einem definierten Bereich zwischen der Plasma- und Thylakoidmembran statt, welcher als Prata-definierten Membran (Abschnitt 1.6.4.1) bezeichnet wird und in höheren Organismen nicht nachgewiesen werden konnte [180]. Bislang wurde Pitt nur in *Synechocystis* identifiziert, sodass unklar ist, ob und wie Pitt in höheren Pflanzen die Chlorophyllbiosynthese und -integration koordiniert.

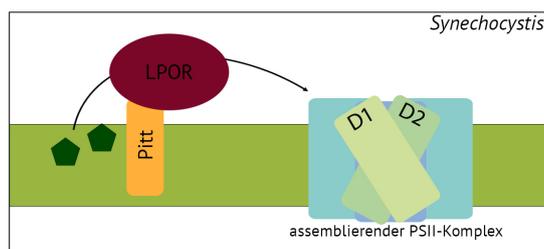


Abbildung 1.11. – Schematische Darstellung der postulierten Funktionsweise von Pitt in *Synechocystis*. Durch die Interaktion zu Pitt wird POR an der Prata-definierten Membran stabilisiert und begünstigt dort die Integration von Chlorophyllen in die entstehenden PSII-Komplexe.

1.6. *Tetratricopeptide Repeat* Proteine

1.6.1. Tandem-Repeat-Proteine - Eine Übersicht

Tandem-Repeat-Proteine enthalten per Definition eine sich mindestens zweimal wiederholende Peptid-Sequenz, wobei die repetitiven Motive direkt aneinander anschließen [181]. Phylogenetische Analysen zeigten, dass die Zahl der vorhergesagten Tandem-Repeat-Proteine in einem Genom mit steigender Komplexität des Organismus zunimmt [181, 182]. Während in Archaeen nur ca. 0,79 % aller Proteine als Repeat-Proteine eingeordnet werden können, liegt die Zahl in Bakterien bei 1,05 % [182]. In Eukaryoten gibt es eine deutliche Diskrepanz zwischen tierischen (5,31 %) und pflanzlichen Organismen (2,20 %) [182]. Neben der steigenden Gesamtanzahl an Repeat-Proteinen pro Organismus nimmt auch die Anzahl der repetitiven Sequenzen pro Protein in Eukaryoten zu. Die Duplikation einer bereits vorhandenen Sequenz scheint hierbei eine evolutionär wiederholt auftretende, unkomplizierte Möglichkeit zu sein, das zelluläre Repertoire zu erweitern. Interne Duplikationen finden für gewöhnlich in der Mitte des betroffenen Proteins statt [183]. Auffällig ist außerdem, dass die Repeat-Domäne zumeist durch ein einziges Exon kodiert wird [183]. Der modulare Aufbau der Repeat-Proteine sowie das Potenzial, durch interne Duplikation der Sequenz die Funktionalität des Proteins zu regulieren, ermöglicht eine schnellere Anpassung an neue Umgebungen. *In silico* und *in vitro* Analysen von artifiziellen TPR-Proteinen unterstrichen den direkten Zusammenhang zwischen der Motiv-Anzahl und der thermodynamischen Stabilität dieser Proteine [184, 185]. Das repetitive Peptid-Motiv besteht im Durchschnitt aus 20 und 40 Aminosäuren [186]. Die jeweiligen Motive weisen in den meisten Fällen eine relativ einfache Faltung auf, welche aus zwei durch eine Querverbindung verknüpften Sekundärstrukturen besteht. Die Wiederholung dieser Faltung führt zur Ausbildung einer linearen Struktur, in welcher die einzelnen Motive um eine gemeinsame Achse arrangiert sind [182, 187]. Die Tertiärstruktur faltet sich dabei unabhängig von der Motivanzahl und dem Vorhandensein von weiteren Domänen [187]. Diese Faltung bildet eine ausgedehnte, der löslichen Phase zugängliche Oberfläche, welche als ideale Plattform für die Interaktion von Biomolekülen fungiert [182, 186]. Die bekanntesten Vertreter der über 20 Klassen der Repeat-Protein-Superfamilie sind Armadillo-Repeats, Ankryin-Repeats, *pentatricopeptid repeats*, TPRs, Leucin-reiche Repeat Motive und WD40-Proteine [187].

1.6.2. TPR-Proteine - Aufbau und Struktur

Etwa 81 % aller Repeat-Peptide setzen sich aus einer komplexen Komposition von Aminosäuren zusammen, welche eine degenerierte Proteinsequenz bilden [181]. Innerhalb dieser Gruppe verfügt das 34 Aminosäuren-lange TPR-Motiv über die am stärksten konservierte Konsensussequenz. Große und hydrophobe Aminosäuren sind bevorzugt an den Positionen 4, 7, 11 und 24 zu finden, während an den Positionen 8, 20 und 27 überwiegend kleine Aminosäuren vorliegen (Abb. 1.12A) [182, 188, 189]. An Position 32 der repetitiven Sequenz liegt häufig ein strukturbrechendes Prolin vor (Abb. 1.12A) [182, 188, 189]. Die Peptidsequenz faltet sich meistens in zwei, seltener in drei amphipathische, antiparallele Alphahelices (Abb. 1.12B) [182, 189].

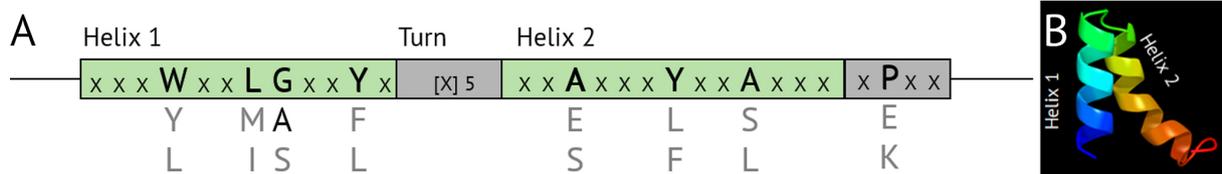


Abbildung 1.12. – Struktur und Faltung des TPR-Motivs. (A) Schematische Darstellung der 34 Aminosäuren langen TPR-Konsensussequenz. An spezifischen Positionen innerhalb der Peptid-Sequenz liegen einige Aminosäuren präferiert (schwarz) gegenüber anderen (grau) vor, während für andere Positionen keine Präferenzen bekannt sind (X). Die Primärstruktur der TPRs faltet in den meisten Fällen in zwei antiparallele Alphahelices (grün), welche durch Querverbindungen (grau) miteinander bzw. mit anschließenden Motiv verbunden sind. (B) Vorhergesagte Faltung eines exemplarischen TPR-Motivs, welches durch den Phyr2-Server modelliert wurde (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Als Ausgangssequenz für diese Vorhersage wurde die Aminosäuresequenz des ersten TPR-Motivs von At1g78915 (TPR1) verwendet.

In Arabidopsis enthalten ca. 70 % aller TPR-Proteine zwischen drei und sechs TPR-Motive, wobei der Anteil von Proteinen mit drei Motiven überwiegt (40 %) [190]. Allerdings wurden in Arabidopsis auch Proteine mit bis zu 16 Motiven identifiziert [190]. Grundsätzlich gibt es kaum Limitationen bei der Anzahl der Wiederholungen. In Archaeen wurden zum Beispiel TPR-Proteine, welche aus über 50 Motiven bestehen, vorhergesagt [190]. Die Repetition des TPR-Motivs führt zur Ausbildung einer rechtsgängigen Superhelix (Alpha-Solenoid) mit großer Oberfläche [191]. Die konvexen und konkaven Krümmungen dieser Helix bilden dabei eine ideale Plattform für die Interaktionen mit Biomolekülen [192]. Durch die hohe Flexibilität der Struktur, welche durch die gestreckte Faltung hervorgerufen wird, ist ein elaborierter Faltungsapparat für die korrekte Faltung der Alpha-Solenoids nötig [191]. Aus diesem Grund ist der Anteil an Alpha-Solenoids in Eukaryoten wesentlich höher als in Bakterien und Archaeen [191]. Die TPR-Proteine nehmen dabei eine Sonderstellung ein. Durch die geringe Motiv Anzahl sind TPR-Proteine deutlich kürzer als durchschnittliche Alpha-Solenoid-Proteine, wodurch die Faltung von TPR-Proteinen auch durch einen wenig entwickelten Faltungsapparat gewährleistet werden kann [191]. Unabhängig davon zeigen TPR-Proteine die für Alpha-Solenoids übliche flexible und vielseitige Faltung. Beispielsweise hatte die Insertion einer 16 Aminosäuren langen Sequenz in die TPR-Domäne des cytosolischen Faktors p67^{phox} aus *Homo sapiens* keinen Einfluss auf die Faltung der TPR-Domäne [193]. Darüber hinaus bestimmt die Aminosäure-Zusammensetzung der einzelnen TPR-Motive, vor allem im Bereich der Querverbindungen, die spezifische Drehung und Krümmung der Superhelix, welche wiederum die Stabilität und Erreichbarkeit der einzelnen Bindetaschen prägt [190, 194].

1.6.3. TPR-Proteine - Liganden und Interaktionspartner

Wie alle Alpha-Solenoids stabilisieren TPR-Proteine vorrangig Protein-Protein-Interaktionen innerhalb einer kurzen Reichweite [195]. Darüber hinaus wurden auch Nukleinsäuren und in selteneren Fällen Lipide als Interaktionspartner bestätigt [191]. Die TPR-Domäne bildet hierbei keine einzelne, ausgedehnte Interaktionsplattform, sondern verfügt über mehrere Bindetaschen, sodass zeitgleich verschiedene Interaktionen vermitteln werden können [190]. Obwohl postuliert wurde, dass jedes TPR-Motiv für die spezifische Bindung eines Interaktionspartners zuständig ist, fehlen detailliertere Studien hierzu [194]. Die elektrostatische Natur, die Hydrophobizität und Größe der Aminosäurereste in den einzelnen Bindetaschen bestimmen die Spezifität der Interaktionen [194]. Die interagierenden Proteine zeigen dabei eine hohe Variabilität im Hinblick auf die Struktur und Konformation.

Eine Vielzahl der bereits identifizierten Liganden weisen jedoch eine *coiled extended* oder alpha-helikale Faltung auf [194]. Es sind einige Beispiele bekannt, in denen TPR Homo-Oligomere die Stabilität größerer Protein-Komplexe vermitteln, wie im Falle des Anaphase-Promoting Komplexes [196]. Allerdings agieren TPR-Proteine zumeist als Monomere [197].

1.6.4. TPR-Proteine in Photosynthese-betreibenden Organismen

Innerhalb der Tandem-Repeat-Superfamilie verfügt die TPR-Familie über die am stärksten konservierte Konsensussequenz. Da TPR-Proteine darüber hinaus bereits in vielen Prokaryonten zu finden ist, wird angenommen, dass es sich bei der TPR-Proteinfamilie um die älteste Familie der Repeat-Proteine handelt [190, 198]. Bereits 80,73 % (88/109) aller untersuchten Archaeen verfügen über mindestens ein TPR-Protein, während dies in Bakterien auf 96,42 % (970 /1007) aller untersuchten Spezies zutrifft [199]. Darüber hinaus wurde in jedem analysierten eukaryontischen Organismus mindestens ein TPR-Protein nachgewiesen [199].

Wie erwartet nimmt auch in Photosynthese-betreibenden Organismen die Anzahl der TPR-Proteine pro Organismus mit steigender zellulärer Komplexität zu (Abb. 1.13A). In Prokaryonten wie dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 und dem Archeon *Halobacterium* wurden jeweils 29 bzw. lediglich ein einziges TPR-Protein vorhergesagt. In *Chlamydomonas reinhardtii* liegt die Zahl der TPR-Proteine bereits bei 100 [197]. Für höhere Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* wurden jeweils 141 bzw. 259 TPR-Proteine *in silico* identifiziert [197]. Auffällig war hierbei, dass sich die Anzahl der potenziell plastidär lokalisierten Proteine zwischen *Chlamydomonas* (20) und *Arabidopsis* (21) kaum verändert [197]. Die bereits charakterisierten plastidären TPR-Proteine sind zumeist am Proteinimport, in der Genexpression, der Chlorophyllbiogenese sowie der Assemblierung und Erhaltung der photosynthetischen Untereinheiten beteiligt [197] (Abb. 1.13B).

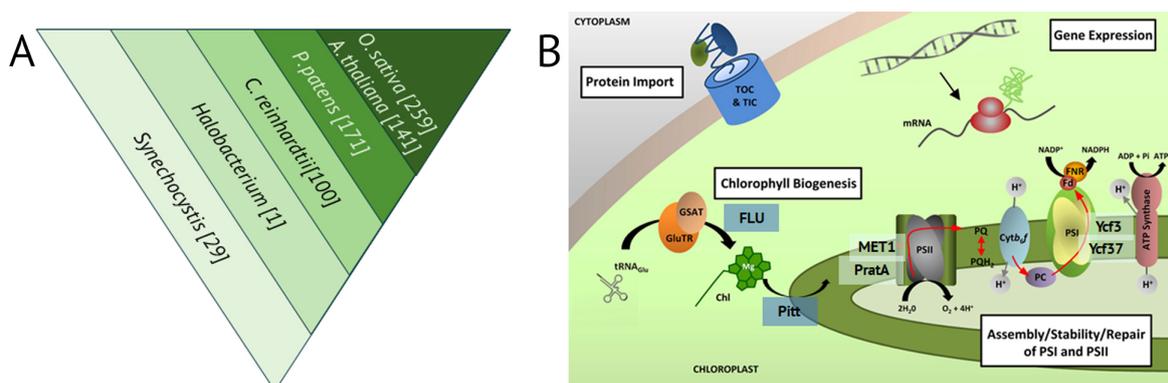


Abbildung 1.13. – TPR-Proteine in Photosynthese-betreibenden Organismen. (A) Übersicht über die vorhergesagte Gesamtanzahl der TPR-Proteine in den Modellorganismen *Synechocystis* sp. PCC 6803; *Chlamydomonas reinhardtii*; *Physcomitrella patens*; *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* sowie einem Vertreter der Archeen (*Halobacterium*). (B) Für verschiedene plastidäre TPR-Proteine wurde eine Funktion in der Chlorophyllbiosynthese (blau unterlegt) sowie der Biogenese der photosynthetischen Untereinheiten (grau unterlegt) identifiziert. Die Abbildung wurde aus Bohne *et al.* entnommen und modifiziert [197].

1.6.4.1. An der Assemblierung der Photosysteme beteiligte TPR-Proteine

Jeweils zwei plastidäre TPR-Proteine wurden als Assemblierungsfaktoren sowohl für PSI (YCF3 und YCF37) als auch PSII (MET1 und Prata) identifiziert (Abb. 1.13B). YCF3 interagiert direkt mit den PSI-Kernuntereinheiten PsaA und PsaD und fungiert als Chaperone des heterodimeren Reaktionszentrums [200, 201]. *Nicotiana tabacum ycf3 knockout*-Linien enthielten keinerlei assembliertes PSI und waren lediglich auf Zucker-supplementiertem Medium überlebensfähig. Da YCF3 ein spezifischer Assemblierungsfaktor für PSI ist, lagen alle weiteren Komponenten der Elektronentransportkette unverändert in den Thylakoidmembranen vor [202]. Die Sequenz der drei YCF3 TPR-Motive ist in Photosynthese-betreibenden Organismen konserviert [200]. Punktmutationen innerhalb des zweiten und dritten TPR-Motivs in *Synechocystis* inhibierten das photoautotrophe Wachstum und erhöhten die Sensitivität der Zellen gegenüber hohen Lichtintensitäten [200]. Naver *et al.* vermuteten, dass die drei TPR-Motive von YCF3 für die spezifische Interaktion zu weiteren PSI-Assemblierungsfaktoren verantwortlich sein könnten [200]. YCF37 ist hingegen an der Stabilisierung des PsaK-losen PSI-Komplexes (PSI^{*}) und der Biogenese der PSI-Trimere in *Synechocystis* beteiligt [203]. Selbiges trifft auf das YCF3-Ortholog in *C. reinhardtii* zu, welches PSI vor allem während oxidativem Stress stabilisiert [204]. Im Kontrast dazu ist das YCF3-Ortholog PALE YELLOW GREEN7 (PYG7) in *Arabidopsis* existenziell, da *pyg7 knockout*-Linien nicht zu photoautotrophem Wachstum fähig sind [205]. In *pyg7 RNAi*-Linien bildet sich zwar das PsaA/PsaB Heterodimer aus, die nachfolgenden Assemblierungsschritte sind jedoch inhibiert [206]. Vergleichbar zu YCF3 besitzt YCF37 drei konservierte TPR-Domänen, welche die Bindung zu weiteren PSI-Untereinheiten vermitteln [197, 205].

Das TPR-Protein PROCESSING ASSOCIATED TPR PROTEIN A (Prata) ist an der C-terminalen Prozessierung von D1 beteiligt und interagiert direkt mit pD1 [207, 208]. Die Interaktion zwischen Prata und pD1 findet in *Synechocystis* im Übergang von der Plasmamembran zu den Thylakoidmembranen statt. Dieser Bereich wird aufgrund des hohen Prata-Gehalts als Prata-definierte Membran (PDM) bezeichnet [208]. In der PDM finden die initialen Schritte der PSII-Assemblierung statt, weswegen in diesem Bereich pD1, verschiedenen Assemblierungsfaktoren sowie Chl_d in großen Mengen vorliegen [178, 209]. Die TPR-Domäne von Prata ist mit den 9 identifizierten TPR-Motiven deutlich länger als der Durchschnitt der TPR-Proteine [197]. Das in *Arabidopsis* postulierte Prata Ortholog LOW PSII ACCUMULATION 1 (LPA1) interagiert zwar ebenfalls direkt über die enthaltene TPR-Domäne mit D1, allerdings ist diese mit zwei TPR-Motiven kürzer als die Prata TPR-Domäne [197, 210]. In *lpa1*-Mutanten ist die D1/D2-Synthese inhibiert, infolgedessen verbleiben lediglich 20 % der PSII-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp [210]. Trotz der vergleichbaren Funktionalität ist fraglich, ob LPA1 tatsächlich das Prata-Ortholog in höheren Pflanzen ist [210]. MESOPHYLL-ENRICHED THYLAKOID PROTEIN 1 (MET1) ist ein weiterer PSII-Assemblierungsfaktor mit TPR-Domäne, welcher *in vitro* direkt mit CP43 und CP47 interagiert [211]. *Arabidopsis met1*-Linien sind vor allem unter fluktuierenden Lichtbedingungen nicht in der Lage, PSII-Superkomplexe auszubilden und akkumulieren infolgedessen unassembliertes CP43 [211]. Die beiden in MET1 enthaltenen TPR-Domänen sind dabei an der Bindung von CP43 und CP47 beteiligt [211]. Aufgrund der Sensitivität gegenüber fluktuierendem Licht postulierten Bhuiyan *et al.*, dass MET1 während der *de novo* Synthese sowie der Reparatur von PSII die internen Antennen CP43 und CP47 stabilisiert. Dadurch würde MET1 die Assemblierung des PSII-Kernkomplexes und -Dimers unterstützen [211].

1.6.4.2. An der Chlorophyllbiosynthese beteiligt TPR-Proteine

Für mehrere Vertreter der TPR-Proteinfamilie wurde eine Funktion in der Chlorophyllbiosynthese und Chloroplastenbiogenese identifiziert. Eines dieser TPR-Proteine ist SLOW GREEN 1 (SG1). In einer durch EMS-Mutagenese erzeugten *sg1*-Linie weisen die Rosettenblätter zu Beginn ihrer Entwicklung einen stark reduzierten Chlorophyllgehalt auf, welcher mit einer gestörten Chloroplastenbiogenese einhergeht [212]. Diese Störung wird dabei durch eine veränderte Genexpression der kern- und plastidenkodierten RNA-Polymerasen sowie weiterer kernkodierter Gene hervorgerufen [212]. Die genaue Funktion von SG1 konnte bislang nicht aufgeklärt werden, allerdings postulieren Hu *et al.*, dass SG1 an der Synthese oder dem Abbau von Proteinen beteiligt sein könnte [212]. Dabei spielt möglicherweise auch die retrograde Signalgebung eine Rolle, da die Kreuzung von *sg1* und *gun4* den SG1-Phänotyp partiell supprimierte und die gestörte Genexpression zumindest teilweise wiederherstellte [212]. Inwiefern SG1 den GUN-vermittelten Signalweg beeinflusst ist bislang allerdings unbekannt. Die beiden an der Regulation der Chlorophyllbiosynthese beteiligten TPR-Proteine FLU und Pitt wurden bereits an anderer Stelle vorgestellt (Abschnitt 1.5.1.2.3 und 1.5.2.2.4). Hierbei ist zu bemerken, dass es sich bei FLU um ein untypisches TPR-Protein handelt, da die drei TPR-Motive aus jeweils 40 Aminosäuren, anstatt der üblichen 34, bestehen [144]. Die bereits charakterisierten plastidären TPR-Proteine unterstreichen die große Bedeutung dieser Proteinfamilie für die Regulation der Chlorophyllbiosynthese und Chloroplastenbiogenese.

1.7. Etiolierung und Deetiolierung

In Angiospermen kann die Ausbildung von grünen Kotyledonen in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase wird als Skotomorphogenese oder Etiolierung bezeichnet und findet vor der lichtinduzierten Entwicklung statt. In dieser Phase sind Keimlinge durch ein schnell wachsendes Hypokotyl, die Ausbildung eines apikalen Hackens sowie komprimierten, gelblichen Kotyledonen gekennzeichnet. Auf molekularer Ebene ist die Etiolierung durch die Ausbildung des Prolamellarkörpers (*prolamellar body*; PLB) charakterisiert. Die zweite Phase wird durch Licht induziert und als Photomorphogenese bzw. Deetiolierung bezeichnet. Während dieser Phase wird das Hypokotylwachstum inhibiert und es bilden sich geöffnete, grüne Kotyledonen aus. Auf molekularer Ebene erfolgt die Umwandlung des PLBs zu Thylakoidmembranen.

1.7.1. Aufbau und Funktion des Prolamellarkörpers

Der PLB bezeichnet eine parakristalline Struktur mit hexagonaler Symmetrie, welche in Etioplasten von Angiospermen vorliegt. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass dieser aus untereinander verbundenen, tetraedrischen Tubuli aufgebaut ist [213](Abb. 1.14). Hauptbestandteile des PLBs sind die plastidären Lipide Monogalactosyldiacylglycerin (MGDG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) sowie POR [214]. Faktisch macht POR zwischen 90 - 95 % der Gesamtproteinmasse des PLBs aus [215]. Die TBS ist während der Etiolierung größtenteils inaktiv, sodass lediglich PChlid in nachweisbaren Mengen vorliegt [214, 216]. Eng mit dem PLB verbunden sind die ersten lamellenförmigen, thylakoidalen Strukturen. Diese sogenannten Prothylakoide haben eine zum PLB vergleichbare Zusammensetzung, unterscheiden sich allerdings durch einen erhöhten DGDG-Anteil und einen geringeren POR-Gehalt [214].

Mittels Tieftemperatur-(77K)-Fluoreszenzanalysen wurden insgesamt vier verschiedene PChlid-Spezies mit unterschiedlichen Fluoreszenzmaxima in etiolierten Keimlingen nachgewiesen: PChlid_{633 nm}, PChlid_{645 nm}, PChlid_{657 nm} und PChlid_{670 nm} [217]. Die verschiedenen Fluoreszenzmaxima und deren Veränderungen unter Belichtung ermöglichten die funktionelle Charakterisierung der einzelnen PChlid-Spezies [218]. Ungebundenes PChlid, welches hauptsächlich in den Prothylakoiden vorliegt, emittiert Licht bei 633 nm und ist nicht photoreduzierbar [217, 218]. PChlid_{645 nm} entspricht dem monomeren POR-PChlid-NADPH-Komplex. Dieser führt lediglich während längerer Belichtung zur Synthese von Chlid [217, 218]. Die Oligomerisierung dieses POR-Chlid-NADPH-Komplexes löst die Fluoreszenz von PChlid bei 657 nm aus. PChlid_{657 nm} macht hierbei den Hauptanteil des PLBs aus. Das in den Oligomeren gebundene, photoaktive PChlid wird innerhalb von 3 - 400 Pikosekunden zu Chlid reduziert [217–219]. Bei PChlid_{670 nm} handelt es sich höchstwahrscheinlich um die zufällig assoziierte bzw. aggregierte Form des Intermediats [218]. Der Gehalt an photoaktivem PChlid steht in direktem Zusammenhang zum POR-Gesamtproteingehalt [220, 221]. Sowohl PORA als auch PORB sind am Aufbau des PLBs beteiligt, wobei das Verhältnis beider Isoformen zueinander weniger entscheidend ist als angenommen [220, 221]. Dies führt in etiolierten Arabidopsis *porA* und *porB knockdown*-Keimlingen zu einem reduzierten Anteil an photoaktivem PChlid, während der Gesamtgehalt an PChlid weniger beeinträchtigt ist [111, 220–222]. Eine weitere wichtige Komponente für die Ausbildung von photoaktivem PChlid ist MGDG. Ein reduzierter MGDG-Gehalt, welcher durch eine Reduktion der plastidären MGDG-Synthase 1 (MDG1) ausgelöst wurde, hatte zwar keinerlei

Auswirkungen auf den Gesamtgehalt an PChlid, verminderte allerdings die PChlid_{657 nm} Emission [223]. Infolgedessen war die membranassoziierte Synthese von Chlid in *mgd1*-Mutanten während der Deetiolierung inhibiert [223]. Eine Destabilisierung des oligomeren POR-PChlid-NADPH-Komplexes verursacht somit eher die Reduktion von photoaktivem PChlid als eine Verringerung des PChlid-Gesamtgehalts.

Drei mögliche Funktionen des PLBs in Angiospermen werden diskutiert: (1) Der PLB dient der Speicherung von Lipiden und Proteinen, um eine schnelle Ergrünung zu gewährleisten [224]. (2) Der PLB verhindert die Produktion von ROS, welche durch ungebundenes PChlid ausgelöst werden könnten, und reduziert somit dessen negativen Einfluss auf die Deetiolierung [224, 225]. (3) Der PLB ist Voraussetzung für die Bildung des POR-Chlid-NADPH Quencher-Komplexes, welcher die PSII-Assemblierung aktiviert und die geordnete Synthese von Chlorophyll gewährleistet [224, 226]. Das Fehlen dieses Quencher-Komplexes, wie beispielsweise nach einer sehr langen Etiolierungsphase, führt zur Bildung von ROS und zu einer verzögerten Ergrünung [122].

1.7.2. Die Ausbildung der thylakoidalen Membranen

In der Phase der Photomorphogenese wird der PLB innerhalb von wenigen Stunden, bis maximal einem Tag, aufgelöst (Abb. 1.14). In dieser Zeit erfolgt die geordnete Einlagerung von Pigmenten, Lipiden und Proteinen in die entstehenden Thylakoidmembranen [227]. Die Ausbildung der Thylakoidmembranen findet dabei in mehreren Stufen statt, die je nach Organismus zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer ins Licht eintreten. Zu Beginn dissoziiert die kompakte Struktur des PLBs und eine Vielzahl von porösen, lamellenartig angeordneten Prothylakoiden wird gebildet (Abb. 1.14) [213]. Anschließend lagern sich diese porösen Lamellen parallel zueinander an und bilden Verbindungen untereinander aus. Am Ende der ersten Belichtungsphase liegen bereits einzeln gestapelte, nicht länger poröse Bithylakoide vor [213, 228]. Im letzten Schritt bilden sich die Grana-Stapel aus, deren Komplexität mit der Zeit zunimmt [213]. Die Insertion der photosynthetischen Untereinheiten und die Assemblierung dieser in Komplexe ist dabei unabdingbar für die korrekte Ausbildung der Thylakoide.

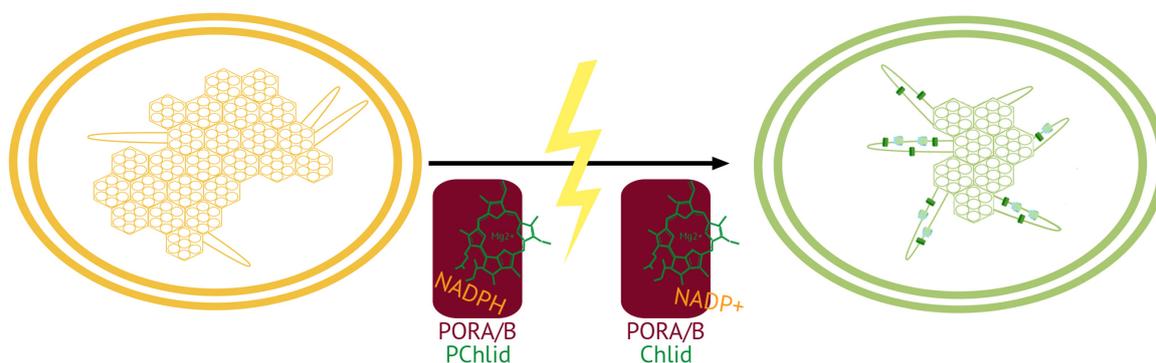


Abbildung 1.14. – Veränderungen des PLBs im Übergang zwischen Skoto- und Photomorphogenese. Der Etioplast ist charakterisiert durch den parakristallinen Prolamellarkörper, welcher vor allem aus dem ternären POR-PChlid-NADPH-Komplex und Lipiden besteht. Dieser Komplex gewährleistet die Photoreduktion von PChlid zu Chlid innerhalb von Pikosekunden. Das aus Chlid synthetisierte Chlorophyll wird in die naszierenden photosynthetischen Untereinheiten eingelagert und fördert so deren Stabilität und die Ausbildung der Thylakoidmembranen.

Sowohl die Lipidsynthese als auch der Import der kernkodierte, plastidenlokalisierte Proteine findet an der Hüllmembran statt. Somit müssen diese Komponenten zuerst durch das wässrige Milieu des Stromas zu den entstehenden Thylakoidmembranen transportiert werden, was vor allem bei hydrophoben Molekülen eine Herausforderung darstellt. Diese Barriere kann unter anderem durch den vesikelvermittelten Transportweg überwunden werden [229, 230]. Obwohl der genaue Mechanismus dieses Transports größtenteils unbekannt ist, sind einige beteiligte Proteine bekannt, welche eine Auswirkung auf die Abundanz von stromalen Vesikeln haben. Zu diesen Proteinen zählen VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS 1 (VIPP1), CURVATURE THYLAKOID (CURT) sowie verschiedene GTPasen [229, 230]. Eine gestörte Induktion oder Fusion von plastidären Vesikeln kann dabei die Ausbildung der Thylakoidmembranen inhibieren. Beispielsweise konnten in *vipp1 knockdown*-Linien lediglich unregelmäßige und ungestapelte Lamellen, anstatt Granastapeln, nachgewiesen werden [231]. Membranintegrale Bestandteile wie Chlorophylle und Carotinoide aggregierten dabei in globulären oder membranösen Strukturen im Stroma [231]. Bisher wurde lediglich LHCB als direktes Zielprotein und Transportgut des vesikelvermittelten Transports identifiziert [232]. Die Protein-Disulfid-Isomerase SNOWY COTYLEDON 2 bindet LHCB in den sich ausbildenden Vesikeln und fördert so die Translokation von LHCB zu den entstehenden Thylakoidmembranen [232]. Da *snowy cotyledon 2*-Linien chlorotische Kotyledonen ausbildeten, während adulte Blätter wildtypartig waren, wird vermutet, dass der vesikelvermittelte Transportweg vor allem während der Deetiolerung eine Rolle spielt [232]. Ein Grund dafür ist, dass die Translokation von LHCB in adulten Blättern hauptsächlich durch cpSRP43 und cpSRP54 erfolgt [156, 232]. Die SRP-Komponenten binden die importierten LHCPs hierbei posttranslational und bilden einen transienten stromalen Komplex aus, welcher anschließend an die Thylakoidmembran transloziert wird [156, 233]. An der Thylakoidmembran angelangt, interagiert dieser transiente Komplex mit dem SRP-Rezeptor FtsY und der Translokase ALBINO3 (ALB3), welche die LHCPs in die Membran integrieren [234–237]. Darüber hinaus vermittelt die Interaktion zwischen cpSRP54 und cpSecY1, einer Untereinheit der sekretorischen Translokase, die co-translationale Integration der plastidenkodierte photosynthetischen Untereinheiten [238]. Während dieses Prozesses erfolgt außerdem die Insertion von Chlorophyllen [179]. In *Arabidopsis* wird diese Integration im Falle von D1 potenziell durch die ONE-HELIX-PROTEINE 1 und 2 (OHP1 und 2) vermittelt [179, 239]. In Übereinstimmung damit ist in *OHP1* und *OHP2* VIGS-Linien die *de novo* Synthese von D1 stark inhibiert und PSII destabilisiert [239]. Während der gesamten Deetiolerung ist die adäquate Bereitstellung von TBS-Intermediaten essentiell für die Assemblierung von PSI und PSII, da die Einlagerung von Chlorophyllen die Stabilität der photosynthetischen Untereinheiten erhöht [240–242].

1.7.3. Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten

Parallel zur Auflösung des PLBs findet die Synthese von Chlorophyll a und die darauf aufbauende Assemblierung der photosynthetischen Kernkomplexe statt [243]. Leicht verzögert wird Chlorophyll b synthetisiert und die Antennenkomplexe werden assembliert [243]. Bereits nach wenigen Minuten im Licht kann eine geringe PSI-Aktivität nachgewiesen werden [243, 244]. Die Abundanz von PSI ist darüber hinaus entscheidend für die Ausbildung der Stromalamellen [227]. Die Assemblierung von PSII erfolgt deutlich langsamer und ist abhängig von der Ausbildung des POR-Chlid-NADPH Quencher-Komplexes [226]. Nach 6 h im Licht konnte in *Pisum sativum* der vollständige PSII-Kernkomplex zwar nachgewiesen werden, die effektive photochemische

Aktivität lag jedoch lediglich bei 40 % im Vergleich zu späteren Entwicklungsstadien [245]. Erst nach 24 h im Licht war PSII vollständig funktional und stabil [245]. Sobald die Assemblierung der Kernkomplexe abgeschlossen ist, nimmt nur noch die Größe der Antennenkomplexe zu [243]. Im Kontrast zu PSI und PSII liegt der Cytochrom b_6f -Komplex bereits während der Etiolierung vor, sodass dieser nur einen geringen Einfluss auf die Ausbildung der Thylakoidmembran hat [227, 243, 245].

Die *de novo* Assemblierung von PSII erfolgt hochgradig geordnet. Zu Beginn bildet sich das Reaktionszentrum, welches aus D1 und D2 besteht, aus. Anschließend assoziieren die inneren Antennenproteine CP43 und CP47 an den heterodimeren D1/D2-Komplex. Daraufhin lagert sich der Wasser-Spaltungs-Komplex an das Reaktionszentrum an [246, 247]. Neben den vier großen Untereinheiten des PSII (D1, D2, CP43 und CP47) sind 13 weitere, kleinere transmembranproteine für die Ausbildung des vollständigen PSII-Kernkomplexes nötig [247]. Der nächste entscheidende Schritt ist die Dimerisierung von PSII sowie die anschließende Anlagerung der Antennenkomplexe (LHCII). Die homo- und heterotrimeren LHCII-Antennenkomplexe binden jeweils 14 Chlorophylle (8 Chlorophyll a, 6 Chlorophyll b) [8]. Das PSII-Dimer kann hierbei zwei kernassoziierte (C2), zwei moderat gebundene (M2) sowie zwei lose gebundene (S2) LHCII-Trimere enthalten [248]. Der PSII-LHCII Superkomplex enthält insgesamt ca. 220 Chlorophyll a und 100 Chlorophyll b Moleküle und hat in Arabidopsis ein Molekulargewicht von etwa 1400 kDa [249]. Bisher wurden insgesamt 60 verschiedene Hilfsproteine identifiziert, welche sowohl an der *de novo* Synthese als auch Reparatur von PSII beteiligt sind [250, 251]. In adultem Gewebe erfolgt ein ständiger Austausch der D1 Untereinheit, da diese sensitiv gegenüber oxidativem Stress ist. Vergleichbar zur *de novo* Synthese ist auch die Reparatur des PSII hochgradig geordnet [248]. Im Vergleich dazu ist die sequenzielle Assemblierung von PSI weniger gut untersucht. Zu Beginn der Assemblierung werden die Proteine des Reaktionszentrums PsaA und PsaB co-translational in die Thylakoidmembran inseriert und bilden unmittelbar danach ein Heterodimer. Anschließend werden die drei gebundenen Eisen-Schwefel-Cluster integriert. Die Einlagerung dieser Cluster ist dabei eine Voraussetzung für die Anlagerung der stromal gelegenen Untereinheiten [252]. Es folgt anschließend die Assemblierung von sechs kleineren, membranintegralen Untereinheiten in unbekannter Reihenfolge [252]. Zum Schluss bilden die vier monomeren Antennenproteine (LHCA1-4) den LHCI-Antennenkomplex, welcher sich an den PSI-Kernkomplex anlagert [252]. Der PSI-LHCI-Superkomplex besteht insgesamt aus 16 Untereinheiten und enthält 233 Chlorophylle (199 Chlorophyll a / 34 Chlorophyll b) [8]. Obwohl einige Hilfsproteine der PSI Assemblierung identifiziert wurden, ist die genaue sequenzielle Abfolge unbekannt. Eine Herausforderung bei der Erforschung der PSI-Assemblierung stellt hierbei die schnelle *de novo* Synthese sowie die hohe Stabilität des reifen PSI dar [252].

1.8. Oxidativer Stress in Chloroplasten

ROS werden unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich als Nebenprodukte verschiedener zellulärer Prozesse produziert. In den meisten Fällen schließt sich der schnelle Abbau dieser Moleküle an, wodurch schädigende Effekte verhindert werden. Die Hauptquellen für ROS in Chloroplasten sind PSI und PSII. Am PSI werden Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) durch die Mehler-Reaktion gebildet [253, 254]. Die univalente Reduktion von Sauerstoff durch reduziertes Ferredoxin produziert dabei zuerst Superoxidanionen, welche anschließend durch die Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutasen in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff umgewandelt werden [254, 255]. Vor allem unter Stressbedingungen, in denen wenig $NADP^+$ als finaler Elektronenakzeptor vorliegt und die Elektronentransportkette überlastet ist, reduzieren Ferredoxin und die Eisen-Schwefel-Cluster Sauerstoff zu Superoxidanionen [256]. PSII ist hingegen die primäre Quelle von Singulett-Sauerstoff (1O_2) [257]. Dieser entsteht vor allem unter Starklicht und UV-Bestrahlung durch die Reaktion von Triplett-Chlorophyll mit Triplett-Sauerstoff [258]. Unter diesen Bedingungen sind die primären und sekundären Elektronenakzeptoren des PSII (Plastiquinone Q_A und Q_B) meist überreduziert und verhindern so die Ladungstrennung an den beiden zentralen Chlorophyllen [259]. Infolgedessen kommt es zur Ladungrekombination bzw. zur Rückführung der Ladung auf die beiden zentralen Chlorophylle und zur Bildung von Triplett-Sauerstoff. Darüber hinaus kann Triplett-Chlorophyll in den Antennenkomplexen durch Interkombination (*Intersystem-Crossing*) entstehen. Neben den Photosystemen sind TBS-Intermediate wie ProtoIX und PChlid bekannte Photosensibilisatoren, welche die Bildung von Singulett-Sauerstoff auslösen, wie beispielsweise in der *flu*-Mutante [140, 260]. Darüber hinaus sind auch UroIII und CoProIII photosensitiv. In *Nicotiana tabacum urod*-Antisense-Linien kommt es in Abhängigkeit von der Lichtintensität zur Anreicherung von UroIII, was die Ausbildung von Nekrosen verursacht [261, 262]. Diese Nekrosen bilden sich in Folge der ROS-vermittelten Immunantwort, welche vergleichbar zum Befall durch Pathogene ist [262]. Die Akkumulation von CoProIII in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis cpo* Antisense-Linien führt hingegen in den betroffenen Bereichen vor allem zur Anreicherung von Wasserstoffperoxid [263, 264]. Sowohl Superoxidanionen als auch Wasserstoffperoxid sind moderat reaktiv, können allerdings beide durch die Haber-Weis-Reaktion in die deutlich reaktiveren und kurzlebigeren Hydroxylradikale umgewandelt werden ($\bullet OH$) [256].

ROS-Moleküle sind in der Lage, irreparable zelluläre Schäden durch die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleotiden hervorzurufen. Während Lipid-Oxidationen die Zellwand schädigen, induzieren ROS-vermittelte Protein-Carboxylierungen die Aggregation und Proteolyse der betroffenen Proteine. Die Oxidation von DNA hingegen verursacht Doppelstrangbrüche und Deletionen [256]. Unabhängig von den schädigenden Effekten dient die lokale und temporäre Akkumulation von ROS der Signaltransduktion und Redoxkontrolle. Wasserstoffperoxid oxidiert beispielsweise die Thiolgruppen von Cysteinen verschiedener Peroxidasen und beeinflusst so durch die Bildung von Disulfidbindungen die Funktionalität dieser Enzyme [265]. ROS induzieren weiterhin das Ende der Dormanz, da sie mit den Antagonisten der Keimung (Gibberellinsäure und Abscisinsäure) interagieren [266]. Die Homöostase von ROS entsteht durch das Zusammenspiel von produzierenden und abbauenden Reaktionen. Einerseits induziert und amplifiziert die NADPH-Oxidase die Produktion von Superoxidanionen [267]. Andererseits entgiften und quenchen sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Komponenten die

verschiedenen ROS-Moleküle. Zu den nicht-enzymatischen Komponenten zählen unter anderem Carotinoide, Glutathione, Tocopherole und Ascorbate [256, 268]. Zu den enzymatischen Komponenten gehören neben den Superoxid-Dismutasen auch Katalasen, Guaiacolperoxidasen und die Enzyme des Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Katalasen und Guaiacol Peroxidasen entgiften spezifisch Wasserstoffperoxid [256]. Katalasen dismutieren dabei Wasserstoffperoxide zu Wasser und Sauerstoff als spezifische Reaktion auf bestimmte Stressbedingungen. Im Vergleich dazu wird die Oxidation von Aromaten (bspw. Guaiacol) durch Peroxidasen durch eine Vielzahl von Stressbedingungen induziert [256]. Innerhalb des Ascorbat-Glutathion-Zyklus wird Wasserstoffperoxid durch die sukzessive Oxidation und Reduktion von Ascorbat zu Glutathion und *vice versa* unter Verbrauch von NADPH in Wasser umgewandelt [269, 270]. Die induzierte Genexpression der entgiftenden Enzyme dient neben der direkten Anfärbung der Sauerstoffspezies als Marker für ROS *in planta* [271].

1.9. Ziel der Arbeit

TPR-Proteine bilden die evolutionär älteste Klasse innerhalb der Tandem-Repeat-Superfamilie und weisen eine relativ stark konservierte Konsensussequenz auf. Darüber hinaus vermitteln TPR-Proteine vor allem Protein-Protein-Interaktionen und sind häufig an der Stabilisierung größerer Protein-Komplexe beteiligt. Von den bisher identifizierten plastidären TPR-Proteinen ist eine Vielzahl an Prozessen wie der Assemblierung der Photosysteme, der plastidären Genexpression und der Regulation der Chlorophyllbiosynthese beteiligt [197]. Für die meisten der in *Synechocystis* und *Chlamydomonas reinhardtii* identifizierten und charakterisierten TPR-Proteine wurden die entsprechenden Homologe in höheren Pflanzen bereits identifiziert. Eine Ausnahme hierbei ist Pitt, das in *Synechocystis* die Verbindung zwischen der Chlorophyllbiosynthese und der Integration von Chlorophyllen in die assemblierenden photosynthetischen Untereinheiten vermittelt. Wie diese Verbindung in höheren Pflanzen organisiert sein könnte, ist größtenteils unbekannt. Aus diesem Grund war ein Schwerpunkt dieser Arbeit die Identifikation des Pitt-Homologs in Arabidopsis. Zudem sollten weitere interessante TPR-Proteine identifiziert werden, welche an der Regulation der Chlorophyllbiosynthese oder der Chloroplastenbiogenese beteiligt sein könnten. Zur Identifikation des Pitt-Homologs sollte eine Liste mit potenziellen Kandidaten erstellt werden, welche sich durch eine hohe Sequenzidentität im Vergleich zu Pitt sowie einen ähnlichen Aufbau der einzelnen Domänen und Motive auszeichnen. Mittels verschiedener Interaktionsanalysen sollten die vielversprechendsten Kandidaten hinsichtlich möglicher Interaktionen zu POR und weiteren Proteinen der TBS untersucht werden. Außerdem sollte die funktionelle Relevanz dieser Kandidaten in Arabidopsis untersucht werden. Aus diesem Grund sollten T-DNA-Insertionslinien der selektierten TPR-Proteine, vor allem hinsichtlich der *steady state* Gehalte von Chlorophyllen und TBS-Intermediaten sowie der Stabilität und subzellulären Lokalisation von POR und weiteren TBS-Enzymen, untersucht werden. Mit Hilfe dieser Ansätze sollte das potenzielle Pitt-Homolog in Arabidopsis identifiziert werden, welches ebenfalls hinsichtlich einem potenziellen Einfluss auf Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten charakterisiert werden sollte. Anders als in *Synechocystis* konnten in Pflanzen bisher keine Biogenesezentren nachgewiesen werden. Somit ist kein spezifischer Ort für die Assemblierung der Photosysteme und Inkorporation der Chlorophylle in höheren Organismen bekannt. Um dennoch den Einfluss des potenziellen Pitt-Homologs auf die *de novo* Assemblierung der photosynthetischen Komplexe untersuchen zu können, sollten die entsprechenden T-DNA-Insertionslinien während der Deetiolierung untersucht werden. Da TBS-Intermediate häufig eine Ursache für die Produktion von ROS sind, sollte ebenso untersucht werden, inwiefern sich das Fehlen des potenziellen Pitt-Homologs auf die Anreicherung von ROS auswirkt. Schlussendlich sollte der Einfluss des Pitt-Homologs sowie weiterer interessanter TPR-Kandidaten auf die TBS und die Abundanz der photosynthetischen Komplexe unter verschiedenen Stressbedingungen charakterisiert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Auswahl der TPR Proteine

2.1.1. Auswahl der Kandidaten für die weiterführenden Arbeiten

In *Arabidopsis thaliana* wurden 21 plastidär lokalisierte TPR-Proteine vorhergesagt [197]. Unabhängig davon, wurde unter Zuhilfenahme verschiedener Datenbanken (Tair, Chloroplast-DatabaseII, Uniprot) eine Liste von potenziell plastidär lokalisierten TPR-Proteinen erstellt, welche sich als Kandidaten für weitere Untersuchungen eignen würden (Tab. 2.1). Der Fokus lag hierbei zum einen auf TPR-Proteinen mit bislang unbekannter Funktion, zum anderen sollte das mögliche Pitt-Homolog in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Da vor allem die TPR-Domäne eine entscheidende Rolle für die Funktionalität der TPR-Proteine spielt und diese meist unabhängig von anderen Domänen agiert, wurde lediglich die 182 Aminosäuren lange TPR-Domäne der Pitt-Peptidsequenz verwendet, um mittels *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) nach einem potenziellen Homolog zu suchen. Aufgrund der komplexen Aminosäurezusammensetzung des TPR-Motivs ist die Einteilung dieser durch die Algorithmen der Datenbanken nicht immer zuverlässig. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von TPRpred verifiziert, dass es sich bei den gewählten Kandidaten mit über 99 %iger Wahrscheinlichkeit um TPR-Proteine handelte (Tab. 2.1). Des Weiteren wurde mittels TPRpred die Länge der TPR-Domäne und die Anzahl der Motive bestimmt (Tab. 2.1). Die Vorhersage der plastidären Lokalisation erfolgte mit Hilfe von ChloroP (Tab. 2.1). Jene Kandidaten, welche gemäß ChloroP über kein Transitpeptid verfügten, wurden erneut mittels CellPloc2.0 überprüft. Für drei der 18 selektierten TPR-Proteinen war zu Beginn der Arbeit bereits eine Funktion beschrieben: FLU, LPA1 und SG1. Zur Identifikation des putativen Pitt-Homologs wurde für alle gewählten TPR-Proteine mittels *Needleman-Wunsch Global Alignment* die Sequenzidentität und -ähnlichkeit zur Pitt TPR-Domäne bestimmt. Da die transmembrane Domäne von Pitt entscheidend für die Funktionalität des Proteins ist, wurde für alle Kandidaten mittels des TMHMM Server überprüft, ob diese eine solche Domäne ausweisen (Tab. 2.1). Die vielversprechendsten Kandidaten wurden aufgrund einer hohen Sequenzähnlichkeit zur TPR-Domäne von Pitt (über 40 %), einer vergleichbaren Länge der TPR-Domäne und ähnlichen Anzahl von TPR-Motiven (5 ± 1) ausgewählt. Infolgedessen fiel die Wahl auf die folgenden fünf TPR-Proteine für weiterführende Analysen: At1g78915 (TPR1), At3g18420 (SG1), At4g39470 (TPR4), At5g02590 (TPR7) und At3g53560 (TPR9).

Tabelle 2.1. – Liste der plastidär lokalisierten TPR-Proteine. Die selektierten TPR-Proteine sind nach der absteigenden Ähnlichkeit zur TPR-Domäne von Pitt sortiert. Angegeben wurde die ATG-Identifikationsnummer und die Bezeichnung in den weiterführenden Analysen. Weiterhin wurde der durch TPRpred kalkulierte p-Wert angegeben sowie die daraus errechnete Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein TPR Protein handelte. Durch TPRpred wurde außerdem die Anzahl der TPR-Motive sowie die Länge der TPR-Domäne bestimmt. Vier der untersuchten TPR-Proteine hatten nach ChloroP kein plastidäres Transitpeptid, allerdings wurde für diese die plastidäre Lokalisation mittels Cell-PLoc 2.0 vorhergesagt. Die durch TPRpred bestimmte Länge der TPR-Domäne wurde ebenso angegeben wie deren Sequenzähnlichkeit zur Pitt TPR-Domäne. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil an identischen Aminosäuren und Lücken im Alignment berechnet. Das Vorhandensein einer Transmembrandomäne (TM) wurde ebenfalls untersucht (+: TM vorhanden; -: keine TM vorhanden).

ATG Nummer	TPRpred	% TPR	ChloroP	Länge TPR-Domäne	Motivanzahl	Ähnlichkeit	Identität	Lücken	TM
SG1 At3g18420	4.7E-25	100 %	0,570	176 AS	5	49 %	26 %	3 %	-
At4g39470	1.8E-19	100 %	0,510	175 AS	6	49 %	25 %	5 %	-
At1g78915	2.4E-22	100 %	0,540	187 AS	5	45 %	26 %	3 %	+
At5g02590	3.3E-23	100 %	0,519	210 AS	6	41 %	25 %	4 %	-
At3g53560	3.5E-20	100 %	0,575	177 AS	5	46 %	23 %	4 %	-
At2g37400	1.5E-21	100 %	0,580	211 AS	7	40 %	22 %	3 %	-
At3g09490	1.2E-23	100 %	0,563	211 AS	6	35 %	19 %	2 %	-
At4g37210	9.1E-18	100 %	Cell-PLoc 2.0	236 AS	3	33 %	19 %	22 %	-
FLU At3g14110	4.8E-15	99,99 %	Cell-PLoc 2.0	72 AS	3	28 %	16 %	38 %	+
At1g15290	2.1E-15	99,99 %	Cell-PLoc 2.0	202 AS	5	32 %	16 %	14 %	-
At3g16760	6.3E-22	100 %	0,563	108 AS	3	25 %	15 %	42 %	-
At5g10090	0.0E+00	100 %	0,521	336 AS	9	26 %	14 %	45 %	-
At3g26580	8.9E-12	99,70 %	Cell-PLoc 2.0	72 AS	2	18 %	12 %	62 %	+
At3g05625	1.0E-11	99,68 %	0,545	68 AS	2	20 %	11 %	63 %	-
At4g10840	0.0E+00	100 %	0,582	410 AS	10	20 %	11 %	55 %	-
At2g31240	0.0E+00	100 %	0,540	528 AS	13	16 %	10 %	65 %	-
At5g53080	1.6E-36	100 %	0,567	414 AS	10	18 %	10 %	56 %	-
LPA At1g02910	1.6E-12	99,87 %	0,534	71 AS	2	16 %	9 %	62 %	-

2.1.2. Interaktionsanalysen der ausgewählten Kandidaten

Ein entscheidendes Kriterium für die weiterführenden Analysen der gewählten Kandidaten war deren Vermögen, mit einer oder mehreren POR-Isoformen aus Arabidopsis zu interagieren. Darüber hinaus wurde überprüft, ob die Kandidaten ebenfalls in der Lage sind, andere Schlüsselenzymen der TBS zu binden. Für die Interaktionsanalysen wurden zwei verschiedene *in vivo* Ansätze gewählt: zum einen das Split-Ubiquitin-System, zum anderen die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC). In beiden Verfahren werden die entsprechenden putativen Interaktionspartner heterolog zur Überexpression gebracht.

2.1.2.1. Split-Ubiquitin-Interaktionsanalysen ausgewählter TPR-Proteine

Die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels Split-Ubiquitin-Analysen basiert auf dem Wachstum von co-transformierten Hefezellen auf Selektionsmedium. Die Bestätigung der erfolgreichen Co-Transformation beider zu testenden Interaktionspartner erfolgt auf Medium ohne Leucin und Tryptophan (-It) (siehe Anhang .1). Darüber hinaus resultierte eine positive Interaktion im Wachstum der Zellen auf Minimalmedium ohne Histidin, Uracil, Leucin und Tryptophan (-hult). Um mögliche falsch positive Interaktionen zu eliminieren, wurde zusätzlich 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) hinzugefügt. Von den fünf selektierten Kandidaten zeigten vier das Potenzial mit mindestens einer POR Isoform aus Arabidopsis zu interagieren (Abb. 2.1). Während TPR1 und SG1 mit allen drei Isoformen interagierten, traf dies im Falle von TPR7 und TPR9 nur für zwei Isoformen, PORA und PORB, zu (Abb. 2.1). Somit kamen diese vier TPR-Proteine weiterhin als Pitt-Homolog in Frage. Im Vergleich dazu deutete nichts auf eine Interaktion zwischen TPR4 und POR hin (Abb. 2.1).

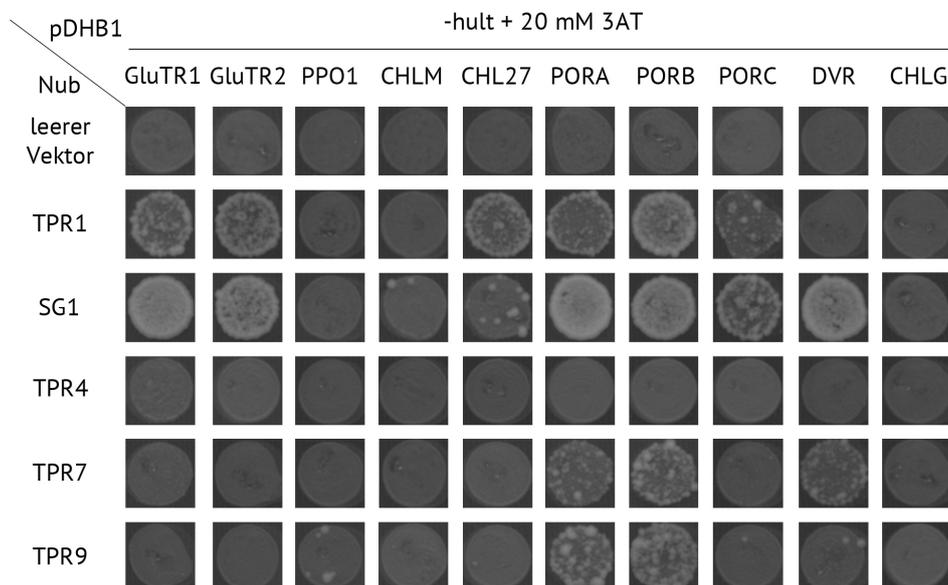


Abbildung 2.1. – Interaktionsanalysen der selektierten TPR-Proteine zu Schlüsselenzymen der TBS mittels Split-Ubiquitin. Die gewählten TPR-Proteine wurden in den pNub Vektor kloniert, während die Enzyme der TBS in den pDHB1 Vektor kloniert wurden. Die zu testenden Interaktionspartner wurden in Hefe co-transformiert und auf Selektionsmedium angezogen. Bei einer Interaktion beider Partner resultierte dies im Wachstum der Hefezellen auf Minimalmedium ohne Histidin, Uracil, Leucin und Tryptophan (-hult). Zur zusätzlichen Reduktion falsch positiver Interaktionen wurden 20 mM 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) hinzugefügt. Das Wachstum der Zellen wurde nach vier Tagen bei 30 °C festgehalten.

Darüber hinaus interagierten TPR1 und SG1 ebenfalls mit beiden GluTR Isoformen sowie CHL27 (Abb. 2.1). Zusätzlich dazu zeigte SG1 ebenfalls eine Interaktion zu weiteren Enzymen der Chlorophyllbiosynthese (CHLM und DVR). Im Vergleich dazu wiesen TPR7 und TPR9 ein weniger breites Interaktionsmuster auf. Während TPR7 zusätzlich mit DVR interagierte, konnten für TPR9 keine weiteren Interaktionspartner unter den getesteten Enzymen der TBS identifiziert werden.

Neben den TBS-Enzymen sind eine Vielzahl von Proteinen bekannt, welche die Stabilität dieser beeinflussen und somit die TBS regulieren. Dementsprechend wurden die fünf gewählten TPR-Proteine mit den wichtigsten Regulatoren der TBS co-transformiert und auf mögliche Interaktionen hin untersucht (Abb. 2.2). Im Falle von TPR1 überlebten wenige Zellen in Kombination mit YCF54, ein mögliches Zeichen für eine schwache, unspezifische oder falsch positive Interaktion (Abb. 2.2). Ähnliches traf auf drei weitere TPR-Proteine (TPR4, TPR7 und TPR9) in Kombination mit GUN4 zu. SG1 interagierte mit nahezu allen getesteten Regulatoren der TBS. Die einzige eindeutig positive Interaktion konnte hierbei zu GUN4 nachgewiesen werden, während die Interaktionen zwischen SG1 und FLU, YCF54 sowie LIL3.2 ein schwaches Zellwachstum hervorriefen. Möglicherweise handelt es sich bei SG1 um ein sehr affines Protein, was das breite Interaktionsmuster erklären könnte. Welche Interaktionen hierbei von biologischer Relevanz sind, ist eine Fragestellung für die weiterführenden Analysen. Interessanterweise interagierten sowohl TPR1 als auch SG1 mit den Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes: GluTR, CHL27 und POR. Während SG1 dabei auch mit FLU interagierte, traf dies auf TPR1 nicht zu (Abb. 2.2). Die Analyse von Interaktionen mittels des Split-Ubiquitin-Verfahrens diente als erster Anhaltspunkt für mögliche Interaktionspartner und bedurfte der Verifikation mit einer weiteren *in vivo* Methode.

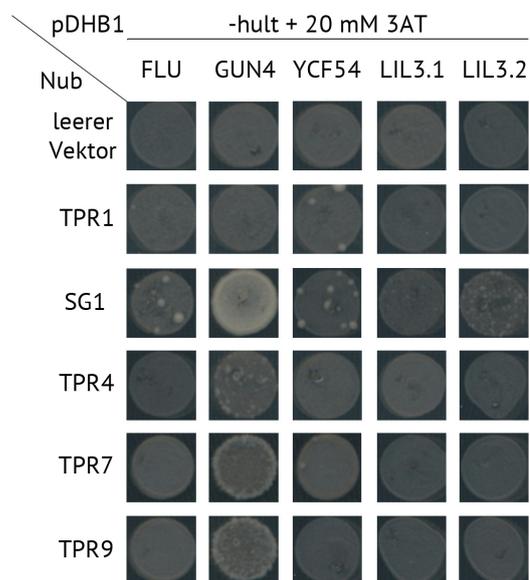


Abbildung 2.2. – Interaktionsanalysen der selektierten TPR-Proteine zu Regulatoren der TBS mittels Split-Ubiquitin. Die zu testenden Interaktionspartner wurden jeweils in pNub oder pDHB1 Vektoren kloniert, in Hefe co-transformiert und auf Selektionsmedium angezogen. Die gewählten TPR-Proteine wurden dabei in pNub kloniert, während die Regulatoren der TBS in den pDHB1 Vektor kloniert wurden. Die positive Co-Transformation beider Vektoren wurde mit Medium ohne Leu und Tyr (-lt) überprüft. Im Falle einer positiven Interaktion konnten die Hefezellen auf Minimalmedium ohne Histidin, Uracil, Leucin und Tryptophan (-hult) wachsen. Es wurden 20 mM 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) hinzugefügt, um die Rate an falsch positiven Interaktionen zu minimieren. Das Wachstum der Zellen wurde nach vier Tagen bei 30 °C festgehalten.

2.1.2.2. BiFC-Interaktionsanalysen ausgewählter TPR-Proteine

Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels BiFC wurden die zu testenden Kombinationen mit jeweils einer Hälfte des *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert und in *Nicotiana benthamiana* co-infiltriert. Im Falle einer Interaktion zwischen beiden Proteinen führte dies zur Rekonstitution des YFPs und demzufolge zur Wiederherstellung der Fluoreszenz bei 527 nm. Der Vorteil dieser Methode war, dass durch die vorhandenen Transitpeptide der Zielproteine der Interaktionsort überprüft werden konnte. Da alle Interaktionen im Chloroplasten vermutet wurden, wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz genutzt um dies zu bestätigen.

In den BiFC-Analysen konnten die Interaktionen von TPR1 zu GluTR1, CHL27, PORB und PORC, jedoch nicht zu PORA, bestätigt werden (Abb. 2.3). Darüber hinaus interagierte TPR1 mit GBP und FLU (Abb. 2.3). Dies war im Fall von FLU unerwartet, da in Split-Ubiquitin-Analysen keine Interaktion zwischen TPR1 und FLU nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.2). Möglicherweise wurde die Interaktion *in planta* durch einen weiteren Partner vermittelt. Außerdem zeigte sich, dass TPR1 keine Homodimere ausbildete (Abb. 2.3).

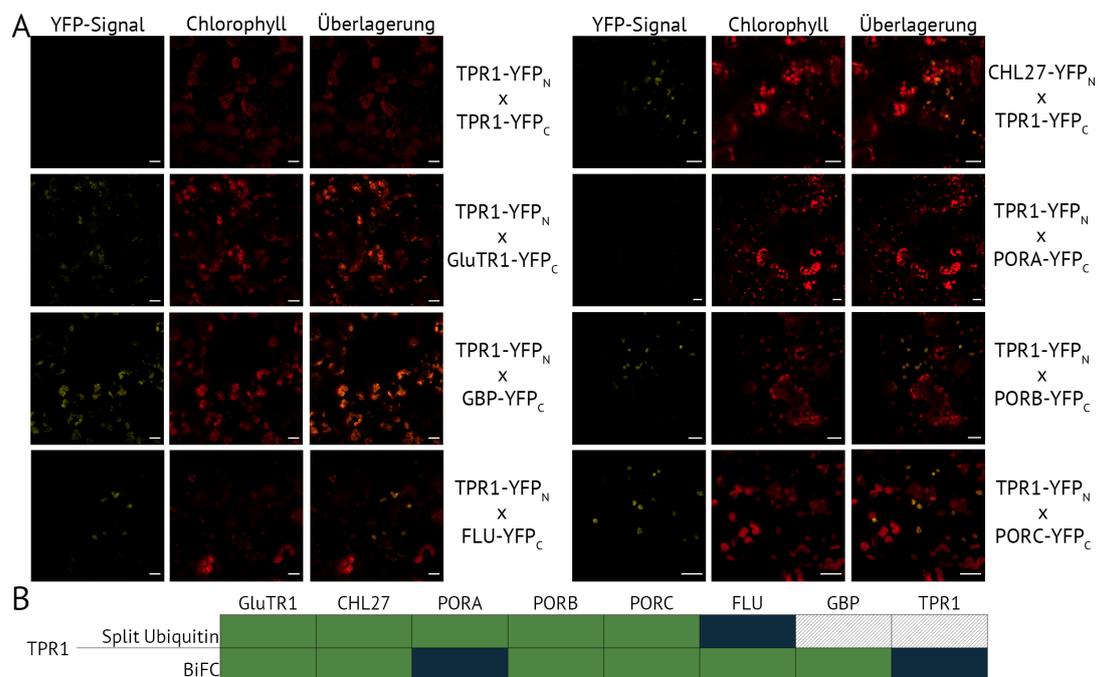


Abbildung 2.3. – Interaktionsanalysen von TPR1 zu Proteinen der TBS mittels BiFC. (A) Die zu testenden Interaktionspartner wurden mit der N-terminalen (YFP_N) oder C-terminalen (YFP_C) Hälfte von YFP fusioniert und in *Nicotiana benthamiana* co-infiltriert. Im Falle einer Interaktion wurde die gelbe Fluoreszenz des rekonstituierten YFPs mittels Laserscanmikroskopie detektiert (YFP-Signal). Zusätzlich wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz nachgewiesen (Chlorophyll). Die angegebene Skalierung entspricht 20 µm. (B) Vergleichende Übersicht der Ergebnisse der Split-Ubiquitin- und BiFC-Analysen. Im Falle einer positiven Interaktion wurde das entsprechende Feld grün unterlegt, während eine ausbleibende Interaktion blau unterlegt wurde. Sollte die Interaktion mit einem der beiden Ansätze nicht untersucht wurden sein, wurde das entsprechende Feld grau schraffiert unterlegt.

Für die genauere Analyse der putativen Bindestelle von TPR1 an GluTR1 wurden zwei GluTR1-Deletionskonstrukte verwendet: Zum einen wurde die aminoterminal HBD (Δ HBD), zum anderen die carboxyterminale FBD (Δ FBD) entfernt. Bei der Co-Transformation von TPR1 mit GluTR1- Δ HBD konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 2.4). Im Vergleich dazu interagiert TPR1 weiterhin mit GluTR1- Δ FBD (Abb. 2.4). Dies zeigte, dass TPR1 eher an im aminoterminalen als im carboxyterminalen Bereich von GluTR1 bindet.

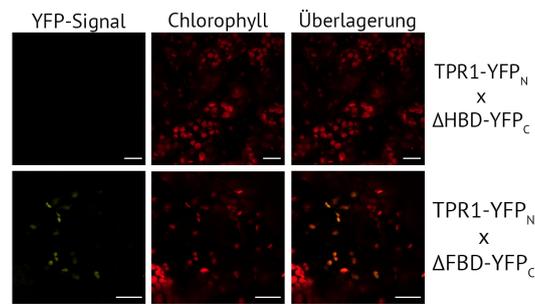


Abbildung 2.4. – Interaktionsanalysen zwischen TPR1 und GluTR-Deletionskonstrukten mittels BiFC. Die zu testenden Interaktionspartner wurden mit der N-terminalen (YFP_N) oder C-terminalen (YFP_C) Hälfte von YFP fusioniert und in *Nicotiana benthamiana* co-infiltriert. Im Falle einer Interaktion wurde die gelbe Fluoreszenz des rekonstituierten YFPs mittels Laserscanmikroskopie detektiert (YFP-Signal). Zusätzlich wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz genutzt, um die Lage der Chloroplasten nachzuweisen (Chlorophyll). Die angegebene Skalierung entspricht 20 µm. GluTRΔHBD - GluTR ohne Häm-Bindedomäne; GluTRΔFBD - GluTR ohne FLU-Bindedomäne

Für SG1 konnten mittels BiFC die Interaktionen zu GluTR1, PORB, PORC, GUN4 und LIL3 bestätigt werden (Abb. 2.5). Allerdings waren die Signale in Kombination von SG1 mit PORC und LIL3.2 schwach (Abb. 2.5). Ähnliches traf im Falle der SG1-Homodimerbildung zu. Die schwachen Signale könnten ein Hinweis auf unspezifische Interaktionen sein. Die Interaktion von SG1 zu PORA konnte mit dieser Methode nicht bestätigt werden (Abb. 2.5).

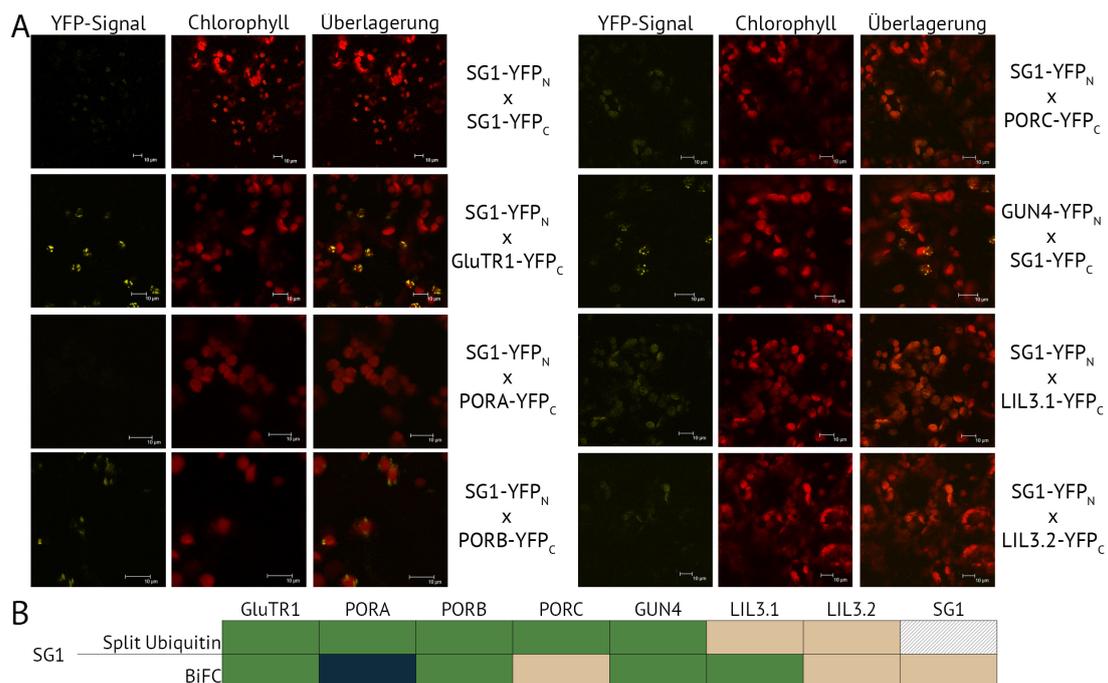


Abbildung 2.5. – Interaktionsanalysen von SG1 zu Proteinen der TBS mittels BiFC. (A) Die zu testenden Interaktionspartner wurden mit der N-terminalen (YFP_N) oder C-terminalen (YFP_C) Hälfte von YFP fusioniert und in *Nicotiana benthamiana* co-infiltriert. Im Falle einer Interaktion wurde die gelbe Fluoreszenz des rekonstituierten YFPs mittels Laserscanmikroskopie detektiert (YFP-Signal). Zusätzlich wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz genutzt, um die Lage der Chloroplasten nachzuweisen (Chlorophyll). Die angegebene Skalierung entspricht 10 µm. (B) Vergleichende Übersicht der Ergebnisse der Split-Ubiquitin- und BiFC-Analysen. Im Falle einer positiven Interaktion wurde das entsprechende Feld grün unterlegt, während schwache Interaktionen beige und ausbleibende Interaktionen blau unterlegt wurden. Sollte die Interaktion mit einem der beiden Ansätze nicht untersucht wurden sein, wurde dieses grau schraffiert dargestellt.

Auffällig ist, dass bei den Interaktionen von SG1 zu GluTR1, PORB und GUN4 die rekonstituierten YFP-Signale in sehr distinkten Bereichen innerhalb des Chloroplasten zu beobachten waren. Diese fleckenartigen Signale entsprechen wahrscheinlich den plastidären Nukleoiden. Diese Kernäquivalente der plastidären DNA sind Orte mit hoher Transkriptions- und Translationsrate und liegen häufig in unmittelbarer Nähe zu den Thylakoidmembranen vor [272]. Diese Lokalisation könnte ein Hinweis auf eine Funktion von SG1 im Zusammenhang mit der Transkription oder Translation im Chloroplasten sein.

Für TPR7 konnte die Interaktion zu PORA und PORB mittels BiFC bestätigt werden. Darüber hinaus interagierte TPR7 in BiFC-Analysen, anders als im Split-Ubiquitin-Verfahren, ebenfalls mit der dritten POR-Isoform PORC (Abb. 2.6).

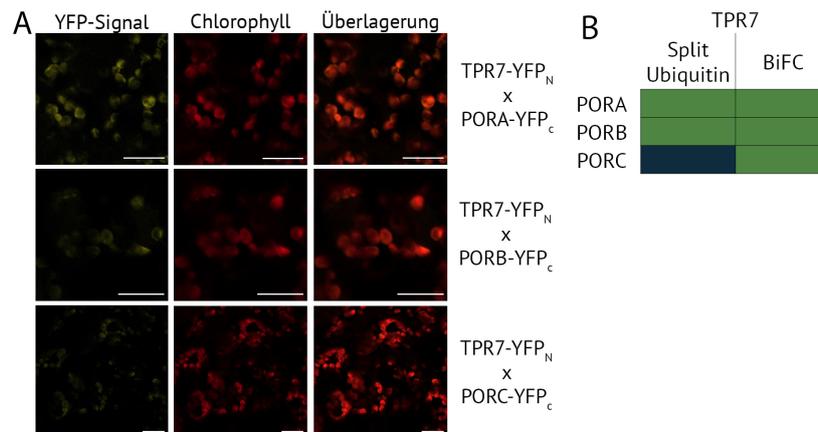


Abbildung 2.6. – Interaktionsanalysen von TPR7 zu Proteinen der TBS mittels BiFC. Die zu testenden Interaktionspartner wurden mit der N-terminalen (YFP_N) oder C-terminalen (YFP_C) Hälfte von YFP fusioniert und in *Nicotiana benthamiana* co-infiltriert. Im Falle einer Interaktion wurde die gelbe Fluoreszenz des rekonstituierten YFPs mittels Laserscanmikroskopie detektiert (YFP-Signal). Zusätzlich wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz genutzt, um die Lage der Chloroplasten nachzuweisen (Chlorophyll). Die angegebene Skalierung entspricht 20 µm. (B) Vergleichende Übersicht der Ergebnisse der Split-Ubiquitin- und BiFC-Analysen. Im Falle einer positiven Interaktion wurde das entsprechende Feld grün unterlegt, während eine ausbleibende Interaktion blau unterlegt wurde.

Leider konnte TPR9 in *Nicotiana benthamiana* nicht zur Expression gebracht werden. Die Expression wurde dabei mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, welche gegen die jeweiligen YFP-Hälfte gerichtet war, untersucht. Leider konnte weder TPR9-YFP_N noch TPR9-YFP_C auf diese Weise nachgewiesen werden (Anhang .3). Somit konnte für TPR9 die Interaktion zu den drei POR Isoformen nicht durch eine weitere Methode verifiziert werden.

2.1.3. Phylogenetische Analyse und Auswahl der TPR-Proteine

Die TPR-Domänen der fünf gewählten TPR-Proteine zeigten alle eine vergleichbare Sequenzidentität (zwischen 23 % und 26 %) zur TPR-Domäne von Pitt. Ähnliches traf für die Sequenzähnlichkeit zu (Tab. 2.1). Darüber hinaus interagierten vier der fünf TPR-Proteine in einem heterologen System mit mindestens einer POR Isoform. Für einen detaillierteren Einblick in die mögliche evolutionäre Beziehung zwischen Pitt und den potenziellen *Arabidopsis thaliana* Homologen wurden die Aminosäuresequenzen der TPR-Domänen aller Kandidaten für ein multiples Sequenz Alignment genutzt, welches mit Hilfe von MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) erzeugt wurde. Der phylogenetische Baum wurde unter Zuhilfenahme der MEGA-X Software visualisiert (Abb. 2.7). Anhand des erstellten phylogenetischen Baumes wurde deutlich, dass TPR1 die engste verwandtschaftliche Beziehung zu Pitt aufweist.

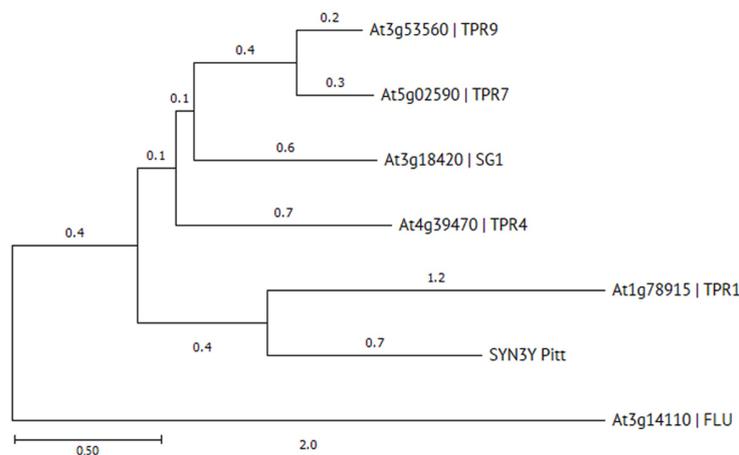


Abbildung 2.7. – Analyse der phylogenetischen Beziehungen zwischen Pitt und den selektierten TPR-Kandidaten. Die TPR-Domänen der fünf gewählten Kandidaten sowie von Pitt wurden für das multiple Sequenz Alignment genutzt. FLU wurde hierbei als Kontrolle verwendet. Basierend auf einem durch MUSCLE (*MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) erstellten multiplen Sequenz Alignment wurde mit der *Maximum Likelihood* Methode und dem auf der Jones-Taylor-Thornton (JTT)-Matrix basierenden Modell der wahrscheinlichste phylogenetische Baum erzeugt. Die Visualisierung erfolgte durch die MEGA-X Software. Die angegebene Skalierung entspricht der Anzahl an Substitutionen pro Position.

Nach TPR1 weist TPR4 die wenigsten Substitutionen im Vergleich zu Pitt auf (Abb. 2.7). Allerdings konnte keine Interaktion zwischen TPR4 und POR *in vivo* nachgewiesen werden, weswegen TPR4 von den weiterführenden Analysen ausgeschlossen wurde. Die TPR-Domäne von SG1 hatte die höchste Sequenzidentität zur TPR-Domäne von Pitt (Tab. 2.1), allerdings eine intermediäre verwandtschaftliche Beziehung (Abb. 2.7). SG1 wurde 2014 als eine wichtige Komponente der Chloroplastenbiogenese identifiziert [212] und interagiert darüber hinaus mit einigen Proteinen der TBS (Abschnitt 2.1.2). Insofern war SG1 ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen. TPR7 und TPR9 zeigten eine enge phylogenetische Verbindung zueinander und interagieren *in vivo* mit mindestens zwei der *Arabidopsis* POR Isoformen. Obwohl beide TPR-Proteine nicht als Pitt-Homolog in Frage kommen, besteht die Möglichkeit, dass sie an der Regulation von POR beteiligt sind. FLU wies wie erwartet die geringste evolutionäre Verbindung zu Pitt auf. Anhand der Interaktionsstudien sowie der phylogenetischen Daten wurde deutlich, dass TPR1 der geeignetste Kandidat für das Pitt-Homolog in *Arabidopsis* ist. Darüber hinaus war TPR1 das einzige der fünf TPR-Proteine, welches genau wie Pitt über eine Transmembranhelix verfügt. Nichtsdestotrotz kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehr als ein TPR-Protein für die Regulation und subzelluläre Lokalisation von POR verantwortlich ist.

Für die Analyse der funktionellen Relevanz der POR-interagierenden TPR-Proteine *in planta* wurde mindestens eine transgene T-DNA-Insertionslinie für jeden Kandidaten mittels der Datenbank des *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*s selektiert (Tab. 2.2). Diese Linien sollen im weiteren Verlauf der Arbeit vor allem hinsichtlich der Stabilität von POR und dem Einfluss auf die TBS charakterisiert werden. Für TPR1 wurden drei T-DNA-Insertionslinien gewählt. Für die drei weiteren Kandidaten SG1, TPR7 und TPR9 wurde jeweils eine T-DNA-Insertionslinie selektiert, welche die T-DNA in dem jeweiligen Exon auswies.

Tabelle 2.2. – Übersicht der ausgewählten T-DNA-Insertionslinien für weiterführende Untersuchungen. Die mittels der Datenbank des *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*s selektierten Linien wurden mit der Identifikationsnummer des kodierenden Gens (ATG Nummer) sowie der in dieser Arbeit genutzte Bezeichnung angegeben. Da die Linien entweder durch das SALK- oder GABI-KAT (GK) Institut erzeugt wurden, wurde auch die Identifikationsnummer des *Nottingham Arabidopsis Stock Center* aufgeführt (NASC ID).

ATG Nummer	NASC ID	Liniename	Bezeichnung
TPR1 (At1g78915)	N520398	SALK_020398	<i>tpr1-1</i>
	N484901	GK-885D01	<i>tpr1-2</i>
	N65556	SALK_022668	<i>tpr1-3</i>
SG1 (At3g18420)	N469634	GK-726C10	<i>sg1-2</i>
TPR7 (At5g02590)	N413757	GK-144C05	<i>tpr7</i>
TPR9 (At3g53560)	N571334	SALK_071334	<i>tpr9</i>

2.2. Untersuchung von TPR1 als mögliches Pitt-Homolog

2.2.1. Phylogenetische Analyse der Pitt-Proteinsequenz

Der Vergleich zwischen den Proteinsequenzen von Pitt und TPR1 sollte einen detaillierteren Einblick in ähnliche und verschiedene Bereiche liefern (Abb. 2.8). Das für TPR1 vorhergesagte Transitpeptid wurde nicht mit in das Alignment einbezogen. Sowohl Pitt als auch TPR1 verfügen über eine aminoterminal Transmembrandomäne sowie eine carboxyterminale TPR-Domäne mit jeweils fünf TPR-Motiven. Vor allem im Bereich der Transmembrandomäne gibt es viele Übereinstimmungen zwischen beiden TPR-Proteinen. Ebenso weisen die fünf identifizierten TPR-Motive eine Reihe von identischen oder ähnlichen Aminosäuren auf (Abb. 2.8). Die Bereiche vor und nach den beiden charakteristischen Domänen unterscheiden sich jedoch stark voneinander. Während TPR1 über eine aminoterminal Verlängerung verfügt, weist Pitt eine carboxyterminale Verlängerung auf. Darüber hinaus ist der Bereich zwischen der Transmembrandomäne und der ersten TPR-Domäne in Pitt im Vergleich zu TPR1 verkürzt. Während die Bereiche mit hoher Ähnlichkeit höchstwahrscheinlich vergleichbare Funktionen beider Proteine vermitteln, sind die unterschiedlichen Sequenzen womöglich die Folge einer individuelle Anpassungen im jeweiligen Organismus.

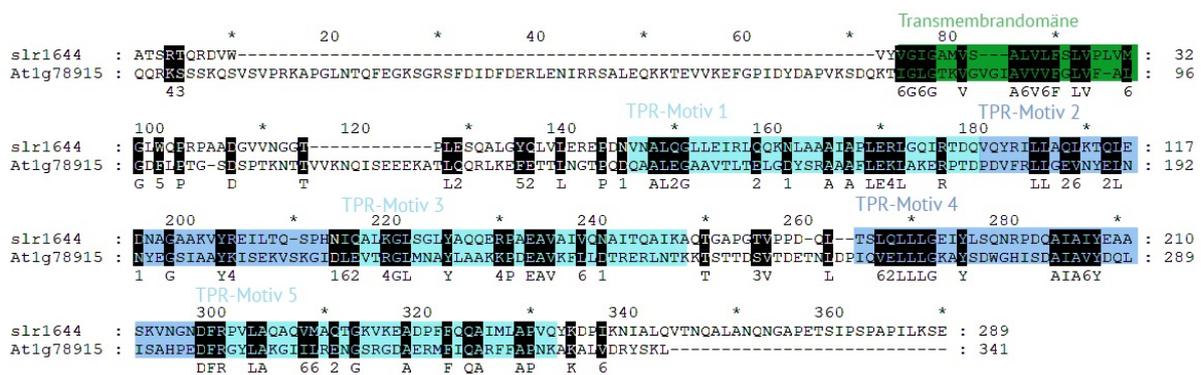


Abbildung 2.8. – Alignment von TPR1 und Pitt. Das hier dargestellte Alignment wurde mit Hilfe von MUSCLE erzeugt und durch das Programm GeneDoc visualisiert. Identische und ähnliche Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Die Konsensussequenz wurde unter dem Alignment angegeben. Ähnliche Aminosäuren wurden durch GeneDoc in acht verschiedene Gruppen klassifiziert: negativ geladene (1), positiv geladene (2), amidische (3), hydroxyliche (4), aliphatische (5), große (6), kleine (7) und schwefelhaltige (8) Aminosäuren. Die Transmembrandomäne wurden grün unterlegt, während die fünf identifizierten TPR-Motive hell- bzw. dunkelblau unterlegt wurden.

Um zu überprüfen, ob die bestimmten Unterschiede zwischen Pitt und TPR1 spezifisch für Arabidopsis sind, oder ob sich diese schon früher im Laufe der Evolution entwickelt haben, wurde die Proteinsequenz von Pitt für die Suche nach möglichen Homologen in anderen Organismen verwendet. Bei Pitt/TPR1 handelt es sich um ein *GreenCut*-Protein, welches somit in allen Photosynthese betreibenden Organismen vorliegt [273]. Für die Erstellung eines phylogenetischen Baumes wurden neben Pitt und TPR1 die Sequenzen der möglichen Pitt-Homologe aus dem Cyanobakterium *Anabaena variabilis*, der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und den Monokotyledonen *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* und *Zea mays* verwendet. Als Vertreter der Dicotyledonen wurden *Brassica rapa*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum* und *Vitis vinifera* gewählt. Für das Moos *Physcomitrella patens* wurde durch BLAST ein mögliches Homolog identifiziert, welches allerdings eine sehr geringe Sequenzähnlichkeit zu den anderen Pitt/TPR1-Homologen aufweist und somit von dem weiteren Analysen ausgeschlossen wurde. Die Proteinsequenzen

der möglichen Pitt/TPR1-Homologe wurden ohne die vorhergesagten Transitpeptide verwendet. In *A. variabilis* und *G. max* wurden zwei mögliche Pitt-Homologe gefunden, welche beide in die Analysen eingebunden wurden (Abb. 2.9). Die Duplikation der Pitt-Sequenz innerhalb eines Genoms wurde lediglich für diese beiden Organismen nachgewiesen und ist somit kein Merkmal einer bestimmten Gruppe.

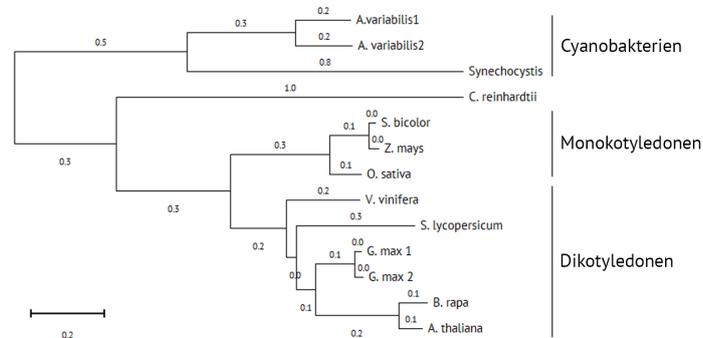


Abbildung 2.9. – Phylogenetischer Baum der mittels BLAST identifizierte Pitt/TPR1-Homologe. Basierend auf einem durch MUSCLE erstellten multiplen Sequenz Alignment wurde mit der *Maximum Likelihood* Methode und dem auf Jones-Taylor-Thornton (JTT)-Matrix basierendem Modell der wahrscheinlichste phylogenetische Baum erzeugt. Die Skalierung entspricht der Anzahl von Substitutionen pro Position. Der phylogenetische Baum wurde mit Hilfe des Programms MEGA-X visualisiert.

Die errechnete evolutionäre Entwicklung der Pitt/TPR1-Sequenz entspricht den Erwartungen, da sich die gewählten Sequenzen entsprechend ihres phylogenetischen Stammbaums gruppieren (Abb. 2.9). Innerhalb der Magnoliopsida bilden sowohl die Monokotyledonen als auch die Dikotyledonen eine homogene Gruppe (Abb. 2.9). Der erzeugte phylogenetische Baum weist darauf hin, dass spezifische Substitutionen innerhalb der verschiedenen Taxa der Grünen Linie auftraten. Für einen detaillierteren Einblick, welche Bereiche der Pitt/TPR1-Homologe möglicherweise stärker konserviert sind als andere, wurde ein multiples Sequenz Alignment erzeugt (Abb. 2.10). Da das putative Pitt/TPR1-Homolog aus *Chlamydomonas* in einigen Bereichen sehr lange Insertionen aufweist (siehe Anhang .5), wurde diese Sequenz aus Gründen der Übersichtlichkeit von dem hier angegebenen Alignment ausgeschlossen (Abb. 2.10). Die beiden charakteristischen Domänen wurden gemäß ihrer Einteilung in *Arabidopsis* farblich unterlegt: in Grün die Transmembrandomäne, in Hell- bzw. Dunkelblau die fünf identifizierten TPR-Motive (Abb. 2.10). Wie im vorangegangenen Alignment zwischen Pitt und TPR1 wiesen auch die Pitt/TPR1-Homologe anderer Organismen vor allem im Bereich der Transmembran- und TPR-Domäne die größten Übereinstimmungen auf (Abb. 2.10). Innerhalb der TPR-Domäne sind vor allem im Bereich des ersten TPR-Motivs einige Unterschiede zu verzeichnen, während das letzte TPR-Motiv die höchste Ähnlichkeit zwischen allen untersuchten Organismen aufweist (Abb. 2.10). Charakteristisch für die Pitt/TPR1-Homologe höherer Pflanzen war darüber hinaus eine 31 Aminosäuren lange, aminoterminaler Verlängerung direkt vor der Transmembrandomäne (Abb. 2.10). Die in Pitt identifizierte carboxyterminale Verlängerung hingegen ist eine Besonderheit der cyanobakteriellen Homologe. Die Verbindung zwischen der Transmembran- und TPR-Domäne weist vor allem in höheren Pflanzen eine hohe Ähnlichkeit auf. Allerdings verfügten alle untersuchten Organismen über einige konservierte Aminosäuren direkt vor dem ersten TPR-Motiv. Somit zeigte sich, dass einige der zuvor identifizierten Unterschiede zwischen Pitt und TPR1 spezifisch für die Pitt/TPR1-Homologe der Cyanobakterien oder höheren Pflanzen sind.

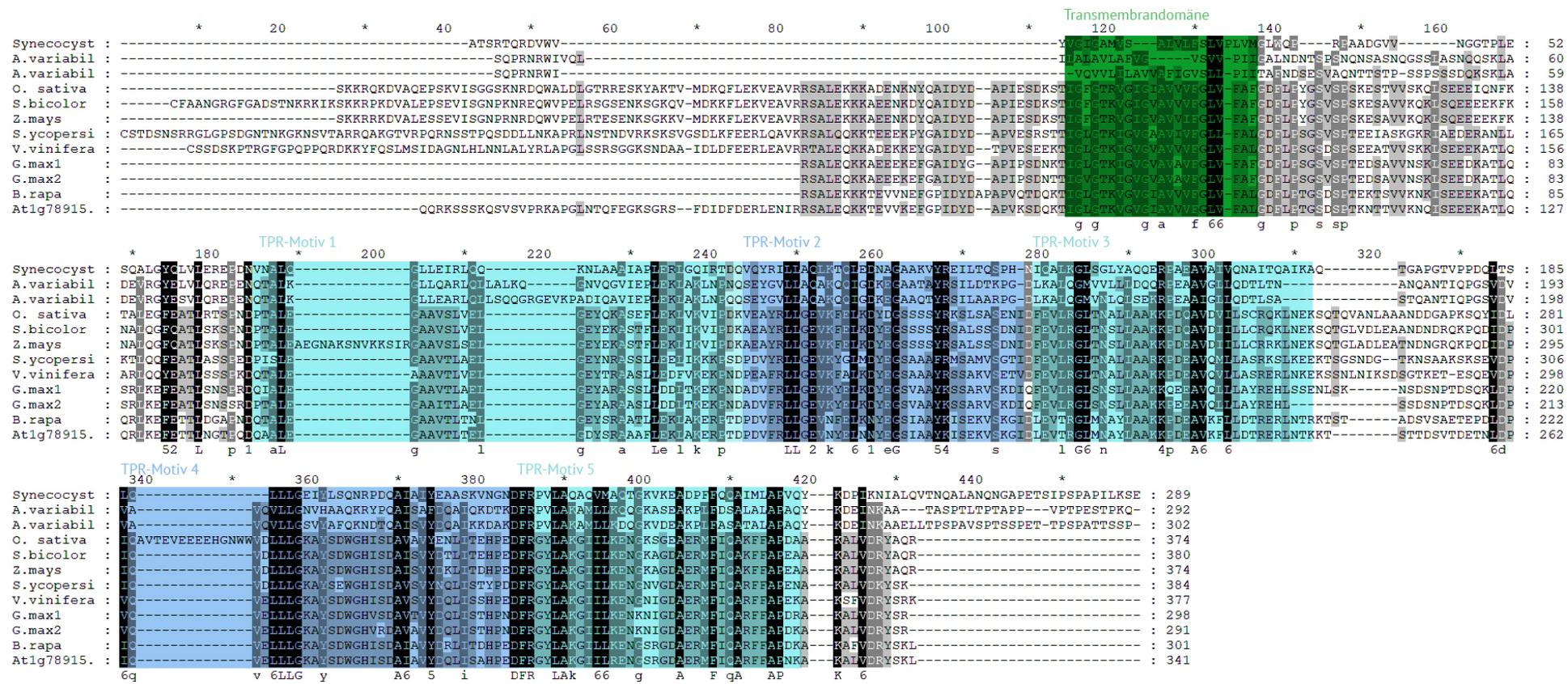


Abbildung 2.10. – Alignment der mittels BLAST identifizierte potenziellen Pitt/TPR1-Homologe verschiedener Organismen. Die verschiedenen potenziellen Pitt/TPR1-Homologe wurde, ausgehend von der Proteinsequenz von Pitt aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, mittels BLAST identifiziert. Für das multiple Sequenz Alignment wurden, neben der Pitt und TPR1 Sequenz, die Sequenzen von *Anabaena variabilis*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Brassica rapa*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Arabidopsis thaliana* (TPR1) verwendet. Für eine bessere Übersicht wurden die für *Arabidopsis thaliana* vorhergesagten Domänen und Motive farblich unterlegt: die Transmembrandomäne in Grün, die fünf TPR-Motive in Hell- bzw. Dunkelblau. Die Färbung der identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren nimmt mit dem Grad der Konserviertheit ab. Schwarz unterlegte Aminosäuren sind stark konserviert, während hellgrau unterlegte Aminosäuren nur in wenigen Organismen identisch waren. Die Konsenssequenz wurde unterhalb des Alignments angegeben.

2.2.2. Produktion eines spezifischen TPR1-Antikörpers

Für die weiteren Untersuchungen von TPR1 *in planta* war ein spezifischer Antikörper unabdingbar. Da kein kommerzieller TPR1 Antikörper verfügbar war, wurde dieser zu Beginn der Arbeit auf Grundlage der *AtTPR1* cDNA-Sequenz des Columbia-0 (Col-0) Ökotyps erzeugt. Zur spezifischen Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem *E. coli* Extrakt wurde ein aminoterminaler Hexahistidin-Tag (6xHis) an die Sequenz von TPR1 angefügt (Abb. 2.11A). Das kalkulierte Molekulargewicht des 6xHis-TPR1 Proteins lag bei 41 kDa. Das erstellte Konstrukt wurde in pRIL *Escherichia coli* Zellen zur Überexpression gebracht. Bereits eine Stunde nach Induktion der Expression durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) konnte eine zusätzliche Bande im Gesamtproteinextrakt von *E. coli* detektiert werden, welche in etwa dem erwarteten Molekulargewicht des rekombinanten TPR1 Proteins entsprach (Abb. 2.11B). Mittels des His-Tag spezifischen Antikörpers wurde bestätigt, dass es sich bei diesem Protein um das rekombinante 6xHis-TPR1 Protein handelte (Abb. 2.11C). Trotz der vorhergesagten Transmembrandomäne lag ein Teil des exprimierten TPR1 Proteins in der löslichen Zellfraktion vor, was die Aufreinigung des Proteins unter nativen Bedingungen ermöglichte (Abb. 2.11C, D).

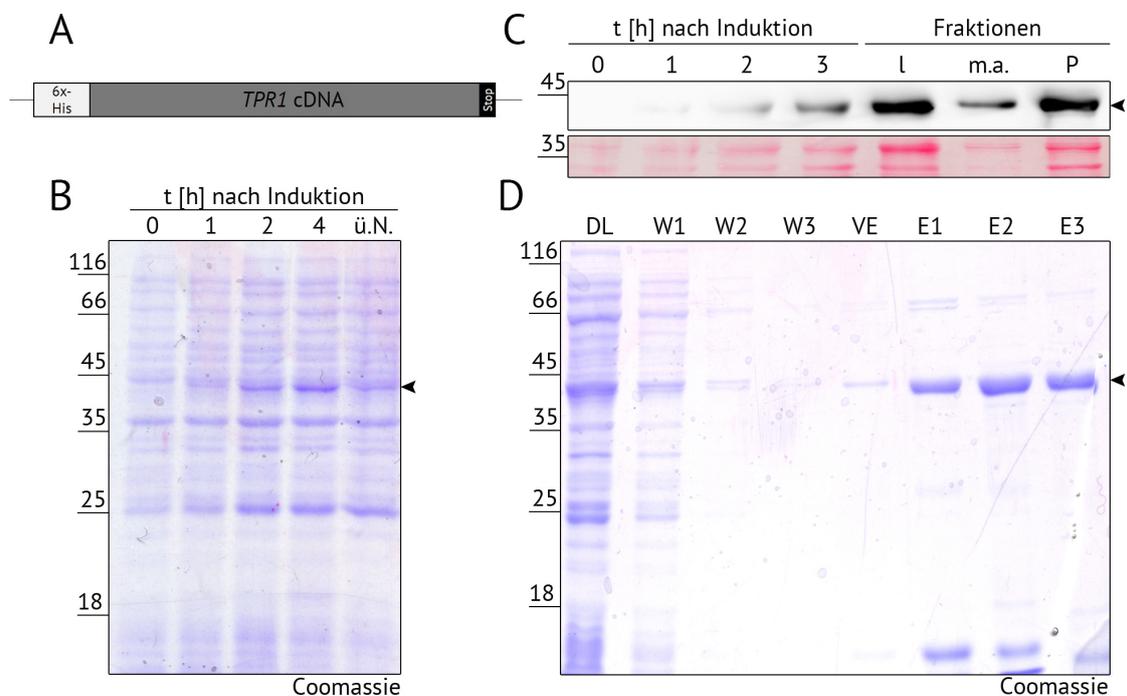


Abbildung 2.11. – Expression des rekombinanten 6xHis-TPR1 Proteins in *E. coli*. (A) Schematische Darstellung des erzeugten 6xHis-TPR1 Proteins, welches auf Grundlage der *AtTPR1* cDNA-Sequenz erzeugt und mit einem aminoterminalen Hexahistidin-Tag versehen wurde. (B) Analyse von *E. coli* pRIL Gesamtproteinextrakten vor und nach der Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG. Die Expression wurde über mehrere Stunden und nach über Nacht (ü.N.) Wachstum der Zellkultur verfolgt. Nach dem Auftrennen der Proteinproben mittels 12 %iger SDS-Gele, gefolgt von der Färbung mit Coomassie, konnte eine zusätzliche Bande (Pfeil) detektiert werden. (C) Immunologischer Nachweis des rekombinanten Proteins durch den His-Tag spezifischen Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression mit IPTG. Die Zellkultur wurde nach drei Stunden geerntet und in die lösliche (l), membranassoziierte (m.a.) und Pellet (P) Fraktion unterteilt. (D) Native Aufreinigung des exprimierten 6xHis-TPR1 Proteins. Das *E. coli* Lysat wurde auf eine Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix gegeben. Ungebundene Proteine wurden in der Durchflussfraktion (DF) aufgefangen, während unspezifisch gebundene Proteine durch mehrere Waschschritte (W1-W3) sowie eine Vorelution (VL) von der Säule gewaschen wurden. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte durch Imidazol (Elution1-3; E1-E3).

Für die Antikörperproduktion wurden insgesamt 2 mg des aufgereinigten 6xHis-TPR1 Proteins zur Immunisierung zweier Kaninchen verwendet. Nach Abschluss der Immunisierung wurden beide gewonnenen Seren gegen 1 µg des Antigens und ein Wildtyp (Col-0) Gesamtproteinextrakt getestet (Abb. 2.12). Unter Verwendung des Antigens konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa nachgewiesen werden, welches dem rekombinanten 6xHis-TPR1 Protein entsprach. Im Wildtyp Gesamtextrakt konnte mit beiden Seren auf Höhe von ca. 43 kDa eine Proteinbande detektiert werden, welche dem kalkulierten Molekulargewicht von TPR1 in *A. thaliana* entsprach. Beide Seren erzeugten weitere Signale über 50 kDa, welche vermutlich auf unspezifische Kreuzreaktionen zurückzuführen sind. Beide Seren zeigten eine vergleichbare Spezifität gegen das verwendete Antigen und wiesen wenige Kreuzreaktionen auf, weswegen beide in einer Verdünnung von 1:2000 ohne weitere Aufreinigung verwendet werden konnten.

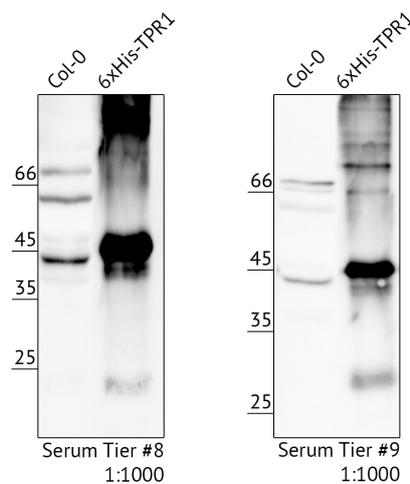


Abbildung 2.12. – Analyse zweier nach Abschluss der Immunisierung gewonnen Kaninchenserum. Zur Immunisierung zweier Kaninchen wurden 2 mg des aufgereinigten 6xHis-TPR1 Proteins verwendet. Die beiden gewonnenen Seren (# 08 und # 09) wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und gegen 1 µg des rekombinanten Proteins sowie ein Col-0 Gesamtproteinextrakt getestet. Die Proben wurden zuvor mit einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt.

2.2.3. Charakterisierung von TPR1 in *Arabidopsis thaliana*

Die Genexpression der meisten TBS-Enzyme ist lichtabhängig und unterliegt der diurnalen Kontrolle. Um zu prüfen, ob *TPR1* eine ähnliche Abhängigkeit zeigt, wurde der *TPR1*-Transkriptgehalt über einen Zeitraum von 24 h eines Standard-Kurztag untersucht. Die Genexpressionen von *HEMA1* und *PORB* wurden als Kontrollen mit bekanntem Muster verwendet [49]. Die Genexpression von *HEMA1* unterlag hierbei wie erwartet der diurnalen Kontrolle mit einem maximalen Transkriptgehalt zwei Stunden nach Beginn der Lichtphase und einem minimalen Transkriptgehalt zwei Stunden nach Beginn der Dunkelphase (Abb. 2.13A). Die Genexpression von *PORB* zeigte einen zu *HEMA1* vergleichbaren Verlauf. Das Maximum war allerdings im Vergleich zu *HEMA1* um vier Stunden in Richtung Tagesende verschoben (Abb. 2.13B). Im Vergleich dazu verändert sich der relative *TPR1*-Transkriptgehalt im Laufe eines Standard-Kurztag kaum und unterliegt somit keinem diurnalen Rhythmus (Abb. 2.13C). Vergleichbar zur *TPR1*-Expression konnte keine Veränderung des TPR1-Proteingehalts über den selben Zeitraum detektiert werden (Abb. 2.13E). Allerdings wurde für PORA/B ebenfalls keine signifikante Veränderung der Proteinakkumulation verzeichnet. Hierbei ist zu bemerken, dass der PORA/B Antikörper beide POR-Isoformen erkennen kann. Da PORA allerdings in adultem Gewebe kaum vorliegt, kann

davon ausgegangen werden, dass hier nur PORB detektiert wurde. Der Proteingehalt von GluTR1 stieg über den Tag hinweg an und erreichte das Maximum um 14:00 Uhr und war somit um vier Stunden zur maximalen Genexpression von *HEMA1* verschoben (Abb. 2.13E).

