ETH zürich

ETH Library

Charakterisierung des EXECUTER1-Proteins von Arabidopsis thaliana

Doctoral Thesis

Author(s):
Mahler, Hanno

Publication date:
2010

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-006023062

Rights / license:
In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

This page was generated automatically upon download from the ETH Zurich Research Collection.
For more information, please consult the Terms of use.

Dissertation ETH Nr. 18825

Charakterisierung des EXECUTER1-Proteins von *Arabidopsis thaliana*

Abhandlung zur Erlangung des Titels Doktor der Wissenschaften

Dr. sc. ETH Zürich

Vorgelegt dem Departement Biologie der

Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von

Hanno Mahler

Diplom Biologe, Justus-Liebig-Universität Giessen, Deutschland

geboren am 21. Juli 1978 in Friedberg, Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Claudia Köhler, Prof. Klaus Apel

2010

Inhaltsverzeichnis

Summary 1

Zusammenfassung 2

1. Einleitung 4

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies als Signalmoleküle 5

1.2 Die *flu*-Mutante 7

1.3 Das EXECUTER1-Protein 12

1.4 Die plastidäre ATP-Synthase 15

1.5 Die *variegated*-Mutanten 17

1.6 Zielsetzung der Arbeit 19

2. Material und Methoden 20

2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial 20

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial 20

2.1.2 Antikörper 22

2.1.3 Laborgeräte 23

2.1.4 Pflanzenmaterial 23

2.2 Methoden 24

2.2.1 Pflanzenanzucht 24

2.2.2 Isolation von intakten Chloroplasten 24

2.2.3 Isolation von Plastidenproteinen 26

2.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese 27

2.2.5 *Blue-Native* Gelelektrophorese 28

2.2.6 Gelfärbetechniken 30

2.2.7 Immunologischer Nachweis durch *Western-Blotting* 31

2.2.8 Gradientenzentrifugation von Chloroplastenproteinen 33

2.2.9 Immunopräzipitation von EX1-GFP 34

2.2.10 Probenvorbereitung für Massenspektronomie 35

2.2.11 Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie 36

2.2.12 Messung des *Nonphotochemical Quenchings* 37

3. Ergebnisse 39
3.1 Das EXECUTER1-GFP Konstrukt 39
3.1.1 Fluoreszierende Keimlinge 39
3.1.2 Komplementierung von *ex1/flu* mit *EX1-GFP* 39
3.1.3 Immunologischer Nachweis von EX1-GFP 41
3.2 Lokalisation von EX1-GFP in der Pflanzenzelle 42
3.2.1 EX1-GFP in der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie 42
3.2.2 Fraktionierung und immunologischer Nachweis 43
3.3 Nachweis einer komplexen Form von EX1-GFP 45
3.3.1 *Blue Native*-Gelelektrophorese 45
3.3.2 Zentrifugation im Saccharosegradienten 46
3.3.3 Zentrifugation im Glyceringradienten 47
3.4 Untersuchung des EX1-GFP im Proteinkomplex 50
3.4.1 Immunopräzipitation von EX1-GFP 50
3.4.2 Identifizierung von Co-Immunopräzipitaten 53
3.5 Fluoreszenzmessungen 56
4. Diskussion 58
4.1 Eigenschaften von EXECUTER1 58
4.2 EXECUTER1 ist Teil eines Proteinkomplexes 60
4.3 Die Interaktionspartner von EXECUTER1 62
4.3.1 EX1 im *Yeast-Two-Hybrid Assay* 62
4.3.2 Die Interaktionspartner von EX1 *in vivo* 62
4.4.Die Physiologie des EXECUTER1 64
4.4.1 EX1 und die γ-Untereinheit der ATP-Synthase 64
4.4.2 Folgen der Mutation von *EX1* 65
4.4.3 Die Funktionsweise von EX1 66
4.5 Ausblick 73
5. Anhang 74
5.1 Ergebnisse des *Yeast-Two-Hybrid Assays* 74

5.2 Ergebnisse der Stärkequantifizierung 77
5.3 Ergebnisse der 2D-PAGE von EX1 79
Abkürzungsverzeichnis 82
Tabellenverzeichnis 84
Abbildungsverzeichnis 85
Literaturverzeichnis 87
Lebenslauf 92
Danksagung 93

Summary

The EXECUTER1 protein performs an essential function in singlet oxygen activated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. This discovery is due to the research carried out with the *flu* mutant, in which oxidative stress can be provoked in a controlled manner.

The *flu* mutant suffers extensive damage after a change from a period of darkness to light. Adult individuals develop necrosis and growth inhibition while seedlings bleach and die. The reason for this phenotype is the loss of control over chlorophyll biosynthesis. Protochlorophyllide is unphysiologically accumulated in darkness and produces singlet oxygen after onset of light. The visible damage is not directly caused by this component, though. The *flu*-phenotype rather is the result of a genetically controlled cell death. This became evident through a second site mutation, which completely reverses the original *flu*-phenotype without decreasing the amount of excess protochlorophyllide. The mutated gene was labelled *EXECUTER1* (*EX1*). Since this mutation almost completely inhibits stress related gene activation after stress induction, the corresponding protein EX1 must have a pivotal role in oxidative stress signal transduction. While research had already been conducted on FLU and the protein had been closely described, the EX1 protein is still a less understood entity.

In this study, the properties of the EX1 protein have been analysed, possible interacting proteins searched for and found. It could be determined that EX1 is part of a protein complex that is associated with the thylakoid membrane. It is located at the stromal side of the membrane. In an immunoprecipitation assay with extracted proteins from intact chloroplasts possible partners of interaction have been found which could reveal the mode of action of EX1. Among those the γ-subunit of the ATP-synthase already has been described as being significant in the matter of oxidative stress. Other interacting proteins are two FtsH-metalloproteases and several subunits of photosystem II. With this information a new model of stress related programmed cell death can be established which emanates from the chloroplast.

Zusammenfassung

Das Protein EXECUTER1 übt seine Funktion an einer entscheidenden Stelle der durch Singulett-Sauerstoff aktivierten Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* aus. Diese Entdeckung ist der Erforschung der *flu*-Mutante zu verdanken, in der sich auf kontrollierte Weise oxidativer Stress induzieren lässt.

Die *flu* Mutante trägt nach einem Wechsel von Dunkel nach Licht Schäden in Form von Läsionen und Wachstumshemmung davon. Keimlinge der Mutante werden durch diese Prozedur ausgeblichen und abgetötet. Der Grund für diesen Phänotyp ist der Verlust einer Kontrollfunktion der Chlorophyllsynthese. Im Gegensatz zum Wildtyp wird die Synthese von Protochlorophyllid im Dunkeln nicht blockiert. Es akkumuliert und erzeugt mit einsetzender Belichtung Singulett-Sauerstoff. Dieser ist jedoch nur indirekt für die sichtbaren Schäden verantwortlich. Vielmehr handelt es sich beim *flu*-Phänotyp um die Auswirkung einer genetisch kontrollierten Zelltodreaktion. Dies wurde durch eine erneute Mutagenisierung deutlich, welche den *flu*-Phänotyp vollständig revertiert ohne die Bildung von Protochlorophyllid zu vermindern. Das mutierte Gen wurde *EXECUTER1* (*EX1*) genannt. Da die Mutation von *EX1* die für Wildtyp charakteristische Genaktivierung nach Stressinduktion fast komplett unterdrückt, muss es sich hierbei um ein entscheidendes Glied der Signaltransduktionskette des oxidativen Stresses handeln. Während FLU bereits untersucht und die Funktion des Proteins genau beschrieben wurde, ist über das EX1 Protein wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften des EX1-Proteins untersucht, nach möglichen Interaktionspartnern gesucht und diese gefunden. Es konnte festgestellt werden, dass EX1 ein Teil eines Proteinkomplexes ist, der mit der Thylakoidmembran assoziiert vorliegt. Dabei befindet er sich an der stromatären Seite der Membran. Als mögliche Interaktionspartner des EX1 konnten in einer Immunopräzipitations-Analyse mit Proteinextrakt aus intakten Chloroplasten Bindungspartner gefunden werden, welche Aufschluss über die Funktion des Proteins geben können. Darunter findet sich zum einen die γ-Untereinheit der ATP-Synthase, welche bereits in früheren

Untersuchungen in Zusammenhang mit oxidativem Stress gebracht wurde. Zum anderen stehen auch FtsH-Metalloproteasen und Bestandteile des Photosystems II in Interaktion mit EX1. Hieraus könnte sich ein neues Modell des stressaktivierten programmierten Zelltods ergeben, welches seinen funktionalen Ausgangspunkt im Chloroplast hat.