Nach drei Tagen in Dunkelheit oder Schwachlicht war die Genexpression von *TPR1* reprimiert, während sie unter Starklicht-Bedingungen im Vergleich zum Normallicht induziert wurde (Abb. 2.13D). Die *TPR1*-Expression zeigte somit eine direkte Abhängigkeit zur Lichtintensität. Darüber hinaus wurde die Repression oder Induktion durch ein kontinuierliches Lichtregime verstärkt (Abb. 2.13D).

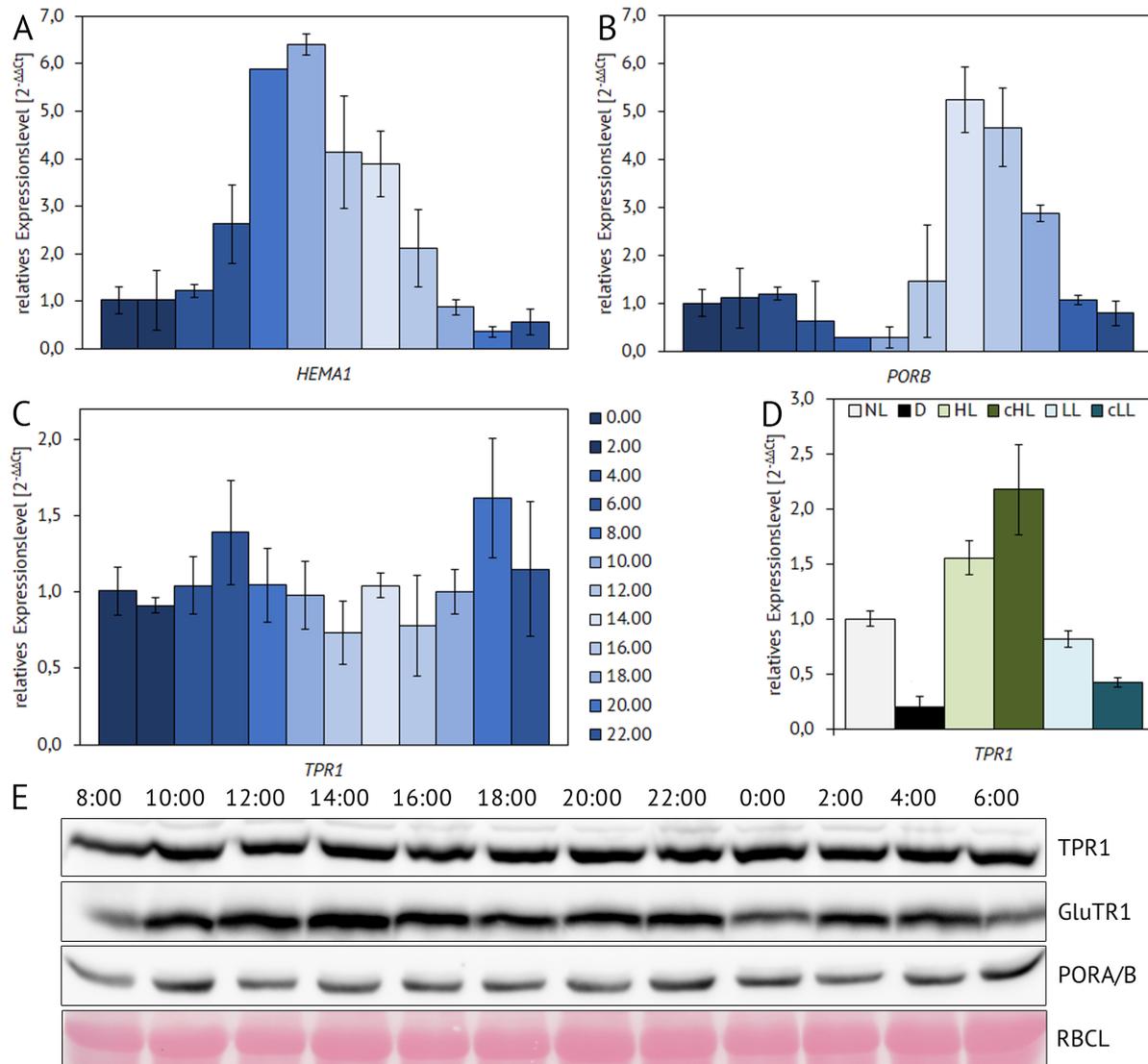


Abbildung 2.13. – Analyse des *TPR1* Transkript- und Proteingehalts im Wildtyp-Hintergrund innerhalb eines Standard-Kurztags. Arabidopsis Keimlinge wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. (A-C) Der mittels quantitativer PCR ermittelte Transkriptgehalt von *HEMA1*, *PORB* und *TPR1* wurde relativ zum Zeitpunkt 0:00 bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten berechnet. (D) Nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen wurden die verwendeten Wildtyp-Pflanzen für drei Tage verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt: Schwachlicht (LL), kontinuierliches Schwachlicht (cLL), Starklicht (HL) oder kontinuierliches Starklicht (cHL). Die gemessenen Transkriptgehalte wurden relativ zu den Werten unter Standard-Anzuchtbedingungen angegeben. (E) Immunologischer Nachweis der GluTR1, PORA/B und *TPR1* Proteingehalte im Verlauf eines Standard-Kurztags. Die Proben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben.

2.2.4. TPR1 ist ein chloroplastidäres, membranständiges Protein

Bereits in den anfänglichen *in silico* Untersuchungen zeigte sich, dass TPR1 aufgrund der vorhergesagten Transmembrandomäne höchstwahrscheinlich ein plastidäres Membranprotein ist. Darüber hinaus wurde TPR1 durch massenspektrometrische Untersuchung in isolierten Col-0 Thylakoidmembranen nachgewiesen [274]. Die Fraktionierung von intakten Chloroplasten bestätigte, dass TPR1 ausschließlich in der Membranfraktion vorliegt (Abb. 2.14A). LHCA1 und GSAT dienten als Markerproteine für die Membran- bzw. Stromafraktion. Hierbei fiel auf, dass mittels des TPR1-Antikörpers zwei spezifische Banden detektiert werden konnten: eine langsamer migrierende Bande auf Höhe von 43 kDa und eine schneller migrierende Bande auf Höhe von 40 kDa (Abb. 2.14A). Zur besseren Unterscheidung wurden diese zwei Banden in den weiterführenden Analysen als TPR1₄₃ und TPR1₄₀ bezeichnet. Das unterschiedliche Laufverhalten der beiden TPR1-Proteine könnte durch die zwei vorhergesagten TPR1 Splicing-Varianten erklärt werden. Weiterhin könnte eine Prozessierung von TPR1 im Chloroplasten ebenso die Ursache sein, wie posttranslationale Modifikationen.

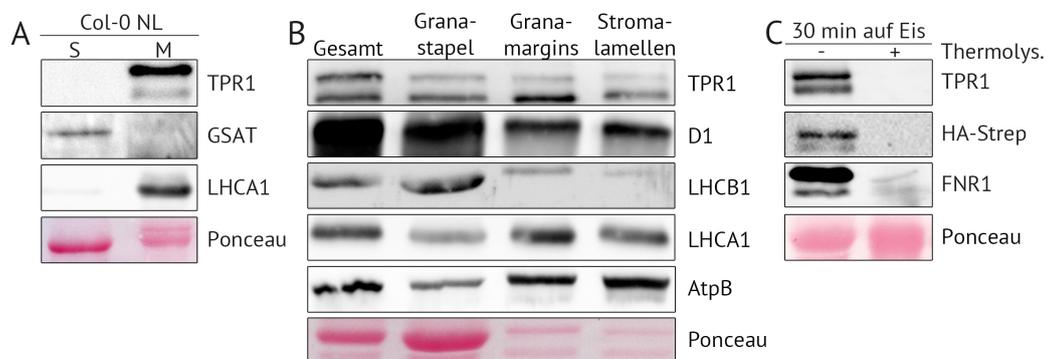


Abbildung 2.14. – Subzelluläre Lokalisation von TPR1 in intakten Chloroplasten und isolierten Thylakoidmembranen. (A) Fraktionierung von intakten Chloroplasten in Stroma- (S) und Membranfraktion (M). (B) Subfraktionierung von isolierten Thylakoidmembranen mittels Differenzialzentrifugation. (C) Thermolysinbehandlung von isolierten Thylakoidmembranen. Die Proben wurden für 30 min mit (+) und ohne (-) 500 µg Thermolysin auf Eis inkubiert. Alle Proben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulose Membran diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine wurden rechts neben den spezifischen immunologischen Signalen angegeben.

In fraktionierten Thylakoidmembranen konnte TPR1 in allen Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. 2.14B). Anders als im Gesamtchloroplastenextrakt war die Abundanz der TPR1₄₀-Bande in den isolierten Thylakoidmembranen deutlich erhöht (Abb. 2.14B). Eine mögliche Erklärung hierfür war, dass TPR1₄₃ auch in der Hüllmembran vorliegt, welche bei der Präparation der Thylakoidmembranen verloren ging. Während TPR1₄₃ in allen Subfraktionen gleichmäßig verteilt war, wurde TPR1₄₀ vor allem in den Grenzbereichen der Granastapel (Granamargins) detektiert (Abb. 2.14B). Die Untereinheiten des PSII, D1 und LHCB1, wurden vorrangig in den Granastapeln nachgewiesen. Komplexe wie beispielsweise PSI und die ATP-Synthase, welche hier durch LHCA1 bzw. die Beta Untereinheit (AtpB) repräsentiert wurden, sind durch ihre Größe sterisch an der Einwanderung in die Granastapel gehindert und liegen somit in den Granamargins und Stromalamellen vor (Abb. 2.14B). TPR1₄₀ co-fraktionierte in diesen Untersuchungen vor allem mit LHCA1, was ein Hinweis auf eine mögliche Co-Lokalisation mit PSI sein könnte. Um die genaue Ausrichtung von TPR1 in der Membran zu untersuchen, wurden isolierte Thylakoidmembranen einer *TPR1-HA*-Überexpressionslinie (Abschnitt 2.2.26) mit Thermolysin verdaut. Der carboxyterminal angefügte Hämagglutinin (HA)-Streptavidin (Strep)-Tag diente hierbei als

zusätzliche Kontrolle, da nicht bekannt war, an welchem Epitop der TPR1-Antikörper bindet. Nach einer 30 minütigen Behandlung von isolierten Thylakoidmembranen mit Thermolysin konnte weder TPR1 noch der HA-Strep-Tag immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 2.14C). Als zusätzliche Kontrolle wurde die im Stroma lokalisierte FNR1 verwendet. Die Ergebnisse der Thermolysinbehandlung sprechen für die Ausrichtung des carboxyterminalen Bereiches, welcher die TPR-Domäne enthält, in Richtung Stroma.

2.2.5. Selektion von *tpr1* Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

Für die weiterführenden Analysen hinsichtlich der Funktion von TPR1 in *Arabidopsis* wurden drei T-DNA-Insertionslinien mittels der Datenbank des Salk-Instituts (*Salk Institute Genomic Analysis Laboratory*) ausgewählt und vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* geordert. Die erste gewählte Linie (Salk_020398; *tpr1-1*) trägt die Insertion im ersten der 15 Introns des TPR1 kodierenden Gens *At1g78915* (Abb. 2.15A). Die zweite Linie (GK-885D01; *tpr1-2*) trug die Insertion in der 5' untranslatierten Region (5'-UTR), während in der dritten Linie (Salk_022668; *tpr1-3*) die T-DNA im 15ten der 16 Exons lag, was den Verlust der 23 letzten Aminosäuren verursachen sollte (Abb. 2.15A). Alle Untersuchungen der *tpr1*-Linien fanden im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp (Col-0) statt. Die verwendeten Linien wurden hinsichtlich der enthaltenen T-DNA selektiert. Die Homozygotie der T-DNA-Insertion wurde mittels spezifischer Primer bestätigt (Abb. 2.15B) und die Insertionsstelle wurde durch Sequenzierung verifiziert.

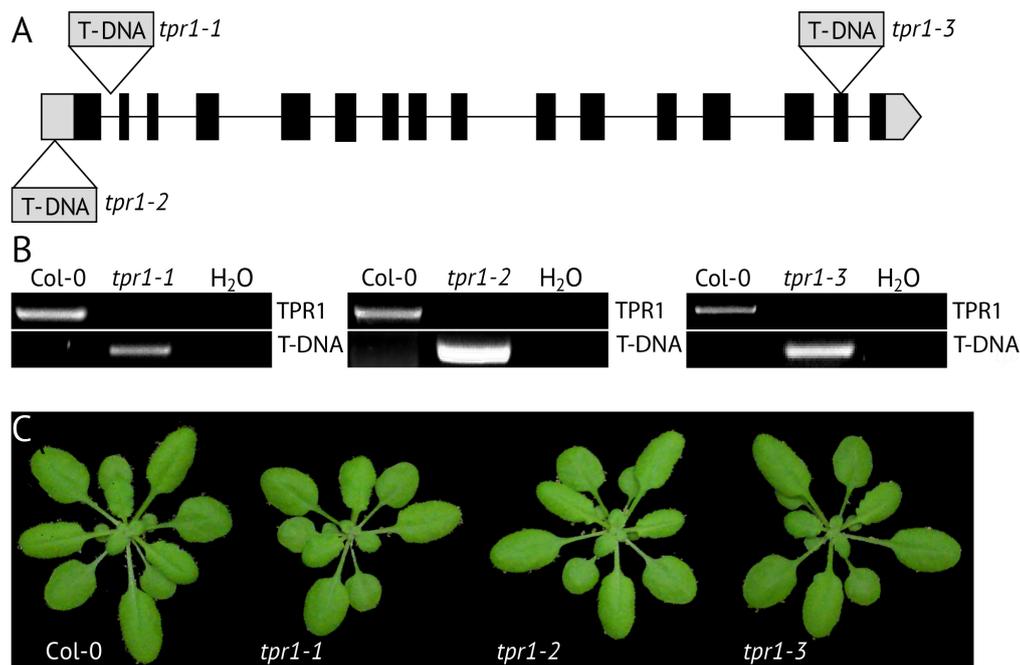


Abbildung 2.15. – Selektion dreier *tpr1* T-DNA-Insertionslinien in *Arabidopsis thaliana*. (A) Struktur des *At1g78915* Gens. Untranslatierte Bereiche wurden in hellgrauen, Exons in schwarzen Boxen dargestellt. Die dazwischenliegenden Introns sind durch schwarze Striche gekennzeichnet. Die Lage der T-DNA der jeweiligen *tpr1*-Linien sowie die in dieser Arbeit verwendeten Linienbezeichnungen wurden ebenfalls angegeben. (B) Nachweis der Homozygotie der T-DNA-Insertion in den drei *tpr1*-Linien mit Hilfe von spezifischen Primern. Es wurde eine genspezifische (TPR1) und eine T-DNA spezifische Primerkombination gewählt. Die Auftrennung der mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gewonnen Amplifikate erfolgte in einem 1 %igen Agarosegel. (C) Phänotyp von vier Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen, welche unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen wurden.

Unter Standard-Kurztagbedingungen wiesen alle drei T-DNA-Insertionslinien hinsichtlich Pigmentierung und Wuchs einen zum Wildtyp vergleichbaren makroskopischen Phänotyp auf (Abb. 2.15C). In allen drei *tpr1*-Linien wurde durch das Einfügen der T-DNA der *TPR1*-Transkriptgehalt auf unter 10 % des Wildtyp-Levels reduziert (Abb. 2.16A). In den Linien *tpr1-1* und *tpr1-2* konnte mit dem TPR1-Antikörper eine schwache Proteinbande nachgewiesen werden, deren Intensität bei 1 bzw. 7 % im Vergleich zum Wildtyp lag (Abb. 2.16B). In der *tpr1-3*-Linie konnte TPR1 nicht mehr detektiert werden (Abb. 2.16B). Somit handelt es sich bei *tpr1-1* und *tpr1-2* um starke *knockdown*-Linien, wohingegen *tpr1-3* höchstwahrscheinlich eine *knockout*-Linie ist. Darüber hinaus konnte damit bestätigt werden, dass der erzeugte Antikörper TPR1 spezifisch erkennt. In allen *tpr1*-Linien waren die Transkriptgehalte der weiteren TPR-Kandidaten kaum verändert (Abb. 2.16C). Lediglich in der *tpr1-3* Linie verdoppelte sich die *SG1*-Genexpression (Abb. 2.16C).

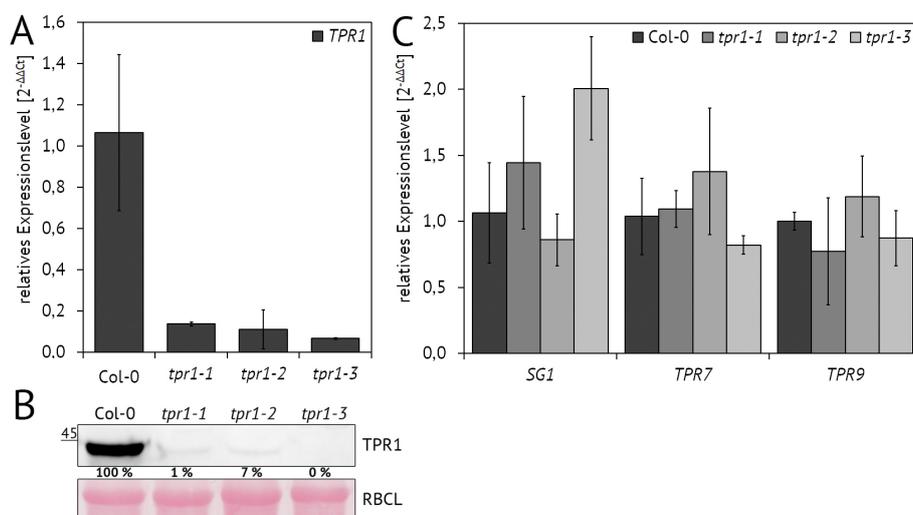


Abbildung 2.16. – Auswirkungen der T-DNA-Insertion auf die Genexpression und Proteinabundanz von TPR1 und weiteren TPR-Kandidaten. (A) Der mittels quantitativer PCR ermittelte *TPR1*-Transkriptgehalt in den drei selektierten *tpr1*-Linien wurde relativ zum Wildtyp bestimmt. (B) Immunologischer Nachweis des TPR1-Proteingehalts im Vergleich zu dem Wildtyp. Die Proben wurden mittels eines 12 %igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. (C) Der mittels quantitativer PCR ermittelte Transkriptgehalt der weiteren TPR-Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu Pitt in den *tpr1*-Linien wurde relativ zum Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus der Analyse von vier biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten berechnet.

Auf makroskopischer Ebene konnte kein Unterschied zwischen den drei *tpr1*-Linien und dem Wildtyp detektiert werden (Abb. 2.15C). Der Chlorophyllgehalt der *tpr1*-Linien bestätigte dies größtenteils (Abb. 2.17A). Lediglich die *TPR1* *knockout*-Linie *tpr1-3* wies eine leicht reduzierte Chlorophyllmenge auf (Abb. 2.17A). Das Chlorophyll a zu Chlorophyll b (Chl a/b) Verhältnis war allerdings in allen *tpr1*-Linien leicht reduziert (Abb. 2.17B). Eine Reduktion des Chl a/b-Verhältnisses würde für einen stärkeren Effekt auf die photosynthetischen Kernkomplexe als auf die Antennenkomplexen sprechen. Inwiefern sich die gemessenen Tendenzen auf die Photosyntheseleistung auswirkten, sollten die nachfolgenden Untersuchungen zeigen. Da die *TPR1*-Expression der Linie *tpr1-1* in späteren Generationen stark schwankte, was möglicherweise auf die Insertion im intronischen Bereich zurückzuführen ist, wurde diese Linie von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, sodass lediglich mit den Linien *tpr1-2* und *tpr1-3* weiter gearbeitet wurde.

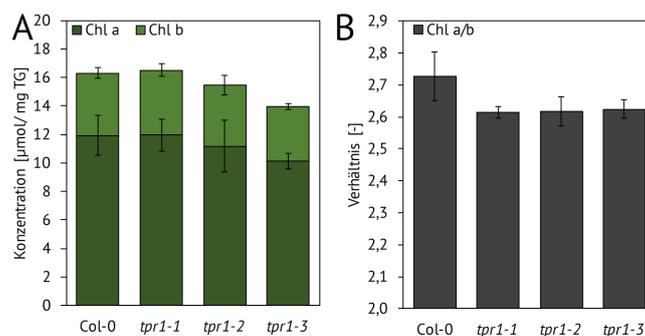


Abbildung 2.17. – Analyse der Chlorophyllgehalte in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp. (A) Nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen wurde der Chlorophyllgehalt mittels HPLC bestimmt und auf das verwendete Trockengewicht (TG) bezogen. (B) Aus den Chlorophyllgehalten wurde das Chl a/b Verhältnis errechnet. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten bestimmt.

2.2.6. Auswirkungen des TPR1-Verlustes auf die photosynthetische Leistung

Die photosynthetische Leistung von PSII wurde in den selektierten *tpr1*-Linien mittels Pulsamplitudenmodulation (PAM) in dunkel-adaptierten Pflanzen bestimmt. Die maximale (F_v/F_m) und effektive Quantenausbeute (Φ PSII) des PSII waren in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp unverändert (Tab. 2.3). Allerdings war das Nicht-Photochemische Quenching (NPQ) in beiden *tpr1*-Linien reduziert (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3. – Analyse der photosynthetischen Leistung von PSII mittels PAM in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Die vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Vor Beginn der Messung erfolgte eine 15 minütige Dunkeladaptation. Anschließend wurde die maximale Quantenausbeute (F_v/F_m), die effektive Quantenausbeute (Φ PSII) sowie das NPQ bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Parameter	Col-0	<i>tpr1-2</i>	<i>tpr1-3</i>
F_v/F_m	0,840 ± 0,004	0,837 ± 0,009	0,836 ± 0,003
Φ PSII	0,661 ± 0,034	0,693 ± 0,039	0,714 ± 0,013
NPQ	0,366 ± 0,023	0,263 ± 0,145	0,282 ± 0,024

Darüber hinaus war die Akkumulation der photosynthetischen Komplexe, welche mittels Blau-Nativen-Gelen analysiert wurden, in den *tpr1*-Linien wildtypartig (Abb. 2.18A). In Übereinstimmung damit wiesen alle untersuchten photosynthetischen Untereinheiten in den *tpr1*-Mutanten eine zum Wildtyp vergleichbare Abundanz auf (Abb. 2.18B). Einzig für CP47 wurde in beiden *tpr1*-Linien ein reduzierter Gehalt nachgewiesen (Abb. 2.18B). Für die Untersuchung der PSI-Leistung bot sich das 77K-Chlorophyllfluoreszenzverfahren an, da PSI bei Raumtemperatur nur zu einem vernachlässigbaren Anteil zur Chlorophyllfluoreszenz beiträgt. Die gemessene Fluoreszenz wurde relativ zur maximalen Fluoreszenz des PSII bei 687 nm normiert. Hier zeigte sich abermals, dass es keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den getesteten *tpr1*-Mutanten gab (Abb. 2.18C). In *Synechocystis* löst der Verlust von Ptt eine Destabilisierung des PSI aus. Im Unterschied dazu konnte kein vergleichbarer Effekt für das potenzielle Pitt-Homolog TPR1 in *Arabidopsis thaliana* verzeichnet werden. Darüber hinaus führte der Verlust von TPR1 zu keiner prägnanten Auswirkung auf die photosynthetische Leistung oder die Zusammensetzung der photosynthetischen Komplexe.

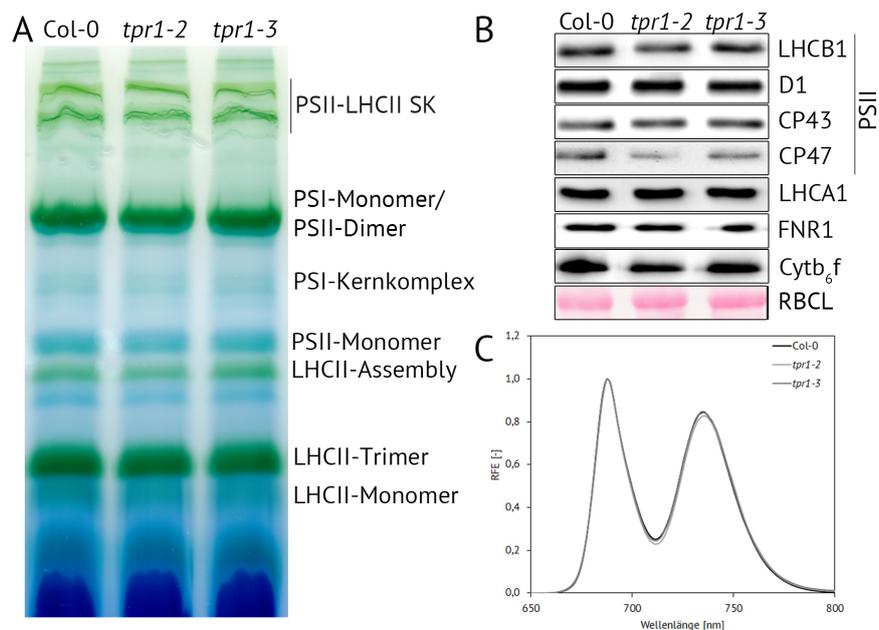


Abbildung 2.18. – Analyse der photosynthetischen Komplexe in isolierten Thylakoidmembranen sowie der photosynthetischen Leistung von PSI mittels 77K. (A) Thylakoidmembranen wurden aus fünf Wochen alten Rosettenpflanzen isoliert, mit 1 % DDM solubilisiert und mittels eines 4- 12 %igen BN-PAGE Gradientengels aufgetrennt. Es wurden hierbei Proteinproben mit gleicher Chlorophyllmenge eingesetzt. Die nachweisbaren photosynthetischen Komplexe sind rechts neben der jeweiligen Bande vermerkt. (B) Immunologischer Nachweis verschiedener photosynthetischer Untereinheiten in Gesamtproteinextrakten. Die Proben wurden mittels 12 %iger Harnstoff-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. (C) 77K-Chlorophyllfluoreszenz von fünf Wochen alten Arabidopsis Rosettenpflanzen. Die gemessene Chlorophyllfluoreszenz wurde auf die Fluoreszenz von PSII bei 687 nm normiert. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten dreier biologischer Replikate mit jeweils drei technischen Replikaten. RFE-relative Fluoreszenz Einheit.

2.2.7. Auswirkungen des TPR1-Verlustes auf die Tetrapyrrolbiosynthese

TPR1 war in verschiedenen Interaktionsstudien in der Lage physisch mit Enzymen des TBS-Weges zu interagieren. Dementsprechend wurde der Proteingehalt verschiedener Schlüsselenzyme der TBS in den *tpr1*-Linien untersucht. Besonderes Interesse galt hierbei den potenziellen Interaktionspartnern GluTR1, CHL27 und PORB. Die Proteingehalte von CHL27 und PORA/B waren in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.19). Im Falle von GluTR1 war der Proteingehalt hingegen deutlich erhöht (Abb. 2.19). Weiterhin war der FLU-Gehalt drastisch reduziert. Alle weiteren untersuchten Proteine der TBS zeigten entweder keine Beeinträchtigungen oder ein unterschiedliches Verhalten in den beiden gewählten *tpr1*-Linien. Der deutlich erhöhte GluTR1-Gehalt war überraschend, da beispielsweise die Überakkumulation von GluTR1 in Tabak zur Ausbildung von starken Nekrosen führte [155]. Der *HEMA1*-Transkriptgehalt war hingegen in den *tpr1*-Linien um 20 - 30 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.19B). Ähnliches konnte für den *CHL27*-Transkriptgehalt nachgewiesen werden (Abb. 2.19B). Im Vergleich dazu stieg die *PORB*-Transkriptmenge in beiden *tpr1*-Linien leicht an (Abb. 2.19B). Neben den drei potenziellen Interaktionspartnern von TPR1 wurde auch die Genexpression von *FLU* und *LIL3.1* untersucht, welche in den *tpr1*-Linien allerdings unverändert im Vergleich zum Wildtyp war (Abb. 2.19B). Die veränderten Proteingehalte waren daher nicht auf einen veränderten Transkriptgehalt zurückzuführen. Somit wurde die Stabilität der Proteine posttranslational durch das Fehlen von TPR1 beeinflusst. Einzige Ausnahme war hierbei CHL27, da der reduzierte Proteingehalt durch die reduzierte Genexpression erklärt werden könnte.

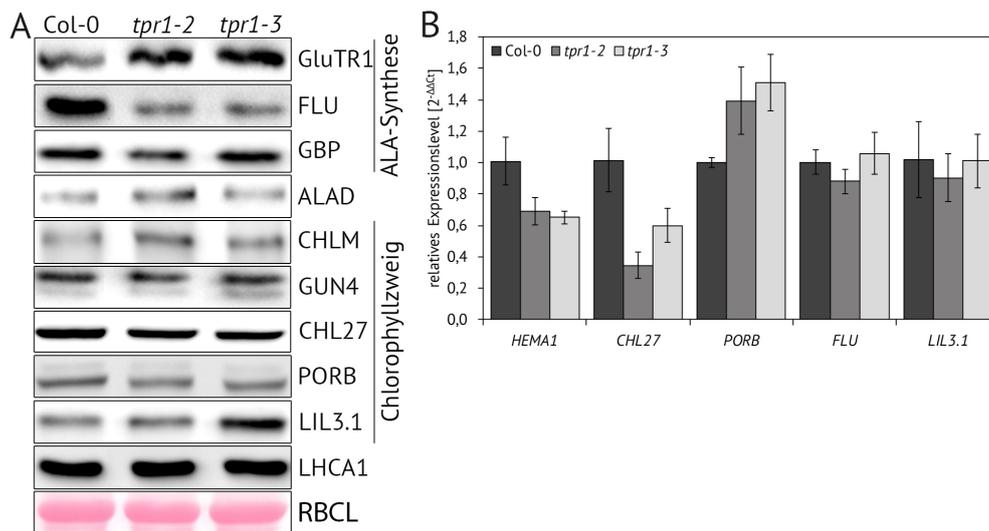


Abbildung 2.19. – Analyse der Proteinabundanz (A) und Genexpression (B) verschiedener Enzyme und akzessorischer Proteine der TBS. Die verwendeten Arabidopsis Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Zwei Stunden nach Belichtungsbeginn wurden die hier verwendeten Proben entnommen. (A) Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt. (B) Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurden relativ zu den Werten des Wildtyps bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt.

Eine veränderte Stabilität der Enzyme des Chlorophyllzweigs wirkt sich häufig auf die *steady state* Gehalte der TBS-Intermediate aus. Die Gehalte von MgP und MgProtoME waren in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.20A, B). Da zum Zeitpunkt der Ernte, zwei Stunden nach Belichtungsbeginn, die Mengen dieser beiden Intermediate allerdings gering waren und großen Schwankungen unterlagen (Abb. 2.20A, B), konnte keine eindeutige Aussage hierzu getroffen werden. Die PChlid-Gehalte war in beiden *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.20C), während der Chlid-Gehalt lediglich in der *tpr1-3*-Linie reduziert war (Abb. 2.20D). Die veränderten PChlid- und Chlid-Gehalte der *tpr1*-Linien deuteten auf eine Beeinträchtigung der PORA/B-Aktivität hin, was in Übereinstimmung mit dem reduzierten PORA/B Proteingehalt war. Allerdings wurde in beiden *tpr1*-Linien eine ähnliche Veränderung des PORA/B Gehalts detektiert, während nur die *tpr1-3*-Linie einen reduzierten Chlid-Gehalt aufwies. Die veränderten Intermediatgehalte hatten indes nur schwache Auswirkungen auf die Akkumulation von Chlorophyll (Abb. 2.17A). Möglicherweise war der gemessene Gehalt an Chlid in der *tpr1-3*-Linie ausreichend, um den minimalen Bedarf dieses Intermediats für die Synthese von Chlorophyll zu decken.

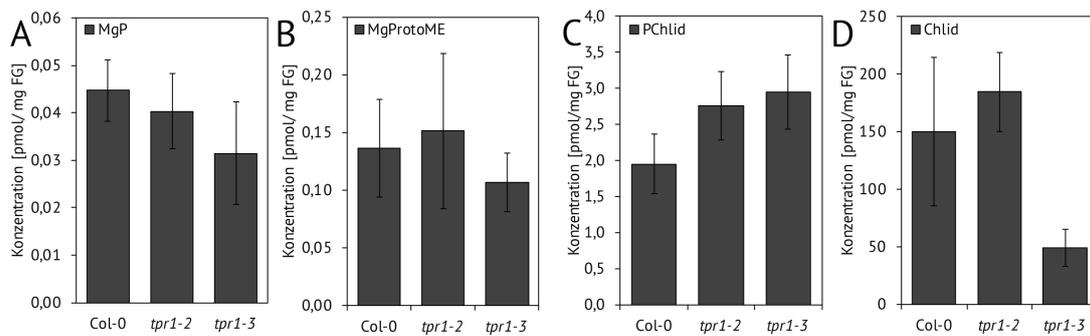


Abbildung 2.20. – *Steady state* Gehalte der Intermediate des Chlorophyllzweiges. Nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen wurden die Mengen der angegebenen Intermediate mittels HPLC bestimmt und auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) bezogen. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten bestimmt.

2.2.8. TPR1 beeinflusst die Lokalisation von GluTR1

Der erhöhte GluTR1-Proteingehalt war die wohl auffälligste Veränderung in der *tpr1*-Mutante. GluTR1 ist ein dual lokalisiertes Enzym, welches sowohl in der löslichen als auch membrangebundenen Fraktion vorliegt. In beiden *tpr1*-Linien war der lösliche Anteil von GluTR1 drastisch erhöht, während der membrangebundene Anteil nur leicht erhöht war (Abb. 2.21A). Im Vergleich dazu hatte das Fehlen von TPR1 kaum Auswirkungen auf die duale Lokalisation von GBP (Abb. 2.21A). Schmied *et al.* konnten nachweisen, dass die lösliche Fraktion von GluTR1 die aktive Fraktion ist [93]. In Übereinstimmung damit war in beiden *tpr1*-Linien die ALA-Synthesekapazität stark erhöht (Abb. 2.21B). Die erhöhte ALA-Synthesekapazität führte indes nicht zu einer Veränderung der *steady state* ALA-Gehalte in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.21C). Darüber hinaus konnte ausgeschlossen werden, dass die wildtypartigen ALA-Gehalte durch einen erhöhten Umsatz von ALA zu PBG durch ALAD verursacht wurden, da die ALAD-Aktivität in beiden *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp unverändert war (Abb. 2.21D).

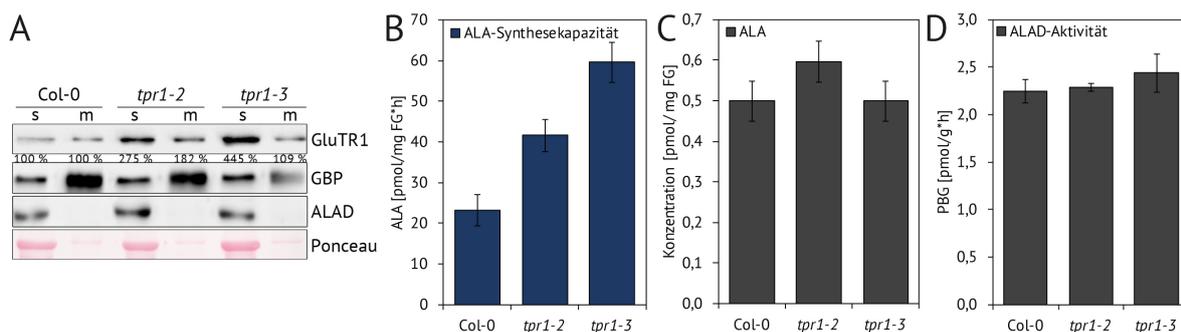


Abbildung 2.21. – *Analyse der ALA-Synthese.* Für die Analysen wurden vier Wochen alte Arabidopsis Pflanzen verwendet, welche unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen wurden. (A) Subfraktionierung von Gesamtproteinextrakten in die löslichen (*soluble*; s) und membrangebundenen (m) Fraktionen. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt. Die Intensität der Chemolumineszenz wurde relativ zur korrespondierenden Wildtyp-Fraktion mittels der AIDA Software bestimmt. (B) Die ALA-Synthesekapazität wurde nach vier Stunden Inkubation mit Lävulinsäure unter Standardlicht (120 μ E) relativ zum eingesetzten Frischgewicht (FG) bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden jeweils drei biologische Replikate mit je zwei technischen Replikaten verwendet. (C) Die gemessene ALA-Menge wurde relativ zum eingesetzten Frischgewicht bestimmt. Pro Linie wurden vier biologische Replikate vermessen. (D) Für die Bestimmung der ALAD-Aktivität wurde die Produktion von PBG über einen Zeitraum von 60 min verfolgt und auf das eingesetzte Frischgewicht bezogen.

Während Dunkelphasen wird GluTR1 inaktiviert. Diese Inaktivierung wird zum einen durch die Bindung durch FLU zum anderen durch den Abbau von GluTR1 durch das Clp-Proteasom vermittelt. Dieser proteolytische Abbau kann dabei durch Zugabe von ALA verstärkt werden. Eine wichtige Voraussetzung für eine zuverlässige Aussage über die GluTR1-Abbauraten war ein vergleichbares Ausgangslevel für das Enzym. Da dies unter Standard-Kurztagbedingungen für die *tpr1*-Linien nicht gewährleistet werden konnte, wurde zuvor überprüft, wie sich der GluTR1-Proteingehalt unter kontinuierlichen Lichtbedingungen verhielt. Nach drei Tagen in kontinuierlichem Licht war der GluTR1-Gehalt beider *tpr1*-Linien im Vergleich zur Anzucht unter Standard-Kurztagbedingungen deutlich reduziert und wies nun einen zum Wildtyp vergleichbaren Gehalt auf (Abb. 2.22A). Durch die anschließende Dunkelinkubation von Blattscheiben in Puffer mit und ohne ALA wurde der Abbau von GluTR1 induziert. In beiden *tpr1*-Linien war die Abbauraten von GluTR1 hierbei vergleichbar zum Wildtyp, was darauf hinwies, dass der durch das Clp-Proteasom vermittelte Abbau von GluTR1 nicht der Auslöser für die erhöhte Stabilität von GluTR1 in den beiden *tpr1*-Linien unter Standard-Kurztagbedingungen war (Abb. 2.22B). Dennoch deutet der wildtypartige GluTR1-Gehalt in den *tpr1*-Linien unter kontinuierlichen Lichtbedingungen darauf hin, dass das Vorhandensein einer Nachtphase einen Einfluss auf die Stabilität von GluTR1 in den *tpr1*-Linien hat.

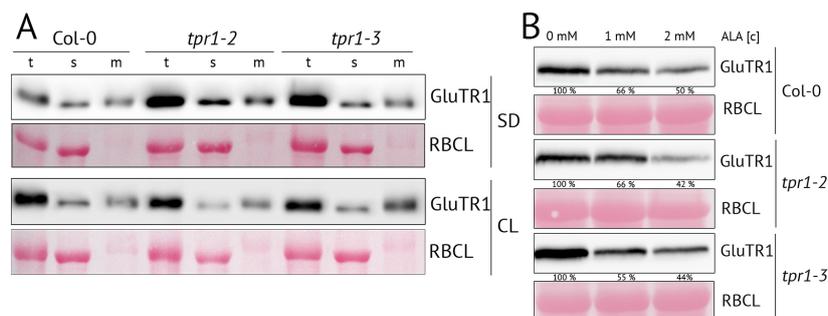


Abbildung 2.22. – Analyse der GluTR1-Stabilität in den *tpr1*-Linien. (A) Untersuchung der subzellulären Lokalisation von GluTR1 unter verschiedenen Lichtregimen. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (SD) angezogen, gefolgt von drei Tagen in kontinuierlichem Licht (120 μ E). Anschließend wurde der Gesamtproteinextrakt in lösliche (*soluble*; s) und membrangebundene (m) Fraktionen aufgeteilt. (B) Nachweis des GluTR1-Abbaus nach vier Stunden in Dunkelheit. Das verwendete Blattmaterial wurde in Puffer mit den angegebenen ALA-Konzentrationen inkubiert. Alle Proben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine sind rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt. Die Intensität der Chemolumineszenz wurde relativ zur korrespondierenden Wildtyp-Fraktion mittels der AIDA Software bestimmt.

2.2.9. Analysen der Dunkelinkubation der Tetrapyrrolbiosynthese in *tpr1*-Linien

Die reduzierte Chlid-Menge in der *tpr1-3*-Linie war ein Hinweis auf eine reduzierte POR-Aktivität infolge des TPR1-Verlustes. Um die POR-Aktivität *in planta* zu bestimmen wurde die von Biswal *et al.* publizierte Methode angewandt [275]. Die verwendeten Pflanzen wurden dabei zuerst einer sechsständigen Dunkelphase ausgesetzt und anschließend für 10 min im Licht (120 μ E) inkubiert. Vor und nach der 10 minütigen Inkubation im Licht wurden die PChlid- und Chlid-Gehalte bestimmt. Nach sechsständiger Dunkelinkubation waren die Gehalte beider Intermediate in den *tpr1*-Linien entweder wildtypartig oder im Vergleich zum Wildtyp verringert (Abb. 2.23A). Nach 10 min im Licht konnte ein zum Wildtyp vergleichbarer Umsatz von Chlid in den beiden *tpr1*-Linien nachgewiesen werden (Abb. 2.23B). Die *tpr1 knockout*-Linie *tpr1-3* wies überraschenderweise eine erhöhte POR-Aktivität auf (Abb. 2.23B).

Allerdings sollte hierbei bemerkt werden, dass es sich nur um die Annäherung an die tatsächliche POR-Aktivität handelt. Nichtsdestotrotz sprechen die Ergebnisse gegen eine Beeinträchtigung der POR-Aktivität durch das Fehlen von TPR1 *in planta*.

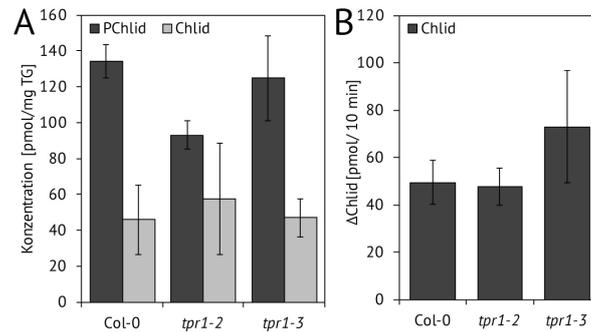


Abbildung 2.23. – Bestimmung der POR-Aktivität nach Biswal *et al.* Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für sechs Stunden in Dunkelheit inkubiert. (A) Die angegebenen Intermediatgehalte wurden mittels HPLC bestimmt und auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (B) Differenz der Chlid-Mengen nach sechs Stunden in Dunkelheit, gefolgt von 10 min bei 100 μ E. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Darüber hinaus konnte mit dieser Methode nachgewiesen werden, dass in den *tpr1*-Linien nach sechsstündiger Dunkelinkubation die FLU-vermittelte Inaktivierung der TBS nicht beeinträchtigt war. Andernfalls wäre eine stärkere Anreicherung von PChlid zu verzeichnen gewesen. Um dennoch auszuschließen, dass die langfristige Inaktivierung der TBS durch FLU in den *tpr1*-Linien verändert war, wurden die *tpr1*-Linien für fünf Tage in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Akkumulation der TBS-Intermediate und -Endprodukte bestimmt. Nach fünf Tagen in Dunkelheit waren die *tpr1*-Linien makroskopisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 2.24A). Allerdings war der Gesamtchlorophyllgehalt der *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert, wovon Chlorophyll a und Chlorophyll b gleichermaßen betroffen waren (Abb. 2.24B, C). Der reduzierte Chlorophyllgehalt wurde dabei nicht durch eine Reduktion der PChlid- oder Chlid-Gehalte verursacht, da diese Intermediate in beiden *tpr1*-Linien wildtypartig waren (Abb. 2.24D). MgP und MgProtoME konnten nach fünf Tagen in Dunkelheit nicht mehr mittels HPLC detektiert werden.

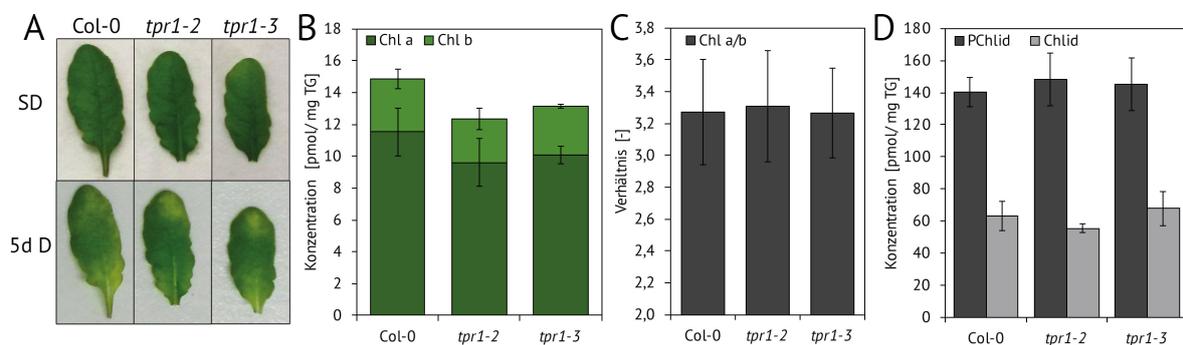


Abbildung 2.24. – Analyse der Akkumulation von TBS-Intermediaten und Endprodukten nach fünf-tägiger Dunkelinkubation. (A) Phänotyp vor und nach der Dunkelinkubation. Nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (SD) wurden die verwendeten Linien für fünf Tage in Dunkelheit (5d D) inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde der Phänotyp detektiert. (B-D) Chlorophyll- und Intermediatgehalte. Die angegebenen Intermediat- und Endproduktgehalte wurden mittels HPLC bestimmt und auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Das Chl a/b Verhältnis wurde aus den ermittelten Chlorophyllgehalten berechnet. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten bestimmt.

2.2.10. Der Einfluss von TPR1 auf die Lokalisation der Tetrapyrrolbiosynthese-Enzyme

Neben der Aktivität und Abundanz der TBS-Enzyme spielt auch deren subzelluläre Lokalisation eine entscheidende Rolle bei der Regulation der TBS. Da das membranständige TPR1-Protein mit verschiedenen membranassoziierten Enzymen der TBS interagiert, sollte geprüft werden, ob TPR1 die Lokalisation von GluTR1, CHL27 und PORB in isolierten Thylakoidmembranen beeinflusste. Im Falle von GluTR1 zeigte sich, dass nur in der *tpr1-2*-Linie ein reduzierter GluTR1-Proteingehalt an der Thylakoidmembran beobachtet werden konnte, während dieser Gehalt in der *tpr1-3*-Linie wildtypartig war (Abb. 2.25). Diese Veränderung in der *tpr1-2*-Linie konnte allerdings durch die Abundanz von FLU erklärt werden, da auch FLU einen leicht reduzierten Proteingehalt aufwies (Abb. 2.25). Im Vergleich dazu schienen die Proteingehalte von TPR1 und PORA/B direkt miteinander verbunden zu sein, da mit sinkendem TPR1-Gehalt auch die Abundanz von PORA/B an den Thylakoidmembranen abnahm (Abb. 2.25). Ein ähnliches Verhalten konnte für die Komponenten des Cyclasekomplexes, CHL27 und YCF54, beobachtet werden (Abb. 2.25). Jedoch bestand dabei kein direkter Zusammenhang zwischen dem TPR1-Gehalt und der Abundanz der Komponenten. Im Kontrast dazu hatte der Verlust von TPR1 keinen Einfluss auf die Lokalisation von CHLM oder membranintegralen Proteinen, wie beispielsweise LHCA1 (Abb. 2.25).

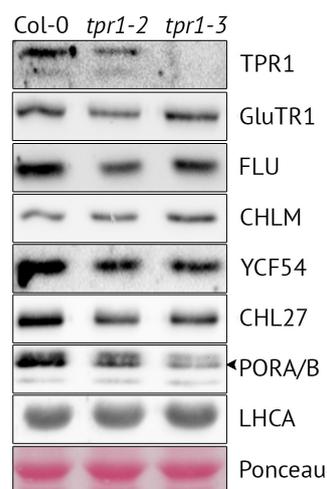


Abbildung 2.25. – Analyse der Abundanz verschiedener Enzyme und Hilfsproteine der TBS in isolierten Thylakoidmembranen. Die dabei verwendeten Rosettenpflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Die isolierten Thylakoidmembranen wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulosemembran diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt. Im Falle von PORA/B konnten verschiedene Banden detektiert werden. Die PORB-spezifische Bande wurde mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

TPR1 beeinflusste somit die subzelluläre Lokalisation von CHL27 und PORA/B. Aufgrund der verwendeten Methode konnte allerdings keine Aussage über den löslichen Anteil dieser Proteine getroffen werden, da dieser aufgrund der Präparation zu stark verdünnt war. Unter Verwendung der durch Schmied *et al.* publizierten Methode zur Subfraktionierung von Gesamtproteinextrakt konnte weder CHL27 noch PORA/B in der löslichen Phase detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es ist somit fraglich, ob in den *tpr1*-Linien der Gehalt an CHL27 und PORA/B im Stroma zunahm.

2.2.11. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten

Für einen detaillierteren Einblick in den Aufbau und die Struktur der Thylakoidmembranen in den *tpr1*-Linien wurden transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von Chloroplasten drei Wochen alter *Arabidopsis thaliana* Pflanzen angefertigt. Da im Falle einer veränderten Struktur der Thylakoidmembranen für die *tpr1-3*-Linie die deutlichsten Unterschiede erwartet wurden, wurde diese Linie im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Sowohl die Gesamtstruktur der Chloroplasten als auch die Struktur der Thylakoidmembranen waren in der *tpr1-3*-Linie wildtypartig (Abb. 2.26). Interessanterweise wiesen einige der *tpr1-3* Chloroplasten eine Anhäufung von Vesikeln auf, welche sich zwischen der Hüllmembran und den Thylakoidmembranen befand (Abb. 2.26). Bei diesen Anhäufungen von stromalen Vesikeln handelt es sich höchstwahrscheinlich um sogenannte Vesikelcluster [276].

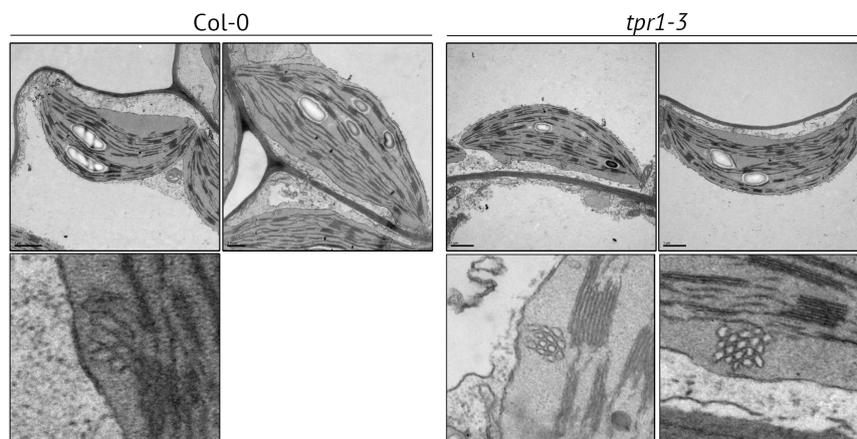


Abbildung 2.26. – TEM Aufnahmen von *Arabidopsis* Chloroplasten. Nach drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen wurde adultes Blattgewebe von Col-0 und *tpr1-3* Pflanzen geerntet. Die angegebene Skalierung entspricht 1 μm . Die Aufnahmen entstanden in Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Geimer an der Universität Bayreuth.

Die Vesikelcluster lagen in 38 % aller untersuchten Chloroplasten der *tpr1-3*-Linie vor, während im gleichbehandelten Wildtyp lediglich ein einziges solches Cluster gefunden wurde (Tab. 2.4). Wildtyp Chloroplasten enthielten insgesamt zwischen 2-6 Vesikel, wohingegen die Chloroplasten der *tpr1-3*-Linie zwischen 3 - 17 Vesikel aufwiesen (Tab. 2.4). Dabei waren die Vesikel in der *tpr1-3*-Linie im Durchmesser etwas kleiner als im Wildtyp (Tab. 2.4). Die Gründe für die Entstehung von Vesikelclustern wurden bislang nicht zweifelsfrei geklärt. Allerdings nimmt die Häufigkeit solcher Cluster im Wildtyp bei niedrigen Temperaturen oder unter Bedingungen mit hohem oxidativen Stress zu [276]. Weiterhin können die Inhibierung der Vesikelfusion und ein erhöhter Lipidumsatz die Bildung von Vesikelclustern auslösen [230, 276].

Tabelle 2.4. – Analyse der in TEM Aufnahmen von *Arabidopsis* Chloroplasten beobachteten Vesikel. Alle nachgewiesenen Vesikel in den erzeugten TEM Aufnahmen von drei Wochen alten *Arabidopsis* Pflanzen wurden in diese Auswertung mit einbezogen. Im Wildtyp (Col-0) wurden dabei insgesamt 19 Vesikel in 29 Chloroplasten gefunden, während in der *tpr1-3*-Linie 45 Vesikel in 21 Chloroplasten vorlagen. Eine Anhäufung von mehr als fünf Vesikeln wurde dabei als Vesikelcluster eingeordnet.

Parameter	Col-0	<i>tpr1-3</i>
Häufigkeit der Vesikelcluster	3,45 % (1/29)	38,10 % (8/21)
Maximale Anzahl der Vesikel pro Cluster	6	17
Durchmesser der Vesikel [μm]	$0,061 \pm 0,019$	$0,053 \pm 0,015$

2.2.12. Analyse des Lipidstoffwechsels und der Vesikelbildung in *tpr1* Mutanten

Eine mögliche Ursache für die Entstehung von Vesikelclustern kann ein erhöhter Umsatz von Lipiden im Chloroplasten sein. Dies kann im Zusammenhang mit einer erhöhten Lipidsynthese und/oder mit einem erhöhten Abbau von Fettsäuren stehen. Aus diesem Grund wurde der relative Transkriptgehalt verschiedener Enzyme der Lipidsynthese (Abb. 2.27) und des Fettsäureabbaus (Abb. 2.28) bestimmt. Da in der *tpr1-3*-Linie die deutlichsten Unterschiede erwartet wurden, wurde diese Linie für die nachfolgenden Messungen verwendet. In der *tpr1-3*-Mutante war die relative Genexpression der MGDG-Synthasen 2 und 3 (MGD2/3) sowie der DGDG-Synthasen 1 und 2 (DGD1/2) im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.27B, C). Die Genexpressionen der MGDG-Synthase 1 (MGD1) sowie der Fettsäuredesaturasen 5 und 6 (FAD5/6) waren in der *tpr1-3*-Linie hingegen wildtypartig (Abb. 2.27B, D). Auffällig war hierbei, dass vor allem die Genexpression für Enzyme, welche ausschließlich in der äußeren Hüllmembran vorliegen, erhöht war (Abb. 2.27A). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Synthese von DGDG in der äußeren Hüllmembran erhöht ist [277, 278].

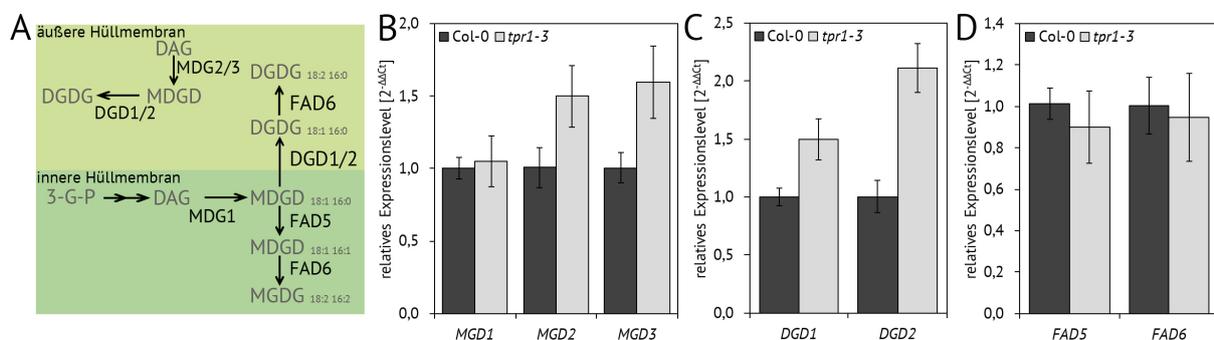


Abbildung 2.27. – Genexpression verschiedener Enzyme der plastidären Lipidsynthese. (A) Übersicht über die nachgewiesenen Schlüsselenzyme der Lipidsynthese in Chloroplasten. In der äußeren Hüllmembran wird Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) durch die MGDG-Synthasen 2 und 3 (MGD2/3) aus Diacylglycerin (DAG) synthetisiert. Anschließend wird MGDG durch die Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)-Synthasen 1 und 2 (DGD1/2) in DGDG umgewandelt. In der inneren Hüllmembran wird DAG aus Glycerin-3-phosphat (3-G-P) synthetisiert und daraufhin durch MGD1 in MGDG umgewandelt. Durch verschiedene Fettsäuredesaturasen (FADs) werden ungesättigte Doppelbindungen in MGDG eingebaut. Die Entsättigung der Doppelbindungen von DGDG findet hingegen ausschließlich in der äußeren Hüllmembran statt, weswegen MGDG in die äußere Hüllmembran importiert und dort durch DGD1/2 in DGDG umgewandelt wird. Darauf folgend kann die Ausbildung der ungesättigten Doppelbindungen von DGDG stattfinden. Die subzelluläre Lokalisation der hier angegebenen Enzyme wurde aus Li *et al.* entnommen [279]. (B-C) Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte von *MGD1-3* (B), *DGD1/2* (C) sowie *FAD5/6* (D) wurden relativ zum Wildtyp bestimmt. Die dabei verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

Darüber hinaus wurden die relativen Transkriptgehalte dreier Enzyme der Oxylipinsynthese untersucht, welche für den Abbau von Fettsäuren zuständig sind: 13-Lipoxygenase 3 (LOX3), Allenoxidsynthase (AOS) und Allenoxid-Synthase-Cyclase (AOC). Die korrespondierenden Transkripte dieser drei Enzyme wiesen in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp einen leicht erhöhten Gehalt auf (Abb. 2.28B). Somit war sowohl die Synthese als auch der Abbau von Lipiden bzw. Fettsäuren in der TPR1-defizienten Mutante erhöht, was eine erhöhte Häufigkeit von Vesikeln verursachen könnte. Ob und wie sich die veränderten Genexpressionen auf die Aktivität und Stabilität der korrespondierenden Enzyme auswirkte, konnte in dieser Arbeit nicht getestet werden.

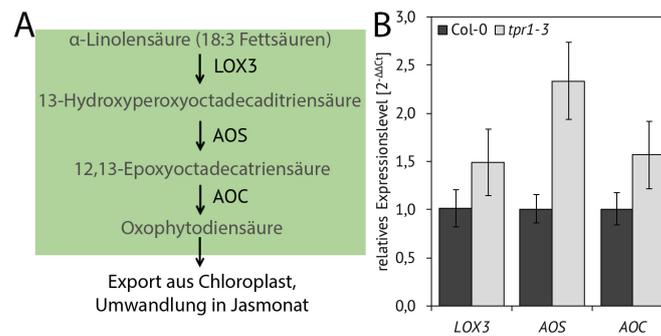


Abbildung 2.28. – Genexpression von Enzymen der Oxylipinsynthese. (A) Übersicht über die Enzyme der Oxylipinsynthese. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie α -Linolensäure werden durch die 13-Lipoxygenase 3 (LOX3) in 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure umgewandelt. Anschließend katalysiert die Allenoxidsynthase (AOS) die Synthese von 12,13-Epoxyoctadecatriensäure, welche daraufhin durch die Allenoxid-Synthase-Cyclase (AOC) in Oxophytodiensäure umgewandelt wird. Die gebildete Oxophytodiensäure wird aus dem Chloroplasten exportiert und zur Synthese von Jasmonat verwendet [280]. (B) Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte von Enzymen der Oxylipinsynthese wurden relativ zum Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

Neben der erhöhten Lipidsynthese kann auch eine inhibierte Vesikelfusion die Ursache für das erhöhte Auftreten von stromalen Vesikeln sein. In den letzten Jahren wurden mehrere Faktoren identifiziert, welche einen Einfluss auf die Fusion und Translokation von Vesikeln haben [230]. Unter anderem sind die zwei plastidären RAS-verwandten Proteine mit GTPase Aktivität, chloroplastic secretion-associates Rat sarcoma-related protein (CPSAR1) und chloroplastic Rat sarcoma-related Ara-1 (CPRabA5e), für die Ausbildung von Vesikeln an der Chloroplasten-hüllmembran zuständig [281]. Weiterhin wurden THYLAKOID FORMATION 1 (THF1) und VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS 1 (VIPP1) als wichtige Faktoren der Abspaltung und Fusion von Vesikeln identifiziert [281]. In der *tpr1-3*-Linie konnte für alle korrespondierenden Gene dieser Faktoren ein wildtypartiger Transkriptgehalt nachgewiesen werden (Abb. 2.29). Lediglich der *VIPP1*-Transkriptgehalt war in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.29). Somit war die erhöhte Ausbildung oder inhibierte Fusion von plastidären Vesikeln wahrscheinlich nicht der Grund für die erhöhte Häufigkeit der Vesikelcluster in der *tpr1-3*-Linie.

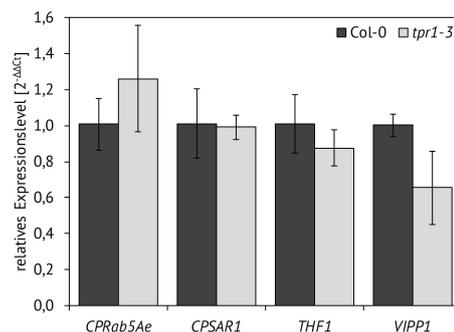


Abbildung 2.29. – Analyse der Genexpression von Faktoren, welche mit der Ausbildung und Fusion von plastidären Vesikeln assoziiert sind. Der mittels quantitativer PCR nachgewiesene Transkriptgehalt wurde in adulten Pflanzen nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen relativ zum Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. CPSAR1 - chloroplastic secretion-associates Rat sarcoma-related protein; CPRabA5e - chloroplastic Rat sarcoma-related Ara-1; THF1 - THYLAKOID FORMATION 1; VIPP1 - VESICLE-INDUCING PROTEIN IN PLASTIDS 1.

2.2.13. Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies in adulten Pflanzen

Der Nachweis von ROS, wie Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, erfolgte in adulten Arabidopsis Blättern mittels spezifischer Farbstoffe. Für die Anfärbung von Wasserstoffperoxid wurde der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Wasserstoffperoxid oxidiert DAB in Anwesenheit von Peroxidasen, was in der Produktion eines braunen Präzipitats resultierte. Superoxidanionen wurden durch den Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) angefärbt, welcher in Verbindung mit Superoxidanionen einen dunkelblauen Formazankomplex ausbildete. Weiterhin wurde der Transkriptgehalt verschiedener ROS-Markergene unter Standard-Kurztagbedingungen analysiert. Unter normalen Anzuchtbedingungen (120 µE) war in den *tpr1*-Linien sowohl der Gehalt an Superoxidanionen als auch Wasserstoffperoxid im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.30A). Darüber hinaus waren die Transkriptgehalte der Markergene des allgemeinen oxidativen Stresses sowie für Wasserstoffperoxid, mit Ausnahme von *Ferritin*, in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.30B). Die Markergene für Singulett-Sauerstoff, *ATPase* und *BAP1*, wiesen hingegen in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Genexpression auf (Abb. 2.30B). Die Anreicherung von ROS sowie die veränderte Genexpression von ROS-Markergenen könnte somit im Zusammenhang mit der erhöhten Häufigkeit von Vesikeln und Vesikelclustern in den *tpr1-3* Chloroplasten stehen.

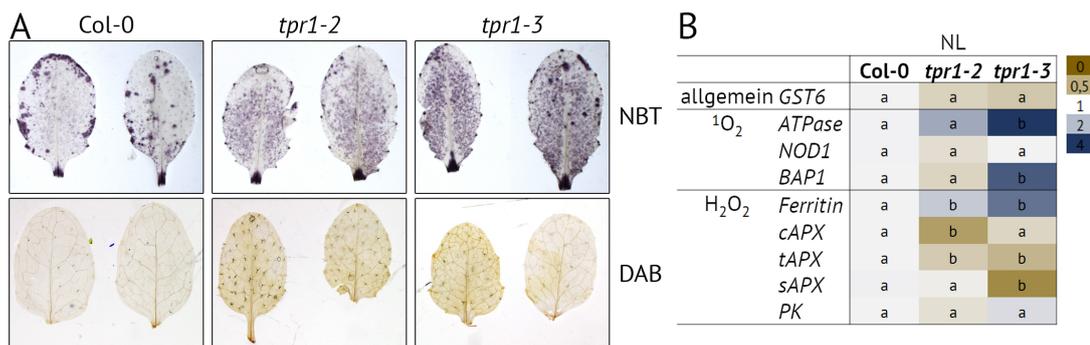


Abbildung 2.30. – Nachweis von ROS in adultem Blattgewebe. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. (A) Anfärbung von ROS. Der Nachweis von Superoxidanionen erfolgte mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), während Wasserstoffperoxid mit Diaminobenzidin (DAB) angefärbt wurde. (B) Genexpression verschiedener ROS-Markergene. Die mittels quantitativer PCR ermittelten Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp bestimmt. Die Einteilung der Markergene wurde gemäß Woodson *et al.* vorgenommen [271]. Die angegebene statistische Auswertung wurde für jedes Gen auf Grundlage von vier biologischen Replikaten ermittelt (*two-way* ANOVA, Bonferroni Post-hoc-Test, $p < 0,05$).

2.2.14. Analyse der *tpr1*-Linien unter erhöhten Lichtintensitäten

Der erhöhte Gehalt an Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid unter moderaten Lichtintensitäten führte zu der Frage, ob möglicherweise erhöhte Lichtintensitäten eine makroskopische Veränderung in der *tpr1*-Linien verursachen könnten. Nach drei Tagen unter erhöhten Lichtintensitäten (450 μE) waren die *tpr1*-Linien jedoch makroskopisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 2.31A). In Übereinstimmung mit dem makroskopischen Phänotyp waren die Gehalte der TBS-Intermediate und -Endprodukte in den *tpr1*-Linien wildtypartig (Abb. 2.31B-F). Lediglich die PChlid-Gehalte waren in beiden *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.31D). Im Unterschied zu moderaten Lichtintensitäten konnte bei 450 μE keine Reduktion von Chlid in der *tpr1-3*-Linie nachgewiesen werden (Abb. 2.31E). Überraschenderweise waren unter erhöhten Lichtintensitäten die Transkriptgehalte der meisten ROS-Markergene in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert (Abb. 2.31G). Lediglich für *GST6* und *NOD1* konnte ein leicht reduzierter Transkriptgehalt nachgewiesen werden. Die wildtypartigen Transkriptgehalte der ROS-Markergene sprachen somit gegen eine weitere Anreicherung von ROS in den *tpr1*-Linien unter erhöhten Lichtintensitäten im Vergleich zu moderaten Lichtintensitäten.

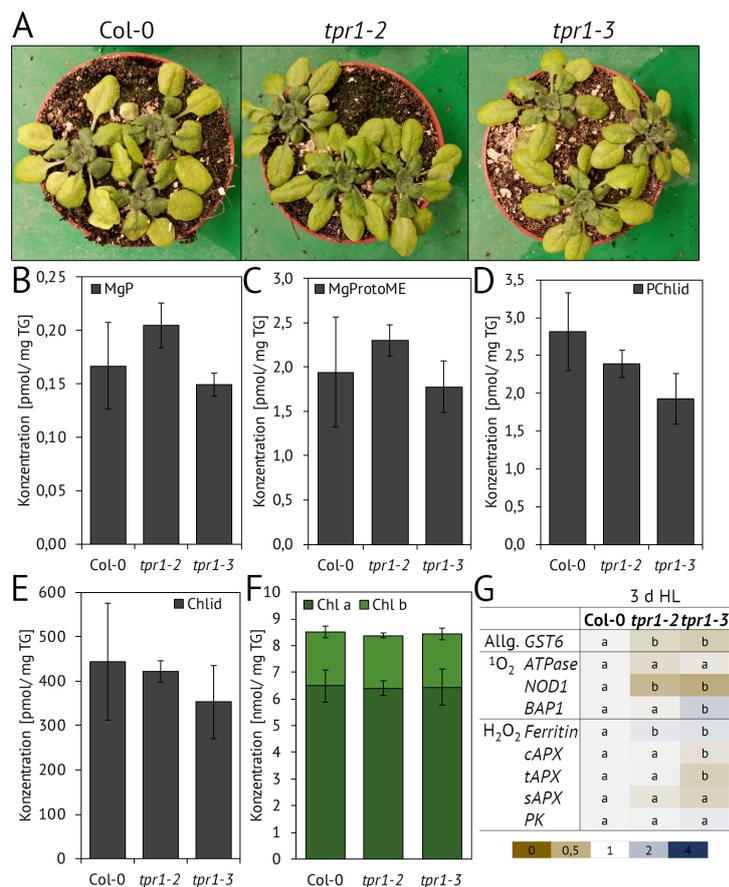


Abbildung 2.31. – Untersuchung der *tpr1*-Linien unter erhöhten Lichtintensitäten. Die verwendeten Pflanzen wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μE) angezogen und anschließend für drei Tage erhöhten Lichtintensitäten (450 μE) ausgesetzt. (A) Nach drei Tagen unter erhöhten Lichtintensitäten wurde der Phänotyp festgehalten. (B-E) Die Intermediat- und Endproduktgehalte wurden mittels HPLC bestimmt und auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. (F) Das Chl a/b Verhältnis wurde aus den nachgewiesenen Chlorophyllgehalten berechnet. (G) Die mittels quantitativer PCR detektierten Transkriptgehalte der verschiedenen ROS-Markergene wurden relativ zum gleichbehandelten Wildtyp bestimmt. Die angegebene statistische Auswertung jedes Gens wurde auf Grundlage von vier biologischen Replikaten vorgenommen (*two-way* ANOVA, Bonferroni Post-hoc-Test, $p < 0,05$).

2.2.15. Einfluss von TPR1 auf die Etiolierung und Ergrünung von Keimlingen

Das Fehlen von TPR1 verursachte die Anreicherung von ROS in adultem Gewebe, was allerdings zu keiner sichtbaren Veränderung der Blattpigmentierung im Vergleich zum Wildtyp führte. Eine Erklärung hierfür war, dass die Auswirkungen des erhöhten oxidativen Stresses in adultem Gewebe effizient durch entgiftende Komponenten kompensiert werden konnten. Aufgrund dessen wurde überprüft, ob in den *tpr1*-Linien ROS auch in früheren Entwicklungsstadien akkumulierte und ob dies zu einer makroskopischen Veränderung führte. Darüber hinaus beeinflusste TPR1 die subzelluläre Lokalisation von POR sowie die Umsetzung von PChlid zu Chlid unter Standard-Anzuchtsbedingungen. Da POR das Schlüsselenzym der Etiolierung in Angiospermen ist, wurde überprüft, ob das Fehlen von TPR1 die Abundanz und Aktivität von POR während dieser Entwicklungsstadien beeinflusste. Aus diesem Grund wurden Arabidopsis Keimlinge für sechs Tage in Dunkelheit angezogen. Anschließend erfolgte die Analyse der PChlid-Akkumulation mittels Fluoreszenzmikroskopie und HPLC. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde die *flu*-Mutante als eine zusätzliche Kontrolle einbezogen. In der *flu*-Mutante reicherte sich wie erwartet eine große Menge PChlid nach einer sechstägigen Anzucht in Dunkelheit an, was durch die fehlende Inhibierung der ALA-Synthese ausgelöst wurde (Abb. 2.32A). Im Vergleich dazu waren die PChlid-Gehalte in den *tpr1*-Linien wildtypartig (Abb. 2.32A). Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Inaktivierung der TBS während der Etiolierung in den *tpr1*-Linien nicht beeinträchtigt war. Mittels HPLC wurde allerdings ein leicht erhöhter PChlid-Gehalt in beiden *tpr1*-Mutanten bestimmt (Abb. 2.32B).

77K-Fluoreszenzanalysen von etiolierten Kotyledonen erlaubten einen detaillierteren Einblick in die Zusammensetzung der verschiedenen PChlid-Spezies nach Böddie *et al.* [218] (Abb. 2.32C). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde hier nur die Fluoreszenz der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Abb. 2.32C). Es wurde deutlich, dass die relative Fluoreszenz ab 650 nm in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp reduziert war (Abb. 2.32C). Darüber hinaus war das nach Masuda *et al.* bestimmte Verhältnis von photoaktivem ($F_{657\text{ nm}}$) zu nicht-photoaktivem ($F_{633\text{ nm}}$) PChlid [222] in beiden *tpr1*-Linien reduziert (Abb. 2.32D). Der reduzierte Anteil an photoaktivem PChlid konnte dabei nicht vollständig auf einen reduzierten PORA/B-Gehalt zurückgeführt werden. Zwar wies die *tpr1-3*-Linie einen reduzierten PORA/B-Proteingehalt auf, allerdings zeigte die Linie *tpr1-2* einen vergleichbar verminderten PChlid-Gehalt, während der PORA/B-Gehalt wildtypartig war (Abb. 2.32D, E). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der reduzierte Anteil an photoaktivem PChlid ausschließlich durch einen reduzierten PORA/B-Gesamtproteingehalt verursacht wurde. Da photoaktives PChlid dem oligomeren POR-PChlid-NADPH-Komplex entspricht [217], bestand die Möglichkeit, dass durch das Fehlen von TPR1 die Ausbildung des oligomeren, photoaktiven POR-PChlid-NADPH-Komplexes gestört wurde.

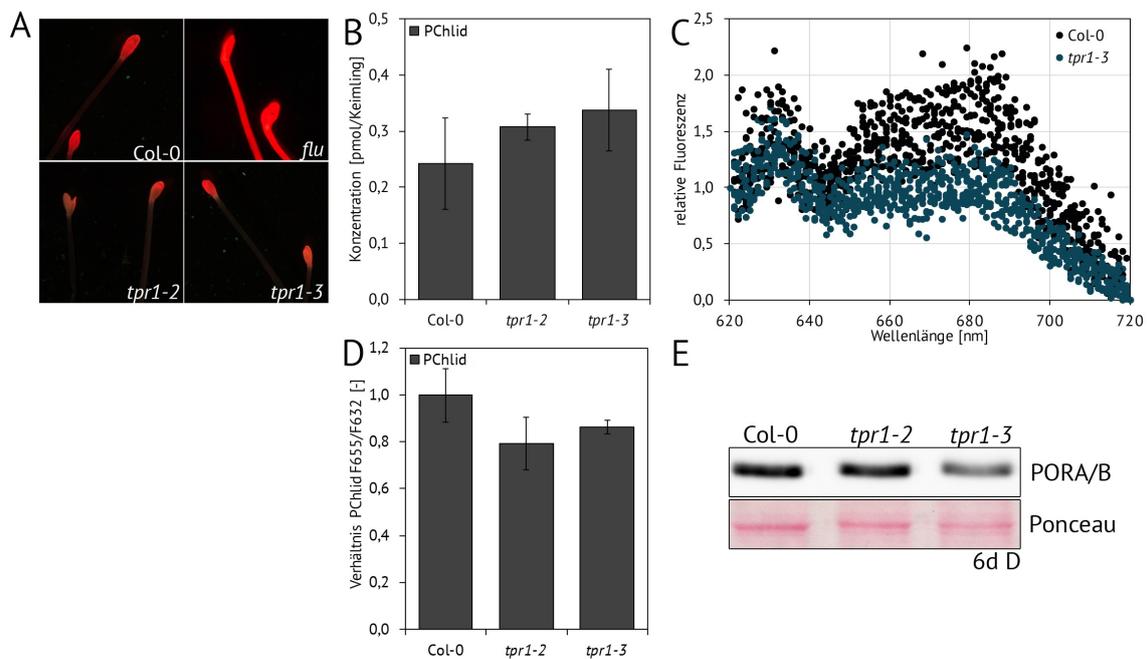


Abbildung 2.32. – Analyse der PChlid-Akkumulation in sechs Tage alten etiolierten Arabidopsis Keimlingen. Die verwendeten Linien wurden nach einem vierstündigen Lichtimpuls für sechs Tage in Dunkelheit angezogen. (A) Nachweis des PChlid-Gehalts mittels Fluoreszenzmikroskopie. Durch Anregung mit blauem Licht wurde die Rot-Fluoreszenz von PChlid sichtbar gemacht. Neben dem Wildtyp (Col-0) und den beiden *tpr1*-Linien wurde die *flu*-Mutante als Positivkontrolle einbezogen. (B) Die mittels HPLC bestimmten PChlid-Gehalte wurden auf die Anzahl der geernteten Keimlingen bezogen. (C) 77K-Fluoreszenzspektroskopie von PChlid in etiolierten Keimlingen. Die Fluoreszenz wurde bei $\lambda = 433\text{ nm}$ angeregt und zwischen 620 - 720 nm detektiert. Die PChlid-Fluoreszenz wurde auf das Maximum bei 620 nm normiert. Es wurden hier die Messwerte von drei biologischen Replikaten mit je drei technischen Replikaten angegeben. (D) Verhältnis von photoaktivem ($F_{655\text{ nm}}$) zu nicht-photoaktivem ($F_{632\text{ nm}}$) PChlid. Das angegebene Verhältnis wurde aus den mittels 77K bestimmten Fluoreszenzen ermittelt. (E) Immunologischer Nachweis des PORA/B Proteingehalts nach sechs Tagen in Dunkelheit (6d D). Die Proben wurden mittels eines 12 %igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrozellulosemembran wurde als Ladekontrolle verwendet.

Um die Auswirkungen des reduzierten Anteils an photoaktivem PChlid auf die Deetiolierung zu untersuchen, wurden Keimlinge nach sechstägiger Dunkelinkubation kontinuierlichem Licht ($90\ \mu\text{E}$) ausgesetzt. Bereits nach 24 h im Licht wiesen über 80 % der Wildtyp-Keimlinge geöffnete, grüne Kotyledonen auf (Abb. 2.33A, B). Im Kontrast dazu lag dieser Anteil in beiden *tpr1*-Linien nach 24 h bei 20 %, während die übrigen Keimlinge geschlossene, gelbliche Kotyledonen besaßen (Abb. 2.33A, B). Nach 48 h in kontinuierlichem Licht waren nahezu alle Keimlinge des Wildtyps ergrünt, wohingegen sich der Anteil an grünen Keimlingen in beiden *tpr1*-Linien auf ca. 50 % erhöhte. Somit wiesen beide *tpr1*-Linien eine verlängerte Ergrünungsphase auf. Nach drei bis vier Tagen in kontinuierlichem Licht waren in beiden *tpr1*-Linien nahezu alle Keimlinge ergrünt (Daten nicht gezeigt). Der makroskopische Phänotyp nach 24 h im Licht konnte durch die mittels HPLC bestimmten Chlorophyllgehalte untermauert werden (Abb. 2.33C). Hiervon waren Chlorophyll a und b gleichermaßen betroffen (Abb. 2.33D).

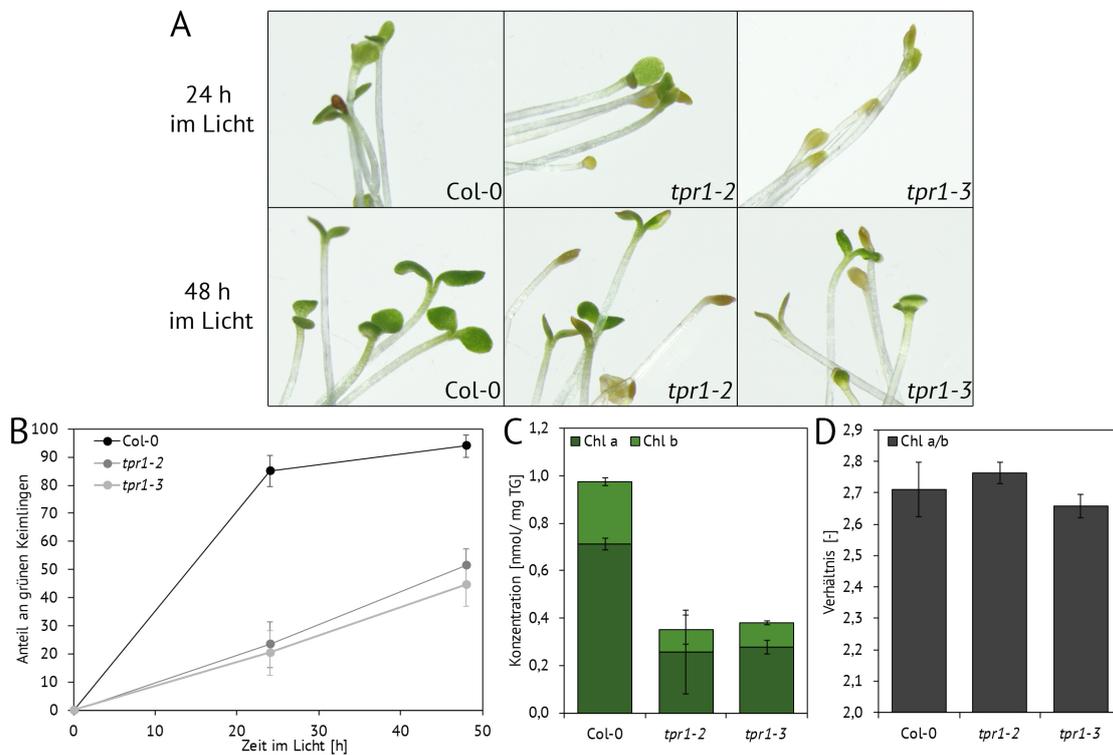


Abbildung 2.33. – Untersuchung von deetiolierten Keimlingen nach 24 bzw. 48 h in kontinuierlichem Licht. Die verwendeten Keimlinge wurden nach einem vierstündigen Lichtimpuls für sechs Tage in Dunkelheit angezogen und anschließend für 24 bzw. 48 h in kontinuierlichem Licht (90 μ E) inkubiert. (A) Phänotyp der Keimlinge nach 24 bzw. 48 h im Licht. (B) Ergrünungsrate. Der Anteil an grünen Keimlingen wurde relativ zur Gesamtanzahl der gekeimten Samen bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden jeweils mindestens 150 Keimlinge pro angegebenem Zeitpunkt und Linie ausgezählt. (C) Die mittels HPLC nachgewiesenen Chlorophyllgehalte nach 24 h in kontinuierlichem Licht wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (C) Ermitteltes Verhältnis von Chlorophyll a zu b. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten bestimmt.

Die Verzögerung der Ergrünung wurde nicht ausschließlich durch eine Reduktion der GluTR1 und PORA/B Proteingehalte hervorgerufen (Abb. 2.34A). Zwei Stunden nach dem Transfer ins Licht war der Gehalt an PORA/B wildtypartig, während bereits zu diesem Zeitpunkt ein leicht erhöhter GluTR1-Gehalt in beiden *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden konnte (Abb. 2.34A). Darüber hinaus wurden die Transkriptgehalte verschiedener TBS-Gene sowohl nach sechs Tagen in Dunkelheit als auch nach 1, 2 und 24 h in kontinuierlichem Licht untersucht (Abb. 2.34B). Nach sechs Tagen in Dunkelheit war lediglich der *CHL27*-Transkriptgehalt in beiden *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert, während alle weiteren Transkripte ein wildtypartiges Level aufwiesen (Abb. 2.34B). Nach 1 bis 2 h im Licht waren die Transkriptgehalte von *GSAT*, *HEMA1* und *PORA* in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp und der *tpr1-2*-Linie reduziert (Abb. 2.34B). Nichtsdestotrotz zeigte die Induktion der Genexpression durch Licht in allen Linien vergleichbare Tendenzen und war in beiden *tpr1*-Mutanten spätestens nach 24 h auf Wildtyp-Niveau. Somit konnte eine veränderte Genexpression während der Deetiolierung als Ursache für die verzögerte Ergrünung ausgeschlossen werden.

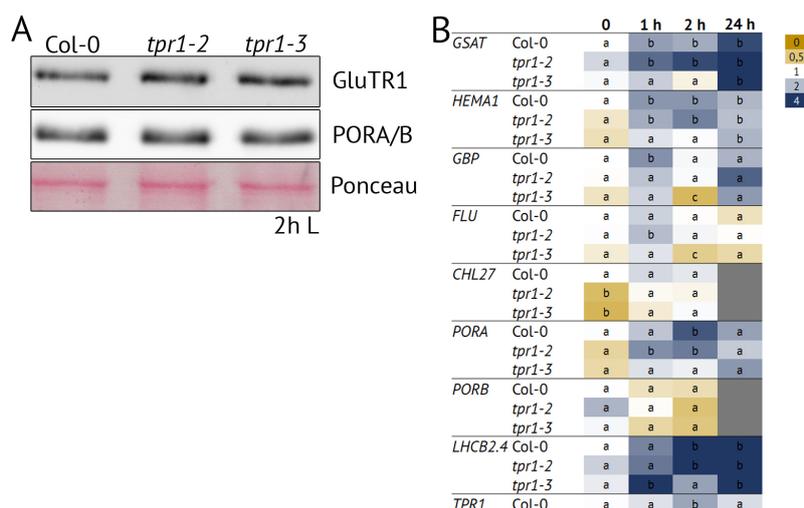


Abbildung 2.34. – Analyse der Proteingehalte (A) und Genexpression (B) von TBS-Enzymen und Hilfsproteinen während der Deetioliierung. (A) Immunologischer Nachweis von GluTR1 und PORA/B. Die Proteingehalte wurden nach sechs Tagen der Etiolierung, gefolgt von zwei Stunden im Licht (90 μ E), bestimmt. Die Proben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrozellulosemembran diente als Ladekontrolle. (B) Die mittels quantitative PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp nach sechs Tagen in Dunkelheit (Zeitpunkt 0) bestimmt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach dem Transfer in kontinuierliches Licht (90 μ E) genommen. Für *CHL27* und *PORB* konnte die Genexpression nach 24 h in kontinuierlichem Licht aufgrund von zu starken Schwankungen nicht ausgewertet werden. Die angegebene statistische Auswertung für jedes Gen wurde auf Grundlage von vier biologischen Replikaten vorgenommen (*two-way* ANOVA, Bonferroni Post-hoc-Test, $p < 0,05$).

Ein veränderter Protein- oder Transkriptgehalt von PORA/B konnte als Hauptursache für die verzögerte Ergrünung ausgeschlossen werden. Allerdings kann die reduzierte Anreicherung von photoaktivem PChlid in den *tpr1*-Linien einen reduzierten Chlorophyllgehalt in den ersten Stunden nach Belichtung verursachen. Darüber hinaus wird der ternäre POR-PChlid-NADPH-Komplex unter Belichtung in den POR-Chlid-NADPH-Komplex umgewandelt, welcher ein starker Energiequencher für Chlid ist [107]. Der reduzierte Gehalt an photoaktivem PChlid könnte somit eine unzureichende Ausbildung dieses Energiequenchers verursachen, was wiederum eine erhöhte Photooxidation von Chlid und die Anreicherung von ROS auslösen kann.

2.2.16. Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies während der Deetioliierung

Um zu überprüfen, ob der reduzierte Gehalt von photoaktivem PChlid in den *tpr1*-Linien zu erhöhter Anreicherung von ROS führte, was wiederum die verzögerte Ergrünung verursachen könnte, wurde die Anreicherung verschiedener ROS in deetiolierten Keimlingen überprüft. Nach fünf Tagen in Dunkelheit, gefolgt von 16 h in kontinuierlichem Licht, wurden verschiedene ROS zum einen direkt im verwendeten Material angefärbt, zum anderen wurde der Transkriptgehalt verschiedener ROS-Markergene überprüft. Für den direkten Nachweis von ROS wurden neben dem Wildtyp weitere Kontrolllinien verwendet, um die mögliche Ursache der Sauerstoffspezies einzugrenzen. Zum einen wurde die *flu*-Mutante als Positivkontrolle für die Anreicherung von Singulett-Sauerstoff in Folge der Akkumulation von PChlid verwendet [282]. Zum anderen wurde die *knockout porb-2*-Mutante verwendet, welche einen verringerten Chlid-Gehalt aufwies und in welcher darüber hinaus der Aufbau des PLBs verändert sein sollte [111]. Mit Hilfe des *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG) Fluoreszenzfarbstoffs wurde Singulett-Sauerstoff in den Keimlingen nachgewiesen. Durch die parallele Detektion der Chlorophyll-Autofluoreszenz konnte außerdem die Lokalisation des Singulett-Sauerstoffs überprüft werden. Wildtyp-Keimlinge

zeichneten sich dabei durch eine starke Chlorophyll-Autofluoreszenz und keinen nachweisbaren Singulett-Sauerstoff aus (Abb. 2.35). In beiden *tpr1*-Linien wurde eine reduzierte Chlorophyll-Autofluoreszenz detektiert (Abb. 2.35), was in Übereinstimmung mit den zuvor bestimmten Chlorophyllgehalten war (Abb. 2.33C). Ferner akkumulierte in beiden *tpr1*-Linien vor allem in der Blattperipherie Singulett-Sauerstoff (Abb. 2.35). Hierbei fiel auf, dass besonders in der *tpr1-3*-Linie die SOSG-Signale nicht gleichmäßig in den betroffenen Bereichen verteilt waren, sondern ein fleckenartiges Muster aufwiesen. Neben den beiden *tpr1*-Linien verfügten auch die *flu* und *porb-2* Keimlinge über eine reduzierte Chlorophyll-Autofluoreszenz (Abb. 2.35). In der *flu*-Mutante wurde die erwartete Anhäufung von Singulett-Sauerstoff nachgewiesen, welche vor allem in Bereichen mit hoher Chlorophyll-Autofluoreszenz vorlag (Abb. 2.35). In der *porb-2*-Mutante hingegen konnte ein zu den *tpr1*-Linien vergleichbares Muster der SOSG-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 2.35). Zwar akkumuliert in allen untersuchten Linien mit Ausnahme des Wildtyps Singulett-Sauerstoff, allerdings unterschied sich die Verteilung von Bereichen mit einem hohen Anteil an Singulett-Sauerstoff zwischen der *flu*-Mutante und den beiden *tpr1*-Linien bzw. der *porb-2*-Mutante. Somit wurde bereits an diesem Punkt vermutet, dass das Fehlen von TPR1 und PORB einen vergleichbaren Effekt auf die Deetiologie hatte.

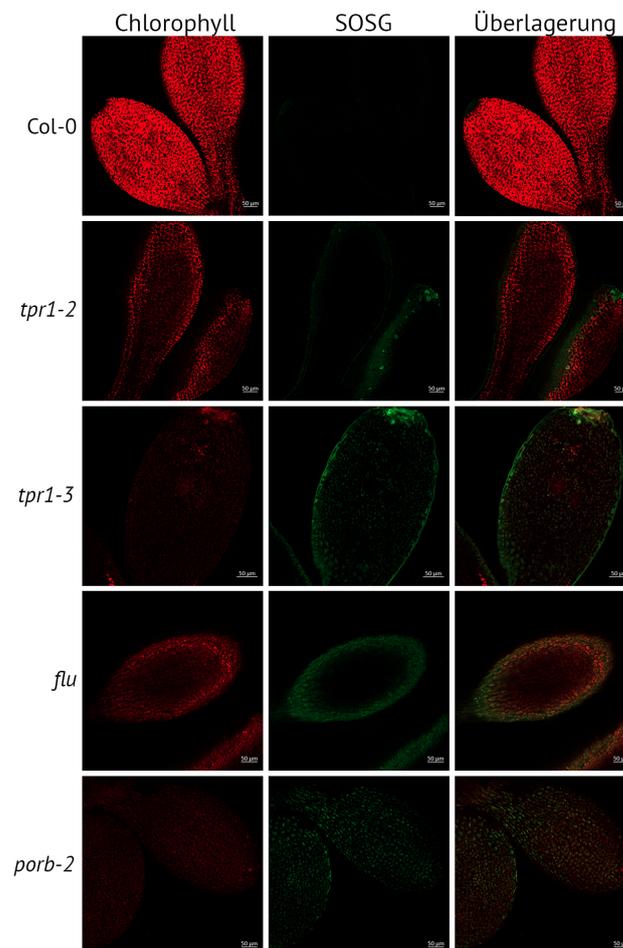


Abbildung 2.35. – Nachweis von Singulett-Sauerstoff mittels des *Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG)* Fluoreszenzfarbstoffs in deetiolierten *Arabidopsis* Keimlingen. Die verwendeten Keimlinge wuchsen für fünf Tage in Dunkelheit und wurden anschließend für 16 h in kontinuierlichem Licht (90 µE) angezogen. Durch konfokale Laserscanmikroskopie wurden neben der SOSG-Fluoreszenz die Chlorophyll-Autofluoreszenz detektiert. Die Überlagerung beider Signale diente der Lokalisierung des SOSG-Signals. Die angegebene Skalierung entspricht 50 µm.

Der Gehalt an Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen war im Wildtyp gering (Abb. 2.36). Lediglich in verschiedenen Leitgefäßen konnten beide ROS in den Col-0 Keimlingen nachgewiesen werden (Abb. 2.36). Im Vergleich dazu war in beiden *tpr1*-Linien der Gehalt an Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen erhöht (Abb. 2.36). Beide ROS akkumulierten dabei vor allem im apikalen Sprossmeristem und den Blattmeristemen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass in den *tpr1*-Linien ROS vor allem in sich neu entwickelnden Geweben entstand (Abb. 2.36). Die *flu*-Mutante wies zwar eine starke Akkumulation von Wasserstoffperoxid auf, jedoch wurden kaum Superoxidanionen nachgewiesen (Abb. 2.36). Die Anreicherung von Wasserstoffperoxid war dabei wahrscheinlich eine Folge der Singulett-Sauerstoff-Akkumulation [283]. In der *porb-2*-Linie wurde hingegen nur eine geringe Menge an Superoxidanionen nachgewiesen (Abb. 2.36). Darüber hinaus wurde die Anreicherung von Wasserstoffperoxid vor allem im Bereich der Blattmeristeme detektiert, was vergleichbar zum zuvor detektierten Verhalten von Singulett-Sauerstoff war (Abb. 2.36, Vergleich 2.35). Wie zuvor im Falle von Singulett-Sauerstoff zeigte die Akkumulation von Wasserstoffperoxid in der *porb-2*-Mutante ein zu den *tpr1*-Linien vergleichbares Muster. Dies untermauert den möglichen Zusammenhang zwischen der verzögerten Ergrünung und einem reduzierten Gehalt an photoaktivem PChlid. Im deutlichen Kontrast zur *porb-2*-Mutante akkumulierten die *tpr1*-Linien allerdings eine große Menge an Superoxidanionen, was auf einen weiteren Aspekt der TPR1-Funktion, abseits der Stabilisierung von POR, hindeutete (Abb. 2.36).

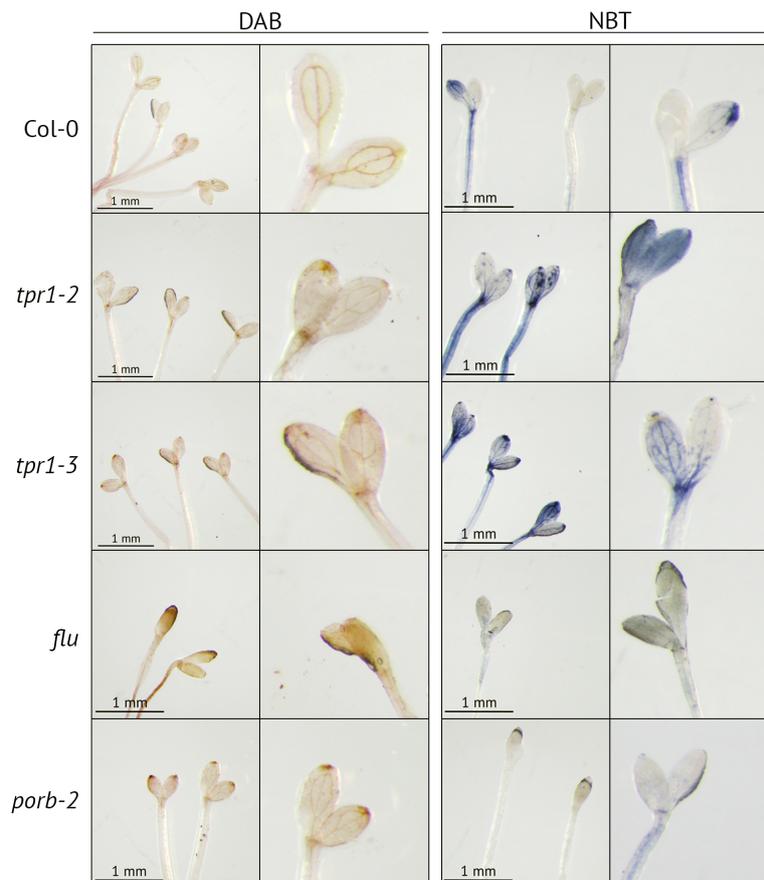


Abbildung 2.36. – Nachweis von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen in deetiolierten Keimlingen. Die verwendeten Keimlinge wuchsen für fünf Tage in Dunkelheit und wurden anschließend für 16 h in kontinuierlichem Licht (90 μ E) angezogen. Mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde Wasserstoffperoxid angefärbt, während Superoxidanionen mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) sichtbar gemacht wurden. Die angegebene Skalierung entspricht 1 mm.

Um einen detaillierteren Einblick in die zeitliche Abfolge der ROS-Anreicherung unter Belichtung zu gewinnen, wurden die Transkriptgehalte verschiedener ROS-Markergene in etiolierten Keimlingen nach fünf Tagen in Dunkelheit sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Deetiolierung bestimmt. Es stellte sich dabei heraus, dass nach fünf Tagen in Dunkelheit die meisten ROS-Markergene in beiden *tpr1*-Linien einen reduzierten Gehalt aufwiesen (Abb. 2.37). Vor allem der relative Transkriptgehalt von *GST6* und *NOD1* war in beiden *tpr1*-Linien signifikant im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.37). Durch Licht wurde die Expression aller getesteten ROS-Markergene in allen Linien induziert (Abb. 2.37). Dabei zeigten die Gehalte der untersuchten Markergene in den beiden *tpr1*-Linien nach einer Stunde im Licht eine zum Wildtyp vergleichbare Reaktion (Abb. 2.37). Erst nach zwei bzw. 24 h unter Belichtung wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Linien deutlich. Während die Markergene des allgemeinen oxidativen Stresses (*GST6* und *ZAT12*) in den *tpr1*-Linien erst nach 24 h im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht waren, konnte diese Reaktion im Falle der Singulett-Sauerstoff-Markergene (*BAP1* und *NOD1*) bereits nach zwei Stunden im Licht beobachtet werden (Abb. 2.37). Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit der erhöhten Akkumulation von Singulett-Sauerstoff *in planta* (Abb. 2.35). Der relative Transkriptgehalt der Wasserstoffperoxid-Markergene unterschied sich kaum zwischen allen untersuchten Linien, lediglich für *Ferritin* wurden zu einigen Zeitpunkten ein erhöhte Transkriptgehalte in der *tpr1-3*-Linie detektiert (Abb. 2.37). Zusammenfassend ließ sich an dieser Stelle sagen, dass die erste mittels ROS-Markergenen nachgewiesene Reaktion auf die Inkubation im Licht in den *tpr1*-Keimlingen wahrscheinlich die Anreicherung von Singulett-Sauerstoff ist, während die Akkumulation von Wasserstoffperoxid erst zu einem späteren Zeitpunkt folgte.

			0	1 h	2 h	24 h		
allgemeiner ROS Stress	<i>GST6</i>	Col-0	a	c	a	b	0,0	
		<i>tpr1-2</i>	b	c	a	b	0,5	
		<i>tpr1-3</i>	b	c	a	b	1,0	
							2,0	
	<i>ZAT12</i>	Col-0	a	c	b	a	4,0	
		<i>tpr1-2</i>	a	c	b	a	8,0	
		<i>tpr1-3</i>	a	c	b	a		
	¹ O ₂	<i>BAP1</i>	Col-0	a	b	a	b	
			<i>tpr1-2</i>	a	b	b	b	
<i>tpr1-3</i>			a	b	b	c		
<i>NOD1</i>		Col-0	a	c	a	a		
		<i>tpr1-2</i>	b	c	c	a		
		<i>tpr1-3</i>	b	c	c	a		
H ₂ O ₂	<i>Ferritin</i>	Col-0	a	a	a	a		
		<i>tpr1-2</i>	a	a	a	a		
		<i>tpr1-3</i>	a	b	a	b		
	<i>sAPX</i>	Col-0	a	a	a	b		
		<i>tpr1-2</i>	a	a	a	b		
		<i>tpr1-3</i>	a	a	a	b		
	<i>tAPX</i>	Col-0	a	a	a	b		
		<i>tpr1-2</i>	a	a	a	b		
		<i>tpr1-3</i>	a	a	a	b		

Abbildung 2.37. – Analyse der Genexpression verschiedener ROS- Markergene in etiolierten und de-etiolierten Keimlingen. Die durch quantitative PCR ermittelte Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp nach sechs Tagen in Dunkelheit (Zeitpunkt 0) bestimmt. Die Proben wurden zu den angegebene Zeitpunkten nach dem Transfer in kontinuierliches Licht (90 µE) genommen. Die Einteilung der Markergene erfolgte nach Woodson *et al.* [271]. Die angegebene statistische Auswertung jedes Gens wurde auf Grundlage von vier biologischen Replikaten ermittelt (*two-way* ANOVA, Bonferroni Post-hoc-Test, $p < 0,05$).

Der erhöhte oxidativer Stress in den *tpr1*-Mutanten kam somit als Ursache für die verzögerte Ergrünung in Frage. Es wurde darauf aufbauen überprüft, ob die Akkumulation von ROS in den *tpr1*-Linien durch die Anzucht der Keimlinge unter geringeren Lichtintensität (30 μE) verhindert werden konnte. Konträr dazu wurden Keimlinge unter erhöhten Lichtintensitäten (180 μE) angezogen. Um dabei eventuelle sekundäre Effekte durch Hitzestress zu vermeiden, wurden nur leicht erhöhte Lichtintensitäten gewählt. Wie zuvor bei 90 μE akkumulierte im Wildtyp sowohl unter reduzierten als auch erhöhten Lichtintensitäten kaum Singulett-Sauerstoff (Abb. 2.38). In den *tpr1*-Mutanten hingegen wurde Singulett-Sauerstoff abermals in vesikelförmigen Strukturen in Bereichen mit geringer Chlorophyll-Autofluoreszenz sowie in der Blattperipherie nachgewiesen, unabhängig von der Anzuchsbedingung (Abb. 2.38). Der Durchmesser dieser Vesikel lag im Durchschnitt bei 4 μm . Im Vergleich zu den *tpr1*-Linien konnte in der *flu*-Mutante unter beiden Bedingungen abermals ein hoher Gehalt an Singulett-Sauerstoff vor allem in Bereichen mit hoher Chlorophyll-Autofluoreszenz detektiert werden (Abb. 2.38). Die Akkumulation von Singulett-Sauerstoff war in der *porb-2*-Mutante hingegen direkt abhängig von der Lichtintensität: Je höher diese war, desto mehr Singulett-Sauerstoff reicherte sich an (Abb. 2.38).

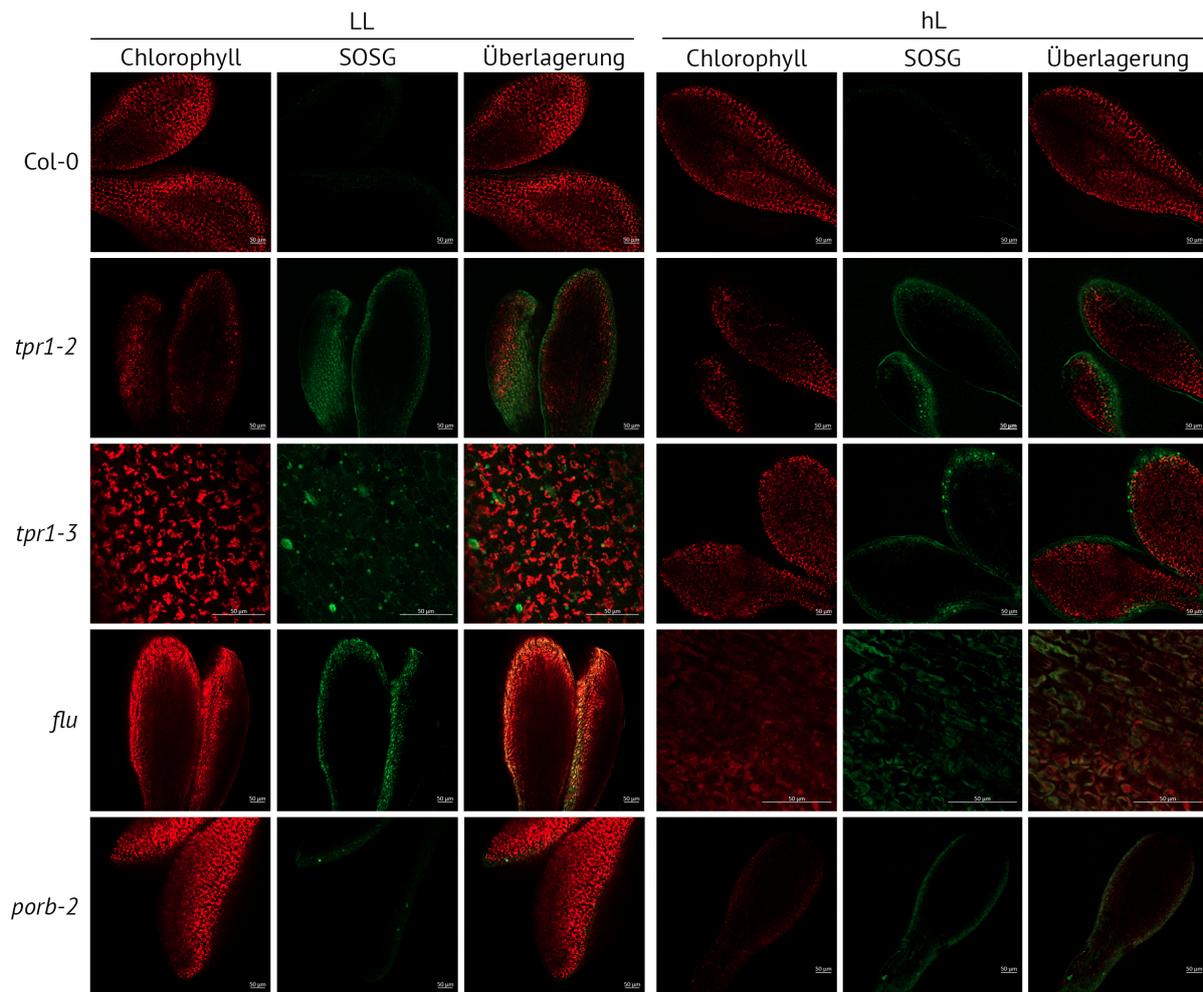


Abbildung 2.38. – Nachweis von Singulett-Sauerstoff mittels des Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) Fluoreszenzfarbstoffs in deetiolierten Arabidopsis Keimlingen unter verschiedenen Lichtintensitäten. Die verwendeten Keimlinge wuchsen für fünf Tage in Dunkelheit und wurden anschließend für 16 h unter geringen (LL; 30 μE) oder erhöhten Lichtintensitäten (hL; 180 μE) angezogen. Durch konfokale Laserscanmikroskopie wurden neben der SOSG-Fluoreszenz die Chlorophyll-Autofluoreszenz detektiert. Die Überlagerung beider Signale diente der Lokalisierung des SOSG-Signals. Die angegebene Skalierung entspricht 50 μm .

Vergleichbar zu Singulett-Sauerstoff konnte im Wildtyp weder unter geringen noch erhöhten Lichtintensitäten eine starke Anreicherung von ROS nachgewiesen werden (Abb. 2.39). Allerdings nahm die Akkumulation von Superoxidanionen im Wildtyp unter erhöhten Lichtbedingungen leicht zu (Abb. 2.39). Im Vergleich zum Wildtyp wurde in den *tpr1*-Mutanten unter beiden getesteten Lichtbedingungen sowohl mehr Wasserstoffperoxid als auch mehr Superoxidanionen nachgewiesen. Unerwarteterweise war dabei der Gehalt beider ROS in den *tpr1*-Keimlingen umgekehrte proportional zur Lichtintensität, da die höchste Anreicherung von Superoxidanionen unter Schwachlicht detektiert wurde (Abb. 2.39). In der *flu*-Mutante war das Gegenteil der Fall: Während unter erhöhten Lichtintensitäten eine starke Akkumulation von Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden konnte, wurde unter geringeren Lichtintensitäten weniger Wasserstoffperoxid detektiert (Abb. 2.39). Darüber hinaus konnte in der *flu*-Linie unter keiner der getesteten Bedingungen eine Anreicherung von Superoxidanionen beobachtet werden. Hingegen war der Gehalt von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid in der *porb-2*-Mutante, unabhängig von der Lichtintensität, gering (Abb. 2.39).

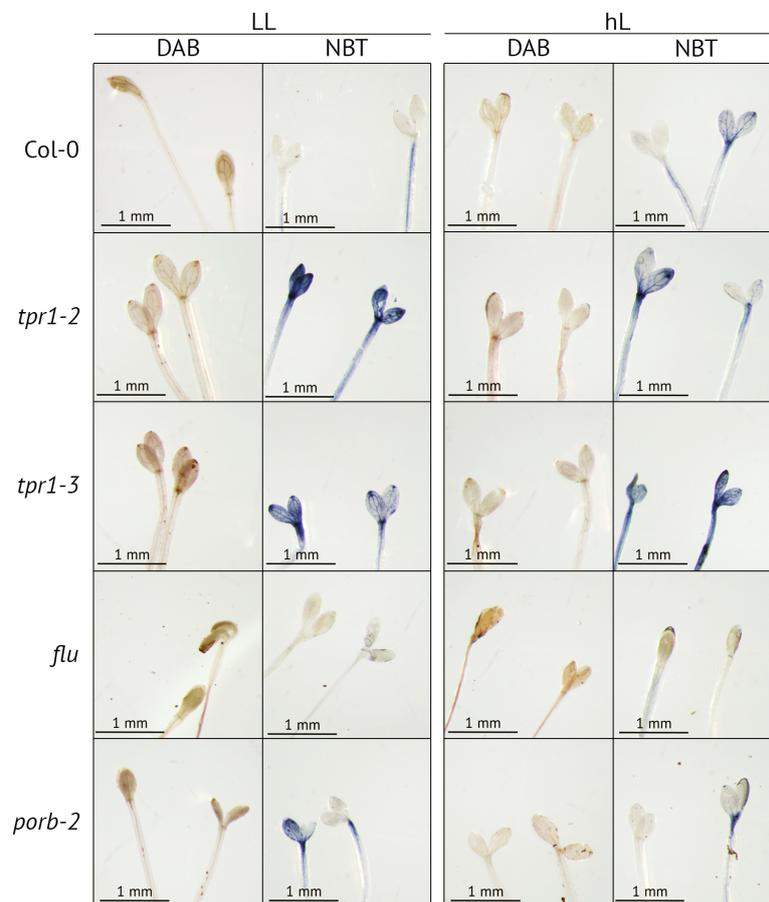


Abbildung 2.39. – Nachweis von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen in deetiolierten Keimlingen unter verschiedenen Lichtintensitäten. Die verwendeten Keimlinge wuchsen für fünf Tage in Dunkelheit und wurden anschließend für 16 h unter geringen (LL; 30 μ E) oder erhöhten Lichtbedingungen (hL; 180 μ E) angezogen. Mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde Wasserstoffperoxid angefärbt, während Superoxidanionen mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) sichtbar gemacht wurden. Die angegebene Skalierung entspricht 1 mm.

Durch die Anfärbung der unterschiedlichen ROS wurde deutlich, dass die untersuchten Mutanten verschiedene Reaktionen während der Deetiolierung zeigten. Vor allem unter moderaten Lichtintensitäten wies die Akkumulation von Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid in den *tpr1*-Linien und der *porb-2*-Linie einige Parallelen auf. Dies unterstrich den möglichen Zusammenhang zwischen einem reduzierten Gehalt an photoaktivem PChlid und der Entstehung von ROS, insbesondere von Singulett-Sauerstoff. Sowohl im Kontrast zur *porb-2*- als auch *flu*-Mutante akkumulierten in den *tpr1*-Linien eine große Menge an Superoxidanionen, hauptsächlich unter geringen Lichtintensitäten. Die Hauptquelle von Superoxidanionen in grünem Gewebe ist PSI, wodurch eine mögliche Verbindung zwischen TPR1 und PSI ersichtlich wurde.

2.2.17. Untersuchung von TPR1-haltigen Proteinkomplexen in den Thylakoidmembranen

Für eine detaillierte Analyse der Zusammenhänge zwischen TPR1 und den Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes sowie den photosynthetischen Untereinheiten wurden isolierte Thylakoidmembranen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Die Thylakoidmembranen wurden aus vier Wochen alten Col-0 Rosettenpflanzen isoliert und in einem 0,4 - 1,3 molaren Saccharosegradienten aufgetrennt. Nach Abschluss der Zentrifugation konnten sechs distinkte Banden im Gradienten identifiziert werden, welche verschiedenen photosynthetischen Komplexen zugeordnet werden konnten (Abb. 2.40A) [284]. Der Gradient wurde anschließend in 21 Fraktionen unterteilt, beginnend bei der höchsten Saccharose-Konzentration am Boden des Gradienten (Fraktion 1) (Abb. 2.40B). In den Fraktionen mit sichtbarer Pigmentierung (6 - 18) wurde zudem die Menge an Carotinoiden und Chlorophyllen photometrisch bestimmt (Abb. 2.40C), anhand deren Zusammensetzungen Rückschlüsse auf die vorhandenen Komplexe gezogen werden konnten. Carotinoide lagen lediglich in den Fraktionen mit der niedrigsten bzw. höchsten Saccharosekonzentration vor. In den Fraktionen mit hoher Saccharosekonzentration (6 - 11) war deutlich mehr Chlorophyll a als Chlorophyll b nachweisbar. Der erhöhte Chlorophyll a Gehalt konnte dabei auf einen erhöhten Anteil der photosynthetischen Kernkomplexe zurückgeführt werden, welche in diesen Fraktionen vorlagen. In den Fraktionen 12 - 17 war der Chlorophyll b Gehalt höher als in den Fraktionen 6 - 11. In diesem Bereich lagen vor allem die Antennenkomplexe des PSII (LHCII) vor, welche im Vergleich zu den Kernkomplexen Chlorophyll b enthalten und somit den erhöhten Chlorophyll b Gehalt erklären könnten.

Die erzeugten Fraktionen des Saccharosegradienten wurden anschließend hinsichtlich der Abundanz verschiedener Proteine der TBS sowie beider Photosysteme untersucht (Abb. 2.40D). Repräsentativ für den PSI-LHCI-Komplex wurde die Lokalisation von LHCA1 untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass die PSI-LHCI-Komplexe vorrangig in den höhermolekularen Regionen des Gradienten zu finden war (Abb. 2.40D). Repräsentativ für PSII wurde die Abundanz von D1 und CP47 nachgewiesen, welche eine breite Verteilung im Gradienten aufwiesen (Abb. 2.40D). Der Hauptanteil des PSII befand sich dabei in den Fraktionen 8 - 12 (Abb. 2.40D). Besonderes Interesse galt außerdem der Lokalisation der Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes. Es ist hierbei zu vermerken, dass die Thylakoidmembranen während der Lichtphase geerntet wurden, sodass der Anteil des FLU-Inaktivierungskomplexes dementsprechend gering sein sollte [143]. Nichtsdestotrotz co-lokalisierten GluTR1, CHL27 und FLU in den Fraktionen 5 - 16 (Abb. 2.40D). Dabei haben diese drei Komponenten einen gemeinsamen Peak in Fraktion 14.

Im Kontrast dazu konnte PORB lediglich in den niedermolekularen Fraktionen 15 - 19 detektiert werden und wies somit eine zu den anderen Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes abweichende Lokalisation auf (Abb. 2.40D). In den Fraktionen mit der größten Anreicherung von PORB (Fraktionen 16 - 18) konnten für GluTR1, CHL27 und FLU nur schwache Signale detektiert werden (Abb. 2.40D). Wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.2.4), wurden für TPR1 zwei Banden detektiert werden, welche eine unterschiedliche Lokalisation im Saccharosegradienten aufwiesen. TPR1₄₃ lag in den Fraktionen 6 - 18 vor. Die höchste Abundanz von TPR1₄₃ konnte in Fraktion 8 detektiert werden und co-lokalisierte somit vor allem mit LHCA1 auf Höhe der vollständig assemblierten Photosysteme (Abb. 2.40D). Nichtsdestotrotz zeigte die sehr breite Verteilung von TPR1₄₃ ebenfalls Übereinstimmungen mit der Lokalisation von GluTR1, CHL27 und FLU (Abb. 2.40D). Im Gegensatz dazu war TPR1₄₀ lediglich in den Fraktionen 14 -19 zu detektieren und zeigte die größte Abundanz in Fraktion 17 (Abb. 2.40D). Damit co-fraktionierte TPR1₄₀ stark mit PORB und unterstrich damit erneut den Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen.

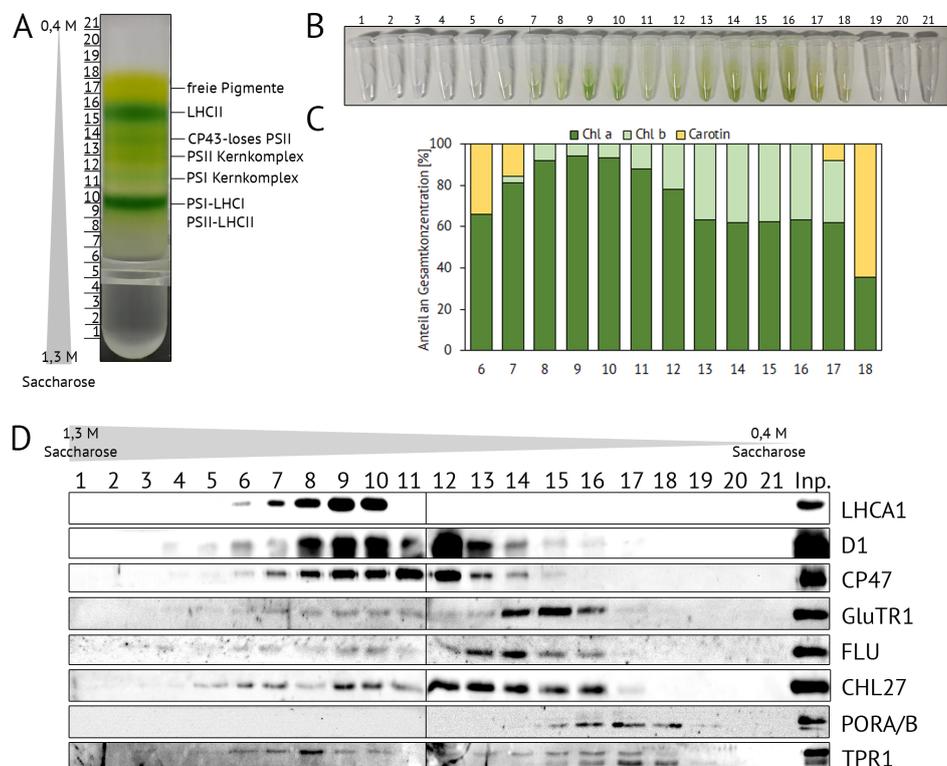


Abbildung 2.40. – Fraktionierung von isolierten Thylakoidmembranen durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. (A) Thylakoidmembranen wurden aus vier Wochen alten Col-0 Rosettenpflanzen isoliert und in einem 0,4 - 1,3 molaren Saccharosegradienten durch 16 stündige Zentrifugation bei 134.470 xg aufgetrennt. Die Zuordnung der sichtbaren Banden wurde rechts neben dem Gradienten angegeben und gemäß Dallosto *et al.* vorgenommen [284]. (B) Der Saccharosegradient wurde in 21 Fraktionen unterteilt, beginnend bei der höchsten Saccharosekonzentration in Fraktion 1. (C) Für die Fraktionen 6-18 wurde der Gehalt von Carotinoiden (Carotin), Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b) photometrisch bestimmt. Aus den ermittelten Mengen wurde der Anteil des jeweiligen Pigments am Gesamt pigmentgehalt berechnet. Für die hier angegebenden Werte wurden zwei technische Replikate verwendet. (D) Lokalisation von verschiedenen Enzymen und Hilfsproteinen der TBS sowie der photosynthetischen Untereinheiten. Für den Nachweis von D1 und CP47 wurden die gewonnenen Fraktionen mittels 12 %iger Harnstoff-Gele elektrophoretisch aufgetrennt, während für den Nachweis aller weiteren Proteine 12 % SDS-Gele verwendet wurden. Als Kontrolle wurde neben den gewonnenen Fraktionen das verwendete Ausgangsmaterial (*Input*; Inp.) analysiert. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben.

2.2.18. Einfluss von TPR1 auf die Ausbildung von Komplexen in den Thylakoidmembranen

Um zu überprüfen, inwiefern das Fehlen von TPR1 die Lokalisation der im Saccharosegradienten co-fractionierten Proteine beeinflusste, wurden isolierte Thylakoidmembranen aus vier Wochen alten Col-0 und *tpr1-3* Rosettenpflanzen mittels 4- 12 %iger BN-PAGE Gradientengele elektrophoretisch aufgetrennt. Für die sich anschließende zweite Dimension wurden 12 %ige SDS-Gele verwendet. Der Verlust von TPR1 hatte dabei kaum einen Einfluss auf die Lokalisation von GluTR1, FLU, CHL27 und PORB (Abb. 2.41A, B). Allerdings wurde GluTR1 im Wildtyp vor allem im Bereich der Superkomplexe detektiert, während in der *tpr1-3*-Linie GluTR1 auch zu einem geringen Anteil in niedermolekularen Bereichen nachweisbar war (Abb. 2.41A, B). Weiterhin konnte wie zuvor weniger membranassoziierte PORB in der *tpr1-3*-Linie nachgewiesen werden als im gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.41A, B). Da PORB nur im Bereich der freien Proteine vorzufinden war (Abb. 2.41A, f.P.), konnte keine Aussage über eine veränderten Lokalisation getroffen werden. Ein deutlicherer Unterschied zeigte sich allerdings für die Lokalisation von LHCA1: In der *tpr1-3*-Linie konnte weniger LHCA1 im Bereich der LHCI-Monomere und -Dimere detektiert werden als im Wildtyp (Abb. 2.41B). In höhermolekularen Bereichen war die Lokalisation von LHCA1 in der *tpr1-3*-Linie hingegen wildtypartig (Abb. 2.41B). Im Wildtyp lag TPR1₄₃ vor allem im Bereich der LHC-Monomere und -Trimere vor (Abb. 2.41A). Im Vergleich dazu war TPR1₄₀ im Bereich der freien Proteine zu finden, in welchem ebenfalls CHL27 und PORB detektiert werden konnten (Abb. 2.41A). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. TPR1₄₀ stand somit eher in Verbindungen mit PORB und weiteren Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes, während TPR1₄₃ mit LHCA1 bzw. PSI co-lokalisierte.

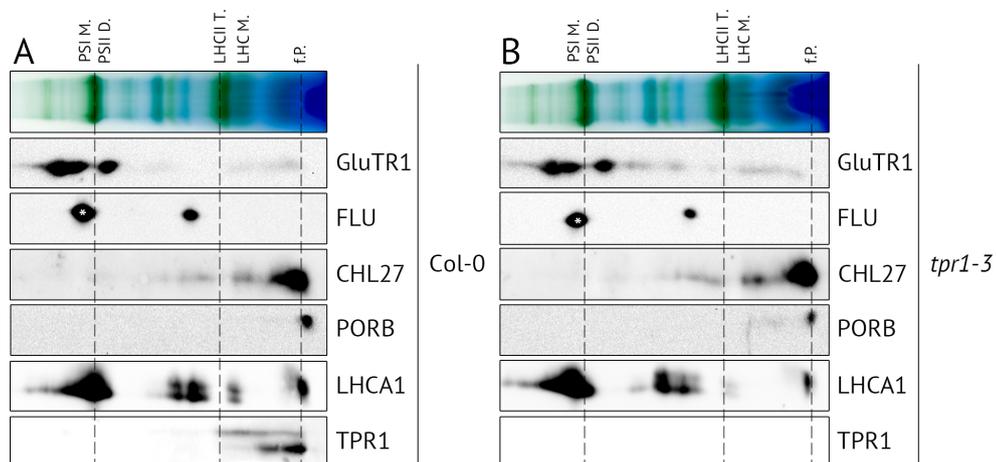


Abbildung 2.41. – Lokalisation der Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes sowie LHCA1 in isolierten Thylakoidmembranen. Die Thylakoidmembranen wurden aus vier Wochen alten Col-0 (A) und *tpr1-3* (B) Rosettenpflanzen isoliert und mittels 4 - 12 %iger BN-PAGE Gradientengele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der zweiten Dimension erfolgte durch 12 %ige SDS-Gele. Die nachgewiesenen Proteine sind jeweils rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben. Unspezifische Signale wurden durch einen Stern gekennzeichnet. PSI M.- PSI Monomer; PSII D.-PSII Dimer; LHCI T.-LHCII Trimer; LHC M - LHC Monomere; f.P. - freie Proteine.

2.2.19. TPR1 in verschiedenen Mutanten des Tetrapyrrolbiosynthese-Weges

Für eine bessere Vergleichbarkeit der *tpr1*-Linien wurden verschiedene TBS-Mutanten hinsichtlich der Stabilität von TPR1 untersucht. Dafür wurden eine *chl27* *knockdown*-Mutante [100] sowie zwei *porb* *knockout*-Mutanten [113] verwendet. Darüber hinaus wurden die *gbp*-Punktmutante in diese Untersuchungen einbezogen, in welcher GBP drastisch destabilisiert war [149]. Die gewählten Linien wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen, da unter diesen Bedingungen TPR1 den größten Einfluss auf die Abundanz von GluTR1 hatte. Allerdings war die *flu*-Mutante unter diesen Bedingungen nicht überlebensfähig, weswegen diese nicht mit einbezogen wurde. Nach vier Wochen zeigte die *gbp*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein gesteigertes Wachstum und eine wildtypartige Pigmentierung, während sowohl die *chl27*-Mutante als auch beide *porb*-Linien einen retardierten Wuchs und eine reduzierte Pigmentierung aufwiesen (Abb. 2.42A). In allen untersuchten Mutanten war der TPR1-Proteingehalt im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.42B). Darüber hinaus war auffällig, dass, sobald eine Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes destabilisiert war, wie beispielsweise in den *chl27*- und *porb*-Mutanten, die anderen Komponenten des Komplexes einen erhöhten Proteingehalt aufwiesen (Abb. 2.42B). Ähnliches traf auch auf den GBP-Proteingehalt der *chl27* und *porb-4*-Linie zu (Abb. 2.42B).

Zusätzlich dazu wurde die *hemA1*-Linie in die Analysen einbezogen. Da diese auf Erde nicht überlebensfähig war, wurden sowohl Wildtyp- als auch *hemA1*- und *tpr1-3*-Keimlinge für zwei Wochen auf MS-Agarmedium angezogen. Wie zuvor für die anderen Mutanten des TBS-Weges wies auch die *hemA1*-Mutante einen erhöhten TPR1-Proteingehalt auf (Abb. 2.42C). Darüber hinaus besaßen die Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes in der *hemA1*-Mutante ebenfalls eine erhöhte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.42C). Dies war in Übereinstimmung mit den zuvor publizierten Daten von Apitz *et al.* [285] und zeigte einige Parallelen zur verwendeten *tpr1-3*-Linie (Abb. 2.42C). Die erhöhten Proteingehalte der Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes sowie von TPR1 in allen untersuchten Mutanten des TBS-Weges waren möglicherweise ein kompensatorischer Effekt, infolge einer gestörten Inaktivierung der ALA-Synthese.

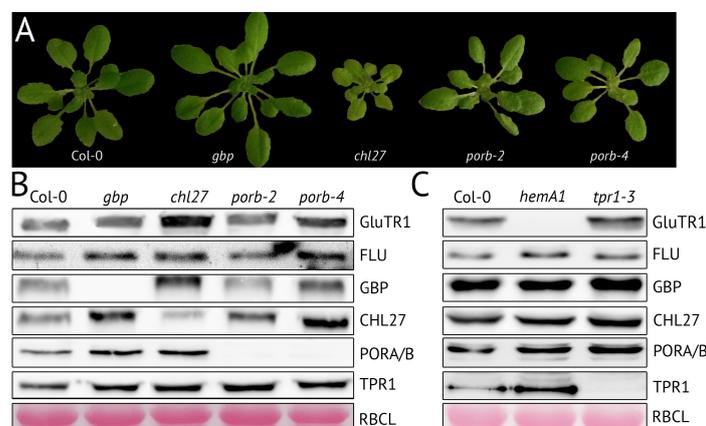


Abbildung 2.42. – Proteingehalte verschiedener Mutanten des TBS-Wegs. Die verwendeten Pflanzen wurden unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) entweder für vier Wochen auf Erde (A, B) oder für zwei Wochen auf Murashige-Skoog (MS)-Medium (C) angezogen. (A) Phänotyp auf Erde angezogenen Pflanzen. (B, C) Nachweis von Proteinen der TBS. Die Proben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem dazugehörigen spezifischen immunologischen Signal vermerkt.

2.2.20. Analyse des TBS-Weges über den Verlauf eines Standardkurztages in den *tpr1*-Linien

Unter Standard-Kurztagbedingungen war der GluTR1 Gehalt in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.19), während dies unter kontinuierlichen Lichtbedingungen nicht der Fall war (Abb. 2.22A). Der Wechsel von Licht- und Dunkelphasen könnte somit möglicherweise ein Auslöser für die veränderte Abundanz von GluTR1 sein. Darüber hinaus interagiert TPR1 mit den Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes. Die Ausbildung bzw. Auflösung dieses Komplexes ist vor allem im Wechsel von Tag zu Nacht und *vice versa* von elementarer Bedeutung [139]. Für einen detaillierteren Einblick in die Auswirkungen des Wechsels zwischen Licht- und Dunkelphasen auf die *tpr1*-Mutanten wurden die Gehalte von ALA und verschiedenen TBS-Intermediaten sowohl zum Ende der Dunkelphase als auch zum Ende der Lichtphase bestimmt.

Am Ende der Dunkelphase war der ALA-Gehalt der *tpr1*-Linien um 50 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.43A). Dies hatte indes lediglich schwache Auswirkungen auf die *steady state* Gehalte von PChlid und Chlid (Abb. 2.43B, C). MgP und MgProtoME lagen am Ende der Nacht unterhalb des durch die HPLC detektierbaren Levels. Es zeigte sich, dass die PChlid-Gehalte in den *tpr1*-Linien leicht reduziert waren (Abb. 2.43B), wohingegen die Chlid-Level tendenziell erhöht waren (Abb. 2.43C). Somit wurde abermals bestätigt, dass der Verlust von TPR1 keinen deutlichen Einfluss auf die Funktionalität des FLU-Inaktivierungskomplexes an sich hatte. Andernfalls wäre eine Akkumulation von ALA und PChlid aufgrund der fehlenden Inhibierung der ALA-Synthese nachweisbar gewesen. Überraschenderweise war am Ende der Dunkelphase das Gegenteil in den *tpr1*-Linien der Fall.

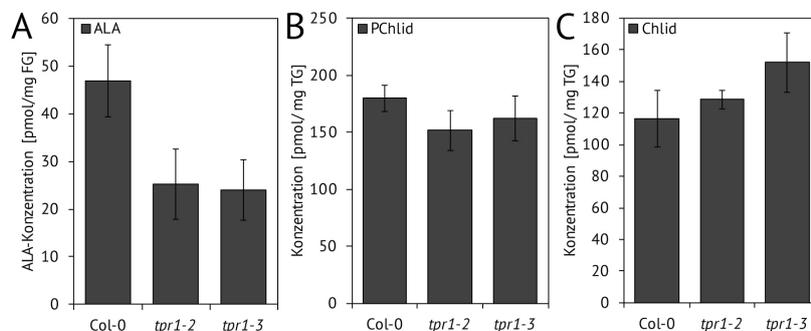


Abbildung 2.43. – Nachweis von verschiedenen TBS-Intermediaten am Ende der Dunkelphase. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. Die Beprobung der Pflanzen erfolgte 5 min vor Beginn der Lichtphase. (A) Die photometrisch bestimmten ALA-Mengen wurden auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) der verwendeten Rosettenpflanzen bezogen. (B, C) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatmengen wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten bestimmt.

Am Ende der Lichtphase konnte in der *tpr1-3*-Linie ein wildtypartiger ALA-Gehalt verzeichnet werden, während die *tpr1-2*-Linie nur noch einen leicht reduzierten ALA-Gehalt aufwies (Abb. 2.44A). Während die *steady state* Gehalte an MgP in den *tpr1*-Linien leicht erhöht waren (Abb. 2.44B), konnte für MgProtoME in beiden *tpr1*-Linien ein reduzierter Gehalt im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 2.44C). Die Menge an PChlid war hingegen in den beiden *tpr1*-Mutanten wildtypartig (Abb. 2.44D). Im Unterschied dazu war der Chlid-Gehalt am Ende der Lichtphase in den *tpr1*-Linien um etwa 40 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.44E).

Die Mengen der TBS-Intermediate am Ende des Tages decken sich mit Ausnahme von MgP mit den nach zwei Stunden im Licht bestimmten Gehalten (Abb. 2.20). Der reduzierte Chlid-Gehalt der *tpr1*-Linien kann somit erst nach mehreren Stunden im Licht nachgewiesen werden. Möglicherweise war die Effektivität der Photoreduktion von PChlid zu Chlid durch POR erst während längerer Belichtungsphasen durch das Fehlen von TPR1 beeinträchtigt.

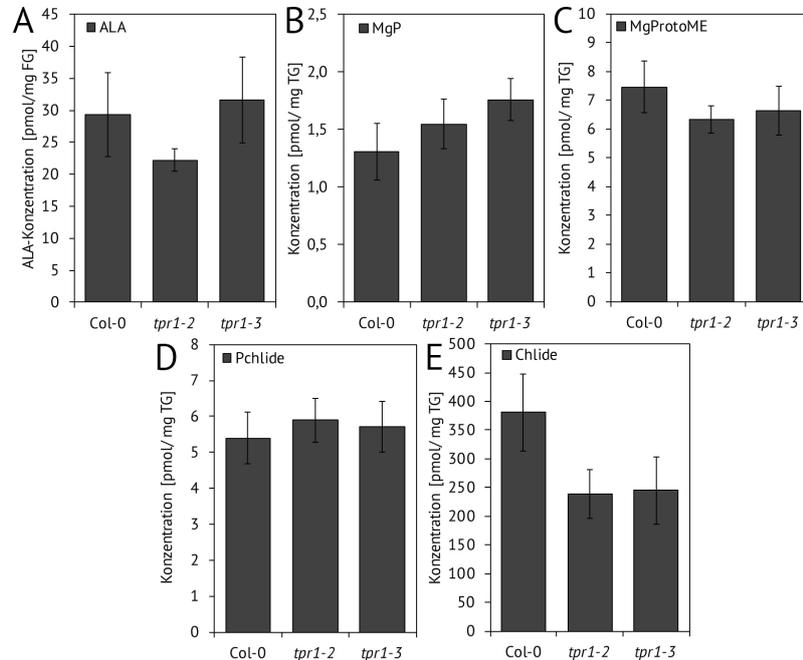


Abbildung 2.44. – Nachweis von verschiedenen TBS-Intermediaten am Ende der Lichtphase. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. Die Probenentnahme erfolgte 5 min vor Beginn der Dunkelphase. (A) Die photometrisch bestimmten ALA-Mengen wurden auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) der verwendeten Rosettenpflanzen bezogen. (B-E) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatmengen wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten bestimmt.

Am Ende der Dunkelphase waren alle analysierten Gehalte von Enzymen und Hilfsproteinen der TBS, mit Ausnahme von GUN4 und CHLM, in den *tpr1*-Linien wildtypartig (Abb. 2.45). Die Proteingehalte von GUN4 und CHLM waren hingegen leicht erhöht (Abb. 2.45). Für GluTR1 war der wildtypartige Gehalt in den *tpr1*-Linien zum Ende der Dunkelphase unerwartet, da sonst ein erhöhter Proteingehalt in diesen Linien im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden konnte und die Abbaurate von GluTR1 in den *tpr1*-Mutanten wildtypartig war (Abb. 2.45). Erst zum Ende der Lichtphase wurde der zuvor detektierte erhöhte Gehalt von GluTR1 in den *tpr1*-Linien beobachtet (Abb. 2.45). Vergleichbar dazu waren zum Ende der Dunkelphasen die Gehalte von GBP, FLU, CHL27, YCF54 und PORB wildtypartig, während am Ende der Lichtphase eine leicht erhöhte Abundanz dieser Proteine in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.45). Unter keiner der getesteten Bedingungen wurde ein Einfluss des TPR1-Verlustes auf die Gehalte von LHCA1 und LHCB1 festgestellt.

Die deutlichsten Unterschiede im Bezug auf die Intermediat- und Proteingehalte zwischen dem Wildtyp und den *tpr1*-Linien waren am Ende des Tages zu sehen. Einzige Ausnahme bildete hierbei der ALA-Gehalt. Ein Faktor, welcher die veränderte Akkumulation der TBS-Intermediate in den *tpr1*-Linien auslösen könnte, war somit die Tageslänge. Ein weiterer Faktor, welcher sich, aufgrund der schnellen Änderung der GluTR1-Aktivität durch die Bindung an oder Ablösung vom

FLU-Inaktivierungskomplex rasch während Dunkel- und Lichtphasen verändert, ist der Gehalt von ALA. Der Einfluss von sowohl der Tageslänge als auch der ALA-Menge auf die *tpr1*-Linien sollte deswegen näher analysiert werden.

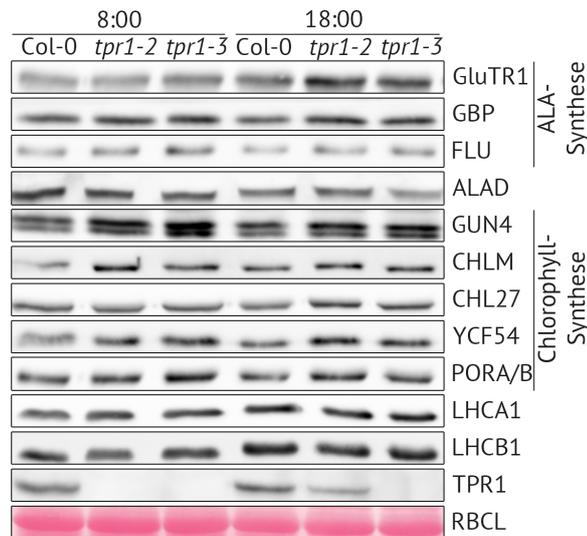


Abbildung 2.45. – Proteingehalte von Enzymen und Hilfsproteinen der TBS sowie zweier LHCs in Abhängigkeit der Tageszeit. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. Die Proben wurden jeweils 5 min vor Ende der Dunkelphase (8:00) bzw. 5 min vor Ende der Lichtphase (18:00) genommen. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt.

2.2.21. Analyse des Einflusses der Tageslänge auf die *tpr1*-Linien

Der Einfluss der Tageslänge auf die Anreicherung der TBS-Intermediate in den *tpr1*-Linien wurde unter zwei extremen Bedingungen untersucht. Hierbei wurde zum einen ein kontinuierliches Lichtregime (120 μ E) gewählt, zum anderen ein extremer Kurztag (4 h Licht / 20 h Dunkelheit, 120 μ E). Drei Wochen alte, unter Standard-Kurztagbedingungen angezogene Arabidopsis Pflanzen wurden dafür für mehrere Tage unter den beiden oben genannten veränderten Tageslängen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Gehalte der TBS-Intermediate bestimmt.

Nach drei Tagen in kontinuierlichem Lichtregime waren die *tpr1*-Linien makroskopisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 2.46A). Der Gehalt von MgP lag unter dem durch die HPLC bestimmbaren Detektionslevel, weswegen über dessen Akkumulation keine Aussage getroffen werden konnte. Ebenfalls problematisch war der Nachweis von MgProtoME, da beispielsweise in der *tpr1-2*-Linie lediglich in einer Probe MgProtoME nachgewiesen werden konnte. In der *tpr1-3*-Linie war der MgProtoME *steady state* Gehalt im Vergleich zum Wildtyp jedoch leicht reduziert (Abb. 2.46B). Ebenso waren die Gehalte von PChlid und Chlid in beiden *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.46C, D). Wie zuvor unter Standard-Kurztagbedingungen waren die Chlorophyllmengen in den *tpr1*-Linien geringfügig reduziert (Abb. 2.46E). Hierbei schien Chlorophyll b stärker beeinträchtigt zu sein als Chlorophyll a, was ein leicht erhöhtes Chl a/b Verhältnis verursachte (Abb. 2.46F). Die Verlängerung der Lichtphase führte somit nicht zu einer Steigerung der am Ende des Tages detektierten Veränderungen der Intermediatgehalte in den *tpr1*-Linien. Andernfalls wäre eine Akkumulation von PChlid und eine Reduktion von Chlid nachweisbar gewesen.

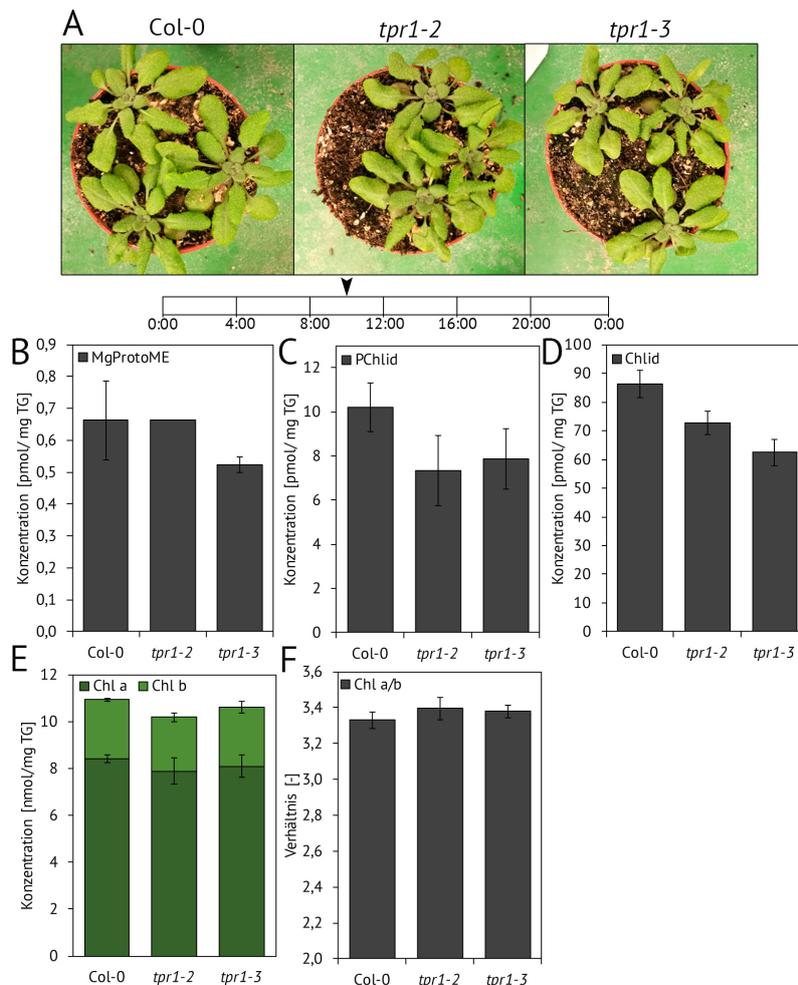


Abbildung 2.46. – Analyse von Arabidopsis Pflanzen nach drei Tagen unter kontinuierlichen Lichtbedingungen. Die verwendeten Pflanzen wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen und anschließend für drei Tage in kontinuierlichem Licht (120 μ E) inkubiert. (A) Phänotyp nach drei Tagen in kontinuierlichem Licht. Die schematische Darstellung des Lichtregimes wurde für einen Zeitraum von 24 h angegeben. Der Zeitpunkt der Ernte (10:00 Uhr) wurde mit einem schwarzen Pfeil markiert. (B-E) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (F) Aus den gemessenen Chlorophyllgehalten wurde das Chl a/b Verhältnis ermittelt. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten bestimmt.

Pflanzen, welche einem extremen Kurztag ausgesetzt waren, zeigten allgemein ein deutlich verlangsamtes Wachstum, weswegen die Entnahme der Proben erst nach fünf Tagen unter diesen Bedingungen erfolgte (Abb. 2.47A). Wie zuvor in kontinuierlichem Licht führte auch eine Verlängerung der Dunkelphase in beiden *tpr1*-Linien nicht zu einem makroskopisch vom Wildtyp zu unterscheidenden Phänotyp (Abb. 2.47A). Im Gegensatz zu kontinuierlichen Lichtbedingungen waren die *steady state* Gehalte vom MgProtoME und PChlid in den *tpr1*-Linien unter extremen Kurztagbedingungen im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.47C, D). Die Gehalte von MgP und Chlid waren in den *tpr1*-Linien hingegen wildtypartig (Abb. 2.47B, E). Wie zuvor unter kontinuierlichen Lichtbedingungen und unter Standard-Kurztagbedingungen war der Chlorophyllgehalt der *tpr1*-Linien geringfügig reduziert (Abb. 2.47F). Im Kontrast zu kontinuierlichen Lichtbedingungen war hierbei scheinbar der Chlorophyll a Gehalt stärker beeinträchtigt, was an einem leicht reduzierten Chl a/b Verhältnis sichtbar wurde (Abb. 2.47G).

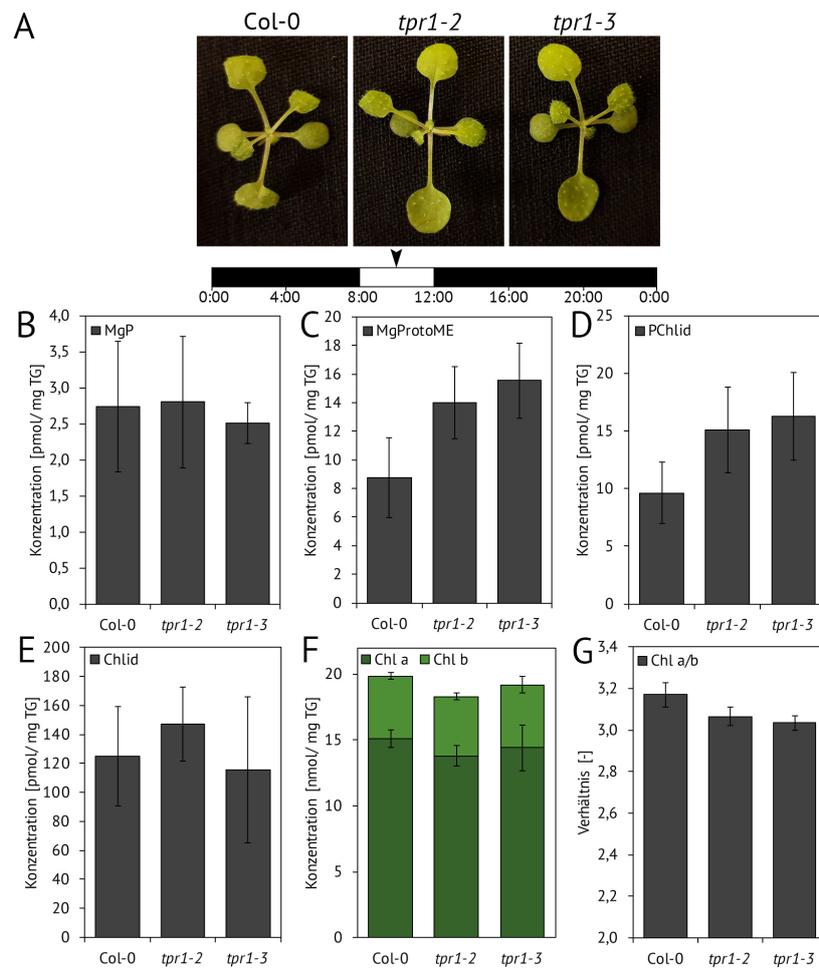


Abbildung 2.47. – Analyse von Arabidopsis Pflanzen nach fünf Tagen unter extremen Kurztagbedingungen. Die verwendeten Pflanzen wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen und anschließend für fünf Tagen unter extremen Kurztagbedingungen inkubiert. (A) Phänotyp nach fünf Tagen in extremen Kurztagbedingungen. Die schematische Darstellung des Lichtregimes wurde für einen Zeitraum von 24 h angegeben. Der Zeitpunkt der Ernte (10:00 Uhr) wurde mit einem schwarzen Pfeil markiert. (B-F) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (G) Aus den gemessenen Chlorophyllgehalten wurde das Chl a/b Verhältnis ermittelt. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten bestimmt.

Während eine extrem verlängerte Lichtphase in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp zu einer reduzierten Menge von TBS-Intermediaten führte, hatte die Verlängerung der Dunkelphase einen gegenteiligen Effekt. Dies wies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Tageslänge und der Akkumulation von TBS-Intermediaten in den *tpr1*-Linien hin. Möglicherweise könnte eine weitere Verkürzung der Tageslänge auf lediglich zwei bis drei Stunden eine weitere Anreicherung von TBS-Intermediaten in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp hervorrufen.

2.2.22. Die Auswirkungen von erhöhten ALA-Konzentrationen auf die Entwicklung und Pigmentierung von *tpr1*-Keimlingen

Die ALA-Synthesekapazität war in den *tpr1*-Linien deutlich erhöht (Abb. 2.21B), wohingegen die ALA-Mengen entweder wildtypartig oder reduziert waren (Abb. 2.21C). Es sollte im Folgenden überprüft werden, welchen Einfluss ein Überangebot von ALA während der Belichtungsphase auf die Entwicklung und Pigmentierung von *tpr1*-Keimlingen hatte. Dafür wurden Keimlinge unter kontinuierlichem Licht auf ALA-supplementiertem MS-Agarmedium angezogen. Neben der Anzucht auf Kontrollmedium ohne ALA wurden zwei verschiedene ALA-Konzentrationen (400 μM und 800 μM) verwendet. Im Wildtyp führte ein Überangebot von ALA bei einer Konzentration von 800 μM zu einer sichtbar reduzierten Pigmentierung (Abb. 2.48). Im Kontrast zum Wildtyp war in den *tpr1*-Linien bereits bei einer Konzentration von 400 μM ALA eine deutliche Reduktion der Pigmentierung zu erkennen, welche sich bei 800 μM ALA verstärkte (Abb. 2.48). Darüber hinaus hemmte die Supplementierung mit ALA das Wachstum der *tpr1*-Keimlinge im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.48).

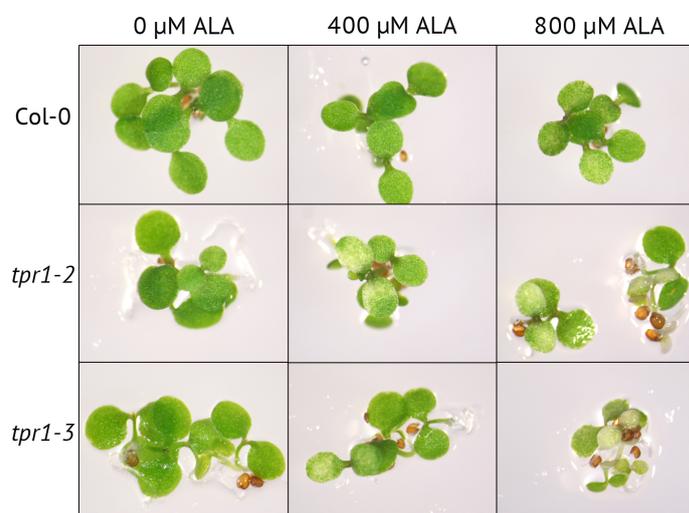


Abbildung 2.48. – Auswirkungen einer erhöhten ALA-Konzentration auf das Wachstum und die Pigmentierung von *Arabidopsis* Keimlingen. Wildtyp und *tpr1*-Linien wurden auf Kontrollmedium (0 μM ALA) sowie zwei mit ALA supplementierten Medien (400 μM und 800 μM) für fünf Tage in kontinuierlichem Licht angezogen.

Die sichtbare reduzierte Pigmentierung der *tpr1*-Linien konnten durch die mittels HPLC bestimmten Chlorophyllgehalte bestätigt werden. Während im Wildtyp der Gesamtchlorophyllgehalt bei erhöhten ALA-Konzentrationen nur leicht im Vergleich zu Kontrollbedingungen reduziert war, konnte in den beiden *tpr1*-Linien ein um 20 % bzw. 50 % reduzierter Gesamtchlorophyllgehalt bei 400 μM ALA bzw. 800 μM ALA im Medium detektiert werden (Abb. 2.49A). Von dieser Reduktion war Chlorophyll b stärker betroffen als Chlorophyll a (Abb. 2.49B). Zwar stieg das Chl a/b Verhältnis auch im Wildtyp an (Abb. 2.49B), allerdings nicht in einem zu den *tpr1*-Linien vergleichbaren Maße. Möglicherweise waren durch das Überangebot an ALA die photosynthetischen Antennenkomplexe in den *tpr1*-Linien stärker betroffen als die Kernkomplexe. Ebenso waren die Häm-Gehalte bei erhöhten ALA-Konzentrationen in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.49C). Als eine mögliche Ursache für die reduzierten Mengen der TBS-Endprodukte in den *tpr1*-Mutanten wurde in einer veränderten Anreicherung der TBS-Intermediate vermutet.

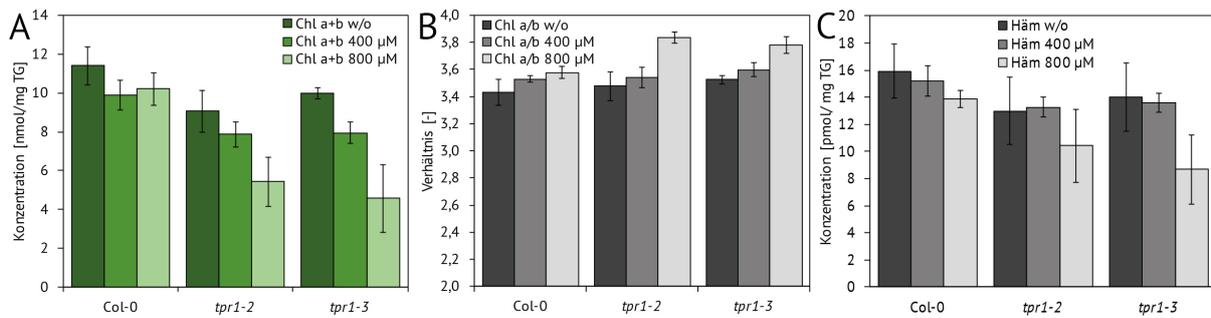


Abbildung 2.49. – Chlorophyll- und Hämgehalte in Abhängigkeit der ALA-Konzentration. Die verwendeten Arabidopsis-Linien wurden für fünf Tage in kontinuierlichem Licht (100 µE) auf MS-Agarmedium mit und ohne ALA angezogen. Die mittels HPLC bestimmten Mengen von (A) Chlorophyll und (C) Häm wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Aus den ermittelten Chlorophyll-Gehalten wurde anschließend das Chlorophyll a zu b (Chl a/b) Verhältnis bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten berechnet.

Als Reaktion auf das Überangebot an ALA im Medium akkumulierten im Wildtyp MgP und MgProtoME, während die PChlid und Chlid-Gehalte entweder unverändert oder im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (0 µM ALA) reduziert waren (Abb. 2.50A-D). Der Chlid-Gehalt unterlag im Wildtyp unter den Kontrollbedingungen starken Schwankungen, dennoch konnte eine Reduktion des Chlid-Gehaltes als Reaktion auf die erhöhte ALA-Konzentration festgestellt werden (Abb. 2.50D). Die fehlende Anreicherung von PChlid und Chlid in Folge eines erhöhten ALA Angebots im Medium war unerwartet, da üblicherweise die Zugabe von ALA eine Akkumulation aller TBS-Intermediate induziert [100]. Allerdings wurde diese Induktion zumeist in Dunkelheit und während kürzerer Inkubationsphasen nachgewiesen. Im Vergleich dazu keimten in diesen Versuchen die verwendeten Linien direkt auf dem ALA-supplementierten Medium, was diese Abweichungen möglicherweise hervorrief. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sich die Reaktion auf ein Überangebot von ALA während früherer Entwicklungsstadien von den Reaktionen in adultem Gewebe unterscheidet. In beiden *tpr1*-Mutanten stiegen die Gehalte von MgP und MgProtoME nicht in einem zum Wildtyp vergleichbaren Maße als Reaktion auf die erhöhten Mengen an ALA im Medium an (Abb. 2.50A, B). Darüber hinaus waren die PChlid-Gehalte in den *tpr1*-Linien bereits ab einer Konzentration von 400 µM ALA im Medium im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp reduziert (Abb. 2.50C). Auch die Chlid-Mengen waren in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp bei erhöhten ALA-Konzentrationen reduziert (Abb. 2.50D). Da allerdings bereits unter Kontrollbedingungen Chlid in den *tpr1*-Linien einen reduzierten Gehalt aufwies, war dieser Effekt weniger deutlich als im Falle von MgProtoME und PChlid (Abb. 2.50B-D).

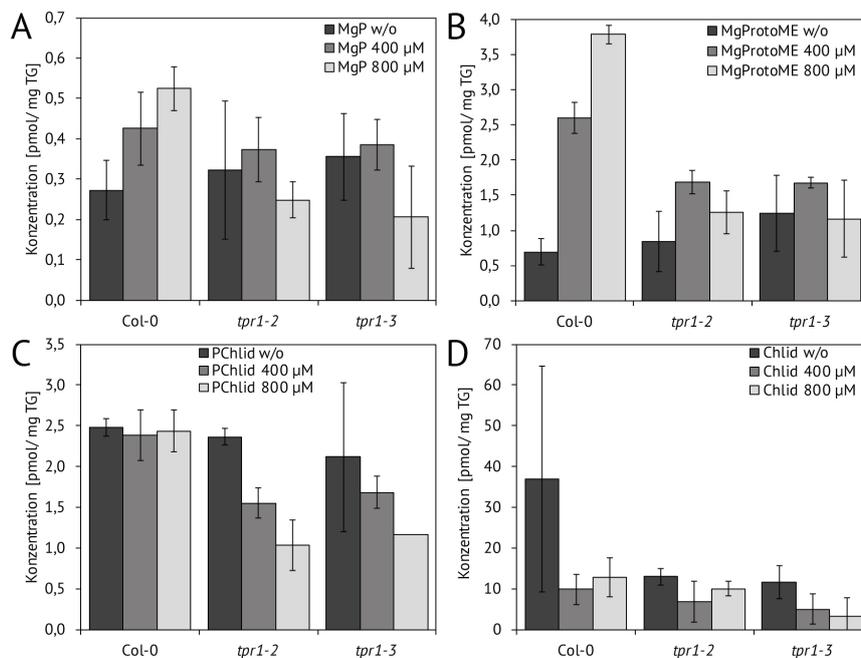


Abbildung 2.50. – Nachweis der TBS-Intermediatgehalte in fünf Tage alten Arabidopsis Keimlingen in Abhängigkeit von der ALA-Konzentration. Die verwendeten Linien wurden für fünf Tage in kontinuierlichem Licht (100 µE) auf MS-Agarmedium mit und ohne 400 µM bzw. 800 µM ALA angezogen. (A-D) Die TBS-Intermediatgehalte wurden mittels HPLC bestimmt und auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt.

Da bei einer Konzentration von 800 µM ALA im Medium in den *tpr1*-Linien hohe sekundäre Effekte aufgrund des stark retardierten Wachstums und der reduzierten Pigmentierung erwartet wurden, wurden die Proteingehalte verschiedener Proteine der TBS lediglich für eine Konzentration von 400 µM ALA im Medium untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die reduzierten Mengen der TBS-Intermediate in den *tpr1*-Linien nur teilweise auf einen reduzierten Proteingehalt der korrespondierenden Enzyme zurückgeführt werden konnte (Abb. 2.51). Die Proteingehalte von GluTR1 und GBP waren sowohl im Wildtyp als auch in beiden *tpr1*-Linien kaum durch das Überangebot von ALA beeinträchtigt. Im Vergleich dazu erhöhte sich der FLU-Gehalt durch die Supplementierung mit ALA im Wildtyp, während in den *tpr1*-Linien das Gegenteil der Fall war, obwohl die *tpr1*-Linien einen erhöhten FLU-Gehalt unter Kontrollbedingungen aufwiesen (Abb. 2.51). Eine weitere Reaktion auf die erhöhte ALA-Konzentration war ein erhöhter ALAD-Gehalt in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp und den Kontrollbedingungen (Abb. 2.51). Dies könnte ein möglicher Hinweis auf einen erhöhten Umsatz von ALA zu PBG, katalysiert durch ALAD, sein. Dementsprechend wurde im Wildtyp möglicherweise die Abundanz von ALAD durch das Überangebot von ALA reprimiert, wohingegen diese Repression in den *tpr1*-Linien ausblieb. Diese Beeinträchtigung von ALAD wurde unter Standard-Kurztagbedingungen nicht nachgewiesen und war somit eine spezifische Reaktion der *tpr1*-Linien auf das Überangebot von ALA. Die erhöhte Konzentration von ALA rief darüber hinaus in der *tpr1-3*-Linie einen reduzierten Gehalt der meisten Proteine des Chlorophyllzweiges, mit Ausnahme von CHL27, hervor (Abb. 2.51). Besonders betroffen waren hierbei CHLM und PORB, welche in beiden *tpr1*-Linie einen reduzierten Gehalt bei 400 µM ALA im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Abb. 2.51). Die verringerte Abundanz von PORB in den *tpr1*-Linien könnte somit die Ursache für die reduzierten Chlid-Mengen sein (Abb. 2.51).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch eine Überangebot von ALA die Pigmentierung der *tpr1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp stark beeinträchtigt war. Dies konnte in beiden *tpr1*-Linien auf eine Reduktion der TBS-Intermediate sowie der CHLM und PORB Proteingehalte zurückgeführt werden. Hierbei schien ein direkter Zusammenhang zwischen der Abundanz von TPR1 und der Deregelung der TBS bei erhöhten ALA-Konzentrationen zu bestehen, da die *TPR1 knockout*-Linie (*tpr1-3*) stärker betroffen war als die *TPR1 knockdown*-Linie (*tpr1-2*). Allerdings war an diesem Punkt nicht klar, ob die Deregelung der TBS nur durch die veränderte Stabilität von PORB verursacht sein könnte.

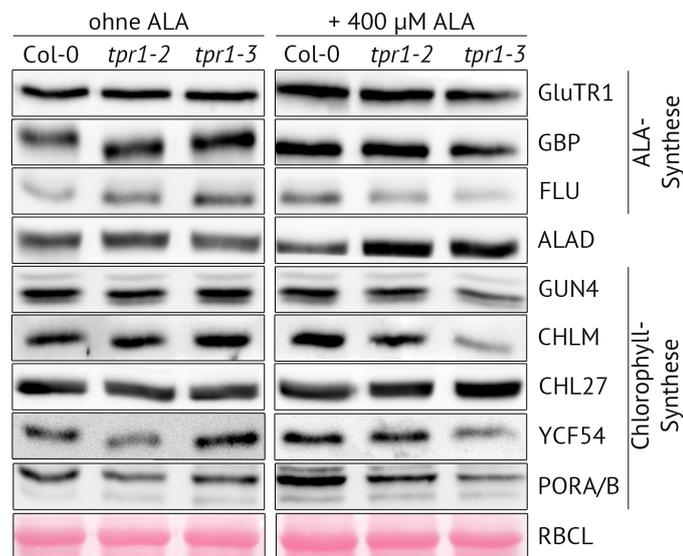


Abbildung 2.51. – Nachweis von Enzymen und Hilfsproteinen der TBS in Abhängigkeit der ALA-Konzentration. Die verwendeten Arabidopsis Keimlinge wurden für fünf Tage in kontinuierlichem Licht (100 µE) auf MS-Medium ohne und mit 400 µM bzw. 800 µM ALA angezogen. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine sind rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt.

2.2.23. Die Auswirkungen von erhöhten ALA-Konzentrationen auf die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in den *tpr1*-Keimlingen

In Keimlingen und adultem Blattgewebe der *tpr1*-Linien konnte ein erhöhter Gehalt von Singulett-Sauerstoff und Superoxidanionen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 2.2.13 und 2.2.16). Ein Grund für die Deregelung der TBS bei erhöhten ALA-Konzentrationen könnte dementsprechend die erhöhte Anreicherung von ROS sein. Um dies zu überprüfen, wurden in fünf Tage alten Arabidopsis Keimlingen, welche unter kontinuierlichem Licht auf Medium mit und ohne ALA angezogen wurden, die Gehalte verschiedener ROS nachgewiesen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der möglichen ROS-Ursache wurden abermals die *flu*- und *porb-2*-Mutanten als zusätzliche Kontrollen verwendet. In Wildtyp-Keimlingen war sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei erhöhten ALA-Konzentrationen im Medium lediglich eine geringe Menge an Singulett-Sauerstoff nachweisbar (Abb. 2.52). In den *tpr1*-Linien war der Gehalt an Singulett-Sauerstoff unter Kontrollbedingungen wildtypartig. Die Anzucht auf Medium mit 400 µM ALA führte jedoch nur in der *TPR1 knockout*-Linie (*tpr1-3*) zur Anreicherung von Singulett-Sauerstoff (Abb. 2.52). Diese Ergebnisse zeigten zum einen, dass die Akkumulation von ROS in den *tpr1*-Linien abhängig von der Tageslänge war. Das Fehlen von TPR1 löste nur im Tag-Nacht-Wechsel oder nach verlängerter Etiolierungsphase eine Akkumulation von Singulett-Sauerstoff aus

(siehe Abschnitt 2.2.13 und 2.2.16), während nach Anzucht in kontinuierlichem Licht der Gehalt an Singulett-Sauerstoff wildtypartig war (Abb. 2.52). Zum anderen zeigte sich, dass nur der *knockout* von *TPR1* die Anreicherung von Singulett-Sauerstoff bei erhöhten ALA-Gehalten hervorrief (Abb. 2.52). Im Vergleich zum Wildtyp und den *tpr1*-Linien akkumulierte in der *flu*-Mutante sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei erhöhten ALA-Konzentrationen im Medium Singulett-Sauerstoff (Abb. 2.52). In der *porb-2*-Linie konnte dagegen unter Kontrollbedingungen ein höherer Gehalt von Singulett-Sauerstoff detektiert werden, als nach fünf Tagen auf ALA-haltigem Medium (Abb. 2.52). Die *porb-2*-Linie schien dementsprechend durch die zusätzliche Bereitstellung von ALA weniger oxidativen Stress zu erleiden.

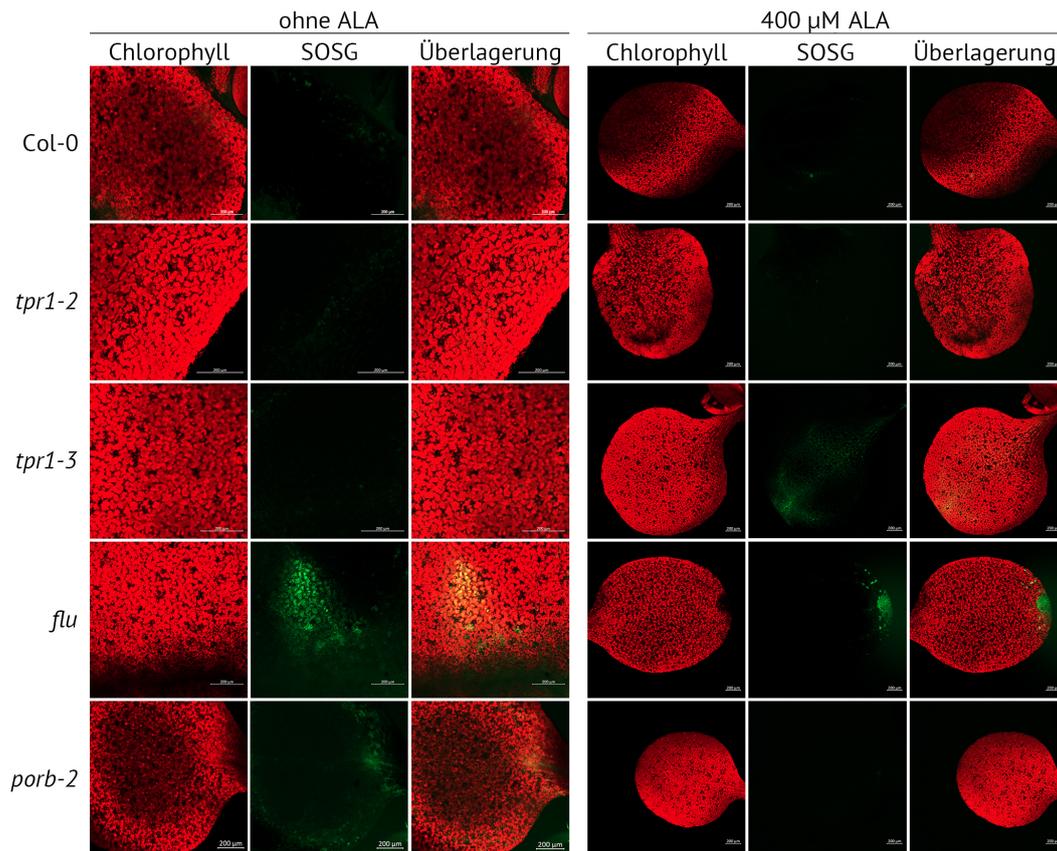


Abbildung 2.52. – Anreicherung von Singulett-Sauerstoff in Abhängigkeit der ALA-Konzentration. Die verwendeten Arabidopsis Keimlinge wurden für fünf Tage in kontinuierlichem Licht (100 μ E) auf MS-Medium mit und ohne 400 μ M ALA angezogen. Der Nachweis von Singulett-Sauerstoff erfolgte durch den *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG) Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz mittels konfokaler Laserscanmikroskopie detektiert wurde. Neben der SOSG-Fluoreszenz wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz untersucht. Die Überlagerung beider Signale dient der Lokalisierung der Singulett-Sauerstoff Anreicherung. Die angegebene Skalierung entspricht 200 μ m.

Neben Singulett-Sauerstoff wurde Wasserstoffperoxid und Superoxidationen in den fünf Tage alten Arabidopsis Keimlingen nachgewiesen. Besonders der Gehalt an Superoxidationen war dabei von Interesse, da in adultem Blattgewebe sowie in deetioliertem Gewebe der *tpr1*-Linien mehr Superoxidationen als im vergleichbaren Wildtyp akkumulierten (Abb. 2.30A, 2.36). Im Wildtyp reicherte sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch im Falle der Supplementierung mit ALA kaum Wasserstoffperoxid an (Abb. 2.53). Lediglich in den Leitgefäßen und Primärblättern konnte diese ROS-Spezies nachgewiesen werden (Abb. 2.53). Ähnliches traf für beide *tpr1*-Linien zu (Abb. 2.53). Allerdings konnte hierbei in den Primärblättern ein leicht erhöhter Wasserstoffperoxid-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, wel-

cher unabhängig von der Menge an ALA im Anzuchtsmedium war (Abb. 2.53). Ein zu den beiden *tpr1*-Linien vergleichbares Verhalten konnte für die *flu*-Mutante detektiert werden (Abb. 2.53). In der *porb*-Mutante war wie zuvor im Falle von Singulett-Sauerstoff die Anreicherung von Wasserstoffperoxid indirekt proportional zur ALA-Konzentration im Medium (Abb. 2.53). Im Wildtyp war ein geringer Gehalt von Superoxidanionen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei einer erhöhten ALA-Konzentration im Medium hauptsächlich an der Blattspitze und im Sprossapikalmeristem nachzuweisen (Abb. 2.53). Im Kontrast dazu verursachte ein Überangebot von ALA in den *tpr1*-Linien eine starke Anreicherung von Superoxidanionen, welche unter Kontrollbedingungen nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.53). In der *flu*-Mutante war der Gehalt von Superoxidanionen unter Kontrollbedingungen hingegen höher als auf ALA supplementiertem Medium (Abb. 2.53). Die Akkumulation von Superoxidanionen war in der *porb-2*-Linie vergleichbar zu den beiden *tpr1*-Linien: Mit erhöhter ALA-Konzentration nahm auch der Gehalt an Superoxidanionen zu (Abb. 2.53). Eine Überproduktion von ROS kann im Extremfall zum Zelltod des betroffenen Gewebes führen. Dies konnte jedoch durch die Anfärbung der fünf Tage alten Arabidopsis Keimlingen mit Trypanblau ausgeschlossen werden (siehe Anhang .6). Abgestorbenes Zellgewebe war somit nicht die Ursache für die sichtbare reduzierte Blattpigmentierung in den *tpr1*-Linien.

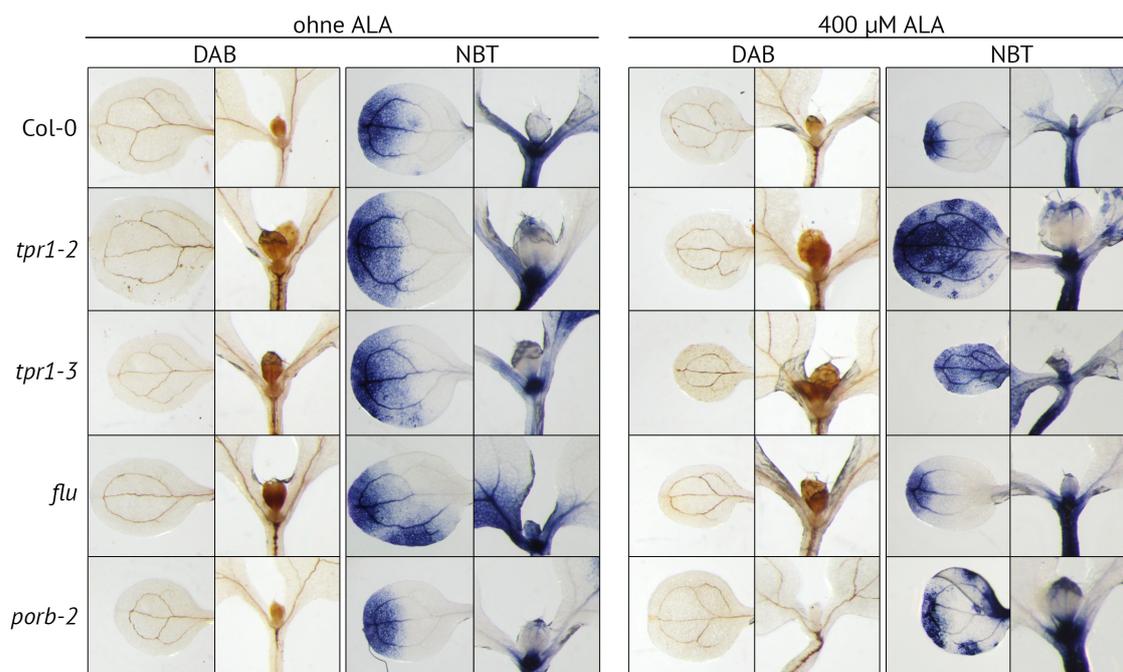


Abbildung 2.53. – Nachweis von Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen in Abhängigkeit der ALA-Konzentration. Die verwendeten Linien wurden für fünf Tage in kontinuierlichem Licht (100 μ E) auf MS-Medium mit und ohne 400 μ M ALA angezogen. Anschließend erfolgte die Anfärbung von Wasserstoffperoxid durch Diaminobenzidin (DAB), während Superoxidanionen mittels Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) sichtbar gemacht wurden.

Das Überangebot von ALA rief in den *tpr1*-Linien vor allem eine starke Anreicherung von Superoxidanionen und reduzierte Pigmentierung hervor (Abb. 2.48 und 2.53). Inwiefern der hohe Superoxidanionen-Gehalt im Zusammenhang mit der Destabilisierung der TBS-Enzyme stand, war allerdings unbekannt. Darüber hinaus war nicht auszuschließen, dass nach fünf Tagen auf ALA-supplementiertem Agarmedium eine Vielzahl sekundärer Effekte auftraten, welche den detektierten Phänotyp der *tpr1*-Linien verstärken könnten.

2.2.24. Der Einfluss von dunkelrotem Licht auf die *tpr1*-Linien

In den *tpr1*-Linien wurde unter verschiedenen Bedingungen eine starke Anreicherung von Superoxidanionen nachgewiesen. Die Hauptquellen für Superoxidanionen in Chloroplasten ist die Mehler-Reaktion, welche am PSI stattfindet [253, 254]. Aus diesem Grund sollte der Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Superoxidanionen und der photosynthetischen Leistung des PSI in den *tpr1*-Linien im Folgenden näher analysiert werden. Unter normalen Anzuchtsbedingungen konnten keine Auswirkungen auf die photosynthetische Leistung oder Komplexbildung des PSI in den *tpr1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Um dennoch zu überprüfen, ob TPR1 einen Einfluss auf die photosynthetische Leistung des PSI hatte, wurden Bedingungen so gewählt, dass PSI stärker beansprucht wird als PSII. Photonen einer Wellenlänge zwischen 710 und 850 nm, welche dem roten und infraroten Spektralbereich des sichtbaren Lichts entsprechen, werden vorrangig durch PSI absorbiert. Dementsprechend führt die Inkubation in dunkelrotem oder infrarotem Licht zu einer stärkeren Beanspruchung des PSI. Für die nachfolgenden Analysen wurde nur die *TPR1 knockout*-Linie *tpr1-3* verwendet, da für diese Linie die stärksten Unterschiede zum Wildtyp erwartet wurden. Die verwendeten Pflanzen wurden dafür für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für 90 min in dunkelrotem Licht inkubiert. Daraufhin wurde die Fluoreszenz von PSI mittels 77K-Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die PSI-Fluoreszenz der *tpr1-3*-Linie um ca. 7 % im Vergleich Wildtyp reduziert war (Abb. 2.54A). Diese Analysen lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass PSI in den *tpr1*-Linien unter spezifischen Bedingungen stärker beeinträchtigt war als im gleichbehandelten Wildtyp. Zusätzlich zur Analyse von PSI wurde mittels PAM die photosynthetische Leistung von PSII bei Raumtemperatur bestimmt (Abb. 2.54B). Hierbei fiel vor allem die geringere Fluoreszenz während der ersten beiden Lichtpulse nach Anschalten des aktinischen Lichtes in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 2.54B).

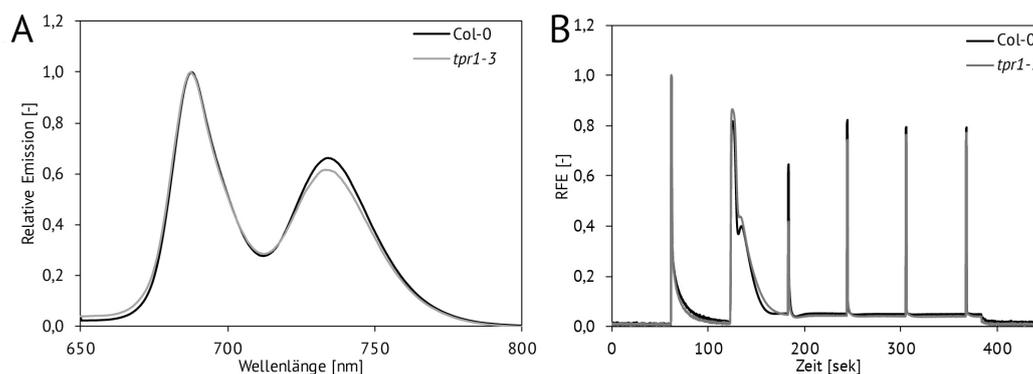


Abbildung 2.54. – Fluoreszenz von PSI und PSII nach 90 min in dunkelrotem Licht. Vier Wochen alte Arabidopsis Pflanzen wurden unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für 90 min in dunkelrotem Licht inkubiert. Daraufhin erfolgte die Messung der PSI und PSII Fluoreszenz. (A) Die mittels 77K-Fluoreszenzspektroskopie bestimmte Chlorophyllfluoreszenz wurde auf die Fluoreszenz von PSII bei 687 nm normiert. Die hier angegebenen Mittelwerte wurden aus drei biologischen Replikaten mit je drei technischen Replikaten bestimmt. (B) Die mittels PAM detektierte Fluoreszenz wurde auf die maximale Chlorophyllfluoreszenz nach 60 Sekunden normiert. Die hier angegebenen Mittelwerte wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Die veränderte Fluoreszenz von PSII nach 90 min in dunkelrotem Licht hatte indes keinen Einfluss auf die mittels PAM bestimmte maximale (F_v/F_m) und effektive Quantenausbeute (Φ PSII) des PSII in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp (Tab. 2.5). Somit führte die Inkubation in dunkelrotem Licht weder im Wildtyp noch in der *tpr1-3*-Linie zu einer Veränderung der PSII-Leistung. Dies entsprach den Erwartungen, da unter dunkelrotem Licht PSII weniger beansprucht wird als PSI. Allerdings konnte unter diesen Bedingungen für die *tpr1-3*-Linie ein Anstieg des NPQs beobachtet werden, was anhand der verringerten Fluoreszenz während der ersten beiden Lichtpulse nach Inkubation in aktinischem Licht sichtbar wurde (Tab. 2.5).

Tabelle 2.5. – PAM-Messungen nach 90 minütiger Inkubation in dunkelrotem Licht. Die vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen, gefolgt von einer 90 minütigen Inkubation in dunkelrotem Licht. Anschließend wurde mittels PAM die maximale (F_v/F_m) und effektive Quantenausbeute (Φ PSII) sowie das NPQ bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Parameter	Col-0	<i>tpr1-3</i>
F_v/F_m	0,835 ± 0,032	0,847 ± 0,001
Φ PSII	0,834 ± 0,031	0,846 ± 0,001
NPQ	0,210 ± 0,009	0,241 ± 0,021

Nach 90 min in dunkelrotem Licht wurden Thylakoidmembranen isoliert und mittels Blau-Nativer Gradientengele aufgetrennt. Nach 90 min in dunkelrotem Licht war vor allem der Gehalt des PSI Monomers / PSII-Dimers sowie der PSII-LHCII-Superkomplexe in der *tpr1-3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.55A). Der Proteingehalt von LHCA1 war hingegen in beiden *tpr1*-Linien wildtypartig (Abb. 2.55B). Im Vergleich zu LHCA1 war die Abundanz von GluTR1 und PORB in der thylakoidalen Fraktion der *tpr1*-Linien stark gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 2.55B). Hierbei schien der Grad der Reduktion abhängig von der Stärke des TPR1-Defekts zu sein, da in der *TPR1 knockdown*-Linie *tpr1-2* ein moderat verringerter Gehalt von GluTR1 und PORB nachweisbar war, welcher sich in der *TPR1 knockout*-Linie *tpr1-3* verstärkte (Abb. 2.55B, Vergleich Abb. 2.25). Weiterhin wiesen die beiden Cylase-Komponenten CHL27 und YCF54 eine reduzierte Abundanz in beiden *tpr1*-Linien auf (Abb. 2.55B). Wildtypartig waren hingegen die FLU und CHLM Proteingehalte der *tpr1*-Mutanten (Abb. 2.55B). Aufgrund dessen konnte davon ausgegangen werden, dass die veränderte Membranstabilität der Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes in den *tpr1*-Linien nicht durch die fehlende Bindung dieser durch FLU verursacht wurde. Interessant war außerdem, dass das Verhältnis von TPR1₄₃ zu TPR1₄₀ nach 90 min in dunkelrotem Licht im Wildtyp ausgeglichen war (Abb. 2.55B), während unter Standard-Kurztagbedingungen TPR1₄₃ abundanter gegenüber TPR1₄₀ war (Vergleich Abb. 2.25).

Das veränderte Verhältnis von TPR1₄₃ zu TPR1₄₀ im Wildtyp war eine interessante Folge der Inkubation in dunkelrotem Licht. Um zu überprüfen, ob die beiden TPR1-Formen dabei mit verschiedenen photosynthetischen Komplexen co-lokalisieren, wurde die Verteilung dieser in der zweiten Dimension untersucht. Darüber hinaus wurde die Lokalisation von LHCA1 analysiert, da bereits zuvor ein möglicher Zusammenhang zwischen TPR1 und LHCA1 unter Standard-Kurztagbedingungen nachgewiesen wurde (Vergleich Abb. 2.41).

TPR1₄₃ war in der zweiten Dimension unter Standard-Kurztagbedingungen geringfügig breiter verteilt als TPR1₄₀ (Abb. 2.55 C). Dabei war die Abundanz von TPR1₄₃ im Bereich der LHCII-Trimere, in welchem auch LHCA1 vorlag, am stärksten (Abb. 2.55 C). Nach 90 min in dunkelrotem Licht nahm die Abundanz von TPR1₄₃ vor allem in diesem Bereich ab, während die Abundanz von TPR1₄₀ im Bereich der freien Proteine zunahm (Abb. 2.55 C). Somit könnte ein Zusammenhang zwischen TPR1 und dem LHCI-Komplex unter Bedingungen bestehen, in welchen PSI stärker beansprucht wird als PSII. Für weiterführende Analysen können längere Inkubationszeiten in dunkelrotem Licht gewählt oder eine Inhibierung des PSI nach Lima-Melo *et al.* [286] vorgenommen werden.

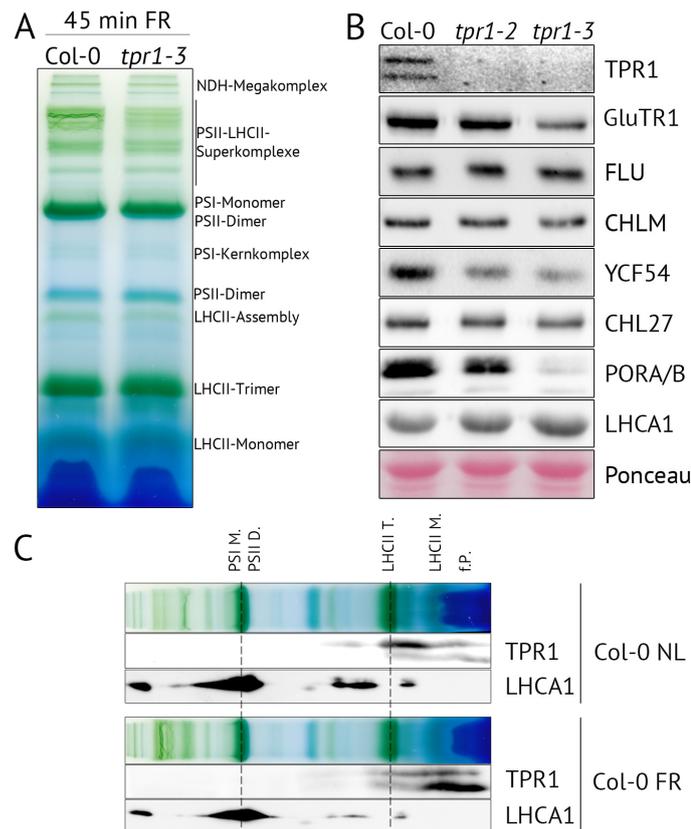


Abbildung 2.55. – Analyse von isolierten Thylakoidmembranen nach 90 minütiger Inkubation in dunkelrotem Licht. Die verwendeten Rosettenpflanzen wurden für fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für 90 min in dunkelrotem Licht inkubiert. (A) BN-PAGE von isolierten Thylakoidmembranen. Die isolierten Thylakoidmembranen wurden mit 1 % DDM solubilisiert und mittels eines 4- 12 %igen BN-PAGE Gradientengels elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden dabei Proteinproben mit gleicher Chlorophyllmenge eingesetzt. Die nachweisbaren photosynthetischen Komplexe wurden rechts neben der jeweiligen Bande vermerkt. (B) Proteingehalte von Enzymen und Hilfsproteinen der TBS. Die isolierten Thylakoidmembranen wurden mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulosemembran diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt. (C) TPR1- und LHCA1-Proteingehalte nach fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (NL) bzw. für 90 min in dunkelrotem Licht (FR). Die isolierten Thylakoidmembranen wurden mit 1 % DDM solubilisiert und daraufhin mittels eines 4- 12 %igen BN-PAGE Gradientengels elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden Proteinproben mit gleicher Chlorophyllmenge eingesetzt. In der zweiten Dimension erfolgte die Auftrennung durch 12 %ige SDS-Gele. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen Signal angegeben. PSI M.-PSI Monomere; PSII D.-PSII Dimere; LHCII T.-LHCII Trimere; LHC M.-LHC Monomere; f.P.-freie Proteine.

2.2.25. Virus-induziertes Gen-Silencing von *TPR1*

TPR1 und *FLU* gehören beide zu den TPR-Proteinen und wiesen eine hohe Übereinstimmung hinsichtlich der Interaktionspartner auf. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob eine gewisse funktionelle Redundanz zwischen beiden Proteinen besteht. Eine Kreuzung der *flu*- und *tpr1-3*-Mutanten konnte aufgrund der zeitlichen Limitation nicht gewährleistet werden, weswegen das VIGS-Verfahren verwendet wurde, um dieser Fragestellung nachzugehen. Hierfür wurde eine 300 bp große Teilsequenz der kodierenden DNA von *AtTPR1* in einen Tabak-Rattle-Virus-basierten Vektor (pTRV2) eingefügt. Die Transformation dieses Vektors in Arabidopsis rief die pflanzlichen Abwehrreaktion gegen das Virus hervor [287]. Als Konsequenz führte dies zu einer sich systemischen ausbreitenden Inaktivierung von *TPR1*, welche durch den RNA-induzierten Silencing Komplex vermittelt wurde [287]. Als Kontrolle diente hierbei ein virales Konstrukt, welches gegen *GFP* gerichtet war. Sowohl der *TPR1*-pTRV2 als auch *GFP*-pTRV2 Vektor wurden in Agrobakterien transformiert und anschließend in die Kotyledonen von 10 Tage alte Wildtyp- und *flu*-Keimlinge infiltriert. Ein zweiter Vektor (pTRV1), welcher unter anderem Gene für essentielle Komponenten der viralen Replikationsmaschinerie enthielt [287], wurde co-infiltriert. Zwei Wochen nach Infiltration konnte die Inaktivierung von *TPR1* nachgewiesen werden. Es zeigte sich hierbei, dass die systemische Inaktivierung von *TPR1* im Wildtyp-Hintergrund weniger effektiv war als im Hintergrund der *flu*-Linie (Abb. 2.56A). Während im Wildtyp-Hintergrund der *TPR1*-Transkriptgehalt lediglich um 40 % im Vergleich zur *GFP*-Kontrolle reduziert war, konnte im *flu*-Hintergrund ein um 90 % reduzierter *TPR1*-Transkriptgehalt nachgewiesen werden (Abb. 2.56A). Die Reduktion des *TPR1*-Transkriptgehalts führte sowohl im Wildtyp als auch in der *flu*-Mutante zu einer vergleichbaren Reduktion des *TPR1*-Proteingehalts (Abb. 2.56B). Die Inaktivierung von *TPR1* war somit, zumindest in der *flu*-Linie, sehr erfolgreich, führte allerdings zu keiner sichtbaren phänotypischen Veränderung im Vergleich zur korrespondierenden *GFP*-Kontrolle (Abb. 2.56C).

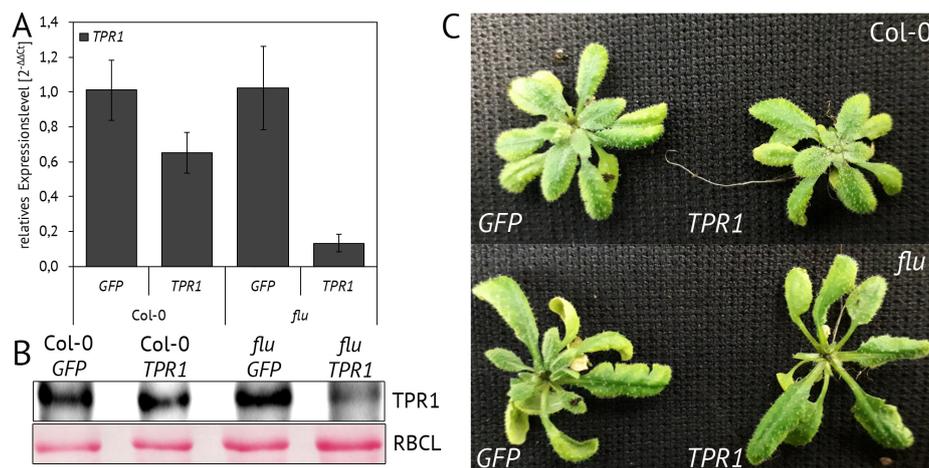


Abbildung 2.56. – Nachweis der Inaktivierung von *TPR1* in *Arabidopsis thaliana*. Die verwendeten Linien wurden für 10 Tage unter kontinuierlichen Lichtbedingungen angezogen. Nach 10 Tagen erfolgte die Infiltration des GFP-pTRV2 und TPR1-pTRV2 Vektors. Zwei Wochen nach Infiltration wurden die Transformanten analysiert. (A) *TPR1*-Transkriptgehalt. Der in den infiltrierten Pflanzen mittels quantitativer PCR nachgewiesene Transkriptgehalt wurde relativ zur Kontrolle (Col-0 GFP) bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt. (B) Immunologischer Nachweis des TPR1-Proteingehalts in positiv getesteten Transformanten. Die Proteinproben wurden mittels eines 12 %igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. (C) Phänotyp einer repräsentativen Rosettenpflanze zwei Wochen nach Infiltration.

Sowohl im Hintergrund des Wildtyps als auch der *flu*-Mutante führte die Reduktion von *TPR1* zu einer Akkumulation von MgP, MgProtoME und PChlid im Vergleich zur jeweiligen *GFP*-Kontrolle (Abb. 2.57A-C). Hierbei rief auch eine geringfügige Destabilisierung von TPR1, wie im Falle der *Col-0-TPR1*-Pflanzen, die Anreicherung dieser Intermediate hervor (Abb. 2.57A-C). Allerdings ließ sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem Chlid-Gehalt und der Abundanz von TPR1 herstellen (Abb. 2.57D). Während in *Col-0-TPR1*-Transformanten der Chlid-Gehalt nur geringfügig reduziert war, führte die starke Destabilisierung von *TPR1* in *flu-TPR1*-Pflanzen zu einer deutlichen Reduktion von Chlid (Abb. 2.57D). Dies unterstreicht die zuvor (Abschnitt 2.2.7) vermutete Verbindung zwischen der POR-Aktivität und der Anwesenheit von TPR1. Die Bestimmung der POR-Aktivität konnte während dieser Arbeit nicht gewährleistet werden. Die Pflanzen müssten für die Aktivitätsmessung sechs Stunden in Dunkelheit inkubiert werden [275], was in der *flu*-Mutante zur Akkumulation von PChlid führen würde, welche wiederum die Messung der POR-Aktivität beeinträchtigen könnte. Die Veränderungen der *steady state* TBS-Intermediatgehalte hatte indes keine Auswirkungen auf den Gesamtchlorophyllgehalt oder das Chl a/b Verhältnis (Abb. 2.57E-F).

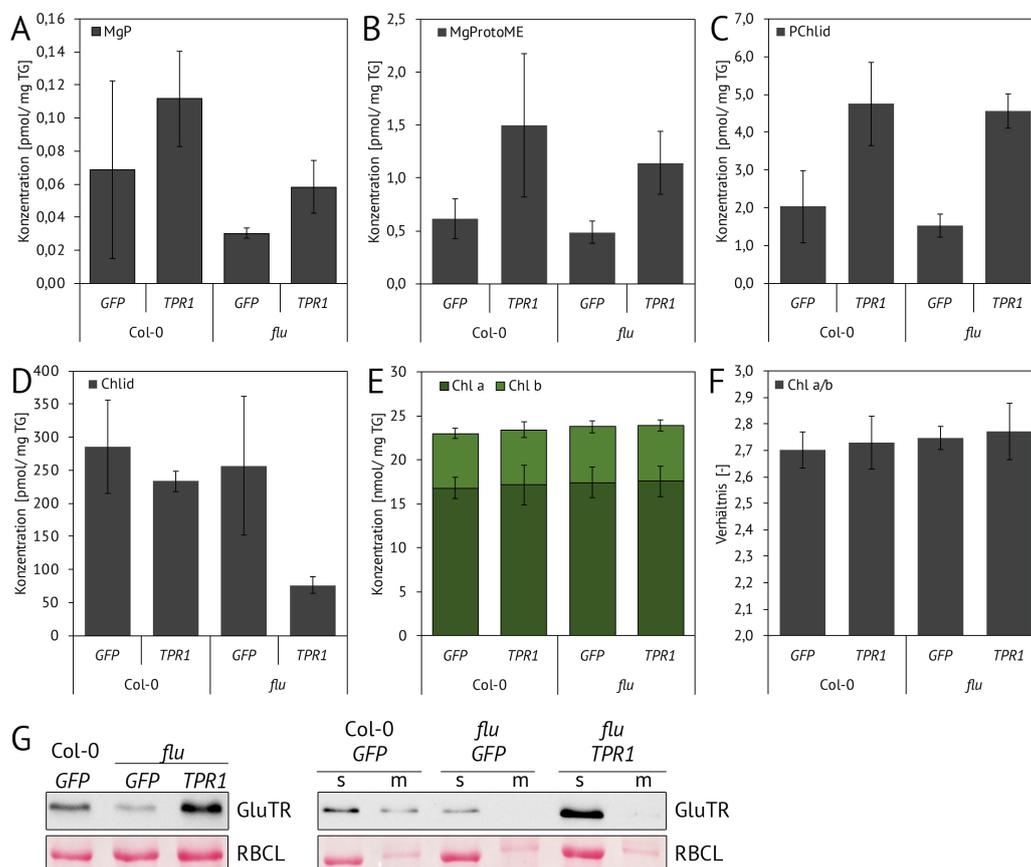


Abbildung 2.57. – Analyse der *steady state* TBS-Intermediat- und Chlorophyllgehalte sowie der subzellulären Lokalisation von GluTR. Die verwendeten Linien wurden für 10 Tage unter kontinuierlichen Lichtbedingungen angezogen. Nach 10 Tagen erfolgte die Infiltration der Silencing-Konstrukte (GFP-pTRV2 und TPR1-pTRV2). Zwei Wochen nach Infiltration wurden die Transformanten hinsichtlich der TBS-Intermediatgehalte (A-F) und der Lokalisation von GluTR1 (G) untersucht. (A-E) Die mittels HPLC bestimmten Intermediat- und Chlorophyllgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (F) Aus den nachgewiesenen Chlorophyllmengen wurde das Chl a/b Verhältnis berechnet. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten bestimmt. (G) Immunologischer Nachweis von GluTR1 sowohl im Gesamtproteinextrakt (links) als auch in der löslichen (s) und membrangebundenen (m) Fraktion (rechts). Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle.

Besonderes Interesse galt darüber hinaus der GluTR1-Stabilität und -Lokalisation in den *flu-TPR1*-Transformanten. Dabei zeigte sich, dass in *flu-GFP*-Transformanten der GluTR1-Gehalt im Vergleich zur *Col-0-GFP*-Kontrolle reduziert war, während in *flu-TPR1*-Pflanzen das Gegenteil der Fall war (Abb. 2.57G). In den *flu-GFP*- und *flu-TPR1*-Transformanten konnte GluTR1 außerdem nicht mehr in der Membranfraktion detektiert werden (Abb. 2.57G). Dies war vor allem für die *flu-GFP*-Transformanten überraschend, da trotz des Fehlens von FLU ein geringer Anteil von GluTR1 an der Membran erwartet wurde [147]. Nichtsdestotrotz wurde deutlich, dass das Fehlen von TPR1 einen additiven Effekt auf die Veränderung der GluTR1-Lokalisation in der *flu*-Mutante hatte (Abb. 2.57G).

Es galt weiterhin zu prüfen, ob möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt ein stärkere Inaktivierung von *TPR1* im Wildtyp-Hintergrund beobachtet werden konnte. Drei Wochen nach Infiltration war dabei der relative *TPR1*-Transkriptgehalt in den *Col-0-TPR1*-Transformanten um 80 % im Vergleich zur *Col-0-GFP*-Kontrolle reduziert (Abb. 2.58A). Der Chlid-Gehalt der *Col-0-TPR1*-Pflanzen war dabei ebenfalls um ca. 80 % im Vergleich zur *Col-0-GFP*-Kontrolle reduziert (Abb. 2.58B). Alle weiteren TBS-Intermediatgehalte lagen zu diesem Zeitpunkt unter dem Detektionslevel der HPLC. Das Fehlen von *TPR1* hatte auch zu einem späteren Zeitpunkt keinen Einfluss auf den Gesamtchlorophyllgehalt (Abb. 2.58C).

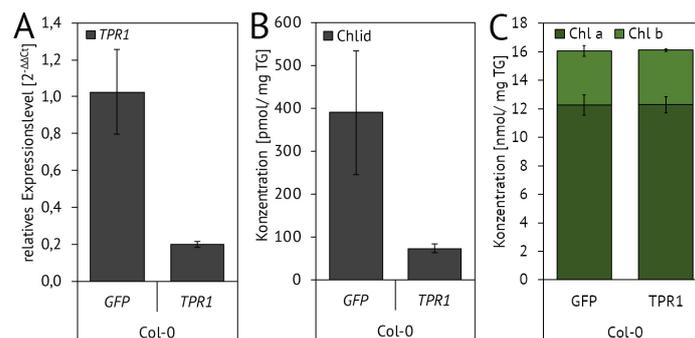


Abbildung 2.58. – Nachweis des relativen *TPR1*-Transkriptgehaltes sowie des Chlid- und Chlorophyll-Gehaltes. Die verwendeten Linien wurden für 10 Tage unter kontinuierlichen Lichtbedingungen angezogen. Nach 10 Tagen erfolgte die Infiltration der Silencing-Konstrukte (GFP-pTRV2 und TPR1-pTRV2). Drei Wochen nach Infiltration wurden die Transformanten hinsichtlich des *TPR1*-Transkriptgehalts (A) und den Gehalten von Chlid (B) und Chlorophyll (C) untersucht. (A) Der mittels quantitativer PCR gemessene Transkriptgehalt wurde relativ zur *Col-0-GFP*-Kontrolle bestimmt. (B, C) Die durch HPLC nachgewiesenen Chlid- und Chlorophyll-Gehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

Bereits diese sehr anfänglichen Ergebnisse der *TPR1*-VIGS-Linien zeigten, dass die erhöhte Stabilität von GluTR1 sowie die reduzierten Chlid-Gehalte direkt im Zusammenhang mit der Inaktivierung von *TPR1* stehen. Sowohl im Wildtyp- als auch im *flu*-Hintergrund akkumulierten darüber hinaus durch die Inaktivierung von *TPR1* die TBS-Intermediate MgP, MgProtoME und PChlid (Abb. 2.57A-C). Unter Zuhilfenahme des VIGS-Systems wurde gezeigt, dass eine Kreuzung der *flu*- und *tpr1-3*-Mutanten ein hilfreicher Ansatz wäre, um das Zusammenspiel zwischen diesen beiden TPR-Proteinen im Hinblick auf die Regulation von GluTR1, CHL27 und POR genauer zu analysieren. Darüber hinaus wären Kreuzungen zwischen der FLU-Überexpressionslinie und der *TPR1* knockout-Linie *tpr1-3* und *vice versa* ein interessanter Ansatzpunkt.

2.2.26. Initiale Charakterisierung von *TPR1*-Komplementationslinien

Es sollte überprüft werden, ob das Wiedereinfügen des *TPR1*-Gens zur Komplementation der sichtbaren Unterschiede zwischen den *tpr1*- und Col-0-Linien führte. Aus diesem Grund wurde die *AtTPR1*-Sequenz in den pCAMBIA-Vektor eingefügt, wodurch *TPR1* unter der Kontrolle des 35S-Promotors stand. Für weiterführende Co-Immunoprecipitationsanalysen wurde am carboxy-terminalen Ende der *TPR1*-Sequenz ein HA-Strep-Tag angefügt. Der Vektor wurde, vermittelt durch Agrobakterien, in *Arabidopsis* transformiert. Positive Transformanten wurden durch die im Vektor enthaltene BASTA-Resistenzkassette selektiert. Nach erfolgreicher Selektion wurde das Vorhandensein der transformierten Kassette im Hintergrund der *tpr1-3*-Linie mittels PCR verifiziert (Abb. 2.59A). In zwei separat durchgeführten Transformationsrunden wurden so insgesamt fünf unabhängige Linien selektiert, welche in den nachfolgenden Analysen als *TPR1*-HA-Linien bezeichnet wurden. Der relative *TPR1*-Transkriptgehalt der *TPR1*-HA-Linien war trotz des sehr starken 35S-Promotors nur um das Sechs- bis Achtfache im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.59B). Bei der Analyse des *TPR1*-Proteingehalts konnten zweierlei Beobachtungen gemacht werden: 1) Wurde durch das Anfügen des HA-Strep-Tags das Laufverhalten von *TPR1* verändert (Abb. 2.59C). 2) Führte die sechs- bis achtfache Erhöhung des relativen *TPR1*-Transkriptgehalts maximal zu einer Verdopplung des *TPR1*-Proteingehaltes (Abb. 2.59C). Dennoch konnte die Überexpression von *TPR1* in den *TPR1*-HA-Linien bestätigt werden. Keine der selektierten Überexpressionslinien zeigte eine makroskopisch sichtbare Veränderung der Pigmentierung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.59D).

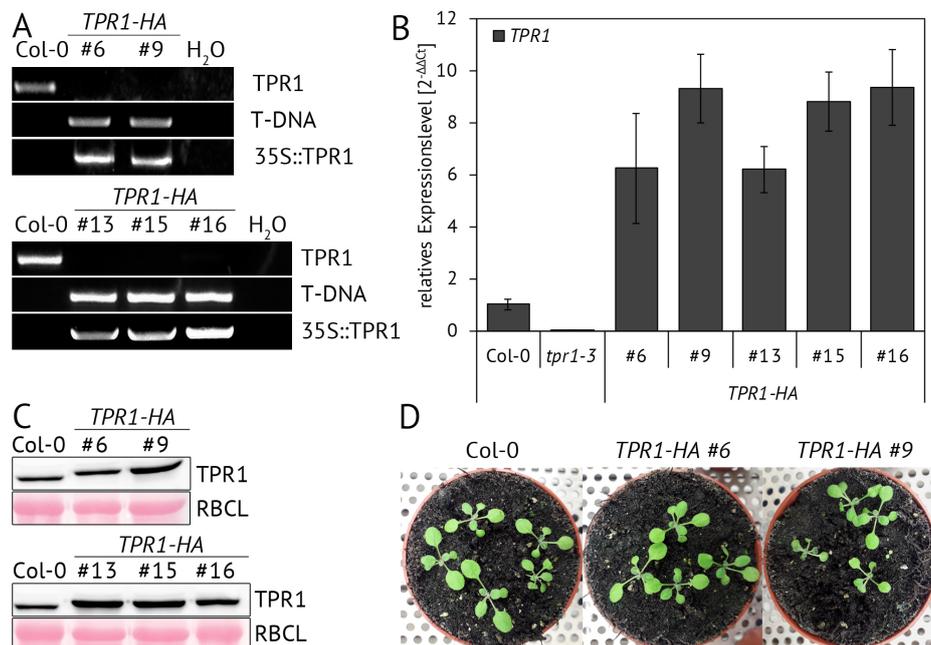


Abbildung 2.59. – Selektion der *TPR1*-HA-Linien. Die verwendeten F2-Linien wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. (A) Nachweis der Homozygotie des transformierten 35S::TPR1 Konstruktes im Hintergrund der *tpr1-3*-Linie. Es wurde eine genspezifische (TPR1) und eine T-DNA spezifische (T-DNA) Primerkombination sowie eine spezifische Primerkombination für die 35S::TPR1-Genkassette gewählt. Die Auftrennung der mittels PCR gewonnen Amplifikate erfolgte durch 1 %ige Agarosegele. (B) Nachweis des *TPR1*-Transkriptgehalts. Der mittels quantitativer PCR nachgewiesene *TPR1*-Transkriptgehalt der fünf selektierten *TPR1*-HA-Linien sowie der *tpr1-3*- Linie wurde relativ zum Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. (C) Immunologischer Nachweis von *TPR1*. Die Gesamtproteinextrakte wurden mittels 12 % iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. (D) Der Phänotyp von zwei selektierten *TPR1*-HA-Linien im Vergleich zum Wildtyp.