1. Einleitung

Das Auftreten von physiologischem Stress bedeutet für jedes Lebewesen eine Einschränkung der biologischen Fitness und eine Gefährdung des Fortpflanzungserfolges. Stress wird definiert durch die belastende Einwirkung von abiotischen oder biotischen Faktoren, die zur Überdauerung und Überwindung eine besondere Leistung des Organismus nötig macht.

Durch spezielle Anpassung der Stresstoleranz und Abwehrreaktionen kann dem Stress entgegengewirkt werden. Pflanzen haben nicht die Möglichkeit sich durch einen aktiven Ortswechsel Linderung zu verschaffen. Dabei können an demselben Standort sehr starke Schwankungen an Lichtintensität, Wasserverfügbarkeit und Temperatur auftreten. Pflanzen müssen die an ihrem Standort herrschenden, stark schwankenden Bedingungen, allein durch physiologische Leistung bewältigen.

Viele Stressoren bewirken einen raschen Anstieg der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Pflanzen. Darunter sind sowohl klimatische Faktoren wie Temperatur, hohe Lichtintensität, ultraviolette Strahlung und Dürre, als auch kombinierte Faktoren wie Nährstoffmangel, Giftstoffe, Verletzung und Pathogenbefall. ROS werden bereits unter milden Bedingungen als ständiges Nebenprodukt des aeroben Stoffwechsels gebildet. Solange die ständig verfügbaren zellulären Mechanismen in der Lage sind diese Verbindungen zu entgiften, befindet sich der Organismus nicht im Stresszustand. Bewirken jedoch ungünstige Bedingungen die vermehrte Bildung von ROS und müssen ungewöhnlich grosse Teile der verfügbaren Ressourcen für die Entgiftung aufgewendet werden, tritt Stress auf. Verschiedene genetische und physiologische Mechanismen werden nun in dem Versuch aktiviert, eine Anpassung an die erschwerten Bedingungen herzustellen. Dies erfordert eine präzise Wahrnehmung der über den Normalzustand hinausgehenden Bildung von ROS und eine Signalkaskade vom Rezeptor zu den jeweiligen Systemen zur Bekämpfung des Stresses und zur Akklimatisation. Die Menge und Art an gebildeten ROS stellt für den Organismus ein Gradmesser über den physiologischen Stresszustand dar.

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies als Signalmoleküle

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind reaktive Sauerstoffverbindungen, die mit einer Vielfalt von Biomolekülen reagieren können und diese oxidieren (Girotti, 2001). Zu den ROS zählen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das radikalische Superoxid Anion ($\bullet O_2^-$), das Hydroxyl-Radikal ($\bullet OH$), das Perhydroxyl-Radikal ($\bullet O_2H$) und Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$). Mit Ausnahme von H_2O_2, welches enzymatisch aus $\bullet O_2^-$ gebildet wird, entstehen sie durch die Übertragung eines freien Elektrons oder von Anregungsenergie auf molekularen Sauerstoff. Im letzteren Fall entsteht ausschliesslich $^1O_2$. Die Radikale unter den ROS besitzen ein ungepaartes Valenzelektron, was der Grund für ihre hohe Reaktivität ist. Singulett-Sauerstoff hingegen erlangt seinen Radikal-ähnlichen Charakter durch ein besetztes antibindendes Molekülorbital. Da ROS stets aus molekularem Sauerstoff erzeugt werden, entstehen sie vor allem im aeroben Stoffwechsel.

Durch das Aufkommen sauerstoffproduzierender Cyanobakterien vor 2,7 bis 2,3 Milliarden Jahren und der damit verbundenen Anreicherung von Sauerstoff in Wasser und Atmosphäre kam es zu einer Krise des damaligen Lebens (Canfield et al., 2000; Kopp et al., 2005). Da molekularer Sauerstoff für die meisten anoxygenen Organismen toxisch ist, wurden Anpassungen an die veränderte Gaszusammensetzung der Umwelt nötig. Die Verfügbarkeit von Sauerstoff als Oxidationsmittel bietet auch neue Möglichkeiten, da der aerobe Stoffwechsel eine grössere Energieausbeute als der anaerobe aufweist. Auch wenn aerobe Organismen sich an den molekularen Sauerstoff angepasst haben, birgt dessen Anwesenheit immer noch Risiken. Molekularer Sauerstoff im Triplett-Zustand ist chemisch relativ inert, kann jedoch bei Überwindung einer gewissen Anregungsenergie bereits als Oxidationsmittel wirken. Durch enzymatische Aktivität wie z.B. der Zellatmung und durch Energieübertragung von lichtabsorbierenden Molekülen, sogenannten *photosensitisern*, können reaktive Sauerstoffspezies entstehen. ROS haben eine viel potentere Oxidationswirkung als molekularer Sauerstoff im Triplett-Zustand. Im Laufe der Evolution haben Organismen für alle ROS enzymatische oder rein chemische Systeme zur

Entgiftung entwickelt. Im physiologischen Normalzustand können ROS durch sogenannte *scavenger* und *quencher* entgiftet werden. Hierzu gehören Enzyme wie Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase, als auch Produkte des Sekundärstoffwechsels wie Tocopherole, Carotinoide und Ascorbinsäure (Alscher et al., 1997). Durch Stress wird die Fähigkeit zur Entgiftung beeinträchtigt und freigesetzte ROS richten Schäden in der Zelle an. Noch bevor der auslösende externe Stressor den gesamten Organismus in Gefahr bringt, kann dies den Tod der betroffenen Zellen bedeuten. Im Laufe der Evolution haben sich biologische Systeme entwickelt, die das vermehrte Auftreten von ROS und deren Reaktionsprodukte als frühen Indikator für einen Stresszustand interpretieren (Mittler, 2002; Vranova et al., 2002).
Vor allem aufgrund der Bedeutung für die Tumorforschung ist diese Art der Regulation für den tierischen Organismus bereits gut dokumentiert. Das Muster der Genaktivierung ist hochgradig spezifisch für die Art des ROS und den Ort der Entstehung. ROS werden dabei direkt oder indirekt über ein spezifisches Produkt der Oxidation wahrgenommen.

Die Erkenntnislage für den pflanzlichen Organismus spricht ebenfalls für eine Rolle der ROS als Übermittler in der Signaltransduktion (Apel and Hirt, 2004). Dabei können ROS als *second messenger* über einen ROS-Rezeptor eine Genaktivierung einleiten, oder indirekt durch ein spezifisches Oxidationsprodukt. Im Fall von Membranlipiden ist bekannt, dass das Auftreten der oxidierten Formen in der Zelle ein Signalkaskade auslöst (Przybyla et al., 2008).

Singulett-Sauerstoff ist eines der ROS, die im besonderen Masse Auslöser der Signaltransduktion des oxidativen Stresses sind (Danon et al., 2005; Danon et al., 2006). Es wird ausschliesslich in den Photosystemen gebildet und ist der massgebliche Verursacher photooxidativer Schäden an Membranen, Pigmenten und Proteinen (Triantaphylides and Havaux, 2009). Seine Lebensdauer in der pflanzlichen Zelle beträgt 3 µs und kann daher über Distanzen von mehreren hundert Nanometern diffundieren (Hatz et al., 2007). Externe Stressfaktoren intensivieren die Bildung von $^1O_2$ sehr stark, was es zu einem idealen Umweltindikator macht. Mit der *flu*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* ist ein

pflanzliches System gefunden worden, in dem gezielt die Auswirkungen von $^1O_2$ untersucht werden können.

1.2 Die *flu*-Mutante

Auf der Suche nach Mutationen, welche den Biosyntheseweg von Tetrapyrrolen beeinflussen, wurde die *flu*-Mutante gefunden. Das FLU-Protein ist ein Regulator der Chlorophyllsynthese (Abb. 1). Es reguliert die Aktivität der Glutamyl-tRNS-Reduktase (GluTR) (Meskauskiene and Apel, 2002; Goslings et al., 2004). Durch die Lichtabhängigkeit der NADPH Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) kann im Dunklen keine Chlorophyllsynthese stattfinden (Reinbothe et al., 1996). Die Akkumulation von Protochlorophyllid wird verhindert, indem FLU die GluTR inhibiert und so den Syntheseweg bereits früh unterbricht.

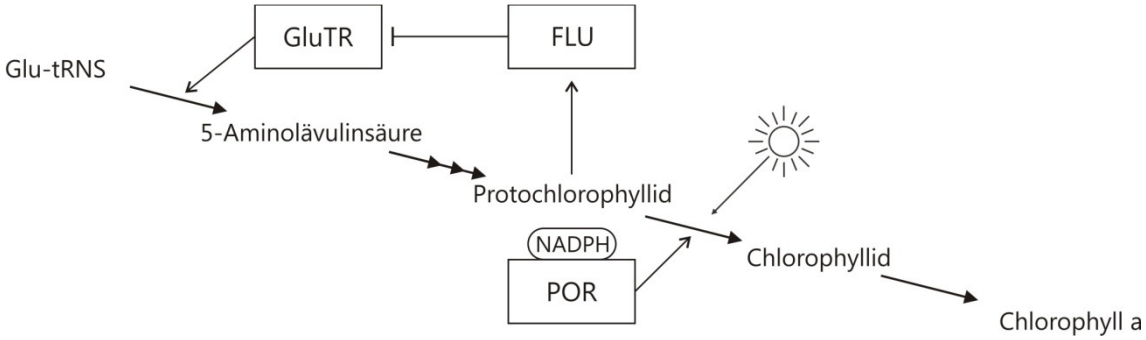

Abbildung 1: FLU-regulierte Chlorophyllsynthese in *Arabidopsis thaliana*

FLU reguliert die Aktivität der Glutamyl-tRNS-Reduktase (GluTR) in Abhängigkeit der Konzentration von Protochlorophyllid bzw. des Protochlorophyllid-POR-NADPH-Komplexes. POR: Protochlorophyllidoxidoreduktase.

Durch die Mutation und den damit verbundenen Funktionsverlust des FLU-Proteins läuft die Synthese auch im Dunkeln bis zum Protochlorophyllid, welches akkumuliert wird. Unter Blaulicht wird eine charakteristische rote Fluoreszenz sichtbar, die ohne vorherige Dunkelphase nicht auftritt. Diese

Fluoreszenz des überschüssigen Protochlorophyllids gab der Mutante ihren Namen *flu* (*fluorescent*).

Protochlorophyllid ist in der Lage Licht zu absorbieren und kann daher, wenn kein geeigneter Akzeptor zur Verfügung steht, als *photosensitiser* Energie an Triplett-Sauerstoff übertragen. Im Falle einer langen Dunkelphase wird in *flu* Protochlorophyllid über die Menge hinaus gebildet, die von den POR-NADPH-Komplexen gebunden werden kann. Das frei vorliegende Protochlorophyllid gibt unmittelbar bei einsetzender Belichtung die Anregungsenergie an Triplett-Sauerstoff weiter ($^3O_2$), welches sich in Singulett-Sauerstoff umwandelt. Die Umwandlung geschieht durch Spinumkehr eines der beiden Elektronen in den antibindenden π-Orbitalen. Über diesen extrem kurzlebigen Zwischenschritt wechselt ein Elektron das Orbital und befindet sich zusammen mit dem anderen Elektron in einem gemeinsamen antibindenden π-Orbital. Das andere π-Orbital bleibt unbesetzt und bildet eine Elektronenlücke, die für die stark elektrophile Reaktivität von $^1O_2$ verantwortlich ist.

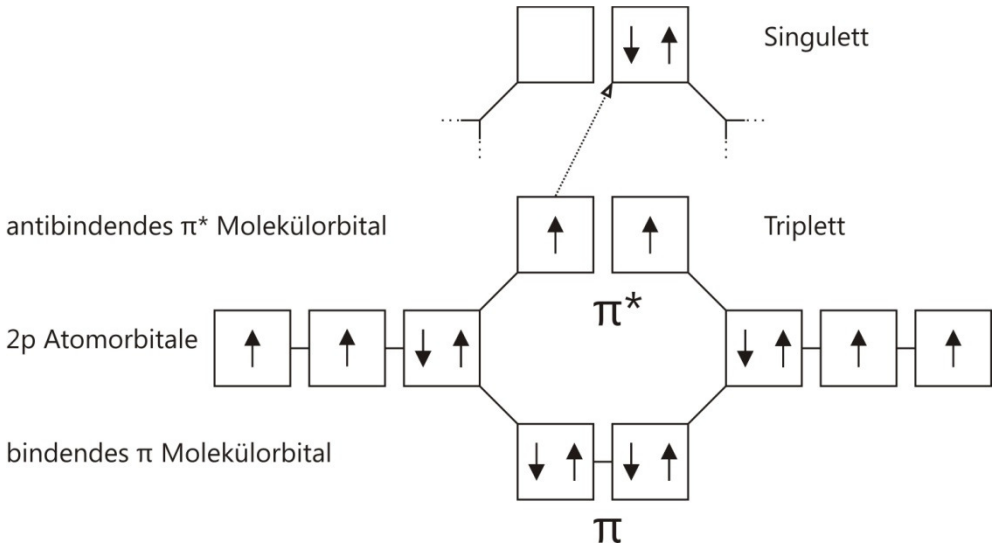

Abbildung 2: Orbitalschema des Triplett- und Singulettzustands von O_2

Der Übergang von Triplett- zu Singulettzustand des Sauerstoffs besteht in der Spinumkehr und Orbitalwechsels eines Elektrons im antibindenden π-Orbital. Die σ-Orbitale sind nicht dargestellt.

Schon durch einmaliges Verdunkeln und Wiederbelichten wird in *flu* am natürlichen Entstehungsort, der Thylakoidmembran, $^1O_2$ erzeugt. Dies ähnelt der Erzeugung von $^1O_2$ durch angeregtes Triplett-Chlorophyll im PSII (Macpherson et al., 1993). Ohne das Vorhandensein von Stress, als unweigerliche Folge der durch Lichteinstrahlung absorbierten Energie, wird im PSII kontinuierlich $^1O_2$ gebildet (Apel and Hirt, 2004). Unter stressauslösenden Bedingungen wie Trockenheit und hoher Lichtintensität ist die Bildungsrate jedoch stark erhöht (Fryer et al., 2002). Der Singulett-Sauerstoff wird von den vorhandenen *quenchern* und *scavengern*, insbesondere den Carotinen, Tocopherolen und auch den Proteinen des PSII selbst, entgiftet (Keren et al., 1995; Kruk et al., 2005). Bei ausreichend hohem Stressniveau bewirkt vor allem $^1O_2$ die Photooxidation der Pigmente in den Photosystemen (Triantaphylides et al., 2008). In *flu* kann die Protochlorophyllid-Menge durch zeitliche Anpassung der Dunkelphase dosiert werden, so dass eine quantifizierbare Freisetzung von $^1O_2$ erzielt wird. Durch die Einstellung einer nicht zu langen Dunkelphase ist es möglich zwischen den Effekten, die durch die Toxizität des $^1O_2$ hervorgerufen werden, von den Folgen der aktivierten Signaltransduktion des oxidativen Stresses zu unterscheiden. Letzteres wird bereits vor der vollständigen Erschöpfung der entgiftenden Systeme aktiviert. Die beiden Phänomene können durch das Aufkommen von enzymatischen und nichtenzymatischen Peroxidationen von Membranlipiden unterschieden werden (Przybyla et al., 2008)