Für die weiterführenden Analysen wurden die Linien *TPR1-HA* #6 und #9 verwendet. In diesen beiden Überexpressionslinien waren die *steady state* Gehalte der TBS-Intermediate MgP, MgProtoME und Chlide wildtypartig (Abb. 2.60A, B, D). Die Reduktion dieser Intermediate in der *tpr1-3*-Linie konnte somit erfolgreich komplementiert werden (Abb. 2.60A, B, D). Im Unterschied dazu war der PChlid-Gehalt der beiden *TPR1*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp und der *tpr1-3*-Linie reduziert (Abb. 2.60C). Aufgrund der in den *TPR1*-Überexpressionslinien gemessenen PChlid- und Chlid-Mengen konnte bereits an dieser Stelle vermutet werden, dass die Aktivität und Effektivität von POR in diesen Linien wildtypartig war. Der Gesamtchlorophyllgehalt der *TPR1*-Überexpressionslinien war im Vergleich zur *tpr1-3*-Linie erhöht, konnte jedoch nicht vollständig zurück auf das Wildtyp-Level gebracht werden (Abb. 2.60E)

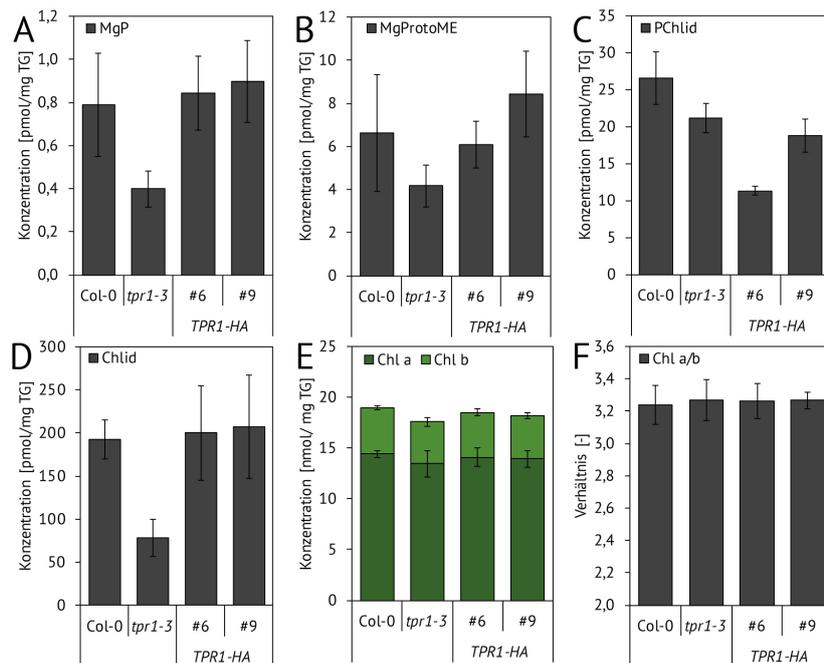


Abbildung 2.60. – *Steady state* TBS-Intermediatgehalte zweier *TPR1-HA*-Linien im Vergleich zum Wildtyp und der *tpr1-3*-Mutante. Die verwendeten Pflanzen wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Die Probenentnahme erfolgte zwei Stunden nach Beginn der Belichtungsphase. (A-E) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (F) Das Chl a/b Verhältnis wurde aus den gemessenen Chlorophyllmengen bestimmt. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

Die ALA-Synthesekapazität war in den beiden untersuchten *TPR1-HA*-Linien im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.61A). Darüber hinaus war in einer weiteren Linie der zweiten Transformationsrunde (*TPR1-HA*-#16) eine deutlich reduzierte ALA-Synthesekapazität im Vergleich zum Wildtyp und der *tpr1-3*-Linie nachweisbar (Abb. 2.61A). Unklar war, warum in der Linie #16 ein stärkerer Effekt auf die ALA-Syntheserate zu sehen war, obwohl die Linien #9 und #16 einen ähnlichen *TPR1*-Protein- und -Transkriptgehalt aufwiesen (Abb. 2.59B, C). Für die Analyse der Proteingehalte wurde die Linie mit der stärksten Reduktion der ALA-Synthesekapazität ausgewählt (*TPR1-HA*-#16). In dieser Linie lag im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr GluTR1 an der Membran gebunden vor, was die Auswirkungen auf die ALA-Synthese erklärte. Allerdings wurde in der *TPR1-HA* #16-Linie ebenfalls mehr GluTR1 in der löslichen Fraktion als im Wildtyp nachgewiesen (Abb. 2.61B). Somit wurde durch die Überexpression von *TPR1* GluTR1 nicht destabilisiert. Der FLU-Proteingehalt war in der *TPR1-HA* #16-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht verringert (Abb. 2.61B), sodass der erhöhte Anteil von GluTR1 an der Membran nicht durch

eine erhöhte Stabilität von FLU erklärt werden konnte. Weiterhin war der membrangebundene Anteil von PORA/B in der *TPR1-HA #16*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.61B), was den reduzierten PChlid-Gehalt (Abb. 2.60 C) erklären könnte. Die Abundanz von LHCA1 war in der Überexpressionslinie hingegen wildtypartig (Abb. 2.61B). Für TPR1 konnte sowohl im Wildtyp als auch in der *TPR1-HA*-Linie das zuvor gesehene spezifische Bandenmuster detektiert werden (Abb. 2.61B). Das Anfügen des carboxyterminalen HA-Strep-Tags führte zu einem veränderten Laufverhalten von TPR1, wodurch das transgene TPR1-Protein um 2-3 kDa größer wirkte als das endogene Protein (Abb. 2.61B). Darüber hinaus konnte in der *TPR1-HA*-Linie ein geringerer Anteil von TPR1 in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Dies wurde möglicherweise durch die Überexpression von TPR1 verursacht, wodurch die Integration von TPR1 in die Thylakoidmembran beeinträchtigt gewesen sein könnte.

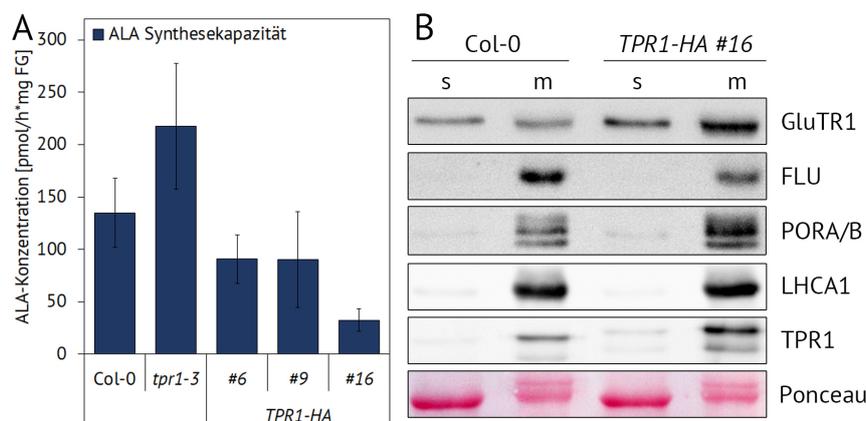


Abbildung 2.61. – ALA-Synthesekapazität und subzelluläre Lokalisation verschiedener Proteine der TBS in den *TPR1-HA*-Linien. Für die Analysen wurden vier Wochen alte, unter Standard-Kurztagbedingungen angezogene Arabidopsis Pflanzen verwendet. (A) Die ALA-Synthesekapazität wurde nach vier Stunden Inkubation mit Lävulinsäure unter moderaten Lichtintensitäten (120 μ E) relativ zum eingesetzten Frischgewicht (FG) bestimmt. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt. (B) Subfraktionierung von Gesamtproteinextrakten. Die Proteinproben wurden in die lösliche (*soluble*; s) und membrangebundene (m) Fraktionen unterteilt und mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulosemembran diente als Ladekontrolle. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt.

Das Wiedereinfügen von *TPR1* führte unter Standard-Kurztagbedingungen zur Komplementation des *tpr1-3*-Phänotyps. Besonders die reduzierten TBS-Intermediatgehalte der *tpr1-3*-Linie konnten in den *TPR1-HA*-Linien wiederhergestellt werden. Darüber hinaus führte die Überexpression von TPR1 sogar zu einem zur *tpr1-3*-Linie komplementären Effekt auf den PChlid-Gehalt und die ALA-Synthesekapazität.

Neben dem Einfluss der Überexpression von TPR1 auf die TBS unter Standard- Kurztagbedingungen wurde der Phänotyp der Überexpressionslinien während der Deetiolierung untersucht. Dafür wurden die verwendeten Linien für sechs Tage in Dunkelheit angezogen, gefolgt vom 24 h in kontinuierlichem Licht (100 μ E). Die *TPR1-HA*-Linien zeigten nach 24 h ein wildtypartiges Erscheinungsbild im Hinblick auf die Pigmentierung der Kotyledonen (Abb. 2.62A). Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass das Wiedereinfügen von *TPR1* zu einer Komplementation der im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Ergrünungsrate der *tpr1-3*-Linie führte (Abb. 2.62B). Allerdings wurde nur für Linie *TPR1-HA #6* eine wildtypartige Ergrünungsrate nachgewiesen, während der Anteil von grünen Keimlingen in der *TPR1-HA-#9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp

weiterhin leicht reduziert war (Abb. 2.62B). Es ist jedoch zu bemerken, dass auch der Wildtyp nach 48 h nur eine Ergrünungsrate von 85 % aufwies, anstatt einer erwarteten Rate von 95 - 100 % (Abb. 2.62B). Eine mögliche Ursache dafür war die Saatgutqualität. Da das hier verwendete Saatgut allerdings zum selben Zeitpunkt geerntet wurde, konnte der Unterschied zwischen den einzelnen Linien dennoch als aussagekräftig angesehen werden.

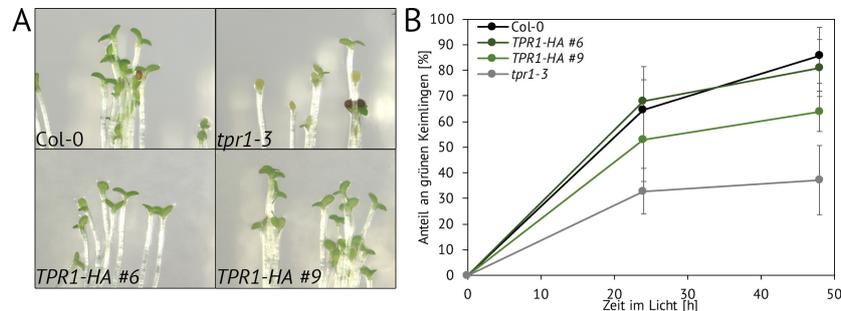


Abbildung 2.62. – Deetiolierung der *TPR1-HA*-Linien im Vergleich zum Wildtyp und der *tpr1-3*-Mutante. Die verwendeten Keimlinge wurden für sechs Tage in Dunkelheit angezogen und anschließend für 24 h in kontinuierlichem Licht inkubiert (100 μ E). (A) Phänotyp der Keimlinge nach 24 h im Licht. (B) Ergrünungsrate. Der Anteil an grünen Keimlingen wurde im Vergleich zur Gesamtanzahl der gekeimten Samen bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden jeweils mindestens 50 Keimlinge pro angegebenem Zeitpunkt und Linie ausgezählt.

Eine weitere Folge des *TPR1* knockouts war ein erhöhter Gehalt von Superoxidanionen sowohl in deetioliertem als auch adultem Gewebe unter Standard-Kurztagbedingungen (Abb. 2.30A und 2.36). In den *TPR1*-Überexpressionslinien konnte hingegen ein reduzierter Gehalt von Superoxidanionen im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 2.63), was einen möglichen direkten Zusammenhang zwischen der Abundanz von *TPR1* und dem Gehalt an ROS unterstrich.

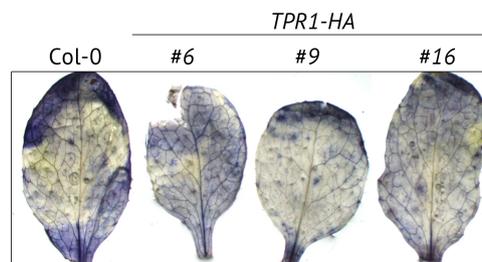


Abbildung 2.63. – Nachweis von Superoxidanionen in den *TPR1-HA*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp. Die verwendeten Arabidopsis Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Der Nachweis der Superoxidanionen erfolgt mittels Nitroblautetrazoliumchlorid.

Mit diesen ersten Analysen der *TPR1-HA*-Linien konnte gezeigt werden, dass durch das Wiedereinfügen von *TPR1* die verzögerte Ergrünungsrate sowie der erhöhte Gehalt von Superoxidanionen der *tpr1*-Linien komplementiert werden konnten. Inwiefern die Überexpression von *TPR1* die Stabilität des FLU-Inaktivierungskomplexes und die Verteilung der PChlid-Spezies während der Etiolierung beeinflusste, und ob durch den geringeren Anteil an Superoxidanionen die *TPR1-HA*-Linien resistenter gegenüber Bedingungen mit hohem oxidativen Stress waren, bilden wichtige Ansatzpunkte für weiterführende Analysen.

2.2.27. Analyse von TPR1-Deletionskonstrukten

Es ist postuliert, dass jedes TPR-Motiv für die Bindung eines spezifischen Interaktionspartners zuständig ist [194]. Durch die Deletion jedes TPR-Motivs in der TPR1-Sequenz könnte diese Hypothese überprüft werden (Abb. 2.64). Zum einen sollten die Deletionskonstrukte für Interaktionsanalysen mittels BiFC und Hefe-2-Hybrid erzeugt werden. Zum anderen sollten die Deletionskonstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promoters in die *tpr1-3*-Linie transformiert werden. Mittels dieser Deletionslinien sollte überprüft werden, inwiefern das Fehlen eines TPR-Motivs den *tpr1*-Phänotyp komplementieren könnte. Weitere interessante Fragestellungen sind, welchen Beitrag die Transmembrandomäne zur Funktion von TPR1 leistet und ob die membranintegrale Lokalisation unabdingbar für die Funktionalität von TPR1 ist. Dafür sollte ein Konstrukt erstellt werden, bei welchem die Transmembrandomäne entfernt wurde (Abb. 2.64). Aufgrund der zeitlichen Limitation wurde lediglich mit der Klonierung der erwähnten Konstrukte begonnen, sodass zur Effektivität der Komplementation und zum Einfluss der Deletionskonstrukte auf die TBS keine Aussage getroffen werden konnte. Allerdings war die Erzeugung dieser Linien ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Analysen.

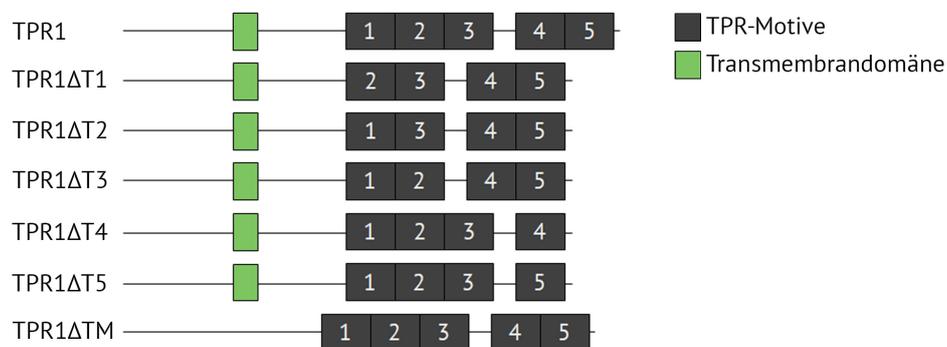


Abbildung 2.64. – Schematische Darstellung der TPR1-Deletionskonstrukte. Die Transmembrandomäne (TM) wurde in Hellgrün, die TPR-Motive in Hellgrau dargestellt. Bereiche ohne postulierte Domänen oder Funktionen wurden als schwarze Striche schematisiert. Der Name des jeweiligen Konstruktes wurde links neben der Darstellung der dazugehörigen Sequenz vermerkt.

2.3. Weitere TPR-Proteine mit Einfluss auf die TBS

2.3.1. *SLOW GREEN 1* im Zusammenhang mit der Tetrapyrrole-Biosynthese

Ein weiterer Kandidat für das Pitt-Homolog in *Arabidopsis thaliana* war *SLOW GREEN 1* (*SG1*), welches ebenfalls eine hohe Sequenzähnlichkeit und -identität zu Pitt auswies (Tab. 2.1). Allerdings verfügt *SG1* über keine transmembranen Bereiche. Hu *et al.* charakterisierten bereits 2014 eine *sg1*-Punktmutante, welche sich durch eine stark verlangsamte Ergrünung und eine abnormale Chloroplastenentwicklung auszeichnete [212]. Eine Ursache für die verzögerte Entwicklung war dabei die reduzierte Aktivität der kern- und plastidenkodierten RNA-Polymerasen [212]. Darüber hinaus interagierte *SG1* genetisch mit *GUN1* und *GUN4*, weshalb *SG1* als eine Komponente des retrograden Signalweges vermutet wurde [212].

2.3.1.1. Rekombinante Expression von *SG1*

Trotz der bereits vorhandenen Publikation zur Funktion von *SG1* war zu Beginn dieser Arbeit kein kommerzieller Antikörper gegen *SG1* verfügbar. Aus diesem Grund sollte *SG1* rekombinant in *E. coli* exprimiert werden. Das exprimierte und aufgereinigte Protein sollte anschließend für die Erzeugung eines Antikörpers genutzt werden. Dafür wurde die *AtSG1* cDNA-Sequenz in den pET28a+ Vektor eingebracht. Für die spezifische Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem *E. coli*-Zelllysat wurde die *SG1*-Sequenz mit einem aminoterminalen 6xHis-Tag versehen. Das berechnete Molekulargewicht des 6xHis-*SG1* Proteins lag bei 38 kDa. Nach erfolgreicher Transformation in den verwendeten pRIL *E. coli*-Expressionsstamm wurde die Expression von *SG1* mit 1 mM IPTG induziert. Gesamtproteinextrakte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion hinsichtlich einer zusätzlichen Bande mit einem Molekulargewicht um 38 kDa untersucht. Nach Coomassie-Färbung konnte allerdings keine solche Bande nachgewiesen werden (Abb. 2.65). Ebenso wurde kein Protein mit dem His-Tag-spezifischen Antikörper nachgewiesen (siehe Anhang .4).

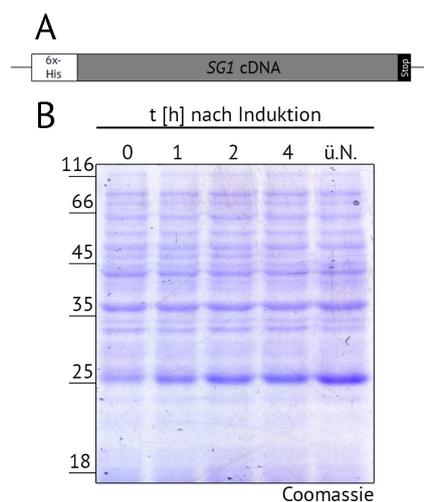


Abbildung 2.65. – Versuch der rekombinanten Expression von 6xHis-*SG1* in *E. coli*. (A) Schematische Darstellung des erstellten 6xHis-*SG1* Konstruktes, welches auf Grundlage der *AtSG1* cDNA-Sequenz erzeugt wurde und mit einem aminoterminalen 6xHis-Tag versehen war. (B) Analyse von pRIL *E. coli* Gesamtproteinextrakten vor und nach der Induktion der Expression mit 1 mM IPTG. Die Expression wurde über mehrere Stunden und nach über Nacht (ü.N.) Wachstum der Zellkultur verfolgt. Die Proteinproben wurden mittels eines 12 %igen SDS-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit Coomassie konnte keine zusätzliche Proteinbande detektiert werden.

Darüber hinaus konnte kein 6xHis-SG1 Protein in BL21 (DE3) und Arctic *E. coli*-Expressionsstämmen zur Expression gebracht werden (Abb. 2.66A). Es wurde geprüft, ob die Lage des 6xHis-Tags einen Einfluss auf die Stabilität von SG1 haben könnte. Aufgrund dessen wurde der 6xHis-Tag am carboxyterminalen Ende der SG1 cDNA-Sequenz angefügt. Dies führte allerdings ebenfalls nicht zur Expression von SG1 in *E. coli* (Abb. 2.66B). Instabile Proteine zeigen häufig eine erhöhte Expression, wenn die Zellkultur nach Induktion mit IPTG bei niedrigeren Temperaturen inkubiert wird. Jedoch führte auch die Inkubation der Arctic und Rosetta *E. coli*-Expressionsstämmen bei 18 bzw. 22 °C nicht zu einer Expression von SG1 (Abb. 2.66A, B).

Im Zuge dieser Arbeit konnte SG1 nicht in ausreichenden Mengen produziert werden, um einen spezifischen Antikörper zu erzeugen. Für die Produktion des Antikörpers wären ca. 2 mg des aufgereinigten SG1-Proteins nötig gewesen. Durch die Nutzung einer für *E. coli* optimierten SG1-Sequenz oder eines verkürzten SG1-Peptids sollte versucht werden die rekombinante Expression von SG1 zu ermöglichen, da dies eine Grundvoraussetzung für die Erzeugung eines spezifischen SG1-Antikörpers ist.

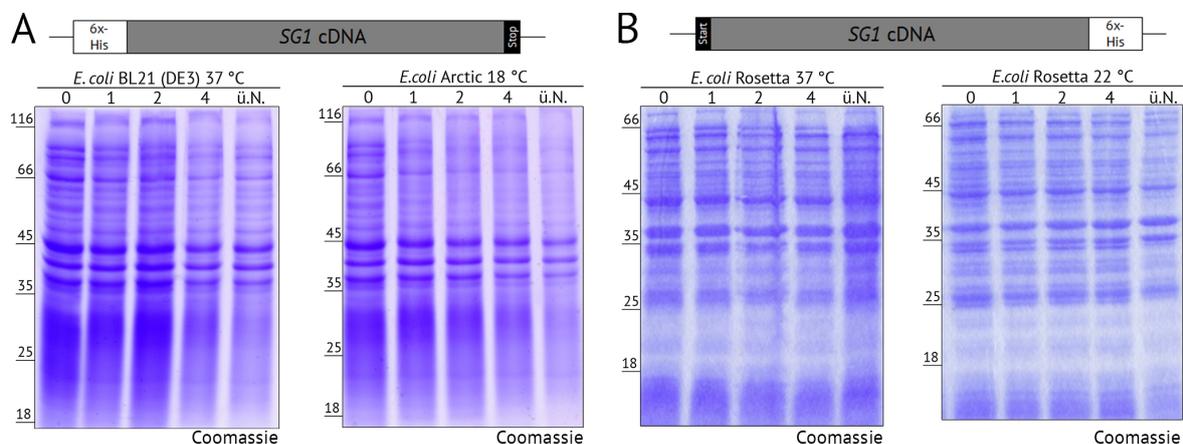


Abbildung 2.66. – Versuch der rekombinanten von SG1 in verschiedenen *E. coli*-Expressionsstämmen und bei unterschiedlichen Temperaturen. Alle verwendeten Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ angezogen. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression mit 1 mM IPTG und die weitere Inkubation der Kulturen in verschiedenen Temperaturen. (A) Testexpression des SG1-Konstrukts mit aminoterminaler 6xHis-Tagung in BL21(DE3) und Arctic *E. coli* Zellen. Dabei wurde die BL21(DE3)-Kultur weiter bei 37 °C belassen, während die Arctic-Kultur bei 18 °C inkubiert wurde. (B) Testexpression des SG1-Konstrukts mit carboxyterminaler 6xHis-Tagung im Rosetta-Expressionsstamm. Nach Induktion der Expression mit IPTG wurden die Kulturen bei 37 bzw. 22 °C weiter angezogen. Alle Proteinproben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten sowie nach über Nacht Inkubation (ü.N.) nach Induktion der Expression entnommen. Die Proteinproben wurden mittels 12 % iger SDS-Gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt.

2.3.1.2. Analyse der *SG1*-Expression in *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen

Durch die Verwendung von spezifischen Primern wurde der *SG1*-Transkriptgehalt im Wildtyp über den Verlauf eines Standard-Kurztages untersucht. Der minimale *SG1*-Transkriptgehalt wurde zwei Stunden vor Beginn der Belichtungsphase detektiert (Abb. 2.67A). Unter Belichtung stieg die Expression von *SG1* stark an und erreichte das Maximum zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase (Abb. 2.67A). Die Expression von *SG1* folgt somit einem diurnalen Rhythmus. Die Oszillation der Expression zeigte dabei einige Parallelen zu *PORB*, jedoch lag das Maximum der *SG1*-Genexpression zwei Stunden nach der maximalen Genexpression von *PORB* (Vergleich Abb. 2.13B). Aufgrund des fehlenden Antikörpers konnte allerdings nicht überprüft werden, inwieweit sich die Veränderung des *SG1*-Transkriptgehalts auf den *SG1*-Proteingehalt auswirkte.

Nach drei Tagen in Dunkelheit oder unter schwachen Lichtbedingungen war der relative *SG1*-Transkriptgehalt in Col-0 Keimlingen im Vergleich zu den Kontrollbedingungen stark reprimiert (Abb. 2.67B). Die Erhöhung der Lichtintensität allein führte indes nicht zu einer Veränderung der *SG1*-Genexpression. Lediglich unter kontinuierlichem Starklicht konnte eine Induktion der Genexpression um ca. 80 % im Vergleich zu Standard-Kurztagbedingungen beobachtet werden (Abb. 2.67B). Die Genexpression von *SG1* war somit zu einem gewissen Grad abhängig von der Lichtintensität. Da auch die Genexpression verschiedener Transkripte der TBS durch Licht induziert wird und darüber hinaus der diurnalen Kontrolle unterliegt [49], war dies bereits ein erster Hinweis darauf, dass *SG1* im Zusammenhang mit der TBS stehen könnte.

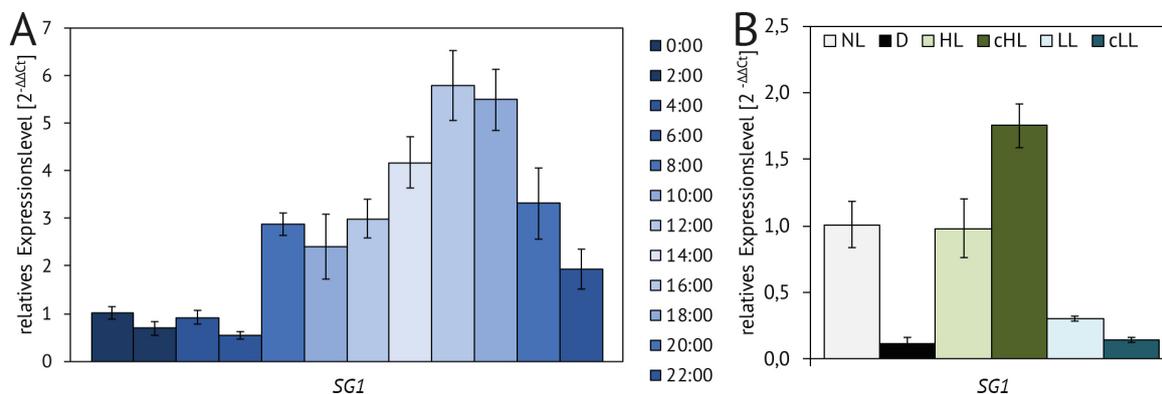


Abbildung 2.67. – *SG1*-Transkriptgehalt im Wildtyp-Hintergrund innerhalb eines Standard-Kurztages (A) und unter verschiedenen Lichtbedingungen (B). (A) Die Bestimmung des *SG1*-Transkriptgehalts erfolgte mittels quantitativer PCR in *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen, welche für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen wurden. Die gemessene Transkriptmengen wurde relativ zum Zeitpunkt 0:00 bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. (B) Die Genexpression von *SG1* wurde in Wildtyp-Pflanzen nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (Normallicht; NL), gefolgt von drei Tagen unter verschiedenen Lichtbedingungen bzw. drei Tagen Dunkelheit (D), bestimmt. Die Pflanzen wurden dabei entweder unter Schwachlicht (LL), kontinuierlichem Schwachlicht (cLL), Starklicht (HL) oder kontinuierlichem Starklicht (cHL) inkubiert. Die mittels quantitativer PCR gemessenen Transkriptmengen wurden dabei relativ zum Transkriptgehalt unter Standard-Kurztagbedingungen ermittelt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten bestimmt.

2.3.1.3. Selektion und Charakterisierung einer *sg1*-Mutante in *Arabidopsis thaliana*

In den vorangegangenen Arbeiten von Hu *et al.* wurde eine durch EMS erzeugte *sg1*-Punktmutante charakterisiert, welche eine G zu A Mutation im kodierenden Bereich des *SG1*-Gens aufwies [212]. Im Vergleich dazu charakterisierte ich eine Linie, welche eine T-DNA-Insertion im zweiten Drittel des *SG1* kodierenden Gens *At3g18420* trug (Abb. 2.68A). Um mögliche Verwechslungen zu vermeiden, wurde die hier analysierte Linie im weiteren Verlauf der Arbeit als *sg1-2* bezeichnet. Die Homozygotie der T-DNA-Insertion wurde mittels spezifischer Primer, die Lage der T-DNA durch Sequenzierung verifiziert (Abb. 2.68B). Die Insertion der T-DNA führte zu einer 90 %igen Reduktion des relativen *SG1*-Transkriptgehalts im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.68C). Da die Insertion im kodierenden Bereich lag, war davon auszugehen, dass kein vollständiges Transkript entstehen konnte und demnach kein funktionales Protein in der *sg1-2*-Linie vorhanden war. Im starken Kontrast zu den Ergebnissen von Hu *et al.* zeigte die *sg1-2*-Linie makroskopisch keinen Unterschied hinsichtlich der Pigmentierung oder des Wachses im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.68D). Die zuvor beschriebene reduzierte Pigmentierung in neu entstehenden Blättern der *sg1*-Punktmutante [212] konnte somit in der *sg1-2* T-DNA-Linie nicht bestätigt werden.

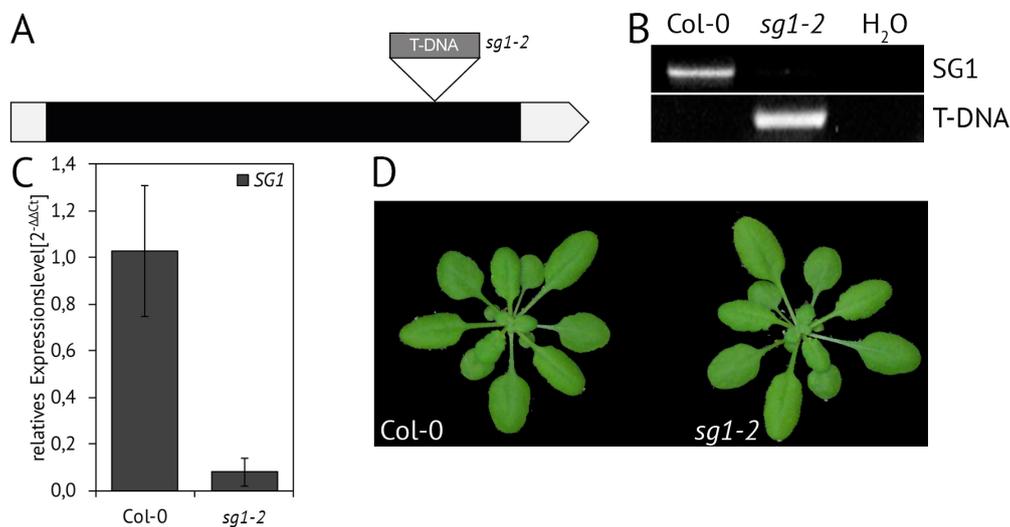


Abbildung 2.68. – Selektion einer *sg1-2* T-DNA-Insertionslinie in *Arabidopsis thaliana*. (A) Schematische Darstellung des *At3g18420* Gens. Untranslatierte Bereiche wurden in Hellgrauen, Exons in Schwarz dargestellt. Die durch das *Nottingham Arabidopsis Stock Center* postulierte und verifizierte Insertionsstelle wurde gekennzeichnet. (B) Nachweis der Homozygotie der T-DNA mittels spezifischer Primer. Es wurde dabei eine genspezifische (SG1) und eine T-DNA spezifische Primerkombination gewählt. Die Auftrennung der in der PCR gewonnenen Amplifikate erfolgte durch 1 %ige Agarosegele. (C) Der durch quantitative PCR nachgewiesene *SG1*-Transkriptgehalt wurde relativ zum gleichbehandelten Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. (D) Phänotyp von *sg1-2 Arabidopsis thaliana* Pflanzen im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp nach Anzucht für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E).

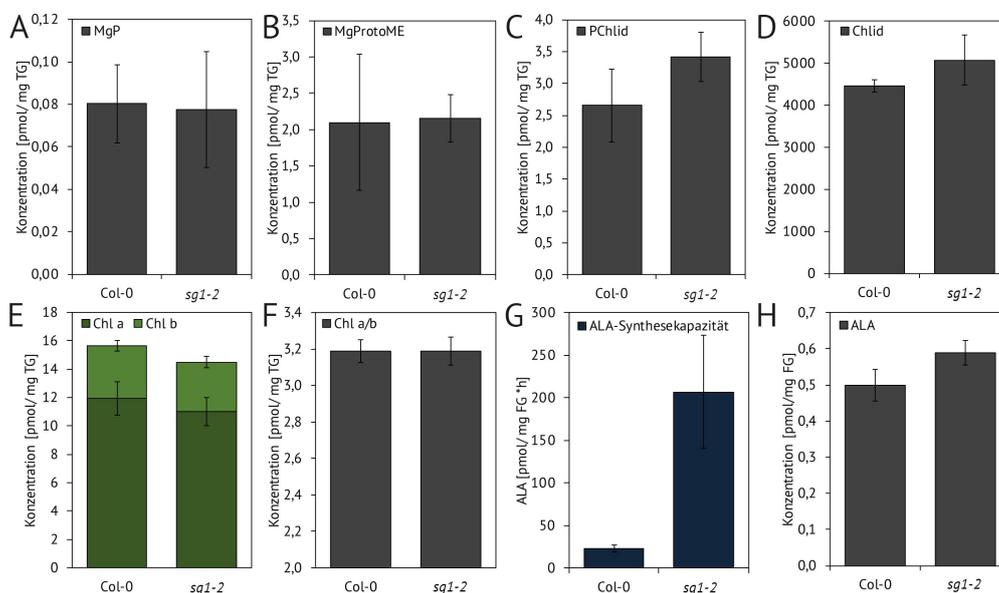
Die photosynthetische Leistung von PSII der *sg1-2*-Linie wurde mittels PAM bestimmt. Dabei konnte in der *sg1-2*-Linie eine wildtypartige maximale Quantenausbeute F_v/F_m bestimmt werden (Tab. 2.6), während die effektive Quantenausbeute (Φ PSII) leicht erhöht war. Darüber hinaus war das NPQ der *sg1-2*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Tab. 2.6).

Tabelle 2.6. – Photosynthetischen Leistung von PSII in der *sg1-2*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

Die vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Vor Beginn der Messung erfolgte eine 15 minütige Dunkeladaption. Anschließend wurde die maximale (F_v/F_m) und effektive Quantenausbeute (Φ PSII) sowie das NPQ bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Parameter	Col-0	<i>sg1-2</i>
F_v/F_m	0,840 ± 0,004	0,837 ± 0,003
Φ PSII	0,661 ± 0,034	0,710 ± 0,022
NPQ	0,366 ± 0,023	0,279 ± 0,096

In Interaktionsanalysen wurde gezeigt, dass SG1 mit verschiedenen Proteinen der TBS, unter anderem auch GUN4, interagiert (Abschnitt 2.1.2). Darüber hinaus postulierten Hu *et al.*, dass SG1 und GUN4 genetisch interagieren können [212]. Da GUN4 ein wichtiger Positiv-Regulator der TBS ist, wurde überprüft, ob das Fehlen von *SG1* einen Einfluss auf die *steady state* Gehalte der TBS-Intermediate hatte. Die Gehalte der frühen Intermediate des Chlorophyllzweigs, MgP und MgProtoME, waren hierbei in der *sg1-2*-Linie wildtypartig (Abb. 2.69A, B), während die PChlid- und Chlid-Mengen im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht waren (Abb. 2.69C, D). Der Chlorophyllgehalt der *sg1-2*-Linie war hingegen im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.69E). Von dieser Reduktion waren Chlorophyll a und b gleichermaßen betroffen (Abb. 2.69F). Neben den TBS-Intermediatmengen wurde auch der Einfluss des *SG1*-Verlustes auf die Kapazität der raten-limitierenden ALA-Synthese bestimmt. Überraschenderweise war diese in der *sg1-2*-Linie um das Achtfache im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.69G). Eine Erhöhung der ALA-Synthesekapazität in diesem Maße wurde zuvor für keine andere TBS-Mutante beschrieben. Im Kontrast dazu war der *in planta* gemessene ALA-Gehalt nur geringfügig erhöht (Abb. 2.69H).

**Abbildung 2.69. – *Steady state* TBS-Intermediatgehalte sowie die ALA-Synthesekapazität in der *sg1-2*- Linie im Vergleich zum Wildtyp.**

Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. (A-E) Die mittels HPLC nachgewiesenen Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (F) Aus den gemessenen Chlorophyllmengen wurde das Chl a/b Verhältnis bestimmt. (G) Die ALA-Synthesekapazität wurde nach vier Stunden Inkubation mit Lävulinsäure unter moderaten Lichtintensitäten (120 μ E) ermittelt und auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) bezogen. (H) Die photometrisch bestimmte ALA-Mengen wurden auf das verwendete Frischgewicht (FG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens vier biologischen Replikaten ermittelt.

Neben den Gehalten der TBS-Intermediate wurden die Proteingehalte verschiedener Enzyme und Hilfsproteine der TBS untersucht. Da die *sg1-2*-Mutante eine drastisch erhöhte ALA-Synthesekapazität aufwies, galt ein besonderes Interesse den Proteinen der ALA-Synthese. Sowohl GluTR1 als auch GBP wiesen in der *sg1-2*-Linie einen erhöhten Gesamtproteingehalt im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 2.70A). Allerdings lag in der *sg1-2*-Linie mehr GluTR1 sowohl in der löslichen als auch membrangebundenen Fraktion im Vergleich zum Wildtyp vor, sodass die erhöhte ALA-Synthesekapazität nicht vollständig durch den erhöhten Gehalt an aktiver (löslicher) GluTR1 erklärt werden konnte (Abb. 2.70B). Die Abundanz von FLU war in der *sg1-2*-Linie hingegen wildtypartig (Abb. 2.70B). Darüber hinaus war der Gesamtproteingehalt von ALAD und CHLM in der *sg1-2*-Linie erhöht (Abb. 2.70A). Im Vergleich dazu waren die Proteingehalte von CHL27 und PORA/B in der *SG1*-defizienten Linie leicht reduziert, während der GUN4-Proteingehalt in der *sg1-2*-Mutante wildtypartig war (Abb. 2.70A). Somit schien das Fehlen von *SG1* keinen Einfluss auf die Abundanz des Interaktionspartners GUN4 zu haben. Ebenfalls unverändert waren die Gehalte der Chlorophyll-bindenden Proteine, LHCA1 und LHCB1, in der *sg1-2*-Linie im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.70A).

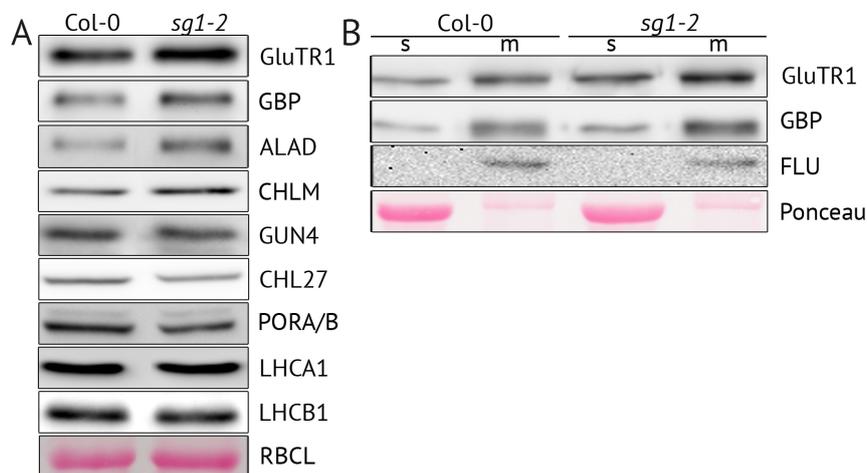


Abbildung 2.70. – Proteingehalte von Enzymen und Hilfsproteinen des TBS- Weges. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. (A) Immunologischer Nachweis der Gesamtproteingehalte in der *sg1-2*-Linie im Vergleich zum Wildtyp. Die Probenentnahme erfolgte zwei Stunden nach Belichtungsbeginn. (B) Subzelluläre Lokalisation von Proteinen der ALA-Syntheserate. Es wurden Gesamtproteinextrakte in die lösliche (s) und membrangebundene (m) Fraktion unterteilt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgt durch 12 %ige SDS-Gele. Die Ponceau gefärbten Nitrocellulosemembranen dienten als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt.

Die relativen Transkriptgehalte von *HEMA1*, *CHLM* und *CHL27* waren indes wildtypartig (Abb. 2.71A), sodass die Beeinflussung der Proteingehalte vermutlich auf posttranslationaler Ebene stattfand. Darüber hinaus wurde geprüft, ob der Verlust von *SG1* einen Einfluss auf den Transkriptgehalt verschiedener TPR-Proteine mit hoher Ähnlichkeit zu Pitt hatte. Hierbei konnte eine wildtypartige Genexpression für *TPR1* und *TPR9* in der *sg1-2*-Mutante nachgewiesen werden. Allerdings war der relative Transkriptgehalt von *TPR7* in der *sg1-2*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.71B). Inwiefern dies eine Auswirkung auf die Akkumulation des korrespondierenden Proteins hatte, konnte im Zuge dieser Arbeit aufgrund eines fehlenden Antikörpers nicht geklärt werden.

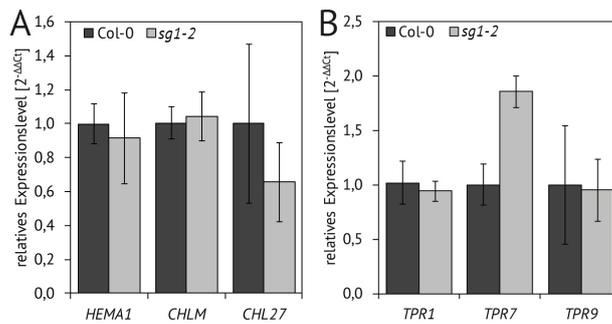


Abbildung 2.71. – Transkriptgehalte verschiedener TBS (A) und TPR (B) Proteine in der *sg1-2*- Linie. Die mittels quantitativer PCR gemessenen Transkriptgehalte wurde relativ zum gleichbehandelten Wildtyp bestimmt. Die angeführten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

Die erhöhte ALA-Synthesekapazität sowie der veränderte GluTR1-Proteingehalt der *sg1-2*-Linie zeigten einige Parallelen zu den hier analysierten *tpr1*-Linien. Die hohe Ähnlichkeit zwischen beiden Proteinen (40 % Sequenzähnlichkeit, 23 % Sequenzidentität der TPR-Domäne), die übereinstimmenden Interaktionspartner und der Einfluss auf GluTR1 legten ein mögliches Zusammenspiel zwischen TPR1 und SG1 nahe. Aus diesem Grund war eine Kreuzung zwischen *tpr1-3* und *sg1-2* vielversprechend, um möglichen funktionellen Redundanzen zwischen beiden Proteinen nachzugehen. Nach der Kreuzung konnten sowohl in der T1- als auch T2-Generation lediglich Keimlinge identifiziert werden, welche heterozygot für beide T-DNA-Insertionen waren (T2-33 %) oder homozygot für die T-DNA im *TPR1*-Gen und heterozygot für die Insertion im *SG1*-Gen (T2-29%). Leider konnten keine Keimlinge identifiziert werden, welche homozygot für beide T-DNA-Insertionen waren. Möglicherweise verursachte demnach das Ausschalten beider Gene einen letalen Phänotyp.

Problematisch war, dass die hier charakterisierte *sg1-2*-Linie keinerlei Übereinstimmungen hinsichtlich Pigmentierung und Entwicklung zu der von Hu *et al.* beschriebenen *sg1*-Punktmutante zeigte. Weiterhin warf die so drastisch erhöhte ALA-Syntheserate Fragen auf, da diese zum einen nicht vollständig durch den GluTR1-Proteingehalt erklärt werden konnte und zum anderen nur zu einer geringfügig erhöhten ALA-Menge führte. Ein wichtiger Schritt für weiterführende Analysen wäre die erfolgreiche Produktion eines spezifischen Antikörpers. Anschließend sollte der SG1-Proteingehalt der *sg1*-Punktmutante [212] sowie die hier selektierte *sg1-2*-Linie untersucht werden, um zweifelsfrei zu überprüfen, wie sich die Stabilität von SG1 in diesen Mutanten verhält. Zusammenfassend ließ sich sagen, dass *SG1* ein spannendes Untersuchungsobjekt war, die widersprüchlichen Ergebnisse allerdings durch weitere Analysen aufgeklärt werden sollten.

2.3.2. TPR7 im Zusammenhang mit der Tetrapyrrolbiosynthese

Ein weiteres interessantes POR-interagierendes TPR-Protein in *Arabidopsis thaliana* war TPR7. Der relative Transkriptgehalt von *TPR7* erreichte sein Minimum innerhalb eines Standard-Kurztages zwei Stunden vor Beginn der Belichtungsphase (Abb. 2.72A). Unmittelbar nach Belichtung stieg der *TPR7*-Transkriptgehalt an und erreichte das Maximum um 16 Uhr (Abb. 2.72A). Somit folgt die Genexpression von *TPR7* einem diurnalen Rhythmus. Nach drei Tagen unter erhöhten Lichtbedingungen war der relative *TPR7*-Transkriptgehalt unverändert im Vergleich zu Standard-Kurztagsbedingungen (Abb. 2.72B). Im Unterschied dazu war die Genexpression von *TPR7* nach drei Tagen in Dunkelheit oder unter Schwachlicht-Bedingungen deutlich reprimiert (Abb. 2.72B). Die Länge der Belichtungsphase schien dabei keinen Einfluss auf den Transkriptgehalt zu haben, da unter kontinuierlichem Lichtregime ein vergleichbarer *TPR7*-Transkriptgehalt wie in den korrespondierenden Bedingungen im Tag-Nacht-Wechsel nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.72B).

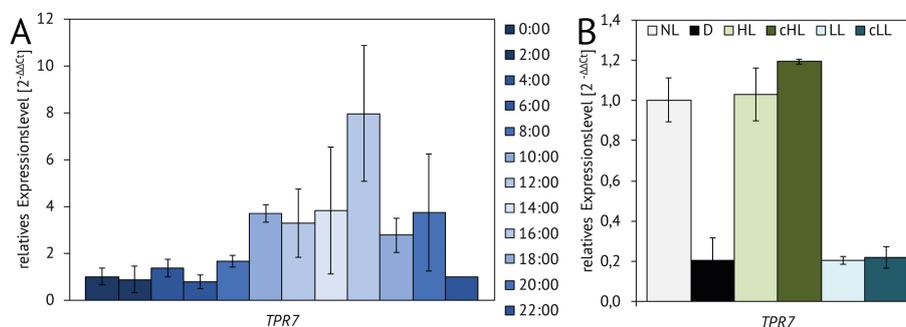


Abbildung 2.72. – *TPR7*-Transkriptgehalt im Wildtyp-Hintergrund über den Verlauf eines Standard-Kurztages (A) und nach drei Tagen unter verschiedenen Lichtbedingungen (B). (A) Die Bestimmung des *TPR7*-Transkriptgehalts erfolgte mittels quantitativer PCR in drei Wochen alten, unter Standard-Kurztagsbedingungen (120 μ E) angezogenen *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen. Die gemessenen Transkriptmengen wurde relativ zum Zeitpunkt 0:00 bestimmt. (B) Die Genexpression von *TPR7* wurde in Wildtyp-Pflanzen nach vier Wochen unter Standard-Kurztagsbedingungen (Normallicht; NL), gefolgt von drei Tagen unter verschiedenen Lichtbedingungen bzw. drei Tagen in Dunkelheit (D), bestimmt. Die Pflanzen wurden dabei entweder unter Schwachlicht (LL), kontinuierlichem Schwachlicht (cLL), Starklicht (HL) oder kontinuierlichem Starklicht (cHL) inkubiert. Die mittels quantitativer PCR gemessene *TPR7*-Transkriptmenge wurde relativ zu den Standard-Kurztagsbedingungen bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt.

Für die genauere funktionelle Charakterisierung von TPR7 in *Arabidopsis* wurde eine T-DNA-Linie analysiert, welche die postulierte Insertion in der Mitte des TPR7 kodierenden Gens *At5g02590* trug (Abb. 2.73A). Mittels spezifischer Primer konnte die Homozygotie der T-DNA-Insertion nachgewiesen werden (Abb. 2.73B), während die Lage der T-DNA durch Sequenzierung verifiziert wurde. Die Insertion der T-DNA führte dabei zu einer Reduktion des relativen *TPR7*-Transkriptgehalts um 70 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.73C). Erwartet wurde, dass die Genexpression von *TPR7* durch die Insertion der T-DNA deutlich niedriger lag, da die Primer überlappend zur Insertionsstelle gewählt wurden. Allerdings lag die T-DNA in der Mitte des kodierenden Bereiches von TPR7, weswegen davon ausgegangen werden konnte, dass kein vollständiges Protein entstand. Da zum Zeitpunkt dieser Analysen jedoch kein spezifischer Antikörper gegen TPR7 verfügbar war, konnte nicht verifiziert werden, wie sich die Insertion der T-DNA tatsächlich auf den TPR7-Proteingehalt auswirkte. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die selektierte *tpr7*-Linie nach vier Wochen unter Standard-Kurztagsbedingungen einen leicht retardierten Wuchs sowie eine makroskopisch sichtbar reduzierte Pigmentierung (Abb. 2.73D).

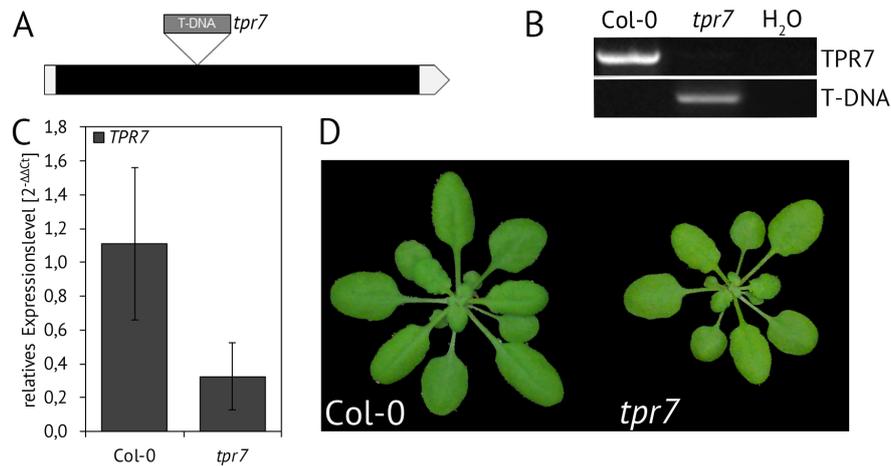


Abbildung 2.73. – Selektion einer *tpr7*-Linie in *Arabidopsis thaliana*. (A) Schematische Darstellung des TPR7 kodierenden Gens *At5g02590*. Untranslatierte Bereiche wurden in hellgrau, Exons in schwarz dargestellt. Ebenfalls angegeben wurde die durch das Nottingham Arabidopsis Stock Center postulierte und durch Sequenzierung verifizierte Insertionsstelle. (B) Nachweis der Homozygotie der T-DNA-Insertion mittels einer genspezifischen (SG1) und einer T-DNA spezifischen Primerkombination. Die Auftrennung der mittels PCR gewonnenen Amplifikate erfolgte durch 1 %ige Agarosegele. (C) Der durch quantitative PCR nachgewiesene *TPR7*-Transkriptgehalt wurde relativ zum gleichbehandelten Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. (D) Phänotyp der *tpr7 Arabidopsis thaliana* Linie im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E).

Die *steady state* Gehalte der frühen TBS-Intermediate, MgP und MgProtoME, waren in der *tpr7*-Linie im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.74A, B), während die Gehalte von PChlid und Chlid wildtypartig waren (Abb. 2.74C, D). Die zuvor beobachtete sichtbar reduzierte Blattpigmentierung wurde durch die gemessenen Chlorophyllmengen bestätigt, welche in der *tpr7*-Linie um 15 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren (Abb. 2.74E). Hierbei waren Chlorophyll a und b gleichermaßen betroffen (Abb. 2.74F). Die reduzierten Intermediat- und Chlorophyllgehalte konnten hierbei nicht auf eine Veränderung der ALA-Syntheserate zurückgeführt werden (Abb. 2.74G), was in Übereinstimmung mit dem unveränderten GluTR1-Proteingehalt war (Abb. 2.74H). Darüber hinaus konnte die reduzierte MgProtoME-Menge nicht auf eine Veränderung des korrespondierenden Enzyms CHLM zurückgeführt werden, da CHLM in der *tpr7*-Linie einen wildtypartigen Gehalt aufwies (Abb. 2.74H). Das Fehlen des potenziellen POR-Interaktionspartners TPR7 hatte indes weder eine Auswirkung auf die Abundanz von PORA/B (Abb. 2.74H) noch auf die Akkumulation von PChlid und Chlid (Abb. 2.74C, D). Weiterhin hatte der reduzierte Gesamtchlorophyllgehalt keine Auswirkungen auf den Proteingehalt der Chlorophyll-bindenden Proteine (Abb. 2.74H).

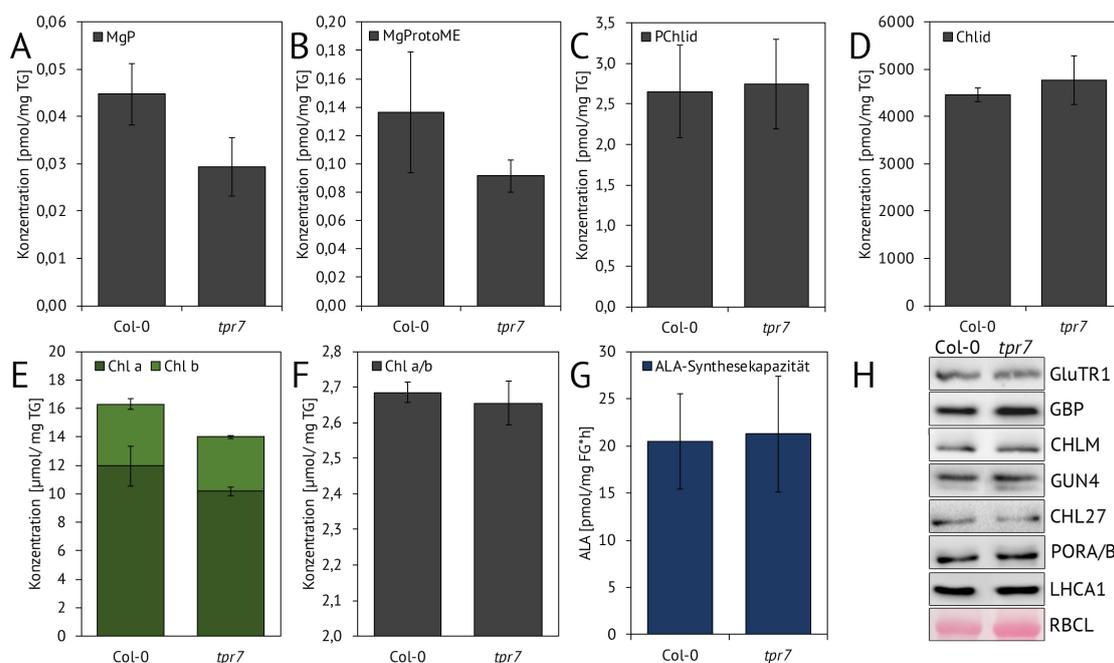


Abbildung 2.74. – Gehalte der TBS-Intermediate und -Proteine in der selektierten *tpr7*-Linie. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. Die Probenentnahme erfolgte zwei Stunden nach Belichtungsbeginn. (A-E) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (F) Aus den gemessenen Chlorophyllmengen wurde das Chl a/b Verhältnis bestimmt. (G) Die ALA-Synthesekapazität wurde nach vier Stunden Inkubation mit Lävulinsäure unter moderaten Lichtintensitäten (120 μ E) ermittelt und auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) bezogen. (H) Immunologischer Nachweis verschiedener Enzyme und Hilfsproteine der TBS. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben.

Trotz des reduzierten Chlorophyllgehaltes in der *tpr7*-Linie konnten keine Unterschiede zum Wildtyp hinsichtlich der Abundanz der photosynthetischen Komplexe nachgewiesen werden (Anhang .7). Darüber hinaus waren sowohl die maximale als auch effektive Quantenausbeute des PSII in der *tpr7*-Mutante wildtypartig (Tab. 2.7), sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Verlust von *TPR7* keinen Einfluss auf die photosynthetische Leistung von PSII hatte. Lediglich das NPQ war in der untersuchten Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Tab. 2.7).

Tabelle 2.7. – Mittels PAM bestimmte photosynthetischen Leistung von PSII in der *tpr7*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. Vor Beginn der Messung erfolgte eine 15 minütige Dunkeladaptation. Anschließend wurde die maximale (F_v/F_m) und die effektive Quantenausbeute (Φ PSII) sowie das NPQ bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Parameter	Col-0	<i>tpr7</i>
F_v/F_m	0,847 \pm 0,003	0,846 \pm 0,001
Φ PSII	0,771 \pm 0,006	0,775 \pm 0,007
NPQ	0,148 \pm 0,024	0,119 \pm 0,008

Die gewählte *tpr7*-Linie wurde nach der enthaltenen T-DNA selektiert. In späteren Generationen fiel allerdings auf, dass der Phänotyp der *tpr7*-Linie weniger deutlich war als in Abb. 2.73D angegeben. Bei der Analyse der relativen Transkriptgehalte für verschiedene POR-interagierende TPR-Proteine in der *tpr7*-Linie zeigte sich, dass der zuvor reduzierte *TPR7*-Transkriptgehalt nicht mehr nachweisbar war (Abb. 2.75). Trotz der Verwendung der gleichen Primerkombination war unerwarteterweise der relative *TPR7*-Transkriptgehalt in der *tpr7*-Linie um das Sechsfache im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.75). Dies änderte sich trotz mehrfacher Wiederholung nicht. Die Transkriptgehalte aller weiteren getesteten TPR-Proteine waren in der *tpr7*-Linie indes wildtypartig (Abb. 2.75). Da kein spezifischer *TPR7*-Antikörper vorhanden war, konnte nicht überprüft werden, inwieweit dies Auswirkungen auf dem *TPR7*-Proteingehalt hatte.

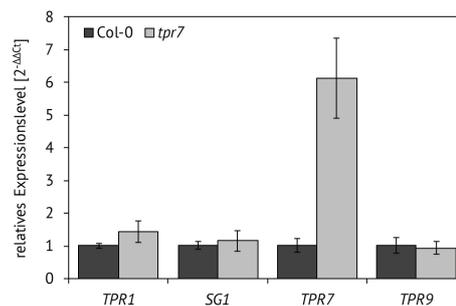


Abbildung 2.75. – Genexpression verschiedener POR-interagierender TPR-Proteine in der *tpr7*-Linie. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. Die durch quantitative PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurde relativ zum gleichbehandelten Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt.

Eine Voraussetzung für die Produktion eines *TPR7*-spezifischen Antikörpers war die rekombinante Expression des *TPR*-Proteins in *E. coli*. Dafür wurde die *AtTPR7* cDNA-Sequenz in den pET28a+ Expressionsvektor eingefügt, wodurch die *TPR7*-Sequenz mit einem aminoterminalen 6xHis-Tag versehen wurde (Abb. 2.76A). Das rekombinante 6xHis-*TPR7* Protein hatte ein kalkuliertes Molekulargewicht von 34 kDa. Der Expressionsvektor wurde anschließend in den *E. coli* Rosetta-Expressionsstamm transformiert. Die Expression des 6xHis-*TPR7* Proteins wurde mit 1 mM IPTG induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion überprüft. Bereits eine Stunde nach der Induktion mit IPTG konnte nach der Coomassiefärbung eine zusätzliche Bande um 35 kDa nachgewiesen werden (Abb. 2.76B). Durch die Nutzung des His-Tag-spezifischen Antikörpers wurde bestätigt, dass es sich bei dem exprimierten Protein um das Zielprotein handelte (Abb. 2.76C). Die Expression von 6xHis-*TPR7* war hierbei so stark, dass bereits vor der Induktion mit IPTG eine schwache Proteinbande nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.76B). Eine Stunde nach Induktion mit IPTG war die Menge des exprimierten Proteins so hoch, dass das mittels Chemilumineszenz nachgewiesene Signal nicht mehr vollständig ausgefüllt war, obwohl die Detektion nach 10 ms erfolgte. Das rekombinant exprimierte 6xHis-*TPR7* Protein lag dabei sowohl in der löslichen als auch membrangebundenen Fraktion vor (Abb. 2.76C), wodurch eine Aufreinigung des Proteins unter nativen Bedingungen möglich war. Drei Stunden nach Induktion der Expression mit IPTG wurde die Kultur geerntet und das exprimierte Protein konnte dank des 6xHis-Tags in großen Mengen aufgereinigt werden, wodurch die Herstellung eines Antikörper möglich wäre (Abb. 2.76D).

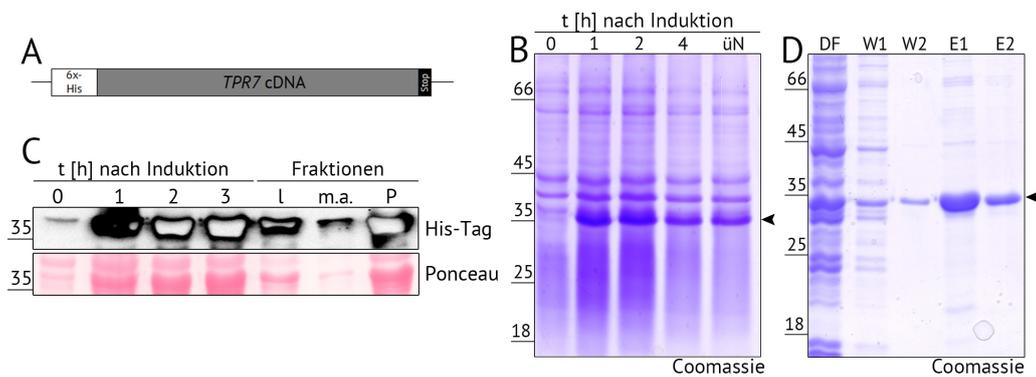


Abbildung 2.76. – Rekombinante Expression von TPR7 in *E. coli*. (A) Schematische Darstellung des erzeugten 6xHis-TPR7 Konstruktes, welches auf Grundlage der *AtTPR7* cDNA-Sequenz erzeugt wurde und mit einem aminoterminalen 6xHis-Tag versehen war. (B) Analyse von *E. coli* Rosetta Gesamteinextrakten vor und nach der Induktion der Expression mit 1 mM IPTG. Die Expression wurde über mehrere Stunden und nach über Nacht (ü.N.) Wachstum der Zellkultur verfolgt. Nach elektrophoretischen Auftrennung der Gesamteinextrakte mittels eines 12 %igen SDS-Gels, gefolgt von der Färbung des Gels mit Coomassie, konnte eine zusätzliche Proteinbande (Pfeil) detektiert werden. (C) Nachweis des rekombinanten Proteins mit Hilfe des His-Tag spezifischen Antikörpers. Der Nachweis erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression mit IPTG. Die Zellkultur wurde nach drei Stunden geerntet und in die lösliche (l), membranassoziierte (m.a.) und Pellet (P) Fraktion unterteilt. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulosemembran diente als Ladekontrolle. (D) Native Aufreinigung des exprimierten 6xHis-TPR7 Proteins. Das erzeugte *E. coli*-Lysat wurde auf eine Nickel-Nitriloessigsäure-Säule gegeben. Ungebundene Proteine wurden in der Durchflussfraktion (DF) aufgefangen, während unspezifisch gebundene Proteine durch mehrere Waschschritte (W1-W3) von der Säule gewaschen wurden. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte durch Imidazol (Elution 1-3; E1-E3). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Mit diesem TPR7-spezifischen Antikörper könnte überprüft werden, wie sich die veränderte *TPR7*-Genexpression auf die Proteinstabilität auswirkt. Dies wäre ein wichtiger Schritt für die weiterführende Analyse der *tpr7*-Linie. Da allerdings in der *TPR7*-defizienten Linie keine Veränderung des POR-Proteingehaltes und keine starken Auswirkungen auf die TBS im Allgemeinen nachzuweisen waren, wurde TPR7 als mögliches Pitt-Homolog ausgeschlossen.

2.3.3. TPR9 als Faktor der plastidären Antwort auf kontinuierliches Starklicht

2.3.3.1. Produktion eines spezifischen TPR9- Antikörpers

Ein weiterer Kandidat, welcher im Zusammenhang mit der Regulation der TBS stehen könnte, war TPR9. TPR9 wies ebenso wie alle zuvor untersuchten POR-interagierenden TPR-Proteine eine hohe Ähnlichkeit zu Pitt auf (23 % Sequenzidentität; 46 % Sequenzähnlichkeit). Da zu Beginn der Analysen kein kommerzieller Antikörper gegen TPR9 verfügbar war, sollte dieser im Zuge dieser Arbeit erzeugt werden. Voraussetzung dafür war die rekombinante Expression von TPR9 in *E. coli*. Hierfür wurde die *AtTPR9* cDNA-Sequenz in den pET28a+ Expressionsvektor eingefügt, sodass die TPR9-Sequenz mit einem aminoterminalen 6xHis-Tag versehen wurde (Abb. 2.77A). Das kalkulierte Molekulargewicht dieses rekombinanten Proteins lag bei 34 kDa. Der erstellte Vektor wurde in den pRIL *E. coli*-Expressionsstamm transformiert und die Expression mittels 1 mM IPTG induziert. Drei Stunden nach Induktion der Expression konnte im *E. coli* Gesamtproteinextrakt eine zusätzliche Bande detektiert werden, welche allerdings mit einem Molekulargewicht von ca. 37 kDa etwas größer war als das erwartete Protein (Abb. 2.77B). Mittels des His-Tag spezifischen Antikörpers konnte allerdings bestätigt werden, dass es sich bei dem exprimierten Protein um das Zielprotein handelte (Abb. 2.77C). Das exprimierte 6xHis-TPR9 Protein lag zu großen Teilen in der löslichen Zellfraktion vor, sodass eine Aufreinigung dieses Proteins unter nativen Bedingungen möglich war (Abb. 2.77C, D).

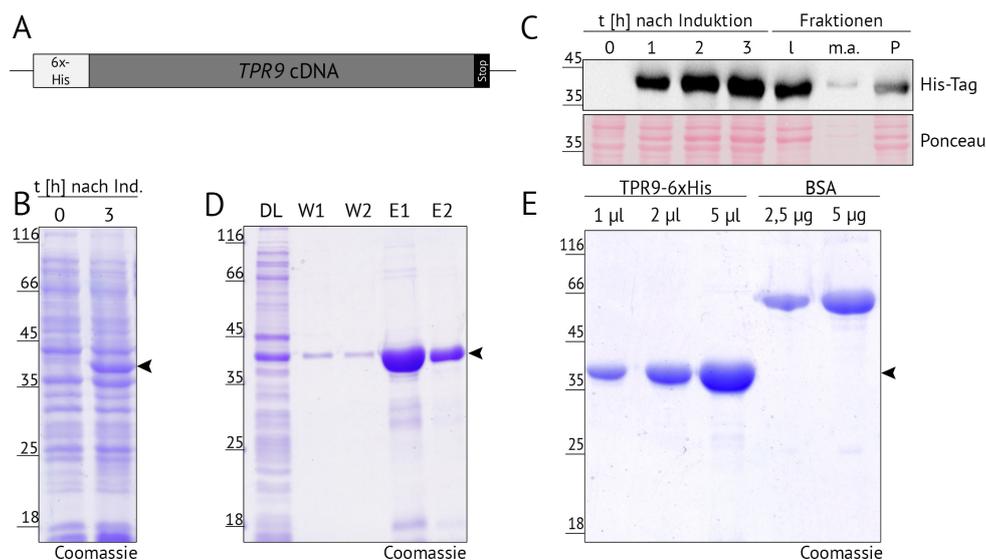


Abbildung 2.77. – Rekombinante Expression und Aufreinigung von TPR9. (A) Schematische Darstellung des erzeugten *AtTPR9* cDNA-Konstruktes, welches über einen aminoterminalen 6xHis-Tag verfügte. (B) Testexpression von TPR9. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression mit 1 mM IPTG wurde ein Aliquot aus der Expressionskultur entnommen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung des Gels mit Coomassie konnte eine zusätzliche Proteinbande (schwarzer Pfeil) detektiert werden. (C) Immunologischer Nachweis des exprimierten Proteins. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression durch den His-Tag spezifischen Antikörper untersucht. Der nach drei Stunden gewonnene *E. coli*-Gesamtproteinextrakt wurde in die lösliche (l), membranassoziierte (m.a.) und Pellet (P) Fraktion unterteilt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulosemembran diente als Ladekontrolle. (D) Native Aufreinigung des exprimierten 6xHis-TPR9 Proteins. Das exprimierte Protein wurde aus einem *E. coli*-Lysat mittels einer Nickel-Nitriloessigsäure-Säule aufgereinigt. Ungebundene Proteine wurden in der Durchflussfraktion (DF) aufgefangen, während unspezifische gebundene Proteine durch mehrere Waschschritte (W1-W2) entfernt wurden. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit Imidazol (Elution 1-2; E1-E2). (E) Konzentrationsanpassung des aufgereinigten 6xHis-TPR9 Proteins. Rinderserumalbumin (*Bovine serum albumin*; BSA) mit bekannten Mengen wurde als Kontrolle verwendet. Alle Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Immunisierung zweier Kaninchen wurden jeweils 2 mg des nativ aufgereinigten 6xHis-TPR9-Proteins verwendet. Die veranschlagte Konzentration von 1 mg/ml wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 2.77E). Nach Abschluss der Immunisierung wurden die gewonnenen Kaninchenserum gegen das verwendete Antigen sowie ein Wildtyp Gesamtproteinextrakt getestet. Beide Seren führten unter Verwendung des Antigens zu einer Vielzahl von Kreuzreaktionen (Abb. 2.78). Die abundanteste Bande konnte auf Höhe von 37 kDa nachgewiesen werden und entsprach dem Zielprotein. Im Wildtyp Gesamtproteinextrakt wurden hingegen erst nach längere Detektionszeit einige Banden sichtbar (Abb. 2.78). Das erwartete Molekulargewicht von TPR9 lag in *Arabidopsis thaliana* bei 34 kDa. Mit beiden Antiseren konnte im Wildtyp Gesamtproteinextrakt eine Bande auf dieser Höhe nachgewiesen werden, während die Anzahl der unspezifischen Banden deutlich geringer als im 6xHis-TPR9 Proteinextrakt war (Abb. 2.78). Insofern konnte TPR9 im Gesamtproteinextrakt unter Verwendung des Anti-TPR9-Serums gut detektiert werden. Da beide Antiseren eine vergleichbare Spezifität zu TPR9 aufwiesen, Serum # 3 allerdings weniger unspezifische Kreuzreaktionen im Gesamtproteinextrakt hervorrief, wurde dieses Serum in einer Verdünnung von 1:2000 für die nachfolgenden Analysen verwendet.

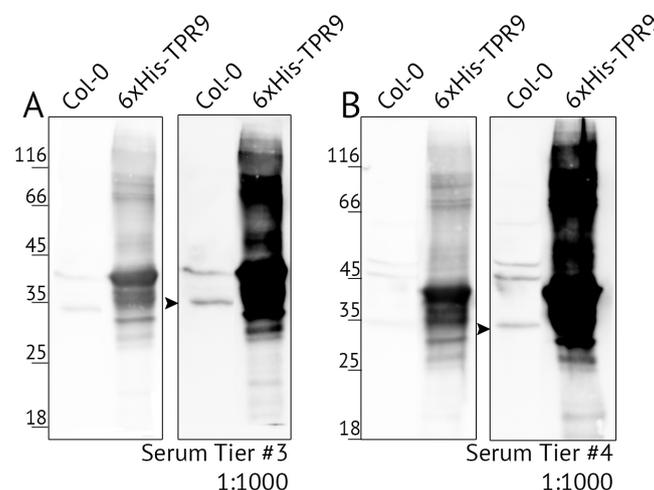


Abbildung 2.78. – Analyse zweier Kaninchenserum nach Abschluss der Immunisierung. Für die Immunisierung wurden je 1 mg des nativ aufgereinigten 6xHis-TPR9 Proteins verwendet. Die beiden gewonnenen Kaninchenserum (#3 (A) und #4 (B)) wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt und sowohl gegen 1 µg des Antigens als auch einen Wildtyp Gesamtproteinextrakt getestet. Die verwendeten Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden zwei verschiedene Detektionszeiten verwendet: 10 Sekunden (links) und zwei Minuten (rechts).

2.3.3.2. Charakterisierung von TPR9 in *Arabidopsis thaliana*

Im Verlauf eines Standard-Kurztages wurde der niedrigste relative *TPR9*-Transkriptgehalt vier Stunden nach Beginn der Lichtphase gemessen, während der maximal Gehalt am Ende der Lichtphase um 18:00 Uhr detektiert wurde (Abb. 2.79A). Die Genexpression von *TPR9* unterlag somit einem diurnalen Rhythmus. Auch der *TPR9*-Proteingehalt veränderte sich im Verlauf eines Standard-Kurztages: Zum Ende der Dunkelphase (8:00 Uhr) wurde der geringste *TPR9*-Proteingehalt nachgewiesen, während der höchste Proteingehalt zwei Stunden nach Ende der Belichtungsphase (20:00 Uhr) detektiert wurde (Abb. 2.79B).

Weiterhin wurde der *TPR9*-Transkriptgehalt nach drei Tagen Inkubation unter verschiedenen Lichtbedingungen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die *TPR9*-Genexpression im Wildtyp nach drei Tagen in Dunkelheit und unter Schwachlichtbedingungen im Vergleich zu Standard-Kurztagbedingungen stark reprimiert wurde (Abb. 2.79C). Im Kontrast dazu wurde die *TPR9*-Genexpression durch Starklicht induziert (Abb. 2.79C). Dabei führte ein kontinuierliches Lichtregime der jeweiligen Bedingungen zu einer Verstärkung der im Tag-Nacht-Wechsel nachgewiesenen Reaktionen (Abb. 2.79C).

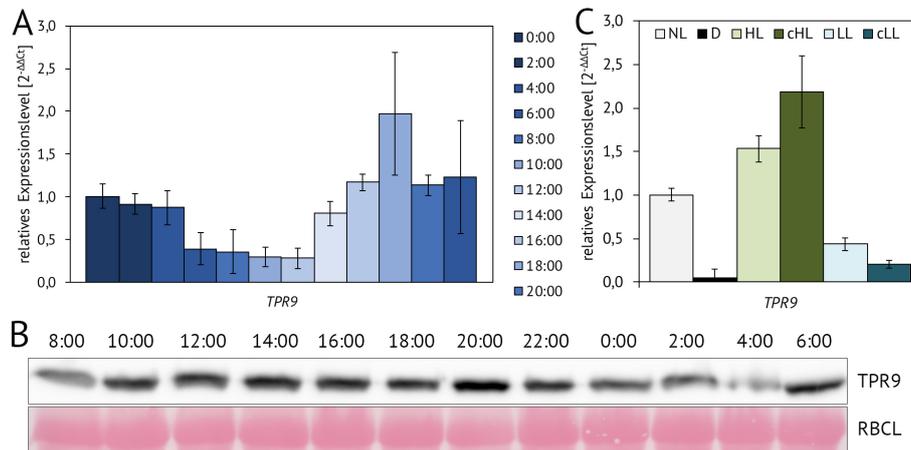


Abbildung 2.79. – TPR9 Transkript- und Proteingehalte im Wildtyp innerhalb eines Standard-Kurztages (A, B) und unter verschiedenen Lichtbedingungen (C). Die verwendeten Pflanzen wurden für drei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen. (A) Der durch quantitative PCR nachgewiesene *TPR9*-Transkriptgehalt wurde relativ zum Zeitpunkt 0:00 Uhr bestimmt. (B) Der *TPR9*-Proteingehalt wurde in Gesamtproteinextrakten nachgewiesen. Die verwendeten Proteinproben wurden mittels eines 12 %igen SDS-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. (C) Die verwendeten drei Wochen alten Arabidopsis Pflanzen wurden für drei Tage unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Der anschließend mittels quantitativer PCR nachgewiesene *TPR9*-Transkriptgehalt wurde relativ zur Kontrolle unter Standard-Kurztagbedingungen (NL) bestimmt. Dunkelheit-D, Starklicht-HL, kontinuierliches Starklicht-cHL, Schwachlicht-LL und kontinuierliches Schwachlicht-cLL.

Durch den erzeugten *TPR9*-Antikörper konnte bestätigt werden, dass *TPR9* ein plastidär lokalisiertes Protein ist, welches sowohl im Stroma als auch an der Thylakoidmembran vorlag (Abb. 2.80). Da für die Proteinsequenz von *TPR9* keine transmembranen Bereiche vorhergesagt wurden, ist *TPR9* aller Wahrscheinlichkeit nach ein membranassoziiertes und kein membranintegriertes Protein.

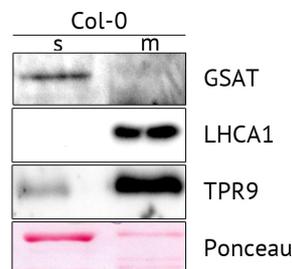


Abbildung 2.80. – Subzelluläre Lokalisation von TPR9 in isolierten Chloroplasten. Intakte Chloroplasten wurden aus drei Wochen alten Col-0 Arabidopsis Pflanzen isoliert und in die Stroma- (s) und Membranfraktion (m) unterteilt. Als Markerprotein für die Membranfraktion wurde LHCA1 verwendet, während GSAT als Markerprotein der Stromafraction diente. Die Proben wurden mittels 12 %iger SDS- Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau-gefärbte Nitrocellulosemembran wurde als Ladekontrolle verwendet. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben.

2.3.3.3. Selektion und Charakterisierung einer *tpr9*-Linie in *Arabidopsis thaliana*

Für die funktionelle Charakterisierung von *TPR9* in *Arabidopsis* wurde eine T-DNA-Linie analysiert, welche die T-DNA-Insertion im ersten Drittel des einzigen Exons des *TPR9* kodierenden Gens *At3g53560* trug (Abb. 2.81A). Die Homozygotie der T-DNA-Insertion wurde mittels spezifischer Primer verifiziert (Abb. 2.81B), die Lage der T-DNA durch Sequenzierung. Durch die T-DNA-Insertion wurde der relative *TPR9*-Transkriptgehalt auf etwa 20 % des Wildtyp-Gehalts reduziert (Abb. 2.81C). Durch die Lage der T-DNA im kodierenden Bereich von *TPR9* sollte allerdings kein vollständig funktionales Protein entstehen, was unter Verwendung des *TPR9*-Antikörpers bestätigt werden konnte (Abb. 2.81D). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass es sich bei der *tpr9*-Linie um einen *knockout* für *TPR9* handelte. Darüber hinaus konnte damit verifiziert werden, dass der *TPR9*-Antikörper spezifisch gegen *TPR9* gerichtet war (Abb. 2.81D). Die homozygote *tpr9*-Linie wies unter Standard-Kurztagbedingungen im Vergleich zum Wildtyp einen leicht retardierten Wuchs auf, unterschied sich aber hinsichtlich der Blattpigmentierung nicht vom Wildtyp (Abb. 2.81E).

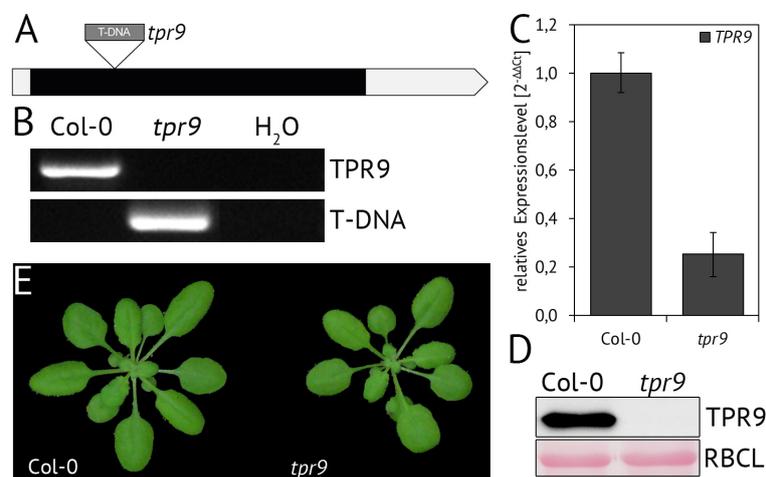


Abbildung 2.81. – Selektion einer *tpr9*-Linie in *Arabidopsis thaliana*. (A) Schematische Darstellung des *TPR9* kodierenden Gens. Untranslatierte Bereiche wurden in Grau, kodierenden Bereiche in Schwarz dargestellt. Die durch das *Nottingham Arabidopsis Stock Center* postulierte und durch Sequenzierung verifizierte Insertionsstelle wurde gekennzeichnet. (B) Nachweis der Homozygotie der T-DNA. Es wurde dafür eine genspezifische (*TPR9*) und eine T-DNA spezifische Primerkombination gewählt. Die elektrophoretische Auftrennung der mittels PCR gewonnen Amplifikate erfolgte durch 1 %ige Agarosegele. (C) *TPR9*-Transkriptgehalt. Der durch quantitative PCR nachgewiesene Transkriptgehalt wurde relativ zum gleichbehandelten Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt. (D) *TPR9*-Proteingehalt. Der immunologische Nachweis von *TPR9* erfolgte mit Hilfe des spezifischen *TPR9*-Antikörpers im Gesamtproteinextrakt. Die Proteinproben wurden mittels eines 12 % SDS-Gels elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (*RBCL*) diente als Ladekontrolle. (E) Nach vier Wochen Anzucht unter Standard-Kurztagbedingungen wurde der Phänotyp der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp (*Col-0*) festgehalten.

Bei der Analyse der *steady state* TBS-Intermediatgehalte wurden kaum Unterschiede zwischen der *tpr9*-Linie und dem korrespondierenden Wildtyp nachgewiesen (Abb. 2.82A-D). Lediglich der MgProtoME-Gehalt war in der *tpr9*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.82B). Der Chlorophyllgehalt der *tpr9*-Linie war ebenso wildtypartig (Abb. 2.82E), wie die ALA-Synthesekapazität (Abb. 2.82G). Der GluTR1-Proteingehalt der *tpr9*-Linie war ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp unverändert, was in Übereinstimmung mit der wildtypartigen ALA-Synthesekapazität war (Abb. 2.82H). Im Kontrast dazu wiesen ALAD und PORB in der *tpr9*-Linie eine leicht erhöhte Abundanz im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 2.82H). Der Verlust des

POR-interagierenden TPR9-Proteins führte somit zwar zu einer erhöhten Abundanz von PORB, dies verursachte allerdings keine Veränderung der *steady state* Gehalte von PChlid und Chlid. Die CHLM und GUN4 Proteingehalt waren hingegen in der *tpr9*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert, was eine Ursache für den reduzierten MgProtoME-Gehalt sein könnte (Abb. 2.82H).

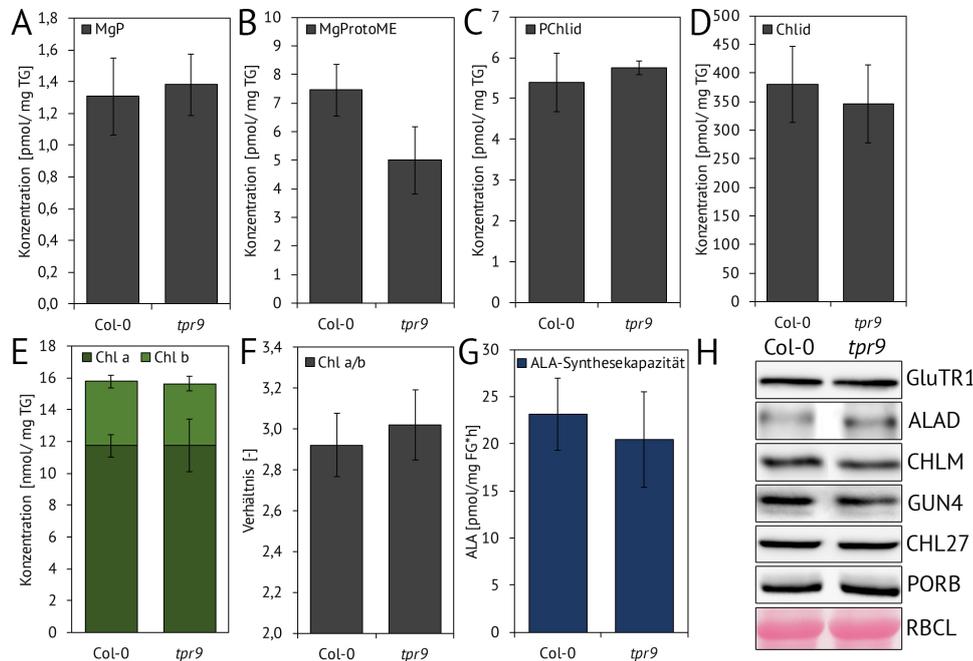


Abbildung 2.82. – Gehalte von TBS-Intermediaten und -Proteinen in der *tpr9*-Linie unter Standard-Kurztagbedingungen Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen (120 µE). (A-E) Die mittels HPLC bestimmten Gehalte der TBS-Intermediate und -Endprodukte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (F) Aus den gemessenen Chlorophyllmenge wurde das Chl a/b Verhältnis berechnet. (G) Die ALA-Synthesekapazität wurde nach vier Stunden Inkubation mit Lävulinsäure unter moderaten Lichtintensitäten bestimmt und auf das eingesetzte Frischgewicht (FG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten ermittelt. (H) Nachweis verschiedener Enzyme und Hilfsproteine der TBS im Gesamtproteinextrakt. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben.

Obwohl keine Veränderung des Gesamtchlorophyllgehaltes bestimmt werden konnte, war die Abundanz einiger photosynthetischer Komplexe in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abb. 2.83A). Beispielsweise waren die Gehalte der PSII und LHCII Monomere in der *tpr9*-Linie erhöht (Abb. 2.83A). Dies könnte möglicherweise eine Folge der reduzierten Abundanz der PSII-LHCII-Superkomplexe in der *tpr9*-Linie sein (Abb. 2.83A). Allerdings war die Auflösung der Superkomplexe in dem verwendeten BN-PAGE Gel nicht ausreichend und schwankte häufig zu stark zwischen den einzelnen Wiederholungen, um darüber eine klare Aussage treffen zu können. Die veränderte Abundanz der PSII-Komplexe hatte indes kaum Auswirkungen auf den Gehalt der einzelnen Untereinheiten im Gesamtproteinextrakt (Abb. 2.83B). Einziger Unterschied zum Wildtyp war ein geringfügig reduzierter Gehalt der PSII-Kernkomplex-Untereinheiten CP47 und D1 in der *tpr9*-Mutante (Abb. 2.83B). Neben der veränderten Abundanz der PSII-Komplexe wurde durch 77K-Chlorophyllfluoreszenz eine Reduktion der relativen PSI-Fluoreszenz in der *tpr9*-Mutante detektiert (Abb. 2.83C). Der Gehalt des PSI-Antennenproteins LHCA1 wurde dabei nicht durch das Fehlen von TPR9 beeinflusst (Abb. 2.83B). Somit waren sowohl PSI als auch PSII in der *tpr9*-Linie leicht beeinträchtigt, trotz des wildtypartigen Chlorophyllgehalts.

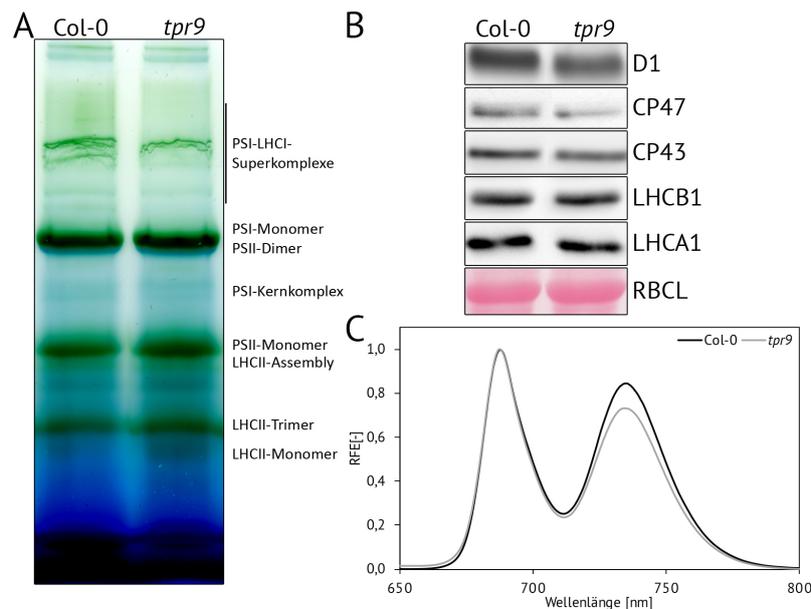


Abbildung 2.83. – Analyse der photosynthetischen Komplexe sowie der Chlorophyllfluoreszenz des PSI in der *tpr9*-Linie. Die verwendeten Pflanzen wurden für fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen. (A) BN-PAGE. Thylakoidmembranen wurden aus fünf Wochen alten Arabidopsis-Rosettenpflanzen isoliert und mit 1 % DDM solubilisiert. Proteinproben mit gleicher Chlorophyllmenge wurden mittels eines 4- 12 %igen BN-PAGE Gradientengels aufgetrennt. Die nachweisbaren photosynthetischen Komplexe wurden rechts neben der dazugehörigen Bande vermerkt. (B) Proteingehalt verschiedener photosynthetischer Untereinheiten. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgt im Gesamtproteinextrakt von vier Wochen alten Arabidopsis Pflanzen. Die Proben wurden mittels 12 %iger Harnstoffgele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben. (C) 77K-Chlorophyllfluoreszenz. Nach der Anregung bei $\lambda_{nm} = 440$ nm wurde die Chlorophyllfluoreszenz zwischen 650 und 800 nm detektiert und relativ zur maximalen Fluoreszenz bei 680 nm bestimmt. Die hier angegebenen Mittelwerte wurden aus jeweils drei biologischen mit je drei technischen Replikaten ermittelt.

Die Analyse der photosynthetischen Leistung von PSII bei Raumtemperatur ergaben, dass die effektive Quantenausbeute (Φ PSII) der *tpr9*-Linie leicht unter der des Wildtyps lag, wohingegen die maximale Quantenausbeute (F_v/F_m) nicht verändert war (Tab. 2.8). Darüber hinaus war das NPQ in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert, unterlag allerdings starken Schwankungen (Tab. 2.8). Die gemessenen Abweichungen in der Abundanz und Leistung der Photosysteme könnten eine Erklärung für den leicht retardierten Wuchs der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp sein. Diese Abweichungen standen dabei allerdings nicht im Zusammenhang mit einem reduzierten Chlorophyllgehalt. Durch Stressexperimente sollte überprüft werden, ob bei einer größeren Beanspruchung der Photosysteme ein deutlich sichtbarer Phänotyp hervorgerufen werden konnte.

Tabelle 2.8. – Mittels PAM bestimmte photosynthetische Leistung des PSII in der *tpr9*- Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Alle vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen und anschließend für 15 Minuten im Dunkeln adaptiert. Daraufhin erfolgte die Messung der maximalen (F_v/F_m) und effektiven Quantenausbeute (Φ PSII) sowie des NPQs. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Parameter	Col-0	<i>tpr9</i>
F_v/F_m	0,850 \pm 0,005	0,844 \pm 0,004
Φ PSII	0,722 \pm 0,021	0,655 \pm 0,040
NPQ	0,366 \pm 0,023	0,310 \pm 0,133

2.3.3.4. Analyse der *tpr9*-Mutante unter erhöhten Lichtbedingungen

Da die *TPR9*-Genexpression im Wildtyp unter Starklicht und kontinuierlichem Starklicht im Vergleich zu Standard-Kurztagbedingungen induziert wurde (Abb. 2.79C), wurden diese beiden Anzuchtbedingungen für weiterführende Stressexperimente gewählt. Arabidopsis Keimlinge wurden dafür für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für drei Tage unter erhöhtem Licht (ca. 350 μ E) und Langtag-Bedingungen inkubiert. Nach drei Tagen unter diesen Bedingungen zeigte die *tpr9*-Linie hinsichtlich Wuchs und Pigmentierung makroskopisch keine Unterschiede zum Wildtyp (Abb. 2.84A). In Übereinstimmung damit waren der Gesamtchlorophyllgehalt und das Chl a/b Verhältnis in der *tpr9*-Linie wildtypartig (Abb. 2.84B, C).

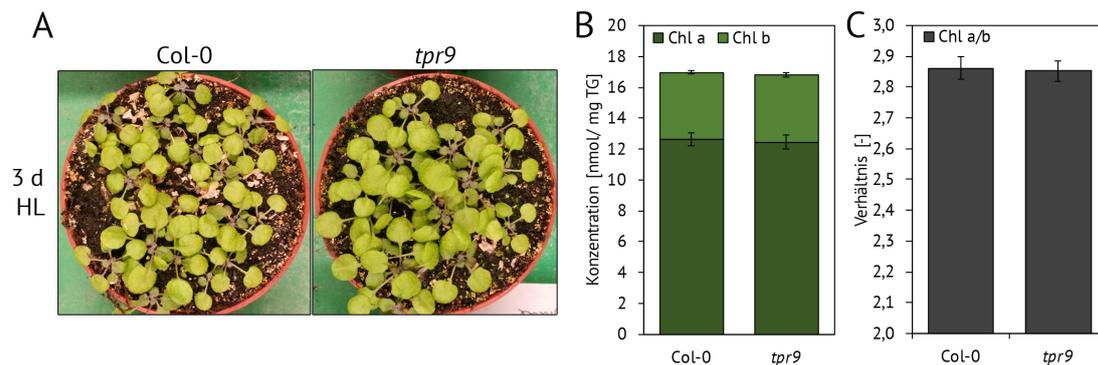


Abbildung 2.84. – Auswirkungen von erhöhten Lichtintensitäten im Tag-Nacht-Wechsel auf die Pigmentierung und den Wuchs der *tpr9*-Linie. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für drei Tage unter erhöhten Lichtbedingungen inkubiert (350 μ E; 16 h / 8 h). (A) Phänotyp der verwendeten Linien nach drei Tagen unter erhöhten Lichtbedingungen. (B) Die mittels HPLC bestimmten Chlorophyllgehalte wurden auf das verwendete Trockengewicht (TG) bezogen. (C) Aus den nachgewiesenen Chlorophyllmengen wurde das Chl a/b Verhältnis berechnet. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens vier biologischen Replikaten bestimmt.

Unter den hier verwendeten Bedingungen waren die frühen Intermediate des Chlorophyllzweigs, MgP und MgProtoME, in der *tpr9*-Linie entweder nicht nachweisbar oder wildtypartig (Abb. 2.85). Die Gehalte der späten TBS-Intermediate, PChlid und Chlid, waren hingegen in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.85). Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Anreicherung von Chlorophyll (Abb. 2.84B).

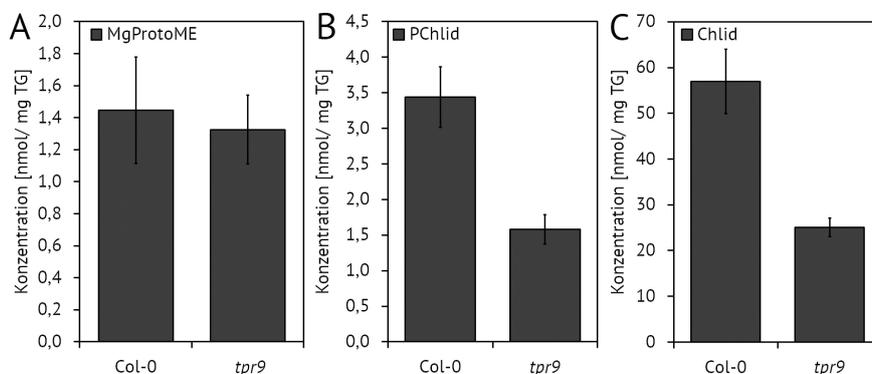


Abbildung 2.85. – Gehalte von TBS-Intermediaten und -Endprodukten nach drei Tagen unter erhöhten Lichtbedingungen. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für drei Tage unter erhöhten Lichtbedingungen inkubiert (350 μ E; 16 h / 8 h). (A-C) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens vier biologischen Replikaten ermittelt.

Bei der Untersuchung der Gesamtproteingehalte konnten für die meisten untersuchten Enzyme und Hilfsproteine der TBS in der *tpr9*-Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 2.86A). Lediglich der PORB-Gehalt war in der *tpr9*-Linie deutlich im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp reduziert, was eine Ursache für den reduzierten Chlid-Gehalt sein konnte (Abb. 2.86A). Der LHCA1-Gehalt in der *tpr9*-Linie war leicht reduziert, wohingegen LHCB1 eine wildtypartige Abundanz im Vergleich zum Wildtyp aufwies (Abb. 2.86A). Ein Mechanismus der Anpassung von Pflanzen an erhöhte Lichtintensitäten ist die Phosphorylierung der photosynthetischen Untereinheiten, welche von großer Bedeutung für die Justierung der Antennenkomplexe und die Reparatur des PSII-Kernkomplexes ist [288]. Interessanterweise konnte hierbei für die *tpr9*-Mutante ein reduzierter Anteil an phosphorylierten D1/D2-Untereinheiten im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden, während alle anderen Untereinheiten wildtypartig phosphoryliert wurden (Abb. 2.86B). Bereits nach drei Tagen unter erhöhten Lichtintensitäten im Tag-Nacht-Wechsel (Langtag) waren einige Unterschiede hinsichtlich der Gehalte von TBS-Intermediaten und -Proteinen in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp nachweisbar. Diese hatten allerdings keine sichtbaren Auswirkungen auf die Blattpigmentierung und den Wuchs der *tpr9*-Mutante.

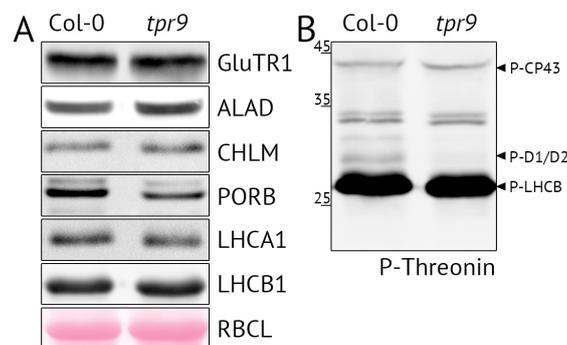


Abbildung 2.86. – Proteingehalte verschiedener Enzyme und Hilfsproteine der TBS sowie verschiedener photosynthetischer Untereinheiten nach drei Tagen unter erhöhten Lichtbedingungen. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen und anschließend für drei Tage unter erhöhten Lichtbedingungen inkubiert (350 μ E; 16 h / 8 h). (A) Immunologischer Nachweis verschiedener Proteine der TBS sowie von zwei photosynthetischen Antennenproteinen im Gesamtproteinextrakt. (B) Immunologischer Nachweis von phosphorylierten photosynthetischen Untereinheiten des PSII. Der Nachweis dieser Untereinheiten erfolgte mit Hilfe des Phospho-Threonin spezifischen Antikörpers in Gesamtproteinextrakten. Die Proteinproben wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal angegeben. Die Zuordnung der phosphorylierten Untereinheiten erfolgte nach Vainonen *et al.* [289].

2.3.3.5. Analyse der *tpr9*-Linie in kontinuierlichem Starklicht

Die stärkste Veränderung des relativen *TPR9*-Transkriptgehalts im Vergleich zu Standard-Kurztagbedingungen konnte unter kontinuierlichen Starklicht-Bedingungen detektiert werden (Abb. 2.79C). Aus diesem Grund wurde sowohl die *tpr9*-Linie als auch der Wildtyp für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für drei Tage unter kontinuierlichem Starklicht (ca. 700 μE) inkubiert. Nach drei Tagen war in der *tpr9*-Linie eine deutlich verringerte Blattpigmentierung im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp zu beobachten (Abb. 2.87A). Dies war einhergehend mit einem reduzierten Gehalt an Anthocyanen, welcher an der fehlenden violetten Färbung der Blattunterseite in der *tpr9*-Mutante sichtbar war (Abb. 2.87B). In Übereinstimmung mit der sichtbar reduzierten Blattpigmentierung war der Chlorophyllgehalt der *tpr9*-Linie um ca. 25 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.87C). Die photosynthetischen Kernkomplexe schienen hierbei stärker betroffen zu sein als die Antennenkomplexe, was zu einem erhöhten Chl a/b Verhältnis führte (Abb. 2.87D). Die Carotinoidgehalte der *tpr9*-Linie waren hingegen kaum verändert (Abb. 2.87E). Lediglich für Antheraxanthin und Zeaxanthin wurden in der *tpr9*-Linie erhöhte Gehalte im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (Abb. 2.87E). Beide Xanthophylle spielen eine wichtige photoprotektive Rolle [290, 291], sodass geschlossen wurde, dass die *tpr9*-Linie unter höherem photooxidativen Stress steht als der gleichbehandelte Wildtyp.

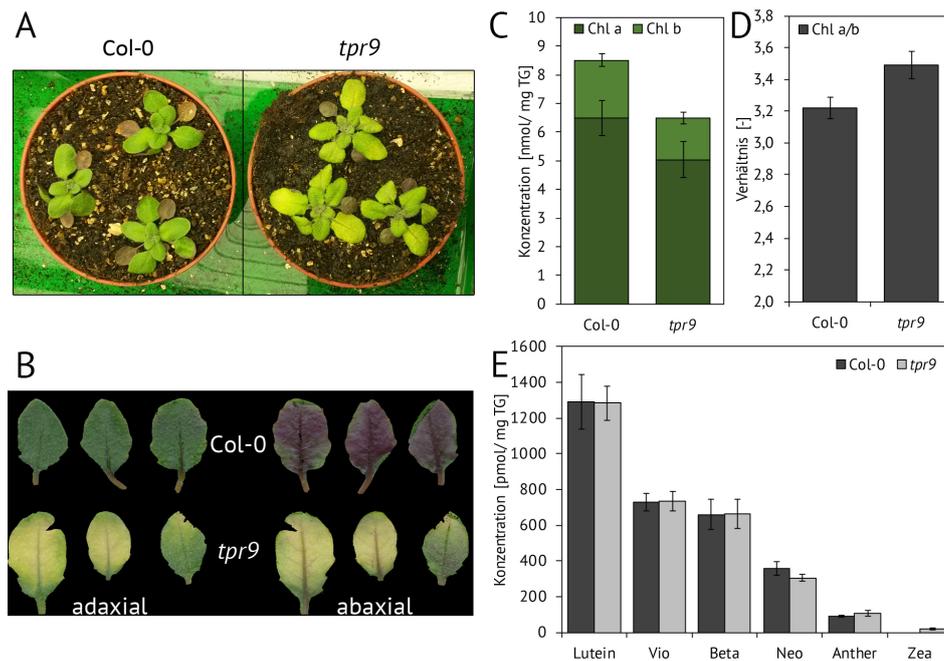


Abbildung 2.87. – Auswirkungen von kontinuierlichem Starklicht auf die Akkumulation von Chlorophyllen und Carotinoiden. Die verwendeten Linien wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μE) angezogen und anschließend für drei Tage unter kontinuierlichem Starklicht (ca. 700 μE) inkubiert. (A,B) Phänotyp der verwendeten Linien nach drei Tagen im Starklicht. (B) Abaxiale und dazugehörige adaxiale Blattseite von repräsentativen Blättern des Wildtyps und der *tpr9*-Linie. (C) Die mittels HPLC bestimmten Chlorophyllgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (D) Aus den nachgewiesenen Chlorophyllgehalten wurde das Chl a/b Verhältnis ermittelt. (E) Die mittels HPLC detektierten Carotinoidgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Im Wildtyp lag der Gehalt von Zeaxanthin unter dem Detektionsniveau der HPLC. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten ermittelt.

Der reduzierte Chlorophyllgehalt in der *tpr9*-Linie nach drei Tagen unter kontinuierlichem Starklicht-Bedingungen wurde dabei vermutlich durch die reduzierten Mengen der TBS-Intermediate verursacht (Abb. 2.88). Lediglich die PChlid-Gehalte waren in der *tpr9*-Linie wildtypartig (Abb. 2.88). Möglicherweise wurde die Aktivität von POR in der *tpr9*-Linie stärker beeinträchtigt als die anderer TBS-Enzyme, wodurch die Akkumulation von PChlid im Vergleich zu den anderen Intermediaten hervorgerufen wurde.