Die *flu*-Mutante zeigt unter Dauerlicht keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp und kann dadurch sehr einfach kultiviert werden. Im Dauerlicht wird das gebildete Protochlorophyllid sofort durch die POR reduziert und erreicht keine kritische Konzentration (Rebeiz et al., 1988). Wird die Mutante mit einem Wechsel von mehrstündiger Dunkelheit zu Licht behandelt, zeigt sie charakteristische Stressreaktionen. Keimlinge bleichen aus und sterben, während adulte Pflanzen binnen weniger Stunden nach Einsetzen der Belichtung nekrotische Läsionen entwickeln und ihr Wachstum einstellen (Abb. 3, 4).

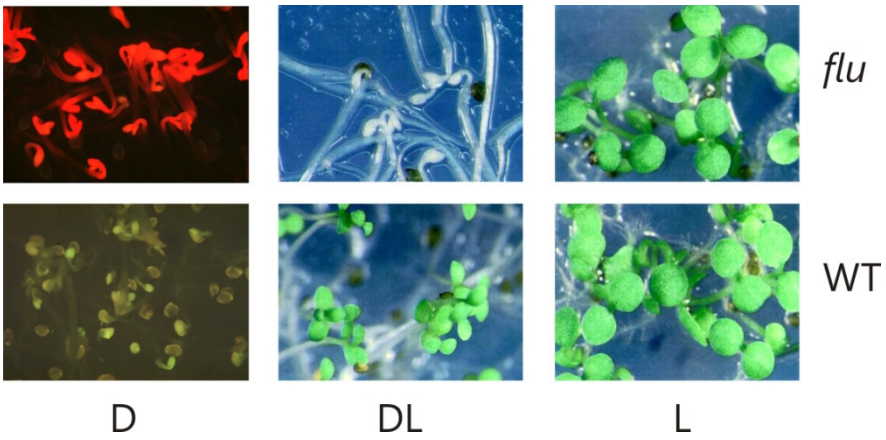

Abbildung 3: Keimlinge von *flu* unter verschiedenen Lichtbedingungen

Nach einer Dunkelphase (D) fluoreszieren *flu*-Keimlinge. Nach Wechsel von Dunkel zu Licht (DL) bleichen sie aus und sterben, während *flu*-Keimlinge im Dauerlicht (D) keinen von WT verschiedenen Phänotyp zeigen. Aus: (Meskauskiene et al., 2001)

Abbildung 4: Adulte *flu*-Mutanten in verschiedenen Belichtungsprozeduren

In einer Zeitspanne von 44 Tagen wurde *flu* verschiedenen Belichtungsbedingungen ausgesetzt. Dauerlichtphase: (L) Langtagphase: (DL). Die jeweilige Dauer der Belichtungsphase ist darunter in Tagen angegeben Aus: (op den Camp et al., 2003).

Während *flu*-Keimlinge im Wechsel von Licht und Dunkel absterben, sind adulte Pflanzen in der Lage, die Stressreaktion zu überleben (Abb. 4). Nach Wiederherstellung des Dauerlichts können diese Pflanzen sich erholen und ihr Wachstum normal fortsetzen (op den Camp et al., 2003).

Da in *flu* zu Beginn der Behandlung selektiv nur die Spezies $^1O_2$ gebildet wird, ist es möglich, die Wirkung eines einzelnen ROS ohne interferierende Effekte durch andere ROS zu untersuchen. Durch Verwendung des Herbizids DCMU war es bisher möglich, die Bildung von $^1O_2$ in Chloroplasten zu provozieren. Dieses blockiert den Elektronentransport am PSII und führt so zur Energieübersättigung des Pigmentsystems (Fufezan et al., 2002). Dies stellt jedoch eine Vertauschung der Ursache und Wirkung gegenüber dem natürlichen Vorgang dar, bei dem $^1O_2$ durch Photoinhibition zunächst an den Pigmenten des PSII entsteht und anschliessend durch oxidative Schädigung desselben zur Störung des Elektronentransports führt. Dazu kommt die Unsicherheit bei der Dosierung und Applikation des Herbizids an der Pflanze. Damit ist der invasiven Behandlung von Pflanzen mit DCMU, die Verwendung der *flu*-Mutante klar vorzuziehen. Die genannten Eigenschaften machen *flu* zum idealen Arbeitsmittel, um die Auswirkung der Freisetzung von $^1O_2$ in *A. thaliana* zu untersuchen.

Nach erneutem Mutagenisieren von *flu* wurde eine Revertante des *flu*-Phänotyps gesucht. Es wurden 15 Revertanten gefunden, die nach Stressbehandlung weder Wachstumshemmung noch Sterben der Keimlinge zeigten. Alle 15 Revertanten waren allelisch in der Mutation des Locus At4g33630 (Wagner et al., 2004). Das mutierte Gen der *flu*-Revertante wurde *executer1* genannt.

1.3 Das EXECUTER1-Protein

Die *flu*-Revertante akkumuliert Protochlorophyllid im Dunkeln im gleichen Masse wie *flu*. Messungen der nach Wiederbelichtung gebildeten Menge an Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von DanePy in *flu* und deren Revertante ergaben, dass die Mengen identisch sind (Wagner et al., 2004). Die beobachtete Stressreaktion in *flu* muss daher eine andere Ursache haben als die Toxizität von $^1O_2$. Das verantwortliche Gen wurde *EXECUTER1* (*EX1*) genannt.
Die Reversibilität des *flu*-Phänotyps durch die Mutation von *EXECUTER1* zeigt, dass die Schäden an der Pflanze durch Auftreten von $^1O_2$ nicht durch dessen Toxizität verursacht werden. Offenbar wird Singulett-Sauerstoff in der Zelle wahrgenommen und löst eine kontrollierte Zelltodreaktion aus. Der Nachweis der Signalwirkung von EX1 wurde erbracht, indem *ex1*-Mutanten mit DCMU behandelt wurden und ebenfalls ein Ausbleiben der Zelltodreaktion zeigten. Das *EX1*-Genprodukt ist zum Ablauf dieser Stressreaktion notwendig. Durch die Mutation ist die Reaktionskette unterbrochen und es findet weder Zelltod noch Wachstumshemmung statt (Abb. 5).

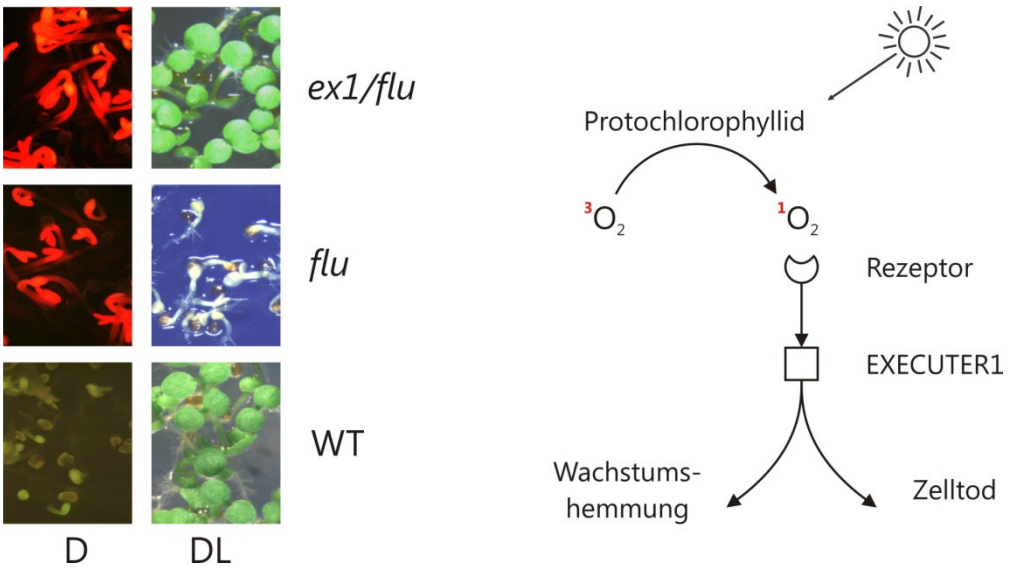

Abbildung 5: Die *ex1*-Mutation revertiert den *flu*-Phänotyp

Links: *ex1/flu* zeigt keine Stressreaktion nach Wechsel vom Dunkel ins Licht. Die durch Protochlorophyllid hervorgerufene Fluoreszenz nach Dunkelphase ist bei *ex1/flu* und *flu* gleich. Aus: (Wagner et al., 2004)
Rechts: Schema zur Signaltransduktion von $^1O_2$-Stress

Das Genprodukt von *EXECUTER1* ist ein Protein mit einer Masse von 76,5 kDa und einer Länge von 684 Aminosäuren. Ausser der Importsequenz für Plastiden besitzt die übrige Struktur keine Ähnlichkeit mit einer anderen Proteinklasse. Weiterführende Experimente wiesen nach, dass das EXECUTER1-Protein ein Element der Singulett-Sauerstoff aktivierten Signaltransduktion ist. Das Ziel dieses Signals ist die Aktivierung kerncodierter Gene, die einen kontrollierten Zelltod auslösen. Durch *Microarrays* gewonnene Expressionsmuster von *ex1/flu* zeigten nach Stressinduzierung eine, im Vergleich zu *flu,* deutlich herabgesetzte Aktivierung $^1O_2$-responsiver Gene. Durch zusätzliche Mutation eines homologen Gens (35,5%ige Identität in der Aminosäurensequenz), *EXECUTER2* (*EX2*), wurde die Expression $^1O_2$-responsiver Gene nach Stressinduzierung nahezu vollständig unterdrückt (Lee et al., 2007). EX2 ist offenbar ebenfalls an der Signaltransduktion beteiligt, nimmt gegenüber EX1 jedoch eine supplementäre Rolle ein. Die *ex2*-Mutation in *flu* ist alleine nicht in der Lage den *flu*-Phänotyp zu revertieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Ausfall beider EXECUTER-Proteine eine gestörte Plastidendifferenzierung während der Embryogenese zur Folge hat (Kim et al., 2009).

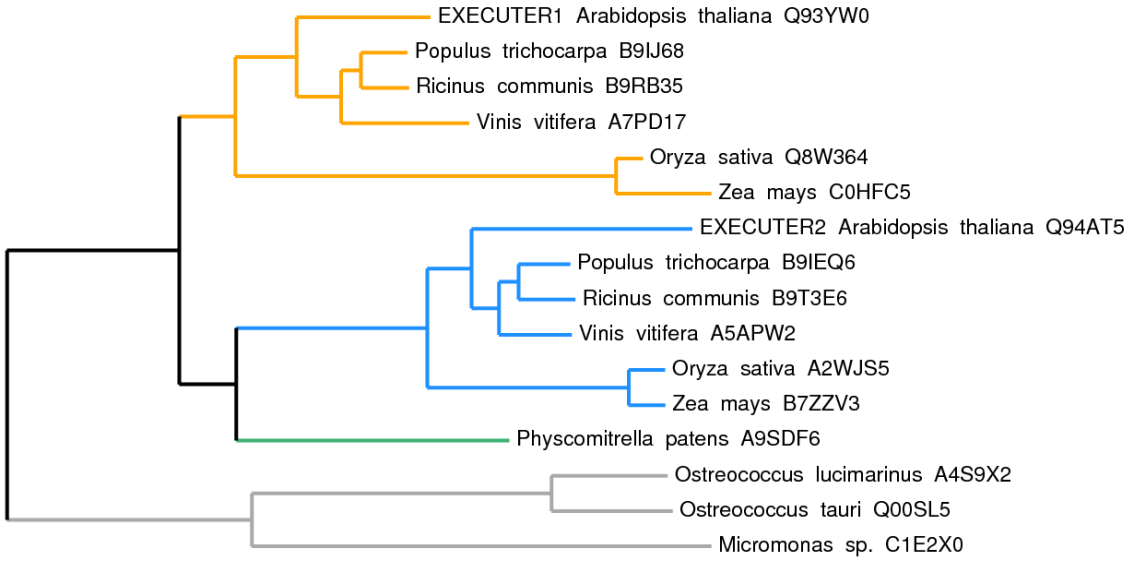

Abbildung 6: Phylogramm der EXECUTER-Proteinfamilie

Die Astlängen entsprechen der relativen Identität der Peptide. In Gelb: der EX1-Zweig; in Blau der EX2-Zweig; in Grün: EXECUTER-ähnliches Protein in *Physcomitrella patens*, in Grau EXECUTER-verwandte Proteine in ausgewählten Algen. Das jeweilige Protein ist mit Namen der Spezies und UniProtKB Identifikationscode bezeichnet. Erstellt mit „phylogeny analysis", www.phylogeny.fr.

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* existieren keine zu *EX1* und *EX2* homologen Gene. Jedoch wurden in allen vollständig sequenzierten pflanzlichen Genomen *EXECUTER1*-ähnliche Gene gefunden. In den Genomen von Bedecktsamern sind Homologe zu finden, die jeweils *EX1* oder *EX2* zugeordnet werden können. Im Laubmoos *Physcomitrella patens* kann nur ein einzelnes Gen gefunden werden, welches eine geringfügig grössere Homologie mit *EX2* als mit *EX1* aufweist (37% bzw 36% in der Aminosäurensequenz). Auch in den Genomen einiger Algen lassen sich Gene finden, die eine auffällige Homologie mit *EXECUTER1* besitzen. Im Falle des Einzellers *Micromonas sp.* gibt es eine 47%ige Übereinstimmung über eine Sequenz von 160 Aminosäuren. Das entwicklungsgeschichtliche Alter und die starke Konservierung der EXECUTER-Proteine lassen den Schluss zu, dass diese eine unabdingbare Rolle für aerobe photoautotrophe Organismen spielen müssen. In Bakterien, tierischen Organismen und Pilzen scheinen sie zu fehlen.

Die Wirkweise und Interaktionspartner von EXECUTER1 waren bislang unbekannt. Wahrscheinlich ist, dass EXECUTER1 Teil einer Signalkaskade ist, die vom Chloroplast in den Zellkern reicht. Über diesen Signalweg gibt es bis jetzt keine Erkenntnisse. Seine Erforschung kann daher neue Einblicke in die wenig bekannte Natur der Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern geben. Die Wahrnehmung von oxidativem Stress und die darauf folgende Auslösung einer spezifischen Reaktion innerhalb der Pflanzenzelle ist eine überlebenswichtige Funktion für den Organismus als Ganzes.
Die Identität und Funktionsweise des $^1O_2$-Rezeptors ist nicht bekannt. Angesichts der Kurzlebigkeit und der Reaktivität von $^1O_2$ wäre es denkbar, dass es keinen primären Rezeptor im Sinne eines Sensors mit spezifischer Bindungsstelle gibt. Vielmehr könnte ein Reaktionsprodukt der Oxidation durch $^1O_2$ oder anderer ROS als Signalgeber dienen. Dieses Biomolekül würde keine speziellen Eigenschaften besitzen, die es zur Perzeption von $^1O_2$ befähigen würde. Es würde oxidiert werden wie auch andere Moleküle, jedoch eine Rezeptor-ähnliche Rolle einnehmen, indem seine Oxidationsprodukte als Signal des oxidativen Stresses wahrgenommen werden.