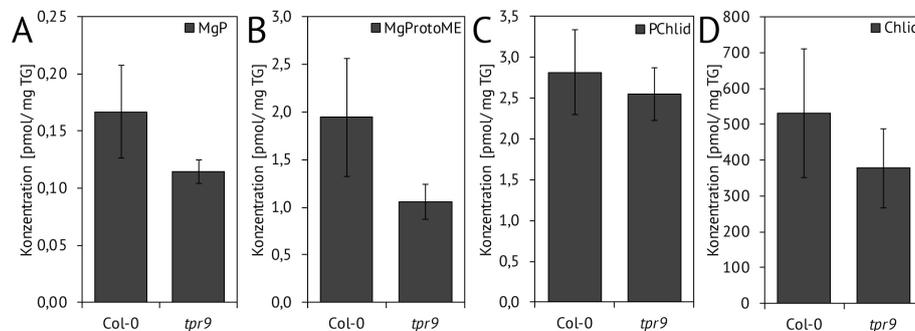


Abbildung 2.88. – TBS-Intermediatgehalte nach drei Tagen in kontinuierlichem Starklicht. Die verwendeten Linien wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen und anschließend für drei Tage unter kontinuierlichem Starklicht (ca. 700 μ E) inkubiert. (A-D) Die mittels HPLC bestimmten Intermediatgehalte wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus mindestens drei biologischen Replikaten ermittelt.

Um den Einfluss des verringerten Chlorophyllgehaltes auf die photosynthetischen Komplexe zu überprüfen, wurden nach drei Tagen im Starklicht Thylakoidmembranen isoliert und mittels BN-PAGE aufgetrennt. In der *tpr9*-Linie schien vor allem die Abundanz der PSI-Monomere/PSII-Dimere im Vergleich zum Wildtyp betroffen zu sein (Abb. 2.89A). Darüber hinaus wiesen einige der Superkomplexe einen leicht verringerten Gehalt in der *tpr9*-Mutante auf (Abb. 2.89A). Diese Beeinträchtigung der Superkomplexe wurde bereits unter Standard-Anzuchtbedingungen in der *tpr9*-Mutante vermutet (Abb. 2.83A). Für einen detaillierteren Einblick in die reduzierten Gehalte der photosynthetischen Komplexe wurde der Gesamtproteingehalt verschiedener photosynthetischer Untereinheiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Transfer in Starklicht untersucht. Da nach drei Tagen in kontinuierlichem Starklicht der Einfluss von sekundären Effekten auf die Stabilität der photosynthetischen Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde die Abundanz der verschiedenen Untereinheiten nach 24 bzw. 48 h in kontinuierlichem Starklicht untersucht. Dabei zeigte sich, dass nach 24 h der Gehalt der meisten photosynthetischen Untereinheiten in der *tpr9*-Linie wildtypartig war (Abb. 2.89B). Einzige Ausnahme bildete hierbei LHCB1, welches eine reduzierte Abundanz in der *tpr9*-Mutante aufwies (Abb. 2.89B). Nach 48 h waren die Proteingehalte der meisten photosynthetischen Untereinheiten in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp reduziert (Abb. 2.89B). Am stärksten waren dabei die Untereinheiten des PSII-Kernkomplexes, D1 und CP43, betroffen (Abb. 2.89B). Nach 48 h konnte ebenfalls ein reduzierter Gehalt der Antennenkomplexe des PSI, repräsentiert durch LHCA1, detektiert werden (Abb. 2.89B). Wie zuvor unter erhöhten Lichtbedingungen im Tag-Nacht-Wechsel war der PORA/B-Gehalt in der *tpr9*-Mutante nach drei Tagen in kontinuierlichem Starklicht im Vergleich zu Standard-Kurztagbedingungen und zum gleichbehandelten Wildtyp reduziert (Abb. 2.89C). Dies könnte dabei im Zusammenhang mit den nachgewiesenen PChlid- und Chlid-Gehalten stehen.

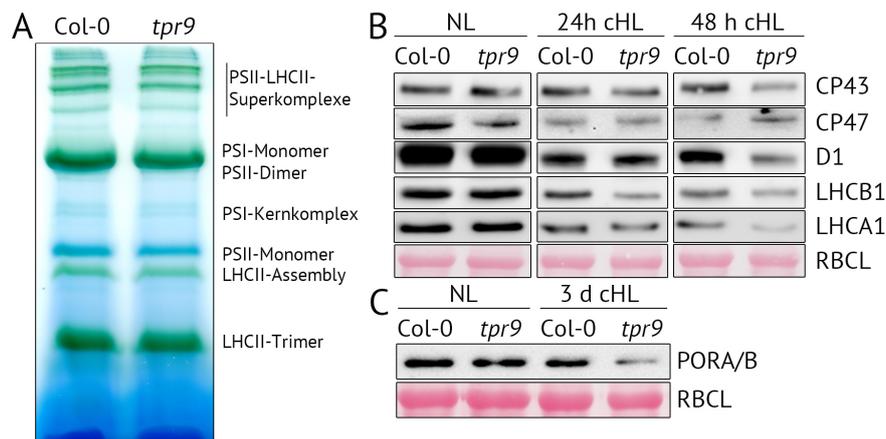


Abbildung 2.89. – Abundanz der photosynthetischen Komplexe und Untereinheiten zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Transfer in Starklicht. Die verwendeten Linien wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für 24, 48 bzw. 72 h in kontinuierlichem Starklicht (ca. 700 μE) inkubiert. (A) BN-PAGE nach 72 h in kontinuierlichem Starklicht. Thylakoidmembranen wurden aus Arabidopsis Rosettenpflanzen isoliert und mittels 1 % DDM solubilisiert. Proteinproben mit gleichen Chlorophyllmengen wurden durch ein 4–12 %iges BN-PAGE Gradientengel aufgetrennt. Die verschiedenen nachweisbaren photosynthetischen Komplexe wurden rechts neben der dazugehörigen Bande vermerkt. (B) Abundanz verschiedener photosynthetische Untereinheiten im Gesamtproteinextrakt vor der Inkubation in Starklicht und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation. Die Proben wurden mittels 12 %iger Harnstoffgele aufgetrennt. (C) PORA/B-Proteingehalt vor und nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht. Die Proteinproben wurden mittels eines 12 %igen SDS-Gels aufgetrennt. Für alle elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) als Ladekontrolle verwendet. Die detektierten Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt.

2.3.3.6. Untersuchung der photosynthetischen Leistung in Abhängigkeit zur Lichtintensität

Eine mögliche Ursache für die reduzierte Abundanz der photosynthetischen Untereinheiten in der *tpr9*-Linie unter kontinuierlichen Starklichtbedingungen konnte reduziertes NPQ sein. Dies hätte zur Folge, dass überschüssige Energie, welche durch die starke Einstrahlung hervorgerufen wurde, nicht abgegeben werden könnte und somit zur Schädigung der photosynthetischen Komplexe führen würde [292, 293]. Neben dem NPQ wurde auch die photosynthetische Leistung des PSII sowohl unter Standard-Kurztag- als auch kontinuierlichen Starklicht-Bedingungen untersucht (Tab. 2.9).

Tabelle 2.9. – Mittels PAM bestimmte photosynthetischen Leistung des PSII unter Standard-Kurztagbedingungen (NL) und nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht (HL). Alle vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μE) angezogen und anschließend für 24 h in kontinuierlichem Starklicht inkubiert. Vor und nach dieser Inkubation wurde die photosynthetische Leistung des PSII bestimmt. Vor Beginn der Messung erfolgte eine 15 minütige Dunkeladaptation. Anschließend wurden die maximale (F_v/F_m) und effektive Quantenausbeute (ΦPSII) sowie das NPQ bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

Parameter	NL		HL	
	Col-0	<i>tpr9</i>	Col-0	<i>tpr9</i>
F_v/F_m	0,850 \pm 0,005	0,844 \pm 0,004	0,791 \pm 0,012	0,801 \pm 0,020
ΦPSII	0,722 \pm 0,021	0,655 \pm 0,040	0,752 \pm 0,013	0,768 \pm 0,017
NPQ	0,366 \pm 0,023	0,310 \pm 0,133	0,083 \pm 0,038	0,075 \pm 0,023

Bereits nach der Anzucht unter Standard-Kurztagbedingungen konnte eine leichte Reduktion des NPQ und der effektiven Quantenausbeute des PSII in der *tpr9*-Linie nachgewiesen werden, während die maximale Quantenausbeute wildtypartig war (Tab. 2.9NL). Nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht waren die maximale und effektive Quantenausbeute der *tpr9*-Linie hingegen wildtypartig, während das NPQ weiterhin leicht im Vergleich zum Wildtyp reduziert war (Tab. 2.9HL). Allerdings konnten sowohl im Wildtyp als auch der *tpr9*-Linie die gleichen Tendenzen als Reaktion auf Starklicht nachgewiesen werden (Tab. 2.9HL).

Für eine detailliertere Analyse wurde sowohl die maximale Quantenausbeute als auch das NPQ in Abhängigkeit der Lichtintensität untersucht. Die gemessene maximale Quantenausbeute fiel sowohl im Wildtyp als auch in der *tpr9*-Linie mit steigender Intensität der Lichtpulse ab (Abb. 2.90A, C). Beide Linien zeigten sowohl nach Anzucht unter Standard-Kurztagbedingungen als auch nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht ein vergleichbares Verhalten (Abb. 2.90A, C). Im Vergleich zur effektiven Quantenausbeute nahm das NPQ mit steigender Lichtintensität der Lichtpulse unabhängig von der vorangegangenen Inkubation in beiden getesteten Linien zu (Abb. 2.90B, D). Die *tpr9*-Linie wies nach der Inkubation unter Standard-Kurztagbedingungen im Vergleich zum Wildtyp ein leicht reduziertes NPQ bei höheren Lichtintensitäten der Pulse (über 600 μE) auf (Abb. 2.90B). Im Gegensatz dazu lag nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht das NPQ der *tpr9*-Linie ab einer Intensität der Lichtpulse über 600 μE leicht über dem des Wildtyps (Abb. 2.90D). Zusammenfassend ließ sich allerdings sagen, dass eine Beeinträchtigung des NPQ als Ursache für den Phänotyp der *tpr9*-Linie ausgeschlossen werden konnte, da in Mutanten mit eingeschränktem NPQ die maximale Quantenausbeute und das NPQ mit steigender Lichtintensität weit hinter den Werten des Wildtyps zurückbleiben würden [290, 291].

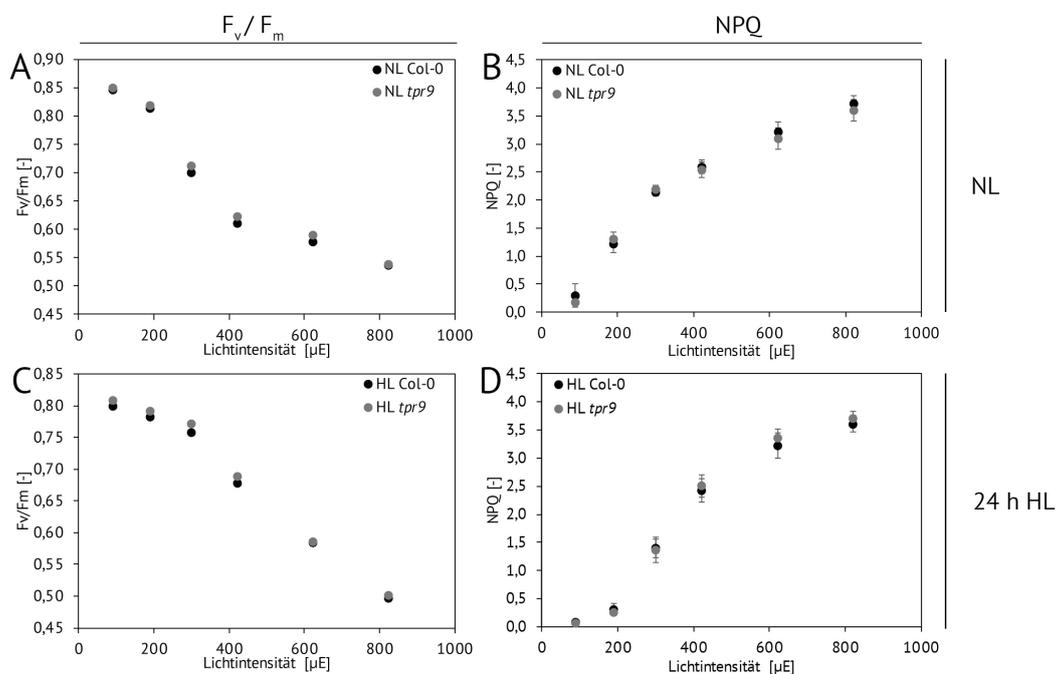


Abbildung 2.90. – Maximalen Quantenausbeute und NPQ in Abhängigkeit der Lichtintensität. Alle vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für 24 h unter kontinuierlichem Starklicht inkubiert. Vor und nach der Inkubation in Starklicht wurde die Leistung des PSII bestimmt. Vor Beginn der Messung erfolgte eine 15 minütige Dunkeladaptation. Anschließend wurde die maximale Quantenausbeute (A, C) sowie das NPQ (B, D) bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt.

2.3.3.7. Akkumulation von Anthocyanen in Abhängigkeit der Lichtintensität

Neben dem reduzierten Chlorophyllgehalt konnte eine deutliche Reduktion des Anthocyan-Gehalts nach drei Tagen in kontinuierlichem Starklicht in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 2.87B). Anthocyane spielen eine wichtige Rolle als Antioxidantien. Weiterhin akkumulieren sie als Antwort auf verschiedene Stressbedingungen, wie z.B. Kälte und Starklicht [294, 295]. Eine fehlende Anreicherung von Anthocyanen kam somit als Ursache für den Starklicht sensitiven Phänotyp der *tpr9*-Linie in Frage. Aus diesem Grund wurde der Anthocyanengehalt nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen, gefolgt von 24 h in kontinuierlichem Starklicht, bestimmt. Unter Standard-Kurztagbedingungen lag der Anthocyanengehalt in der *tpr9*-Linie leicht über dem des Wildtyps (Tab. 2.10NL). Nach 24 h unter kontinuierlichem Starklicht stieg der Anthocyanengehalt im Wildtyp als Reaktion auf die erhöhte Lichtintensität leicht an, während in der *tpr9*-Linie das Gegenteil der Fall war (Tab. 2.10HL). Diese Ergebnisse bestätigen den sichtbaren Phänotyp beider Linien nach mehreren Tagen im Starklicht, obgleich die Anthocyanmengen nach 24 h im Starklicht in beiden Linien starken Schwankungen unterlagen.

Tabelle 2.10. – Akkumulation von Anthocyanen in Abhängigkeit der Lichtintensität. Alle vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen (NL) und anschließend für 24 h unter kontinuierlichem Starklicht inkubiert (HL). Die Messung des Anthocyanengehalts erfolgt photometrisch bei 535 nm. Die nachgewiesene Absorption wurde auf das verwendete Trockengewicht (TG) bezogen. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten, im Falle der Standard-Kurztagbedingungen (NL) bzw. sechs biologischen Replikaten im Starklicht ermittelt.

	Anthocyane [$A_{535 \text{ nm}}/\text{g TG}$]	
	Col-0	<i>tpr9</i>
NL	6,10 \pm 0,72	7,09 \pm 1,08
HL	8,13 \pm 2,99	5,83 \pm 2,44

Diese Ergebnisse wiesen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Lichtsensitivität der *tpr9*-Linie und der Menge an Anthocyanen hin. Für die weiterführende Analyse wurde die Genexpression verschiedener Anthocyan-Biosynthese-Enzyme vor und nach 24 h im Starklicht bestimmt. Die Chalcon-Synthase (CHS) ist das initiale Enzym der Flavonoid-Biosynthese, während die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) und die Leukoanthocyanidin-Dioxygenase (LDOX) die letzten beiden Schritte der Anthocyan-Biosynthese katalysieren [295]. Unter Standard-Kurztagbedingungen war der relative Transkriptgehalt aller untersuchten Anthocyanogene in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Abb. 2.91). Als Reaktion auf erhöhte Lichtintensitäten stiegen im Wildtyp alle untersuchten Transkriptgehalte um das 8 - 12fache an (Abb. 2.91). In der *tpr9*-Linie fand dabei eine zum Wildtyp vergleichbare Reaktion auf die Starklicht-Bedingungen statt (Abb. 2.91). Lediglich der relative *DFR*-Transkriptgehalt lag in der *tpr9*-Linie im Starklicht leicht unter den Werten des gleichbehandelten Wildtyps (Abb. 2.91). Die relativen Transkriptgehalte der Anthocyan-Biosynthese-Enzyme waren in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert. Somit konnte die fehlende Akkumulation von Anthocyanen in der *tpr9*-Linie unter Starklicht-Bedingungen nicht auf eine beeinträchtigte Anreicherung der entsprechenden Transkripte zurückgeführt werden. Allerdings war unbekannt, wie die Abundanz und Aktivität der entsprechenden Enzyme durch das Fehlen von TPR9 beeinflusst wurde.

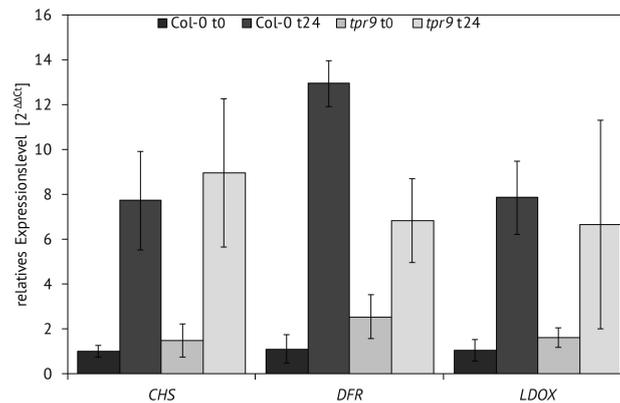


Abbildung 2.91. – Transkriptgehalte verschiedener Gene der Anthocyan-Biosynthese in Abhängigkeit der Lichtintensität. Alle vermessenen Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen (t0) und anschließend für 24 h unter kontinuierlichem Starklicht inkubiert (t24). Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp unter Standard-Wachstumsbedingungen bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt. CHS - Chalcon-Synthase; DFR - Dihydroflavonol 4-Reduktase; LDOX - Leukoanthocyanidin-Dioxygenase.

2.3.3.8. Analyse der transkriptionellen Auswirkungen im Starklicht

Die Starklicht-Sensitivität konnte durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Beispielsweise wurde ein zur *tpr9*-Linie vergleichbarer Phänotyp für die PLASTID REDOX INSENSITIVE 2 (*PRIN2*) defiziente Linie *prin2* beschrieben [296]. Vor allem unter Starklicht führt das Defizit von *PRIN2* zu einer deregulierten Genexpression von *LHCB* und infolge dessen zur Photoinhibierung des PSII [296]. Es galt somit zu überprüfen, ob auch der Starklicht-sensitive Phänotyp der *tpr9*-Linie durch die Fehlregulation der *LHCP*-Genexpression hervorgerufen wurde. Darüber hinaus war einer der deutlichsten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *tpr9*-Linie nach 24 h im Starklicht der verringerte *LHCB1*-Proteingehalt der *tpr9*-Mutante. Diese Reduktion könnte möglicherweise durch einen reduzierten *LHCB1*-Transkriptgehalt hervorgerufen werden. Für einen detaillierteren Einblick wurde die Veränderung der Transkriptgehalte verschiedener *LHCPs* nach einer kurzen und einer längeren Inkubationszeit in Starklicht im Vergleich zu Standard-Kurztagbedingungen untersucht. Unter Standard-Kurztagbedingungen wiesen alle untersuchten *LHCPs* in der *tpr9*-Linie einen wildtypartigen Transkriptgehalt auf (Abb. 2.92). Als kurzzeitige Reaktion auf die deutlich erhöhten Lichtintensitäten wurde die Genexpression der *LHCPs* im Wildtyp im Vergleich zu den Kontrollbedingungen induziert (Abb. 2.92). Einzige Ausnahme bildete dabei die unveränderte Genexpression von *LHCB2.4* (Abb. 2.92). Die Transkriptgehalte der *LHCPs* zeigten in der *tpr9*-Linie eine zum Wildtyp vergleichbare Reaktion (Abb. 2.92). Lediglich der *LHCB5*-Transkriptgehalt war in der *tpr9*-Linie nach zwei Stunden im Starklicht im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.92). Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Genexpression von *PRIN2* in der *tpr9*-Linie im Starklicht stärker induziert wurde als im gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.92).

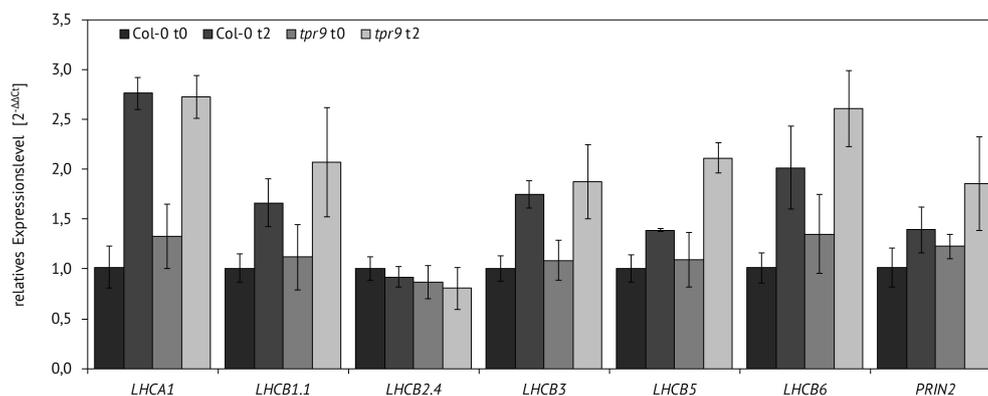


Abbildung 2.92. – Transkriptgehalte verschiedener LHCPs unter Standard-Kurztagbedingungen sowie nach zwei Stunden im Starklicht. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E, t0) angezogen und anschließend in Starklicht (750 μ E, t2) inkubiert. Der mittels quantitativer PCR nachgewiesene Transkriptgehalt wurde relativ zum Wildtyp unter Standard-Kurztagbedingungen bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

Nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht waren die Transkriptgehalte von *LHCB1.1*, *LHCB2.4* und *LHCB6* im Wildtyp im Vergleich zu den Standard-Anzuchtsbedingungen reduziert (Abb. 2.93). Im Kontrast dazu waren die Transkriptgehalte von *LHCB1.1* und *LHCB2.4* in der *tpr9*-Linie im Vergleich zu den Gehalten unter Standard-Kurztagbedingungen unverändert. Anders als im Wildtyp wurde die Genexpression dieser beiden Gene somit im Starklicht nicht reprimiert (Abb. 2.93). Die Transkriptgehalte von *LHCA1* und *LHCB5* waren hingegen im Wildtyp nach 24 h im Starklicht im Vergleich zu den Standard-Anzuchtsbedingungen unverändert, während sie in der *tpr9*-Linie leicht anstiegen (Abb. 2.93). Alle weiteren untersuchten Transkriptgehalte waren in der *tpr9*-Linie wildtypartig (Abb. 2.93).

Die Starklicht-Sensitivität der *tpr9*-Linie könnte somit im Zusammenhang mit der fehlenden Repression der LHCPs nach längerer Zeit unter erhöhten Lichtintensitäten stehen, welche analog zur *prin2*-Linie war. Allerdings konnte in der *tpr9*-Linie keine zu *prin2* vergleichbare Photoinhibition des PSII nachgewiesen werden. Demnach stellte sich die Frage, welche Ursachen und Folgen die veränderte Genexpression der LHCPs in der *tpr9*-Linie hatte.

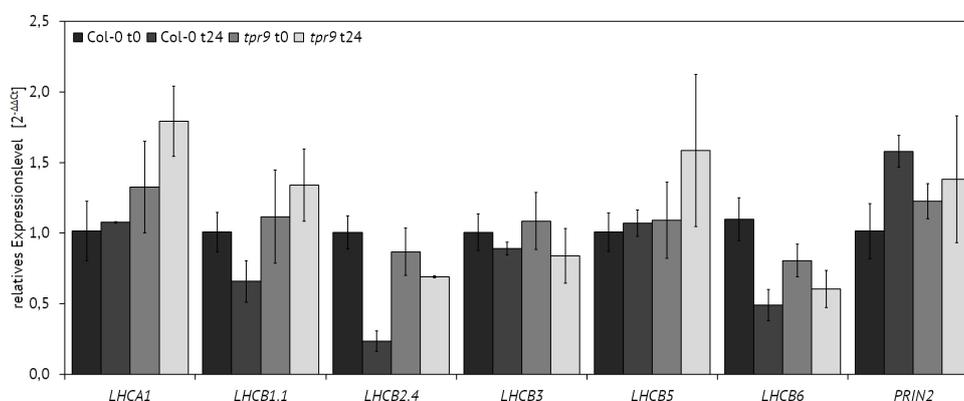


Abbildung 2.93. – Transkriptgehalte verschiedener LHCPs unter Standard-Kurztagbedingungen sowie nach 24 Stunden in kontinuierlichem Starklicht Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E, t0) angezogen und anschließend für 24 h in kontinuierlichem Starklicht (750 μ E, t24) inkubiert. Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp unter Standard-Kurztagbedingungen bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

2.3.3.9. Untersuchung des retrograden Signalweges unter Norflurazon-Behandlung

Die *tpr9*-Linie zeigte in den vorangegangenen Analysen eine Beeinträchtigung der *LHCP*-Genexpression. Die *LHCPs* gehören dabei zu den Zielgenen des retrograden Signalweges. Darüber hinaus wurde für die *prin2*-Mutante, welche einige Parallelen zu der hier analysierten *tpr9*-Linie zeigte, eine Funktion im GUN-vermittelten retrograden Signalweg beschrieben [296]. Dieser GUN-vermittelte retrograde Signalweg spielt vor allem während der Entwicklung funktionaler Chloroplasten eine entscheidende Rolle [297]. In Keimlingen, in welchen diese Entwicklung gestört ist, wie beispielsweise durch die Behandlung mit Norflurazon (NF), führt das Fehlen von GUNs zur fehlenden Repression verschiedener PhANGs [298]. Um zu überprüfen, ob das Fehlen von *TPR9* ebenfalls den retrograden Signalweg beeinflusst, wurden Wildtyp- und *tpr9*-Keimlinge für fünf Tage auf NF-haltigem Agarmedium angezogen. Anschließend wurden die relativen Transkriptgehalte verschiedener PhANGs im Vergleich zu Kontrollbedingungen bestimmt. Sowohl Wildtyp- als auch *tpr9*-Keimlinge bildeten unter Kontrollbedingungen, wie erwartet, grüne Kotyledonen und Primärblätter aus (Abb. 2.94A).

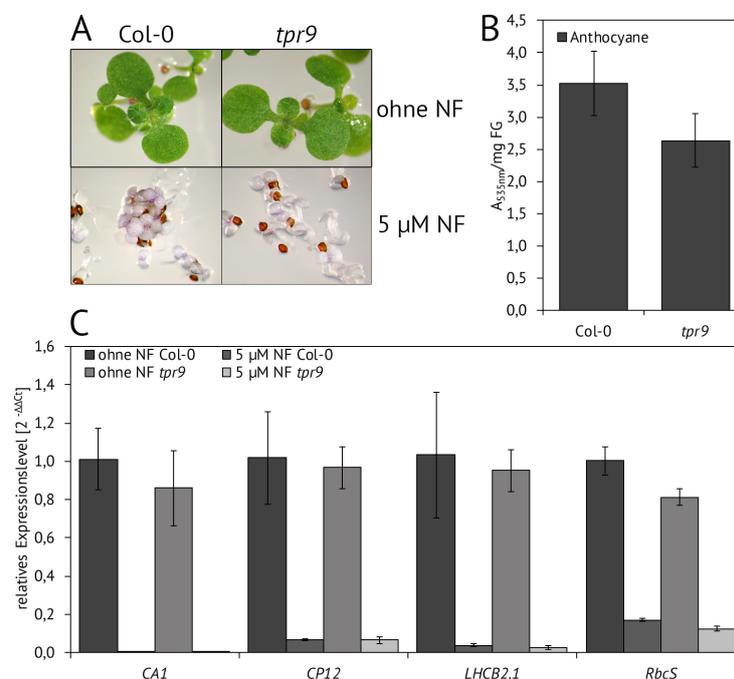


Abbildung 2.94. – Auswirkungen der Norflurazon (NF)-Behandlung auf Wildtyp- und *tpr9*-Keimlinge.

Arabidopsis Keimlinge wurden für fünf Tage sowohl auf Kontrollmedium (ohne NF) als auch auf NF-haltigem Medium (5 μ M NF) unter kontinuierlichen moderaten Lichtbedingungen (90 μ E) angezogen. (A) Phänotyp der fünf Tage alten Keimlinge. (B) Die Messung des Anthocangehalts erfolgt photometrisch bei 535 nm. Die nachgewiesene Absorption wurde auf das verwendete Frischgewicht (FG) bezogen. (C) Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp unter Kontrollbedingungen bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt. CA - Carboanhydrase; CP12 - chloroplast protein 12; RbcS - RuBisCO small subunit.

Die relativen Transkriptgehalte der untersuchten PhANGs waren unter diesen Bedingungen in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert (Abb. 2.94C). Nur der Transkriptgehalt der kleinen Untereinheit von RuBisCO (*RbcS*) war in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Abb. 2.94C). Die Behandlung mit NF führte zur Inhibierung der Carotinoid-Biosynthese und somit zur Hemmung der Chloroplastenentwicklung [299], wodurch Keimlinge lediglich weiße Kotyledonen ausbilden. Dies konnte für beide Linien auf NF-haltigem Medium bestätigt werden (Abb. 2.94A). Weitere Reaktionen auf die inhibierte Chloroplastenbiogenese

sind die Akkumulation von Anthocyanen und die starke Repression der PhANG-Genexpression. Hierbei fiel auf, dass in der *tpr9*-Linie weniger Anthocyane akkumulierten als im gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.94A, B). Die relativen Transkriptgehalte der untersuchten PhANGs zeigten hingegen in beiden Linien eine vergleichbare Repression als Reaktion auf die inhibierte Chloroplastenentwicklung im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Abb. 2.94C). Somit kann ausgeschlossen werden, dass unter NF-Behandlung der GUN-vermittelte Signalweg durch das Fehlen von TPR9 beeinträchtigt ist. Allerdings führten auch diese Stressbedingungen in der *tpr9*-Linie zu einer reduzierten Anreicherung von Anthocyanen.

2.3.3.10. Untersuchung des retrograden Signalweges unter Starklicht-Bedingungen

Um auszuschließen, dass der GUN-vermittelte retrograde Signalweg zwar nicht unter NF-Behandlung, jedoch im Starklicht beeinträchtigt war und somit den Starklicht-sensitiven Phänotyp der *tpr9*-Linie verursachte, wurde der Transkriptgehalt einiger PhANGs sowie weiterer Komponenten des retrograden Signalweges nach 24 h im Starklicht im Vergleich zu Kontrollbedingungen bestimmt. Darüber hinaus wurde die Genexpression zweier POR-Isoformen untersucht, da der PORB-Proteingehalt der *tpr9*-Linie unter Starklicht-Behandlung deutlicher abnimmt als im gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.89C). Unter Standard-Kurztagbedingungen war der Transkriptgehalt aller untersuchten Gene in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Abb. 2.95). Als Reaktion auf Starklicht wurde die Genexpression der untersuchten Gene, mit Ausnahme von *GLK1*, im Wildtyp stark induziert (Abb. 2.95). In der *tpr9*-Linie war eine zum Wildtyp vergleichbare Induktion der Genexpression im Starklicht nachweisbar, lediglich der Transkriptgehalt von *PORB* blieb im Vergleich zu den Kontrollbedingungen unverändert (Abb. 2.95). Dieser unveränderte *PORB*-Transkriptgehalt könnte somit den reduzierten PORB-Proteingehalt der *tpr9*-Mutante im Starklicht verursachen. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass der retrograde Signalweg weder unter NF- noch Starklicht-Behandlung durch das Fehlen von TPR9 beeinträchtigt ist. Bei der hier analysierten *tpr9*-Linie handelte es sich somit nicht um eine GUN-Mutante im klassischen Sinne. Die nachgewiesene Deregulation der Genexpression von *LHCB1*, *LHCB2* sowie *PORB* in der *tpr9*-Mutante schien demnach eine spezifische Reaktion auf kontinuierliches Starklicht zu sein.

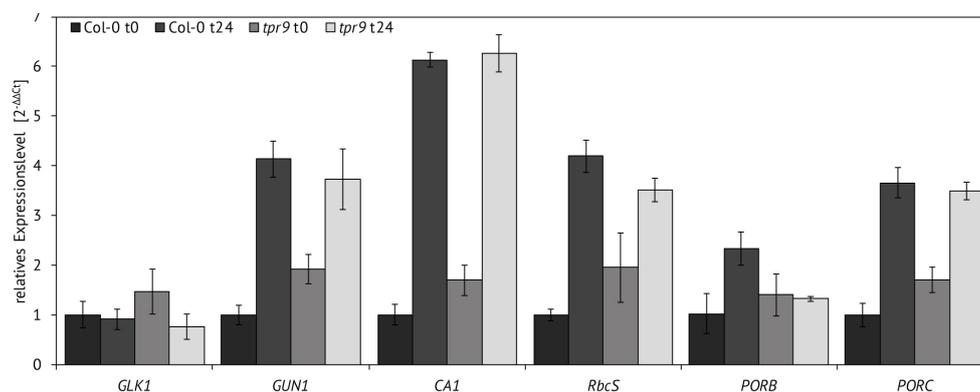


Abbildung 2.95. – Transkriptgehalte verschiedener Komponenten des retrograden Signalweges sowie zweier POR-Isoformen in Abhängigkeit der Lichtintensität. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E, t0) angezogen und anschließend für 24 h in kontinuierlichem Starklicht (750 μ E, t24) inkubiert. Die mittels quantitativer PCR nachgewiesenen Transkriptgehalte wurden relativ zum Wildtyp unter Standard-Kurztagbedingungen bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten ermittelt.

2.3.3.11. *State transition* und Phosphorylierung der photosynthetischen Untereinheiten unter verschiedenen Lichtbedingungen

Neben der mittel- und langfristigen Reaktion auf Lichtstress durch die Veränderung der Transkript- und Proteingehalte kann kurzfristig durch *state transition* der LHCII-Antennen auf verschiedene Lichtbedingungen reagiert werden. Darüber hinaus führt Starklicht zur Auflösung der Megakomplexe [300] sowie, als Folge einer veränderten Phosphorylierung der einzelnen PSII-Untereinheiten, zur Ablösung der LHCII-Antennen von den PSII Kernkomplexen [301]. Da in der *tpr9*-Linie der Transkript- und Proteingehalt verschiedener Antennenproteine, vor allem aber von LHCBI, beeinträchtigt war, wurde untersucht, ob *state transition* in der *tpr9*-Linie verändert war. Dafür wurden fünf Wochen alte Rosettenpflanzen für 90 min sowohl in dunkelrotem Licht (state I), gefolgt von rotem Licht (state II), als auch unter moderaten Lichtbedingungen, gefolgt von Starklicht, inkubiert. Unter Standard-Kurztagbedingungen und in rotem Licht konnte sowohl im Wildtyp als auch in der *tpr9*-Mutante der *state transition* Komplex, bestehend aus dem PSI-Monomer und den LHCII-Antennen, detektiert werden (Abb. 2.96). Im Vergleich dazu konnte nach 90 min in Starklicht bzw. dunkelrotem Licht dieser Komplex nicht mehr bzw. nur noch mit deutlich geringerer Abundanz nachgewiesen werden (Abb. 2.96). Hierbei waren keine Unterschiede zwischen der *tpr9*-Linie und dem Wildtyp nachweisbar (Abb. 2.96). Die fehlende Auflösung des *state transition* Komplexes konnte demnach als Ursache für die Starklicht-Sensitivität der *tpr9*-Linie ausgeschlossen werden.

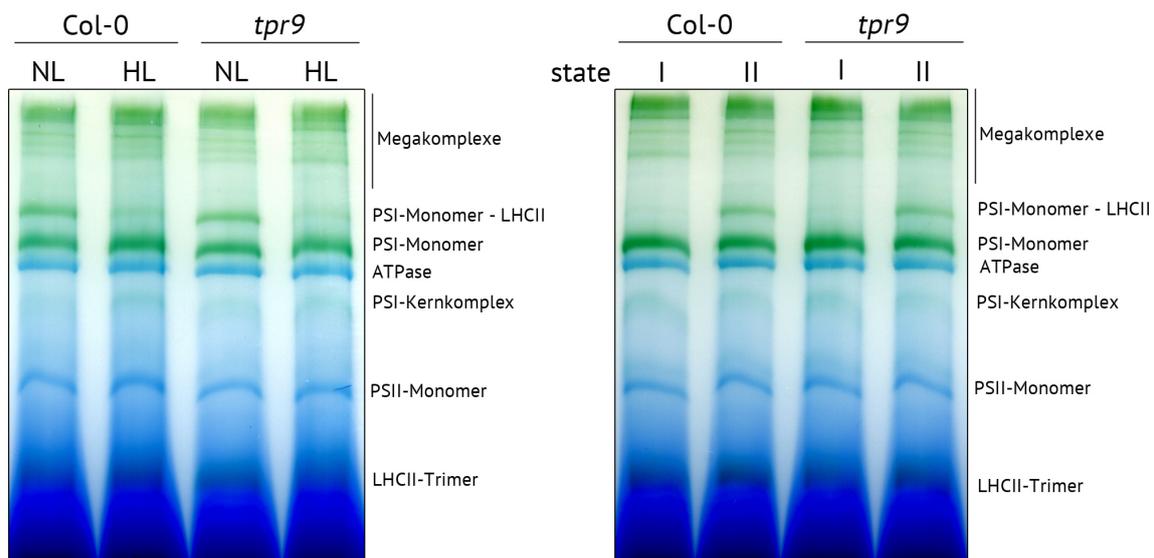


Abbildung 2.96. – Nachweis des *state transition* Komplexes unter verschiedenen Lichtbedingungen.

Nach fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) wurden Arabidopsis Rosettenpflanzen für 90 min sowohl unter dunkelrotem Licht (state I; 100 μ E), gefolgt von rotem Licht (state II; 100 μ E), als auch unter moderaten Lichtbedingungen (NL; 120 μ E), gefolgt von Starklicht (HL; 750 μ E), inkubiert. Die isolierten Thylakoidmembranen wurden mit 1 % Digitonin solubilisiert und mittels 4- 12 %iger BN-Gradientengele elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden dabei Proteinproben mit gleicher Chlorophyllmenge eingesetzt. Die nachweisbaren photosynthetischen Untereinheiten wurden rechts neben der dazugehörigen Bande angegeben.

Die Phosphorylierung von PSII-Untereinheiten spielt während der Auflösung und Ausbildung der Superkomplexe eine wichtige Rolle. Mit Hilfe eines Phospho-Threonin spezifischen Antikörpers wurde die Phosphorylierung von CP43, D1, D2 und LHCB in den verwendeten Linien untersucht. Unter Standard-Kurztagbedingungen waren vor allem LHCB und D1/D2 im Wildtyp und der *tpr9*-Linie stark phosphoryliert (Abb. 2.97). Leider konnten D1 und D2 unter Verwendung der 12 %igen SDS-Gele nicht gut genug aufgelöst werden, um diese eindeutig unterscheiden zu können. Allerdings wurde deutlich, dass keine Unterschiede zwischen beiden Linien nachweisbar waren (Abb. 2.97). Nach 90 min im Starklicht nahm sowohl im Wildtyp als auch der *tpr9*-Linie die Phosphorylierung von LHCB deutlich ab (Abb. 2.97). Die Phosphorylierung von D1/D2 und CP43 nahm hingegen nur im Wildtyp im Starklicht deutlich zu, während in der *tpr9*-Linie das Gegenteil der Fall war (Abb. 2.97). Die ausbleibende Phosphorylierung der Untereinheiten des PSII-Kernkomplexes in der *tpr9*-Linie schien hierbei eine spezifische Reaktion auf Starklicht zu sein, da nach 90 Minuten in rotem und dunkelrotem Licht die Phosphorylierung dieser Untereinheiten in der *tpr9*-Linie wildtypartig war (Abb. 2.97).

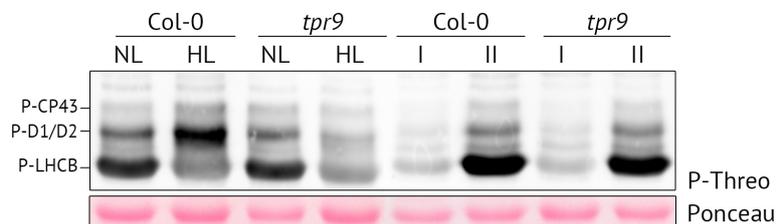


Abbildung 2.97. – Phosphorylierung von PSII-Untereinheiten unter verschiedenen Lichtbedingungen. Nach fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (NL) wurden Arabidopsis Rosettenpflanzen für 90 min unter Starklicht (HL), dunkelrotem Licht (state I) und rotem Licht (state II) inkubiert. Die anschließend isolierten Thylakoidmembranen wurden mittels 12 %iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die durch den Phospho-Threonin (P-Threo) spezifischen Antikörper nachgewiesenen PSII-Untereinheiten wurden links neben dem immunologischen Signal angegeben. Die Zuordnung wurde hierbei gemäß Vainonen *et al.* [289] vorgenommen.

Nachdem festgestellt wurde, dass die Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten in der *tpr9*-Linie beeinträchtigt war, wurde überprüft, ob davon spezifische photosynthetische Komplexe betroffen waren. Interessanterweise zeigte sich bereits unter Standard-Kurztagbedingungen, dass in der *tpr9*-Linie weniger phosphoryliertes LHCB in den Superkomplexen und mehr in den LHCII-Trimeren im Vergleich zum Wildtyp vorlag (Abb. 2.98). Somit wurde gezeigt, dass zwar der Gesamtgehalt an phosphoryliertem LHCB in der *tpr9*-Linie wildtypartig, die Verteilung der Phosphorylierung allerdings verändert war (Abb. 2.98). Darüber hinaus waren in der *tpr9*-Linie die Gehalte aller phosphorylierten Untereinheiten im Bereich der Superkomplexen allgemein geringer als im Wildtyp, was möglicherweise im Zusammenhang mit den reduzierten Gehalten der Superkomplexe stand (Abb. 2.98). Im Starklicht nahm die Phosphorylierung von LHCB in allen Komplexen sowohl im Wildtyp als auch in der *tpr9*-Linie stark ab (Abb. 2.98). Darüber hinaus nahm im Wildtyp unter Starklicht-Bedingungen die Phosphorylierung aller weiteren Untereinheiten in allen Komplexen deutlich zu (Abb. 2.98). In der *tpr9*-Linie stieg der Anteil an phosphoryliertem D1, D2 und CP43 in den Superkomplexen zwar ebenfalls an, allerdings weniger stark als im Wildtyp und im Vergleich zu den anderen Komplexen (Abb. 2.98). Ferner wurde deutlich, dass in der *tpr9*-Linie vor allem der Gehalt an phosphoryliertem D2 im Starklicht geringer war als im gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.98).

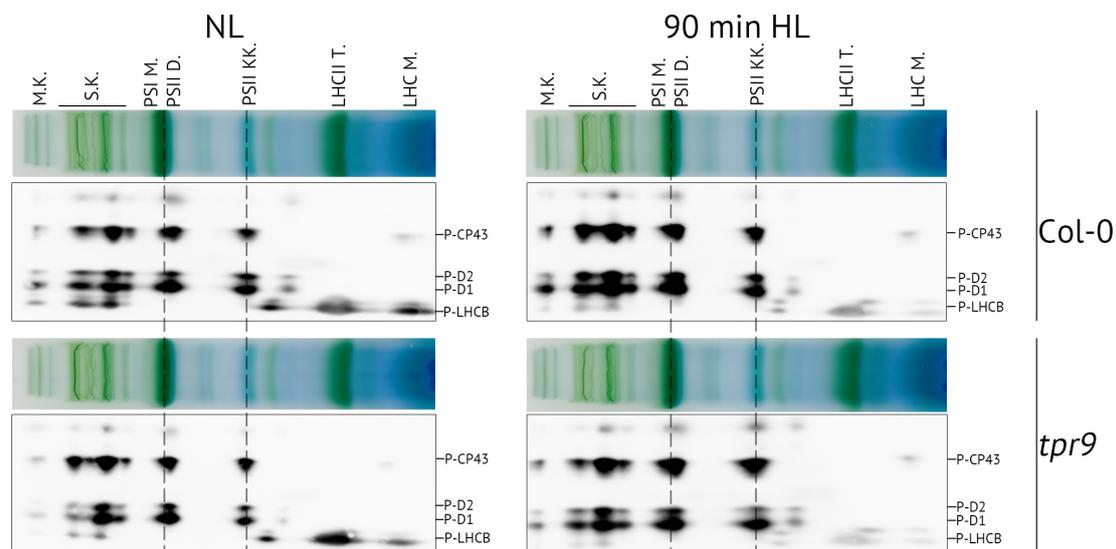


Abbildung 2.98. – Phosphorylierung von PSII-Untereinheiten in den photosynthetischen Komplexen in Abhängigkeit der Lichtintensität. Nach fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (NL) wurden Arabidopsis Rosettenpflanzen für 90 min in Starklicht (HL) inkubiert. Anschließend wurden Thylakoidmembranen isoliert und mittels 1 % DDM solubilisiert. Die Auftrennung der ersten Dimension erfolgte mittels 4- 12 %iger BN-Gradientengele. Es wurden dabei Proteinproben mit gleicher Chlorophyllmenge eingesetzt. Die abundantesten photosynthetischen Untereinheiten wurden über der dazugehörigen Bande angegeben. Für die elektrophoretische Auftrennung der zweiten Dimension wurden 12 %ige SDS- Gele verwendet. Der immunologische Nachweis der phosphorylierten PSII-Untereinheiten erfolgte durch den Phospho-Threonin spezifischen Antikörper. Die Zuordnung der einzelnen detektierten Untereinheiten wurden nach Vainonen *et al.* [289] vorgenommen und rechts neben dem dazugehörigen Signal vermerkt. M.K. - Megakomplexe; S.K. - Superkomplexe; PSI M - PSI Monomere; PSII D. - PSII Dimere; PSII KK. - PSII Kernkomplex; LHCII T. - LHCII Trimere; LHC M. -LHC Monomere.

Die Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten führt unter anderem zur Auflösung der PSII-Superkomplexe und dient daher dem Schutz dieser Komplexe vor Überanregung [288]. Bei fehlender Phosphorylierung, wie beispielsweise in der *tpr9*-Linie, könnte dies eine weniger effektive Auflösung der Superkomplexe zur Folge haben und somit zur Überanregung und dementsprechend zur Schädigung der photosynthetischen Komplexe führen.

2.3.3.12. Initiale Charakterisierung von *TPR9-HA*-Komplementationslinien

Für die Komplementation der *tpr9*-Linie wurde die *AtTPR9* cDNA-Sequenz in den pCAMBIA-HA-Vektor eingebracht. Dadurch stand die *TPR9*-Sequenz zum einen unter der Kontrolle des 35S-Promoters und verfügte zum anderen über einen carboxyterminaler HA-Strep-Tag, welcher spätere Co-Immunopräzipitations-Analysen ermöglichen sollte. Das erzeugte 35S::*TPR9-HA*-Konstrukt wurde, vermittelt durch Agrobakterien, in die *tpr9*-Linien transformiert. Positive Transformanten wurden durch die im Vektor enthaltene BASTA-Resistenz-Kassette selektiert. Nach erfolgreicher Selektion wurde das Vorhandensein der transformierten 35S::*TPR9-HA*-Genkassette im Hintergrund der *tpr9*-Linie mittels spezifischer Primer verifiziert (Abb. 2.99A). Es wurden so insgesamt sechs unabhängige Transformanten identifiziert, von denen drei hier gezeigt wurden. Das Einfügen der 35S::*TPR9-HA*-Genkassette führte zu einem stark erhöhten *TPR9*-Transkriptgehalt in den untersuchten Transformanten im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.99B).

Für die Analyse des TPR9-Proteingehalts wurde der aufgereinigte TPR9-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Leider zeigte sich, dass die Aufreinigung nicht sehr erfolgreich war, da lediglich eine Bande bei einer Überexpression von *TPR9* detektiert werden konnte, während TPR9 im Wildtyp nicht nachweisbar war (Abb. 2.99C). Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass *TPR9* erfolgreich im Hintergrund der *tpr9*-Linie überexprimiert werden konnte und zu einem erhöhten Proteingehalt führte. Die TPR9-Überexpressionslinien waren nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen makroskopisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 2.99D). Für die weiteren Analysen wurde die Linie *TPR9-HA* #15 verwendet, da diese den höchsten TPR9 Transkript- und Proteingehalt auswies.

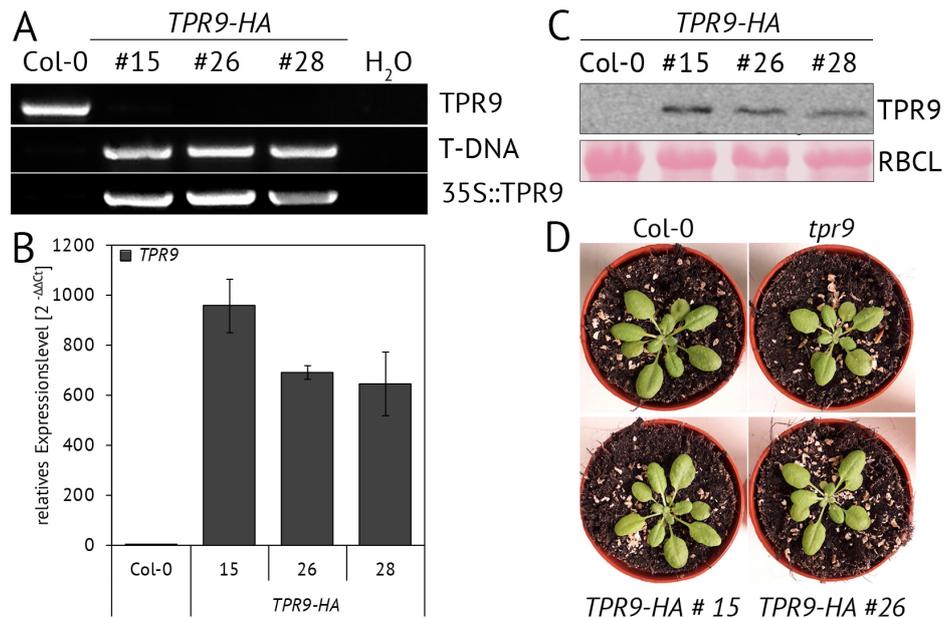


Abbildung 2.99. – Selektion von *TPR9-HA*-Komplementationslinien im Hintergrund der *tpr9*-Mutante. (A) Nachweis der transformierten 35S::*TPR9-HA*-Genkassette. Es wurde eine genspezifische (TPR9) und eine T-DNA spezifische (T-DNA) Primerkombination sowie eine spezifische Primerkombination für die 35S::TPR9-Genkassette verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der durch PCR erzeugten Amplifikate erfolgte durch 1 %ige Agarosegele. (B) Der *TPR9*-Transkriptgehalt der gewählten *TPR9-HA*-Linien wurde relativ zum korrespondierenden Wildtyp bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten ermittelt. (C) TPR9-Proteingehalt der *TPR9-HA*-Komplementationslinien. Der Nachweis von TPR9 wurde mit Hilfe des aufgereinigten TPR9-Antikörper durchgeführt, welcher in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde. Die Proben wurden mittels 12 % iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. (D) Der Phänotyp zweier repräsentativer *TPR9-HA*-Linien im Vergleich zum Wildtyp und der *tpr9*-Linie nach vier Wochen unter Standard-Anzuchsbedingungen.

Es sollte ferner geprüft werden, ob das Wiedereinfügen von TPR9 den Starklicht-sensitive Phänotyp der *tpr9*-Linie komplementieren konnte. Hierfür wurden Pflanzen für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für fünf Tage in kontinuierlichem Starklicht inkubiert. Wie zuvor beobachtet, wies die *tpr9*-Linie nach fünf Tagen in Starklicht eine reduzierte Blattpigmentierung im Vergleich zum Wildtyp auf. Die sichtbare Pigmentierung der *TPR9-HA*#15-Linie war hingegen wildtypartig (Abb. 2.100A). Dies konnte durch die mittels HPLC bestimmten Chlorophyllgehalte bestätigt werden (Abb. 2.100B). Somit führte das Wiedereinfügen von TPR9 zur Komplementation des Starklicht-sensitiven Phänotyps der *tpr9*-Linie. Allerdings war das Chl a/b Verhältnis der *TPR9-HA*#15-Linie immer noch im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Abb. 2.100B).

Ebenfalls wurden die reduzierten Gehalte von Chlid und Carotinoiden in der *tpr9*-Linie durch das Wiedereinfügen von TPR9 komplementiert (Abb. 2.100C, D). Die Gehalte von MgP, MgProtoME und PChlid lagen nach fünf Tagen in kontinuierlichem Starklicht unter dem Detektionslevel der HPLC, sodass über die Anreicherung dieser Intermediate keine Aussage getroffen werden konnte. Neben der Akkumulation von Chlorophyll und TBS-Intermediaten war außerdem der Anthocyan-Gehalt der *TPR9-HA#15*-Linie von Interesse. Auf makroskopischer Ebene konnte dieser am deutlichsten an der Blattunterseite detektiert werden. Wie zuvor detektiert, wies der Wildtyp eine deutliche violette Färbung der Blattunterseite auf, während sich in der *tpr9*-Linie weniger Anthocyane in kontinuierlichem Starklicht anreicherten (Abb. 2.100A). Überraschenderweise akkumulierten in der *TPR9-HA*-Linie weniger Anthocyane als im Wildtyp und der *tpr9*-Mutante (Abb. 2.100A).

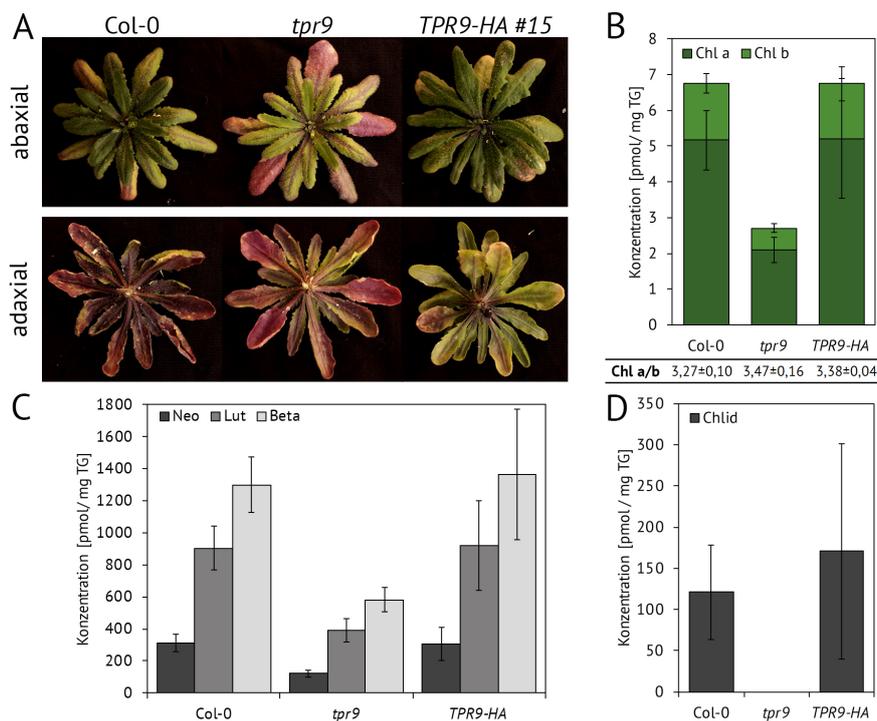


Abbildung 2.100. – Charakterisierung der *TPR9-HA#15*-Linie nach fünf Tagen in kontinuierlichem Starklicht. Die verwendeten Linien wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μ E) angezogen und anschließend für fünf Tage in kontinuierlichem Starklicht (750 μ E) inkubiert. (A) Der Phänotyp der abaxialen und dazugehörigen adaxialen Seite der Rosettenpflanzen nach fünf Tagen in kontinuierlichem Starklicht. (B, D, E) Die mittels HPLC bestimmten Gehalte von Chlorophyll (B), Chlid (D) und Carotinoiden (E) wurden auf das eingesetzte Trockengewicht (TG) bezogen. (C) Das Chl a/b Verhältnis wurde aus den detektierten Chlorophyllgehalten ermittelt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus vier biologischen Replikaten bestimmt.

Neben der Komplementation des Starklicht-sensitiven Phänotyps der *tpr9*-Linie durch das Wiedereinfügen von TPR9 waren die Auswirkungen der TPR9-Überexpression auf die Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten ein weiterer interessanter Punkt. Nach vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen war der Gehalt an phosphoryliertem D1/D2 in der *TPR9-HA*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht, während die Phosphorylierung von LHCB unverändert war (Abb. 2.101). Darüber hinaus konnte durch die Wiederholung des immunologischen Nachweises von TPR9 unter Verwendung des TPR9-Serums das transgene TPR9-HA-Protein im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abb. 2.101).

Allerdings stellte sich hierbei heraus, dass der TPR9-Proteingehalt der *TPR9-HA #15*-Linie wildtypartig war (Abb. 2.101). Der deutlich erhöhte *TPR9*-Transkriptgehalt führte in diesem Fall somit nicht zu einem erhöhten Proteingehalt (Abb. 2.101). Weiterhin zeigte sich, dass durch das Anfügen des HA-Strep-Tags das Laufverhalten von TPR9 verändert wurde, sodass das transgene TPR9-HA-Protein ca. 2 -3 kDa größer erscheint als das endogene Protein (Abb. 2.101).

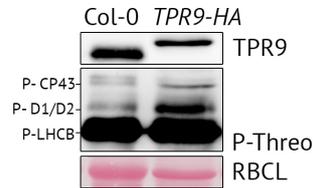


Abbildung 2.101. – Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten in der *TPR9-HA#15*-Linie. Die verwendeten Pflanzen wurden für vier Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 μE) angezogen. Die elektrophoretische Auftrennung der Gesamtproteinextrakte erfolgte mittels 12 % iger SDS-Gele. Die Ponceau gefärbte große Untereinheit von RuBisCO (RBCL) diente als Ladekontrolle. Die nachgewiesenen Proteine wurden rechts neben dem spezifischen immunologischen Signal vermerkt. Weiterhin wurden die nachweisbaren phosphorylierten PSII-Untereinheiten links neben dem dazugehörigen Signal vermerkt.

Die Analyse der *TPR9-HA#15*-Komplementationslinie unterstrich den möglichen Zusammenhang zwischen dem TPR9-Gehalt und der Starklicht-Sensitivität. Hierbei schien vor allem die Akkumulation von Anthocyanen und die Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten eine entscheidende Rolle zu spielen.

3. Diskussion

TPR-Proteine sind die evolutionär älteste Gruppe innerhalb der Gruppe der Repeat-Proteine [198]. Dennoch wurde bisher nur für wenige Vertreter dieser Gruppe eine Funktion in Chloroplasten beschrieben. Da TPR-Proteine bereits in den meisten Bakterien und Archaeen vorhanden sind, wird vermutet, dass sie an fundamentalen Prozessen beteiligt sind [190, 198]. Im Falle der plastidären TPR-Proteine entspräche dies beispielsweise der Regulation der Photosynthese, des Proteinimports sowie der Genexpression [197]. Aus diesem Grund war die Charakterisierung von plastidär lokalisierten TPR-Proteinen vielversprechend bei der Suche nach Regulatoren der Chlorophyllbiosynthese und Chloroplastenbiogenese. Von den 21 von Bohne *et al.* postulierten plastidären TPR-Proteinen in *Arabidopsis thaliana* wurde bislang nur für wenige eine Funktion beschrieben [197]. Auffällig war jedoch, dass die Funktionalität der bereits charakterisierten TPR-Proteine innerhalb der Chlorophyta konserviert war. Für viele der TPR-Proteine, welche in einzelligen Photosynthese betreibenden Organismen beschrieben wurden, erfüllte das Pendant in höheren Organismen eine essentielle Rolle [197]. Für das POR-INTERACTING TPR-Protein (Pitt), welches ursprünglich in *Synechocystis* charakterisiert wurde, wurde bislang kein Homolog in höheren Pflanzen identifiziert. In *Synechocystis* verbindet das membranintegrale Pitt die Chlorophyllbiosynthese mit der Assemblierung der photosynthetischen Komplexe [177, 178]. Ein Protein, welches in höheren Pflanzen eine vergleichbare Funktion ausübt, könnte eine Antwort auf die bislang nicht vollständig geklärte Frage liefern, wie Chlorophyll in die Chlorophyll-bindenden Proteine eingelagert wird und wie dieser Vorgang reguliert ist.

3.1. Identifikation des potenziellen Pitt-Homologs in *A. thaliana*

Bei der Suche nach dem Pitt-Homolog in *Arabidopsis thaliana* wurden insgesamt fünf TPR-Proteine identifiziert, deren TPR-Domäne eine hohe Sequenzidentität (22 - 26 %) und Sequenzähnlichkeit (40 - 49 %) zur TPR-Domäne von Pitt aufweist und die darüber hinaus über eine vergleichbare Anzahl an TPR-Motiven verfügen. Es war unerwartet, dass fünf potenzielle Kandidaten identifiziert wurden. Schottkowski *et al.* benannten At4g39470 (TPR4) und At1g78915 (TPR1) als putative Kandidaten des Pitt-Homologs [177], während Bohne *et al.* postulierten, dass At2g37400 das Pitt-Homolog in *Arabidopsis* sein könnte [197]. Allerdings wurde das durch At2g37400 kodierte TPR-Protein von weiteren Analysen ausgeschlossen, da es nur eine moderate Sequenzähnlichkeit und -identität zu Pitt relativ zu anderen Pitt-ähnlichen TPR-Proteinen aufweist und darüber hinaus über zwei TPR-Motive mehr als Pitt verfügt (Tab. 2.1). Außerdem wurden in dieser Arbeit durch die Nutzung von BLAST auch At3g18420 (SG1), At5g02590 (TPR7) und At3g53560 (TPR9) als mögliche Kandidaten vorgeschlagen. Bei den durchgeführten Interaktionsanalysen zeigten vier der fünf Kandidaten das Potenzial, mit einer oder mehreren POR-Isoformen aus *Arabidopsis* zu interagieren (siehe Abschnitt 2.1.2). Die Analyse der Interaktionen konnte somit die Suche nach dem putativen Pitt-Homolog nicht wesentlich eingrenzen. Von den vier verbleibenden Kandidaten verfügt allerdings nur TPR1, genau wie Pitt, über eine Transmembrandomäne und wurde somit als wahrscheinlichster Kandidat für das Pitt-Homolog in *Arabidopsis* angesehen. Da allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, dass in höheren Pflanzen zwei oder mehr TPR-Proteine die Funktion von Pitt ausüben, wurde für alle vier POR-interagierenden TPR-Proteine die Funktion *in planta* untersucht.

Für die Hypothese, dass mehrere TPR-Proteine in Arabidopsis eine Pitt-ähnliche Funktion ausüben können, spricht, dass der Verlust eines der TPR-Proteine unter Standard-Kurztagbedingungen keinen prägnanten Einfluss auf die Pigmentierung und photosynthetische Leistung in der entsprechenden Mutante hatte. Diese Möglichkeit steht im Kontrast zu den *pitt*-*Synechocystis* Linien, in denen das Zellwachstum und die PSI-Chlorophyllfluoreszenz stark beeinträchtigt war [177, 178]. Möglich ist durchaus, dass im Laufe der Evolution die Duplikation des Pitt-Gens dazu führte, dass sich die Funktionsweise von Pitt auf mehrere TPR-Proteine aufteilte, von denen eines in der Membran verankert ist und eines im Stroma vorliegt.

3.2. TPR1 - ein Regulator der Chlorophyllbiosynthese

3.2.1. Alignment zwischen verschiedenen Pitt-Homologen

Das Alignment der möglichen Pitt-Homologe innerhalb der Chlorophyta weist auf einige spezielle Merkmale der putativen Pitt-Homologe (PPH) höherer Pflanzen gegenüber den PPHs der Algen und Cyanobakterien hin. Eines dieser Merkmale ist die aminoternale Verlängerung der Sequenz in höheren Pflanzen (Abb. 2.10), welche zum einen auf die inkorrekte Vorhersage des Transitpeptids der PPHs zurückzuführen oder Teil eines weiteren Signalpeptids sein könnte. Zum anderen könnte dieser Bereich für eine spezifische Funktion der PPHs in den Thylakoidmembranen höherer Pflanzen zuständig sein. Die Transmembrandomäne verfügt hingegen über eine Vielzahl von konservierten Aminosäureresten, was ein Zeichen dafür sein könnte, dass diese Domäne für die Funktionalität aller PPHs von zentraler Bedeutung ist (Abb. 2.10). Ein Merkmal, welches die PPHs höherer Pflanzen gemein haben, ist eine verlängerte Verbindung zwischen der Transmembrandomäne und der TPR-Domäne (Abb. 2.10). Auffällig ist hierbei, dass nur At1g78915.1 eine um 17 Aminosäuren längere Insertion in diesem Bereich aufweist (Abb. 3.1). Eine verlängerte Verbindung zwischen den beiden Domänen könnte möglicherweise die Flexibilität der in das Stroma ragenden TPR-Domäne erhöhen. Warum diese Insertion lediglich in Arabidopsis gefunden wurde, ist allerdings unklar. Möglich ist, dass diese verlängerte Verbindung ebenfalls in den Splicing-Varianten anderer PPHs zu finden ist, welche bisher nicht identifiziert wurden.

Ein weiterer Unterschied zwischen den PPHs verschiedener Organismen ist eine carboxyterminale Verlängerung, welche in Cyanobakterien deutlich stärker ausgeprägt ist als in höheren Pflanzen (Abb. 2.10). Diese 25-27 Aminosäuren lange Sequenz ist wahrscheinlich im Laufe der Evolution verloren gegangen. Da für AtTPR1 kein Einfluss auf die Assemblierung des PSII nachgewiesen werden konnte, könnte diese carboxyterminale Verlängerung für die Interaktion zwischen Pitt und pD1 zuständig sein.

Innerhalb der TPR-Motive wurde ein hoher Konservierungsgrad zwischen den verschiedenen PPHs nachgewiesen, was die Vermutung nahelegt, dass sich die Funktion und Bindungsspezifität dieser Domäne im Laufe der Evolution, anders als in Bereichen außerhalb der zwei Domänen, kaum verändert haben. Da postuliert wurde, dass jedes TPR-Motiv für die spezifische Bindung eines Interaktionspartners zuständig sein könnte [194], spricht dies für ein im Laufe der Evolution nur geringfügig verändertes Interaktionsmuster der PPHs.

Mehrere mögliche Ursachen kommen für die Abweichungen zwischen den cyanobakteriellen und pflanzlichen PPH-Sequenzen in Frage. Die Unterschiede könnten zum einen im Zusammenhang mit dem unterschiedlichen räumlichen Aufbau der thylakoidalen Strukturen sowie der Organisation der *de novo* Synthese und Reparatur der photosynthetischen Untereinheiten stehen [180]. Cyanobakterien weisen beispielsweise sogenannte Biogenesezentren auf. In diesen Mikro-Kompartimenten werden die photosynthetischen Untereinheiten assembliert und die Chlorophylle in diese eingelagert [302]. In *Synechocystis* liegen diese Biogenesezentren in der Nähe der Plasmamembran vor und ermöglichen so einen raschen Austausch zwischen den beiden Membransystemen [180, 302]. In höheren Pflanzen konnte ein solches Mikro-Kompartiment nicht identifiziert werden [180], sodass fraglich ist, in welchen Bereichen das Pitt-Homolog vorliegen könnte und inwiefern ein solches Protein die Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten beeinflusst. Somit muss die Organisation der *de novo* Synthese der photosynthetischen Untereinheiten in höheren Pflanzen anders organisiert sein, wodurch auch die Funktionalität des Pitt-Homologs betroffen sein könnte.

Ein weiterer Faktor, welcher die Unterschiede zwischen den Pitt-Homologen der Cyanobakterien und höheren Pflanzen verursachen könnte, ist der Verlust von DPOR in Angiospermen [303]. Zwar besteht kein Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen Pitt und DPOR [177], da Pitt allerdings für die Anlieferung von Chlid zu den entstehenden photosynthetischen Komplexen zuständig ist, kann auch eine mögliche Abhängigkeit von DPOR nicht ausgeschlossen werden. Unabhängig von einer direkten Interaktion zu DPOR ist durch die strikte Lichtabhängigkeit der Chlid-Synthese in höheren Pflanzen eine andere Art der TBS-Regulation erforderlich. Dies kann ebenfalls die Funktion der möglichen Pitt-Homologe beeinflussen und somit auch eine Veränderung/Anpassung der Proteinsequenz bedingen. Nichtsdestotrotz unterstrich das Alignment, dass TPR1 der beste Kandidat für das PPH in *Arabidopsis* ist.

3.2.2. Die Genexpression von *TPR1* korreliert nicht mit der Genexpression von Enzymen der TBS

Die Genexpression vieler an der TBS beteiligten Enzymen unterliegt diurnaler Kontrolle und ist durch Licht induziert [49]. Die unterschiedlichen Reaktionen der TBS-Gene auf Licht, Photoperiodik und die endogenen Uhr führte zur Einteilung der TBS-Gene in vier verschiedene Cluster [49]. Beispielsweise wird *HEMA1* dem ersten Cluster zugeordnet [49]. Die Genexpression der Vertreter dieses Clusters ist während der Deetiolierung stark durch Licht induziert und oszilliert periodisch im Tag-Nacht-Wechsel [49] (Abb. 2.13A). Die Genexpression von Vertretern des zweiten Clusters, wie beispielsweise *ALAD1* oder *PORC*, ist moderat während der Deetiolierung induziert und unterliegt ebenfalls diurnaler Kontrolle [49].

Der *TPR1*-Transkriptgehalt verändert sich im Verlauf eines Standard-Kurztages kaum und folgte somit keinem diurnalen Rhythmus (Abb. 2.13C). Dies traf ebenfalls auf den *TPR1*-Proteingehalt zu (Abb. 2.13E). Die Genexpression von *TPR1* während der Deetiolierung ist hingegen moderat durch Licht induziert (Abb. 2.34B). Zwar wäre eine zu den Clustern 1 und 2 vergleichbare Genexpression von *TPR1* ein guter Indikator für eine potenzielle Verbindung zur TBS [49], allerdings korreliert die Genexpression von Regulatoren der TBS, wie beispielsweise *FLU* und *GBP*, ebenfalls kaum mit den Genen der TBS, obwohl *GBP* und *FLU* nachweislich eine entscheidende

Rolle für die TBS spielen [125, 140, 145, 149].

Denkbar wäre, dass der stabile *TPR1*-Transkriptgehalt in adultem Gewebe eine schnellere Reaktion auf verschiedenen Umwelteinflüsse ermöglicht. Ähnliches wurde für *GBP* vermutet, dessen Genexpression nicht im Tag-Nacht-Wechsel oszilliert, allerdings durch Stress, wie beispielsweise NF-Behandlung, stark induziert wird [125, 149]. Für eine ähnliche Funktionalität von *TPR1* würde sprechen, dass der *TPR1*-Transkriptgehalt stark von der Lichtintensität und der Länge der Lichtphase abhängig ist (Abb. 2.13D). Gegen diese Art der Regulation spricht, dass unter Stressbedingungen mit erhöhter Lichtintensität (Abb. 2.31) oder veränderter Länge der Lichtphase (Abb. 2.46, 2.47) kein starker Einfluss auf den Chlorophyllgehalt und die Stabilität der TBS-Enzyme in der *TPR1 knockout*-Linie im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar war. Möglich ist, dass die Stabilität und Funktionalität von *TPR1* nicht durch eine veränderte Genexpression beeinflusst wird, sondern auf posttranslationaler Ebene vermittelt wird.

3.2.3. *TPR1* ist ein integraler Bestandteil der Thylakoidmembranen

TPR1 ist, ebenso wie Pitt [177], durch die aminoterminalen Transmembrandomäne in den plastidären Membranen verankert (Abb. 2.14). Dabei ragt die *TPR*-Domäne in das Stroma des Chloroplasten (Abb. 2.14C) und ermöglicht so eine Vielzahl von Interaktionen zu membranassoziierten und stromalen Proteinen (Abschnitt 2.1.2). Die Funktionalität von *TPR1* könnte durch eine PTM und die Veränderung der subzellulären Lokalisation vermittelt werden. Vor allem die zwei *TPR1*-Proteinbanden, *TPR1*₄₃ und *TPR1*₄₀, lassen einigen Spielraum für Spekulationen. Zwei Ursachen kommen für den Größenunterschied von ca. 3 kDa zwischen beiden *TPR1*-Formen in Frage. (1) Der Unterschied wird durch die beiden Splicing-Varianten *At1g78915.1* und *At1g78915.2* verursacht (Abb. 3.1). (2) Der Unterschied wird durch PTM hervorgerufen. Dies könnte zum einen die weitere Prozessierung des *TPR1*-Peptids innerhalb des Chloroplasten sein. Die Abspaltung eines Peptids würde dabei den Größenunterschied und die subzelluläre Lokalisation auslösen. Zum anderen könnte beispielsweise eine Phosphorylierung ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel verursachen, wie dies beispielsweise auch für *GUN4* beschrieben wurde [304]. In Phospho-Proteomanalysen konnte für *TPR1* eine putative Phosphorylierungsstelle nachgewiesen werden, welche am Aminoterminus der *TPR1*-Sequenz vorliegt (Abb. 3.1) [305].

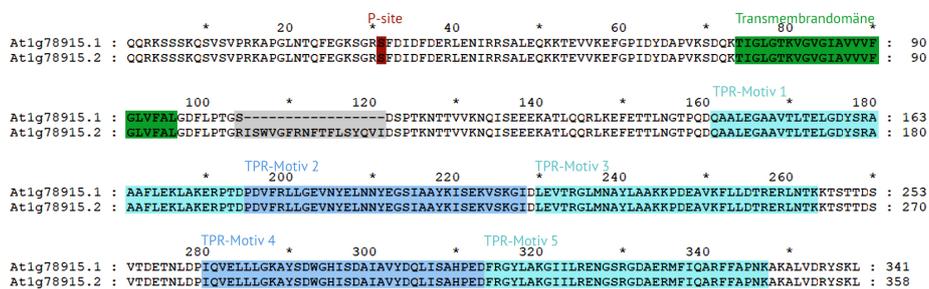


Abbildung 3.1. – Alignment der beiden für *TPR1* vorhergesagten Splicing-Varianten. Die beiden Splicing-Varianten wurden aus *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) entnommen und mittels MUSCLE verglichen. Die Visualisierung des Alignments erfolgte mittels GenDoc. Die Transmembrandomäne wurde grün unterlegt, wohingegen die fünf vorhergesagten *TPR*-Domänen blau unterlegt sind. Die durch Reiland *et al.* identifizierte Phosphorylierungsstelle (P-site) wurde rot hervorgehoben [305]. Die Unterschiede der beiden Splicing-Varianten zueinander ist hingegen grau unterlegt.

Interessant war das unterschiedliche Verhältnis beider TPR1-Formen zueinander in Extrakten von isolierten Chloroplasten oder isolierten Thylakoidmembranen. Während in isolierten Chloroplasten sowie im Gesamtproteinextrakt meist ausschließlich TPR₁₄₃ nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.16B), stieg der Anteil von TPR₁₄₀ im Vergleich zu TPR₁₄₃ in isolierten Thylakoidmembranen stark an (Abb. 2.14). Möglich ist, dass TPR₁₄₃ sensitiver gegenüber den verwendeten Extraktionsmethoden ist als TPR₁₄₀ und während der Präparation der Thylakoidmembranen modifiziert oder abgebaut wurde. Mittels Kinaseassays könnte dieser Frage beispielsweise nachgegangen werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass TPR₁₄₃ dual sowohl in den Thylakoidmembranen als auch den Hüllmembranen lokalisiert ist. Ein Teil der Hüllmembran könnte dementsprechend während der Präparation der Thylakoidmembranen verloren gegangen sein [306] und so die Verschiebung des Verhältnisses verursachen. Durch die Isolation von Hüllmembranen könnte dies überprüft werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass TPR₁₄₃, trotz des vorhergesagten plastidären Transitpeptids, ebenfalls in anderen zellulären Subkompartimenten vorliegt und dadurch im Gesamtextrakt abundanter ist als TPR₁₄₀ (Abb. 2.16). Beide TPR1-Proteinbanden weisen zudem eine unterschiedliche Lokalisation in fraktionierten Thylakoidmembranen auf. Während TPR₁₄₃ mit photosynthetischen Untereinheiten co-lokalisiert, weist die Lokalisation von TPR₁₄₀ indes hohe Übereinstimmungen zu POR auf (Abb. 2.40D). Die spezifische subzelluläre Lokalisation könnte demnach die Funktionalität der beiden TPR1-Varianten beeinflussen oder umgekehrt.

Auffällig war ferner, dass sich das Verhältnis beider TPR1-Varianten zueinander bereits nach 90 min in dunkelrotem Licht von TPR₁₄₃ zu TPR₁₄₀ verschob (Vergleich Abb. 2.25 und 2.55). Die schnelle Verschiebung dieses Verhältnisses könnte beispielsweise durch (De)Phosphorylierung gewährleistet werden, da das reversible Anheften oder Ablösen eines Phosphatrestes innerhalb weniger Minuten stattfinden kann, wie dies im Falle von GUN4 gezeigt wurde [304]. Zwar konnte in *in vitro* Experimenten am Beispiel von *LHCB3* gezeigt werden, dass auch verschiedene alternative Splicing-Varianten von *LHCB* innerhalb von 90 min nachweisbar sind [307], allerdings ist fraglich, ob innerhalb einer so kurzen Zeitspanne die Auswirkungen einer Veränderung des Splicings von *At1g78915* schon auf Proteinebene nachweisbar wären.

Zusammenfassend ließ sich an dieser Stelle sagen, dass für TPR1 zwei Varianten mit möglicher unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation nachgewiesen werden konnten. Die genaue Ursache für diese beiden Varianten ist unbekannt. Durch Kinaseassays und dem Nachweis der beiden Splicing-Varianten mittels quantitativer PCR könnte dem Ursprung beider TPR1-Varianten nachgegangen werden.

3.2.4. TPR1 - eine Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes?

3.2.4.1. TPR1 interagiert mit den Enzymen des FLU-Inaktivierungskomplexes

In Angiospermen, welche über keine DPOR verfügen, ist die negative Feedback-Regulation der ALA-Synthese über die Ausbildung des FLU-Inaktivierungskomplexes unabdingbar, um die Akkumulation von PChlid in Dunkelheit zu verhindern [143]. Hierbei interagiert FLU als Reaktion auf den steigenden Gehalt von POR-gebundenem PChlid sowohl mit GluTR1 als auch CHL27 und POR. Durch die Ausbildung dieses Komplexes wird GluTR1 inaktiviert und infolge dessen die ALA-Synthese inhibiert [143]. In verschiedenen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass TPR1 physisch sowohl mit GluTR1/2 als auch CHL27 und PORB/C interagiert (Abb. 2.1, 2.3). Die Interaktion zwischen GluTR1 und TPR1 fand hierbei in der aminoterminal gelegenen HBD von GluTR1 statt (Abb. 2.4). Da die Interaktion zwischen GluTR1 und FLU durch die FLU-Bindedomäne vermittelt wird [144–146], binden die beiden TPR-Proteine, TPR1 und FLU, GluTR1 in zwei unterschiedlichen Domänen innerhalb der GluTR1 Sequenz und konkurrieren somit nicht um die selbe Bindestelle. Es konnte im Zuge dieser Arbeit allerdings nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob TPR1 in der Lage ist, direkt mit FLU zu interagieren. In BiFC-Analysen konnte zwar eine Interaktion zwischen beiden Proteinen nachgewiesen werden (Abb. 2.2), in Split-Ubiquitin-Analysen allerdings nicht (Abb. 2.3). Die Interaktion zwischen TPR1 und FLU könnte *in planta* somit durch weitere Komponenten, wie beispielsweise GluTR1 oder PORB, vermittelt werden, welche dadurch ein falsch positives Signal verursachen würden.

Neben der direkten physischen Interaktion zeigte sich, dass TPR1 in subfraktionierten Thylakoidmembranen mit verschiedenen TBS-Enzymen co-lokalisiert. Der Hauptanteil von TPR1₄₀ konnte in den Granamargins nachgewiesen werden, während ein geringer Anteil des TPR1₄₀-Proteins in den Granastapeln und Stromalamellen vorliegt (Abb. 2.14B). Wang *et al.* konnten ihrerseits zeigen, dass PORB ausschließlich in den Granamargins zu finden ist, während GluTR1 und FLU neben den Granamargins auch zu einem geringen Anteil in den Stromalamellen vorliegen [308]. Darüber hinaus konnte mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation von isolierten Thylakoidmembranen bestätigt werden, dass TPR1 mit verschiedenen Enzymen der TBS co-lokalisiert (Abb. 2.40D). Dabei lag TPR1₄₀ in den selben Fraktionen wie PORA/B vor, während TPR1₄₃ in Fraktionen, in denen auch CHL27 und GluTR1 vorlagen, nachgewiesen wurde (Abb. 2.40D).

Mit Hilfe verschiedener *in vivo* und *in planta* Ansätze konnte mehrfach gezeigt werden, dass TPR1 mit einigen Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes co-lokalisiert bzw. interagieren konnte. Somit könnte TPR1 eine weitere Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes sein, welche entweder einen essentiellen Beitrag zur Funktionalität des Komplexes leistete oder eine akzessorische Funktion einnimmt.

3.2.4.2. TPR1 beeinflusst die Lokalisation und Stabilität von GluTR1

Neben der direkten Interaktion und Co-Lokalisation von TPR1 und GluTR1 hatte der Verlust des TPR1-Proteins *in planta* direkte Auswirkungen auf die Lokalisation und die damit verbundene Aktivität und Stabilität von GluTR1. Interessant war in diesem Zusammenhang der erhöhte Gehalt löslichen GluTR1s in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.21A). Der lösliche Anteil von GluTR1 wird als der aktive Anteil angesehen, während der membrangebundene Anteil von GluTR1, der vor allem auf die Bindung durch FLU zurückzuführen ist, größtenteils inaktiv sein soll [93]. Der bisherige Versuch, GluTR1 zur Überexpression zu bringen, führte stets zur Ausbildung von inaktiven Aggregaten und infolge dessen zur Ausbildung von Nekrosen in den Blättern von *Nicotiana tabacum* [155], was allerdings in den *tpr1*-Linien nicht der Fall war (Abb. 2.15C).

In Übereinstimmung mit der vorwiegend stromalen Lokalisation von GluTR1 konnte in den *tpr1*-Linien eine erhöhte ALA-Synthesekapazität nachgewiesen werden (Abb. 2.21B). Darüber hinaus war die ALA-Synthesekapazität umgekehrt proportional zum TPR1-Gehalt. Während der *knockout* von *TPR1* die höchste ALA-Synthesekapazität aufwies (Abb. 2.21B), führte die Überexpression von TPR1 zu einer reduzierten ALA-Synthesekapazität im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.61A). Dabei korrelierte die ALA-Synthesekapazität sowohl in den *tpr1*-Mutanten als auch in den Überexpressionslinien mit der subzellulären Lokalisation und damit einhergehenden Aktivität von GluTR1 [93] (Abb. 2.21B, 2.61A), was vermuten lässt, dass TPR1 entweder direkt an der Bindung und Inaktivierung von GluTR1 beteiligt sein könnte oder die Interaktion von GluTR1 und FLU vermittelt.

Die Stabilität löslichen GluTR1s wird durch verschiedene posttranslationale Mechanismen gesteuert. Der Abbau von GluTR1 erfolgt durch die Clp-Protease [146, 154]. Die ungebundene, aminoterminal gelegene HBD von GluTR1 wird durch die Clp-Substratelektoren ClpF und ClpS erkannt, welche daraufhin GluTR1 zur Clp-Protease anliefern [146, 154]. Sollte die HBD durch Interaktionspartner wie GBP und cpSRP43 okkupiert sein, wird GluTR1 vor proteolytischem Abbau geschützt [138, 146, 151]. Die Interaktion zwischen TPR1 und GluTR1 findet zwar ebenfalls im Bereich der HBD von GluTR1 statt, allerdings scheint der Verlust von TPR1 keinen Einfluss auf den GluTR1-Abbau zu haben, welcher beispielsweise durch ein Überangebot von ALA in Dunkelheit ausgelöst werden kann (Abb. 2.22B). Somit ist anzunehmen, dass die durch das Fehlen von TPR1 freiwerdende HBD von GluTR1 durch GBP und/oder cpSRP43 gebunden wird und diese so den Verlust von TPR1 kompensieren. Der zwei- bis dreifach erhöhte Anteil löslichen GluTR1s in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.21A) deutet darauf hin, dass der cpSRP43-Gehalt in den *tpr1*-Linien ebenfalls erhöht ist, da es andernfalls zur Ausbildung von inaktiven Aggregaten und zu einer reduzierten ALA-Syntheserate kommen sollte [151, 155].

Die erhöhte Aktivität von GluTR1 unter Standard-Kurztagbedingungen ist in den *tpr1*-Linien jedoch wahrscheinlich vor allem auf die reprimierte Inaktivierung von GluTR1 durch FLU zurückzuführen. Lange Zeit wurde vermutet, dass die Inaktivierung von GluTR1 durch FLU lediglich während der Dunkelphasen eine essentielle Rolle spielt [140, 145]. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, dass FLU auch während der Lichtphasen für die schnelle Inaktivierung von GluTR1 benötigt wird, da die *flu*-Mutante unter fluktuierenden Lichtintensitäten einen reduzierten

Chlorophyllgehalt im Vergleich zum gleichbehandelte Wildtyp aufwies [147]. Allerdings führte die Anzucht der *tpr1*-Linien in fluktuierendem Licht nicht zu einem zu *flu* vergleichbaren Phänotyp (Anhang .8). Nichtsdestotrotz ist es möglich, dass TPR1 an der Anpassung der ALA-Synthesekapazität während der Belichtungsphase beteiligt ist. In diesem Zusammenhang gilt auch zu bedenken, dass GBP *in vitro* eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu GluTR1 aufweist als FLU [134]. TPR1 könnte möglicherweise die Bindung zwischen GluTR1 und FLU initiieren und so das Gleichgewicht zwischen dem GBP-GluTR1-Komplex und dem FLU-GluTR1-Komplex während Belichtungsphasen vermitteln. Das Fehlen von TPR1 würde somit das Gleichgewicht in Richtung des GBP-GluTR1-Komplexes verschieben und so die erhöhte GluTR1-Stabilität und -Aktivität auslösen. Die Bindungsaffinität von TPR1 zu GluTR1 könnte mittels isothermer Titrationskalorimetrie oder *microscale thermophoresis* überprüft werden.

Der erhöhte Gehalt aktiven GluTRs in den *tpr1*-Linien steigerte zwar die ALA-Synthesekapazität, der *steady state* ALA-Gehalt war jedoch im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht (Abb. 2.21C). Dies könnte möglicherweise auf einen schnellen Umsatz von ALA durch die nachfolgenden Enzyme zurückzuführen sein. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang zu prüfen, ob im Falle eines wildtypartigen GluTR1-Gehalts in den *tpr1*-Mutanten unter Standard-Kurztagbedingungen ein reduzierter Chlorophyllgehalt hervorgerufen werden könnte. Um einen wildtypartigen GluTR1-Gehalt in der *tpr1*-Mutante herbeizuführen, könnte eine *tpr1 x gbp* Doppelmutante erzeugt werden, da in *gbp*-Mutanten der Abbau von GluTR1 erhöht ist [146].

3.2.4.3. Der Einfluss von TPR1 auf die Lokalisation und Aktivität von CHL27 und PORB

Neben dem Einfluss auf GluTR1 führt der Verlust von TPR1 zu einem deutlich reduzierten Gehalt von CHL27 und PORB an den Thylakoidmembranen (Abb. 2.25), während der Gesamtproteinanteil beider Enzyme nur leicht reduziert war (Abb. 2.19A). Unter Verwendung von isolierten Thylakoidmembranen (Abb. 2.25) konnte leider nicht geprüft werden, ob derteil dieser Enzyme an der Membran mit einer erhöhten Abundanz dieser im Stroma einherging, da die Stromafraktion während der Präparation zu stark verdünnt wurde. Alternativ wurde die durch Schmied *et al.* vorgeschlagene Methode zur Subfraktionierung von GluTR1 verwendet [93, 147]. Mittels dieser wurde allerdings weder CHL27 noch PORB in der löslichen Fraktion nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Somit ist unklar, ob der Verlust von TPR1 ebenfalls die subzelluläre Lokalisation von CHL27 und PORB verändert oder ob durch das Fehlen von TPR1 CHL27 und PORB leichter von der Membran abgelöst werden und dadurch beispielsweise schneller abgebaut wurden. Trotz dieser Unklarheiten ließ sich mehrfach bestätigen, dass durch den Verlust von TPR1 der Anteil von CHL27 und POR an den Thylakoidmembranen sowohl unter Standard-Kurztagbedingungen (Abb. 2.25, 2.41) als auch nach 90 min in dunkelrotem Licht reduziert ist (Abb. 2.55B). Durch die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von CHL27 und PORB unter kontinuierlichen Lichtbedingungen sollte untersucht werden, inwieweit dies auch für andere Lichtregime zutrifft.

Die Aktivität von CHL27 schien durch den reduzierten Anteil des Enzyms an den Thylakoidmembranen unter Standard-Anzuchtsbedingungen nicht beeinträchtigt zu sein, da MgProtoME und PChlid in den *tpr1*-Linien einen wildtypartigen *steady state* Gehalt aufwiesen (Abb. 2.20B, C). Darüber hinaus wurde unter keiner der getesteten Bedingungen eine starke Anreicherung

von MgProtoME und/oder ein drastischer Verlust von PChlid beobachtet (Abb. 2.31, 2.46, 2.47).

Auch die POR-Aktivität war in den *tpr1*-Linien *per se* nicht gestört (Abb. 2.23B), allerdings führte der Verlust von TPR1 unter verschiedenen Bedingungen zu einem reduzierten *steady state* Gehalt von Chlid (Abb. 2.20D, 2.44E), während der PChlid *steady state* Gehalt zumeist wildtypartig war (Abb. 2.20C, 2.44E). In *TPR1*-Überexpressionslinien war unter Standard-Kurztagbedingungen das Gegenteil der Fall. Während der *steady state* PChlid-Gehalt erhöht war, blieb der Chlid-Gehalt wildtypartig (Abb. 2.60C, D). Auch die Analyse der VIGS *TPR1*-Linien machte deutlich, dass die Inaktivierung von *TPR1* reduzierte *steady state* Chlid-Gehalte verursachte, während die Gehalte der vorgeschalteten TBS-Intermediate erhöht waren (Abb. 2.57, 2.58B). TPR1 ist somit zwar keine essentielle Komponente für die Umsetzung von PChlid zu Chlid durch POR, kann aber dennoch möglicherweise die durch POR katalysierte Reaktion oder die nachfolgende Reaktion, welche durch CHLG katalysiert wird, beeinträchtigen. Unklar ist jedoch, warum der reduzierte Chlid-Gehalt erst nach mehreren Stunden nach Beginn der Lichtphase nachweisbar war (Abb. 2.43C, 2.44F). Möglich wäre, dass dies im Zusammenhang mit dem sich über den Tag verändernden Intermediatfluss steht.

Trotz der offenen Fragen zeigte sich, dass der Verlust von TPR1 den Gehalt von peripheren Membranproteinen der TBS beeinflusst. Diese Veränderung hatte indes keine Auswirkung auf die durch CHL27 katalysierte Reaktion, die Aktivität von PORB schien jedoch unter bestimmten Bedingungen beeinträchtigt zu sein. Durch die Nutzung von *in vitro* Aktivitätsmessungen könnte dabei der genaue Einfluss von TPR1 auf die Aktivität von PORB beleuchtet werden.

3.2.4.4. Die Funktionalität von FLU ist durch TPR1 in Dunkelheit nicht beeinträchtigt

TPR1 interagiert zwar mit Enzymen des FLU-Inaktivierungskomplexes, die Inhibierung der TBS in Dunkelheit ist allerdings durch das Fehlen von TPR1 nicht nachweislich beeinträchtigt (Abschnitt 2.2.9), trotz des reduzierten FLU-Gehalts in den *tpr1*-Linien unter Standard-Kurztagbedingungen (Abb. 2.19A, 2.25). Der Gehalt von FLU scheint jedoch ausreichend für die Inhibierung der ALA-Synthese sowohl während der regulären Nachtphase eines Standard-Kurztages (Abb. 2.43B) als auch nach längerer Dunkelinkubation (Abb. 2.24D) zu sein, da andernfalls eine Akkumulation von PChlid in den *tpr1*-Linien, vergleichbar zur *flu*-Mutante, zu erwarten gewesen wäre [140, 145].

Im Wildtyp wird die TBS innerhalb von 30 - 60 min in Dunkelheit fast vollständig inaktiviert [139]. Fraglich ist in diesem Zusammenhang, ob durch das Fehlen von TPR1 und dem reduzierten FLU-Gehalt diese Inaktivierung in den *tpr1*-Linien möglicherweise langsamer vonstatten geht als im Wildtyp. Durch die Analyse der *steady state* ALA- und PChlid-Gehalte in den *tpr1*-Linien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Dunkelphase könnte diese Vermutung überprüft werden. Der Verlust von TPR1 schien vor allem im Tag-Nacht-Wechsel entscheidend zu sein, da die Gehalte von GluTR1 und FLU unter kontinuierlichen Lichtbedingungen nur geringfügig durch das Fehlen von TPR1 beeinträchtigt wurden (Abb. 2.22A, 2.51).

3.2.4.5. TPR1 und FLU haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von GluTR1

TPR1 und FLU interagieren beide mit GluTR1 und nehmen so einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation dieses Enzyms. Allerdings ist der Gesamtgehalt von GluTR1 in der *flu*-Linie kaum verändert, die subzelluläre Lokalisation von GluTR1 ist jedoch drastisch in Richtung der löslichen Fraktion der Plastiden verschoben [93, 147]. Im Kontrast dazu ist in den *tpr1*-Mutanten der Gesamtproteingehalt von GluTR1 um ein Vielfaches im Vergleich zum Wildtyp erhöht, die subzelluläre Lokalisation jedoch nicht wesentlich beeinflusst: Zwar kann in den *tpr1*-Linien ein deutlich höherer Anteil stromalen GluTR1s nachgewiesen werden (Abb. 2.21A), der membran-gebundene Anteil ist jedoch unverändert (Abb. 2.25).

TPR1 nimmt womöglich unabhängig von FLU Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von GluTR1. In Linien mit induzierter Inaktivierung von *TPR1* im Hintergrund der *flu*-Mutante wurde deutlich, dass der Verlust von sowohl FLU als auch TPR1 einerseits zu einem reduzierten Anteil von membrangebundener GluTR1 führte, was auf das Fehlen von FLU zurückzuführen war (Abb. 2.57G). Andererseits war der Anteil löslichen GluTR1s deutlich erhöht (Abb. 2.57G), was auf das Defizit von TPR1 zurückgeführt werden konnte. Somit ist es möglich, dass die Bindung von TPR1 die subzelluläre Lokalisation von GluTR1 unabhängig von FLU beeinflussen kann.

3.2.4.6. Die Rolle von TPR1 in TBS-Mutanten

Obwohl FLU, unabhängig vom Vorhandensein von CHL27 und POR, in der Lage ist, GluTR1 zu binden [309], kann ein Defizit von CHL27 oder POR die Integrität des gesamten FLU-Inaktivierungskomplexes stören und so die Bindung von FLU an diesen inhibieren [143]. Somit wäre die Ausbildung eines FLU-CHL27-POR-Komplexes nötig für eine geregelte Inhibierung der ALA-Synthese. In einer *chl27 knockdown*-Linie akkumulierte MgProtoME jedoch nur, wenn zusätzlich ALA bereitgestellt wurde [100]. Darüber hinaus führt die induzierte Inaktivierung von *CHL27* zu einer leicht erhöhten ALA-Synthesekapazität [310]. In *PORB knockout*-Linien ist die ALA-Synthesekapazität ebenfalls nur leicht erhöht [113]. Wenn das Vorhandensein von CHL27 und PORB essentiell für die Ausbildung des FLU-Inaktivierungskomplexes ist, wäre zu erwarten, dass sowohl in den *chl27*- als auch *porb*-Mutanten die ALA-Synthesekapazität deutlich erhöht ist.

Der Verlust einer Komponente des FLU-Inaktivierungskomplexes führt darüber hinaus zu einer erhöhten Abundanz der weiteren Bestandteile. Davon betroffen sind sowohl GluTR1 und FLU als auch CHL27 und PORB (Abb. 2.42B, C). Beispielsweise ruft der Verlust von *HEMA1* einen erhöhten Proteingehalt von FLU, CHL27 und PORB hervor (Abb. 2.42C) [285]. In Übereinstimmung damit ist auch der TPR1-Gehalt in den *hemA1*-, *chl27*- und *porb*-Mutanten erhöht (Abb. 2.42B, C). Die veränderten Gehalte könnten auf zwei regulatorischen Mechanismen beruhen. Zum einen könnte der erhöhte Gehalt der einzelnen Komponenten ein kompensatorischer Effekt sein, wonach eine gestörte Integrität des FLU-Inaktivierungskomplexes die Stabilität der beteiligten Enzyme erhöht. Zum anderen könnte die Ausbildung des FLU-Inaktivierungskomplexes einen negativen Effekt auf die Stabilität der einzelnen Komponenten haben. Der erhöhte TPR1-Gehalt in den *hemA1*-, *chl27*- und *porb*-Mutanten deutet darauf hin, dass TPR1 am Aufbau des FLU-Inaktivierungskomplexes beteiligt sein könnte und vergleichbar zu den anderen Komponenten im Falle einer gestörten Ausbildung des Komplexes reguliert wird.

3.2.4.7. TPR1 im Zusammenhang mit der schnellen Inaktivierung der TBS

Neben dem Proteingehalt der einzelnen Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes spielt auch der Gehalt von POR-gebundenem PChlid eine wichtige Rolle in diesem Komplex [139]. FLU nimmt den steigenden Gehalt von POR-gebundenem PChlid wahr und bindet daraufhin GluTR1 [143]. Dadurch kommt es zur schnellen Inaktivierung der ALA-Synthese innerhalb von 30 - 60 min [139]. Dies ist in Dunkelheit und bei geringen Lichtintensitäten nachgewiesen worden, wenn infolge der Inaktivierung von POR das Enzym schnell mit dem akkumulierenden PChlid abgesättigt ist [139]. Möglich ist hierbei, dass durch die Ausbildung eines CHL27-POR-Komplexes die Absättigung von POR mit PChlid aufgrund des optimierten Substratflusses beschleunigt werden kann. TPR1 könnte möglicherweise einen solchen Komplex vermitteln und stabilisieren (Abb. 3.2A). TPR-Proteine sind dafür bekannt, aufgrund ihrer ausgedehnten linearen Faltung, mit mehreren Proteinen gleichzeitig zu interagieren und so die Ausbildung von größeren Proteinkomplexen zu ermöglichen [190]. Somit ist es möglich, dass TPR1 mit GluTR1, CHL27 und POR gleichzeitig interagieren kann. Allerdings kann auch eine sequenzielle Abfolge der einzelner Interaktion nicht ausgeschlossen werden.

Eine gestörte Ausbildung dieses putativen CHL27-POR-TPR1-Komplexes, welche durch das Fehlen von TPR1 ausgelöst wurde, könnte die schnelle Absättigung von POR mit PChlid unterbinden und/oder die Weitergabe von CHL27 und POR an FLU stören (Abb. 3.2B). Infolgedessen würde ebenfalls die Inhibierung von GluTR1 durch FLU beeinträchtigt sein, was zu einer erhöhten ALA-Synthesekapazität führt (Abb. 2.21B). Ebenso könnte die Weitergabe des CHL27-POR-Komplexes an FLU durch die vorangegangene Bindung an TPR1 erleichtert werden, wodurch eine schnelle Inaktivierung der ALA-Synthese, beispielsweise nach Eintritt der Nacht, gewährleistet werden könnte (Abb. 3.2A). Darüber hinaus könnte dieser CHL27-POR-TPR1-Komplex auch während der Lichtphase für ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inaktivierung der ALA-Synthese durch FLU sorgen. Nach einer längeren Dunkelphase würde POR dennoch durch akkumulierendes PChlid abgesättigt werden und die Inaktivierung der ALA-Synthese durch FLU ermöglichen.

Im Zusammenhang damit könnten die unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Interaktionspartner zu GluTR1 stehen. Beispielsweise besitzt GBP eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu GluTR1 als die TPR-Domäne von FLU, wodurch unter vergleichbaren Bedingungen GluTR1 bevorzugt mit GBP interagieren würde [134]. TPR1 und GBP konkurrieren um die selbe Bindestelle innerhalb des Aminoterminus (HBD) von GluTR1 (Abb. 2.4). TPR1 könnte somit, in Konkurrenz zum GBP, GluTR1 binden und an FLU weiterleiten (Abb. 3.2A). Der Verlust von TPR1 könnte die uneingeschränkte Interaktion GBPs mit GluTR1 erlauben, sodass dadurch vor allem der stromale Anteil von GluTR1 stabilisiert wird (Abb. 3.2B). TPR1 müsste somit eine intermediäre Affinität zur GluTR1 haben.

Allerdings wäre auch denkbar, dass TPR1 einen FLU-unabhängigen Komplex mit GluTR1, CHL27 und POR bildet, welcher für die subzelluläre Lokalisation und Stabilisierung von CHL27 und POR an den Thylakoidmembranen verantwortlich sein könnte. Der erhöhte lösliche GluTR1-Gehalt wäre in diesem Fall ein sekundärer Effekt infolge eines veränderten Intermediatflusses, der durch die reduzierte Stabilisierung der Enzyme des Chlorophyllzweiges an den Thylakoidmembranen verursacht wurde.

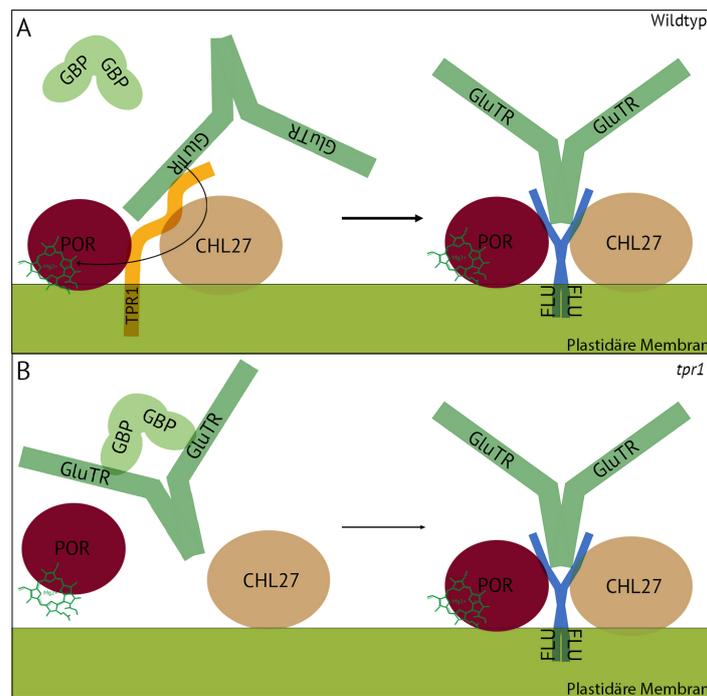


Abbildung 3.2. – Model zur Funktionsweise von TPR1 in adultem Gewebe. (A) Es wird vorgeschlagen, dass TPR1 mit GluTR, CHL27 und/oder PORB interagieren kann und dadurch Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation dieser Enzyme nimmt. Dies würde unter anderem die optimale Weitergabe von Intermediaten erleichtern. Darüber hinaus könnte TPR1 mit GBP um die Bindung von GluTR1 konkurrieren. Sowohl im Licht als auch in Dunkelheit könnten GluTR1, CHL27 und PORB von TPR1 an FLU weitergegeben werden und so eine schnelle und effektive Inhibierung der TBS ermöglichen. (B) Der Verlust von TPR1 würde die Ausbildung eines GluTR1-CHL27-POR-TPR1-Komplexes beeinträchtigen, dadurch die membranassoziierte Lokalisation dieser Enzyme verändern, wodurch auch die Inaktivierung der ALA-Synthese durch FLU beeinflusst wäre. Die von TPR1 und GBP genutzte Bindestelle der GluTR1 würde in der *tpr1*-Mutante unbeschränkt von GBP gebunden werden können und dadurch eine erhöhte Stabilität von GluTR1 hervorrufen. Unbekannt ist, ob TPR1 GluTR1 als Monomer oder Dimer bindet. Da allerdings die meisten Interaktionspartner mit dem GluTR1-Dimer interagieren [134, 144], ist davon auszugehen, dass auch TPR1 dimeres GluTR1 bindet.

3.2.4.8. Die Funktion von TPR1 im Verlauf des Tages

Die schnelle Anpassung der ALA-Synthese als Reaktion auf die PChlid-Gehalte ist essentiell im Verlauf eines Standard-Kurztags. Zu Beginn der Lichtphase kommt es zur Umwandlung von PChlid zu Chlid durch POR, wodurch der PChlid-Gehalt sinkt [139]. Über den Tag hinweg wäre anzunehmen, dass der PChlid-Gehalt relativ konstant bleibt, bis dieser nach Beginn der Dunkelphase aufgrund der strikten Lichtabhängigkeit der POR-Aktivität wieder rasch ansteigt. Reziprok zum PChlid-Gehalt sollte sich im Verlauf eines Standard-Kurztags der ALA-Gehalt verhalten: Zu Beginn der Lichtphase steigt der ALA-Gehalt stark an, da die Inaktivierung von GluTR1 durch FLU aufgehoben wird [143]. Zum Beginn der Dunkelphase sinkt der ALA-Gehalt, aufgrund der Inaktivierung der ALA-Synthese durch FLU, wieder ab (Abb. 3.3A) [139]. Die Veränderung von ALA und PChlid im Verlauf eines Standard-Kurztags stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der Funktion von TPR1.

Zu Beginn der Lichtphase waren die Gehalte der TBS-Intermediate und -Proteine in den *tpr1*-Linien wildtypartig (Abb. 2.43B, C, 2.45). Lediglich der ALA-Gehalt war in den *tpr1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.43A). Erst nach mehreren Stunden im Licht war der Chlid-Gehalt in den *tpr1*-Linien reduziert (Abb. 2.20D, 2.44F) und die Abundanz von GluTR1 erhöht (Abb. 2.19A, 2.45). Dies könnte dafür sprechen, dass eine fehlende Bindung verschiedener Interaktionspartner durch TPR1 erst nach längerer Belichtung von Bedeutung ist. Am Ende der

Dunkelphase würde sowohl im Wildtyp als auch in den *tpr1*-Linien POR größtenteils mit PChlid abgesättigt sein und so einen schnellen Umsatz von PChlid zu Chlid in der sich anschließenden Belichtungsphase ermöglichen. In dieser Phase hätte TPR1 wenig Einfluss auf den Fluss der Intermediate. Unter Belichtung sinkt daraufhin der Gehalt von PChlid drastisch ab, während die Gehalte der anderen TBS-Intermediate ansteigen (Vergleich Abb. 2.43 und 2.44). Im Zuge des sich verändernden TBS-Intermediatflusses könnte die Ausbildung eines GluTR1-CHL27-PORB-TPR1-Komplexes eine optimale Weitergabe der Intermediate ermöglichen. Das Fehlen von TPR1 könnte einen solchen Komplex destabilisieren und so auch den Metabolitfluss beeinflussen. Möglicherweise könnte die Stärke der Schwankungen im Gehalt von ALA und PChlid (Abb. 3.3, Amplitude) entscheidend sein oder der Gehalt von PChlid müsste einen gewissen Schwellenwert unterschreiten, bevor sich ein solcher CHL27-PORB-TPR1-Komplex ausbilden kann.

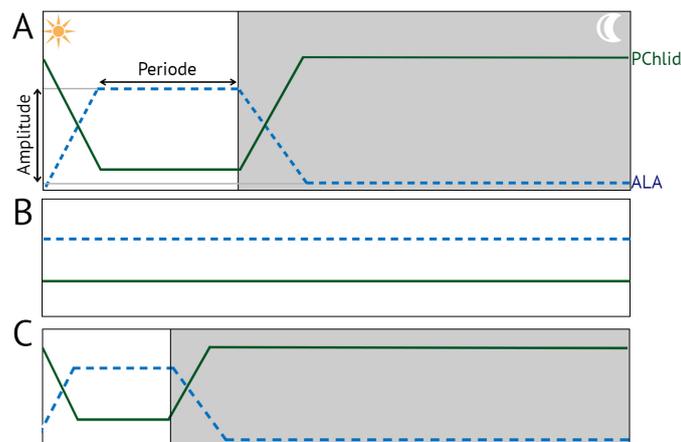


Abbildung 3.3. – Veränderung des ALA und PChlid Gehalts unter verschiedenen Lichtintensitäten. Die Veränderungen der ALA- und PChlid-Gehalte wurden schematisch für einen Standard-Kurztag (A), kontinuierliche Lichtbedingungen (B) sowie einen extremen Kurztag (C) dargestellt. Teile dieser Abbildung wurden gemäß der von A. Richter vorlegten Arbeit erstellt [311]. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Unter kontinuierlichen Lichtbedingungen kann davon ausgegangen werden, dass die Mengen an ALA und PChlid im Verlauf eines Tages weniger schwanken (Abb. 3.3B) und somit keine stetige Anpassung der ALA-Synthese an die Photoperiode erforderlich ist. In Übereinstimmung mit einer potenziellen Rolle von TPR1 in der photoperiodischen Anpassung der ALA-Synthese sind die Gehalte der meisten Intermediate und Proteine der TBS unter kontinuierlichen Lichtbedingungen in den *tpr1*-Linien kaum verändert (Abb. 2.46). In einem extremen Kurztag hingegen könnten die Mengen an ALA und PChlid im Verlauf eines Tages, aufgrund der reduzierten Photoperiode, stärker schwanken (Abb. 3.3C) und somit den Bedarf einer funktionalen Feedback-Regulation der ALA-Synthese erforderlich machen. In den *tpr1*-Linien könnte die verminderte Funktionalität der schnellen Inaktivierung durch FLU die Akkumulation der TBS-Intermediate unter extremen Kurztagbedingungen erklären (Abb. 2.47). Interessant war, dass in einem extremen Kurztag auch ein erhöhter Chlid-Gehalt in den *tpr1*-Linien nachgewiesen wurde (Abb. 2.47D), welcher zuvor unter keiner der untersuchten Bedingungen sichtbar war (Abb. 2.20D, 2.46D). Die Akkumulation von Chlid muss allerdings nicht unbedingt nur auf die Synthese durch die TBS zurückzuführen sein, da längere Dunkelphasen die Seneszenz induzieren und einen höheren Abbau von Chlorophyll zu Chlid hervorrufen könnten [91, 312]. Um diesem Model nachzugehen, sollten unter den oben genannten Lichtbedingungen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf des Tages im Wildtyp und den *tpr1*-Mutanten die *steady state* ALA- und PChlid-Gehalte überprüft

werden.

3.2.5. Die Funktion von TPR1 in etioliertem und deetiolierten Gewebe

Neben dem Einfluss von TPR1 auf die TBS in adultem Gewebe führte der Verlust von TPR1 zu einer verlangsamten Ergrünung von etioliertem Gewebe.

3.2.5.1. TPR1 beeinflusst die Ausbildung des oligomeren POR-NADPH-PChlid-Komplexes während der Etiolierung

Die Ausbildung des PLB hat verschiedene Funktionen im Etioplasten. Zum einen dient er der Speicherung von Lipiden und Proteinen zum anderen wird durch ihn die Bildung von ROS verhindert [224]. Ein Indikator für eine korrekte Ausbildung des PLB ist das Verhältnis von photoaktivem zu photoinaktivem PChlid [122, 218–220]. Verschiedene Autoren postulierten, dass sich in Etioplasten größere Oligomere des POR-PChlid-NADPH-Komplexes ausbilden, welche die effektive Umsetzung von PChlid unter Belichtung ermöglichen [217, 220]. Ausschließlich das in diesem Komplex gebundene PChlid wird als photoaktives PChlid bezeichnet [122, 218]. Photoinaktives PChlid entspricht dem ungebundenen Intermediat [122, 218]. Die Monomere des POR-PChlid-NADPH-Komplexes sind zwar ebenfalls in der Lage, PChlid in Chlid umzuwandeln, allerdings erst nach einer längeren Belichtungsphase, wodurch diese PChlid-Spezies nicht dem photoaktivem PChlid zugeordnet wird [122, 218].

In etiolierten *tpr1*-Keimlingen konnte ein geringerer Anteil von photoaktivem PChlid als im gleichbehandelten Wildtyp nachgewiesen werden, während der Gesamtgehalt von PChlid kaum verändert war (Abb. 2.32). Da angenommen wird, dass die Fluoreszenz von photoaktivem PChlid bei $\lambda_{nm} = 657$ nm ausschließlich durch die Oligomere des POR-PChlid-NADPH-Komplexes verursacht wird [122, 218], könnte TPR1 an der Ausbildung dieses Komplexes beteiligt sein. Die Ausbildung des oligomeren POR-PChlid-NADPH-Komplexes wird durch verschiedene Faktoren kontrolliert. Der POR-Gesamtproteingehalt ist beispielsweise entscheidender als das Verhältnis von PORA zu PORB [220, 221]. Ein reduzierter PORA/B-Gehalt konnte allerdings als Ursache für den geringeren Anteil an photoaktivem PChlid in der *tpr1*-Linie ausgeschlossen werden (Abb. 2.32E). Die *tpr1-3*-Linie wies zwar einen reduzierten PORA/B-Gehalt auf, die *tpr1-2* Linie allerdings nicht (Abb. 2.32E). Beide Linien zeigten jedoch eine vergleichbare Veränderung des PChlid-Verhältnisses (Abb. 2.32D). Ähnliches wurde zuvor für die *mgd1* microRNA Linie beschrieben, in welcher die MDGD Synthase 1 (MGD1) inaktiviert ist und infolgedessen die Synthese von MGDG inhibiert ist [223]. Während der POR-Gesamtproteingehalt in der *mgd1*-Linie wildtypartig war, konnte ein reduzierter Gehalt an photoaktivem PChlid nachgewiesen werden [223]. Neben POR wurde somit auch MGDG als eine wichtige Komponente für die Ausbildung des oligomeren POR-PChlid-NADPH-Komplexes vorgeschlagen [223]. TPR1 könnte ein weiterer essentieller Bestandteil für die Ausbildung der POR-PChlid-NADPH-Oligomere sein, diese Oligomere in den Etioplastenmembranen binden und dadurch stabilisieren.

3.2.5.2. Die fehlende Ausbildung des oligomeren POR-NADPH-PChlid-Komplexes führt zur Produktion von ROS während der Deetiolierung

Die Ausbildung des PLB im Etioplasten ist entscheidend für eine schnelle Ergrünung während der sich anschließenden Belichtung [122, 224]. Darüber hinaus ist die stöchiometrisch korrekte Assemblierung von kern- und plastidenkodierten Genen sowie Chlorophyllen und Carotinoiden während der Deetiolierung essentiell, um oxidativen Stress zu vermeiden [224, 313]. Als ein Mechanismus zur Vermeidung von oxidativem Stress wurde die Ausbildung des POR-Chlid-NADPH-Quencher-Komplexes beschrieben [224, 314]. Dieser von Schoefs *et al.* vorgeschlagene Quencher-Komplex kann aus photoaktivem PChlid gebildet werden und soll das photolabile Chlid vor Photooxidation schützen [224, 314]. In Übereinstimmung damit führte der reduzierte Gehalt an photoaktivem PChlid in den *tpr1*-Mutanten zu einem erhöhten Gehalt von ROS während der Deetiolierung (Abb. 2.35, 2.36). Somit wurde geschlossen, dass TPR1 POR während der Etiolierung an den plastidären Membranen stabilisiert und darüber hinaus während der Deetiolierung die Ausbildung des POR-Chlid-NADPH-Quencher-Komplexes unterstützt (Abb. 3.4A). Ein Defizit von TPR1 könnte somit diesen POR-Chlid-NADPH-Quencher-Komplex destabilisieren und so die Bildung von ROS hervorrufen (Abb. 3.4B).

Neben dem Einfluss auf die Produktion von ROS wurde ein Zusammenhang zwischen der fehlenden Ausbildung des Quencher-Komplexes und einer verzögerten Ergrünung postuliert [122]. Dieser Hypothese entsprechend wurde in den *tpr1*-Linien eine reduzierte Ergrünungsrate nach sechstägiger Etiolierung detektiert (Abb. 2.33B).

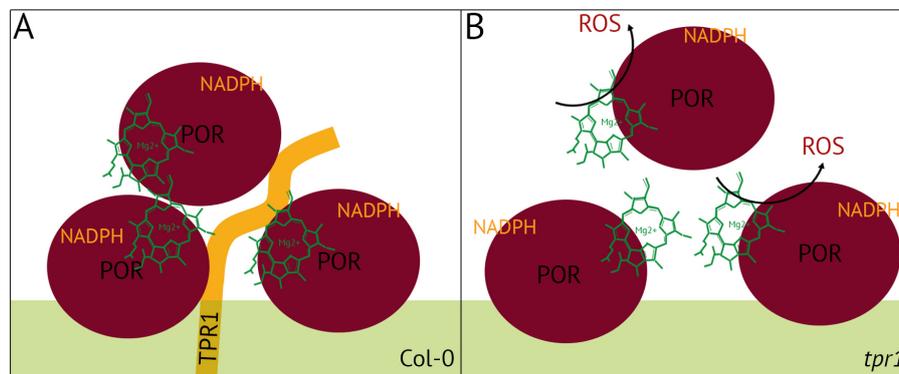


Abbildung 3.4. – Vorgeschlagene Funktionsweise von TPR1 in (de)etioliertem Gewebe. (A) Im Wildtyp kann TPR1 sowohl während der Etiolierung als auch Deetiolierung POR an den plastidären Membranen binden und stabilisieren. Während der Etiolierung könnte dadurch die Ausbildung des oligomeren POR-PChlid-NADPHs gefördert und so oxidativer Stress während der Deetiolierung vermieden werden. (B) Durch den Verlust von TPR1 könnte die Ausbildung des oligomeren POR-PChlid-NADPH-Komplexes während der Etiolierung beeinträchtigt sein. Infolge dessen würde es bei der anschließenden Deetiolierung zur Produktion von ROS kommen.

Neben dem POR-PChlid-NADPH-Komplex spielen auch verschiedene Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Deetiolierung. Beispielsweise verursachte eine Inhibierung der lichtinduzierten Signaltransduktion in *pif-*, *far1-* und *fhy3-*Mutanten eine deutlich reduzierte Ergrünungsrate [25, 127]. In den genannten Mutanten ist unter anderem die Induktion der Genexpression verschiedener TBS-Gene inhibiert [25, 127]. Da allerdings in den *tpr1*-Linien eine zum Wildtyp vergleichbare Induktion der TBS-Genexpression unter Belichtung nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.34B), kann eine Modifikation der Genexpression als Ursache der verzögerten Ergrünung ausgeschlossen werden.

3.2.5.3. Der Verlust von FLU oder TPR1 verursacht die Bildung von unterschiedlichen ROS während der Deetiolierung

In der *flu*-Linie verursacht die fehlende Inhibierung der ALA-Synthese während der Etiolierung die Anreicherung von PChlid, was unter Belichtung zur Produktion von Singulett-Sauerstoff führt (Abb. 2.35) [140, 145]. Die massive Akkumulation dieser ROS löst daraufhin den programmierten Zelltod in *flu*-Keimlingen aus [140, 145]. Sowohl der Verlust von PORB als auch TPR1 führte während der Etiolierung ebenfalls zur Produktion von Singulett-Sauerstoff (Abb. 2.35), woraus geschlossen werden kann, dass sowohl die Akkumulation von PChlid als auch eine gestörte Ausbildung von photoaktivem PChlid zur Produktion von Singulett-Sauerstoff führt.

Im Kontrast zu den *flu*- und *porb-2*-Mutanten akkumulierte in den *tpr1*-Linien darüber hinaus eine große Menge an Superoxidanionen (Abb. 2.36). Dementsprechend könnte der Verlust von TPR1 spezifisch die Akkumulation von Superoxidanionen verursachen, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen TPR1 und einer gestörten Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten des PSI hindeuten kann, da die Hauptquelle für Superoxidanionen in Chloroplasten PSI ist [253, 254]. Da PSI allerdings erst in den späteren Ergrünungsphasen vollständig assembliert vorliegt [227], könnte vermutet werden, dass auch einzelne Untereinheiten des PSI für die Produktion von Superoxidanionen verantwortlich sein könnten. Dementsprechend könnte TPR1 ebenfalls eine Funktion bei der Assemblierung von PSI ausüben oder vergleichbar zu Pitt die Integration von Chlorophyllen in die naszierenden photosynthetischen Untereinheiten begünstigen. Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte zu verschiedenen Zeitpunkten der Deetiolierung die Abundanz der einzelnen photosynthetischen Komplexe in den *tpr1*-Mutanten und dem Wildtyp untersucht werden.

3.2.5.4. Die Produktion von ROS ist in der *tpr1*-Mutante abhängig von der Lichtintensität

Die Deregulation der TBS führt vor allem unter erhöhten Lichtintensitäten vermehrt zur Produktion von ROS [315]. Mutanten mit gestörter TBS können dementsprechend lichtsensitiv und nur bei geringen Lichtintensitäten überlebensfähig sein. Beispielsweise sinkt in der *gun4-1* Mutante, welche nur über eine verkürzte Form von GUN4 verfügt, der Chlorophyllgehalt mit steigender Lichtintensität [67]. Nach Anzucht der *gun4-1*-Mutante in Schwachlicht (40 μ E) war der Chlorophyllgehalt hingegen wildtypartig [67]. In den *tpr1*-Linien konnte die reduzierte Ergrünungsrate allerdings nicht durch die Anzucht bei geringerer Lichtintensität erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war bei niedrigeren Lichtintensitäten der Gehalt an Superoxidanionen in den *tpr1*-Linien sogar höher als unter erhöhten Lichtintensitäten (Abb. 2.39). Dies könnte durch die Wechselwirkungen zwischen TPR1 und den verschiedenen POR-Isoformen, die in Abhängigkeit der Lichtintensität unterschiedlich akkumulieren, erklärt werden [110, 111]. Während PORC vor allem unter hohen Lichtintensitäten agiert, ist PORB bei niedrigeren Lichtintensitäten entscheidend [110, 111, 114, 224]. Bei moderaten Lichtintensitäten haben PORB und PORC hingegen eine redundante Funktionalität [114]. Da die *tpr1*-Linien mehr ROS unter niedrigeren Lichtbedingungen anreichte als unter erhöhten Lichtintensitäten (Abb. 2.39), könnte somit ein Hinweis auf einen unterschiedlichen Einfluss des Verlustes von TPR1 auf diese beiden POR-Isoformen sein, obwohl TPR1 potenziell mit beiden Isoformen interagieren kann (Abb. 2.1, 2.3).

Die Anzucht der *porb-2*-Linie im Schwachlicht führte allerdings zu keiner zu *tpr1*-vergleichbaren Anreicherung von Superoxidanionen (Abb. 2.39). Dementsprechend kann die Anreicherung dieser ROS während der Deetiolerung nicht ausschließlich auf die fehlende Interaktion zwischen TPR1 und PORB zurückgeführt werden. Es wird vorgeschlagen, dass TPR1, abseits der Interaktion zu PORB, während der Deetiolerung eine weitere Funktion im Zusammenhang mit der korrekten Ausbildung der Thylakoidmembran und /oder die Assemblierung der Photosysteme erfüllt. Durch den Verlust von TPR1 könnte diese Assemblierung gestört sein, was einen ineffizienten Elektronenfluss und die Produktion von Superoxidanionen auslösen könnte.

3.2.6. TPR1 im Zusammenhang mit der Anreicherung von ROS in adultem Gewebe

Vergleichbar zu deetiolierten Keimlingen verursachte das Fehlen von TPR1 auch in adultem Gewebe eine starke Anreicherung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (Abb. 2.30A). Dabei bestand ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Superoxidanionen und dem TPR1-Gehalt (Abb. 2.30A, 2.63). Darüber hinaus war der Transkriptgehalt von Singulett-Sauerstoff-Markergenen in den *tpr1*-Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.30B). Somit ist davon auszugehen, dass sich sowohl Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid als auch Singulett-Sauerstoff in adultem Gewebe der *tpr1*-Linie anreichert. Während Singulett-Sauerstoff vorrangig durch PSII und die Akkumulation von TBS-Intermediaten hervorgerufen wird [140, 257, 260], ist die Hauptquelle von Superoxidanionen dysfunktionales PSI [253, 254]. Allerdings konnte unter Standard-Kurztagbedingungen keine Beeinträchtigung der photosynthetischen Komplexe durch den Verlust von TPR1 nachgewiesen werden (Tab. 2.3, Abb. 2.18A, C). Lediglich der LHCA1-Gehalt war im Bereich der niedermolekularen Komplexe, welche LHCA1 enthalten, durch das Fehlen von TPR1 beeinträchtigt (Abb. 2.41B). Eine gestörte Assemblierung der PSI Antennen könnte die photosynthetische Elektronentransportkette verändern und so die Produktion von Superoxidanionen auslösen. Allerdings wird die Stabilität von LHCA1 durch ROS negativ beeinflusst [316], sodass der reduzierte LHCA1-Gehalt auch eine Folge der Anreicherung von Superoxidanionen sein kann und nicht deren Ursache. Dabei könnten die Messung der PSI-Aktivität sowie die Analyse der PSI-Photoinhibierung nach Lima-Melo *et al.* [286] in den *tpr1*-Mutanten Aufschluss über den Zusammenhang zwischen TPR1 und PSI geben.

Eine Ursache für die Produktion von Singulett-Sauerstoff ist die Akkumulation von TBS-Intermediaten, wie beispielsweise in der *flu*-Mutante [140, 317]. In den *tpr1*-Linien hingegen akkumulierte keines der TBS-Intermediate deutlich stärker als im Wildtyp (Abb. 2.20), sodass dies als Auslöser für die Anreicherung von Singulett-Sauerstoff ausgeschlossen werden kann. Es gilt dabei jedoch zu bedenken, dass auch eine Anreicherung von ungebundenen TBS-Intermediaten ROS auslösen kann [97, 318], ohne dass die nachgewiesenen TBS-Intermediatgehalte im Vergleich zum Wildtyp erhöht sein müssen. Eine fehlende Interaktion zwischen TPR1 und POR könnte dafür sorgen, dass POR PChlid weniger gut vor Licht abschirmen kann oder weniger stark bindet, wodurch die Produktion von ROS verursacht werden könnte.

Eine weitere mögliche Ursache für die Anreicherung von ROS ist die Autooxidation von ALA. Bei der Anreicherung von ALA in humanem Gewebe kommt es durch Sauerstoff zur Oxidation von ALA und infolge dessen zur Produktion von Superoxidanionen und einem kohlenstoffzentrierten

ALA-Radikal [319]. Dieses ALA-Radikal kann daraufhin erneut mit Sauerstoff reagieren und Superoxidanionen produzieren [319]. Dieser Mechanismus wurde bisher lediglich in tierischen Zellen beschreiben, sodass unklar ist, ob eine ähnliche Reaktion auch in pflanzlichem Gewebe stattfinden kann [319]. Allerdings wurde vermutet, dass die Autooxidation von ALA eine Ursache für die Produktion von ROS in einer *alad*-Mutante in *Gossypium hirsutum* sein könnte [320]. Die Autooxidation von ALA könnte darüber hinaus eine Erklärung dafür liefern, warum in den *tpr1*-Linien zwar eine drastisch erhöhte ALA-Synthesekapazität nachgewiesen werden konnte (Abb. ??B), der *steady state* ALA-Gehalt allerdings wildtypartig war (Abb. 2.21C). Die Autooxidation von ALA und damit verbundene Umwandlung von ALA in die Imino-Form [319] könnte einerseits den Abbau von ALA verursachen oder andererseits einen Nachweis über die hier verwendete Methode zu Bestimmung des ALA-Gehaltes verhindern.

Im Zusammenhang mit der erhöhten ALA-Syntheserate sollte ebenfalls erwähnt werden, dass eine Anreicherung von ALA die pflanzliche Immunantwort auslösen und so einen selbstverstärkenden Feedbackmechanismus verursacht kann, welcher die Akkumulation von ROS weiter verstärkt [320]. Ähnliches wurde für die *amiRNA-HEMB1*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* beschrieben, in welcher die Inhibierung von ALAD zu einer Anreicherung von ALA führt [321]. Der erhöhte ALA-Gehalt wird dabei als Ursache für die Induktion der Salicylat-Biosynthese und Genexpression verschiedener Proteine der pflanzlichen Immunantwort vermutet [321]. Eine Reaktion der pflanzlichen Immunantwort ist die Anreicherung von ROS [283], die auch in der *amiRNA-HEMB1*-Mutante nachweisbar war [321]. Allerdings konnte in den *tpr1*-Linien keine deutlich induzierte Genexpression der untersuchten Transkripte der Salicylat-Biosynthese nachgewiesen werden (Anhang .9). Darüber hinaus vermuteten Apel *et al.*, dass die pflanzliche Immunantwort im Allgemeinen mit einer Repression der ROS-Markergenen verbunden ist, während abiotischer Stress vorrangig die Expression der ROS-Markergene induziert [318]. Da in den *tpr1*-Linien die Genexpression verschiedener Markergene induziert ist (Abb. 2.30B) und kein erhöhter ALA-Gehalt *in planta* nachgewiesen werden konnte (Abb. 2.21C), kann davon ausgegangen werden, dass der erhöhte ROS-Gehalt nicht in Verbindung mit der pflanzlichen Immunantwort steht, sondern anderweitig verursacht wurde.

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass nicht genau bestimmt werden konnte, was der initiale Auslöser für die Akkumulation von Superoxidanionen in den *tpr1*-Linien ist. Am wahrscheinlichsten ist hierbei jedoch ein Zusammenspiel aus der veränderten subzelluläre Lokalisation von TBS-Enzymen und einem Einfluss auf PSI.

3.2.7. Der Einfluss von TPR1 auf die plastidären Membranen

3.2.7.1. Der Verlust von TPR1 führt zur Ausbildung von stromalen Vesikelclustern

Bei der Untersuchung der Thylakoidmembranen mittels TEM fiel auf, dass in der *tpr1-3*-Linie vesikelartige Strukturen mit erhöhter Häufigkeit im Vergleich zum Wildtyp auftraten (Abb. 2.26, Tab. 2.4). Diese Strukturen lagerten sich in der untersuchten *tpr1-3*-Mutante in einigen Fällen zu größeren Clustern zusammen, die stets im Stroma zwischen der Hüllmembran und den Thylakoidmembranen lagen (Abb. 2.26, Tab. 2.4). Da der Verlust von TPR1 eine verlangsamte Deetiolerung auslöste, war zunächst unklar, ob es sich bei diesen Strukturen möglicherweise um Überreste des PLB handeln könnte. In jungem Pflanzengewebe bildet sich der PLB nicht

nur während der Etiolierung aus, sondern auch in Nachtphasen [224]. Der äußere Durchmesser eines einzelnen Tubulus des PLB beträgt 14 - 31 nm [322, 323] und liegt damit deutlich unter dem Durchmesser der in der *tpr1-3*-Mutante sichtbaren Strukturen (Tab. 2.4). Ebenso konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Clustern um das periphere Retikulum handelt. Das periphere Retikulum bezeichnet dabei eine membranöse, tubuläre Struktur in der Peripherie des Chloroplasten [324], die sich beispielsweise in *A. thaliana* Mutanten anhäuft, in welchen sehr wenig Ascorbinsäure vorliegt [325]. Allerdings ist der Durchmesser der Tubuli des periphere Retikulums mit 20 - 40 nm ebenfalls kleiner als der in dieser Arbeit untersuchten Strukturen (Tab. 2.4) [281, 325, 326].

Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich somit bei den in der *tpr1-3*-Linie beobachteten Strukturen um eine Anhäufung von stromalen Vesikeln, die mit einem Durchmesser von ca. 50 nm anderen Vesikeln entsprechen (Tab. 2.4) [281]. Der ermittelte Durchmesser der im Wildtyp detektierten Vesikel lag mit 63 nm etwas über diesem Wert, da in den Wildtyp-Chloroplasten nur wenige, qualitativ schlecht aufgelöste Vesikel zu finden waren.

3.2.7.2. TPR1 hat einen Einfluss auf den Lipidumsatz im Plastiden

Verschiedene Ursachen für das Auftreten von stromalen Vesikelclustern in Arabidopsis wurden durch Lindquist *et al.* beschrieben [281]. Zu diesen Ursachen zählen unter anderem eine gestörte Vesikelfusion und erhöhter oxidativer Stress [281]. Auch ein Ungleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von Lipiden kommt als mögliche Ursache in Frage [327]. Die Transkriptgehalte von Proteinen des Vesikel-Transports waren in der *tpr1*-Mutante allerdings wildtypartig (Abb. 2.29), sodass eine inhibierte Fusion von stromalen Vesikeln mit der Hüllmembran oder den Thylakoidmembranen als Ursache der Vesikelcluster höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden kann.

Die Synthese der plastidären Lipide MGDG und DGDG, welche ausschließlich in Plastiden vorliegen [328], findet sowohl an der inneren als auch äußeren Hüllmembran statt [329]. Bislang konnte nicht vollständig geklärt werden, wie der Transport der Lipide von der Hüllmembran hin zu den hochdynamischen Thylakoidmembranen sichergestellt wird. Einer der möglichen Transportwege ist der Vesikel-vermittelte Transport [328]. In adultem Gewebe der *tpr1-3*-Linie waren einige Transkripte der Lipidsynthese im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.27), sodass die erhöhte Anzahl von Vesikeln auf einen erhöhten Umsatz der Lipide an der Thylakoidmembran zurückzuführen sein könnte. Dafür würde außerdem die exklusive Lage der Vesikelcluster im Stroma zwischen der Hüllmembran und den Thylakoidmembranen sprechen (Abb. 2.26). Auffällig war, dass vor allem die Transkriptgehalte von *MGD2/3* und *DGD1/2* erhöht waren (Abb. 2.27B, C), die für die MGDG-Synthasen 2/ 3 sowie die DGDG-Synthasen 1/ 2 kodieren [279]. Sowohl *MGD2/3* als auch *DGD1/2* sind ausschließlich in der äußeren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert und für die Synthese von DGDG verantwortlich [279, 329]. Die erhöhten Transkriptgehalte dieser Enzyme in der *tpr1-3*-Mutante könnten somit ein Indiz für ein verschobenes Lipid-Verhältnis sein.

DGDG ist vor allem für die Ausbildung der Lipid-Doppelschichten zuständig und spielt darüber hinaus eine essentielle Rolle für den effektiven Elektronenfluss und die Stabilität von PSI und PSII [278, 330]. Zudem sind innerhalb des PSII-Komplexes mehrere DGDG-Moleküle im inneren

Kernkomplex um D1 und D2 zu finden [331]. Eine veränderte Lipid-Zusammensetzung der Thylakoidmembranen in der *tpr1-3*-Mutante könnte die reduzierte Stabilität der PSII-LHCII-Superkomplexe nach 90 min in dunkelrotem Licht verursachen (Abb. 2.55A). Die Analyse der Lipid-Gehalte mittels Massenspektrometrie wäre somit ein guter Ansatz, um zu klären, ob in den *tpr1*-Linien das Verhältnis von MGDG zu DGDG tatsächlich verändert ist.

Neben der erhöhten Genexpression von Enzymen der Lipidsynthese konnte auch ein erhöhter Transkriptgehalt verschiedener Gene des Fettsäureabbaus in der *tpr1-3*-Linie nachgewiesen werden (Abb. 2.28B). Dies spricht ebenfalls für einen erhöhten Umsatz von Lipiden in der *tpr1-3*-Linie. Demzufolge könnte der damit verbundene erhöhte Transport von Lipiden zwischen der Hüllmembran und den Thylakoidmembran und *vice versa* eine Ursache für die erhöhte Anzahl an stromalen Vesikelclustern in der *tpr1-3*-Linie sein. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass eine Veränderung des Lipidumsatzes auch die Deetiolerung beeinflussen und ein Faktor bei der verzögerten Ergrünung der *tpr1*-Linien sein kann [227, 332].

3.2.7.3. Der Zusammenhang zwischen Lipid-Umsatz und ROS

Im Zusammenhang mit dem potenziell erhöhten Umsatz von Lipiden in der *tpr1-3*-Linie gilt zu bedenken, dass Lipide Ziele von ROS, vor allem Singulett-Sauerstoff, sind [256, 333]. Dabei führt die Peroxidation von Lipiden durch ROS zu Kettenbrüchen der ungesättigten Bindungen [256]. Ein erhöhter Gehalt an peroxidierten Lipiden verändert dabei nicht nur die Integrität der plastidären Membranen, sondern erhöht auch die Membranfluidität und Permeabilität [225, 256, 260] und kommt somit ebenfalls als eine Ursache für den potenziell erhöhten Umsatz von Lipiden und die Ausbildung der Vesikelcluster in der *tpr1-3*-Linie in Frage.

Darüber hinaus bewirkt die Lipidperoxidation die nicht-enzymatische Produktion von Oxylipinen [334]. Der erhöhte Transkriptgehalt von AOS und AOC, zwei Enzymen der Oxylipinsynthese, in der *tpr1-3*-Linie (Abb. 2.28B) könnte somit durch eine erhöhte Lipidperoxidation, infolge der Akkumulation von ROS, ausgelöst werden [335]. Ein erhöhter Gehalt an Oxylipinen wie Oxophytodiensäure könnte wiederum zu einem erhöhten Jasmonatgehalt führen und infolge dessen die Singulett-Sauerstoff vermittelte Stressantwort auslösen [336]. Eine solche Reaktion wurde beispielsweise in der dunkelinkubierten *flu*-Mutante beschrieben [336].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust von TPR1 die Transkriptgehalte verschiedener Enzyme der Lipidsynthese sowie des Lipidabbaus verändert, was einen Einfluss auf die Zusammensetzung und den Umsatz der Lipide in den Thylakoidmembranen haben kann und somit auch in Verbindung mit der Ausbildung von stromalen Vesikeln steht. Unklar ist jedoch, ob der veränderte Umsatz von Lipiden durch den erhöhten ROS-Gehalt ausgelöst wurde oder *vice versa*, da in dieser Arbeit nicht genau geklärt werden konnte, was der primäre und sekundäre Effekt des TPR1-Verlustes war.

3.2.8. Das Fehlen von TPR1 erhöht die Sensitivität gegenüber ALA

In den Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich stets ein Zusammenhang zwischen TPR1 und der Regulation der ALA-Synthese. Um den Einfluss von TPR1 auf den Chlorophyllzweig genauer untersuchen zu können, wurden durch exogene Zugabe von ALA im Licht die regulatorischen Mechanismen der ALA-Synthese umgangen. Dabei zeigte sich, dass der Verlust von TPR1 bei erhöhten ALA-Konzentrationen (400 μM ALA) im Licht eine Reduktion der Gehalte aller TBS-Intermediate und -Endprodukte sowie einiger TBS-Proteine hervorrief (Abb. 2.49, 2.50, 2.51). Vor allem CHLM und PORB waren von der Reduktion der TBS-Proteingehalte betroffen (Abb. 2.51).

Die exogene Zugabe von ALA in Dunkelheit führte im Wildtyp stets zur Akkumulation der TBS-Intermediate [100, 138, 146], während dies nach der Inkubation im Licht nicht für alle Intermediate nachzuweisen war (Abb. 2.50). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass die TBS durch ein Überangebot von ALA im Licht anders reguliert wird als in Dunkelheit. Czarnecki *et al.* publizierten einen PChlid-Gehalt von 0,62 pmol/mg Frischgewicht (620 pmol/g) für Wildtyp-Keimlinge, welche bei 10 μE und 250 μM ALA angezogenen wurden [149]. Dieser Wert hatte somit in etwa die selbe Größenordnung wie die in dieser Arbeit bestimmten PChlid-Gehalte im Wildtyp nach ALA-Fütterung im Licht (Abb. 2.50C). Darüber hinaus ist nicht genau bekannt, wie viel ALA tatsächlich über die Wurzeln von Keimlingen aufgenommen und in die Blätter transportiert wird. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ALA-Sensitivität der *tpr1*-Linien durch eine veränderte Aufnahme und/oder einen veränderten Transport von ALA verursacht wurde.

Interessant war, dass ein Überangebot von ALA im Medium den Gehalt von ALAD in den *tpr1*-Linien deutlich im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp erhöhte (Abb. 2.51). Da ALA durch ALAD zu PGB umgewandelt wird [23], kann davon ausgegangen werden, dass in den *tpr1*-Linien ein erhöhter Umsatz von ALA im Vergleich zum Wildtyp stattfand. Dieser erhöhte Umsatz von ALA führte jedoch nicht zu erhöhten Gehalten von anderen TBS-Intermediaten oder -Endprodukten (Abb. 2.49, 2.50). Mehrere mögliche Ursachen kommen für die reduzierten *steady state* Gehalte der TBS-Intermediate und einzelner Enzyme in Frage: Zum einen zeigten Czarnecki *et al.*, dass die exogene Zugabe von ALA die Expression verschiedener kernkodierter Gene, vor allem von verschiedenen PhANGs, beeinflusste [337, 338]. Eine Möglichkeit wäre folglich, dass in den *tpr1*-Linien der retrograde Signalweg beeinträchtigt ist und dadurch reduzierte Gehalte einiger TBS-Enzyme verursacht wurden, was wiederum den Metabolitfluss und die Gehalte der TBS-Intermediate stört. Die genauen Komponenten, welche diesen retrograden Signalweg als Reaktion auf eine deregulierte TBS vermitteln, sind trotz jahrelanger Forschung weiterhin unbekannt [65, 310, 337]. Ein Zusammenhang zur Akkumulation von ROS scheint hierbei allerdings möglich [65, 310, 337].

Zum anderen könnte die Bindung und Stabilisierung von POR durch TPR1 an den Thylakoidmembranen entscheidend für einen effizienten Intermediatfluss bei einem erhöhten Umsatz der TBS sein. Im Falle einer Destabilisierung, die durch das Fehlen von TPR1 hervorgerufen wurde, würde dies zur Entstehung von ROS führen. Darüber hinaus kann ein gestörter Feedback-Mechanismus, als Reaktion auf das Überangebot von ALA, die reduzierten *steady state* Inter-

mediatgehalte der *tpr1*-Linien hervorrufen. Denkbar ist, dass der durch den Verlust von TPR1 aufgelöste reduzierte FLU-Gehalt bei moderat erhöhten ALA-Gehalten im Medium eine stärkere Beeinträchtigung der TBS als im gleichbehandelten Wildtyp verursachte (Abb. 2.51). Jedoch spielt der FLU-vermittelte Feedback-Mechanismus unter kontinuierlichen Lichtbedingungen nur eine untergeordnete Rolle [140, 145, 147].

Da die *tpr1*-Linien als Reaktion auf das Überangebot von ALA vor allem deutlich mehr Superoxid-anionen und Singulett-Sauerstoff akkumulieren als der gleichbehandelte Wildtyp (Abb. 2.52, 2.53), scheint eine Rolle von ROS bei der Deregulation der TBS durch exogene Zugabe von ALA denkbar. Infolge des erhöhten ROS-Gehaltes der *tpr1*-Linien könnten die Enzyme der TBS destabilisiert und/oder die Genexpression von verschiedenen kernkodierten TBS-Genen dereguliert werden [338]. Unbekannt war an dieser Stelle nur, warum durch den Verlust von TPR1 bei Zugabe von ALA mehr ROS akkumulierte als im Wildtyp.

3.2.9. Die Auswirkungen von dunkelrotem Licht auf die *tpr1*-Linien

Die Bestrahlung mit dunkelrotem Licht führt in Pflanzen zu verschiedenen Auswirkungen auf die photosynthetischen Untereinheiten und die TBS. Da die im PSI-Kernkomplex gebundenen Chlorophyll a Moleküle vor allem Licht im dunkelroten Spektralbereich (700 nm) absorbieren, führt die Inkubation in dunkelrotem Licht zu einer stärkeren Beanspruchung von PSI im Vergleich zu Weißlicht. Die Inkubation von *tpr1*-Linien für 90 min in dunkelrotem Licht führte anders als die Anzucht in Weißlicht zu einer reduzierten Chlorophyllfluoreszenz des PSI (Vergleich Abb. 2.18C und 2.54A). Der Verlust von TPR1 führte darüber hinaus nach 90 min in dunkelrotem Licht zu einem reduzierten Gehalt des PSI-Monomers im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.55A). Unter Bedingungen, in denen PSI stark beansprucht wird, kann es bei einer gestörten Assemblierung oder Stabilisierung von PSI zur Photoinhibition des Photosystems kommen, welche mit einer Reduktion der Chlorophyllfluoreszenz verbunden ist [286, 316]. Die Stabilität der PSI-Untereinheiten wird vor allem durch Akkumulation von ROS beeinflusst. Während Singulett-Sauerstoff den Abbau von Chlorophyllen der Antennenkomplexe auslöst [339], führen Superoxidanionen zur Schädigung der Eisen-Schwefel-Cluster [286]. Da das Fehlen von TPR1 die Akkumulation von sowohl Singulett-Sauerstoff als auch Superoxidanionen hervorruft, könnten diese ROS in dunkelrotem Licht zu einer schnelleren Schädigung des PSI im Vergleich zum Wildtyp und damit zur Photoinhibition des PSI führen.

Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen PSI-LHCI und dem Gehalt an TPR1 ist die Co-Lokalisation von TPR1 und LHCA1 in BN-Gradientengelen (Abb. 2.41A) und im Saccharosegradienten (Abb. 2.40D). Möglich ist, dass TPR1 auch LHCA1 binden und stabilisieren könnte. Da die Co-Lokalisation von TPR1 und LHCA1 eher ein indirekter Hinweis auf eine Interaktion ist, sollte durch Split-Ubiquitin und BiFC-Analysen überprüft werden, ob TPR1 und LHCA1 direkt miteinander interagieren können. Um die genaue Funktionalität von TPR1 im Bezug auf PSI genauer zu prüfen, könnte die PSI-Photoinhibition in den *tpr1*-Mutanten nach Lima-Melo *et al.* untersucht werden [286].

3.2.10. TPR1 -Zusammenfassung und Ausblick

Aufgrund der degenerierten Eigenschaften des TPR-Motivs war die Identifikation eines potenziellen Pitt-Homolog in Arabidopsis eine anspruchsvolle Aufgabe. Von den vier selektierten POR-interagierenden TPR-Proteinen mit hoher Sequenzähnlichkeit zu Pitt handelt es sich bei TPR1 mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Pitt-Homolog in Arabidopsis, vor allem wegen der zu Pitt vergleichbaren Transmembrandomäne und Organisation der einzelnen Domänen und Motive. Analog zu Pitt interagiert TPR1 mit PORB und stabilisiert so das Enzym an den Thylakoidmembranen. Die Stabilisierung von POR durch TPR1 ist essentiell bei der Vermeidung von oxidativem Stress als Folge einer ineffizienten TBS unter Bedingungen mit hoher *de novo* Synthese von Chlorophyll wie beispielsweise während der Deetiolierung. Zusätzlich zu POR beeinflusst TPR1 auch die subzelluläre Lokalisation von GluTR und CHL27, welche ebenso wie POR Komponenten des FLU-Inaktivierungskomplexes sind. Dabei konnte TPR1 eine Rolle bei der Regulation der schnellen und effektiven Inaktivierung der TBS zugesprochen werden. Im Zusammenhang mit der veränderten subzellulären Lokalisation der verschiedenen TBS-Enzyme sowie dem erhöhten oxidativen Stress steht ein erhöhter Umsatz von plastidären Lipiden.

Im Kontext mit dem Einfluss von TPR1 auf die Deetiolierung wäre vor allem zu prüfen, wie sich die verzögerte Produktion von Chlorophyll auf die Assemblierung der photosynthetischen Untereinheiten auswirkt und inwiefern die beiden Photosysteme davon betroffen sind. Dieser Ansatz könnte zeigen, ob TPR1 wie Pitt die Integration der Chlorophylle mit der TBS koordiniert. Darüber hinaus könnte durch Analyse der Photoinhibition von PSI sowie durch Nutzung verschiedener Inhibitoren der genaue Stimulus für die Anreicherung von Superoxidanionen näher eingegrenzt werden. Wichtige zu untersuchende Teilaspekte der PSI-Inhibierung, welche geprüft werden sollten, wären die Ausbildung von stromalen Vesikeln und die Veränderung der Lipidsynthese. Die weitere Analyse der *TPR1*-Überexpressionslinien sowie die Erzeugung von *tpr1 x flu* Doppelmutanten wäre ebenfalls hilfreich, um die Funktion von TPR1 im Zusammenhang zur TBS und dem Gehalt von ROS näher zu erörtern. Unabhängig davon ist die Erzeugung von TPR1-Deletionsmutanten ein aussichtsreiches Vorgehen, um die Funktionalität und Spezifität der einzelnen TPR-Motive genauer zu beleuchten. Zuletzt sollte auch die Ursache der zwei identifizierten TPR1-Formen näher charakterisiert werden. Hierbei sollte vor allem die Möglichkeit der PTM durch Phosphorylierung mittels Kinaseassays überprüft werden.

3.3. SG1 - ein Faktor der plastidären Nukleide

3.3.1. Die Rolle von SG1 für die Verbindung zwischen der TBS und den plastidären Nukleiden

SLOW GREEN 1 (SG1) ist ein kernkodiertes, plastidär lokalisiertes TPR-Protein mit einer hohen Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit zu Pitt (Tab. 2.1). Darüber hinaus ist SG1 wie Pitt in der Lage, mit POR zu interagieren (siehe Abschnitt 2.1.2). Hu *et al.* beschrieben für SG1 bereits eine Funktion in der Regulation der RNA-Polymerasen sowie im retrograden Signalweg [212]. Die Chloroplasten der durch EMS erzeugten *sg1*-Punktmutante waren in ihrer Entwicklung stark beeinträchtigt, was in einer verzögerten Ergrünung aller Blätter und einer drastischen Reduktion des Chlorophyllgehalts im Vergleich zum Wildtyp resultierte [212]. Diese gestörte Blattpigmentierung konnte nicht für die hier charakterisierte *sg1-2* T-DNA-Insertionslinie bestätigt werden (Abb. 2.68D). Die *sg1-2*-Linie wies unter Standard-Kurztagbedingungen eine wildtypartige Pigmentierung und Blattentwicklung auf (Abb. 2.68D).

Jedoch unterschied sich die *sg1-2*-Mutante vom korrespondierenden Wildtyp durch eine drastisch erhöhte ALA-Synthesekapazität (Abb. 2.69G) und eine erhöhte Abundanz von ALAD und Proteinen der ALA-Synthese (Abb. 2.70A, B). Darüber hinaus wiesen auch die späten Intermediate des Chlorophyllzweiges einen leicht erhöhten *steady state* Gehalt gegenüber der Wildtypkontrolle auf (Abb. 2.69C, D). Die erhöhte ALA-Syntheserate konnte somit teilweise durch einen erhöhten Anteil von löslicher, aktiver GluTR1 in der *sg1-2*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erklärt werden (Abb. 2.70B). Der FLU-Gehalt der *sg1-2*-Mutante war hingegen wildtypartig (Abb. 2.70B) und Hinweise auf eine posttranslationale Aktivierung von FLU, welche durch die Inhibierung von SG1 beeinträchtigt sein können, sind nicht bekannt (Abb. 2.70B), wodurch eine fehlende Feedback-Inhibierung durch FLU als zusätzliche Ursache der erhöhten ALA-Synthesekapazität ausgeschlossen werden konnte. Die um das Achtfache gesteigerte ALA-Synthesekapazität führte lediglich zu einem um 20 % erhöhten *steady state* ALA-Gehalt in der *sg1-2*-Linie (Abb. 2.69H). Denkbar wäre hierbei, dass die erhöhte ALA-Synthesekapazität eine Kompensation für eine ansonsten sichtbare Störung der Pigmentierung der *sg1-2*-Linie ist. Dabei könnte durch einen erhöhten Metabolitfluss, sichtbar an den leicht erhöhten *steady state*-Gehalten einzelner TBS-Intermediate (Abb. 2.69C, D), ALA direkt umgesetzt werden und somit nicht akkumulieren. Darüber hinaus weist auch der erhöhte ALAD-Gehalt (Abb. 2.70A) auf einen möglichen erhöhten Umsatz von ALA zu PGB hin. Allerdings würde auch dies eine so drastisch erhöhte ALA-Synthesekapazität nicht vollständig erklären. Um zu überprüfen, ob es durch die Inaktivierung von SG1 zu einem erhöhten Intermediatfluss kommt, sollten die Aktivitäten verschiedener TBS-Enzyme in der *sg1-2*-Mutante untersucht werden. Eine weitere Hypothese wäre, dass SG1 ein weiterer Negativ-Regulator der TBS ist, was beispielsweise durch SG1-Überexpressionslinien untersucht werden könnte. Allerdings ist fraglich, warum bei einer so stark erhöhten Kapazität der ALA-Synthese kein deutlicherer Effekt auf den Wuchs, die Pigmentierung oder die Akkumulation der TBS-Intermediate in der *sg1-2*-Linie nachzuweisen war.

Unabhängig von diesen Ungereimtheiten war die deutliche Abweichung des zuvor für *sg1* publizierten Phänotyps ein weiterer problematischer Aspekt der funktionellen Charakterisierung von

SG1. Trotz des fehlenden Antikörpers ist aufgrund der verifizierten Lage der T-DNA-Insertion innerhalb des kodierenden Bereichs von *SG1* (Abb. 2.68A) davon auszugehen, dass kein voll funktionsfähiges SG1-Protein gebildet werden kann. Fraglich ist, ob ein verkürztes SG1-Protein entsteht und ob dieses stabil und in der Lage ist, einen Teil seiner Funktion zu erfüllen, wodurch die Abweichungen des Phänotyps zur durch Hu *et al.* beschriebenen *sg1*-Mutante verursacht wurden. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass eine zweite T-DNA-Insertion im Genom der *sg1-2*-Mutante zur Suppression des *sg1* Phänotyps führt. Darüber hinaus ist unbekannt, ob durch die EMS erzeugte Punktmutation ein tatsächlicher *knockout* von SG1 erzeugt wurde, da Hu *et al.* den Einfluss der Mutation auf die Stabilität von SG1 nicht zeigten [212]. Sollte trotz der Punktmutation ein stabiles Protein entstehen, sollte überprüft werden, inwieweit diese Punktmutation die von SG1 ausgeübte Funktion beeinflusst.

Verschiedene potenzielle SG1-Interaktionspartner konnten durch BiFC und Hefe-2-Hybrid Analysen nachgewiesen werden (Abschnitt 2.1.2). Hu *et al.* postulierten bereits eine genetische Interaktion zwischen SG1 und GUN1 sowie GUN4 [212]. Mit den hier verwendeten Methoden wurde bestätigt, dass SG1 und GUN4 auch physisch miteinander interagieren (Abb. 2.2, 2.5). Bisher ist allerdings unbekannt, inwiefern SG1 einen Einfluss auf die Funktionalität von GUN4 hat, da in adultem Gewebe der *sg1-2*-Mutante der GUN4-Gehalt wildtypartig war (Abb. 2.70A). Neben GUN4 und POR ist SG1 auch in der Lage, mit GluTR1 und DVR zu interagieren (Abb. 2.1, 2.5). Interessanterweise konnte durch die verwendete BiFC-Methode die komplementierte YFP-Fluoreszenz stets in fleckenartigen Bereichen innerhalb der Chloroplasten beobachtet werden (Abb. 2.5). Diese Bereiche könnten dabei den plastidären Nukleoiden entsprechen [272, 340]. Nukleoide sind Orte mit hoher Transkriptions- und Translationsrate, aufgrund dessen sich sowohl die kern- als auch plastidenkodierte Polymerasen in diesen Bereichen befinden [272, 340]. Die Lokalisation der YFP-Signale könnten somit im Zusammenhang mit der postulierten Funktion von SG1 stehen, einen Einfluss auf die plastidären Transkripte auszuüben, obwohl SG1 keine essentielle Komponente der Polymerase-Komplexe ist [212]. Denkbar wäre, dass SG1 eine Verbindung zwischen der TBS und der plastidären Transkriptionsmaschinerie herstellt und so die Koordination der plastidären Proteinsynthese mit der TBS ermöglicht. Darüber hinaus wurde ClpC1/C2 als Komponente der plastidären Nukleoide identifiziert [341]. Da ClpC1/C2 für den Abbau von GluTR1 sowie CAO1 und möglicherweise auch von weiteren Proteinen der TBS verantwortlich ist [146, 153, 342], könnte der Verlust von SG1 mit einer gesteigerten Stabilität von GluTR1 einhergehen.

Eine wichtige Voraussetzung für weitere Analysen der SG1-Funktion *in planta* wäre die Produktion eines spezifischen SG1-Antikörpers. Mit diesem Antikörper könnte verifiziert werden, wie der SG1-Proteingehalt durch die Punktmutation oder T-DNA-Insertion beeinflusst wird. Leider konnte mit den bisher erzeugten Konstrukten SG1 nicht zur Überexpression in *E. coli* gebracht werden (Abschnitt 2.3.1.1). Ein Ansatz, um dieses Problem zu lösen, wäre die Verwendung einer für *E. coli* optimierten *SG1*-Sequenz oder die Produktion eines verkürzten SG1-Peptids in *E. coli*.

3.3.2. SG1 und TPR1 - partiell redundant?

Vor allem die hohe ALA-Syntheserate und der erhöhte GluTR1-Gehalt der *sg1-2*-Linie wiesen einige Parallelen zu den in der hier vorliegenden Arbeit analysierten *tpr1*-Linien auf. Darüber

hinaus interagiert sowohl TPR1 als auch SG1 mit GluTR1/2 und PORB/C (Abb. 2.1). Während SG1 die höchste Sequenzähnlichkeit zu Pitt aufweist, verfügt es anders als TPR1 über keine Transmembrandomäne (Tab. 2.1). Es wäre denkbar, dass durch eine Duplikation des Pitt-kodierenden Gens *slr1644* und einer sich anschließenden unabhängigen Evolution der duplizierten Sequenzen die Funktionalität von Pitt auf SG1 und TPR1 und somit auf eine lösliche und eine membranintegrale Komponente aufgespalten wurde. Diese Art der Genduplikation, gefolgt von einer unabhängigen Evolution der duplizierten Sequenzen, wurde mehrfach beschrieben [343]. Dabei kann eines der Duplikate aufgrund der reduzierten Selektivität nachteiliger Mutationen eine neue Funktion herausbilden oder sich durch Subfunktionalisierung direkt nach Duplikation unabhängig entwickeln [343]. Beispielsweise führte die Duplikation des POR-Gens zur funktionalen und regulatorischen Spezialisierung der einzelnen Isoformen im Laufe der Evolution [344].

Ein Argument, das für eine partiell überlappende Funktion von TPR1 und SG1 sprechen würde, ist die Tatsache, dass der *tpr1*-Phänotyp deutlich schwächer im Vergleich zur *pitt*-*Synechocystis* Zelllinie ist. Darüber hinaus ist der *SG1*-Transkriptgehalt in der *tpr1-3 knockout*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 2.16C). Dies könnte ein Zeichen eines kompensatorischen Effekts sein, durch eine Überproduktion von *SG1* den Verlust von TPR1 auszugleichen. Eine potenziell funktionelle Redundanz von SG1 und TPR1 sollte durch die Erzeugung einer Doppelmutante weiter untersucht werden. Nachdem mehrere Linien selektiert wurden, welche heterozygot für die T-DNA-Insertion in beiden Genen waren, konnten allerdings in der T2 Generation keine für beide Insertionen homozygoten Keimlinge selektiert werden. Die Homozygotie der T-DNA-Insertion im kodierenden Bereich von *TPR1* konnte zwar in 30 % der untersuchten Keimlinge nachgewiesen werden, allerdings waren diese Keimlinge lediglich heterozygot für die T-DNA-Insertion im *SG1*-Gen. Dies spricht dafür, dass die Unterbrechung beider Gene embryonal sein könnte. Eine potenziell überlappende Funktion beider TPR-Proteine unter Standard-Kurztagbedingungen scheint somit möglich. Um dennoch die Folgen einer Inaktivierung von *TPR1* und *SG1* zu untersuchen, könnte durch transiente Inaktivierung beider Gene, die Kreuzung zwischen der *sg1-2* und *tpr1-2*-Linie oder die Erzeugung einer induzierbaren *sg1 tpr1 knockout*-Linie diese potenzielle Lethalität umgangen werden.

3.3.3. SG1 - Zusammenfassung und Ausblick

SG1 wurde zuvor als Faktor der Biogenese von funktionalen Chloroplasten beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SG1 direkt mit GluTR1, PORB und GUN4 im Bereich der plastidären Nukleoide interagiert. Das Fehlen von SG1 beeinflusste vor allem die Inhibierung der ALA-Syntheserate und die subzelluläre Lokalisation von GluTR1. Eine wichtige Voraussetzung für weiterführende Analysen ist die Produktion eines SG1-spezifischen Antikörpers. Darüber hinaus wäre vor allem die Analyse von plastidären Transkripten ein wichtiger Punkt, um die bisher postulierte Funktionalität von SG1 zu überprüfen. Um den Zusammenhang zwischen der ALA-Synthesekapazität und der plastidären Transkriptionsmaschinerie genauer herauszuarbeiten, sollten verschiedene Doppelmutanten erzeugt werden. Gute Kandidaten dafür wären beispielsweise *flu* oder GUN-Komponenten. Da es in dieser Arbeit nicht gelang, *sg1 x tpr1* Doppelmutanten zu erzeugen, wäre ein transientser Ansatz hierbei hilfreich, um die potenzielle funktionelle Redundanz beider TPR-Proteine zu ergründen.

3.4. TPR7 ist nicht das Pitt-Homolog höherer Pflanzen

Die TPR-Domäne von TPR7 wies ebenso wie andere TPR-Proteine eine hohe Sequenzidentität und -ähnlichkeit zu Pitt auf, verfügte allerdings über ein TPR-Motiv mehr als Pitt (Tab. 2.1). Darüber hinaus war TPR7 als einziges der hier untersuchten TPR-Proteine in der Lage, in BiFC-Analysen mit allen drei POR-Isoformen zu interagieren (Abb. 2.6). Die Genexpression von *TPR7* unterlag in *Arabidopsis* einem diurnalen Rhythmus mit einem Maximum am Ende der Lichtphase (Abb. 2.72A). Die *TPR7*-Genexpression war somit, im Vergleich zu anderen TBS-Genen, einschließlich der *PORA*- und *PORB*-Gene, um mehrere Stunden im Tagesverlauf in Richtung Tagesende verschoben [49]. Der Verlust von *TPR7 in planta* hatte allerdings, trotz möglicher Interaktion zu POR, keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Stabilität oder Funktionalität von *PORA/B* (Abb. 2.74C, D, H). Allerdings wiesen die *tpr7*-Linien einen reduzierten MgP, MgProtoME und Chlorophyllgehalt auf (Abb. 2.74A, B, E), welche jedoch nicht zu einer Beeinträchtigung der photosynthetischen Leistung im Vergleich zum Wildtyp führte (Tab. 2.7). Die in dieser Arbeit erzeugten Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass TPR7 nicht als mögliches Pitt-Homolog in Frage kommt.

3.5. TPR9 - eine Komponente der Starklicht-Akklimatisierung in *Arabidopsis thaliana*

Ein weiterer potenzieller Kandidat für das Pitt-Homolog in höheren Pflanzen ist TPR9, welches eine zu den anderen TPR-Kandidaten vergleichbar hohe Sequenzidentität und -ähnlichkeit zu Pitt aufwies (Tab. 2.1). In Hefe-2-Hybrid-Analysen konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass TPR9 in der Lage ist, physisch mit *PORA* und *PORB* zu interagieren (Abb. 2.1). Vergleichbar zu *SG1* und *TPR7* unterlag die Genexpression von *TPR9* diurnaler Kontrolle, wobei die maximale *TPR9*-Genexpression im Wildtyp am Ende der Lichtphase detektiert werden konnte (Abb. 2.79A) und somit im Vergleich zu anderen TBS-Genen deutlich verschoben war [49]. Dabei waren der maximale TPR9-Gehalt zwei Stunden nach Beginn der Dunkelphase, der minimale TPR9-Gehalt in der Mitte der Dunkelphase nachweisbar (Abb. 2.79B). Das plastidär lokalisierte TPR9-Protein verfügte zwar über keine vorhergesagten transmembranen Bereiche, war aber dennoch zum großen Teil in der Fraktion der Thylakoidmembranen präsent (Abb. 2.80). Somit handelt es sich bei TPR9 um ein membranassoziiertes Protein, dessen genaue Verankerung an den Thylakoidmembranen unklar blieb.

3.5.1. Der Verlust von TPR9 beeinflusst die Assemblierung des PSII unter Standard-Kurztagbedingungen

Bei der in dieser Arbeit selektierten *tpr9*-Linie handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um eine *knockout*-Linie, da durch den erzeugten spezifischen Antikörper TPR9 nicht mehr nachweisbar war (Abb. 2.81D). Zwar ist unbekannt, an welchem Epitop der TPR9-Antikörper bindet, durch die Lage der T-DNA-Insertion in der Mitte des kodierenden Bereiches sollte allerdings kein vollständig funktionales Protein entstehen (Abb. 2.81A). Die *A. thaliana tpr9*-Mutante wies unter Standard-Kurztagbedingungen einen leicht retardierten Wuchs auf (Abb. 2.81E) und zeigte nur eine schwache Beeinträchtigung der TBS-Intermediat- und Endproduktgehalte (Abb. 2.82). Auch konnte keine Veränderung der Gehalte des potenziellen Interaktionspartners *PORA/B* oder weiterer TBS-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 2.82C, D, H). Allerdings

zeigte sich, dass das Fehlen von TPR9 Auswirkungen auf die Quantenausbeute und Assemblierung von PSII hatte (Tab. 2.8, Abb. 2.83A). Allen Anschein nach war dabei die Ausbildung der PSII-LHCII-Superkomplexe gestört, da diese eine leicht reduzierte Abundanz aufwiesen, während der Gehalt von PSII-Monomeren und LHCII-Trimeren in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht war (Abb. 2.83A). Trotz der veränderten Abundanz einiger PSII-Komplexe war der Gesamtgehalt der einzelnen PSII-Untereinheiten in der *tpr9*-Linie nicht beeinträchtigt (Abb. 2.83B). Dies könnte für eine Beeinträchtigung der PSII-Assemblierung sprechen, die mit einer reduzierten effektiven Quantenausbeute des PSII einhergeht (Tab. 2.8). Darüber hinaus war die Chlorophyllfluoreszenz von PSI in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Abb. 2.83C), welche allerdings nicht durch eine reduzierte Akkumulation des PSI-Monomers verursacht wurde (Abb. 2.83A). Die reduzierte Chlorophyllfluoreszenz des PSI und der leicht retardierte Wuchs der *tpr9*-Linie wiesen somit zwar eine Parallele zur *pitt*⁻-Linie auf [177, 178], allerdings konnte unter den verwendeten Anzuchtbedingungen keinerlei Beeinträchtigung sowohl des POR-Gehaltes als auch der POR-Aktivität nachgewiesen werden.

3.5.2. TPR9 ist in die Akklimatisierung unter kontinuierlichen Starklichtbedingungen involviert

Die *TPR9*-Genexpression wurde am stärksten durch kontinuierliches Starklicht induziert (Abb. 2.79C). In Übereinstimmung damit hatte dieses Lichtregime den stärksten Einfluss auf die Pigmentierung der *tpr9*-Linie. Beginnend ab dem dritten Tag in kontinuierlichem Starklicht nahm die sichtbare Blattpigmentierung der *tpr9*-Linie stark im Vergleich zum Wildtyp ab (Abb. 2.87A, B, C). Einhergehend damit war ein reduzierter Chlorophyllgehalt, wobei die photosynthetischen Kernkomplexe davon stärker betroffen waren als die Antennenkomplexe (Abb. 2.87C, D). Ebenso wie der Chlorophyllgehalt waren auch die nachgewiesenen *steady state* TBS-Intermediatgehalte, mit Ausnahme von PChlid, in der *tpr9*-Linie reduziert (Abb. 2.88). Die vergleichsweise hohe Menge an PChlid in der *tpr9*-Linie könnte durch einen stark reduzierten PORB-Proteingehalt verursacht worden sein (Abb. 2.89C). Somit ist eine Beeinträchtigung der PORB-Stabilität infolge des Fehlens von TPR9 nicht ausgeschlossen. Es gilt allerdings zu bedenken, dass unter erhöhten Lichtintensitäten PORC die dominante POR-Isoform ist [109, 110]. Dennoch ist es vorstellbar, dass auch PORB unter diesen Bedingungen einen Teil zum Umsatz von PChlid zu Chlid beiträgt. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass die Reduktion aller TBS-Intermediate nicht durch die Destabilisierung von PORB allein verursacht wird, sondern entweder ein sekundärer Effekt ist oder mit einer Deregulation der gesamten TBS zusammenhängt. Neben der reduzierten Menge an TBS-Intermediaten und Chlorophyll führte der Verlust von TPR9 auch zu einer reduzierten Anreicherung von Anthocyanen unter Starklicht (Abb. 2.87A), wodurch die reduzierte Blattpigmentierung der *tpr9*-Linie noch dramatischer erschien. Der reduzierte Chlorophyllgehalt der *tpr9*-Linie korrelierte mit der im Vergleich zum Wildtyp reduzierten Präsenz des PSII-LHCII-Dimeres und der PSII-LHCII Superkomplexe (Abb. 2.89A). Es wurde dementsprechend geschlussfolgert, dass TPR9 die Ausbildung der PSII-LHCII-Komplexe beeinträchtigt. Allerdings führte die Inkubation in kontinuierlichem Starklicht zu keiner Steigerung der unter Standard-Kurztagbedingungen nachgewiesenen reduzierten Gehalte der PSII-LHCII-Superkomplexe (Vergleich Abb. 2.83A und 2.89A).

Verschiedene Mutanten wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten als Starklicht-sensitiv beschrieben. Unter ihnen sind auch einige Linien, welche ein eingeschränktes NPQ aufwiesen [290, 291, 296]. Unter starker Belichtung kann es zu vermehrter Ausbildung von Triplett-Chlorophyll-Zuständen kommen. Um dies zu verhindern, nehmen Xanthophylle, vor allem Zeaxanthin, die überschüssige Anregungsenergie des Chlorophylls auf und wandeln diese in Wärme um. Sollte dieser Prozess eingeschränkt sein, führt dies zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Starklicht und infolge dessen zur Photoinhibierung von PSII [284, 290, 291]. Mutanten, welche entweder einen eingeschränkten Xanthophyllzyklus oder eine eingeschränkte Assemblierung der LHCII-Antennen aufweisen, bilden unter Starklicht Chlorosen und Nekrosen aus [290, 291]. Da allerdings in der *tpr9*-Linie nach drei Tagen in kontinuierlichem Starklicht mehr Xanthophylle akkumulierten als im Wildtyp (Abb. 2.87E) und die Messung des NPQs nach Inkubation in moderaten und erhöhten Lichtintensitäten keinen Unterschied zum Wildtyp ergab (Tab. 2.9, Abb. 2.90), konnte fehlendes NPQ als Ursache für den Starklicht sensitiven Phänotyp der *tpr9*-Linie ausgeschlossen werden. In *npq*-Mutanten wären schon ab einer Lichtintensität von 500 μE deutlich reduzierte NPQ-Werte zu erwarten gewesen [290]. In einer zeitaufgelösten Analyse des Proteingehalts der photosynthetischen Untereinheiten wurde deutlich, dass nach 24 h in kontinuierlichem Starklicht zuerst die LHCB1-Antennenproteine betroffen waren, während die weiteren photosynthetischen Untereinheiten erst nach 48 h einen reduzierten Proteingehalt aufwiesen (Abb. 2.89B). Der reduzierte LHCB1-Gehalt war nicht auf einen reduzierten *LHCB1*-Transkriptgehalt zurückzuführen (Abb. 2.93B). Tatsächlich zeigte sich, dass nach 24 h in kontinuierlichem Licht die Genexpression der meisten *LHCPs* in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum Wildtyp erhöht war (Abb. 2.93). Davon war vor allem die Genexpression von *LHCA1*, *LHCB1*, *LHCB2* und *LHCB5* betroffen (Abb. 2.93).

Ein Grund für die erhöhten *LHCP*-Transkriptgehalte war zum einen ein möglicher Kompensationsversuch des LHCB-Verlustes. Zum anderen könnte durch eine Störung der retrograden (Plastiden zum Zellkern) Signalkaskade die Genexpression der *LHCPs* modifiziert sein. Oeltze *et al.* postulierten allerdings, dass die Veränderungen des Transkriptgehalts verschiedener Gene unter Starklicht nur einen schwachen Anteil zur *de novo* Synthese der entsprechenden Proteine beitragen, da die Regulation unter Starklicht wahrscheinlich eher auf translatorischer Ebene stattfindet [345]. Somit kann ein kompensatorischer Effekt als Ursache für die erhöhte *LHCP*-Genexpression größtenteils ausgeschlossen werden. Eine Deregulation des retrograden Signalweges in der *tpr9*-Linie scheint somit wahrscheinlicher.

Durch die retrograden Signaltransduktionswege werden spezifisch im Chloroplasten erzeugte Signale in Signalkaskaden weitergeleitet, die schlussendlich die Genexpression der verschiedenen *PhANGs* im Zellkern modifizieren. Die retrograde Signaltransduktion spielt eine entscheidende Rolle in der Anpassung und Akklimatisierung der Pflanze an verschiedene abiotische Signale [346–348]. Mutanten mit einem gestörten retrograden Signalweg im Hinblick auf die Genexpression der *PhANGs* werden als *gun*-Mutanten bezeichnet [297].

3.5.3. TPR9 ist keine *gun*-Mutante

Insgesamt sechs *gun*-Mutanten wurden in den letzten Jahren identifiziert, von denen fünf an der TBS beteiligt sind [337, 349, 350]. Während *gun2* und *gun3* einen Defekt von *HO* und *HY2* aufweisen und somit für die Synthese von Phytychromobilin zuständig sind [136, 347], sind *GUN4* und *GUN5* an der Chlorophyllbiosynthese beteiligt [337, 349]. *GUN4* ist der Positivregulator der TBS und *GUN5* kodiert für die CHLH Untereinheit der MgCh [62, 337]. Erst kürzlich wurde die Überexpressionslinie von FC als eine weitere *gun*-Mutante, *GUN6*, identifiziert [348, 350]. Einzig *GUN1*, welches für ein *pentatricopeptid repeat* Protein kodiert [349], ist nicht direkt an der TBS beteiligt. *Pentatricopeptid repeat* Proteine interagieren vorrangig mit RNA und beeinflussen posttranskriptionelle Prozesse wie RNA-Splicing und -Editierung [351]. *GUN1* ist dabei in den Nukleoiden lokalisiert und für die Integration verschiedener plastidärer Signale, wie dem Redoxstatus und der Anreicherung der TBS-Intermediate, zuständig [298, 347, 348].

Allen *gun*-Mutanten ist gemein, dass in diesen unter Bedingungen in denen die Chloroplastenentwicklung gestört ist, wie zum Beispiel bei der Behandlung mit NF, die Genexpression der PhANGs nicht reprimiert ist [297, 350]. Auch unter stark erhöhten Lichtintensitäten spielen die GUN-vermittelten retrograden Signale eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Chloroplasten an diese Stressbedingung [271]. Obwohl der Verlust von TPR9 unter Starklicht zu einer gestörten Repression der *LHCPs* führte (Abb. 2.93), welche zur Gruppe der PhANGs gehören, konnte weder unter Starklicht noch NF-Behandlung eine vergleichbare fehlende Repression weiterer PhANGs, wie beispielsweise der kleinen Untereinheit von RuBisCO oder der Carboanhydrase, nachgewiesen werden (Abb. 2.94C, 2.95). Somit zeigte sich, dass in den *tpr9*-Linien ein anderer spezifischer Effekt auf die Genexpression der *LHCPs* und *PORB* stattfand, welcher zumindest teilweise unabhängig von den GUN-vermittelten Signalwegen stattfinden muss, da ansonsten weitere PhANGs betroffen wären. Darüber hinaus führt der Verlust von TPR9 lediglich unter Starklicht zu deregulierten *LHCP*-Transkriptgehalten, während unter NF-Behandlung eine wildtypartige Repression dieser Gene nachgewiesen wurde (Abb. 2.94C). Auch wenn im Bezug auf die Genexpression der *LHCPs* die *tpr9*-Linie einige Parallelen zu *gun*-Mutanten zeigte, handelt es sich dennoch um kein neues GUN-Protein, sondern um einen Faktor, der spezifisch die Genexpression einzelner Zielgene mit Funktion im Chloroplasten beeinflusst.

3.5.4. TPR9 und Anthocyane

In der *tpr9*-Linie war weiterhin die gestörte Akkumulation von Anthocyanen auffällig, die nach drei Tagen unter Starklicht sichtbar wurde (Abb. 2.87B). Allerdings war schon zu früheren Zeitpunkten der Starklichtbehandlung ein geringerer Anthocyangehalt in der *tpr9*-Linie im Vergleich zum gleichbehandelten Wildtyp messbar (Tab. 2.10). Die Akkumulation von Anthocyanen unter bestimmten Stressbedingungen wie Starklicht, Kälte oder NF-Behandlung dient dem Schutz der betroffenen Pflanzen vor zu starkem Lichteinfall und der damit verbundenen Überanregung der photosynthetischen Komplexe [294]. Dabei wird postuliert, dass Anthocyane eine Art Sonnenschutz bilden und so die photosynthetische Leistung und Akkumulation von Chlorophyllen aufrecht erhalten [294]. Unklar ist dabei, wie die Anreicherung von Anthocyanen in den Vakuolen durch die Überanregung der Photosysteme durch die Lichteinstrahlung im Chloroplasten reguliert wird. Als wichtige Komponenten dieses Signalweges wurden unter anderem Mitogen-

activated-protein (MAP)-Kinasen und ein MYB-Transkriptionsfaktor (MYB75) identifiziert [352]. Linien mit einer gestörten MYB75 Funktion sind nicht in der Lage, Anthocyane infolge der fehlenden Induktion der Genexpression verschiedener Anthocyanbiosynthese-Enzyme zu akkumulieren [352]. Diese Ursache kann allerdings in der *tpr9*-Linie ausgeschlossen werden, da die Genexpression verschiedener Enzyme der frühen und späten Anthocyanbiosynthese in einem zum Wildtyp vergleichbarem Maße unter Starklicht induziert wurden (Abb. 2.91). Unbekannt ist allerdings, ob die Stabilität der korrespondierenden Enzyme und Intermediate durch das Fehlen von TPR9 beeinträchtigt ist und so die reduzierte Akkumulation der Anthocyane auslöst.

Neben der Funktion der Anthocyane als Sonnenschutz wurde in den letzten Jahren ein potenzieller Zusammenhang zum plastidenlokalisierten retrograden Signalweg deutlich [311, 353]. Unter NF-Behandlung akkumulieren Wildtyp-Keimlinge als Reaktion auf die inhibierte Carotinoidbiosynthese und die damit verbundene gestörte Chloroplastenbiogenese eine große Menge an Anthocyanen [311, 353]. Durch das Fehlen der Carotinoide kommt es zu einem verminderten *Quenching* der Energie von Triplett-Chlorophyllzuständen [297], infolge dessen die Akkumulation von Anthocyanen ausgelöst wird [311, 353]. In *gun*-Mutanten reichern sich hingegen deutlich weniger Anthocyane an [311, 353]. Vergleichbar zu den *gun*-Mutanten führte auch die Anzucht von *tpr9*-Linien auf NF-haltigem Medium zu einer reduzierten Akkumulation von Anthocyanen (Abb. 2.94A, B). Da unter erhöhten Lichtintensitäten kein Einfluss auf die Transkriptgehalte der Anthocyanbiosynthese-Gene in der *tpr9*-Mutante nachgewiesen wurde (Abb. 2.91), ist davon auszugehen, dass auch unter NF-Behandlung die Transkriptgehalte der Anthocyanbiosynthese-Gene nicht stark beeinträchtigt sind. Wie zuvor unter Starklicht ist allerdings auch hier nicht ausgeschlossen, dass die Enzyme der Anthocyanbiosynthese in der *tpr9*-Mutante posttranslational destabilisiert werden oder der Abbau der Anthocyane stärker erfolgt als im Wildtyp.

Verschiedene weitere Faktoren werden als Auslöser für die Akkumulation von Anthocyanen diskutiert. Zum einen wird die Anthocyanproduktion potenziell durch die Anreicherung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid induziert [294], da Mutanten mit gestörter Anthocyanproduktion sensitiv gegenüber Starklicht und ROS sind [295]. Allerdings führte die Akkumulation von Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid in *flu* oder *catalase2*-Mutanten nicht zu einer erhöhten Menge an Anthocyanen [354]. Darüber hinaus kann Wasserstoffperoxid mit der Aktivierung der Anthocyanbiosynthese interferieren und somit deren Genexpression inhibieren [355]. Ein weiterer potenzieller Auslöser der Anthocyan-Anreicherung ist der veränderte Redoxstatus des Chloroplasten. Bei einem gestörten Redoxhaushalt, wie beispielsweise in der *ntrc* (NADPH-thioredoxin reductase)-Mutante, kommt es ebenfalls zu einer reduzierten Anreicherung von Anthocyanen [356]. Sowohl ROS- als auch Redox-Signale werden neben Metaboliten wie Magnesium-Porphyrinen als potenzielle retrograde Signale vermutet [333, 347, 348]. Ein Zusammenhang zwischen der reduzierten *LHCP*-Genexpression und Akkumulation von Anthocyanen in der *tpr9*-Linie könnte somit auf ein Ungleichgewicht des plastidären Redoxstatus zurückzuführen sein.

3.5.5. TPR9 ist involviert in die Phosphorylierung der PSII-Kernuntereinheiten

Eine weitere Anpassung an erhöhte Lichtintensitäten ist die Ausbildung des *state transition*-Komplexes. Dieser Mechanismus sorgt für eine partielle Abkopplung der LHCII-Antennen von den PSII-LHCII-Superkomplexen infolge einer Überanregung des PSII-Kernkomplexes und des Transfers der LHCII-Trimere zum PSI [288, 300, 357]. Infolge einer fehlenden Entkopplung der LHCII-Antennen würde es zu einer erhöhten photodynamischen Zerstörung des PSII-Kernkomplexes und aufgrund dessen zur Photoinhibierung des PSII kommen [358, 359].

Unabdingbar für die Umgestaltung der PSII-LHCII-Komplexe ist die Phosphorylierung der Antennen- und Kernproteine [288, 360]. Dabei sind die zwei spezifischen Serine/Threonine Protein Kinasen 7 und 8 (STN7 und STN8) involviert. Während STN7 für die Phosphorylierung der LHCII-Antennen zuständig ist [361], phosphoryliert STN8 die Untereinheiten des Kernkomplexes D1, D2 und CP43 [289]. In der hier untersuchten *tpr9*-Linie konnte keine Beeinträchtigung der LHCII-(De)Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 2.97, 2.98). In Übereinstimmung damit erfolgte die *state transition* in der *tpr9*-Linie vergleichbar zum Wildtyp (Abb. 2.96). Allerdings war die Phosphorylierung der Kernuntereinheiten D1 und D2 in der *tpr9*-Linie reduziert (Abb. 2.97, 2.98). Während unter moderaten Lichtintensitäten die Phosphorylierung der Kernkomplexe nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist sie unabdingbar bei hohen Lichtintensitäten [288, 362, 363]. Durch die Phosphorylierung der Kernkomplexe wird die Ablösung der LHCII-Antennen verursacht [288]. Speziell die Phosphorylierung von D1 ist darüber hinaus ein wichtiger Prozess für die Reparatur des PSII und den Austausch von geschädigtem D1 [363, 364]. Interessant war, dass in den *tpr9*-Linien weniger D1 und mehr D2 von dieser fehlenden Phosphorylierung betroffen war, was sich allerdings erst nach der Auftrennung der Thylakoidmembranen in der zweiten Dimension zeigte (Abb. 2.98). Ebenfalls auffällig war, dass in der *tpr9*-Mutante im Bereich der Mega- und Superkomplexe weniger phosphorylierte Kernuntereinheiten vorlagen als im gleichbehandelten Wildtyp (Abb. 2.98).

Da die Ausbildung des *state transition* Komplexes lediglich eine Anpassung an kurzzeitige Änderungen der Lichtintensitäten darstellt [288, 348, 365], scheint die kurzfristige Antwort auf Starklicht in der *tpr9*-Linie nicht beeinträchtigt zu sein. Die Phosphorylierung von D1 hingegen ist vor allem unter verlängertem Lichtstress entscheidend, da unter diesen Bedingungen ein ständiger Austausch von geschädigtem D1 unabdingbar für die Aufrechterhaltung der photosynthetischen Leistung ist [364]. Denkbar wäre, dass eine Beeinträchtigung dieses Prozesses der Auslöser für die Sensitivität der *tpr9*-Linie gegenüber kontinuierlichem Starklicht ist. In der *tpr9*-Linie könnte somit der Austausch von zerstörtem D1 weniger effizient stattfinden. Bei reduzierter Phosphorylierung der PSII-Kernproteine steigt die Abbaurate von D1 und D2 stark an [366], was die reduzierte Akkumulation von D1 in der *tpr9*-Linie erklären würde (Abb. 2.89). Bei der Anzucht im Tag-Nacht-Wechsel besteht die Möglichkeit, dass während der Nachtphasen das Defizit des D1-Austauschs ausgeglichen wird, sodass es zu keiner sichtbaren Einschränkung der betroffenen Pflanzen kommt (Abb. 2.84A). Unklar ist, welche Rolle die Phosphorylierung von D2 für den Austausch von D1 spielt. Der Abbau von D2 ist bei fehlender Phosphorylierung beispielsweise weniger stark als von D1 [366]. Darüber hinaus ist die Phosphorylierung von D2 nicht essentiell für die Funktionalität von PSII in *Chlamydomonas reinhardtii* [367]. Denkbar wäre dennoch, dass eine reduzierte Phosphorylierung von D2 den Austausch von D1 inhibiert,

da die Phosphorylierung beider Untereinheiten wichtig für den PSII-Reparaturzyklus ist [360]. Aufgrund der Dominanz der D1-Phosphorylierung ist allerdings bislang weniger gut bekannt, welche spezifische Rolle die D2-Phosphorylierung für die Aufrechterhaltung der Funktionsfähigkeit des PSII spielt. Interessant ist außerdem, dass in *stn7 x stn8* Doppelmutanten die D2-Phosphorylierung weiterhin zu einem geringen Teil nachweisbar ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass neben STN7 und STN8 noch eine weitere Kinase an der Phosphorylierung von D2 beteiligt sein könnte [301, 363].

3.5.6. TPR9 ein Faktor des plastidären Redoxstatus?

Fraglich ist, welcher Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung von PSII-Untereinheiten, fehlender Repression der *LHCPs*-Genexpression und reduzierter Anthocyanakkumulation unter Starklicht in der *tpr9*-Linie besteht. Ein Faktor, welcher alle diese Dinge verbinden könnte, ist der Redoxstatus des Chloroplasten. Zum einen konnte für STN7 gezeigt werden, dass deren Kinasaktivität direkt an das Redoxpotenzial des Plastoquinonpool gekoppelt ist [347]. Zum anderen wird der Redoxstatus des Chloroplasten als Teil des Systems der retrograden Signalvermittlung angesehen [333]. Die entstehenden Redoxsignale können mittels bisher unbekannter Faktoren vom Chloroplasten ins Cytosol übertragen werden, dadurch Signalkaskaden auslösen und die Genexpression der PhANGs beeinflussen [333, 347, 368]. Die Redox-Regulation ist darüber hinaus sehr dynamisch, sodass ein großer Unterschied zwischen der primären Reaktion und der finalen Anpassung bestehen kann [369]. Die Redoxsignale agieren unabhängig von weiteren retrograden Signalwegen [333, 348, 368] und regulieren je nach Art des Redoxsignals eine differenzierte und spezifische Gruppe von Zielgenen [370]. Diese Spezifität könnte erklären, warum in der *tpr9*-Linie klassische PhANGs wie *RBCS* und *CA* nicht betroffen sind, die Genexpression der *LHCPs* allerdings schon (Abb. 2.93, 2.95).

Die Analyse verschiedener Mutanten mit einer gestörten Signalweiterleitung, wie beispielsweise *gun1* und *calcium-sensing receptor*, zeigen dabei eine wildtypartige Veränderung der photosynthetischen Parameter unter Starklicht [369], was auch auf die *tpr9*-Mutante zutrifft (Abb. 2.90, Tab. 2.9). Eine weitere Mutante, welche einige Parallelen zur *tpr9*-Linie aufzeigte wäre die *prin2* (plastid redox insensitive 2)-Mutante. *PRIN2* ist an der Verbindung zwischen dem Redoxstatus des Chloroplasten und der plastidenkodierten RNA-Polymerase Maschinerie beteiligt und führt darüber hinaus zu einer deregulierten Genexpression der *LHCPs* als Reaktion auf Starklicht, die durch eine Beeinträchtigung des Redoxstatus sowie der photosynthetischen Elektronentransportkette verursacht wurde [296]. Anders als für *tpr9* konnte in der *prin2*-Linie allerdings ein verringertes NPQ und eine deutlich reduzierte effektive PSII-Quantenausbeute detektiert werden [296]. Darüber hinaus ist die Genexpression von *PRIN2* in der *tpr9*-Linie nicht verändert (Abb. 2.93). Dieses Ergebnis spricht für eine von *PRIN2* unabhängigen Reaktion auf den plastidären Redoxstatus unter Starklicht, an der TPR9 beteiligt sein könnte.

Möglich ist, dass der Einfluss auf PORB in der *tpr9*-Linie ebenfalls eine Reaktion auf den Redoxstatus ist, da PORB ein Ziel von Redox-Modifikationen sein könnte [68]. In *ntrc*-Mutanten mit gestörtem Redoxstatus weist PORB beispielsweise einen reduzierten Gehalt auf [68, 371]. Darüber hinaus akkumulieren *ntrc*-Mutanten weniger Anthocyane [356]. Somit ist es wahrscheinlich, dass in *tpr9*-Mutanten der Redoxstatus der Zelle beeinträchtigt ist. Allerdings sollte nicht

ausgeschlossen werden, dass durch fehlende Phosphorylierung der D1- und D2-Untereinheiten die photosynthetische Elektronentransportkette in der *tpr9*-Linie wahrscheinlich unregelmäßiger als in der Kontrolle verläuft und dies wiederum den Redoxstatus der Zelle beeinträchtigt. Denkbar wäre hierbei, dass TPR9 für die Interaktion zwischen STN8 und dessen Zielproteinen oder für die Aktivität der Phosphatasen verantwortlich sein könnte.

3.5.7. TPR9 - Ein Model

Zusammenfassend ließ sich folgendes Model für die Funktion des TPR9-Proteins aufstellen. Unter moderaten Lichtintensitäten ist der Redoxstatus des Chloroplasten ausgeglichen und die Rate der D1/D2-Phosphorylierung durch STN8 gering, da die Notwendigkeit der Reparatur von PSII minimal ist (Abb. 3.5). Unter verschiedenen Stressbedingungen, beispielsweise starkem Lichteinfall, verändert sich der Elektronenfluss der photosynthetischen Elektronentransportkette und modifiziert so den Redoxstatus des Chloroplasten. Infolge dessen kommt es zur Aktivierung von STN8, die daraufhin D1 und D2 phosphorylieren kann. Eine erhöhte D1/D2-Phosphorylierung würde für eine effiziente Reparatur von D1 nötig sein (Abb. 3.5). Durch den Verlust von TPR9 könnte zum einen der Redoxstatus an sich beeinflusst werden und zum anderen die Aktivität der STN8-Kinase bzw. deren Interaktion zu verschiedenen Zielproteinen beeinträchtigt sein (Abb. 3.5). Beide Vorgänge würden unter erhöhten Lichtintensitäten die erforderliche Rate der D1-Reparatur herabsetzen und so die Regeneration der photosynthetischen Komplexe stören.

Neben dem Einfluss auf die Reparatur des PSII beeinflusst der Redoxstatus außerdem die Genexpression verschiedener *LHCPs* und weiterer Zielgene sowie die Anreicherung von Anthocyanen (Abb. 3.5). Zu bedenken gilt, dass neben STN8 auch die bisher unbekannte Kinase der D1/D2-Phosphorylierung durch das Fehlen von TPR9 beeinträchtigt sein könnte.

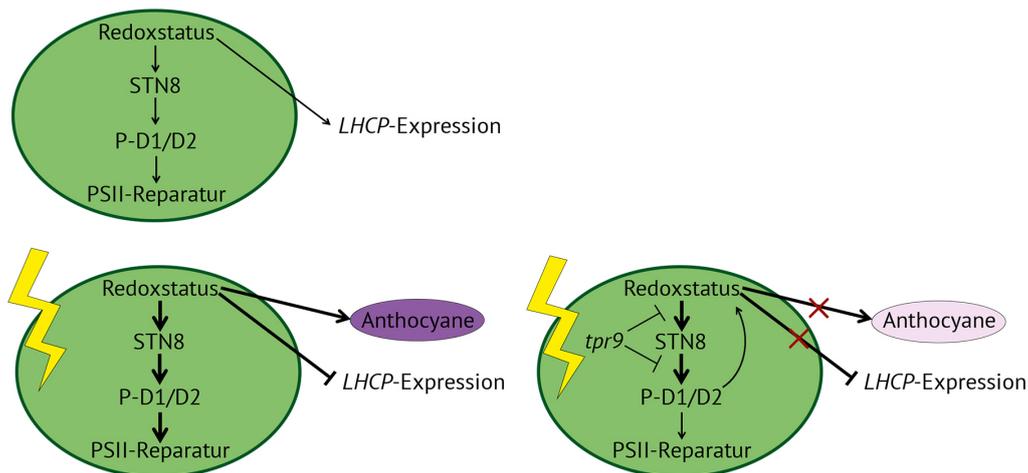


Abbildung 3.5. – Vorgeschlagenes Model zur Funktionsweise von TPR9 in Plastiden.
Für weitere Erläuterungen siehe Text

3.5.8. TPR9 - Zusammenfassung und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit wurde deutlich, dass TPR9 an der Akklimatisierung von Arabidopsis an kontinuierliches Starklicht beteiligt ist. In kontinuierlichem Starklicht beeinflusst TPR9 sowohl die Phosphorylierung der Untereinheiten des PSII-Kernkomplexes als auch die Genexpression verschiedener kernkodierter PhANGs und die Akkumulation von Anthocyanen. Dabei ist *tpr9* keine *gun*-Mutante im klassischen Sinne, sondern beeinflusst spezifisch die Genexpression bestimmter *LHCPs* sowie *PORB*. Das Ausbleiben der Phosphorylierung steht in der *tpr9*-Mutante im Zusammenhang zum Abbau der photosynthetischen Untereinheiten. Zusätzlich dazu weist die Beeinträchtigung von *PORB* in der *tpr9*-Mutante auf eine mögliche Verbindung zwischen der Anpassung der Photosysteme und der TBS hin. Da die Phosphorylierung von PSII und die retrograde Signalgebung abhängig von dem Redoxpotenzial des Chloroplasten sind, ist nicht auszuschließen, dass TPR9 ein Faktor der Redoxregulation ist. In diesem Zusammenhang wäre zu prüfen, welchen Stellenwert TPR9 bei der PSII-Phosphorylierung und Veränderung des Redoxpotenzials einnimmt. Dafür sollten verschiedene plastidäre Kinasemutanten (bspw. *stn7/stn8*) sowie Redoxmutanten (bspw. *ntrc* und $\Delta 2cp$) in die Analysen einbezogen werden und hinsichtlich der *LHCP*-Genexpression, Anthocyanakkumulation und Phosphorylierung der PSII-Untereinheiten in kontinuierlichem Starklicht untersucht werden. Auch die Erzeugung von Doppelmутanten wäre hierbei ein interessanter Aspekt. Darüber hinaus bietet auch die *TPR9-HA*-Überexpressionslinie genügend Potenzial für weiterführende Analysen, vor allem hinsichtlich der Anreicherung von Anthocyanen und der Genexpression verschiedener *LHCPs*.

4. Material und Methoden

4.1. Anzucht von Organismen

Tabelle 4.1. – Verwendete transgene Linien. Die hier aufgelisteten T-DNA-Insertionslinien wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen und sind mit ihrer Identifikationsnummer angegeben. Andernfalls wurde die dazugehörige Publikation angegeben, in welcher die verwendete Linie erzeugt/beschrieben wurde.

ATG Nummer	Bezeichnung	Referenz
At1g78915	<i>tpr1-1</i>	GK885D01
	<i>tpr1-2</i>	SALK020398(AZ)
	<i>tpr1-3</i>	SALK022668
At3g18420	<i>sg1-2</i>	GK72C10
At5g02590	<i>tpr7</i>	GK144C05
At3g53560	<i>tpr9</i>	SALK071334 (AT)
At3g56940	<i>chl27</i>	[100]
At1g58290	<i>hemA1</i>	SALK_053036 [285]
At3g21200	<i>gbp</i>	SALK_200203 [149]
At3g14110	<i>flu</i>	[140, 372]
At4g27440	<i>porb-2</i>	SALK_043887 [113]
	<i>porb-4</i>	SAIL 429_A06 [113]

Tabelle 4.2. – Verwendete Medien. Die angegebenen Medien wurden für die Anzucht verschiedener Kulturen verwendet.

Puffer	Komponenten
<i>lysogeny broth</i> (LB) Medium	0,1 % (w/v) Trypton; 0,05 % (w/v) Hefeextrakt;
LB-Agar	0,1 % (w/v) NaCl LB Medium + 0,15 % Agar
<i>yeast extract broth</i> (YEB) Medium	10 mM MgCl ₂ ; 5 g/l Trypton; 1 g/l Hefeextrakt;
YEB-Agar	5g/l Saccharose; 6 mM MgSO ₄ *7 H ₂ O YEB-Medium + 0,8 % Agar
<i>yeast extract-peptone-adenin-dextrose</i> (YPAD) Medium	1 % Hefeextrakt; 2 % Pepton; 2 % Glukose;
YAPD-Agar	0,004 % Adeninsulfat YAPD-Medium + 2 % Agar
<i>synthetic complete</i> (SC) Medium	4 g/l <i>yeast nitrogen base without amino acids</i> ;
SC-Agar	2 % (w/v) Glukose; 1x SC-Medium Mix; SC-Medium + 3,35 % Bacto Agar
Murashige-Skoog (MS) Medium	1/2 MS; 0,5 g/l MES; pH 5,7
MS-Agar	MS-Medium + 4,13 g/l Difcon Agar

4.1.1. Anzucht von *Escherichia coli* Kulturen

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Flüssigkulturen der verwendeten *E. coli* Stämme in LB-Medium bei 37 °C und 350 rpm angezogen. Für die Anzucht auf Festmedium wurden LB-Agarplatten mit spezifischen Selektionsmarker (Tabelle 4.9) über Nacht in einem 37 °C Brutschrank inkubiert.

4.1.2. Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* Kulturen

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in YEB-Medium, welches neben dem vektorspezifischen Antibiotika (Tab. 4.9) ebenfalls 100 µM Rifampicin enthielten. Flüssigkulturen wurden im Allgemeinen bei 30 °C und 250 rpm über Nacht angezogen. Die Anzucht auf Festmedium erfolgte auf YEB-Agar mit Selektionsmarker für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.1.3. Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* Kulturen

Für verschiedene Hefe-2-Hybrid-Ansätze wurden Hefekulturen in YPAD-Flüssigmedium über Nacht bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Wurden die Kulturen auf Festmedium angezogen, so wurde SC-Medium verwendet. Für die Selektion von positiven Transformanten wurde SC-Medium ohne Leucin und Tryptophan (SC-It) genutzt, während die Selektion von positiven Interaktionen auf SC-Medium ohne Histidin, Uracil, Leucin und Tryptophan (SC-hult) vorgenommen wurde. Die Anzucht auf Festmedium erfolgte für 3-5 Tage bei 30 °C.

4.1.4. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

4.1.4.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Anzucht von *A. thaliana* unter Kurztagbedingungen (SD; 8 h / 16 h) auf GS-90 Einheitserde, welche im Verhältnis 2:1 mit Vermiculit vermischt wurde. Unter Standardbedingungen wuchsen die Pflanzen bei 100 - 120 µE und 40 % Luftfeuchte. Ausgebrachtes Saatgut wurde für 3 Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend für 4 Wochen angezogen. Danach erfolgte für die Blühinduktion ein Transfer in Langtagbedingungen (16 h / 8 h). Je nach Fragestellung wurden die verwendeten Pflanzen weiterhin unter kontinuierlichen Lichtbedingungen (CL; 100 µE), Starklicht (HL; über 750 µE), erhöhten Lichtbedingungen (hL; 350 µE) sowie extremen Kurztagbedingungen (USD; 5 h / 19 h; 80 µE) angezogen.

4.1.4.2. Sterilanzucht von *Arabidopsis thaliana*

Erfolgte eine Anzucht auf MS-Medium, wurde das verwendete Saatgut zuerst für 5 min mit 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde das Saatgut zweimal mit autoklaviertem Wasser gewaschen und auf ½ MS-Agarplatten ausgebracht. Nach einer 3-tägiger Stratifizierung wurden die Samen unter Kurztagbedingungen bei 80 - 90 µE angezogen. Je nach Fragestellung wurde zu dem verwendeten Agarmedium 400µM ALA, 800 µM ALA oder 5 µM Norflurazon hinzugefügt.

4.1.5. Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

Die Anzucht von *N. benthamiana* Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen (16 h / 8 h) und 150 - 250 µE auf Typ-T Einheitserde. Keimlinge wurden für mindestens 3 Wochen angezogen, bevor sie für weitere Experimente genutzt wurden.

4.2. Transformationstechniken

4.2.1. Chemische Transformation von *Escherichia coli*

Für die chemische Transformation *E. coli* wurden 50 µl einer chemisch kompetenten Zellsuspension auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden DNA wurde der Ansatz für 25- 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde ein Hitzeschock (90 sec; 42 °C) durchgeführt. Nach einer Inkubation für 1 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 45 - 60 min bei 37 °C und 250 rpm regeneriert. Ein Aliquot des Transformationsansatzes (50 - 100 µl) wurde auf LB-Agar ausplattiert. Für die Selektion von positiv transformierten Zellen wurde der plasmidspezifische Selektionsmarker verwendet. Die LB-Agar Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von kompetenten *A. tumefaciens* Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurden je nach Dichte 10 - 20 µl einer *A. tumefaciens*-Zellsuspension verwendet und mit 2 ng des zu transformierenden Vektors vermischt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Schlitz) überführt und bei einer Spannung von 1800 V (Kapazität 50 µF, Widerstand 129 Ω) elektroporiert. Zur Regeneration wurden die Zellen in 500 µl YEB-Medium aufgenommen und für 3 - 4 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Zur Selektion von positiven Transformanten wurde ein Aliquot des Gemisches auf YEB-Agar Platten mit vektorspezifischem Selektionsmarker ausplattiert. Die Selektion erfolgte für 3 Tage bei 30 °C.

4.2.3. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

1x Tris-EDTA (TE) Puffer: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0

Lithium-Acetat (LiAc) Puffer: 1 M Lithium-Acetat in TE-Puffer

Die Transformation von Hefe erfolgte mittels der Lithium-Acetat-Methode. Hierfür wurden die verwendeten Hefestämme L40ccuA (Köder) und L40ccuα (Beute) in 5 ml YPAD-Medium inokuliert und bei 28 °C über Nacht angezogen. Am Folgetag wurden 100 ml des vorgewärmten YPAD-Mediums mit der Vorkultur inokuliert, sodass eine optische Dichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,08 - 0,1$ erreicht wurde. Die so hergestellte Hauptkultur wurde bei 28 °C und 180 - 240 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,6$ erreicht wurde. Die Zellen wurden für 5 min bei 2.500 xg und RT pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml sterilem dd-Wasser aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 2.500 xg, RT) wurde das gewonnene Pellet in 0,5 ml LiAc/TE- Puffer resuspendiert. Anschließend wurde der vorbereitete Transformationsmix (Tabelle 4.3) zugefügt. Hierbei war zu beachten, dass die ssDNA zuerst für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend für 1 min auf Eis inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die chemische Transformation für 30 min bei 42 °C durchgeführt. Nach Ablauf der Zeit wurde 1 ml steriles Wasser zum Transformationsansatz hinzugefügt, welcher anschließend kurz zentrifugiert (1 min, 4.000 xg, RT) wurde. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen. Ein Aliquot wurde auf SC-Agar ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

Tabelle 4.3. – Transformationsmix der Licium-Acetat-Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Komponente	Menge
ssDNA (Lachssperma)	1 µl
1 M LiAc	35,5 µl
50 % PEG	240 µl
H ₂ O	78,5 µl
Plasmid-DNA (200 ng)	5 µl
Zellsuspension	50 µl

4.2.4. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Infiltrationsmedium: 1/2 MS; 0,05 % MES; 5 % Saccharose; pH 5,7; (0,05 % Silwett-70)

Für die stabile Transformation von *Arabidopsis* wurde die *floral-drop*-Methode angewandt. Die zu transformierenden Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen zur Blüte gebracht. Vor Beginn der Transformation wurde das Zielplasmid in *A. tumefaciens* eingebracht (Abschnitt 4.2.2). Eine positiv selektierte Kolonie wurde in YEB-Medium mit spezifischem Selektionsmarker inokuliert und über Nacht angezogen. Am folgenden Tag wurden die Zellen pelletiert (8 min, 7.000 xg, RT) und zweimal mit dd-Wasser gewaschen (5 min, 7.000 xg, RT). Anschließend wurde das Pellet in 2 ml Infiltrationsmedium aufgenommen. Die optische Dichte wurde auf OD_{600 nm} = 0,4 eingestellt. Die so vorbereiteten Zellsuspensionen wurden mit 0,05 % Silwett-70 versetzt und vorsichtig auf die noch geschlossenen Blüten geträufelt. Nach der Transformation wurde sichergestellt, dass die Pflanzen für einen Tag hoher Luftfeuchte ausgesetzt waren. Die Transformation wurde 1-2mal für die nachwachsenden Blüten wiederholt. Nach 2-4 Wochen konnten die abgetrockneten Samen geerntet werden.

4.2.5. Transiente Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Infiltrationsmedium: 100 mM MES; 20 mM MgCl₂; 200 µM Acetosyringon

Für die transiente Repression des *TPR1*-Gens wurde das *Virus induced gene silencing* (VIGS) Verfahren verwendet. Hierfür wurde ein 400 bp Fragment von *TPR1* in den pTRV2 Vektor mittels klassischer Klonierung eingebracht. Dieser Vektor wurde anschließend in *A. tumefaciens* transformiert und auf YEB-Agar Platten mit spezifischem Selektionsmarker ausgebracht. Positive Transformanten wurden in YEB-Medium mit spezifischem Selektionsmarker inokuliert und über Nacht inkubiert. Die Kulturen wurden am folgenden Tag für 8 min bei 7.000 xg und RT zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit dd-Wasser gewaschen (8 min, 7.000 xg, RT) und anschließend in Infiltrationsmedium aufgenommen. Die optische Dichte wurde auf OD_{600 nm} = 0,6 eingestellt. Anschließend wurden die Kulturen für 3-4 h bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die pTRV1 und pTRV2-TPR1 Vektoren 1:1 gemischt und mit einer Infiltrationskanüle in die Kotyledonen von 7 Tage alten Keimlingen injiziert. Die Keimlinge wuchsen anschließend für 14 Tage in CL bei 19 °C. Nach 14 Tagen konnte der *Silencing* Effekt nachgewiesen werden.

4.2.6. Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Infiltrationsmedium: 100 mM MES; 20 mM MgCl₂; 100 µM Acetosyringon

Für die transiente Überexpression verschiedener Konstrukte in *N. benthamiana* wurden diese in *A. tumefaciens* transformiert. Nach Übernachtsanzucht der *A. tumefaciens*-Kulturen wurden die Zellen für 8 min bei 7.000 xg und RT pelletiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit dd-Wasser gewaschen (8 min, 7.000 xg, RT) und anschließend in 0,5 ml Infiltrationsmedium aufgenommen. Die optische Dichte wurde auf OD_{600 nm} = 0,3 eingestellt. Anschließend wurden die zu testenden Interaktionspartner 1:1 gemischt und in *N. benthamiana* infiltriert. Die Pflanzen wurden anschließend für 2-3 Tage in Dunkelheit gehalten.

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. DNA

4.3.1.1. Extraktion von DNA aus Blattgewebe

DNA-Extraktionspuffer: 0,1 M Tris; 0,05 M EDTA pH 8,0; 0,5 M NaCl; 1 % (v/v) PVP-40

KOAc: 3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure

Für die Extraktion von DNA wurden ca. 25 mg Blattmaterial geerntet. Das Blattgewebe wurde in 500 µl Extraktionspuffer homogenisiert und mit 66 µl 10 % (w/v) SDS versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT wurden die Proben für 10 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 166 µl KOAc vermischt und für 15 min bei 16.100 xg und RT zentrifugiert. Der dadurch erzeugte Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte daraufhin für 20 min auf Eis. Das durch die anschließende Zentrifugation (20 min, 16.100 xg, 4 °C) gewonnene Pellet wurde zweimal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 16.100 xg, 4 °C). Das Pellet wurde bei RT getrocknet und final in 100 µl RNase-A-Lösung (40 µg/µl in TE-Puffer) resuspendiert. Der RNase Verdau erfolgte für 90 min bei RT.