Aufgrund der Nähe zum Entstehungsort im PSII kämen die Pigmente und Proteine sowie Membranlipide der Thylakoide in Frage. Da auch unter günstigen Bedingungen ROS produziert werden, muss es sich um eine Komponente handeln, die vor allem unter Stressbedingungen oxidiert wird.
Untersuchungen in der Vergangenheit haben Hinweise darauf gegeben, dass es Strukturen in den Chloroplasten gibt, die auf eine spezifische Weise auf das verstärkte Auftreten von $^1O_2$ reagieren. Im Falle der plastidären ATP-Synthase ist eine unmittelbar auf die Freisetzung von $^1O_2$ folgende Modifikation einer Untereinheit beobachtet worden (Mahler et al., 2007). Der Zusammenhang mit einer möglichen Funktion der Vermeidung von Singulett-Sauerstoff durch Erhöhung des *nonphotochemical exciton quenching* (NPQ) drängt sich dabei auf. Es besteht die Möglichkeit und die Hoffnung, durch die Aufklärung der Signaltransduktionskette, deren Glied EXECUTER1 ist, auch das Prinzip der Wahrnehmung von $^1O_2$ zu verstehen.

1.4 Die plastidäre ATP-Synthase

Die plastidäre ATP-Synthase dient der Phosphorylierung von ADP mit der aus der Photosynthese gewonnenen Energie. Während der Lichtreaktion der Photosynthese werden Protonen durch die Oxidation von Wasser am PSII und durch Oxidation von Plastochinon am Cytochrom b_6f-Komplex in das Lumen freigesetzt. Die erhöhte Konzentration von Protonen im Lumen erzeugt ein potentielles Energiegefälle über die protonenundurchlässige Tylakoidmembran, welches als protonenmotorische Kraft bezeichnet wird.
Die Phosphorylierungsreaktion findet im stromaständigen CF_1-Komplex an den β-Untereinheiten statt. Der membranständige CF_O-Komplex erzeugt die dafür notwendige Energie aus der protonenmotorischen Kraft. Dabei werden Protonen in das Stroma freigesetzt. Eine Besonderheit der ATP-Synthasen im Allgemeinen ist die Eigenrotation einiger Untereinheiten im Komplex. Die Rotation im CF_O-Komplex wird dabei an die γ-Untereinheit vermittelt. Durch die dadurch verursachten Landungsverschiebungen an der Innenseite der

statischen α- und β-Untereinheiten wird Energie übertragen und ADP phosphoryliert.

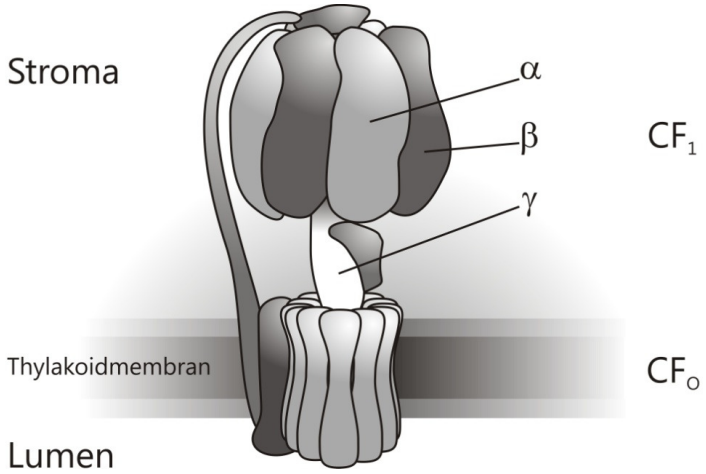

Abbildung 7: Die plastidäre ATP-Synthase

Die plastidäre ATP-Synthase besteht aus dem in das Stroma ragenden CF_1-Komplex und dem transmembranen CF_O-Komplex. Protonen werden vom Lumen durch den CF_O-Komplex geleitet und induzieren eine Drehung der γ-Untereinheit um die Längsachse. Mit der Energie dieser Ladungsverschiebungen werden in den statischen α-Untereinheiten ADP zu ATP phosphoryliert. Aus: (Mahler et al., 2007)

Die enzymatische Aktivität der plastidären ATP-Synthase ist proportional zum protonenmotorischen Potential, wird jedoch durch den RedOx-Zustand der regulatorischen Region der γ-Untereinheit gesteuert (Bald et al., 2001; Ueoka-Nakanishi et al., 2004). Dies hat Auswirkungen auf den pH des Lumens, welcher bestimmend ist für das *nonphotochemical quenching* der Photosysteme (Bosco et al., 2004). Vorangegangene Untersuchungen haben ergeben, dass die Freisetzung von $^1O_2$ in *flu* eine spezifische Auswirkung auf die γ-Untereinheit hat (Mahler et al., 2007). In diesem Zusammenhang wird spekuliert, ob dieser Modifikation eine dezidierte Funktion zukommt. Die Verminderung der Protonendurchlässigkeit der ATP-Synthase bewirkt eine Erhöhung des NPQ, welches der Bildung von $^1O_2$ entgegenwirkt (Kanazawa and Kramer, 2002). In diesem Modell wird $^1O_2$ perzipiert und löst auf physikalisch-chemischen Weg eine geeignete Gegenreaktion aus ohne die Beteiligung einer Genaktivierung. Dies kann jedoch nur eine Massnahme darstellen, die einen plötzlichen und kurzzeitig einsetzenden Stress mildert. Eine Erhöhung der

Entgiftungskapazitäten und Akklimatisation erfordern unbedingt eine Genaktivierung im Zellkern.

1.5 Die *variegated*-Mutanten

Singulett-Sauerstoff entsteht, wie auch andere ROS, auf natürlichem Wege während der Photosynthese im Photosystem II (Apel and Hirt, 2004). Dort ist es verantwortlich für die oxidative Schädigung des PSbA-Proteins und anderer Untereinheiten. Vor allem das PSbA dient als *scavenger,* indem es $^1O_2$ am Entstehungsort abfängt und dabei selbst oxidiert wird (Keren et al., 1995). Ein Stillstand des Elektronenflusses im Licht, die sogenannte Photoinhibition, ist die Folge. Zur Wiederherstellung der Funktion des PSII muss das Protein aus dem Komplex entfernt und ersetzt werden. Aus diesem Grund ist PSbA eines der Proteine mit der höchsten Expressionsrate in der Pflanzenzelle. Bestimmte Metalloproteasen übernehmen den Abbau vor Ort in der Thylakoidmembran, die FtsH-Proteine. Die FtsH-Metalloproteasen gehören zur Superfamilie der AAA-ATPasen, welche für eine Vielzahl substanzieller Aufgaben in der Pflanzenzelle verantwortlich sind. Als Proteasen bauen sie nicht nur defekte Proteine ab, sondern sind auch als molekulare Chaperone an der Reifung neu synthetisierter Proteine und an der Assemblierung und Zersetzung von Proteinkomplexen beteiligt (Ogura and Wilkinson, 2001). Die FtsH-Proteine, welche Teile des Photosystems II prozessieren, wurden durch die *variegated*-Mutanten charakterisiert (Sakamoto et al., 2002). Die beiden homologen Proteine, FtsH5 (*var1*) und FtsH2 (*var2*), können sich in ihrer Funktion gegenseitig nicht komplementieren. Sie sind mit Transmembrandomänen in der Thylakoidmembran verankert und bilden Hetero-Hexamere aus jeweils zwei verschiedenen FtsH-Varianten (Sakamoto, 2003). Die auffällige Blattmusterung (Abb. 8) wird durch eine allgemeine Entwicklungsstörung der Plastiden in den weissen Blattsegmenten verursacht. Dort sind weder Proteine der Photosysteme noch entwickelte Thylakoidmembranen nachweisbar, was darauf hinweist, dass die VAR-Proteine auch an der Entwicklung der Plastiden beteiligt sind (Rosso et al., 2009). In den grünen Pflanzenteilen ist der Abbau von geschädigten Untereinheiten des Photosystems II gestört, so dass es sehr schnell zur

Photoinhibition des Elektronentransports kommt (Miura et al., 2007). Die Folge ist eine stark erhöhte Bildung von ROS (Kato et al., 2009). Obwohl zumindest die grünen Pflanzenteile oxidativem Stress ausgesetzt sind, kommt es jedoch nicht zum Zelltod (Aluru et al., 2006; Kato et al., 2007). Dies wirft die Frage auf ob, in *var1/2* die Signaltransduktion ebenso wie in *ex1* unterbrochen sein könnte.