4.3.1.2. Extraktion von DNA aus Zellkulturen

Puffer 1: 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 ;10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml RNase A

Puffer 2: 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

Puffer 3: 3 M Kaliumacetat in 100 % Essigsäure, pH 5,5

Die über Nacht gewachsene *E. coli*-Zellkultur wurde geerntet (2 min, 16.100 xg, 4 °C) und das Pellet wurde mit 300 µl Puffer 1 versetzt. Die Suspension wurde für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl des Puffers 2 hinzugefügt und die Suspension wurde für weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 300 µl Puffer 3 hinzugegeben und die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 16.100 xg, 4 °C) wurde der Überstand mit 1 Vol Isopropanol vermischt. Die darauffolgende Präzipitation der DNA erfolgte für 10 min bei RT, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 xg, 4 °C). Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 13.000 xg, 4 °C), bei RT getrocknet und abschließend in 50 µl dd-Wasser resuspendiert.

4.3.1.3. Analyse von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) wurde für die Amplifikation von DNA verwendet. Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Sequenz spezifische Primer

benutzt, welche in Tabelle II angegeben sind. Der im Allgemeinen verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Tabelle 4.4. – Verwendeter Reaktionsansatz für die allgemeine Amplifikation von DNA. Die benutzte Polymerase (DreamTaq) wurde von Thermo Scientific bezogen.

Komponente	Volumen
dd-Wasser	7,55 µl
10x Green Buffer	1,00 µl
10 mM dNTPs	0,40µl
10 µM Primer fwd	0,25 µl
10 µM Primer rev	0,25 µl
DreamTaq	0,05 µl
extrahierte DNA	0,50 µl

Die verwendete Programmierung des Thermocyclers (Biorad) ist in Tabelle 4.5 angegeben. Die *Annealing*-Temperaturen wurden in Abhängigkeit der spezifischen Primer gewählt.

Tabelle 4.5. – Verwendete Programmierung des Thermocyclers. Die Elongationszeit wurde, entsprechend der verwendeten DreamTaq-Polymerase, mit 1 kb/min angegeben.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wdh
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	–
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	primerspezifisch	30 sec	
Elongation	72 °C	1 kb/min	35-40
finale Elongation	72 °C	5 min	–

4.3.1.4. DNA Gelelektrophorese

1x Tris-Acetat-EDTA (TAE-Puffer): 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA

Zur Analyse von isolierter DNA oder PCR-Produkten wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, 1 %ige TAE-Agarosegele verwendet. Durch Zugabe von 0,025 µl/ml HD-GreenTM Plus (Intas) wurde doppelsträngige DNA sichtbar gemacht. Zur Kontrolle der Fragmentgröße wurde ein 1 kb DNA-Marker (1 kbp Ladder, Thermo Scientific) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente erfolgte für 30 min bei 90 V in 1x TAE-Puffer. Anschließend wurden die PCR-Amplifikate mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Intas) durch Anregung bei $\lambda = 312$ nm sichtbar gemacht. Wurde das aufgetrennte Fragment für weiter Analysen benötigt, so wurde es mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel ausgeschnitten und konnte so bei -20 °C gelagert werden.

4.3.2. RNA

4.3.2.1. Extraktion von RNA

Zellysepuffer (Lösung 1): 68 mM Na-Zitrat; 132 mM Zitronensäure; 1 mM EDTA; 2 % (w/v) SDS

DNA-Präzipitationspuffer (Lösung 2): 4 M NaCl; 16 mM Na-Zitrat; 32 mM Zitronensäure

Die Extraktion von pflanzlicher RNA erfolgte mittels der Zitratmethode nach Onate-Sanchez und Vincente-Carbajosa [373]. Es wurden hierfür 25 - 50 mg Blattmaterial geerntet und im flüssigen Stickstoff homogenisiert. Anschließend wurden 300 µl der Lösung 1 hinzugefügt. Die Proben wurden für 5 min bzw. bis die Lösung klar wurde bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 wurden die Proben für 10 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Der so erzeugte klare Überstand wurde mit 1 Vol Isopropanol gemischt. Die RNA wurde für 4 min bei 14.000 xg und RT gefällt. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 900 µl 70 % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und abschließend in 25 µl dd-Wasser resuspendiert. Zum Auflösen von sekundären Strukturen wurde die RNA in flüssigem Stickstoff gefroren und daraufhin für 10 min bei 65 °C erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation (2 min, 16.100 xg, 4 °C) wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe des Nanodrops bestimmt.

4.3.2.2. RNA-Gelelektrophorese

0,5x Tris-Borat-EDTA (TBE): 110 mM Tris; 90 mM Borat; 2,5 mM EDTA; pH 8,3

Die Qualitätsbestimmung der extrahierten RNA erfolgte mittels TBE-Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde 1 µg RNA auf ein 1 %iges Agarosegel (in 1x TBE) geladen. Um doppelsträngige RNA sichtbar zu machen, wurden 0,025 µl/ml HD-GreenTM Plus (Intas) hinzugegeben. Die Auftrennung erfolgte für 30 - 40 min bei 70 V. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe eines Transilluminators ($\lambda = 312$ nm; Intas) detektiert.

4.3.2.3. DNase-Verdau und reverse Transkription

Um die extrahierte RNA mittels quantitativer PCR analysieren zu können, musste diese zuerst in cDNA umgewandelt werden. Davor wurde die RNA mit DNaseI behandelt, um verbliebene genomische DNA zu entfernen. Hierfür wurde 1 µg RNA in 4 µl dd-Wasser verdünnt und mit 1 U DNaseI und 1x DNaseI Puffer (Thermo Scientific) versetzt. Der DNA-Verdau erfolgte für 30 min bei 37 °C. Durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und einer Inkubation für 10 min bei 65 °C wurde die DNaseI inaktiviert. Für die reverse Transkription wurde der folgende Reaktionsansatz zur DNase behandelten RNA hinzugegeben (Tabelle 4.6). Die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 42 °C mit abschließender Inaktivierung der Transkriptase für 10 min bei 70 °C. Die gewonnene cDNA wurde mit dd-Wasser 1:5 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4.6. – Verwendeter Reaktionsansatz zur reverse Transkription

Komponente	Volumen
DNase behandelte RNA	4,50 µl
5x RT-Puffer (Thermo Scientific)	2,00 µl
10 mM dNTP-Mix	1,00 µl
10 µM Oligo-dT Primer	0,50 µl
dd-Wasser	0,25 µl
Ribulock-RNase Inhibitor (Thermo Scientific)	0,25 µl
Reverse Transkriptase (Thermo Scientific)	0,50 µl

4.3.2.4. Analyse von Genexpression mittels qPCR

Für die Bestimmung des Transkriptgehalts wurde die umgeschriebene cDNA mit dem in Tabelle 4.7 angegebenen Reaktionsansatz versetzt.

Tabelle 4.7. – Verwendeter Reaktionsansatz für die Bestimmung des Transkriptgehalts mittels qPCR.
Die verwendeten Primer sind in Tabelle II angegeben.

Komponente	Volumen
2x Sensimix (Biotool)	3,00 µl
dd-Wasser	2,20 µl
100 µM Primer fwd	0,15 µl
100 µM Primer rev	0,15 µl
cDNA (1:5)	0,50 µl

Der Nachweis der Transkriptgehalte wurde mit Hilfe eines Thermocyclers (BioRad CFX96 qPCR System) durchgeführt. Das verwendete Programm ist in Tabelle 4.8 angegeben. Die spezifischen Primer wurden hierbei so gewählt, dass sie eine Annealingtemperatur von 60 °C aufwiesen. Die erhaltenen *threshold cycle* (Ct) Werte wurden mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet. Für die Bildung des ΔCt -Wertes wurde Actin als Referenzgen verwendet. Für die Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes wurde, sofern nicht anders angegeben, die gemessenen Transkriptmengen der Probe auf den Transkriptgehalt des gleichbehandelten Wildtyps bezogen.

Tabelle 4.8. – Verwendetes qPCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	Wdh
Initiale Denaturierung	95 °C	30 Sek.	–
Denaturierung	95 °C	10 Sek.	
Annealing und Elongation	60 °C	30 Sek.	40
Denaturierung	95 °C	15 Sek.	–
Schmelzkurve	60 - 95 °C	5 Sek. / 0,5 °C	–

4.3.3. Klonierung

4.3.3.1. Erzeugte und verwendete Vektoren

Die in dieser Arbeit benutzten Ausgangsvektoren wurden in Tabelle 4.9 aufgeführt.

Tabelle 4.9. – Verwendete Ausgangsvektoren.

Bezeichnung	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pJet2.1 blunt	Klonierungsvektor	Amp ^R (100 µM)	Thermo Scientific
pET28a+	Expressionsvektor	Kan ^R (50 µM)	Merck
pTRV1	VIGS Vektor	Kan ^R (50 µM)	[287]
pTRV2	VIGS Vektor	Kan ^R (50 µM)	[287]
pDONOR221	entry GATEWAY Vektor	Kan ^R (50 µM)	Thermo Scientific
pDEST-GW-VYNE	BiFC Vektor	Kan ^R (50 µM)	[374]
pDEST-GW-VYCE	BiFC Vektor	Kan ^R (50 µM)	[374]
pNUB	Split-Ubi Vektor	Amp ^R (100 µM)	[113]
pDHB1	Split-Ubi Vektor	Kan ^R (50 µM)	[113]
pCAMBIA-HA	binärer Vektor	Kan ^R (50 µM)	[239]

Für die Erzeugung von Vektoren erfolgte über zwei unterschiedliche Klonierungsstrategien. Die Wahl der Klonierungsmethode fand dabei in Abhängigkeit der experimentellen Zielstellung statt. Für Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementationsanalysen (BiFC) sowie für Hefe-2-Hybrid Experimente wurde die GATEWAY-vermittelte Klonierung verwendet. Für alle weiteren Konstrukte wurde mit der klassischen, restriktionsvermittelten Klonierung gearbeitet. Eine Übersicht über die erzeugten Vektoren ist in Tabelle 4.3.3.1 zu sehen.

Tabelle 4.10. – Erzeugte und verwendete Vektoren.

Konstrukt	Vektor	Bemerkung
rekombinante Expression		
6xHis-TPR1	pET28a(+)	<i>TPR1</i> cDNA; -TP; -ATG
6xHis-SG1	pET28a(+)	<i>SG1</i> cDNA; -TP; -ATG
SG1-6xHis	pET28a(+)	<i>SG1</i> cDNA; -TP; -ATG
6xHis-TPR7	pET28a(+)	<i>TPR7</i> cDNA; -TP; -ATG
6xHis-TPR9	pET28a(+)	<i>TPR9</i> cDNA; -TP; -ATG
Hefe-2-Hybrid		
TPR1-Cub	pDHB1	<i>TPR1</i> cDNA; -TP; -Stop; erzeugt durch Maxi Rothbart
SG1-Cub	pDHB1	<i>SG1</i> cDNA; -TP; -Stop; erzeugt durch Maxi Rothbart
TPR4-Cub	pDHB1	<i>TPR4</i> cDNA; -TP; -Stop ; erzeugt durch Maxi Rothbart
TPR7-Cub	pDHB1	<i>TPR7</i> cDNA; -TP; -Stop
TPR9-Cub	pDHB1	<i>TPR9</i> cDNA; -TP; -Stop
TPR1-Nub	pNUB	<i>TPR1</i> cDNA; -TP; -Stop; erzeugt durch Maxi Rothbart
SG1-Nub	pNUB	<i>SG1</i> cDNA; -TP; -Stop; erzeugt durch Maxi Rothbart
TPR4-Nub	pNUB	<i>TPR4</i> cDNA; -TP; -Stop; erzeugt durch Maxi Rothbart
TPR7-Nub	pNUB	<i>TPR7</i> cDNA; -TP; -Stop
TPR9-Nub	pNUB	<i>TPR9</i> cDNA; -TP; -Stop
Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation		
TPR1-G1	pDEST-GW-VYNE	<i>TPR1</i> cDNA; +TP; -Stop ; erzeugt durch Maxi Rothbart
SG1-G1	pDEST-GW-VYNE	<i>SG1</i> cDNA; +TP; -Stop ; erzeugt durch Maxi Rothbart
TPR7-G1	pDEST-GW-VYNE	<i>TPR7</i> cDNA; +TP; -Stop

TPR9-G1	pDEST-GW-VYNE	<i>TPR9</i> cDNA; +TP; -Stop
TPR1-G3	pDEST-GW-VYCE	<i>TPR1</i> cDNA; +TP; -Stop ; erzeugt durch Maxi Rothbart
SG1-G3	pDEST-GW-VYCE	<i>SG1</i> cDNA; +TP; -Stop ; erzeugt durch Maxi Rothbart
TPR7-G3	pDEST-GW-VYCE	<i>TPR7</i> cDNA; +TP; -Stop
TPR9-G3	pDEST-GW-VYCE	<i>TPR9</i> cDNA; +TP; -Stop
Komplementation von transgenen Linien		
TPR1-HA	pCAMBIA-HA	<i>TPR1</i> cDNA; +TP; -Stop
TPR9-HA	pCAMBIA-HA	<i>TPR1</i> cDNA; +TP; -Stop
VIGS		
TPR1-VIGS	pTRV2	400 bp <i>TPR1</i> cDNA

4.3.3.2. Restriktionsenzym-vermittelte Klonierung

4.3.3.2.1. Erstellung des Ausgangsfragmentes

Für die klassische Klonierung wurden zwei Restriktionsschnittstellen flankierend zu dem Zielgen angefügt. Für die Erstellung dieses Ausgangsfragmentes wurde Col-0 cDNA als Matrize eingesetzt. Der verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 4.11 aufgeführt. Es wurde das in Abschnitt 4.3.1.3 angegebene PCR-Programm verwendet. Nach Abschluss der PCR wurde der Ansatz mit 5 µl 6x Ladepuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 4.3.1.4). Das Zielfragment wurde ausgeschnitten und aus dem Agarosemedium extrahiert (Invisorb Gelextraktionskit). Die Aufreinigung erfolgte hierbei nach Herstellerangaben. Die Konzentration der extrahierten DNA wurde mittels Nanodrop bestimmt.

Tabelle 4.11. – Phusion PCR Ansatz

Komponenten	Volumen
dd-Wasser	32,70 µl
5x Phusion-Puffer (NEB)	10,00 µl
10 µM Primer fwd	2,50 µl
10 µM Primer rev	2,50 µl
10 mM dNTPs	1,00 µl
cDNA (1:5)	1,00 µl
Phusion Polymerase (NEB)	0,30 µl

4.3.3.2.2. Ligation in pJET2.1

Zur Erzeugung des Zwischenvektors wurde 1 ng des Zielfragments in den pJET2.1-blunt-Vektor ligiert. Der dafür verwendete Ansatz wurde in Tabelle 4.12 zusammengefasst. Der Ligationsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend in DH5α *E. coli* transformiert. Positive Transformanten wurden auf LB-Amp-Agarplatten über Nacht selektiert. Am Folgetag wurde das Vorhandensein des Zielfragments in selektierten Kolonien mittels PCR überprüft. Positive Transformanten wurden in 3 ml LB-Amp-Medium inokuliert und über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde aus den selektierten Kulturen DNA extrahiert.

Tabelle 4.12. – pJET2.1 Ligation

Komponenten	Volumen
2x pJET-Ligations-Puffer (Thermo Scientific)	5,00 µl
pJet2.1-blunt Vektor (Thermo Scientific)	0,50 µl
1 ng Zielfragment	max. 4,00 µl
T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific)	0,50 µl
dd-Wasser	auf 10,00 µl

4.3.3.2.3. Sequenzierung

Um die Richtigkeit von klonierten Sequenzen zu überprüfen, wurden 1 µg der zu untersuchenden DNA mit 4 µl des pJET2.1 fwd Primers (10 µM; Thermo Scientific) auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Die Sequenzierung wurde erfolgt durch LGC-Genomics. Die Auswertung der erzeugten Sequenz wurde mittels Vector NTI (Thermo Scientific) realisiert.

4.3.3.2.4. Restriktionsverdau

Sobald die Sequenz überprüft war, wurde sowohl das Zielfragment als auch der Zielvektor mit den zwei gewählten Restriktionsenzymen verdaut. Der dafür verwendete Ansatz ist in Tabelle 4.13 zu sehen. Der Verdau wurde für 2 h bei der für die Restriktionsenzyme optimalen Temperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden 1,5 µl 6x DNA-Ladepuffer zum Reaktionsansatz hinzugefügt und dieser wurde elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 4.3.1.4). Das Zielfragment wurde aus dem Gel geschnitten und eluiert (Gelextraktionskit; Invisorb). Die Konzentration der DNA wurde mittels Nanodrop bestimmt.

Tabelle 4.13. – Ansatz eines Restriktionsverdaus

Komponente	Volumen
1 µg extrahierte DNA	max. 8,0 µl
Verdau-Puffer	1,0 µl
Restriktionsenzym 1	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	0,5 µl
dd-Wasser	auf 10 µl

4.3.3.2.5. Ligation in den Zielvektor

Für die Ligation des Zielgens in den Endvektor wurden die zuvor verdauten Fragmente (siehe oben) in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt. Die dafür benötigte Menge des Zielfragments wurde mit Hilfe des Ligation Calculators (Insilico; Universität Düsseldorf) ermittelt. Der darauf aufbauende Ligationsansatz wurde in Tabelle 4.14 zusammengefasst. Die Ligation fand für 2 h bei RT statt. Anschließend wurde die T4-DNA-Ligase für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Der gesamte Ligationsansatz wurde in DH5α Zellen transformiert und auf LB-Agarmedium ausplattiert, welches den vektorspezifischen Selektionsmarker enthielt. Die Selektion erfolgte über Nacht bei 37 °C. Am Folgetag wurden mittels PCR die korrekte Insertion des Zielgens verifiziert. Positiv getestete Transformanten wurden in 3 ml LB inokuliert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Anschließend aus erfolgreich selektierten Kulturen DNA isoliert und das finale Plasmid wurde abschließend in den jeweiligen Ziel-Expressionsstamm transformiert.

Tabelle 4.14. – Ligation in den Zielvektor

Komponenten	Volumen
2x T4-Ligase Puffer (NEB)	5,00 µl
25 ng Zielvektor	1,00 µl
x ng Zielfragment	max. 4,00 µl
dd-Wasser	auf 9,50 µl auffüllen
T4-DNA-Ligase (NEB)	0,50 µl

4.3.3.3. GATEWAY®vermittelte Klonierung

4.3.3.3.1. Erstellung des Zielfragmentes mittels *two step* PCR

Bei der GATEWAY-vermittelten Klonierung wurden zwei Rekombinationsstellen flankierend zum Zielgen angefügt, um das Einbringen dieses in den jeweiligen Eingangs- und Zielvektor zu ermöglichen. Die Erstellung dieses Ausgangsfragments erfolgte in zwei Teilschritten. Die dabei verwendeten Reaktionsansätze wurden in Tabelle 4.15 zusammengefasst. Der erste Schritt diente der Amplifikation des Zielgens, welches von zwei Teilsequenzen der Rekombinationsstellen flankiert wurde. Dabei wurde das in Abschnitt 4.3.1.3 beschriebene PCR-Programm genutzt. Im zweiten Schritt erfolgte die Verlängerung der Rekombinationsteilsequenzen aus dem ersten Reaktionsschritt mit Hilfe des in Tabelle 4.16 angegebenen PCR-Programms. Nach Abschluss dieser zwei PCR-Reaktionen wurde der Ansatz mit 10 µl 6x DNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und auf ein 1 %iges Agarosegel geladen. Das Fragment mit der entsprechenden Zielgröße wurde ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Die Elution erfolgte hierbei mit einem Gelextraktionskit (Invisorb) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der DNA wurde abschließend mittels Nanodrop quantifiziert.

Tabelle 4.15. – Reaktionsansätze der GATEWAY®Klonierung

Schritt	Komponente	Volumen
Schritt 1	dd-Wasser	20,10 µl
	5x Phusion Puffer (NEB)	6,00 µl
	10 µM Primer fwd	1,00 µl
	10 µM Primer rev	1,00 µl
	10 mM dNTPs	0,60 µl
	Phusion Polymerase (NEB)	0,30 µl
	cDNA (1:5)	2,00 µl
	PCR für 30 Zyklen	
Schritt 2	Schritt 1 Reaktion	20,00 µl
	dd-Wasser	13,50 µl
	5x Phusion Puffer (NEB)	10,00 µl
	10 µM attB Primer fwd	5,00 µl
	10 µM attB Primer rev	5,00 µl
	10 mM dNTPs	1,00 µl
	Phusion Polymerase (NEB)	0,50 µl

Tabelle 4.16. – Verwendetes PCR-Programm des zweiten Teilschrittes der GATEWAY®Klonierung

Schritt	Temperatur	Zeit	Wdh
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	–
Denaturierung I	95 °C	1 min	
Annealing I	50 °C	30 sec	
Elongation I	72 °C	1 kb/min	15
finale Elongation I	72 °C	5 min	–
Denaturierung II	95 °C	1 min	
Annealing II	65 °C	30 sec	
Elongation II	72 °C	1 kb/min	30
finale Elongation II	72 °C	7 min	–

4.3.3.3.2. Erzeugung des GATEWAY®Eingangsvektors

Die Insertion des eluierten Zielfragmentes in den Eingangsvektor erfolgte per Rekombination, was durch die BP-Clonase (Thermo Scientific) katalysiert wurde. Der dabei verwendete Reaktionsansatz wurde in Tabelle 4.17 angegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde die BP-Clonase nach Zugabe von 1 µl Proteinase K (Thermo Scientific) für 10 min bei 37 °C inhibiert. Im Anschluss wurde der gesamte Reaktionsansatz in DH5α *E. coli* Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agarplatten, welche den vektorspezifischen Selektionsmarker enthielten. Nach positiver Selektion und Verifizierung der vollständigen Insertion des Zielfragmentes mittels PCR, wurden jeweils eine erfolgreich transformierte Kolonie in 4 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht angezogen. Am Folgetag wurde die DNA der Kulturen isoliert. Die Korrektheit des Zielgens wurde durch Sequenzierung überprüft.

Tabelle 4.17. – BP-Reaktion zur Erzeugung des Eingangsvektors

Komponente	Volumen
300 ng pDONR221	1,00 µl
BP-Klonase	2,00 µl
TE-Puffer pH 8,0	2,00 µl
100 ng eluierte DNA	5,00 µl

4.3.3.3.3. Erzeugung des GATEWAY®Zielvektors

Für die Erzeugung des GATEWAY®Zielvektors erfolgte ebenfalls per Rekombination, welche durch die LR-Clonase (Thermo Scientific) katalysiert wurde. Der dabei verwendete Reaktionsansatz wurde in Tabelle 4.18 angegeben. Die Reaktion fand für 1 h bei Raumtemperatur statt und wurde nach Ablauf der Zeit durch die Zugabe von 1 µl Proteinase K inhibiert. Die Inhibition wurde für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz in DB3.1 *E. coli* Zellen transformiert. Positive Transformanten wurden auf LB-Agarmedium, welche den vektorspezifischen Selektionsmarker enthielten, selektiert. Am Folgetag wurden das Vorhandensein des Zielgens mittels PCR überprüft. Im Falle einer verifizierten Transformation des Zielgens wurde die entsprechende Kolonie in 4 ml LB-Medium mit vektorspezifischen Selektionsmarker über Nacht angezogen. Zuletzt wurde die DNA des Zielvektors aus den angewachsenen Kulturen isoliert, aufgereinigt (DNA-Purification Kit; Invisorb) und für die Transformation von Agrobakterien verwendet.

Tabelle 4.18. – LR-Reaktion zur Erzeugung des Zielvektors

Komponente	Volumen
Ausgangsvektor (15-150 ng)	max. 7 μ l
Zielvektor (150 ng/ μ l)	1 μ l
TE-buffer pH 8,0	auf 8 μ l auffüllen
LR-Klonase (Thermo Scientific)	2 μ l

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Expression von rekombinanten Proteinen

Für *in vitro* Ansätze und zur Herstellung von spezifischen Antikörpern wurden die selektierten TPR-Proteine in *E.coli* rekombinant zur Expression gebracht. Zuvor wurde der entsprechende Expressionsvektor durch klassische Klonierung erzeugt. Dieser Vektor wurde in den verwendeten Expressionsstamm transformiert. Die Transformanten wurden auf LB-Agarmedium, welches den vektorspezifischen Selektionsmarker enthielt, über Nacht selektiert. Am Folgetag wurde je eine positiv selektierte Kolonie in 4 ml LB-Medium inokuliert und erneut über Nacht inkubiert. Diese so erstellte Vorkultur wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:100 zum Animpfen der Hauptkultur eingesetzt. Die Hauptkultur wurde so lange bei 37 °C inkubiert, bis eine optische Dichte von $OD_{600\text{ nm}} = 0,6 - 0,8$ erreicht wurde. Danach erfolgte die Induktion der Expression mit 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Um den optimalen Zeitpunkt der Zellernte zu bestimmen, wurde aus einer Testkultur zum Zeitpunkt 1, 2, 4 und 24 h ein Aliquot entnommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse auf das Vorhandensein des Zielproteins untersucht. Meist lag dieser Zeitpunkt zwischen 2- 4 h nach Induktion Expression mit IPTG. Nach Ablauf dieser vorher getesteten Zeit wurde die Kultur geerntet (8 min; 8.000 xg; 4 °C) und das erzeugte Zellepellet konnte bei - 20 °C gelagert werden.

4.4.2. Aufreinigung der rekombinant erzeugten Proteine unter nativen Bedingungen

Lysispuffer: 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0

Waschpuffer: 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0

Vorelutionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 100 mM Imidazol; pH 8,0

Elutionspuffer: 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,

Für die Aufreinigung der rekombinant erzeugten Proteine wurde das *batch*-Verfahren verwendet. Hierbei wurde der am Zielgen angefügte Hexahistidin (6x-His)-Tag genutzt. Dieser Tag interagiert dabei spezifisch mit der eingesetzten Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Matrix und ermöglicht so die Aufreinigung der exprimierten Proteine. Zuerst wurde dafür ein klares Zelllysate aus den vorher geernteten Zellpellet (siehe Abschnitt 4.4.1) erzeugt. Hierfür wurde dieses Pellet für 30 min bei -80 °C gefroren. Nach Zugabe von 5 ml /g Lysispuffer wurde das gefrorene Pellet durch Inkubation für 30 min bei 4 °C wieder erwärmt. Anschließend wurden 1 mg/ml Lysozym hinzugefügt und die Zellsuspension wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Mittels Sonifikation (2 min, 5x10 Zyklen, 30 %) wurden die Zellen aufgeschlossen. Die verbliebenen Zellfragmente wurden pelletiert (30 min, 16.100 xg, 4 °C) und der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um etwaige größere lösliche Zellfragmente zu eliminieren,

wurde das Zelllysate gefiltert (Spritzenfilter, $\varnothing = 45 \mu\text{m}$). Das so gewonnene Zelllysate wurde für das *batch*-Verfahren eingesetzt. Hierfür wurde das Zelllysate mit 300 μl Ni-NTA-Kügelchen für 1 h bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das gesamte Lysat auf eine Säule (Quiagen) geladen und ein Aliquot des Durchflusses wurde für weitere Analysen aufgefangen. Die Säule wurde zweimal mit 5 ml Waschpuffer gewaschen, wobei ein Aliquot der jeweiligen Waschfraktion aufgefangen wurde. Um die Reinheit des eluierten Proteins zu erhöhen, wurde in einigen Fällen eine Vorelution vorgenommen. Dafür wurde das 0,5fache des Säulenvolumens an Vorelutionspuffer auf die Säule gegeben und im Nachgang vollständig aufgefangen. Das Zielprotein wurde daraufhin mit dem 0,5fachen Säulenvolumen des Elutionspuffers eluiert. Diese Elution wurde zweidreimal wiederholt. Die so gewonnenen Fraktion wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassiefärbung bzw. Immunodetektion auf das Vorhandensein des exprimierten Proteins hin untersucht.

4.4.3. Herstellung von Antikörpern

Für die Herstellung spezifischer Antikörper gegen TPR1 und TPR9 wurden die rekombinant in *E. coli* exprimierten 6xHis-TPR1 und 6xHis-TPR9 Proteine als Antigene eingesetzt. Beide Proteine wurden unter nativen Bedingungen aus *E. coli* aufgereinigt und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Die Immunisierung der entsprechenden Kaninchen sowie die Gewinnung der Seren wurden durch die Firma BioGenes (DE) durchgeführt. Der dabei Firma BioGenes verwendete Immunisierungsplan wurde in Tabelle 4.19 zusammengefasst. Die finalen Seren konnten, dank hoher Spezifität, in einer Verdünnung von 1:2000 für den immunologischen Nachweis der Antigene verwendet werden. Aliquots der Antiseren wurden mit 20 % Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4.19. – Immunisierungsplan zur Herstellung von spezifischen Antikörpern in Kaninchen

Zeit	Bemerkung
0 d	Erstimmunisierung
7 d	Folge-Immunisierung
14 d	Folge-Immunisierung
28 d	Gewinn des ersten Serums
47 d	Folge-Immunisierung
61 d	Gewinnung des finales Serums

4.4.4. Aufreinigung der hergestellten Antiseren

Blockinglösung: 0,2 % Milchpulver in TBS-T

Glycinpuffer: 0,2 M Glycin; 0,5 M NaCl; 1 mg/ml BSA; pH 2,5 - 3

Für die Aufreinigung der gewonnenen Antiseren wurden 20 μl einer 1 mg/ml konzentrierten Antigenlösung auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Die Membran wurde für 1 h bei RT in 10 ml Blockinglösung inkubiert. Das Antiserum wurde 1:5 mit Blockinglösung verdünnt und nach Abschluss der Inkubationszeit auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde die Membran 5 x 5 min mit je 5 ml Blockinglösung gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch 0,5 ml des Glycinpuffers. Nach Zugabe des Puffers wurde der Ansatz für 1 min bei RT inkubiert und dabei vorsichtig invertiert. Die Glycinlösung wurde daraufhin mit 100 μM 1 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert. Die so gereinigten Antikörper wurden

in einer 1: 250 Verdünnung für den immunologischen Nachweis der Antigene verwendet.

4.4.5. Analyse von Proteinextrakten

4.4.5.1. Gewinnung von Proteingestamtexttrakten

2x Lämmli-Probenpuffer (2x PP):

126 mM Tris/HCl (pH 6,8); 20 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Für die Analyse des Gesamtproteingehaltes wurden 25 - 50 mg Frischgewicht geerntet. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 10 µl/mg 2x PP aufgenommen. Das Homogenat wurde für 10 min bei 95 °C aufgeköcht und daraufhin für 1 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde entweder direkt für die elektrophoretische Auftrennung verwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.4.5.2. Gewinnung von fraktionierten Proteinextrakten

phosphate buffered saline (PBS) Puffer:

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂HPO₄; pH 7,4

Zur Auftrennung der löslichen und membrangebundenen Proteinfraction nach Schmie^d *et al.* [93] wurden ca. 25 mg Blattmaterial geerntet. Nach der Homogenisierung der Proben in flüssigem Stickstoff wurden 220 µl PBS-Puffer zugefügt und das Homogenat wurden für 10 min aus Eis inkubiert. Anschließend wurde ein 20 µl Aliquot entnommen und mit 1 Vol 2x PP versetzt. Das verbleibende Homogenat wurden für 15 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Es wurden 100 µl von der entstandenen löslichen Phase entnommen und mit 1 Vol 2x PP versetzt. Das verbleibende Pellet wurde einmal mit 300 µl PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, 16.100 xg, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl PBS und 1 Vol 2x PP resuspendiert. Alle mit 2x PP versetzten Proben wurden für 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend für 1 min bei 14.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Die erzeugten Fraktionen wurden entweder direkt mittels SDS-PAGE analysiert oder bei -20 °C gelagert.

4.4.5.3. Analyse der Proteinextrakte mittels Polyacrylamidgelen

Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS

Für die Analyse von Proteingehalten durch Coomassiefärbung oder immunologische Detektion wurden die extrahierten Proteine vorher durch SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele wurde in Tabelle 4.20 zusammengefasst. Für die Auftrennung der photosynthetischen Untereinheiten wurde 6 M Harnstoff zum Trenngel hinzugefügt. Unter Verwendung des Laufpuffers liefen die Proben 10-20 min bei 100 V in das Gel ein und wurden anschließend bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde die Auftrennung gestoppt. Das Gel wurde entweder mit Coomassie gefärbt oder für den Western-Blot-Transfer genutzt.

Tabelle 4.20. – Zusammensetzung der SDS-Gele

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
1,5 Tris-HCl pH 8,8	375 mM	–
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	–	125 mM
Acrylamid	10 - 15 %	4 %
SDS	0,1 %	0,1 %
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	0,1 %	0,1 %
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	0,1 %	0,1 %

4.4.5.4. Western Blot und Immundetektion

Western-Blot-Transferpuffer: 20 % Methanol; 25 mM Tris; 192 mM Glycin

Blockinglösung: 2 % (w/v) Milchpulver in TBS-T

Im Zuge des immunologischen Nachweises von Proteingehalten wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine mittels *semidry* Western-Blot-Technik auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Gel und die Membran wurden dafür zwischen je drei Lagen Whatman-Papier gelegt und mit Transferpuffer befeuchtet. Die Übertragung der Proteine wurde durch das Anlegen von Spannung unterstützt, deren Höhe wie folgt berechnet wurde: Gellänge * Gelhöhe * Geldicke $\hat{=}$ mA / Gel. Der Transfer fand je nach Geldicke für 75-90 min statt. Anschließend wurde das Gel verworfen und die Membran für 1 h mit 10 ml Blockinglösung inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran je einmal mit 5 ml TBS-T und TBS gewaschen (3 min). Der primäre Antikörper wurde in der in Tabelle 4.21 angegebenen Verdünnung verwendet und über Nacht mit der Nitrocellulosemembran inkubiert. Am Folgetag wurde nach einmaligem Waschen mit 5 ml TBS-T und zweimaligem Waschen mit 5 ml TBS (jeweils 10 min) der sekundäre Antikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tab. 4.21) auf die Membran gegeben. Nach 1-2 h Inkubation wurde die Membran einmal mit 5 ml TBS-T und dreimal mit 5 ml TBS gewaschen (jeweils 7 min). Anschließend erfolgte der Nachweis der gebundenen Antikörper mit Hilfe des Clarity™ Reagenz. Dieses stellt die Substrate für die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) bereit. In Anwesenheit der HRP wird das Substrat in einen luminiszierenden Farbstoff umgewandelt, welcher detektiert werden kann. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit einer CCD Kamera (ChemoStar ECL, Intas).

Tabelle 4.21. – Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Charakteristika	Verdünnung	Referenz
α ALAD	polyklonal	1:2000	[375]
α GluTR1	polyklonal	1:2000	[376]
α GluTRBP	polyklonal	1:2000	[149]
α FLU	polyklonal	1:2000	[143]
α CHLM	polyklonal	1:2000	[377]
α GUN4	polyklonal	1:2000	[67]
α YCF54	polyklonal	1:2000	Agrisera (AS10 936)
α CHL27	polyklonal	1:2000	Agrisera (AS06 122)
α PORA/B	polyklonal	1:2000	Agrisera (AS05 067)
α LIL3.1	polyklonal	1:2000	AG Adamska, Universität Konstanz
α FNR1	polyklonal	1:2000	M. R. Hajirezaei, IPK Gatersleben
α LHCA1	polyklonal	1:5000	Agrisera (AS01 005)
α LHCB1	polyklonal	1:5000	Agrisera (AS01 004)
α PsbA / D1	polyklonal	1:5000	Agrisera (AS05 084)
α PsbB / CP47	polyklonal	1:2000	Agrisera (AS04 038)
α PsbC /CP43	polyklonal	1:2000	Agrisera (AS11 1787)
α Phosphothreonin	polyklonal	1:2000	Agrisera (AS18 4171)
α Rabbit	monoklonal	1:20.000	Agrisera (AS09602)

4.4.5.5. Färbung mit Coomassie

Coomassie-Färbelösung: 0,5 % Coomassie Brilliant Blau R250; 50 % Methanol; 7 % Essigsäure

Nach Abschluss der Elektrophorese konnten die aufgetrennten Proteine durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau (G-250) nachgewiesen werden. Hierfür wurde das Gel für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und durch dd-Wasser ersetzt. Das Gel wurde für 2x 5 min aufgekocht und das Bandenmuster wurde photographisch festgehalten.

4.5. Enzymaktivitäten

4.5.1. ALA-Synthesekapazität

Puffer 1: 20 mM Kalium-Phosphat pH 6,8; 40 mM Lävulinsäure

Puffer 2: 20 mM Kalium-Phosphat pH 7,2

modifiziertes Ehrlichsreagenz: 12,6 % (v/v) Perchlorsäure; 74,6 % (v/v) Eisessig; 11,4 % (w/v) Quecksilberchlorid; 0,4 % 4-(N,N-Dimethylamino)benzaldehyd

Für die Bestimmung der ALA-Synthesekapazität wurden Blattscheiben aus adulten *A. thaliana* Pflanzen ausgestanzt und für 4 h bei 100 µE in Puffer 1 inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gewebe aus dem Puffer entfernt und in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die Probe wurde mit 400 µl Puffer 2 versetzt und invertiert. Das Homogenat wurde mit 100 µl Essigsäureethylester vermischt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Nach einer kurzen Abkühlzeit (3 min) auf Eis wurde modifiziertes Ehrlichsreagenz in einem 1:1 Verhältnis hinzugefügt. Die Reaktion wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (3 min, 5000 xg, 20 °C). Die Vermessung des Überstandes erfolgte bei 525, 553 und 600 nm. Durch das Verhältnis zwischen $A_{553\text{ nm}}/A_{525\text{ nm}}$ konnte die Qualität der Proben überprüft werden, wobei das Verhältnis zwischen 1,3 und 1,5 liegen sollte. Die Konzentration von ALA wurde mit Hilfe einer zuvor erstellten Standardreihe nach der folgenden Gleichung (2.1) berechnet.

$$c_{ALA} \left(\frac{\text{pmol}}{\text{mg} * \text{h}} \right) = \frac{A_{525\text{nm}}}{\text{Steigung}_{\text{Standard}} * VF * \text{Zeit}} \quad (4.1)$$

4.5.2. ALAD-Aktivitätsmessung

Extraktionspuffer: 25 mM Tris/ HCl pH 8,2; 5 mM DTT

2x Reaktionspuffer: 25 mM Tris/ HCl pH 8,2; 5 mM DTT; 10 mM ALA; 12 mM MgCl₂

Für die Bestimmung der ALAD-Aktivität wurden ca. 25 mg Blattmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff homogenisiert und mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt von einer Stunde (16.100 xg; 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1 Vol 2x Reaktionspuffer wurde die Reaktion gestartet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl 3 M Trichloressigsäure gestoppt. Durch Zentrifugation (16.100 xg; 10 min; 4 °C) wurden größere Zellfragmente pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 Vol modifiziertem Ehrlichsreagenz versetzt und daraufhin für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (16.100 xg; 10 min; 4 °C) wurde der Überstand bei 555 und 600 nm vermessen. Die Kalkulation der ALAD-Aktivität erfolgte mit der angegebenen Gleichung (2.2). Die Steigung der PBG-Standardkurve betrug in diesem Fall 0,044 pmol/nm.

$$ALAD_{Aktivität} \left(\frac{pmol}{mg * h} \right) = \frac{A_{555nm}}{Steigung_{Standard} * VF * Zeit} \quad (4.2)$$

4.5.3. POR-Aktivitätsmessung

POR ist ein überaus lichtempfindliches Enzym, sodass bislang für Pflanzengewebe kein zuverlässiger *in vitro* Ansatz entwickelt werden konnte. Um dennoch eine Annäherung an die POR-Aktivität *in planta* zu bekommen, wurde die POR-Aktivitätsmessung nach Biswal *et al.* verwendet [275]. Dafür wurden die zu testende *A. thaliana* Pflanzen für sechs Stunden im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der PChlid- und Chlid-Gehalte mittels HPLC. Die Pflanzen wurden daraufhin für 10 min einem 100 µE Lichtreiz ausgesetzt. Nach Ablauf der Zeit wurden abermals die Gehalte von PChlid und Chlid bestimmt. Die Differenz der ermittelten Gehalte vor und nach der Inkubation im Licht lieferten dabei eine grobe Annäherung an die POR Aktivität *in planta*.

4.6. Analyse von plastidären Proteinkomplexen

4.6.1. Isolation von Thylakoidmembranen

Homogenisierungspuffer (HB):

0,45 M Sorbitol; 20 mM Tricin/KOH pH 8,4; 10 mM EDTA pH 8,0; 10 mM NaHCO₃

Waschpuffer: 10 mM Tricin; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl₂

BTHG-Puffer: 25 mM Bis-Tris pH 7,0; 30 % (v/v) Glycerin

Für die Isolation von nativen Proteinkomplexen wurden 4-5 Wochen alte *A. thaliana* Rosettenpflanzen vollständig geerntet und in 15 ml HB homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine Lage Filterseide (Miracloth) gefiltert und für 4 min bei 5.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen (4 min, 5.000 xg und 4 °C). Zum Schluss wurde das Pellet in 1 ml BTHG aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

4.6.2. Blau-Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese

3x Gel-Puffer: 150 mM BisTris-HCl; 1,5 M 6-Aminocapronsäure; pH 7,0

10x Kathodenpuffer: 0,5 M Tricin; 150 mM BisTris; (0,01 % Coomassie Brillant Blau G250)

5x Anodenpuffer: 0,25 M BisTris-HCl; pH 7,0

10x Blau-Nativ-Probenpuffer (BN-PP): 100 mM BisTris-HCl; 0,5 M 6-Aminocapronsäure; 30 % Glycerin; 0,05 % Coomassie Brillant Blau G250; pH 7,0

1x SDS-Probenpuffer:

50 mM Tris-HCl pH6,8; 10 % (v/v) Glycerin; 2 % (w/v) SDS; 0,002 % Bromphenolblau; 50 mM DTT

Zur Untersuchung der photosynthetischen Komplexe wurde die Blau-Nativ-PAGE (BN-PAGE) verwendet. Hierbei wurden 4-12,5 %ige Gradientengele genutzt. Die Zusammensetzung der dafür benötigten Lösungen wurde in Tabelle 4.22 aufgeführt. Für die Auftrennung wurden Proteinproben mit einer Chlorophyllmenge von 8 µg eingesetzt. Das benötigte Volumen der Thylakoidsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 12.000 xg, 4 °C) und in 16 µl BTHG aufgenommen, um eine Konzentration von 0,5 µg/µl Chlorophyll zu erreichen. Für die Solubilisierung der Thylakoidmembranen wurden 0,8 % n-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside (DDM) zugefügt und die Lösung wurde für 5 min bei 60 rpm auf Eis inkubiert. Nach dem Pelletieren der ungelösten Fragmente (10 min, 16.000 xg, 4 °C) wurde der Überstand mit 0,1 Vol 10x BN-PP versetzt und auf das Gradientengel geladen. Zu Beginn der Elektrophorese wurde Anodenpuffer mit 0,01 % Coomassie verwendet, welcher nach etwa der Hälfte der Elektrophorese gegen Anodenpuffer ohne Coomassie ausgetauscht wurde. Zur Auftrennung der Komplexe wurde die Anfangsspannung von 50 V alle 30 min um 25 V erhöht, bis eine maximale Spannung von 200 V erreicht wurde. Die photosynthetischen Komplexe wurde so lange bei 200 V aufgetrennt bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Bandenmuster photographisch festgehalten. Für den Fall, dass die Proteinkomplexe ebenfalls in der zweiten Dimension aufgetrennt werden sollten, wurde das Gel für 30 min in 1x SDS-Probenpuffer inkubiert und anschließend auf ein 12 % SDS-Gel geladen. Die Auftrennung der zweiten Dimension erfolgte wie gehabt (Abschnitt 4.4.5.3).

Tabelle 4.22. – Zusammensetzung der Lösungen zur Erstellung eines 4-12,5 %igen Gradientengels

Komponenten	4 % Lösung	12,5 % Lösung	Sammelgel
dd-Wasser	1,257 ml	0,125 ml	1,720 ml
3x Gelpuffer	0,833 ml	0,833 ml	1,000 ml
75 % Glycerin	0,150 ml	0,750 ml	—
40 % Acrylamid	0,250 ml	0,781 ml	0,300 ml
TEMED	3,0 µl	3,0 µl	6,0 µl
10 % APS	7,5 µl	7,5 µl	16,0 µl
Gesamtvolumen	2,50 ml	2,50 ml	3,00 ml
für Gradienten	1,75 ml	1,65 ml	—

4.6.3. Subfraktionierung von Thylakoidmembranen

Fraktionierungspuffer: 15 mM Tricine pH7,8; 100 mM Sorbitol; 10 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

Die Subfraktionierung von Thylakoidmembranen wurde nach Lu *et al.* vorgenommen [378]. Dafür wurden zuvor isolierte Thylakoidmembranen so in Fraktionierungspuffer aufgenommen, dass der Chlorophyllgehalt bei 1 mg/ml Chlorophyll lag. Diese Thylakoidlösung wurde daraufhin mit 0,8 % Digitonin versetzt und für 2 min bei RT inkubiert. In der darauf folgenden Zentrifugation (1000 xg; 5 min; 4 °C) wurden nicht solubilisierte Zellkompartimente pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (10.000 xg; 30 min; 4 °C). Das so erzeugte Pellet entsprach der Granastapel angereicherten Fraktion. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (40.000 xg; 30 min; 4 °C) wurde die Granamargin angereicherte Fraktion erzeugt. Für die Herstellung der Stromalamellen angereicherten Fraktion wurde der Überstand erneut zentrifugiert (144.000 xg; 60 min; 4 °C). Alle erzeugten Fraktionen wurden in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen (Abschnitt 4.4.5.1) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

4.6.4. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Homogenisierungspuffer 6 (H6): 5 mM HEPES pH 7,5; 10 mM EDTA pH8,0

Die Auftrennung von isolierten Thylakoidmembranen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation erfolgte nach Trompelt *et al.* [379]. Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen des Gradienten wurde in Tabelle 4.23 aufgeführt. Für den Gradienten wurden je 1 ml der 1,3 M und 1 M Saccharoselösung sowie 2 ml für alle weiteren Saccharoselösungen verwendet. Jede Schicht des Gradienten wurde für 20 min bei - 20 °C inkubiert, bevor die nächste Schicht überlagert wurde. Der finale Gradient wurde über Nacht bei 4 °C gelagert. Am Folgetag wurden Thylakoidmembranen frisch isoliert (Abschnitt 4.6.1) und in H6-Puffer resuspendiert, sodass der Chlorophyllgehalt auf 0,8 mg/ml Chlorophyll eingestellt wurde. Die Thylakoidlösung wurde daraufhin mit 0,6 % DDM versetzt und 700 µl dieser Suspension wurden auf den Gradienten geladen. Die Fraktionierung der Thylakoidmembranen erfolgte für 16 h bei 134.470 xg und 4 °C. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der erzeugte Gradient in 21 Fraktionen zu je 510 µl unterteilt.

Tabelle 4.23. – Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen des Saccharose-Gradienten. Die angegebene Konzentration entspricht der Konzentration von Saccharose im Gradienten.

Konzentration	2 M Saccharose	10 % DDM	0,5 M Trincin pH 8,0	dd-H ₂ O
1,3 M	13 ml	100 µl	200 µl	6,7 ml
1,0 M	10 ml	100 µl	200 µl	9,7 ml
0,85 M	8,5 ml	100 µl	200 µl	11,2 ml
0,7 M	7 ml	100 µl	200 µl	12,7 ml
0,65 M	6,5 ml	100 µl	200 µl	13,2 ml
0,4 M	4 ml	100 µl	200 µl	15,7 ml

4.6.5. Chloroplastenisolation

Homogenisierungspuffer (HB):

0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 5 mM EGTA; 1 mM MgCl₂; 10 mM NaHCO₃

Resuspensionspuffer (RB):

1,5 M Sorbitol; 100 mM Tricin/KOH pH 8,4; 12,5 mM EDTA pH 8,0; 25 mM MgCl₂

Für die Isolation von intakten Chloroplasten wurden ca. 2 - 5 g Blattmaterial geerntet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in 250 ml HB mit Hilfe eines *Waring blenders*. Anschließend wurde das Homogenat durch eine Lage Filterseide (Miracloth) gefiltert. Die so gewonnene Lösung wurde für 8 min zentrifugiert (500 xg; 4 °C) und das erzeugte Pellet wurde in 1 ml RB durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Diese Suspension wurde daraufhin auf einen Percoll-Gradienten (12 ml 40 %; 13 ml 80 % Percoll in RB) aufgetragen. Die Isolation der Chloroplasten fand für 30 min bei 6500 xg und 4 °C statt. Nach Abschluss der Zentrifugation waren die intakten Chloroplasten zwischen den beiden Percoll-Schichten zu finden. Die Chloroplasten wurden vorsichtig entnommen und in 20 ml RB überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (6 min; 3.800 xg; 4 °C), durch welchen das Percoll entfernt wurde, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen.

4.6.6. Solubilisierung von intakten Chloroplasten

Zur Gewinnung von solubilisierten Chloroplasten wurde zuerst der Chlorophyllgehalt der Lösung bestimmt (Abschnitt 4.8.4). Anschließend wurden 0,8 % DDM , bezogen auf den Gesamtchlorophyllgehalt, zu der Chloroplastenlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis und gelegentlichem Invertieren wurde die Probe für 30 min bei 16.100 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.6.7. Fraktionierung von Chloroplasten

Schockmedium: 100 mM Tricin/KOH pH 8,4; 12,5 mM EDTA pH 8,0; 25 mM MgCl₂

Für die Fraktionierung von intakten Chloroplasten wurden diese nach der Isolation (Abschnitt 4.6.5) in 1 ml Schockmedium resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (16.100 xg; 10 min; 4 °C), der gewonnene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in 1x SDS-Probenpuffer (Abschnitt 4.4.5.1) aufgenommen. Das Pellet wurde einmal mit Schockmedium gewaschen (16.100 xg; 3 min; 4 °C) und danach ebenfalls mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt. Die gewonnenen Fraktionen konnten direkt für die SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden.

4.7. Methoden zur Analyse funktioneller Chloroplasten

4.7.1. Tieftemperatur-Chlorophyllfluoreszenz

LHC-Puffer: 50 mM Tricin; 0,4 M Sorbitol; pH 7,8

Für die Analyse der Tieftemperatur-(77K)-Fluoreszenz von Chlorophyll wurde jeweils eine Blattscheibe ($\varnothing = 5$ mm) geerntet, mit 300 μ l LHC-Puffer versetzt und mit einem Pistill zerkleinert. Zu diesem Homogenat wurden 300 μ l 80 % Glycerin hinzugegeben und gut vermischt. Für die anschließende Messung wurde diese Lösung in eine Kapillare aufgezogen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Vermessung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Spektrophotometers (F-7000, Hitachi). Hierbei wurden die Proben sofern nicht anders vermerkt bei $\lambda_{nm} = 440$ nm angeregt. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde zwischen $\lambda_{nm} = 650 - 800$ nm aufgezeichnet. Im Falle der Analyse der PChlid-Gehalte in etiolierten Keimlingen wurden die Kotyledonen von 10 Keimlingen geerntet und in 300 μ l LHC-Puffer homogenisiert. Die weitere Probenbehandlung erfolgte analog zur Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz. Allerdings wurde die PChlid-Fluoreszenz bei $\lambda_{nm} = 433$ nm angeregt und zwischen $\lambda_{nm} = 620 - 720$ nm detektiert.

4.7.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Fixierlösung: 0,1 M Natrium-Phosphat pH 7,4; 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd; 4 % (v/v) Formaldehyd

Die Strukturanalysen der Chloroplasten durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde in Zusammenarbeit mit Stefan Geimer und Reinhild Rothe an der Universität Bayreuth vorgenommen. Das entsprechende Blattmaterial wurde in ca. 1 x 2 mm große Stücke geschnitten und mit der Fixierlösung vakuuminfiltiert. Anschließend wurden die Proben zur weiteren Vermessung an die Universität Bayreuth versandt.

4.7.3. Pulsamplitudenmodulation (PAM)

Für die Bestimmung der photosynthetischen Leistung des PSII wurde die Pulsamplitudenmodulation (PAM) verwendet. Vor Beginn der Messung wurden die jeweiligen Pflanzen für 15 min in Dunkelheit adaptiert. Anschließend erfolgte die Messung der photosynthetischen Leistung durch das unten angegebene Programm 4.24. Für die Bestimmung der effektiven Quantenausbeute sowie des NPQs in Abhängigkeit der Lichtintensität wurde das unten angegebene Programm so modifiziert, dass die Schritte 5 und 6 mehrfach wiederholt wurden, wobei bei jeder Wiederholung die Lichtintensität anstieg. Die dabei verwendeten Lichtintensitäten lagen bei 89, 189, 300, 422, 622 und 822 μ E.

Tabelle 4.24. – PAM Programm zur Bestimmung der photosynthetischen Leistung

Schritt	Bezeichnung	Dauer	Licht
1	F_0	s	650 nm Rotlicht
2	Sättigungspuls	800 ms	6000 μ E
3	Warten	60 s	kein Licht
4	PS		Aktinisches Licht an
5	Puls	0,8 s	100 μ E
6	Warten	60 s	kein Licht
7	Wiederholung von Schritt 5 und Schritt 6		
8	F_0'	30 s	kein Licht

4.8. Extraktionen von Metaboliten

4.8.1. Analyse von Anthocyanen

Extraktionspuffer: 1 % (v/v) HCl; 18 % (v/v) 1-Propanol in dd-Wasser

Für die Bestimmung des Anthocyangehalts wurden zwischen 15 und 10 mg des jeweiligen Pflanzenmaterials eingesetzt. Das Gewebe wurde in 500 µl Extraktionspuffer homogenisiert und für 2-3 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (16.100 xg; 15 min; RT) und der Überstand wurde bei 535 und 600 nm vermessen. Die Differenz aus beiden Absorptionen, dividiert durch das eingesetzte Frischgewicht, entsprach dem Anthocyangehalt der Probe.

4.8.2. ALA Konzentrationen

Für die Messung des ALA-Gehalts wurden ca. 250 mg Trockengewicht des verwendeten Pflanzenmaterials eingesetzt. Zur Probe wurden 450 µl Puffer 2 (siehe Abschnitt 4.5.1) hinzugegeben und diese wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (16.100 xg; 10 min; 4 °C), der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und abermals zentrifugiert (16.100 xg; 4 °C). Der so gewonnene Überstand (400 µl) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Essigsäureethylester versetzt. Das weitere Vorgehen geschah analog zur Bestimmung der ALA-Synthesekapazität (siehe Abschnitt 4.5.1). Die finale Berechnung des ALA-Gehalts wurde mit Hilfe von Gleichung 2.3 bestimmt.

$$c_{ALA} \left(\frac{pmol}{mg} \right) = \frac{A_{525nm}}{Steigung_{Standard} * VF} \quad (4.3)$$

4.8.3. Extraktion von Pigmenten und TBS-Intermediaten

Basischer Aceton: 90 % (v/v) Aceton; 10 % (v/v) 0,2 M NH₄OH

Für die Extraktion von Chlorophyllen und TBS-Intermediaten wurden ca. 20 mg Frischgewicht bzw. 2 mg Trockengewicht des verwendeten Blattmaterials verwendet. Nach Zugabe von 400 - 500 µl basischem Aceton erfolgte die Extraktion für 20 min bei -20 °C in Dunkelheit. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben zentrifugiert (16.100 xg; 10 min; 4 °C) und der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde so oft wiederholt, bis das verbleibende Pellet keine grüne Färbung mehr aufwies. Die Überstände aller Extraktionsschritte wurden vereint und entweder direkt für die weitere Analyse mittels HPLC verwendet oder bei -20 °C gelagert. Vor Beginn der HPLC-Messung wurden die Proben abermals zentrifugiert (30 min; 16.100 xg; 4 °C).

4.8.4. Photometrische Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoiden

Für die Bestimmung der Chlorophyllgehalte wurde die Methode nach Lichtenthaler *et al.* verwendet [380]. Dafür wurde ein Aliquot der zu vermessenden Probe mit 80 % Aceton auf ein Volumen von 1 ml gebracht und für 2-3 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte bei 470, 646, 663 und 720 nm. Die Konzentration von Carotinoiden und Chlorophyllen wurde mit Hilfe der Gleichungen 4.4-4.6 berechnet.

$$c_{Chla} \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = 12,25A_{663nm} - 2,04A_{646nm} \quad (4.4)$$

$$c_{Chlb} \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = 21,50A_{646nm} - 5,10A_{663nm} \quad (4.5)$$

$$c_{Car} \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = (1000A_{470nm} - 1,82c_{Chla} - 85,02c_{Chlb})/198 \quad (4.6)$$

4.8.5. Analyse von Pigmenten mittels HPLC

Laufmittel A: 90% Acetonitril 10% H₂O; 0,1% Triethylamin

Laufmittel B: 100 % Ethylacetat

Für die Bestimmung verschiedener Pigmentgehalte wurden 30 - 50 µl des Überstandes (Abschnitt 4.8.3) eingesetzt. Die isolierten Pigmente wurden mit Hilfe einer Protosil Säule 200-3-C30 (3 µm) aufgetrennt. Das verwendete Laufprogramm ist in Tabelle 4.25 angegeben. Die quantitative Bestimmung der Pigmente wurden mittels Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 440$ nm ermöglicht. Für alle bestimmbar Pigmente wurde ein Standardwert verwendet, welcher für 10 pmol des jeweiligen Pigmentes bestimmt wurde.

Tabelle 4.25. – Methode zur Bestimmung der Pigmentgehalte mittels HPLC.

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
0 min	100 %	0 %
1 min	70 %	30 %
23 min	0 %	100 %
24 min	0 %	100 %
24,1 - 28 min	100 %	0 %

4.8.6. Analyse von MgP und MgProtoME mittels HPLC

Laufmittel A: 10 % 1M Ammoniumacetat pH 5,2; 90 % Methanol

Laufmittel B: 100 % Ethylacetat

Für die Analyse der Intermediate MgP und MgProtoME wurde eine Agilent-Poroshell 120-C18 Säule verwendet. Für die Messung konnten dabei bis zu 20 µl des erzeugten Extraktes (Abschnitt 4.8.3) auf die Säule geladen werden. Das verwendete Programm wurde in Tabelle 4.26 angegeben. Die quantitative Bestimmung der Intermediate erfolgte mittels Fluoreszenz-Detektion (FLD) ($\lambda_{Ex} = 420$ nm; $\lambda_{Em} = 600$ nm). Zur Berechnung der enthaltenen Intermediatgehalte wurde ein Standard des jeweiligen Intermediats (1 pmol) verwendet.

Tabelle 4.26. – Methode zur Bestimmung der MgP- und MgProtoME-Gehalte mittels HPLC.

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
5 min	100 %	0 %
5,1 min	70 %	30 %
9 min	70 %	30 %
9,1 - 17 min	100 %	0 %

4.8.7. Analyse von PChlid und Chlid mittels HPLC

Laufmittel A: 20 % 1M Ammoniumacetat pH 7,0 ; 80 % Methanol

Laufmittel B: 100 % Methanol

Für die Analyse der TBS-Intermediate PChlid und Chlid wurde eine Waters Nova Pak C18 Säule (3,9x150 mm) verwendet. Es konnten dabei bis zu 20 µl des basischen Extraktes (Abschnitt 4.8.3) auf die Säule geladen werden. Das verwendete Laufprogramm wurde in Tabelle 4.27 angegeben. PChlid wurde durch den DAD bei 430 nm detektiert, wohingegen Chlid mittels FLD detektiert wurde ($\lambda_{\text{Ex}} = 435 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Em}} = 644 \text{ nm}$). Für PChlid und Chlid wurde jeweils ein Standard von 10 pmol eingesetzt, um die in den Proben enthaltene Intermediatgehalte zu bestimmen.

Tabelle 4.27. – Methode zur Bestimmung der PChlid- und Chlid-Gehalte mittels HPLC.

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
0 min	100 %	0 %
5 min	50 %	50 %
7 min	0 %	100 %
12 min	0 %	100 %
13,1-18 min	100 %	0 %

4.8.8. Analyse von PChlid mittels Fluoreszenzmikroskopie

Das verwendete Saatgut wurde aus MS-Agarmedium ausgebracht und für zwei Tage bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurden die Samen einem vierstündigen Lichtzeit ausgesetzt, gefolgt von fünf bis sechs Tagen in Dunkelheit. Die PChlid-Fluoreszenz wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie nach Meskauskiene *et al.* beobachtet [140]. Dafür wurden die Keimlinge mit blauem Licht ($\lambda_{\text{nm}} = 400 - 450 \text{ nm}$) bestrahlt und die PChlid-Fluoreszenz wurde photographisch festgehalten.

4.8.9. Extraktion von Häm

ADH-Puffer: 90 % Aceton; 4 % HCl; 16 % DMSO

Die Extraktion von Häm erfolgte, anders als bei TBS-Intermediaten und Chlorophyllen, in saurem Aceton (ADH). Es wurden jeweils 25 mg Frischgewicht oder 2,5 mg Trockengewicht für die Messung der Häm-Gehalte eingesetzt. Anschließend wurden 100 µl ADH-Puffer zu zuvor homogenisiertem Material hinzugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT in Dunkelheit wurden die Proben zentrifugiert (16.100 xg; 10 min; 20 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, abermals zentrifugiert (30 min; 16.100 xg; 20 °C) und im Anschluss entweder direkt für die Bestimmung der Häm-Gehalte mittels HPLC verwendet oder bei - 20 °C gelagert.

4.8.10. Analyse von Häm mittels HPLC

Laufpuffer A: H₂O pH 3,2 (mit Essigsäure)

Laufpuffer B: 100 % Methanol

Für die Analyse von Häm wurden jeweils 20 µl des erzeugten sauren Extraktes (Abschnitt 4.8.9) auf die Säule geladen. Für die Auftrennung wurde eine Poroshell 120 EC C18 Säule eingesetzt. Das verwendete Programm wurde in Tabelle 4.28 dargestellt. Die Detektion von Häm erfolgte durch den DAD ($\lambda = 398 \text{ nm}$). Für die Erstellung des Standardwertes wurden 10 pmol Häm verwendet.

Tabelle 4.28. – Methode zur Bestimmung des Häm-Gehalts mittels HPLC.

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
4 min	30 %	70 %
4,1 min	0 %	100 %
8 min	0 %	100 %
8,1 - 11 min	30 %	70 %

4.9. Färbungen

4.9.1. Nitroblautetrazoliumchlorid-Färbung

NBT-Färbelösung: 2 g/l NBT in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer; pH 7.5

Zur Anfärbung von Superoxid-Anionen wurde der Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) verwendet, welcher in Verbindung mit Superoxid-Anionen einen dunkelblauen Formazankomplex ausbildet. Das zu färbende Gewebe wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und vollständig mit NBT-Färbelösung bedeckt. Durch das Anlegen eines leichten Vakuums für 2-3 min wurde die Infiltration des Gewebes mit der Färbelösung unterstützt. Der Ansatz wurde über Nacht im Dunkeln inkubiert. Am Folgetag wurde die NBT-Färbelösung entfernt und durch Absolutalkohol ersetzt. Durch Erhitzen der Proben bei 95 °C wurde das enthaltene Chlorophyll entfernt. Dafür wurde der Absolutalkohol so lange ausgetauscht bis dieser klar blieb. Anschließend wurden die Färbung des Gewebes photographisch festgehalten.

4.9.2. 3,3'-Diaminobenzidin-Färbung

DAB-Färbelösung: 10 g/l DAB in dd-Wasser; pH 3,8

Für die Anfärbung von Wasserstoffperoxid wurde der Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Wasserstoffperoxid oxidiert diesen Farbstoff in Anwesenheit von Peroxidasen, was zur Entstehung eines braunen Präzipitats führte. Das zu färbende pflanzlichem Gewebe wurde dafür in ein Reaktionsgefäß überführt, vollständig mit der DAB-Färbelösung bedeckt und für 2-3 min einem leichten Vakuum ausgesetzt, um die Infiltration des Gewebes mit der Färbelösung zu unterstützen. Die Proben wurden über Nacht in Dunkelheit inkubiert. Am Folgetag wurde die DAB-Färbelösung durch Absolutalkohol ersetzt. Zum Entfernen der enthaltenen Chlorophylle wurden die Proben auf 95 °C erhitzt. Der Absolutalkohol wurde dabei solange ausgetauscht, bis dieser sich nicht mehr verfärbte. Abschließend wurde die DAB-Färbung photographisch festgehalten.

4.9.3. *Singlet Oxygen Sensor Green-Färbung*

Die Anfärbung von Singulett-Sauerstoff erfolgte mit Hilfe des *Singlet Oxygen Sensor Green* (SOSG) Reagenz (Thermo Scientific). Dabei führte Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff zu einer Verschiebung der Fluoreszenz des SOSG-Farbstoffs in den grünen Wellenlängenbereich ($\lambda_{Ex}= 504$ nm; $\lambda_{Em}= 525$ nm). Der SOSG-Reaktionsmix (Thermo Scientific) wurde in 33 μ l 100 % Methanol gelöst und mit 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) auf eine finale Konzentration von 260 μ M gebracht. Die zu untersuchenden Proben wurden in 100 μ l dieser Reaktionslösung für 2 h in Dunkelheit, gefolgt von 2 h im Licht (100 μ E), inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz geschah direkt im Anschluss mittels eines Konfokalmikroskops (LSM 800 mit Airyscan; Zeiss). Das betreffende Gewebe wurde bei $\lambda_{Ex}= 504$ nm angeregt und die SOSG-Fluoreszenz wurde im Bereich von $\lambda_{Em}= 500$ - 550 nm detektiert.

4.10. Interaktionsstudien

4.10.1. Split Ubiquitin System

Für die Analyse von Interaktionen zwischen membranständigen bzw. membranassoziierten Proteinen wurde das Split Ubiquitin verfahren verwendet. Dafür wurden die zu testenden Interaktionspartner in Hefe co-exprimiert. Ein Protein wurde dabei mit der C-terminalen Hälfte von Ubiquitin (CUB) fusioniert, das zweite mit der N-terminalen Hälfte von Ubiquitin (NUB). Eine Interaktion zwischen beiden Proteinen resultierte in der Rekonstitution von Ubiquitin, was daraufhin die Ubiquitin-abhängige Proteolyse des am NUB-Konstrukt abgehängenen Transkriptionsfaktors Lex auslöste. Dieser Lex-Transkriptionsfaktor wanderte daraufhin in den Zellkern und aktivierte dort die Lex-anhängigen Gene ADE2, HIS3, URA3 und LacZ, was das Überleben der betroffenen Zellen auf Selektionsmedium ohne Leucin, Threonin, Histidin und Uracil ermöglichte.

4.10.1.1. *Mating der Saccharomyces cerevisiae* Kulturen

Für die Co-Transformation von *S. cerevisiae* sind verschiedene Vorgehensweisen bekannt. In dieser Arbeit wurde das sogenannte *Mating*-Verfahren verwendet. Hierbei wurde jeweils ein Partner der zu testenden Interaktion in den L40ccuA (Köder) oder L40ccu α (Beute) *S. cerevisiae* Stamm transformiert (Abschnitt 4.2.3). Anschließend wurde je eine Kolonie der positiv selektierten Transformanten (je eine L40ccuA und L40ccu α Kolonie) genutzt, um 500 μ l YAPD-Medium zu inokulieren. Der Ansatz wurde daraufhin für 16 h bei 30 ° und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden ein Aliquot (4 μ l) verwendet, um 200 μ l -Leu -Thr SC-Medium anzupflanzen. Diese so erzeugte Kultur wurde abermals für 16 h bei 30 ° und 220 rpm inkubiert. Am Folgetag konnte ein Aliquot dieser Kultur zur Anzucht auf den entsprechenden Selektionsmedien verwendet werden.

4.10.1.2. Selektion von Interaktionen

Vor der Anzucht der co-transformierten Hefe-Kulturen (Abschnitt 4.10.1.1) auf Selektionsmedium wurden verschiedene Verdünnungen (:10 und 1:100) des *Mating*-Ansatzes hergestellt. Anschließend wurde je ein Aliquot des unverdünnten Ansatzes sowie der beiden Verdünnungen auf Selektionsmedium ausgebracht. Dabei wurden zwei verschiedene Medien verwendet. Zum einen wurde durch die Anzucht auf -Leu -Thr (-It) SC-Medium die Co-Transformation beider Interaktionspartner verifiziert. Zum anderen wurden durch die Anzucht auf -His -Ura -Leu -Thr (-hult) SC-Medium positive Interaktionen selektiert. Um falsch negative Ergebnisse zu minimieren wurden 20 mM 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT) zugefügt. Das Wachstum der Zellen wurde auf beiden Medien über einen Zeitraum von 3-5 Tagen bei 30 °C beobachtet und abschließend photographisch festgehalten.

4.10.2. Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementation

Infiltrationsmedium: 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure; 10 mM MgCl₂

Eine weitere geläufige Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementation (BiFC). Hierbei wurde jeweils ein potentieller Interaktionspartner mit der N- bzw. C-terminalen Hälfte des *Yellow Fluoreszenz Protein* (YFP) fusioniert. Im Falle einer Interaktion der beiden zu testenden Proteine würde dies zu einer Rekonstitution des YFPs führen. Die Fluoreszenz des rekonstituierten YFPs konnte daraufhin detektiert werden.

Zunächst wurden positiv transformierte *A. tumefaciens*-Kolonien (Abschnitt 4.2.2) über Nacht bei 30 °C angezogen. Am Folgetag wurden diese Kulturen geerntet (20 min; 8.000 xg; RT), einmal mit autoklaviertem Wasser gewaschen, pelletiert (20 min; 8.000 xg; RT) und mit Infiltrationsmedium auf eine optische Dichte von OD_{600 nm} = 0,4 eingestellt. Es wurde Acetosyringone (in DMSO) mit einer finalen Konzentration von 100 µM hinzugefügt und die Ansätze wurden für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die zu testenden Kombinationen 1:1 (G1:G3) gemischt und mit einer Infiltrationsspritze in *N. benthamiana* Blätter infiltriert. Dabei wurden nicht mehr als zwei Kombinationen pro Pflanze infiltriert. Nach einer Inkubation der *N. benthamiana* Pflanzen für 2-3 Tage in Dunkelheit wurde jeweils eine Blattscheibe (Ø= 10 mm) aus dem infiltrierten Bereich mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert. Dabei wurde YFP spezifisch bei λ_{Ex} = 514 nm angeregt und die Fluoreszenz wurde zwischen λ_{Em} = 530 - 550 nm überprüft. Zusätzlich dazu wurde die Chlorophyll-Autofluoreszenz (λ_{Ex} = 488 nm; λ_{Em} = 650 - 700 nm) nachgewiesen.

4.11. *in silico* Untersuchungen

Für die durchgeführten *in silico* Untersuchungen wurden die in Tabelle 4.29 angegebenen Datenbanken und Programme genutzt.

Tabelle 4.29. – Übersicht über die verwendeten Datenbanken und Programme

Datenbank	URL
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
Cell-PLoc 2.0	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
Ligation Calculator	http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html
MUSCLE	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
NASC	http://arabidopsis.info/BasicForm
TPRpred	https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/tprpred
TMHMM Server v. 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
SIGnAL	http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress
Programme	Referenz
GenDoc Vers 2.7.000	[381]
MEGA-X Vers. 10.0.5	[382]
NCSS 2019 Vers. 19.2.0	NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss
PerlPrimer Vers. 1.1.21	[383]
Vector NTI® Advance 10	Invitrogen, Darmstadt

Literaturverzeichnis

- [1] J. Lagarias. "Chromopeptides From Phytochrome. the Structure and Linkage of the Pr Form of the Phytochrome Chromophore". In: *Journal of the American Chemical Society* (2013), S. 12.
- [2] M. M. Neff, C. Fankhauser und J. Chory. "Light: An indicator of time and place". In: *Genes and Development* 14.3 (2000), S. 257–271. ISSN: 08909369.
- [3] B. C. Tripathy, I. Sherameti und R. Oelmüller. "Siroheme: An essential component for life on earth". In: *Plant Signaling and Behavior* 5.1 (2010), S. 14–20. ISSN: 15592316.
- [4] M. Oberhuber, J. Berghold, K. Breuker, S. Hörtensteiner und B. Kräutler. "Breakdown of chlorophyll: A nonenzymatic reaction accounts for the formation of the colorless "nonfluorescent" chlorophyll catabolites". In: *PNAS* 100.12 (2003), S. 6910–6915.
- [5] T. L. Poulos. "Heme Enzyme Structure and Function". In: *Chem Rev.* 114.7 (2014), S. 3919–3962.
- [6] N. Mizusawa, T. Yamashita und M. Miyao. "Restoration of the high-potential form of cytochrome b559 of photosystem II occurs via a two-step mechanism under illumination in the presence of manganese ions". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1410.3 (1999), S. 273–286. ISSN: 00052728.
- [7] G. Kurisu, H. Zhang, J. L. Smith und W. A. Cramer. "Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity". In: *Scienceexpress* 2.October (2016), S. 295–306.
- [8] S. Caffarri, T. Tibiletti, R. Jennings und S. Santabarbara. "A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning". In: *Current Protein & Peptide Science* 15.4 (2014), S. 296–331. ISSN: 13892037.
- [9] S. I. Beale und P. A. Castelfranco. "The Biosynthesis of δ -Aminolevulinic Acid in Higher Plants". In: *Plant Physiol.* 53.2 (1974), S. 291–296. ISSN: 0032-0889.
- [10] D. Shemin und C. S. Russell. " δ -AMINOLEVULINIC ACID, ITS ROLE IN THE BIOSYNTHESIS OF PORPHYRINS AND PURINES". In: *J. Am. Chem.Soc* 75.19 (1953), S. 4873–4874.
- [11] B. F. Burnham. "Aminolevulinic Acid Synthase (*Rhodospseudomonas spheroides*)". In: 2 (1970), S. 195–200.
- [12] C. G. Kannangara und S. P. Gough. "Biosynthesis of Delta-Aminolevulinate in Greening Barley Leaves II: Induction of Enzyme Synthesis by Light". In: *Carlsberg Research Communications* 44.25 (1979), S. 11–20.
- [13] A. Schön, G. Krupp, S. Gough, S. Berry-Lowe, C. G. Kannangara und D. Söll. "The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA." In: *Nature* 322.6076 (1986), S. 281–284. ISSN: 0028-0836.
- [14] B. Pontoppidan und C. G. Kannangara. "Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNAGlu reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis". In: *European Journal of Biochemistry* 225.2 (1994), S. 529–537. ISSN: 14321033.
- [15] C. G. Kannangara, S. P. Gough, P. Bruyant, J. Kenneth Hooper, A. Kahn und D. von Wettstein. "tRNAGlu as a cofactor in δ -aminolevulinate biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis". In: *Trends in Biochemical Sciences* 13.4 (1988), S. 139–143. ISSN: 09680004.
- [16] G. P. O'Neill und D. Soll. "Expression of the *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 tRNA(Glu) gene provides tRNA for protein and chlorophyll biosynthesis". In: *Journal of Bacteriology* 172.11 (1990), S. 6363–6371. ISSN: 00219193.

- [17] D. Jahn, J. Moser, W. D. Schubert und Heinz. *Transfer RNA-Dependent Aminolevulinic Acid Formation :structure and function of glutamyl-tRNA synthetase, reductase and glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase*. Hrsg. von B. Grimm, R. Porra, W. Rüdiger und H. Scheer. Springer, 2006, S. 159–171.
- [18] D. Jahn, E. Verkamp und D. Söll. “Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis”. In: *Trends in Biochemical Sciences* 17.6 (1992), S. 215–218. ISSN: 09680004.
- [19] A. Zhao, Y. Fang, X. Chen, S. Zhao, W. Dong, Y. Lin, W. Gong und L. Liu. “Crystal structure of Arabidopsis glutamyl-tRNA reductase in complex with its stimulator protein”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.18 (2014), S. 6630–6635. ISSN: 0027-8424.
- [20] B. Grimm. “Primary structure of a key enzyme in plant tetrapyrrole synthesis: glutamate 1-semialdehyde aminotransferase”. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87.11 (1990), S. 4169–4173. ISSN: 0027-8424.
- [21] M. Hennig, B. Grimm, R. Contestabile, R. A. John und J. N. Jansonius. “Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an alpha2-dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity.” In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.10 (1997), S. 4866–4871. ISSN: 0027-8424.
- [22] J. K. Hooper, A. Kahn, D. E. Ash, S. Gough und C. G. Kannangara. “Biosynthesis of Delta- aminolevulinic acid in greening barley leaves. IX. Structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition, and the catalytic mechanism of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase”. In: *Carlsberg Research Communications* 53.1 (1988), S. 11–25. ISSN: 01051938.
- [23] K. Gibson, A. Neuberger und J. J. Scott. “The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase.” In: *The Biochemical journal* 61.4 (1955), S. 618–629. ISSN: 02646021.
- [24] Q. F. Boese, A. J. Spano, J. Li und M. P. Timko. “Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.)” In: *The Journal of Biological Chemistry* 266.26 (1991), S. 17060–17066.
- [25] W. Tang, W. Wang, D. Chen, Q. Ji, Y. Jing, H. Wang und R. Lin. “Transposase-Derived Proteins FHY3/FAR1 Interact with PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 to Regulate Chlorophyll Biosynthesis by Modulating HEMB1 during Deetiolation in Arabidopsis”. In: *The Plant Cell* 24.5 (2012), S. 1984–2000. ISSN: 1040-4651.
- [26] P. M. Shoolingin-Jordan, M. J. Warren und S. J. Awan. “Discovery that the assembly of the dipyrromethane cofactor of porphobilinogen deaminase holoenzyme proceeds initially by the reaction of preuroporphyrinogen with the apoenzyme”. In: *Biochemical Journal* 316.2 (2015), S. 373–376. ISSN: 0264-6021.
- [27] G. J. Hart, A. D. Miller, F. J. Leeper und A. R. Battersby. “Biosynthesis of the Natural Porphyrins: Proof that Hydroxymethylbilane Synthase (Porphobilinogen Deaminase) uses a Novel Binding Group in its Catalytic Action”. In: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1987), S. 1762–1765.
- [28] P. M. Jordan und M. J. Warren. “Evidence for a dipyrromethane cofactor at the catalytic site of E. coli porphobilinogen deaminase”. In: *FEBS Letters* 225.1-2 (1987), S. 87–92. ISSN: 00145793.
- [29] R. M. Jones und P. M. Jordan. “Purification and properties of porphobilinogen deaminase from Arabidopsis thaliana”. In: *Biochem J* 299 (1994), S. 895–902. ISSN: 0264-6021.
- [30] L. Bogorad und S. Granick. “The Enzymatic Synthesis of Porphyrins from Porphobilinogen”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 39.12 (1958), S. 1176–1188. ISSN: 0027-8424.
- [31] F.-C. Tan, Q. Cheng, K. Saha, I. U. Heinemann, M. Jahn, D. Jahn und A. G. Smith. “Identification and characterization of the Arabidopsis gene encoding the tetrapyrrole biosynthesis enzyme uroporphyrinogen III synthase”. In: *Biochemical Journal* 410.2 (2008), S. 291–299. ISSN: 0264-6021.

- [32] A. H. Jackson, H. A. Sancovich, A. M. Ferramola, N. Evans, D. E. Games, S. A. Matlin, G. H. Elder und S. G. Smith. "Macrocyclic intermediates in the biosynthesis of porphyrins." In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 273.924 (1976), S. 191–206. ISSN: 0962-8436.
- [33] B. M. Martins, B. Grimm, H.-P. Mock, R. Huber und A. Messerschmidt. "Crystal Structure and Substrate Binding Modeling of the Uroporphyrinogen-III Decarboxylase from *Nicotiana tabacum*". In: *Journal of Biological Chemistry* 276.47 (2002), S. 44108–44116. ISSN: 0021-9258.
- [34] W. P. Hsu und G. W. Miller. "Coproporphyrinogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)" In: *Biochemical Journal* 117.2 (1970), S. 215–220. ISSN: 0264-6021.
- [35] M. A. Santana, F. C. Tan und A. G. Smith. "Molecular characterisation of coproporphyrinogen oxidase from *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant Physiology and Biochemistry* 40.4 (2002), S. 289–298. ISSN: 09819428.
- [36] P. Labbe. "Purification and Properties of Coproporphyrinogen III Oxidase from Yeast". In: *Methods in Enzymology* 281.1961 (1997), S. 367–378.
- [37] M. Koch, C. Breithaupt, R. Kiefersauer, J. Freigang, R. Huber und A. Messerschmidt. "Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: A key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis". In: *EMBO Journal* 23.8 (2004), S. 1720–1728. ISSN: 02614189.
- [38] I. Lermontova und B. Grimm. "Reduced activity of plastid protoporphyrinogen oxidase causes attenuated photodynamic damage during high-light compared to low-light exposure". In: *Plant Journal* 48.4 (2006), S. 499–510. ISSN: 09607412.
- [39] F. Zhang, W. Tang, B. Hedtke, L. Zhong, L. Liu, L. Peng, C. Lu, B. Grimm und R. Lin. "Tetrapyrrole biosynthetic enzyme protoporphyrinogen IX oxidase 1 is required for plastid RNA editing". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.5 (2014), S. 2023–2028. ISSN: 0027-8424.
- [40] K. Kobayashi, T. Masuda, N. Tajima, H. Wada und N. Sato. "Molecular phylogeny and intricate evolutionary history of the three isofunctional enzymes involved in the oxidation of protoporphyrinogen IX". In: *Genome biology and evolution* 6.8 (2014), S. 2141–2155. ISSN: 17596653.
- [41] D. R. Crooks, M. C. Ghosh, R. G. Haller, W. H. Tong und T. A. Rouault. "Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery". In: *Blood* 115.4 (2010), S. 860–869. ISSN: 00064971.
- [42] A. G. Smith, M. A. Santana, A. D. Wallace-Cook, J. M. Roper und R. Labbe-Bois. "Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant". In: *Journal of Biological Chemistry* 269.18 (1994), S. 13405–13413. ISSN: 00219258.
- [43] K. S. Chow, D. P. Singh, A. R. Walker und A. G. Smith. "Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: Mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins". In: *Plant Journal* 15.4 (1998), S. 531–541. ISSN: 09607412.
- [44] M. Scharfenberg, L. Mittermayr, E. Von Roepenack-Lahaye, H. Schlicke, B. Grimm, D. Leister und T. Kleine. "Functional characterization of the two ferrochelatases in *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant, Cell and Environment* 38.2 (2015), S. 280–298. ISSN: 13653040.
- [45] N. A. Espinas, K. Kobayashi, Y. Sato, N. Mochizuki, K. Takahashi, R. Tanaka und T. Masuda. "Allocation of Heme Is Differentially Regulated by Ferrochelatase Isoforms in *Arabidopsis* Cells". In: *Frontiers in Plant Science* 7.August (2016), S. 1–14.
- [46] T. Fan, L. Roling, A. Meiers, L. Brings, P. Ortega-Rodés, B. Hedtke und B. Grimm. "Complementation studies of the *Arabidopsis* fc1 mutant substantiate essential functions of ferrochelatase 1 during embryogenesis and salt stress". In: *Plant Cell and Environment* 42.2 (2018), S. 618–632. ISSN: 13653040.

- [47] S. Nagai, M. Koide, S. Takahashi, A. Kikuta, M. Aono, Y. Sasaki-Sekimoto, H. Ohta, K.-i. Takamiya und T. Masuda. "Induction of Isoforms of Tetrapyrrole Biosynthetic Enzymes, AtHEMA2 and AtFC1, under Stress Conditions and Their Physiological Functions in Arabidopsis". In: *Plant Physiology* 144.2 (2007), S. 1039–1051. ISSN: 14795876. arXiv: 15334406.
- [48] S. J. Davis. "The Heme-Oxygenase Family Required for Phytochrome Chromophore Biosynthesis Is Necessary for Proper Photomorphogenesis in Higher Plants". In: *Plant Physiology* 126.2 (2002), S. 656–669.
- [49] K. D. Mackenzie und C. A. Benoit. "Organizational work, Part III. Empirical results". In: *Human Systems Management* 16.2 (1997), S. 117–137. ISSN: 01672533.
- [50] M. J. Terry, J. A. Wahleithner und J. C. Lagarias. *Biosynthesis of the Plant Photoreceptor Phytochrome*. 1993.
- [51] T. Kohchi, K. Mukougawa, N. Frankenberg, M. Masuda, A. Yokota und J. C. Lagarias. "The Arabidopsis HY2 Gene Encodes Phytochromobilin Synthase, a Ferredoxin-Dependent Biliverdin Reductase". In: *The Plant Cell* 13.2 (2007), S. 425. ISSN: 10404651.
- [52] P. E. Jensen, L. C. Gibson, K. W. Henningsen und C. N. Hunter. "Expression of the chlI, chlD, and chlH genes from the cyanobacterium Synechocystis PCC6803 in Escherichia coli and demonstration that the three cognate proteins are required for magnesium-protoporphyrin chelatase activity". In: *Journal of Biological Chemistry* 271.28 (1996), S. 16662–16667. ISSN: 00219258.
- [53] L. C. Gibson, R. D. Willows, C. G. Kannangara, D. von Wettstein und C. N. Hunter. "Magnesium-protoporphyrin chelatase of Rhodobacter sphaeroides: reconstitution of activity by combining the products of the bchH, -I, and -D genes expressed in Escherichia coli." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.6 (1995), S. 1941–1944. ISSN: 14641895.
- [54] B. L. Petersen, P. E. Jensen, L. C. Gibson, B. M. Stummann, C. N. Hunter und K. W. Henningsen. "Reconstitution of an active magnesium chelatase enzyme complex from the bchI, -D, and -H gene products of the green sulfur bacterium Chlorobium vibrioforme expressed in Escherichia coli". In: *Journal of Bacteriology* 180.3 (1998), S. 699–704. ISSN: 00219193.
- [55] N. B. P. Adams und J. D. Reid. "Nonequilibrium isotope exchange reveals a catalytically significant enzyme-phosphate complex in the ATP hydrolysis pathway of the AAA+ ATPase magnesium chelatase". In: *Biochemistry* 51.10 (2012), S. 2029–2031. ISSN: 00062960.
- [56] J. Lundqvist, H. Elmlund, R. P. Wulff, L. Berglund, D. Elmlund, C. Emanuelsson, H. Hebert, R. D. Willows, M. Hansson, M. Lindahl und S. Al-Karadaghi. "ATP-Induced Conformational Dynamics in the AAA+ Motor Unit of Magnesium Chelatase". In: *Structure* 18.3 (2010), S. 354–365. ISSN: 09692126.
- [57] M. N. Fodje, A. Hansson, M. Hansson, J. G. Olsen, S. Gough, R. D. Willows und S. Al-Karadaghi. "Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase". In: *Journal of Molecular Biology* 311.1 (2001), S. 111–122. ISSN: 00222836.
- [58] A. Srivastava, V. Lake, L. a. Nogaj, S. M. Mayer, R. D. Willows und S. I. Beale. "The Chlamydomonas reinhardtii gtr gene encoding the tetrapyrrole biosynthetic enzyme glutamyl-trna reductase: structure of the gene and properties of the expressed enzyme." In: *Plant molecular biology* 58.5 (Juli 2005), S. 643–58. ISSN: 0167-4412.
- [59] Y.-S. Huang und H.-m. Li. "Arabidopsis CHLI2 Can Substitute for CHLI1". In: *Plant Physiol.* 150.2 (2009), S. 636–645. ISSN: 0032-0889.
- [60] L. C. D. Gibson, J. L. Marrison, R. M. Leech, P. E. Jensen, D. C. Bassham, M. Gibson und C. N. Hunter. "A putative Mg chelatase subunit from Arabidopsis thaliana cv C24". In: *Plant Physiology* 111.1 (1996), S. 61–71. ISSN: 00320889.

- [61] J. Papenbrock, S. Gräfe, E. Kruse, F. Hänel und B. Grimm. "Mg-chelatase of tobacco: Identification of a Chl D cDNA sequence encoding a third subunit, analysis of the interaction of the three subunits with the yeast two-hybrid system, and reconstitution of the enzyme activity by co-expression of recombinant CHL D". In: *Plant Journal* 12.5 (1997), S. 981–990. ISSN: 09607412.
- [62] R. M. Larkin, J. M. Alonso, J. R. Ecker und J. Chory. "GUN4, a Regulator of Intracellular Signaling". In: *Science* 299.February (2003), S. 902–907.
- [63] P. A. Davison, H. L. Schubert, J. D. Reid, C. D. Iorg, A. Heroux, C. P. Hill und C. N. Hunter. "Structural and Biochemical Characterization of Gun4 Suggests a Mechanism for Its Role in Chlorophyll Biosynthesis". In: (2005).
- [64] J. Kopečná, I. C. De Vaca, N. B. Adams, P. A. Davison, A. A. Brindley, C. N. Hunter, V. Guallar und R. Sobotka. "Porphyrin binding to Gun4 protein, facilitated by a flexible loop, controls metabolite flow through the chlorophyll biosynthetic pathway". In: *Journal of Biological Chemistry* 290.47 (2015), S. 28477–28488. ISSN: 1083351X.
- [65] P. Brzewowski, H. Schlicke, A. Richter, R. M. Dent, K. K. Niyogi und B. Grimm. "The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in *Chlamydomonas reinhardtii*". In: *Plant Journal* 79.2 (2014), S. 285–298. ISSN: 1365313X.
- [66] X. Chen, X. Wang, J. Feng, Y. Chen, Y. Fang, S. Zhao, A. Zhao, M. Zhang und L. Liu. "Structural insights into the catalytic mechanism of synechocystis magnesium protoporphyrin IX O-methyltransferase (ChlM)". In: *Journal of Biological Chemistry* 289.37 (2014), S. 25690–25698. ISSN: 1083351X.
- [67] E. Peter und B. Grimm. "GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis". In: *Molecular Plant* 2.6 (2009), S. 1198–1210. ISSN: 17529867.
- [68] A. S. Richter, E. Peter, M. Rothbart, H. Schlicke, J. Toivola, E. Rintamäki und B. Grimm. "Post-translational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis." In: *Plant Physiol.* 162.1 (2013), S. 63–73. ISSN: 1532-2548.
- [69] Y.-S. Wong und P. A. Castelfranco. "Properties of the Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase System". In: *Plant Physiology* 79.3 (1985), S. 730–733. ISSN: 0032-0889.
- [70] Y.-S. Wong und P. A. Castelfranco. "Resolution and Reconstitution of Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase, the Enzyme System Responsible for the Formation of the Chlorophyll Isocyclic Ring". In: *Plant Physiol.* 75 (1984), S. 658–661. ISSN: 0032-0889.
- [71] C. J. Walker, P. A. Castelfrancot und B. J. Whyte. "Synthesis of divinyl protochlorophyllide". In: 276 (1991), S. 691–697.
- [72] V. Pinta, M. Picaud, F. Reiss-Husson und C. Astier. "Rubrivivax gelatinosus acsF (previously orf358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester". In: *Journal of Bacteriology* 184.3 (2002), S. 746–753. ISSN: 00219193.
- [73] S. Ouchane, A. S. Steunou, M. Picaud und C. Astier. "Aerobic and Anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: A strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system". In: *Journal of Biological Chemistry* 279.8 (2004), S. 6385–6394. ISSN: 00219258.
- [74] C. A. Albus, A. Salinas, O. Czarnecki, S. Kahlau, M. Rothbart, W. Thiele, W. Lein, R. Bock, B. Grimm und M. A. Schöttler. "LCAA, a novel factor required for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase accumulation and feedback control of aminolevulinic acid biosynthesis in tobacco." In: *Plant physiology* 160.4 (Dez. 2012), S. 1923–39. ISSN: 1532-2548.
- [75] S. Hollingshead, J. Kopečná, P. J. Jackson, D. P. Canniffe, P. a. Davison, M. J. Dickman, R. Sobotka und C. N. Hunter. "Conserved chloroplast open-reading frame ycf54 is required for activity of the magnesium protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase in *Synechocystis* PCC 6803." In: *The Journal of biological chemistry* 287.33 (Aug. 2012), S. 27823–33. ISSN: 1083-351X.

- [76] J. Herbst, A. Girke, M. R. Hajirezaei, G. Hanke und B. Grimm. "Potential roles of YCF54 and ferredoxin-NADPH reductase for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase". In: *Plant Journal* 94.3 (2018), S. 485–496. ISSN: 1365313X.
- [77] R. Schulz, K. Steinmüller, M. Klaas, C. Forreiter, S. Rasmussen, C. Hiller und K. Apel. "Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli*". In: *MGG Molecular & General Genetics* 217.2-3 (1989), S. 355–361. ISSN: 00268925.
- [78] O. T. G. Jones. "Magnesium 2,4-Divinylphaeoporphyrin a5 Monomethyl Ester, a Protochlorophyll-like Pigment Produced by *Rhodospseudomonas spheroides*". In: *Biochem. J.* 89 (1963), S. 182–189.
- [79] N. Nagata. "Identification of a Vinyl Reductase Gene for Chlorophyll Synthesis in *Arabidopsis thaliana* and Implications for the Evolution of Prochlorococcus Species". In: *the Plant Cell Online* 17.1 (2005), S. 233–240. ISSN: 1040-4651.
- [80] P. Wang, C. Wan, Z. Xu, P. Wang, W. Wang, C. Sun, X. Ma, Y. Xiao, J. Zhu, X. Gao und X. Deng. "One Divinyl Reductase Reduces the 8-Vinyl Groups in Various Intermediates of Chlorophyll Biosynthesis in a Given Higher Plant Species, But the Isozyme Differs between Species". In: *Plant Physiology* 161.1 (2012), S. 521–534. ISSN: 0032-0889.
- [81] J. Soll, G. Schultz, W. Rüdiger und J. Benz. "Hydrogenation of geranylgeraniol : two pathways exist in spinach chloroplasts." In: *Plant physiology* 71.4 (1983), S. 849–54. ISSN: 0032-0889.
- [82] A. Tanaka, H. Ito, R. Tanaka, N. K. Tanaka, K. Yoshida und K. Okada. "Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.21 (1998), S. 12719–12723. ISSN: 0027-8424.
- [83] C. E. Espineda, A. S. Linford, D. Devine und J. Brusslan. "The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*". In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96.August (1999), S. 10507–10511.
- [84] U. Oster, R. Tanaka, A. Tanaka und W. Rüdiger. "Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant Journal* 21.3 (2000), S. 305–310. ISSN: 09607412.
- [85] M. Kusaba, H. Ito, R. Morita, S. Iida, Y. Sato, M. Fujimoto, S. Kawasaki, R. Tanaka, H. Hirochika, M. Nishimura und A. Tanaka. "Rice NON-YELLOW COLORING1 Is Involved in Light-Harvesting Complex II and Grana Degradation during Leaf Senescence". In: *the Plant Cell Online* 19.4 (2007), S. 1362–1375. ISSN: 1040-4651.
- [86] Y. Horie, H. Ito, M. Kusaba, R. Tanaka und A. Tanaka. "Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in *Arabidopsis*". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.26 (2009), S. 17449–17456. ISSN: 00219258.
- [87] R. Sato, H. Ito und A. Tanaka. "Chlorophyll b degradation by chlorophyll b reductase under high-light conditions". In: *Photosynthesis Research* 126.2-3 (2015), S. 249–259. ISSN: 15735079.
- [88] Y. Sato, R. Morita, S. Katsuma, M. Nishimura, A. Tanaka und M. Kusaba. "Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice". In: *Plant Journal* 57.1 (2009), S. 120–131. ISSN: 09607412.
- [89] Y. Sakuraba, Y.-s. Kim, S.-C. Yoo, S. Hörtensteiner und N.-C. Paek. "7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase functions in metabolic channeling of chlorophyll breakdown intermediates during leaf senescence Yasuhito Sakuraba Institute of Plant Biology , University of Zurich , CH-8008 Zurich , Switzerland". In: *Biochemical and biophysical research communications* 430 (2013), S. 33–37.

- [90] M. Meguro, H. Ito, A. Takabayashi, R. Tanaka und A. Tanaka. "Identification of the 7-Hydroxymethyl Chlorophyll a Reductase of the Chlorophyll Cycle in Arabidopsis". In: *The Plant Cell* 23.9 (2011), S. 3442–3453. ISSN: 1040-4651.
- [91] Y.-P. Lin, M.-C. Wu und Y.-y. Charng. "Identification of a Chlorophyll Dephytylase Involved in Chlorophyll Turnover in Arabidopsis". In: *The Plant Cell* 28.12 (2016), S. 2974–2990. ISSN: 1040-4651.
- [92] T. Masuda und Y. Fujita. "Regulation and evolution of chlorophyll metabolism". In: *Photochemical and Photobiological Sciences* 7.10 (2008), S. 1131–1149. ISSN: 1474905X.
- [93] J. Schmied, Z. Hou, B. Hedtke und B. Grimm. "Controlled partitioning of glutamyl-tRNA reductase in stroma- and membrane- associated fractions affects the synthesis of 5-amino levulinic acid". In: *Plant Cell Physiol.* 59.11 (2018), S. 2204–2213.
- [94] J. Joyard, M. Ferro, C. Masselon, D. Seigneurin-Berny, D. Salvi, J. Garin und N. Rolland. "Chloroplast proteomics and the compartmentation of plastidial isoprenoid biosynthetic pathways". In: *Molecular Plant* 2.6 (2009), S. 1154–1180. ISSN: 17529867.
- [95] C. Reinbothe, N. Lebedev, K. Apel und S. Reinbothe. "Regulation of chloroplast protein import through a protochlorophyllide-responsive transit peptide." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94.16 (1997), S. 8890–8894. ISSN: 0027-8424.
- [96] M. Ferro, S. Brugière, D. Salvi, D. Seigneurin-Berny, M. Court, L. Moyet, C. Ramus, S. Miras, M. Mellal, S. Le Gall, S. Kieffer-Jaquinod, C. Bruley, J. Garin, J. Joyard, C. Masselon und N. Rolland. "AT_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins". In: *Molecular & Cellular Proteomics* 9.6 (2010), S. 1063–1084. ISSN: 1535-9476.
- [97] N. D. Adhikari, J. E. Froehlich, D. D. Strand, S. M. Buck, D. M. Kramer und R. M. Larkin. "GUN4-porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis." In: *The Plant cell* 23.4 (Apr. 2011), S. 1449–67. ISSN: 1532-298X.
- [98] N. D. Adhikari, R. Orler, J. Chory, J. E. Froehlich und R. M. Larkin. "Prophyrins promote the association of GENOMES UNCOUPLED 4 and a Mg-chelatase subunit with chloroplast membranes". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.37 (2009), S. 24783–24796. ISSN: 00219258.
- [99] M. A. Block, A. K. Tewari, C. Albrieux, E. Maréchal und J. Joyard. "The plant S-adenosyl-L-methionine: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes". In: *European Journal of Biochemistry* 269.1 (2002), S. 240–248. ISSN: 00142956.
- [100] S. Tottey, M. a. Block, M. Allen, T. Westergren, C. Albrieux, H. V. Scheller, S. Merchant und P. E. Jensen. "Arabidopsis CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.26 (Dez. 2003), S. 16119–24. ISSN: 0027-8424.
- [101] A. J. Spano, Z. He und M. P. Timko. "NADPH: protochlorophyllide oxidoreductases in white pine (*Pinus strobus*) and loblolly pine (*P. taeda*)". In: 236 (1992), S. 86–95.
- [102] O. B. Belyaeva und F. F. Litvin. "Photoactive pigment-enzyme complexes of chlorophyll precursor in plant leaves". In: *Biochemistry (Moscow)* 72.13 (2008), S. 1458–1477. ISSN: 0006-2979.
- [103] L. L. Ilag, A. M. Kumar und D. Soll. "Light Regulation of Chlorophyll Biosynthesis at the Level of 5-Aminolevulinic Acid Formation in Arabidopsis". In: *The Plant Cell* 6.2 (1994), S. 265. ISSN: 10404651.
- [104] L. A. Nogaj, A. Srivastava, R. van Lis und S. I. Beale. "Cellular levels of glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase do not control chlorophyll synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*". In: *Plant Physiology* 139.1 (2005), S. 389–396. ISSN: 00320889.

- [105] U. C. Vothknecht, C. G. Kannangara und D. von Wettstein. "Expression of catalytically active barley glutamyl tRNA_{Glu} reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase." In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.17 (1996), S. 9287–91. ISSN: 0027-8424.
- [106] J. Moser, W. D. Schubert, V. Beier, I. Bringemeier, D. Jahn und D. W. Heinz. "V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis". In: *EMBO Journal* 20.23 (2001), S. 6583–6590. ISSN: 02614189.
- [107] B. Schoefs und F. Franck. "Protochlorophyllide Reduction: Mechanisms and Evolution". In: *Photochemistry and Photobiology* 78.6 (2003), S. 543. ISSN: 0031-8655.
- [108] G. A. Armstrong, S. Runge, G. Frick, U. Sperling und K. Apel. "Identification of NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B: A Branched Pathway for Light-Dependent Chlorophyll Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant Physiology* 108.4 (1995), S. 1505–1517. ISSN: 0032-0889.
- [109] N. Oosawa, T. Masuda, K. Awai, N. Fusada, H. Shimada, H. Ohta und K. ichiro Takamiya. "Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*". In: *FEBS Letters* 474.2-3 (2000), S. 133–136. ISSN: 00145793.
- [110] Q. Su, G. Frick, G. Armstrong und K. Apel. "POR C of *Arabidopsis thaliana*: A third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light". In: *Plant Molecular Biology* 47.6 (2001), S. 805–813. ISSN: 01674412.
- [111] T. Masuda, N. Fusada, N. Oosawa, K. Takamatsu, Y. Y. Yamamoto, M. Ohto, K. Nakamura, K. Goto, D. Shibata, Y. Shirano, H. Hayashi, T. Kato, S. Tabata, H. Shimada, H. Ohta und K. I. Takamiya. "Functional Analysis of Isoforms of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant and Cell Physiology* 44.10 (2003), S. 963–974. ISSN: 00320781.
- [112] G. Frick, Q. Su, K. Apel und G. A. Armstrong. "An *Arabidopsis* porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested". In: *Plant Journal* 35.2 (2003), S. 141–153. ISSN: 09607412.
- [113] D. Hey, M. Rothbart, J. Herbst, P. Wang, J. Müller, D. Wittmann, K. Gruhl und B. Grimm. "LIL3, a Light-Harvesting Complex Protein, Links Terpenoid and Tetrapyrrole Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant Physiology* 174.2 (2017), S. 1037–1050. ISSN: 0032-0889.
- [114] T. N. Paddock, M. E. Mason, D. F. Lima und G. A. Armstrong. "Arabidopsis protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) restores bulk chlorophyll synthesis and normal development to a porB porC double mutant". In: *Plant Molecular Biology* 72.4 (2010), S. 445–457. ISSN: 01674412.
- [115] M. Gabruk, A. Stecka, W. Strzałka, J. Kruk, K. Strzałka und B. Mysliwa-Kurdziel. "Photoactive protochlorophyllide-enzyme complexes reconstituted with PORA, PORB and PORC proteins of *A. thaliana*: Fluorescence and catalytic properties". In: *PLoS ONE* 10.2 (2015), S. 1–18. ISSN: 19326203.
- [116] R. K. Wierenga, M. C. H. De Maeyer und W. G. J. Hol. "Interaction of Pyrophosphate Moieties with α -Helixes in Dinucleotide Binding Proteins". In: *Biochemistry* 24 (1985), S. 672–680.
- [117] H. E. Townley, R. B. Sessions, A. R. Clarke, T. R. Dafforn und W. Trevor Griffiths. "Protochlorophyllide oxidoreductase: A homology model examined by site-directed mutagenesis". In: *Proteins: Structure, Function and Genetics* 44.3 (2001), S. 329–335. ISSN: 08873585.
- [118] D. J. Heyes und C. N. Hunter. "Making light work of enzyme catalysis: Protochlorophyllide oxidoreductase". In: *Trends in Biochemical Sciences* 30.11 (2005), S. 642–649. ISSN: 09680004.

- [119] D. J. Heyes, B. R. K. Menon, M. Sakuma und N. S. Scrutton. “Conformational events during ternary enzyme-substrate complex formation are rate limiting in the catalytic cycle of the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase”. In: *Biochemistry* 47.41 (2008), S. 10991–10998. ISSN: 00062960.
- [120] V. M. Koski, C. S. French und J. H. Smith. “The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll a in normal and albino corn seedlings”. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 31.1 (1951), S. 1–17. ISSN: 10960384.
- [121] F. Franck und Y. Inoue. “Light-driven reversible transformation of chlorophyllide Psub(696,682) into chlorophyllide Psub(688,678) in illuminated etiolated bean leaves”. In: *Photobiochemistry and Photobiophysics* 8.2 (1984), S. 85–96. ISSN: 0165-8646.
- [122] B. Schoefs, M. Bertrand und Y. Lemoine. “Changes in the photosynthetic pigments in bean leaves during the first photoperiod of greening and the subsequent dark-phase. Comparison between old (10-d-old) leaves and young (2-d-old) leaves”. In: *Photosynthesis Research* 57.2 (1998), S. 203–213. ISSN: 01668595.
- [123] R. Tanaka, K. Kobayashi und T. Masuda. “Tetrapyrrole Metabolism in Arabidopsis thaliana.” In: *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 9 (Jan. 2011), e0145. ISSN: 1543-8120.
- [124] L. Ma. “Genomic Evidence for COP1 as a Repressor of Light-Regulated Gene Expression and Development in Arabidopsis”. In: *the Plant Cell Online* 14.10 (2002), S. 2383–2398. ISSN: 10404651.
- [125] K. Kobayashi und T. Masuda. “Transcriptional Regulation of Tetrapyrrole Biosynthesis in Arabidopsis thaliana”. In: *Frontiers in Plant Science* 7.December (2016), S. 1–17. ISSN: 1664-462X.
- [126] A. C. McCormac und M. J. Terry. “Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of HEMA1 and Lhcb during chloroplast development in Arabidopsis thaliana”. In: *Plant Journal* 32.4 (2002), S. 549–559. ISSN: 09607412.
- [127] P. G. Stephenson, C. Fankhauser und M. J. Terry. “PIF3 is a repressor of chloroplast development”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.18 (2009), S. 7654–7659. ISSN: 0027-8424.
- [128] J. Shin, K. Kim, H. Kang, I. S. Zulfugarov, G. Bae, C.-H. Lee, D. Lee und G. Choi. “Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting phytochrome-interacting factors”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.18 (2009), S. 7660–7665. ISSN: 0027-8424.
- [129] X. Ouyang, J. Li, G. Li, B. Li, B. Chen, H. Shen, X. Huang, X. Mo, X. Wan, R. Lin, S. Li, H. Wang und X. W. Deng. “Genome-Wide Binding Site Analysis of FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL3 Reveals Its Novel Function in Arabidopsis Development”. In: *The Plant Cell* 23.7 (2011), S. 2514–2535. ISSN: 1040-4651.
- [130] M. T. Waters, P. Wang, M. Korkaric, R. G. Capper, N. J. Saunders und J. A. Langdale. “GLK Transcription Factors Coordinate Expression of the Photosynthetic Apparatus in Arabidopsis”. In: *the Plant Cell Online* 21.4 (2009), S. 1109–1128. ISSN: 1040-4651.
- [131] M. T. Waters und J. A. Langdale. “The making of a chloroplast”. In: *EMBO Journal* 28.19 (2009), S. 2861–2873. ISSN: 02614189.
- [132] C. Lüer, S. Schauer, K. Möbius, J. Schulze, W. D. Schubert, D. W. Heinz, D. Jahn und J. Moser. “Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1- semialdehyde 2,1-aminomutase in Escherichia coli during the initial reactions of porphyrin biosynthesis”. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.19 (2005), S. 18568–18572. ISSN: 00219258.
- [133] L. A. Nogaj und S. I. Beale. “Physical and kinetic interactions between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of Chlamydomonas reinhardtii”. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.26 (2005), S. 24301–24307. ISSN: 00219258.

- [134] Y. Fang, S. Zhao, F. Zhang, A. Zhao, W. Zhang, M. Zhang und L. Liu. “The Arabidopsis glutamyl-tRNA reductase (GluTR) forms a ternary complex with FLU and GluTR-binding protein”. In: *Scientific Reports* 6.December 2015 (2016), S. 4–10. ISSN: 20452322.
- [135] A. Srivastava und S. I. Beale. “Glutamyl-tRNA reductase of *Chlorobium vibrioforme* is a dissociable homodimer that contains one tightly bound heme per subunit”. In: *Journal of Bacteriology* 187.13 (2005), S. 4444–4450. ISSN: 00219193.
- [136] M. J. Terry und R. E. Kendrick. “Feedback Inhibition of Chlorophyll Synthesis in the Phytochrome Chromophore-Deficient aurea and yellow-green-2 Mutants of Tomato”. In: *Plant Physiology* 119.1 (2002), S. 143–152. ISSN: 0032-0889.
- [137] U. C. Vothknecht, C. G. Kannangara und D. von Wettstein. “Barley Glutamyl tRNA-Glu Reductase: Mutations Affecting Haem Inhibition and Enzyme Activity”. In: *Phytochemistry* 47.4 (1998), S. 513–519.
- [138] A. S. Richter, C. Banse und B. Grimm. “The GluTR-binding protein is the heme-binding factor for feedback control of glutamyl-tRNA reductase”. In: *eLife* 8 (2019), S. 1–18.
- [139] A. Richter, E. Peter, Y. Pörs, S. Lorenzen, B. Grimm und O. Czarnecki. “Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves.” In: *Plant & cell physiology* 51.5 (Mai 2010), S. 670–81. ISSN: 1471-9053.
- [140] R. Meskauskiene, M. Nater, D. Goslings, F. Kessler, R. op den Camp und K. Apel. “FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*.” In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.22 (2001), S. 12826–31. ISSN: 0027-8424.
- [141] K. P. Lee, C. Kim, D. W. Lee und K. Apel. “TIGRINA d, required for regulating the biosynthesis of tetrapyrroles in barley, is an ortholog of the FLU gene of *Arabidopsis thaliana*”. In: *FEBS Letters* 553.1-2 (2003), S. 119–124. ISSN: 00145793.
- [142] A. Falciatore, L. Merendino, F. Barneche, M. Ceol, R. Meskauskiene, K. Apel und J. D. Rochaix. “The FLP proteins act as regulators of chlorophyll synthesis in response to light and plastid signals in *Chlamydomonas*”. In: *Genes and Development* 19.1 (2005), S. 176–187. ISSN: 08909369.
- [143] D. Kauss, S. Bischof, S. Steiner, K. Apel und R. Meskauskiene. “FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway.” In: *FEBS Lett.* 586.3 (Feb. 2012), S. 211–216. ISSN: 1873-3468.
- [144] M. Zhang, F. Zhang, Y. Fang, X. Chen, Y. Chen, W. Zhang, H. E. Dai, R. Lin und L. Liu. “The non-canonical tetratricopeptide repeat (TPR) domain of fluorescent (FLU) mediates complex formation with glutamyl-tRNA reductase”. In: *Journal of Biological Chemistry* 290.28 (2015), S. 17559–17565. ISSN: 1083351X.
- [145] D. Goslings, R. Meskauskiene, C. Kim, K. P. Lee, M. Nater und K. Apel. “Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis , in dark- and light-grown *Arabidopsis* plants”. In: 2004 (2003), S. 957–967.
- [146] J. Apitz, K. Nishimura, J. Schmied, A. Wolf, B. Hedtke, K. J. van Wijk und B. Grimm. “Posttranslational Control of ALA Synthesis Includes GluTR Degradation by Clp Protease and Stabilization by GluTR-Binding Protein”. In: *Plant Physiology* 170.4 (2016), S. 2040–2051. ISSN: 0032-0889.
- [147] Z. Hou, Y. Yang, B. Hedtke und B. Grimm. “Fluorescence in blue light (FLU) is involved in inactivation and localization of glutamyl-tRNA reductase during light exposure”. In: *Plant Journal* 97.3 (2019), S. 517–529. ISSN: 1365313X.
- [148] H. S. Jung, Y. Okegawa, P. M. Shih, E. Kellogg, S. E. Abdel-Ghany, M. Pilon, K. Sjolander, T. Shikanai und K. K. Niyogi. “*Arabidopsis thaliana* PGR7 encodes a conserved chloroplast protein that is necessary for efficient photosynthetic electron transport”. In: *PLoS ONE* 5.7 (2010), S. 1–11. ISSN: 19326203.

- [149] O. Czarnecki, B. Hedtke, M. Melzer, M. Rothbart, A. Richter, Y. Schröter, T. Pfannschmidt und B. Grimm. “An Arabidopsis GluTR Binding Protein Mediates Spatial Separation of 5-Aminolevulinic Acid Synthesis in Chloroplasts”. In: *The Plant Cell* 23.12 (Dez. 2011), S. 4476–4491. ISSN: 1040-4651.
- [150] Y. Guo, G. Guo, X. Mao, W. Zhang, J. Xiao, W. Tong, T. Liu, B. Xiao, X. Liu, Y. Feng und Q. Zou. “Functional identification of HugZ, a heme oxygenase from *Helicobacter pylori*”. In: *BMC Microbiology* 8 (2008). ISSN: 14712180.
- [151] P. Wang, F.-C. Liang, D. Wittmann, A. Siegel, S.-o. Shan und B. Grimm. “Chloroplast SRP43 acts as a chaperone for glutamyl-tRNA reductase, the rate-limiting enzyme in tetrapyrrole biosynthesis”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.15 (2018), S. 201719645. ISSN: 0027-8424.
- [152] E. Kruse, B. Grimm, J. Beator und K. Kloppstech. “Developmental and circadian control of the capacity for δ -aminolevulinic acid synthesis in green barley”. In: *Planta* 202.2 (1997), S. 235–241. ISSN: 00320935.
- [153] K. Nishimura und K. J. van Wijk. “Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids”. In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9 (2015), S. 915–930. ISSN: 00063002.
- [154] K. Nishimura, Y. Asakura, G. Friso, J. Kim, S.-h. Oh, H. Rutschow, L. Ponnala und K. J. van Wijk. “ClpS1 Is a Conserved Substrate Selector for the Chloroplast Clp Protease System in Arabidopsis”. In: *The Plant Cell* 25.6 (2013), S. 2276–2301. ISSN: 1040-4651.
- [155] J. Schmied, B. Hedtke und B. Grimm. “Overexpression of HEMA1 encoding glutamyl-tRNA reductase”. In: *Journal of Plant Physiology* 168.12 (2011), S. 1372–1379. ISSN: 01761617.
- [156] D. Schuenemann, S. Gupta, F. Persello-Cartieaux, V. I. Klimyuk, J. D. G. Jones, L. Nussaume und N. E. Hoffman. “A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.17 (1998), S. 10312–10316. ISSN: 0027-8424.
- [157] S. Zhong, M. Zhao, T. Shi, H. Shi, F. An, Q. Zhao und H. Guo. “EIN3/EIL1 cooperate with PIF1 to prevent photo-oxidation and to promote greening of Arabidopsis seedlings”. In: *PNAS* 106.50 (2009), S. 1–6.
- [158] J. Moon, L. Zhu, H. Shen und E. Huq. “PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.27 (2008), S. 9433–9438. ISSN: 0027-8424.
- [159] Z. Ni, E.-D. Kim, M. Ha, E. Lackey, J. Liu, Y. Zhang, Q. Sun und Z. J. Chen. “Altered circadian rhythms regulate growth vigor in hybrids and allopolyploids”. In: *Nature* 457.7227 (2009), S. 327–331.
- [160] P. Y. Hsu, U. K. Devisetty und S. L. Harmer. “Accurate timekeeping is controlled by a cycling activator in Arabidopsis”. In: *eLife* 2 (2013), S. 3–5.
- [161] G. Xu, H. Guo, D. Zhang, D. Chen, Z. Jiang und R. Lin. “REVEILLE1 promotes NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase A expression and seedling greening in Arabidopsis”. In: *Photosynthesis Research* 126.2-3 (2015), S. 331–340. ISSN: 15735079.
- [162] A. Schönberg, E. Bergner, S. Helm, B. Agne, B. Dünschede, D. Schünemann, M. Schutkowski und S. Baginsky. “The peptide microarray “chlorophos1.0 identifies new phosphorylation targets of plastid casein kinase II (pCKII) in Arabidopsis thaliana”. In: *PLoS One* 9.10 (2014). ISSN: 19326203.
- [163] S. Kovacheva, M. Ryberg und C. Sundqvist. “ADP/ATP and protein phosphorylation dependence of phototransformable protochlorophyllide in isolated etioplast membranes”. In: *Photosynthesis Research* 64.2-3 (2000), S. 127–136. ISSN: 01668595.

- [164] C. Alban, M. Tardif, M. Mininno, S. Brugière, A. Gilgen, S. Ma, M. Mazzoleni, O. Gigarel, J. Martin-Laffon, M. Ferro und S. Ravanel. “Uncovering the protein lysine and arginine methylation network in arabidopsis chloroplasts”. In: *PLoS ONE* 9.4 (2014). ISSN: 19326203.
- [165] J. Hu, X. Huang, L. Chen, X. Sun, C. Lu, L. Zhang, Y. Wang und J. Zuo. “Site-Specific Nitrosoproteomic Identification of Endogenously S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis”. In: *Plant Physiology* 167.4 (2015), S. 1731–1746. ISSN: 0032-0889.
- [166] Z. W. Zhang, M. X. Li, B. Huang, L. Y. Feng, F. Wu, Y. F. Fu, X. J. Zheng, H. Q. Peng, Y. E. Chen, H. N. Yang, L. T. Wu, M. Yuan und S. Yuan. “Nitric oxide regulates chlorophyllide biosynthesis and singlet oxygen generation differently between Arabidopsis and barley”. In: *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 76 (2018), S. 6–15. ISSN: 10898611.
- [167] J. N. Lohscheider, M. C. Rojas-Stütz, M. Rothbart, U. Andersson, D. Funck, K. Mendgen, B. Grimm und I. Adamska. “Altered levels of LIL3 isoforms in Arabidopsis lead to disturbed pigment-protein assembly and chlorophyll synthesis, chlorotic phenotype and impaired photosynthetic performance”. In: *Plant, Cell and Environment* 38.10 (2015), S. 2115–2127. ISSN: 13653040.
- [168] R. Tanaka, M. Rothbart, S. Oka, A. Takabayashi, K. Takahashi, M. Shibata, F. Myouga, R. Motohashi, K. Shinozaki, B. Grimm und A. Tanaka. “LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.38 (2010), S. 16721–16725. ISSN: 0027-8424.
- [169] A. E. Mork-Jansson und L. A. Eichacker. “Characterization of chlorophyll binding to LIL3”. In: *PLoS ONE* 13.2 (2018), S. 1–14. ISSN: 19326203.
- [170] K. Takahashi, A. Takabayashi, A. Tanaka und R. Tanaka. “Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting chlorophyll-binding motif in arabidopsis”. In: *Journal of Biological Chemistry* 289.2 (2014), S. 987–999. ISSN: 00219258.
- [171] M. Kawai-Yamada, Y. Saito, L. Jin, T. Ogawa, K. M. Kim, L. H. Yu, Y. Tone, A. Hirata, M. Umeda und H. Uchimiya. “A novel arabidopsis gene causes Bax-like lethality in *Saccharomyces cerevisiae*”. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.47 (2005), S. 39468–39473. ISSN: 00219258.
- [172] J.-Y. Lee, H.-S. Lee, J.-Y. Song, Y. J. Jung, S. Reinbothe, Y.-I. Park, S. Y. Lee und H.-S. Pai. “Cell Growth Defect Factor1/CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR1 Plays a Role in Stabilization of Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase in *Nicotiana benthamiana* and Arabidopsis”. In: *The Plant Cell* 25.10 (2013), S. 3944–3960. ISSN: 1040-4651.
- [173] P. Pulido und D. Leister. “Novel DNAJ-related proteins in Arabidopsis thaliana”. In: *New Phytologist* 217.2 (2018), S. 480–490. ISSN: 14698137.
- [174] H. Liu, Q. Li, F. Yang, F. Zhu, Y. Sun, Y. Tao und C. Lo. “Differential regulation of protochlorophyllide oxidoreductase abundances by VIRESCENT 5A (OsV5A) and VIRESCENT 5B (OsV5B) in rice seedlings”. In: *Plant and Cell Physiology* 57.11 (2016), S. 2392–2402. ISSN: 14719053. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [175] M. Kawai-Yamada, M. Nagano, M. Kakimoto und H. Uchimiya. “Plastidic protein Cdf1 is essential in Arabidopsis embryogenesis”. In: *Planta* 239.1 (2014), S. 39–46. ISSN: 00320935.
- [176] S. Sato, Y. Shimoda, A. Muraki, M. Kohara, Y. Nakamura und S. Tabata. “A large-scale protein-protein interaction analysis in *synechocystis* sp. PCC6803”. In: *DNA Research* 14.5 (2007), S. 207–216. ISSN: 13402838.
- [177] M. Schottkowski, J. Ratke, U. Oster, M. Nowaczyk und J. Nickelsen. “Pitt, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in light-dependent chlorophyll biosynthesis and thylakoid membrane biogenesis in *synechocystis* sp. PCC 6803”. In: *Molecular Plant* 2.6 (2009), S. 1289–1297. ISSN: 17529867.

- [178] B. Rengstl, U. Oster, A. Stengel und J. Nickelsen. "An intermediate membrane subfraction in cyanobacteria is involved in an assembly network for photosystem II biogenesis". In: *Journal of Biological Chemistry* 286.24 (2011), S. 21944–21951. ISSN: 00219258.
- [179] Q. He und W. Vermaas. "Chlorophyll a availability affects psbA translation and D1 precursor processing in vivo in *Synechocystis* sp. PCC 6803". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95.10 (1998), S. 5830–5835. ISSN: 0027-8424.
- [180] A. Rast, S. Heinz und J. Nickelsen. "Biogenesis of thylakoid membranes". In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9 (2015), S. 821–830. ISSN: 00063002.
- [181] E. M. Marcotte, M. Pellegrini, T. O. Yeates und D. Eisenberg. "A census of protein repeats". In: *Journal of Molecular Biology* 293.1 (1999), S. 151–160. ISSN: 00222836.
- [182] M. A. Andrade, C. Perez-Iratxeta und C. P. Ponting. "Protein repeats: Structures, functions, and evolution". In: *Journal of Structural Biology* 134.2-3 (2001), S. 117–131. ISSN: 10478477.
- [183] Å. K. Björklund, D. Ekman und A. Elofsson. "Expansion of protein domain repeats". In: *PLoS Computational Biology* 2.8 (2006), S. 0959–0970. ISSN: 1553734X.
- [184] K. W. Tripp und D. Barrick. "The tolerance of a modular protein to duplication and deletion of internal repeats". In: *Journal of Molecular Biology* 344.1 (2004), S. 169–178. ISSN: 00222836.
- [185] E. R. G. Main, K. Stott, S. E. Jackson und L. Regan. "Local and long-range stability in tandemly arrayed tetratricopeptide repeats". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.16 (2005), S. 5721–5726. ISSN: 0027-8424.
- [186] E. R. Main, S. E. Jackson und L. Regan. "The folding and design of repeat proteins: Reaching a consensus". In: *Current Opinion in Structural Biology* 13.4 (2003), S. 482–489. ISSN: 0959440X.
- [187] M. Sharma und G. K. Pandey. "Expansion and Function of Repeat Domain Proteins During Stress and Development in Plants". In: *Frontiers in Plant Science* 6.January (2016), S. 1–15.
- [188] J. R. Lamb, S. Tugendreich und P. Hieter. "Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?" In: *Trends in Biochemical Sciences* 20.7 (1995), S. 257–259. ISSN: 09680004.
- [189] G. L. Blatch und M. Lässle. "The tetratricopeptide repeat: A structural motif mediating protein-protein interactions". In: *BioEssays* 21.11 (1999), S. 932–939. ISSN: 02659247.
- [190] L. D. D'Andrea und L. Regan. "TPR proteins: The versatile helix". In: *Trends in Biochemical Sciences* 28.12 (2003), S. 655–662. ISSN: 09680004.
- [191] D. Fournier, G. A. Palidwor, S. Shcherbinin, A. Szengel, M. H. Schaefer, C. Perez-Iratxeta und M. A. Andrade-Navarro. "Functional and genomic analyses of alpha-solenoid proteins". In: *PLoS ONE* 8.11 (2013). ISSN: 19326203.
- [192] A. K. Das u. a. "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." In: *The EMBO journal* 17.5 (1998), S. 1192–9. ISSN: 0261-4189.
- [193] S. Grizot, F. Fieschi, M. C. Dagher und E. Pebay-Peyroula. "The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease". In: *Journal of Biological Chemistry* 276.24 (2001), S. 21627–21631. ISSN: 00219258.
- [194] N. Zeytuni und R. Zarivach. "Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module". In: *Structure* 20.3 (2012), S. 397–405. ISSN: 09692126.
- [195] J. J. Phillips, Y. Javadi, C. Millership und E. R. G. Main. "Modulation of the multistate folding of designed TPR proteins through intrinsic and extrinsic factors". In: *Protein Science* 21.3 (2012), S. 327–338. ISSN: 09618368.

- [196] R. Zhang, F. Jiang, Y. Zhang, Y. Hu, D.-C. Wang, X. Shen, Q. Zou, G. Guo, X. Mao und Y. Guo. "Crystal Structure of HugZ, a Novel Heme Oxygenase from *Helicobacter pylori*". In: *Journal of Biological Chemistry* 286.2 (2010), S. 1537–1544. ISSN: 0021-9258.
- [197] A. V. Bohne, S. Schwenkert, B. Grimm und J. Nickelsen. *Roles of Tetratricopeptide Repeat Proteins in Biogenesis of the Photosynthetic Apparatus*. Bd. 324. Elsevier Inc., 2016, S. 187–227. ISBN: 9780128048078.
- [198] C. P. Ponting, L. Aravind, J. Schultz, P. Bork und E. V. Koonin. "Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer". In: *Journal of Molecular Biology* 289.4 (1999), S. 729–745. ISSN: 00222836.
- [199] K. K. Jernigan und S. R. Bordenstein. "Tandem-repeat protein domains across the tree of life". In: *PeerJ* 3 (2015), e732. ISSN: 2167-8359.
- [200] H. Naver, E. Boudreau und J.-D. Rochaix. "Functional Studies of Ycf3: Its Role in Assembly of Photosystem I and Interactions with Some of Its Subunits". In: *The Plant Cell* 13.12 (2001), S. 2731. ISSN: 10404651.
- [201] S. Nellaepalli, S. I. Ozawa, H. Kuroda und Y. Takahashi. "The photosystem i assembly apparatus consisting of Ycf3-Y3IP1 and Ycf4 modules". In: *Nature Communications* 9.1 (2018), S. 1–10. ISSN: 20411723.
- [202] S. Ruf, H. Kössel und R. Bock. "Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene". In: *Journal of Cell Biology* 139.1 (1997), S. 95–102. ISSN: 00219525.
- [203] U. Dühring, K. D. Irrgang, K. Lünser, J. Kehr und A. Wilde. "Analysis of photosynthetic complexes from a cyanobacterial ycf37 mutant". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1757.1 (2006), S. 3–11. ISSN: 00052728.
- [204] M. Heinnickel, R. G. Kim, T. M. Wittkopp, W. Yang, K. A. Walters, S. K. Herbert und A. R. Grossman. "Tetratricopeptide repeat protein protects photosystem I from oxidative disruption during assembly". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.10 (2016), S. 2774–2779. ISSN: 0027-8424.
- [205] J. Stöckle, S. Bennewitz, P. Hein und R. Oelmüller. "The Evolutionarily Conserved Tetratricopeptide Repeat Protein Pale Yellow Green7 Is Required for Photosystem I Accumulation in Arabidopsis and Copurifies with the Complex". In: *Plant physiology* 141.July (2006), S. 870–878.
- [206] H. Yang, P. Li, A. Zhang, X. Wen, L. Zhang und C. Lu. "Tetratricopeptide repeat protein Pyg7 is essential for photosystem I assembly by interacting with PsaC in Arabidopsis". In: *Plant Journal* 91.6 (2017), S. 950–961. ISSN: 1365313X.
- [207] B. Klinkert, F. Ossenbühl, M. Sikorski, S. Berry, L. Eichacker und J. Nickelsen. "PratA, a periplasmic tetratricopeptide repeat protein involved in biogenesis of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803". In: *Journal of Biological Chemistry* 279.43 (2004), S. 44639–44644. ISSN: 00219258.
- [208] M. Schottkowski, S. Gkalympoudis, N. Tzekova, C. Stelljes, D. Schünemann, E. Ankele und J. Nickelsen. "Interaction of the periplasmic pratA factor and the PsbA (D1) protein during biogenesis of photosystem II in *synechocystis* sp. PCC 6803". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.3 (2009), S. 1813–1819. ISSN: 00219258.
- [209] A. Stengel, I. L. Gugel, D. Hilger, B. Rengstl, H. Jung und J. Nickelsen. "Initial Steps of Photosystem II de Novo Assembly and Preloading with Manganese Take Place in Biogenesis Centers in *Synechocystis*". In: *the Plant Cell Online* 24.2 (2012), S. 660–675. ISSN: 1040-4651.
- [210] L. Peng. "LOW PSII ACCUMULATION1 Is Involved in Efficient Assembly of Photosystem II in *Arabidopsis thaliana*". In: *the Plant Cell Online* 18.4 (2006), S. 955–969. ISSN: 1040-4651.

- [211] N. H. Bhuiyan, G. Friso, A. Poliakov, L. Ponnala und K. J. van Wijk. "MET1 Is a Thylakoid-Associated TPR Protein Involved in Photosystem II Supercomplex Formation and Repair in Arabidopsis". In: *The Plant Cell Online* 27.1 (2015), S. 262–285. ISSN: 1040-4651.
- [212] Z. Hu, F. Xu, L. Guan, P. Qian, Y. Liu, H. Zhang, Y. Huang und S. Hou. "The tetratricopeptide repeat-containing protein slow green1 is required for chloroplast development in Arabidopsis". In: *Journal of Experimental Botany* 65.4 (2014), S. 1111–1123. ISSN: 00220957.
- [213] Ł. M. Kowalewska, R. Mazur, S. Suski, M. Garstka und A. Mostowska. "Three-dimensional visualization of the internal plastid membrane network during runner bean chloroplast biogenesis. Dynamic model of the tubular-lamellar transformation." In: *The Plant Cell* 28.April (2016), tpc.01053.2015. ISSN: 1040-4651.
- [214] E. Selstam und A. S. Sandelius. "A Comparison between Prolamellar Bodies and Prothylakoid Membranes of Etioplasts of Dark-Grown Wheat Concerning Lipid and Polypeptide Composition". In: *Plant Physiology* 76.4 (1984), S. 1036–1040. ISSN: 0032-0889.
- [215] L. A. Blomqvist, M. Ryberg und C. Sundqvist. "Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development". In: *Photosynthesis Research* 96.1 (2008), S. 37–50. ISSN: 01668595.
- [216] D. R. Berry und H. Smith. "RED-LIGHT STIMULATION OF PROLAMELLAR BODY RECRYSTALLIZATION AND THYLAKOID FORMATION IN BARLEY ETIOPLASTS develop into well denned organelles of considerable structural complexity . These * Present address : Department of Applied Microbiology , The Univers". In: *J. Cell Sci.* 8 (1971), S. 185–200.
- [217] C. Sundqvist und C. Dahlin. "With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light harvesting complexes". In: *Physiol Plant* 100.4 (1997), S. 748–759.
- [218] B. Böddi, M. Ryberg und C. Sundqvist. "Identification of four universal protochlorophyllide forms in dark-grown leaves by analyses of the 77 K fluorescence emission spectra". In: *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 12.4 (1992), S. 389–401. ISSN: 10111344.
- [219] D. J. Heyes, C. N. Hunter, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, M. L. Groot, R. V. Grondelle und M. L. Groot. "Ultrafast enzymatic reaction dynamics in". In: *Nature structural biology* 10.6 (2003), S. 388–389. ISSN: 10728368.
- [220] U. Sperling, F. Franck, B. van Cleve, G. Frick, K. Apel und G. A. Armstrong. "Etioplast Differentiation in Arabidopsis: Both PORA and PORB Restore the Prolamellar Body and Photoactive Protochlorophyllide-F655 to the cop1 Photomorphogenic Mutant". In: *The Plant Cell* 10.2 (1998), S. 283. ISSN: 10404651.
- [221] F. Franck, U. Sperling, G. Frick, B. Pochert, K. Apel und G. A. Armstrong. "Regulation of Etioplast Pigment-Protein Complexes, Inner Membrane Architecture, and Protochlorophyllide a Chemical Heterogeneity by Light-Dependent NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B". In: *Plant Physiology* 124.4 (2002), S. 1678–1696. ISSN: 0032-0889.
- [222] S. Masuda, R. Ikeda, T. Masuda, H. Hashimoto, T. Tsuchiya, H. Kojima, J. Nomata, Y. Fujita, M. Mimuro, H. Ohta und K. I. Takamiya. "Prolamellar bodies formed by cyanobacterial protochlorophyllide oxidoreductase in Arabidopsis". In: *Plant Journal* 58.6 (2009), S. 952–960. ISSN: 09607412.
- [223] S. Fujii, K. Kobayashi, N. Nagata, T. Masuda und H. Wada. "Monogalactosyldiacylglycerol Facilitates Synthesis of Photoactive Protochlorophyllide in Etioplasts". In: *Plant Physiology* 174.4 (2017), S. 2183–2198. ISSN: 0032-0889.
- [224] K. Solymosi und B. Schoefs. "Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: The dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms". In: *Photosynthesis Research* 105.2 (2010), S. 143–166. ISSN: 01668595.

- [225] N. Erdei, C. Barta, É. Hideg und B. Böddi. "Light-induced wilting and its molecular mechanism in epicotyls of dark-germinated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings". In: *Plant and Cell Physiology* 46.1 (2005), S. 185–191. ISSN: 00320781.
- [226] F. Franck, B. Schoefs, X. Barthélemy, B. Myśliwa-Kurdziel, K. Strzałka und R. Popovic. "Protection of native chlorophyll(ide) forms and of photosystem II against photodamage during early stages of chloroplast differentiation". In: *Acta Physiologiae Plantarum* 17.2 (1995), S. 123–132.
- [227] M. Pribil, M. Labs und D. Leister. "Structure and dynamics of thylakoids in land plants". In: *Journal of Experimental Botany* 65.8 (2014), S. 1955–1972. ISSN: 14602431.
- [228] A. Cortleven, I. Marg, M. V. Yamburenko, H. Schlicke, K. Hill, B. Grimm, G. E. Schaller und T. Schmölling. "Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes". In: *Plant Physiology* 172.1 (2016), S. 464–478. ISSN: 0032-0889.
- [229] L. Zhang, Y. Kato, S. Otters, U. C. Vothknecht und W. Sakamoto. "Essential Role of VIPP1 in Chloroplast Envelope Maintenance in Arabidopsis". In: *The Plant Cell* 24.9 (2012), S. 3695–3707. ISSN: 1040-4651.
- [230] S. Karim und H. Aronsson. "The puzzle of chloroplast vesicle transport involvement of GTPases". In: *Frontiers in Plant Science* 5.May (2014). ISSN: 1664-462X.
- [231] D. Kroll, K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U. C. Vothknecht, J. Soll und P. Westhoff. "VIPP1, a nuclear gene of Arabidopsis thaliana essential for thylakoid membrane formation". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98.7 (2001), S. 4238–4242. ISSN: 0027-8424.
- [232] S. K. Tanz, J. Kilian, C. Johnsson, K. Apel, I. Small, K. Harter, D. Wanke, B. Pogson und V. Albrecht. "The SCO2 protein disulphide isomerase is required for thylakoid biogenesis and interacts with LCHB1 chlorophyll a/b binding proteins which affects chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis seedlings". In: *Plant Journal* 69.5 (2012), S. 743–754. ISSN: 09607412.
- [233] T. Tzvetkova-Chevolleau, C. Hutin, L. D. Noel, R. Goforth, J.-P. Carde, S. Caffarri, I. Sinning, M. Groves, J.-M. Teulon, N. E. Hoffman, R. Henry, M. Havaux und L. Nussaume. "Canonical Signal Recognition Particle Components Can Be Bypassed for Posttranslational Protein Targeting in Chloroplasts". In: *Plant Cell Online* 19.5 (2007), S. 1635–1648. ISSN: 1040-4651.
- [234] E. Sundberg. "ALBIN03, an Arabidopsis Nuclear Gene Essential for Chloroplast Differentiation, Encodes a Chloroplast Protein That Shows Homology to Proteins Present in Bacterial Membranes and Yeast Mitochondria". In: *the Plant Cell Online* 9.5 (1997), S. 717–730. ISSN: 10404651.
- [235] C. J. Tu, D. Schuenemann und N. E. Hoffman. "Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes". In: *Journal of Biological Chemistry* 274.38 (1999), S. 27219–27224. ISSN: 00219258.
- [236] C. A. Woolhead, S. J. Thompson, M. Moore, C. Tissier, A. Mant, A. Rodger, R. Henry und C. Robinson. "Distinct Albino3-dependent and -independent Pathways for Thylakoid Membrane Protein Insertion". In: *Journal of Biological Chemistry* 276.44 (2001), S. 40841–40846. ISSN: 00219258.
- [237] M. Moore, R. L. Goforth, H. Mori und R. Henry. "Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: Substrate not required". In: *Journal of Cell Biology* 162.7 (2003), S. 1245–1254. ISSN: 00219525.
- [238] D. Ziehe, B. Dünschede und D. Schünemann. "From bacteria to chloroplasts: evolution of the chloroplast SRP system". In: *Biological Chemistry* 398.5-6 (2017), S. 653–661. ISSN: 1431-6730.
- [239] D. Hey und B. Grimm. "ONE-HELIX PROTEIN 2 (OHP2) is required for the stability of OHP1 and assembly factor HCF244 and is functionally linked to PSII biogenesis". In: *Plant Physiology* (2018), pp.00540.2018. ISSN: 0032-0889.

- [240] K. Apel und K. Kloppstech. "The effect of light on the biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b protein - Evidence for the requirement of chlorophyll a for the stabilization of the apoprotein". In: *Planta* 150.5 (1980), S. 426–430. ISSN: 00320935.
- [241] M. Brouers und M. R. Michel-Wolwertz. "Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide)". In: *Photosynthesis Research* 4.3 (1983), S. 265–270. ISSN: 01668595.
- [242] J. K. Hooper, M. A. Maloney, L. R. Asbury und D. B. Marks. "Accumulation of chlorophyll a/b-binding polypeptides in *Chlamydomonas reinhardtii* y-1 in the light or dark at 38 °C". In: *Plant Physiology* 92 (1990), S. 419–426. ISSN: 00320889.
- [243] K. Solymosi und H. Aronsson. *Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence*. Bd. 36. April 2013. 2013. ISBN: 978-94-007-5723-3.
- [244] M. Bertrand, B. Bereza und E. Dujardin. "Evidence for Photoreduction of NADP⁺ in a Suspension of Lysed Plastids from Etiolated Bean Leaves". In: *Zeitschrift für Naturforschung C* 43.5-6 (1988), S. 443–448. ISSN: 0939-5075.
- [245] E. Kanervo, M. Singh, M. Suorsa, V. Paakkarinen, E. Aro, N. Battchikova und E. M. Aro. "Expression of protein complexes and individual proteins upon transition of etioplasts to chloroplasts in pea (*Pisum sativum*)". In: *Plant and Cell Physiology* 49.3 (2008), S. 396–410. ISSN: 00320781.
- [246] W. Chi, J. Ma und L. Zhang. "Regulatory factors for the assembly of thylakoid membrane protein complexes". In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367.1608 (2012), S. 3420–3429. ISSN: 14712970.
- [247] J.-R. Shen. "The Structure of Photosystem II and the Mechanism of Water Oxidation in Photosynthesis". In: *Annual Review of Plant Biology* 66.1 (2015), S. 23–48. ISSN: 1543-5008.
- [248] X. Su, X. Wei, D. Zhu, W. Chang, Z. Liu, X. Zhang und M. Li. "Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex". In: *Science* 820.August (2017), S. 815–820.
- [249] S. Caffarri, R. Kouřil, S. Kereiche, E. J. Boekema und R. Croce. "Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes". In: *EMBO Journal* 28.19 (2009), S. 3052–3063. ISSN: 02614189.
- [250] Y. Lu. "Identification and Roles of Photosystem II Assembly, Stability, and Repair Factors in *Arabidopsis*". In: *Frontiers in Plant Science* 7.February (2016).
- [251] T. Rühle und D. Leister. "Photosystem II Assembly from Scratch". In: *Frontiers in Plant Science* 6.January (2016), S. 1–5.
- [252] H. Yang, J. Liu, X. Wen und C. Lu. "Molecular mechanism of photosystem I assembly in oxygenic organisms". In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9 (2015), S. 838–848. ISSN: 00063002.
- [253] A. H. Mehler. "Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents". In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33.1 (1951), S. 65–77. ISSN: 10960384.
- [254] K. Asada, K. Kiso und K. Yoshikawa. "Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination". In: *Journal of Biological Chemistry* 249.7 (1974), S. 2175–2181. ISSN: 00219258.
- [255] K. Asada. "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions". In: *Plant Physiology* 141.2 (2006), S. 391–396. ISSN: 0032-0889.
- [256] P. Sharma, A. B. Jha, R. S. Dubey und M. Pessarakli. "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions". In: *Journal of Botany* 2012 (2012), S. 1–26. ISSN: 2090-0120. arXiv: 217037.

- [257] É. Hideg, T. Kálai, K. Hideg und I. Vass. “Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves”. In: *Biochemistry* 37.33 (1998), S. 11405–11411. ISSN: 00062960.
- [258] A. Krieger-Liszkay. “Singlet oxygen production in photosynthesis”. In: *Journal of Experimental Botany* 56.411 (2005), S. 337–346. ISSN: 00220957.
- [259] É. Hideg, C. Barta, T. Kálai, I. Vass, K. Hideg und K. Asada. “Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation”. In: *Plant and Cell Physiology* 43.10 (2002), S. 1154–1164. ISSN: 00320781.
- [260] B. C. Tripathy, A. Mohapatra und I. Gupta. “Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX”. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767.6 (2007), S. 860–868. ISSN: 00052728.
- [261] H. P. Mock und B. Grimm. “Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by Antisense RNA Expression Affects Activities of Other Enzymes Involved in Tetrapyrrole Biosynthesis and Leads to Light-Dependent Necrosis”. In: *Plant Physiology* 113.4 (1997), S. 1101–1112. ISSN: 0032-0889.
- [262] H. P. Mock, W. Heller, A. Molina, B. Neubohn, H. Sandermann und B. Grimm. “Expression of uroporphyrinogen decarboxylase or coproporphyrinogen oxidase antisense RNA in tobacco induces pathogen defense responses conferring increased resistance to tobacco mosaic virus”. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.7 (1999), S. 4231–4238. ISSN: 00219258.
- [263] E. Kruse, H. P. Mock und B. Grimm. “Reduction of coproporphyrinogen oxidase level by antisense RNA synthesis leads to deregulated gene expression of plastid proteins and affects the oxidative defense system.” In: *The EMBO Journal* 14.15 (1995), S. 3712–3720.
- [264] A. Ishikawa, H. Okamoto, Y. Iwasaki und T. Asahi. “A deficiency of coproporphyrinogen III oxidase causes lesion formation in Arabidopsis”. In: *Plant Journal* 27.2 (2001), S. 89–99. ISSN: 09607412.
- [265] S. García-Santamarina, S. Boronat und E. Hidalgo. “Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction”. In: *Biochemistry* 53.16 (2014), S. 2560–2580. ISSN: 15204995.
- [266] A. Mhamdi und F. Van Breusegem. “Reactive oxygen species in plant development”. In: *Development* 145.15 (2018), dev164376. ISSN: 0950-1991.
- [267] N. Suzuki, G. Miller, J. Morales, V. Shulaev, M. A. Torres und R. Mittler. “Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling”. In: *Current Opinion in Plant Biology* 14.6 (2011), S. 691–699. ISSN: 13695266.
- [268] A. Trchounian, M. Petrosyan und N. Sahakyan. *Plant Cell Redox Homeostasis and Reactive Oxygen Species*. 2016, S. 1–386. ISBN: 9783319440811.
- [269] C. H. Foyer und B. Halliwell. “The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism Christine”. In: *Planta* 5 (1976), S. 5–6.
- [270] C. H. Foyer und G. Noctor. “Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub”. In: *Plant Physiology* 155.1 (2011), S. 2–18. ISSN: 0032-0889.
- [271] J. D. Woodson, M. S. Joens, A. B. Sinson, J. Gilkerson, P. A. Salomé, D. Weigel, J. A. Fitzpatrick und J. Chory. “Ubiquitin facilitates a quality-control pathway that removes damaged chloroplasts”. In: *Science* 350.6259 (2015), S. 450–454. ISSN: 10959203. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [272] L. Zhong, W. Zhou, H. Wang, S. Ding, Q. Lu, X. Wen, L. Peng, L. Zhang und C. Lu. “Chloroplast Small Heat Shock Protein HSP21 Interacts with Plastid Nucleoid Protein pTAC5 and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis under Heat Stress”. In: *The Plant Cell* 25.8 (2013), S. 2925–2943. ISSN: 1040-4651.

- [273] S. J. Karpowicz, S. E. Prochnik, A. R. Grossman und S. S. Merchant. “The greenCut2 resource, a phylogenomically derived inventory of proteins specific to the plant lineage”. In: *Journal of Biological Chemistry* 286.24 (2011), S. 21427–21439. ISSN: 00219258.
- [274] A. Takabayashi, K. Kurihara, M. Kuwano, Y. Kasahara, R. Tanaka und A. Tanaka. “The oligomeric states of the photosystems and the light-harvesting complexes in the Chl b-less Mutant”. In: *Plant and Cell Physiology* 52.12 (2011), S. 2103–2114. ISSN: 00320781.
- [275] A. K. Biswal, G. K. Pattanayak, S. S. Pandey, S. Leelavathi, V. S. Reddy, Govindjee und B. C. Tripathy. “Light Intensity-Dependent Modulation of Chlorophyll b Biosynthesis and Photosynthesis by Overexpression of Chlorophyllide a Oxygenase in Tobacco”. In: *Plant Physiology* 159.1 (2012), S. 433–449. ISSN: 0032-0889.
- [276] E. Lindquist, K. Solymosi und H. Aronsson. “Vesicles Are Persistent Features of Different Plastids”. In: *Traffic* 17.10 (2016), S. 1125–1138. ISSN: 16000854.
- [277] M. Murakawa, M. Shimojima, Y. Shimomura, K. Kobayashi, K. Awai und H. Ohta. “Monogalactosyl-diacylglycerol synthesis in the outer envelope membrane of chloroplasts is required for enhanced growth under sucrose supplementation”. In: *Frontiers in Plant Science* 5.June (2014), S. 1–13.
- [278] K. Kobayashi. “Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development”. In: *Journal of Plant Research* 129.4 (2016), S. 565–580. ISSN: 09189440.
- [279] J. Li, G. Li, S. Gao, C. Martinez, G. He, Z. Zhou, X. Huang, J.-H. Lee, H. Zhang, Y. Shen, H. Wang und X. W. Deng. “Arabidopsis Transcription Factor ELONGATED HYPOCOTYL5 Plays a Role in the Feedback Regulation of Phytochrome A Signaling”. In: *the Plant Cell Online* 22.11 (2010), S. 3634–3649. ISSN: 1040-4651.
- [280] A. Dave und I. A. Graham. “Oxylipin Signaling: A Distinct Role for the Jasmonic Acid Precursor cis-(+)-12-Oxo-Phytodienoic Acid (cis-OPDA)”. In: *Frontiers in Plant Science* 3.March (2012), S. 1–6. ISSN: 1664-462X.
- [281] E. Lindquist und H. Aronsson. “Chloroplast vesicle transport”. In: *Photosynthesis Research* 138.3 (2018), S. 361–371. ISSN: 15735079.
- [282] R. G. L. op den Camp. “Rapid Induction of Distinct Stress Responses after the Release of Singlet Oxygen in Arabidopsis”. In: *the Plant Cell Online* 15.10 (2003), S. 2320–2332. ISSN: 1040-4651.
- [283] A. Mor, E. Koh, L. Weiner, S. Rosenwasser, H. Sibony-Benyamini und R. Fluhr. “Singlet Oxygen Signatures Are Detected Independent of Light or Chloroplasts in Response to Multiple Stresses”. In: *Plant Physiology* 165.1 (2014), S. 249–261. ISSN: 0032-0889.
- [284] L. Dall’Osto, S. Cazzaniga, M. Havaux und R. Bassi. “Enhanced photoprotection by protein-bound vs free xanthophyll pools: A comparative analysis of chlorophyll b and xanthophyll biosynthesis mutants”. In: *Molecular Plant* 3.3 (2010), S. 576–593. ISSN: 17529867.
- [285] J. Apitz, J. Schmied, M. J. Lehmann, B. Hedtke und B. Grimm. “GluTR2 complements a hema1 mutant lacking glutamyl-tRNA reductase 1, but is differently regulated at the post-translational level”. In: *Plant Cell Physiol.* 55.3 (2014), S. 645–657. ISSN: 14719053.
- [286] Y. Lima-Melo, V. T. C. B. Alencar, A. K. M. Lobo, R. H. V. Sousa, M. Tikkanen, E.-M. Aro, J. A. G. Silveira und P. J. Gollan. “Photoinhibition of Photosystem I Provides Oxidative Protection During Imbalanced Photosynthetic Electron Transport in Arabidopsis thaliana”. In: *Frontiers in Plant Science* 10.July (2019), S. 1–13. ISSN: 1664-462X.
- [287] D. Q. Fu, B. Z. Zhu, H. L. Zhu, W. B. Jiang und Y. B. Luo. “Virus-induced gene silencing in tomato fruit”. In: *Plant Journal* 43.2 (2005), S. 299–308. ISSN: 09607412.
- [288] L. Dietzel, K. Bräutigam, S. Steiner, K. Schüffler, B. Lepetit, B. Grimm, M. A. Schöttler und T. Pfannschmidt. “Photosystem II Supercomplex Remodeling Serves as an Entry Mechanism for State Transitions in Arabidopsis”. In: *The Plant Cell* 23.8 (2011), S. 2964–2977. ISSN: 1040-4651.

- [289] J. P. Vainonen, M. Hansson und A. V. Vener. "STN8 protein kinase in *Arabidopsis thaliana* is specific in phosphorylation of photosystem II core proteins". In: *Journal of Biological Chemistry* 280.39 (2005), S. 33679–33686. ISSN: 00219258.
- [290] M. Havaux, L. Dall'Osto und R. Bassi. "Zeaxanthin Has Enhanced Antioxidant Capacity with Respect to All Other Xanthophylls in *Arabidopsis* Leaves and Functions Independent of Binding to PSII Antennae". In: *Plant Physiology* 145.4 (2007), S. 1506–1520. ISSN: 0032-0889.
- [291] K. K. Niyogi, A. R. Grossman und O. Bjorkman. "Arabidopsis Mutants Define a Central Role for the Xanthophyll Cycle in the Regulation of Photosynthetic Energy Conversion". In: *The Plant Cell* 10.7 (2007), S. 1121. ISSN: 10404651.
- [292] A. V. Ruban und E. H. Murchie. "Assessing the photoprotective effectiveness of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: A new approach". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817.7 (2012), S. 977–982. ISSN: 00052728.
- [293] A. V. Ruban. "Nonphotochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching: Mechanism and Effectiveness in Protecting Plants from Photodamage". In: *Plant Physiology* 170.4 (2016), S. 1903–1916. ISSN: 0032-0889.
- [294] M. Landi, M. Tattini und K. S. Gould. "Multiple functional roles of anthocyanins in plant- environment interactions". In: *Environmental and Experimental Botany* 119 (2015), S. 4–17. ISSN: 00988472.
- [295] Z. Xu, K. Mahmood und S. J. Rothstein. "ROS induces anthocyanin production via late biosynthetic genes and anthocyanin deficiency confers the hypersensitivity to ROS-generating stresses in *Arabidopsis*". In: *Plant and Cell Physiology* 58.8 (2017), S. 1364–1377. ISSN: 14719053.
- [296] P. Kindgren, D. Kremnev, N. E. Blanco, J. De Dios Barajas López, A. P. Fernández, C. Tellgren-Roth, I. Small und Å. Strand. "The plastid redox insensitive 2 mutant of *Arabidopsis* is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus". In: *Plant Journal* 70.2 (2012), S. 279–291. ISSN: 09607412.
- [297] R. E. Susek, F. M. Ausubel und J. Chory. "Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development". In: *Cell* 74.5 (1993), S. 787–799. ISSN: 00928674.
- [298] S. Koussevitzky, A. Nott, T. C. Mockler, F. Hong, G. Sachetto-Martins, M. Surpin, J. Lim, R. Mittler und J. Chory. "Signals from Chloroplasts Converge to Regulate Nuclear Gene Expression". In: *Science* 316.5825 (2007), S. 715–719. ISSN: 0036-8075.
- [299] A. P. G. Bartels, C. W. Watson und S. Url. "Weed Science Society of America Inhibition of Carotenoid Synthesis by Fluridone and Norflurazon". In: *Weed Science* 26.2 (1978), S. 198–203.
- [300] N. R. Mekala, M. Suorsa, M. Rantala, E.-M. Aro und M. Tikkanen. "Plants Actively Avoid State Transitions upon Changes in Light Intensity: Role of Light-Harvesting Complex II Protein De-phosphorylation in High Light". In: *Plant Physiology* 168.2 (2015), S. 721–734. ISSN: 0032-0889.
- [301] R. Fristedt und A. V. Vener. "High light induced disassembly of photosystem II supercomplexes in *Arabidopsis* requires STN7-Dependent phosphorylation of CP29". In: *PLoS ONE* 6.9 (2011). ISSN: 19326203.
- [302] A. Rast, M. Schaffer, S. Albert, W. Wan, S. Pfeffer, F. Beck, J. M. Plitzko, J. Nickelsen und B. D. Engel. "Biogenic regions of cyanobacterial thylakoids form contact sites with the plasma membrane". In: *Nature Plants* 5.4 (2019), S. 436–446. ISSN: 20550278.
- [303] T. Masuda und K.-I. Takamiya. "Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms". In: *Photosynthesis Research* 81 (2004), S. 1–29.

- [304] A. S. Richter, C. Hochheuser, C. Fufezan, L. Heinze, F. Kuhnert und B. Grimm. "Phosphorylation of GENOMES UNCOUPLED 4 Alters Stimulation of Mg Chelatase Activity in Angiosperms". In: *Plant Physiology* 172.3 (2016), S. 1578–1595. ISSN: 0032-0889.
- [305] S. Reiland, G. Messerli, K. Baerenfaller, B. Gerrits, A. Endler, J. Grossmann, W. Gruissem und S. Baginsky. "Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks". In: *Plant Physiology* 150.2 (2009), S. 889–903. ISSN: 0032-0889.
- [306] J. P. Markwell und J. Barber. "Complexes Fractionated". In: 122.1 (1980), S. 149–153.
- [307] M. Albaqami und A. S. Reddy. "Development of an in vitro pre-mRNA splicing assay using plant nuclear extract". In: *Plant Methods* 14.1 (2018), S. 1–12. ISSN: 17464811.
- [308] L. Wang, C. Kim, X. Xu, U. Piskurewicz, V. Dogra, S. Singh, H. Mahler und K. Apel. "Singlet oxygen- and EXECUTER1-mediated signaling is initiated in grana margins and depends on the protease FtsH2". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.26 (2016), E3792–E3800. ISSN: 0027-8424.
- [309] R. Meskauskiene und K. Apel. "Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU". In: *FEBS Letters* 532.1-2 (2002), S. 27–30. ISSN: 00145793.
- [310] H. Schlicke, A. S. Hartwig, V. Firtzlaff, A. S. Richter, C. Glässer, K. Maier, I. Finkemeier und B. Grimm. "Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling". In: *Molecular Plant* 7.7 (2014), S. 1211–1227. ISSN: 17529867.
- [311] A. S. Richter. "Charakterisierung des physiologischen Einflusses der Phosphorylierung von GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) auf die Tetrapyrrolbiosynthese und Untersuchung der retrograden Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern". Diss. 2017.
- [312] Y. P. Lin, T. Y. Lee, A. Tanaka und Y. Y. Charng. "Analysis of an Arabidopsis heat-sensitive mutant reveals that chlorophyll synthase is involved in reutilization of chlorophyllide during chlorophyll turnover". In: *Plant Journal* 80.1 (2014), S. 14–26. ISSN: 1365313X.
- [313] B. J. Pogson, D. Ganguly und V. Albrecht-Borth. "Insights into chloroplast biogenesis and development". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1847.9 (2015), S. 1017–1024. ISSN: 18792650.
- [314] B. Schoefs und F. Franck. "Photoreduction of protochlorophyllide to chlorophyllide in 2-d-old dark-grown bean (*Phaseolus vulgaris* cv. commodore) leaves. comparison with 10-d-old dark-grown (etiolated) leaves". In: *Journal of Experimental Botany* 44.6 (1993), S. 1053–1057. ISSN: 00220957.
- [315] A. W. Busch und B. L. Montgomery. "Interdependence of tetrapyrrole metabolism, the generation of oxidative stress and the mitigative oxidative stress response". In: *Redox Biology* 4 (2015), S. 260–271. ISSN: 22132317.
- [316] A. Alboresi, M. Ballottari, R. Hienerwadel, G. M. Giacometti und T. Morosinotto. "Antenna complexes protect Photosystem i from Photoinhibition". In: *BMC Plant Biology* 9.i (2009), S. 1–14. ISSN: 14712229.
- [317] B. C. Tripathy und R. Oelmüller. "Reactive oxygen species generation and signaling in plants". In: *Plant signaling & behavior* 7.12 (2012), S. 1621–1633. ISSN: 15592324.
- [318] K. Apel und H. Hirt. "REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction". In: *Annual Review of Plant Biology* 55.1 (2004), S. 373–399. ISSN: 1543-5008.
- [319] S. W. Ryter und R. M. Tyrrell. "the Heme Synthesis and Degradation Pathways". In: *Free Radical Biology and Medicine* 28.2 (2000), S. 289–309.

- [320] Q. Chai, X. Shang, S. Wu, G. Zhu, C. Cheng, C. Cai, X. Wang und W. Guo. "5-Aminolevulinic Acid Dehydratase Gene Dosage Affects Programmed Cell Death and Immunity". In: *Plant Physiology* 175.1 (2017), S. 511–528. ISSN: 0032-0889.
- [321] W. Wang, W. Tang, T. Ma, D. Niu, J. B. Jin, H. Wang und R. Lin. "A pair of light signaling factors FHY3 and FAR1 regulates plant immunity by modulating chlorophyll biosynthesis". In: *Journal of Integrative Plant Biology* 58.1 (Jan. 2016), S. 91–103. ISSN: 16729072.
- [322] B. E. S. Gunning. "The greening process in plastids - 1. The structure of the prolamellar body". In: *Protoplasma* 60.1 (1965), S. 111–130. ISSN: 0033183X.
- [323] S. Murakami, N. Yamada, M. Nagano und M. Osumi. "Three-dimensional structure of the prolamellar body in squash etioplasts". In: *Protoplasma* 128.2-3 (1985), S. 147–156. ISSN: 0033183X.
- [324] V. E. Gracen, J. H. Hilliard, R. H. Brown und S. H. West. "Peripheral reticulum in chloroplasts of plants differing in CO₂ fixation pathways and photorespiration". In: *Planta* 107.3 (1972), S. 189–204. ISSN: 00320935.
- [325] E. Olmos, G. Kiddle, T. K. Pellny, S. Kumar und C. H. Foyer. "Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*". In: *Journal of Experimental Botany* 57.8 (2006), S. 1645–1655. ISSN: 00220957.
- [326] D. Charuvi, V. Kiss, R. Nevo, E. Shimoni, Z. Adam und Z. Reich. "Gain and Loss of Photosynthetic Membranes during Plastid Differentiation in the Shoot Apex of *Arabidopsis*". In: *The Plant Cell* 24.3 (2012), S. 1143–1157. ISSN: 1040-4651.
- [327] O. Bastien, C. Botella, F. Chevalier, M. A. Block, J. Jouhet, C. Breton, A. Girard-Egrot und E. Maréchal. *New Insights on Thylakoid Biogenesis in Plant Cells*. Bd. 323. Elsevier Inc., 2016, S. 1–30.
- [328] U. C. Vothknecht und P. Westhoff. "Biogenesis and origin of thylakoid membranes". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1541.1-2 (2001), S. 91–101. ISSN: 01674889.
- [329] Q. Li, Q. Zheng, W. Shen, D. Cram, D. B. Fowler, Y. Wei und J. Zou. "Understanding the Biochemical Basis of Temperature-Induced Lipid Pathway Adjustments in Plants". In: *The Plant Cell* 27.1 (2015), S. 86–103. ISSN: 1040-4651.
- [330] G. Holzl, S. Witt, N. Gaude, M. Melzer, M. A. Schottler und P. Dormann. "The Role of Diglycosyl Lipids in Photosynthesis and Membrane Lipid Homeostasis in *Arabidopsis*". In: *Plant Physiology* 150.3 (2009), S. 1147–1159. ISSN: 0032-0889.
- [331] X. Sheng, X. Liu, P. Cao, M. Li und Z. Liu. "Structural roles of lipid molecules in the assembly of plant PSII-LHCII supercomplex". In: *Biophysics Reports* 4.4 (2018), S. 189–203. ISSN: 2364-3439.
- [332] C. Benning. "Mechanisms of Lipid Transport Involved in Organelle Biogenesis in Plant Cells". In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25.1 (2009), S. 71–91. ISSN: 1081-0706.
- [333] K.-J. Dietz, I. Turkan und A. Krieger-Liszkay. "Redox- and Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast". In: *Plant Physiology* 171.3 (2016), S. 1541–1550. ISSN: 0032-0889.
- [334] J. Chmielowska-Bak, K. Izbińska und J. Deckert. "Products of lipid, protein and RNA oxidation as signals and regulators of gene expression in plants". In: *Frontiers in Plant Science* 6.June (2015), S. 6–10.
- [335] A. Mosblech, I. Feussner und I. Heilmann. "Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation". In: *Plant Physiology and Biochemistry* 47.6 (2009), S. 511–517. ISSN: 09819428.
- [336] D. Przybyła, C. Göbel, A. Imboden, M. Hamberg, I. Feussner und K. Apel. "Enzymatic, but not non-enzymatic, 1O₂-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the flu mutant of *Arabidopsis thaliana*". In: *Plant Journal* 54.2 (2008), S. 236–248. ISSN: 09607412.

- [337] O. Czarnecki, C. Gläßer, J.-G. Chen, K. F. X. Mayer und B. Grimm. “Evidence for a Contribution of ALA Synthesis to Plastid-To-Nucleus Signaling”. In: *Frontiers in Plant Science* 3.October (2012), S. 1–19.
- [338] M. T. Page, A. C. McCormac, A. G. Smith und M. J. Terry. “Singlet oxygen initiates a plastid signal controlling photosynthetic gene expression”. In: *New Phytologist* 213.3 (2017), S. 1168–1180. ISSN: 14698137.
- [339] S. Rajagopal, D. Joly, A. Gauthier, M. Beauregard und R. Carpentier. “Protective effect of active oxygen scavengers on protein degradation and photochemical function in photosystem I submembrane fractions during light stress”. In: *FEBS Journal* 272.4 (2005), S. 892–902. ISSN: 1742464X.
- [340] M. Powikrowska, S. Oetke, P. E. Jensen und K. Krupinska. “Dynamic composition, shaping and organization of plastid nucleoids”. In: *Frontiers in Plant Science* 5.September (2014), S. 1–13. ISSN: 1664-462X.
- [341] K. Krupinska, J. Melonek und K. Krause. “New insights into plastid nucleoid structure and functionality”. In: *Planta* 237.3 (2013), S. 653–664. ISSN: 00320935.
- [342] Y. Sakuraba, R. Tanaka, A. Yamasato und A. Tanaka. “Determination of a chloroplast degron in the regulatory domain of chlorophyllide a oxygenase”. In: *Journal of Biological Chemistry* 284.52 (2009), S. 36689–36699. ISSN: 00219258.
- [343] N. Panchy, M. D. Lehti-Shiu und S.-H. Shiu. “Evolution of gene duplication in plants”. In: *Plant Physiology* 171.August (2016), pp.00523.2016. ISSN: 0032-0889.
- [344] F. L. Sousa, L. Shavit-Grievink, J. F. Allen und W. F. Martin. “Chlorophyll biosynthesis gene evolution indicates photosystem gene duplication, not photosystem merger, at the origin of oxygenic photosynthesis”. In: *Genome Biology and Evolution* 5.1 (2013), S. 200–216. ISSN: 17596653.
- [345] M. L. Oelze, M. Muthuramalingam, M. O. Vogel und K. J. Dietz. “The link between transcript regulation and de novo protein synthesis in the retrograde high light acclimation response of *Arabidopsis thaliana*”. In: *BMC Genomics* 15.1 (2014), S. 1–14. ISSN: 14712164.
- [346] A. Nott, H.-S. Jung, S. Koussevitzky und J. Chory. “Plastid-To-Nucleus Retrograde Signaling”. In: *Annual Review of Plant Biology* 57.1 (2006), S. 739–759. ISSN: 1543-5008.
- [347] T. Inaba, F. Yazu, Y. Ito-Inaba, T. Kakizaki und K. Nakayama. *Retrograde Signaling Pathway from Plastid to Nucleus*. 1. Aufl. Bd. 290. Elsevier Inc., 2011, S. 167–204. ISBN: 9780123860378.
- [348] T. Kleine und D. Leister. “Retrograde signaling: Organelles go networking”. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1857.8 (2016), S. 1313–1325. ISSN: 18792650. arXiv: NIHMS150003.
- [349] A. J. Cottage, E. K. Mott, J.-H. Wang, J. A. Sullivan, D. MacLean, L. Tran, M.-K. Choy, C. Newell, T. A. Kavanagh, S. Aspinall und J. C. Gray. “GUN1 (GENOMES UNCOUPLED1) Encodes a Pentatricopeptide Repeat (PPR) Protein Involved in Plastid Protein Synthesis-Responsive Retrograde Signaling to the Nucleus”. In: *Photosynthesis. Energy from the Sun* 1 (2008), S. 1201–1205.
- [350] J. D. Woodson, J. M. Perez-Ruiz und J. Chory. “Heme synthesis by plastid ferrochelatase i regulates nuclear gene expression in plants”. In: *Current Biology* 21.10 (2011), S. 897–903. ISSN: 09609822.
- [351] C. Schmitz-Linneweber und I. Small. “Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression”. In: *Trends in Plant Science* 13.12 (2008), S. 663–670. ISSN: 13601385.
- [352] S. Li, W. Wang, J. Gao, K. Yin, R. Wang, C. Wang, M. Petersen, J. Mundy und J.-L. Qiu. “MYB75 Phosphorylation by MPK4 Is Required for Light-Induced Anthocyanin Accumulation in *Arabidopsis*”. In: *The Plant Cell* 28.11 (2016), S. 2866–2883. ISSN: 1040-4651.

- [353] A. Cottage, E. K. Mott, J. A. Kempster und J. C. Gray. "The Arabidopsis plastid-signalling mutant *gun1* (genomes uncoupled1) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development". In: *Journal of Experimental Botany* 61.13 (2010), S. 3773–3786. ISSN: 00220957.
- [354] A. Lepistö und E. Rintamäki. "Coordination of plastid and light signaling pathways upon development of arabidopsis leaves under various photoperiods". In: *Molecular Plant* 5.4 (2012), S. 799–816. ISSN: 17529867.
- [355] S. Vanderauwera, P. Zimmermann, S. Rombauts, S. Vandenabeele, C. Langebartels, W. Gruissem, D. Inze und F. V. Breusegem. "Genome-Wide Analysis of Hydrogen Peroxide-Regulated Gene Expression in Arabidopsis Reveals a High Light-Induced Transcriptional Cluster Involved in Anthocyanin Biosynthesis". In: *Plant physiology* 139.October (2005), S. 806–821.
- [356] A. Lepistö, S. Kangasjärvi, E.-M. Luomala, G. Brader, N. Sipari, M. Keränen, M. Keinänen und E. Rintamäki. "Chloroplast NADPH-Thioredoxin Reductase Interacts with Photoperiodic Development in Arabidopsis". In: *Plant Physiology* 149.3 (2009), S. 1261–1276. ISSN: 0032-0889.
- [357] H. Kirchhoff, C. Hall, M. Wood, M. Herbstova, O. Tsabari, R. Nevo, D. Charuvi, E. Shimoni und Z. Reich. "Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.50 (2011), S. 20248–20253. ISSN: 0027-8424.
- [358] P. Horton, M. P. Johnson, M. L. Perez-Bueno, A. Z. Kiss und A. V. Ruban. "Photosynthetic acclimation: Does the dynamic structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states?" In: *FEBS Journal* 275.6 (2008), S. 1069–1079. ISSN: 1742464X.
- [359] N. Betterle, M. Ballottari, S. Zorzan, S. de Bianchi, S. Cazzaniga, L. Dall'Osto, T. Morosinotto und R. Bassi. "Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction". In: *Journal of Biological Chemistry* 284.22 (2009), S. 15255–15266. ISSN: 00219258.
- [360] S. Järvi, M. Suorsa und E. M. Aro. "Photosystem II repair in plant chloroplasts - Regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1847.9 (2015), S. 900–909. ISSN: 18792650.
- [361] S. Bellaflore, F. Barneche, G. Peltler und J. D. Rochaix. "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7". In: *Nature* 433.7028 (2005), S. 892–895. ISSN: 00280836. arXiv: 0502035 [q-bio].
- [362] E. Rintamäki, M. Salonen, U.-M. Suoranta, I. Carlberg, B. Andersson und E.-M. Aro. "Phosphorylation of Light-harvesting Complex II and Photosystem II Core Proteins Shows Different Irradiance-dependent Regulation in Vivo". In: *Journal of Biological Chemistry* 272.48 (1997), S. 30476–30482. ISSN: 0021-9258.
- [363] R. Fristedt, A. Willig, P. Granath, M. Crèvecoeur, J.-D. Rochaix und A. V. Vener. "Phosphorylation of Photosystem II Controls Functional Macroscopic Folding of Photosynthetic Membranes in Arabidopsis". In: *The Plant Cell* 21.12 (2009), S. 3950–3964. ISSN: 1040-4651.
- [364] M. Tikkanen, P. J. Gollan, M. Suorsa, S. Kangasjärvi und E.-M. Aro. "STN7 Operates in Retrograde Signaling through Controlling Redox Balance in the Electron Transfer Chain". In: *Frontiers in Plant Science* 3.December (2012), S. 1–11. ISSN: 1664-462X.
- [365] P. Pesaresi, A. Hertle, M. Pribil, T. Kleine, R. Wagner, H. Strissel, A. Ihnatowicz, V. Bonardi, M. Scharfenberg, A. Schneider, T. Pfannschmidt und D. Leister. "Arabidopsis STN7 Kinase Provides a Link between Short- and Long-Term Photosynthetic Acclimation". In: *the Plant Cell Online* 21.8 (2009), S. 2402–2423. ISSN: 1040-4651.

- [366] A. Koivuniemi, E. M. Aro und B. Andersson. “Degradation of the D1- and D2-Proteins of Photosystem II in Higher Plants Is Regulated by Reversible Phosphorylation”. In: *Biochemistry* 34.49 (1995), S. 16022–16029. ISSN: 15204995.
- [367] M. M. Fleischmann und J.-D. Rochaix. “Characterization of Mutants with Alterations of the Phosphorylation Site in the D2 Photosystem II Polypeptide of *Chlamydomonas reinhardtii*”. In: *Plant Physiology* 119.4 (1999), S. 1557–1566. ISSN: 0032-0889.
- [368] V. Fey, R. Wagner, K. Bräutigam, M. Wirtz, R. Hell, A. Dietzmann, D. Leister, R. Oelmüller und T. Pfannschmidt. “Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*”. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.7 (2005), S. 5318–5328. ISSN: 00219258.
- [369] L. Dietzel, C. Gläßer, M. Liebers, S. Hiekel, F. Courtois, O. Czarnecki, H. Schlicke, Y. Zubo, T. Börner, K. Mayer, B. Grimm und T. Pfannschmidt. “Identification of Early Nuclear Target Genes of Plastidial Redox Signals that Trigger the Long-Term Response of *Arabidopsis* to Light Quality Shifts”. In: *Molecular Plant* 8.8 (2015), S. 1237–1252. ISSN: 17529867.
- [370] K. Bräutigam, L. Dietzel, T. Kleine, E. Ströher, D. Wormuth, K.-J. Dietz, D. Radke, M. Wirtz, R. Hell, P. Dörmann, A. Nunes-Nesi, N. Schauer, A. R. Fernie, S. N. Oliver, P. Geigenberger, D. Leister und T. Pfannschmidt. “Dynamic Plastid Redox Signals Integrate Gene Expression and Metabolism to Induce Distinct Metabolic States in Photosynthetic Acclimation in *Arabidopsis*”. In: *The Plant Cell* 21.9 (2009), S. 2715–2732. ISSN: 1040-4651.
- [371] P. Brzezowski, A. S. Richter und B. Grimm. “Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae”. In: *Biochimica et biophysica acta* 1847.9 (2015), S. 968–985. ISSN: 00063002.
- [372] K. P. Lee, C. Kim, F. Landgraf und K. Apel. “of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.24 (2007), S. 10270–10275.
- [373] L. Oñate-Sánchez und J. Vicente-Carbajosa. “DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques”. In: *BMC Research Notes* 1 (2008), S. 1–7. ISSN: 17560500.
- [374] C. Gehl, R. Waadt, J. Kudla, R. R. Mendel und R. Hänsch. “New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation”. In: *Molecular Plant* 2.5 (2009), S. 1051–1058. ISSN: 17529867.
- [375] D. Wittmann, S. Kløve, P. Wang und B. Grimm. “Towards Initial Indications for a Thiol-Based Redox Control of *Arabidopsis* 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase”. In: *Antioxidants* 7.11 (2018), S. 152. ISSN: 2076-3921.
- [376] B. Hedtke, A. Alawady, S. Chen, F. Börnke und B. Grimm. “HEMA RNAi silencing reveals a control mechanism of ALA biosynthesis on Mg chelatase and Fe chelatase”. In: *Plant Molecular Biology* 64.6 (2007), S. 733–742. ISSN: 01674412.
- [377] A. Alawady, R. Reski, E. Yaronskaya und B. Grimm. “Cloning and expression of the tobacco CHLM sequence encoding Mg protoporphyrin IX methyltransferase and its interaction with Mg chelatase”. In: *Plant Molecular Biology* 57.5 (2005), S. 679–691. ISSN: 01674412.
- [378] Y. Lu, D. A. Hall und R. L. Last. “A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*”. In: *Plant Cell* 23.5 (2011), S. 1861–1875. ISSN: 10404651.
- [379] K. Trompelt, J. Steinbeck, M. Terashima und M. Hippler. “A new approach for the comparative analysis of multiprotein complexes based on ¹⁵N metabolic labeling and quantitative mass spectrometry”. In: *Journal of Visualized Experiments* 85 (2014), S. 1–12. ISSN: 1940087X.
- [380] H. Lichtenthaler. “Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane”. In: *Methods in Enzymology* 148 (1987), S. 350–382.

- [381] K. Nicholas, H. Nicholas und D. Deerfield. "GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation." In: *EMBNEW News* 4.14 (1997).
- [382] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz und K. Tamura. "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms". In: *Molecular Biology and Evolution* 35.6 (2018), S. 1547–1549. ISSN: 15371719.
- [383] O. J. Marshall. "PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR". In: *Bioinformatics* 20.15 (2004), S. 2471–2472. ISSN: 13674803.
- [384] B. J. Feys, L. J. Moisan, M. A. Newman und J. E. Parker. "Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4". In: *EMBO Journal* 20.19 (2001), S. 5400–5411. ISSN: 02614189.
- [385] M. C. Wildermuth, J. Dewdney, G. Wu und F. M. Ausubel. "Erratum: Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence (Nature (2001) 414 (562-565))". In: *Nature* 417.6888 (2002), S. 571. ISSN: 00280836.
- [386] Z. Q. Fu und X. Dong. "Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense". In: *Annual Review of Plant Biology* 64.1 (2013), S. 839–863. ISSN: 1543-5008.
- [387] Y. S. Seo, E. Y. Kim, J. H. Kim und W. T. Kim. "Enzymatic characterization of class I DAD1-like acylhydrolase members targeted to chloroplast in Arabidopsis". In: *FEBS Letters* 583.13 (2009), S. 2301–2307. ISSN: 00145793.
- [388] D. Charuvi, V. Kiss, R. Nevo, E. Shimoni, Z. Adam und Z. Reich. "Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of arabidopsis". In: *Plant Cell* 24.3 (2012), S. 1143–1157. ISSN: 10404651.
- [389] W. Huang, Q. Chen, Y. Zhu, F. Hu, L. Zhang, Z. Ma, Z. He und J. Huang. "Arabidopsis thylakoid formation 1 is a critical regulator for dynamics of PSII-LHCII complexes in leaf senescence and excess light". In: *Molecular Plant* 6.5 (2013), S. 1673–1691. ISSN: 17529867.
- [390] S. Karim, M. Alezzawi, C. Garcia-Petit, K. Solymosi, N. Z. Khan, E. Lindquist, P. Dahl, S. Hohmann und H. Aronsson. "A novel chloroplast localized Rab GTPase protein CPRabA5e is involved in stress, development, thylakoid biogenesis and vesicle transport in Arabidopsis". In: *Plant Molecular Biology* 84.6 (2014), S. 675–692. ISSN: 01674412.

Anhang

I. Zusätzliche Daten

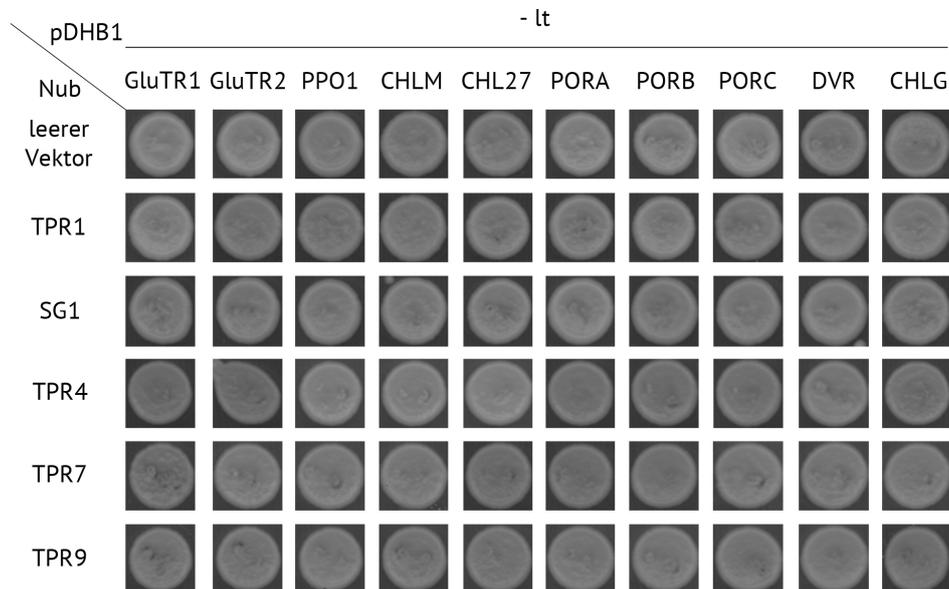


Abbildung .1. – Nachweis der erfolgreichen Co-Transformation von Hefezellen für die Analyse der Interaktionen zwischen ausgewählten TPR-Proteinen und Schlüsselenzymen der TBS. Die mittels Split-Ubiquitin-Analysen zu testenden Interaktionspartner wurden entweder in den pNUB oder pDHB1-Vektor eingebracht und in Hefe co-transformiert. Die Co-Transformation wurde durch die Anzucht der Hefekulturen auf Selektionsmedium ohne Leucin und Threonin bestätigt. Das Wachstum der Zellen wurde nach vier Tagen bei 30 °C photographisch festgehalten.

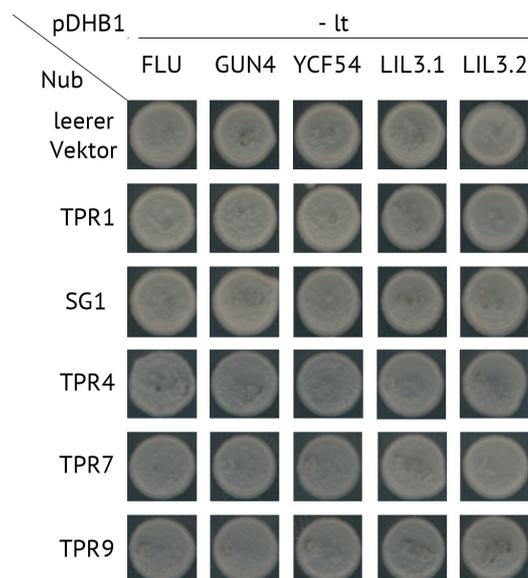


Abbildung .2. – Nachweis der erfolgreichen Co-Transformation von Hefezellen für die Analyse der Interaktionen zwischen ausgewählten TPR-Proteinen und Hilfsproteinen der TBS. Die mittels Split-Ubiquitin-Analysen zu testenden Interaktionspartner wurden entweder in den pNUB oder pDHB1-Vektor eingebracht und in Hefe co-transformiert. Die Co-Transformation wurde durch die Anzucht der Hefekulturen auf Selektionsmedium ohne Leucin und Threonin bestätigt. Das Wachstum der Zellen wurde nach vier Tagen bei 30 °C photographisch festgehalten.

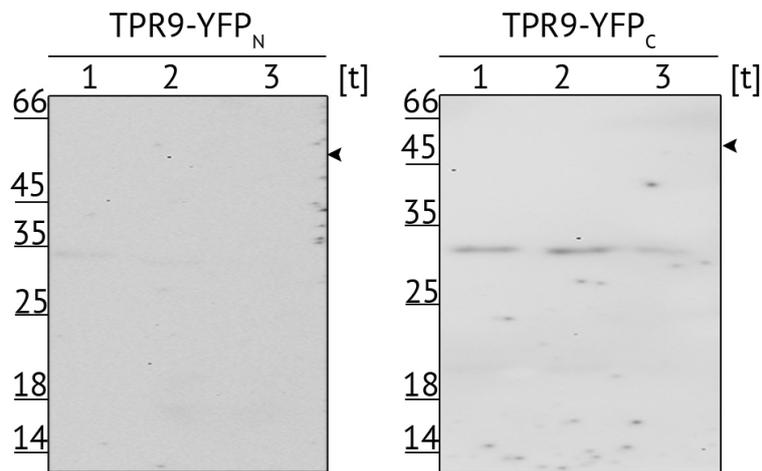


Abbildung .3. – Nachweis der transienten Expression von TPR9 in *N. benthamiana*. Nach Infiltration der entsprechenden TPR9-G1 (links) und -G3 (rechts) Konstrukte wurden die entsprechenden *N. benthamiana* Pflanzen für 1-3 Tage in Dunkelheit gehalten (t_0). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proteinproben genommen und mittels 12%iger SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Unter Zuhilfenahme der spezifischen Antikörper gegen die N- bzw. C-terminale Hälfte von YFP sollte die transiente Expression von TPR9 nachgewiesen werden. Der schwarze Pfeil markiert dabei die erwartete molekulare Größe der TPR9-YFP Proteine.

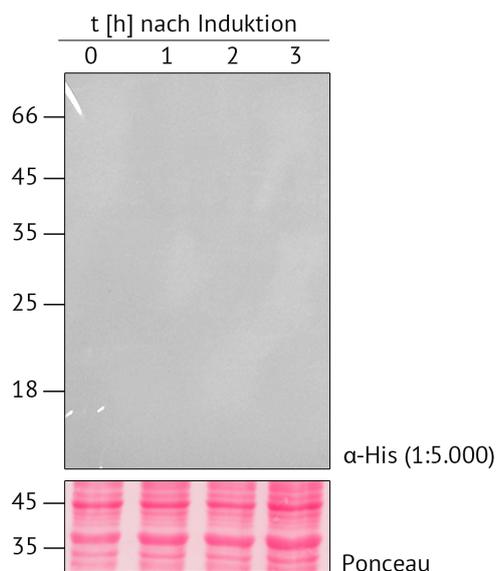


Abbildung .4. – Nachweis der rekombinanten Expression von 6xHis-SG1 in *E. coli*. Versuchter immunologischer Nachweis des rekombinanten 6xHis-SG1-Proteins durch den Histidin-Tag spezifischen Antikörper zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression mit IPTG. Die Proteinproben wurden mittels 12%iger SDS-Gele aufgetrennt. Die Ponceau gefärbte Nitrocellulosemembran diente als Ladekontrolle.

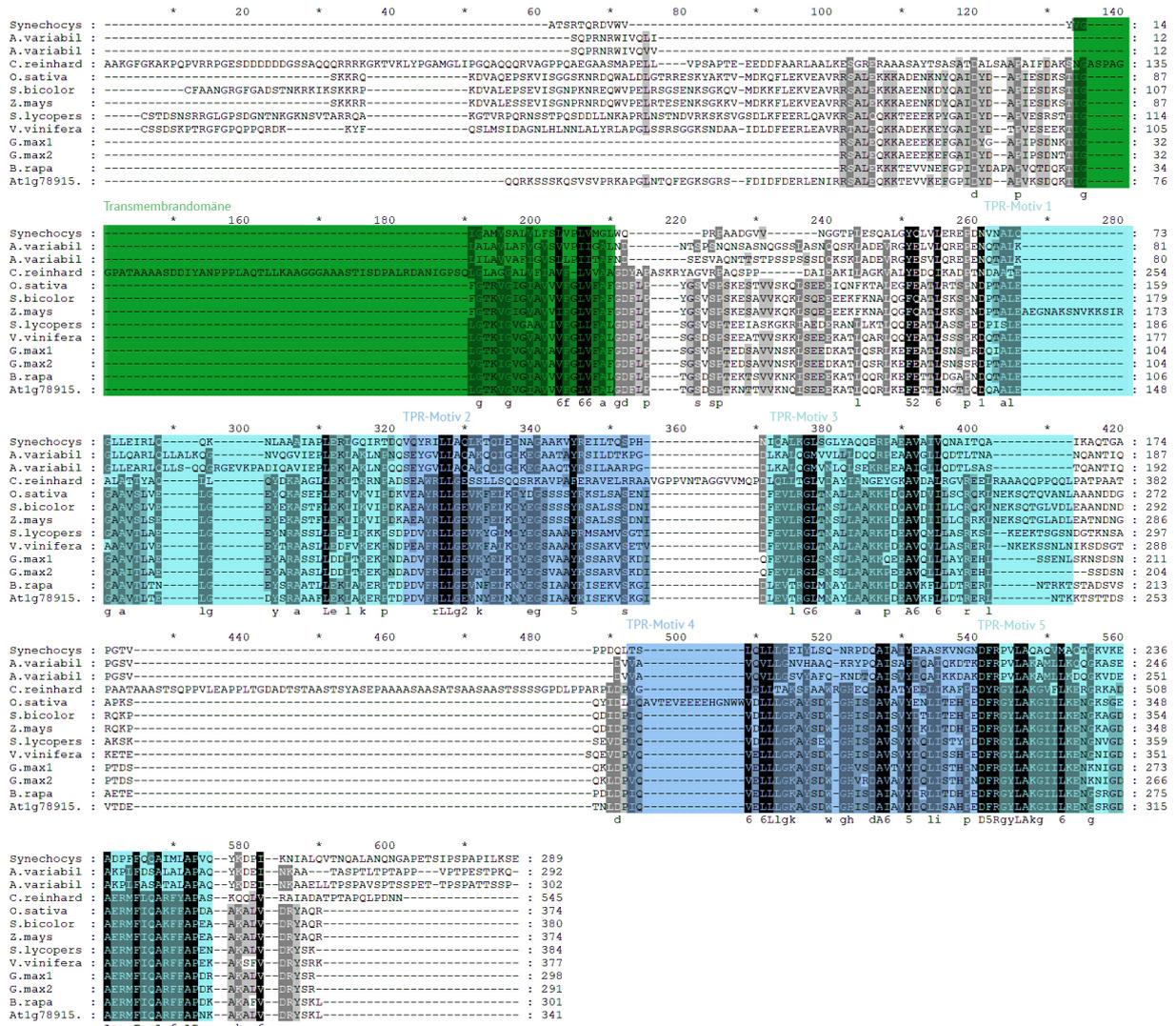


Abbildung .5. – Erweitertes Alignment der potenziellen Pitt-Homologe verschiedener Organismen. Für das multiple Sequenz Alignment wurden neben der Pitt-Proteinsequenz aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 die Sequenzen der potenziellen Pitt-Homologe aus *Anabaena variabilis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Brassica rapa*, *Glycine max*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* und *Arabidopsis thaliana* (TPR1) verwendet. Zur besseren Übersicht wurden die für *Arabidopsis thaliana* vorhergesagten Domänen und Motive farblich unterlegt: die Transmembrandomäne in Grün, die fünf TPR-Motive in Hell- bzw. Dunkelblau. Die Färbung der identischen bzw. ähnlichen Aminosäuren nimmt mit dem Grad der Konserviertheit ab. Schwarz unterlegte Aminosäuren sind stark konserviert, während hellgrau unterlegte Aminosäuren nur in wenigen Organismen identisch sind. Die Konsenssequenz wurde unterhalb des Alignments angegeben.

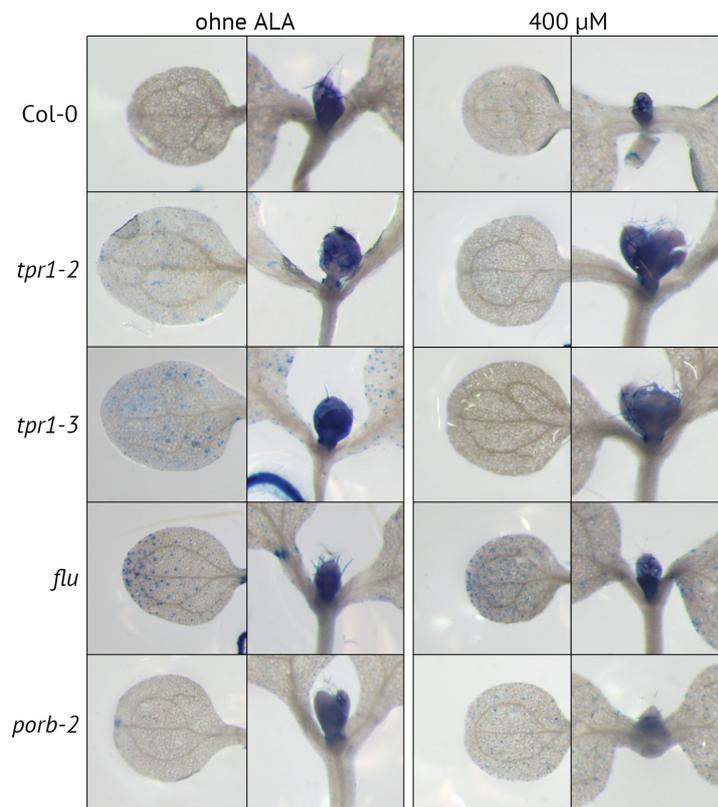


Abbildung .6. – Nachweis von abgestorbenen Gewebe in Abhängigkeit der ALA- Konzentration. Nach fünf Tagen auf Agarmedium mit oder ohne 400 µM ALA wurden abgestorbenes Zellgewebe der Arabidopsis Keimlinge mittels Trypanblau eingefärbt.

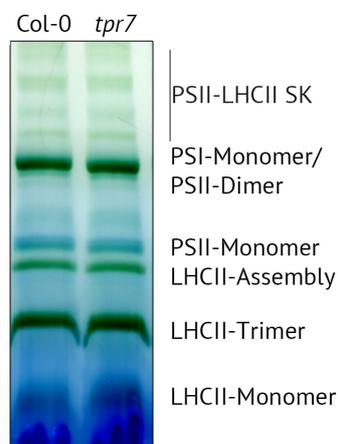


Abbildung .7. – Analyse der Abundanz der photosynthetischen Komplexe in der *tpr7*-Linie im Vergleich zum Wildtyp. Die verwendeten Arabidopsis Rosettenpflanzen wurden für fünf Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen (120 µE) angezogen. Die isolierte Thylakoidmembranen wurden mit 1 % DDM solubilisiert und mit einem 4- 12 %igen BN-PAGE Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt. Die nachweisbaren photosynthetischen Komplexe wurden rechts neben der dazugehörigen Bande vermerkt. Es wurden hierbei Proteinproben mit identischem Chlorophyllgehalt analysiert.

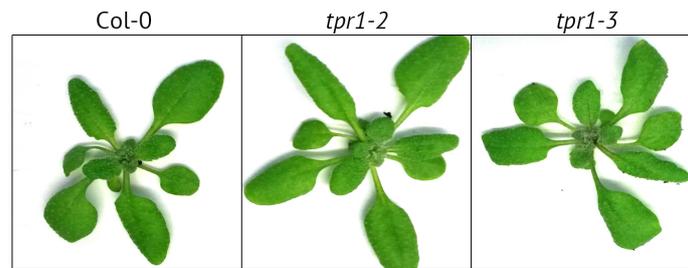


Abbildung .8. – Phänotyp der verwendeten *tpr1*-Linien nach 5 Tagen in fluktuierendem Licht im Vergleich zum Wildtyp. Die verwendeten Linien wurden für zwei Wochen unter Standard-Kurztagbedingungen angezogen und anschließend für 5 Tage in fluktuierendem Licht (30 min 100 μ E, 30 min 20 μ E, 24 h) [147] angezogen.

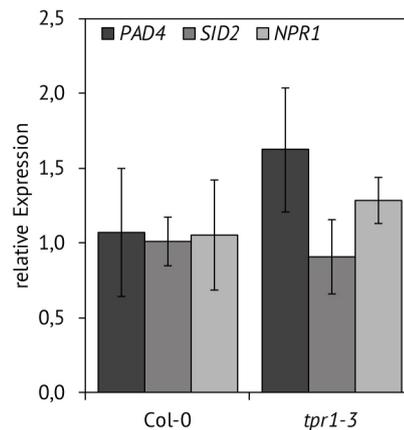


Abbildung .9. – Transkriptgehalte verschiedener Gene des Salicylat-Signalweges. Der mittels quantitativer PCR ermittelte Transkriptgehalt wurde relativ zum Gehalt des gleichbehandelten Wildtyps bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen wurden auf mindestens drei biologischen Replikaten kalkuliert. PAD4 ist dabei für die Amplifikation des Salicylat-Signals über einen positiven Feedback-Mechanismus zuständig [384], während SID2 direkt an der Salicylat-Biosynthese beteiligt ist, in dem es das Substrat Chorismate in Isochorismate umwandelt, welches für die Synthese von Salicylat genutzt wird [385]. NPR1 hingegen kann unabhängig von von PAD4 und SID2 agieren und bindet als Monomer an verschiedene Transkriptionsfaktoren und beeinflusst so die Expression von Genen der pflanzlichen Immunantwort [386]. PAD4 - PHYTOALEXIN DEFICIENT 4; SID2- SALICYLIC- ACID-INDUCTION DEFICIENT 2; NPR1- NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1.

II. Primer

Tabelle .30. – Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Name	Zielgen	Richt.	Sequenz
rekombinante Expression			
6xHis-TPR1	At1g78915	fwd	GGCGCCAGCAAAGGAAATC
		rev	CTGCAGTCATAGTTTGGAGTATCTATCC
6xHis-SG1	At3g18420	fwd	GGCGCCGCTAGCTCGAATC
		rev	GGTACCTTATTCTCCTCACTACC
SG1-6xHis	At3g18420	fwd	CCATGGATGGCTAGCTCG
		rev	GAATTCGTTCTCCTCACTACC
6xHis-TPR7	At5g02590	fwd	GGCGCCGAGCAACTC
		rev	CTGCAGTCACTGATTCTTAGCG
6xHis-TPR9	At3g53560	fwd	GGCGCCCTAACAAACCGCC
		rev	CTGCAGTCAACTAGTTGATCCAGC
Genotypisierung			
tpr1-1	At1g78915	LP	TTTTCTGCTCAAGAGCTGACC
		RP	CTAACGTTATCTTACCGGCC
tpr1-2	At1g78915	LP	TCAGTGAATAAAACGCAAGGG
		RP	ATGTTGAGACACCATGAAGG
tpr1-3	At1g78915	LP	TGCCTCAGGTTGATATCGAAC
		RP	TTTTACGTCCGAAGAAACCAG
sg1-2	At3g18420	LP	ATTGGTTTCTTCTTTCTGTCGC
		RP	ACTTAGCAAAGTTCCTTAGC
tpr7	At5g02590	LP	CTTGCATTTCTCAATCGCTTC
		RP	CAAAAATCAACAGATGATGGG
tpr9	At5g53560	LP	ATCTAGACCATGTGCACAGGG
		RP	CCTTTCCGTCTCTTCAAATCC
SALK LBb1.3		LB	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC
SAIL LB2		LB	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA
Erzeugung der Überexpressionslinien			
TPR1-HA	At1g78915	fwd	CTGAAACTCGAGATGTTGATGACACTAGCG
		rev	CTGAAACCCGGGTAGTTTGGAGTATC
TPR9-HA	At3g53560	fwd	CTGAAACTCGAGATGGAGTCTCTGGGG
		rev	ATTAAACCCGGGACTAGTTGATCCAGCC
VIGS-Konstrukte			
TPR1-VIGS	At1g78915	fwd	GAATTCGGAATACGTTGCTCGGAATTCTAACCC
		rev	GGATCCAGCTGATCTTAACGCACCTTCCC
qPCR TPR-Gene			
TPR1	At1g78915	fwd	TCAGGTTGAGTTACTTCTCGG
		rev	TATAATTCCTTAGCCAAGTAGCC
SG1	At3g18420	fwd	AAACCCACTTTCGTTTGAGG
		rev	CTTTCGTCAGCTGCTCGTAG
TPR7	At5g02590	fwd	CTCTCGTCTCACCTCCTCCT
		rev	CGACGTCGTTTGGATTCTTA
TPR9	At3g53560	fwd	CCATAAGCAAGCCGTGATAA
		rev	TTCTGATGTCGACGCTCTTC
qPCR TBS-Gene			
GAPDH	At1g13440	fwd	TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
		rev	AAACTTGTGCTCAATGCAATC
Actin	At3g18780	fwd	CTTCCCTCAGCACATTCCAG
		rev	GACCTGCCTCATCATACTCG
GSAT	At5g63570	fwd	TCAAAGAAGAGCGACACAGAG
		rev	GTAACACCTTCTTCCAACATTCC
HEMA1	At1g58290	fwd	TTGCTGCCAACAAAGAAGAC

FLU	At3g14110	rev	CCGTCTCCAATGAATCCCTC
		fwd	AAGCCATACAGTATCACTCCA
GBP	At3g21200	rev	TCCAGAATCTTCACTTTCCCT
		fwd	TTCATGGAGGACGGAATCTG
CHLM	At4g25080	rev	TGTTAGCGTTAATCTGGTTGAC
		fwd	TTGCTGAAGCTGAGATGAAGGCAAAG
CHL27	At3g56940	rev	CAACGGTATCATACTTCCCAGTTAGG
		fwd	GCTTCTTCTGCCTCTCGGTTTATG
PORA	At5g54190	rev	GCCGTGGTTCCGGTTTGTCTCG
		fwd	TACCCTCTTCCCTCCTTTCC
PORB	At4g27440	rev	GTTCCAGCTCCAATACACTCC
		fwd	TGATTACCCTTCAAAGCGTCTCA
PORC	At1g03630	rev	CAATGTATTCGTGTTCCCGGT
		fwd	CTGGCAAAGACTAGCACAGGTT
LIL3.1	At4g17600	rev	CAATACACTCCTGACTTCCCAAGAC
		fwd	GCTGAACTCTTAAATGGTCTG
		rev	TGTCTTGCAGAAGAAATTCCC
qPCR ROS-Markergene [350]			
GST6	At1g17170	fwd	GAAGCAGCCAAGGAGTTAATCG
		rev	AAGCTCAGACTCTAGCGTCTTG
ZAT12	At5g59820	fwd	TGCGAGTCACAAGAAGCCTA
		rev	GTGTCCTCCCAAAGCTTGTC
NOD1	At5g64870	fwd	GCTGATGCTGCCTTCTATTCAA
		rev	TGCGACAAGTCCCTCTGCA
BAP1	At3g61190	fwd	GTGGGATCGTCAATCTTTTCG
		rev	GGCCACCGTATCCATCAATC
Ferritin	At5g01600	fwd	GATCTCAGACTACATCACCCA
		rev	GAATCTTCGGGTTCTTCTGTTT
cAPX	At1g07890	fwd	TCGAGAAATACGCTGCTGATG
		rev	ACACAGAGCATAACGTCACAG
tAPX	At1g77490	fwd	CAAAGTATTCTACGGGAAAGAAGG
		rev	TGTTGAGGAAGTAATTTGTGGG
sAPX	At4g08390	fwd	GGGCACATAATTTACTCAACCA
		rev	ATCCTTTGAACAGCCAGAAAC
qPCR PhANGs			
LHCA1	At3g54890	fwd	TGGTGGCAAACACAACGACA
		rev	GGAACCTCCGGCGGATACGAA
LHCB1.1	At1g29920	fwd	CCGTGTGACAATGAGGAAGA
		rev	CAAACCTGCCTCTCCAAACTTG
LHCB2.1	At2g05100	fwd	TCAAAGCATCTGGTACGGAC
		rev	AACATAGCCCATCTGCTGTG
LHCB2.4	At3g27690	fwd	CGGACCAGACCGTCCCAAAT
		rev	GGTGCAGCCTAAAGCTCCCA
LHCB3	At5g54270	fwd	CCGTGTGGACTTCAAAGAACC
		rev	CGCCAACACCATCAAGACC
LHCB5	At4g10340	fwd	ACGGATTGGATTTTCGAGGAC
		rev	AGATGCTTTGCAAGGTTCTC
LHCB6	At1g15820	fwd	AAGAAATCTTGGATCCCTGCC
		rev	CGACGAAGATCCCAAGAACC
PRIN2	At1g10522	fwd	GTGCGGTCAGAGCGTGATTG
		rev	CGGCAAGGAAGACCAAGCC
CA1	AT3G01500	fwd	TGTGTCCATCACACGTTCTGG
		rev	GGACCACGAAGGCATCTCCT
CP12	AT3G62410	fwd	CGGACCCTTTGGAGGAATACTG
		rev	GGCACTCGTTGGTCTCAGGA

GUN1	At2g31400	fwd	CTTGAGTATATTGACTGGCTGGG
		rev	AAAGAACTTCAACCGCTCGT
RBCS	AT1G67090	fwd	GCAACGGCGGAAGAGTTAAC
		rev	TCTTTCCAATCGGAGGCCA
qPCR Anthocyanbiosynthese [311]			
CHS	AT5G13930	fwd	GGTCTCACCTTCCATCTCCT
		rev	AGTATGAAGAGAACGCACGC
DFR	AT5G42800	fwd	CGCCAAGACGCTACTCACT
		rev	CGGCTTTATCACTTCGTTCTCA
LDOX	AT4G22880	fwd	GTGATTACATAGAAGCAACGAGTG
		rev	CTAAACCTAGACCGACAGAGAGA
qPCR Oxilipinsynthese [387, 388]			
LOX3	At1g17420	fwd	AACACAACCACATGGTCTTAAACTC
		rev	GGAGCTCAGAGTCTGTTTTGATAAG
DAD1	At2g44810	fwd	GATAACGTTAAGATGACAGCG
		rev	GTGGCCACATTGATGCTG
DGL	At1g05800	fwd	CAGATCTTTAGGTGGTGTTTACGA
		rev	CTCGGACGGTTTACTAGAG
qPCR Lipidsynthese [329]			
MDG1	At4g31780	fwd	GTTACATCGCTGGTCAAGAG
		rev	TGCCGGTCCAAACCAATCCG
MDG2	At5g20410	fwd	ACGGTCATGGCCCTTGCAGA
		rev	CCGTCGCCGCTTGTACGGA
MDG3	At2g11810	fwd	CACTGATTTGCGGCCTCCCA
		rev	GGGTGAAAACCTCCAGCCCCA
DGD1	At3g11670	fwd	GTGCAAGAAGCAATGACGA
		rev	GTTGCTGCTTCCCAAGAGAG
DGD2	At4g00550	fwd	GTGTGTTTGCATCATCTTC
		rev	CCAAAAGCTGTTCTGGAAG
FAD5	At3g15850	fwd	TGGTTTTGGTTTCAGTCACA
		rev	TAGGTGGTTCGAAGGAATCG
FAD6	At4g30950	fwd	CCGTGGTATCTGCTACCGTT
		rev	TAGGAAGGCGAGAGTACCCA
qPCR Vesikelinduzierende Proteine [229, 389, 390]			
CPRabA5e	At1g05810	fwd	AGAGAGGAGTATCTCTTCAAGATTGTTG
		rev	CACCGTCGTATCCGAATGGA
VIPP	At1g65260	fwd	CTAGCAAAAGTCGTTAGCTTTCCTTCGCAG
		rev	CACCATGGCTCTCAAAGCTTCACCTGT
THF1	At2g20890	fwd	ATGGCTGCAACTGCAATC
		rev	GTCTCTGATACAGGAGGCACAT
CPSAR1	At5g18570	fwd	CAGAACCCAAAGCATTTGTTTCG
		rev	GACCTCAAACCTCATTAATGGCTG
qPCR Jasmonat und Salicylat Biosynthese[321]			
PAD4	At3g52430	fwd	TTAGCCGTTGAAGCTCT
		rev	ATGCATCGCAACGATCT
SID2	At1g74710	fwd	TGGTTAGCGTTGCTGGTATC
		rev	CATTCAACAGCGATCTTGCC
NPR1	At1g64280	fwd	GGTGGAAGAGGTCTAACCG
		rev	GCGAAACTATATGACGCCAA
allgemein verwendete Primer			
pJET2.1 (Thermo Scientific)		fwd	CRACTCACTATAGGGAGAGCGGC
		rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
attB1		fwd	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attb2		rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

Publikationsliste

Herbst, J., Hey, D. & Grimm, B. "Control Mechanisms of Chlorophyll Biosynthesis and Analysis of Chlorophyll-Binding Proteins. In *Metabolism, Structure and Function of Plant Tetrapyrroles* (ed. Grimm, B.) 91 (2019), S. 163 - 194.

Hey, D., Rothbart, M., **Herbst, J.**, Wang, P., Müller, J., Wittmann, D., Gruhl, K., Grimm, B. "LIL3, a Light-Harvesting Complex Protein, Links Terpenoid and Tetrapyrrole Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. In: *Plant Physiol.* 174 (2017), S. 1037–1050.

Herbst, J., Girke, A., Hajirezaei, M. R., Hanke, G. & Grimm, B. "Potential roles of YCF54 and ferredoxin-NADPH reductase for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase. In: *Plant J.* 94 (2018), S. 485–496.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe von vielen weiteren Personen möglich gewesen. Allen voran möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Bernhard Grimm für das spannende und anspruchsvolle Thema sowie für die Betreuung während meiner Promotionszeit danken. Mein Dank geht ebenfalls an Prof. Dr. Iris Finkemeier und Prof. Ph. D. Thomas Buckhout für die Begutachtung meiner hier vorliegenden Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. Stefan Geimer und Reinhild Rothe für die Zusammenarbeit im Rahmen der TEM-Analysen danken. Ferner geht mein Dank an die Forschergruppe FOR2092 für die Finanzierung des Projektes in den letzten vier Jahren, sowie an alle Mitglieder dieser Forschergruppe, vor allem an die Doktorandinnen und Doktoranden, für den regen Austausch und die hilfreichen Diskussionen.

Ein besonderer Dank geht ebenfalls an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie. Vor allem möchte ich Guillem Schaal-Moreno für die Unterstützung bei der Analyse der TPR1-VIGS-Linien sowie den TPR-Überexpressionslinien im Rahmen seiner Anstellung als studentische Hilfskraft danken, welche mir Zeit für andere Aufgaben verschafft hat. Daniel Hey möchte ich für die Zusammenarbeit an dem gemeinsamen FOR2092 Projekt und die zahlreichen Diskussionen danken, Daniel Wittmann für die Hilfe bei den ALAD-Aktivitätsmessungen und die gute Stimmung im kleinen Labor, Patrick Schall und Lukas Marutschke für die Zusammenarbeit während der über Nacht Probenentnahmen von Arabidopsis, Andreas Richter für Rat und Tat im Hinblick auf die Anthocyanbiosynthese, Kersten Träder für die vielseitige Hilfe vor allem zu Beginn meiner Zeit in der Arbeitsgruppe und Heidemarie Schneider für die Analyse meiner vielzähligen HPLC-Messungen. Vielen Dank für die schöne Zeit in der AG Grimm!

Allerdings wäre diese Arbeit ohne meine Familie und Freunde unmöglich gewesen, welche mich in all den Jahren durch die Höhen und Tiefen der Promotionszeit begleitet und uneingeschränkt unterstützt haben. Aus diesem Grund möchte ich mich hier für eure Unterstützung aus tiefstem Herzen bedanken. Im Besonderen möchte ich mich bei Johannes Borner bedanken, da ohne seine Hilfe und sein Verständnis vor allem die letzte Phase meiner Promotion nicht machbar gewesen wäre. Vielen Dank für eure Unterstützung!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Weiterhin erkläre ich die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrundeliegende Promotionsordnung der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät I vom 27. Juni 2012. Zudem erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberatern stattgefunden hat, ich mich nicht an anderer Stelle um einen Doktorgrad beworben habe und keinen entsprechenden Doktorgrad besitze. Ich erkläre, dass ich diese Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde. Ferner erkläre ich, dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Josephine Herbst, Berlin am 10.09.2019