Abbildung 8: Habitus der Mutante *var2*

Die Pflanze wurde 20 Tage unter Dauerlicht angezogen. Die Blätter sind deutlich sichtbar in weisse und grüne Bereiche unterteilt.

Erste Experimente mit *var1/2/flu*-Mutanten zeigten, dass auch diese Mutation den *flu*-Phänotyp revertiert (unveröffentlichte Daten). Im ursprünglichen Verfahren zur Identifizierung von *flu*-Revertanten sind *var1* und *var2* nicht gefunden worden. Die stark verzögerte Entwicklung und der komplexe Phänotyp der Mutanten verhinderte dies, da zu dieser Zeit Individuen ausgewählt wurden, die eine deutliche Verbesserung der Vitalität gegenüber *flu* aufwiesen.

In *var1/2* ist die Signaltransduktion offensichtlich in ähnlicher Weise wie in *ex1* gestört, was dazu führt, dass trotz der Produktion von $^1O_2$ keine Stressreaktion stattfindet.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Untersuchungen sollen die Rolle des EXECUTER1-Proteins in der Signaltransduktion aufklären. Ausgehend von vorhergehenden Arbeiten soll eine Charakterisierung des Proteins erfolgen. Als Untersuchungsgegenstand dient die Transformante *EXECUTER1-GFP* in *ex1/flu*, sowie die *ex1/flu* Doppelmutante, *flu* und Wildtyp.

Es sollen Erkenntnisse über die Eigenschaften des Proteins, dessen Lokalisation, Häufigkeit und Bindungsverhalten gewonnen werden. Die Isolierung des nativen Proteins aus Pflanzenmaterial soll experimentelle Artefakte, wie sie *in vitro* auftreten können, vermeiden. Es soll untersucht werden, ob EXECUTER1 in einem Proteinkomplex auftritt. Etwaige Interaktionspartner sollen identifiziert werden.
Die gewonnenen Erkenntnisse werden im Rahmen der Signaltransduktion zur Abwehr oxidativen Stresses diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die für die Experimente verwendeten Chemikalien und Materialien stammen von folgenden Herstellern:

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Hersteller	Artikel
Corex	15 ml und 30 ml Corex Zentrifugengefässe
Bayer CropScience, Langenfeld (Deutschland)	Basta (Glufosinat-Ammonium)
Beckman Coulter, Krefeld (Deutschland)	14 ml Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen
BioRad AG, Reinach (Schweiz)	Immun-Star HRP chemiluminescent Detection Kit, Proteinmarker, Laemmli Puffer, PVDF-Membran
Calbiochem	Miracloth Filtergaze
Carl Roth GmbH, Karlsruhe (Deutschland)	Acrylamid/Bisacrylamid-Mix, Digitonin, Dithiothreitol (DTT), Glycin, TRIS
Fluka/Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)	6-Aminohexansäure, Acetonitril, Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, Ammoniumbicarbonat, Ammoniumpersulfat (APS), Bis-TRIS, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylpimelimidat (DMP), Dithiodipropionsäure-hydroxysuccinimidester (DTSP), Dithiothreitol (DTT),

Tabelle wird fortgesetzt

Fluka/Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)	Essigsäure, Ethanol, Ficoll 400, Glufosinat, Glycerin, Glycin, HEPES, Iodacetamid, Kodak BioMax Light Film, Magnesiumchlorid, Mercaptoethanol, Methanol, Murashige und Skoog Medium, Natriumchlorid, Natriumdodecysulfat (SDS), Octyl-2-D-Glucopyranosid (OGP), Ortho-Phosphorsäure, Percoll, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Polyethylenglykol 4000 (PEG), Ponceau S, Protease Inhibitor Mix, Saccharose, Silbernitrat, Sorbit, Tetramethylethylendiamin (TEMED), Trichloressigsäure, Tricin, TRIS
GE Healthcare, Glattbrugg (Schweiz)	HMW Native Marker für BN-PAGE, Whatman Filterpapier, Protein A Sepharose
Greiner Bio-One, Solingen (Deutschland)	15 ml und 50 ml Falcon Tubes 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefässe
Migros, Zürich (Schweiz)	RapiLait fettfreies Milchpulver
Pierce Biotechnology Inc., Rockford (U.S.A.)	BCA Test bestehend aus Bicinchoninsäurelösung und Kupersulfatlösung
Serva GmbH & Co, Heidelberg (Deutschland)	Serva Blau G250, Macerozym, Cellulase

2.1.2 Antikörper

Die für die *Western-Blots* und Immunopräzipitationen verwendeten Antikörper stammen von folgenden Herstellern:

Tabelle 2: Antikörper

Hersteller	Antikörper	Spezies
Roche	α-GFP	Maus
Jackson ImmunoResearch	α-Maus IgG (HRP konjugiert) α-Kaninchen IgG (HRP konjugiert)	Ziege Ziege
Agrisera	α-ATP-Synthase γ-Untereinheit α-ATP-Synthase F_1-Komplex α-Plastocyanin α-RuBisCO grosse Untereinheit (RBCL) α-RuBisCO kleine Untereinheit (RBCS) α-LHCP α-PSbD	Kaninchen Kaninchen Kaninchen Kaninchen Kaninchen Huhn Kaninchen
Invitrogen	α-Huhn IgG (HRP konjugiert)	Ziege
W. Sakamoto Universität Okayama	α-FtsH2 (VAR2) α-FtsH5 (VAR1)	Kaninchen Kaninchen
H. Leonhardt, LMU München	α-GFP „GFP Nano Trap“ (an Protein A-Sepharose gekoppelt)	E. coli (Lama)

2.1.3 Laborgeräte

Im Laufe der Untersuchungen wurden folgende Geräte verwendet:

Tabelle 3: Laborgeräte

Hersteller	Laborgeräte
Photon System Instruments, Brno (Tschechien)	FluorCam (Fluorimeter mit CCD-Kamera)
BioRad AG, Reinach (Schweiz)	Protean II xi Cell, Mini-Protean II (Elektrophorese Gelkammer, Tank-Blotting) TransBlot SemiDry Transfer Cell (*semi-dry Western-Blot* Transferzelle)
Beckman Coulter, Krefeld (Deutschland)	Ultrazentrifuge, SW 40 Ti Rotor
Waring, Torrington (USA)	Blender (Standmixer), 1,2 Liter Glascontainer

2.1.4 Pflanzenmaterial

Als Gegenstand der Untersuchungen dienten Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana*. Im Speziellen wurde der Ökotyp *Landsberg erecta* (*Ler*) für Experimente herangezogen. Neben dem Wildtyp dieser Pflanze wurden die Mutante *flu*, die Doppelmutante *flu/ex1* und die mit *EX1-GFP* transformierte Linie der Doppelmutante verwendet (Lee et al., 2007). Die Mutanten wurden durch EMS-Mutagenese erzeugt und durch Rückkreuzungen mit der Ursprungslinie *flu* von anderen Mutationen bereinigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* wurden nach der Aussaat auf Torferde für 24 Stunden bei 4°C stratifiziert. Danach wurden sie 20 bis 22 Tage unter Dauerlicht von 140 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} bei 20°C und 60% rel. Luftfeuchte angezogen. Zehn Tage nach dem Keimen wurden die Pflanzen vereinzelt. 5 Tage vor Versuchsbeginn wurden die Pflanzen der Linie *EX1-GFP* in *ex1/flu* mit einer 0,02%igen Glufosinatlösung (Basta, Bayer) besprüht und daraufhin abgestorbene Individuen entfernt.

Zur Vermeidung einer Störung der Plastidenisolation durch Stärkekörner wurden die Pflanzen 16 Stunden vor Beginn der Isolation dunkel gestellt. Zur Induktion von Stress durch $^1O_2$ wurden die Pflanzen vor dem jeweiligen Experiment 8 Stunden dunkel gestellt und anschliessend wieder belichtet. Die Wiederbelichtungszeiten variierten je nach Experiment von null bis 60 Minuten Wiederbelichtung.

Zur Durchführung des Komplementierungsexperiments wurden die Pflanzen in Petrischalen angezogen. Das Substrat bestand aus Agar und Murashige-Skoog Nährsubstanz.

2.2.2 Isolation von intakten Chloroplasten

Zur Isolation intakter Chloroplasten wurde ein Protokoll von Aronsson und Jarvis in abgeänderter Form verwendet (Aronsson and Jarvis, 2002). Als Ausgangsmaterial dienten Blätter von 20 bis 22 Tage alten Pflanzen. Die gesamte Prozedur wurde unter grünem Sicherheitslicht (520 nm) bei 4 °C durchgeführt. Alle Geräte, Behälter und Lösungen wurden auf 4 °C vorgekühlt. Die Percollgradienten wurden einen Tag zuvor hergestellt indem die leichte Phase durch langsames Pipettieren mit der schweren Phase unterschichtet wurde.

Die Menge von 15-40 g Pflanzenmaterial wurde in einem Standmixer unter Zugabe von 150 ml Extraktionspuffer pro 10 g zerkleinert. Die Dauer des

Zerkleinerungsvorgangs betrug nicht länger als 20 Sekunden. Die Suspension, bestehend aus Pflanzengewebe, Zelltrümmern und Organellen, wurde durch zwei Lagen mit Extraktionspuffer angefeuchtetem Miracloth gefiltert und das Filtrat bei 1000 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Extraktionspuffer aufgenommen und auf einen 30% / 60%igen diskontinuierlichen Percollgradienten überschichtet. Die Gradienten wurden bei 1000 xg für 20 Minuten zentrifugiert und die Interphase mit den intakten Chloroplasten abgenommen. Diese wurde mit etwa 30 ml HS-Puffer resuspendiert und bei 1000 xg für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mindestens einmal wiederholt bis der Überstand nach der Zentrifugation klar wurde. Das Pellet bestand aus intakten Chloroplasten, die abhängig vom weiteren Verlauf des Experimentes in unterschiedlichen Puffern aufgenommen wurden.

Tabelle 4: Lösungen für die Plastidenisolation

Lösung	Inhaltsstoffe pro 100ml
Extraktionspuffer	330 mM Sorbit 50 mM HEPES-KOH pH 8 5 mM EDTA
Gradientenpufferlösung	275 mM Sorbit 25 mM HEPES-KOH pH 8 10 mM EDTA
Percoll-Lösung	1% Ficoll 400 3% Polyethylenglykol 4000 96% Percoll
HS-Puffer	330 mM Sorbit 50 mM HEPES-KOH pH 8

2.2.3 Isolation von Plastidenproteinen

Die zuvor extrahierten intakten Plastiden wurden mittels osmotischem Schock lysiert. Zusätzlich kamen milde, nichtionische Tenside zum Einsatz, wenn Proteine in ihrer komplexen Form erhalten werden sollten. Das Tensid Digitonin wurde bei der Isolation von Plastidenproteinen für das *Blue Native*-Gel-Verfahren und Glyceringradienten verwendet. Zur Isolation von Proteinen für die Co-Immunopräzipitation wurde das Tensid Dodecyl-2-D-Maltosid verwendet.

Die isolierten Plastiden aus 2.2.2 wurden in Puffer HE, optional mit 0,1 % Tensid, aufgenommen und 1h schüttelnd bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Durch Osmolyse entstand eine Dispersion aus Stromaproteinen und membranassoziierten Proteinen. Die Tenside wurden eingesetzt um das Wiederverschliessen der Chloroplasten zu verhindern, Membranproteine dispers zu lösen und um die Dissoziation von Proteinkomplexen zu verhindern.

Um Proteinkomplexe zusätzlich zu stabilisieren und deren Bestandteile bei einer Immunopräzipitation fest an das Zielprotein zu binden, wurde ein *Crosslinker* verwendet. Der *Crosslinker* DTSP bildet kovalente Bindungen zwischen Lysinresten über kurze Entfernungen (ca. 1,2 nm) und vernetzt dadurch die Proteine eines Komplexes untereinander (Alloza et al., 2004). DTSP wurde als 10%ige Lösung in DMSO vorbereitet. Diese Lösung wurde der Chloroplastensuspension zu Beginn der Lyse zugegeben, so dass die DTSP-Endkonzentration 0,01% betrug.

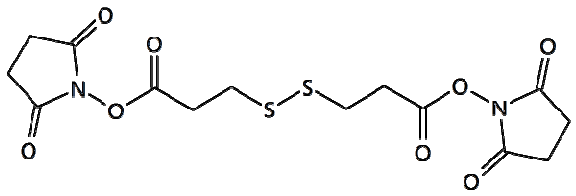

Abbildung 9: Der *Crosslinker* DTSP

DTSP bindet zwei Lysinreste über eine Entfernung von bis zu 1,2 nm. Die intramolekulare Disulfidbrücke kann durch reduzierende Agenzien aufgebrochen und die Quervernetzung aufgehoben werden.

Das Chloroplastenlysat wurde bei 4 °C gekühlt für 15 min bei 16000 xg zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Tabelle 5: Lösungen für die Isolation von Plastidenproteinen

Lösung	Inhaltsstoffe pro 100ml
HE-Puffer	25 mM HEPES-KOH pH 8 5 mM EDTA 0,1% Dodecyl-2-D-Maltosid
im weiteren Verlauf:	0,01% DTSP

2.2.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde mit den Gerätesortiments „Mini-Protean II“ und „Protean II xi“ der Firma BioRad durchgeführt. Es wurden diskontinuierliche 5% / 10%-ige SDS-Gele hergestellt und verwendet. Als Ladepuffer diente „Laemmli Sampling Buffer“ von BioRad. Als Proteinmarker wurden verschiedene ungefärbte und vorgefärbte Produkte der Firmen BioRad und Invitrogen verwendet.

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt, bei 95 °C für 10 min erhitzt, 5% Mercaptoethanol dazugegeben. Für Proben, deren Proteinkonzentration ermittelt werden sollte, wurde vor der Zugabe von ME ein Aliquot genommen und mittels eines BCA-Test Kit (Pierce) behandelt (Smith et al., 1985). Nach erneutem Erhitzen bei 95 °C für 5 min wurden die Proben mit 16.000 xg zentrifugiert und nur der Überstand weiterverwendet. Gelagert wurden die Proben bei -20 °C. Die Elektrophorese fand mit einer Spannung von 90-120 V statt und dauerte 20 bis 90 min.

Tabelle 6: SDS-PAGE

Lösung	Inhaltsstoffe
Sammelgel 5%	130 mM TRIS-HCl pH 6,8 5% Acrylamid : Bisacrylamid (37,5 : 1) 0,1% SDS 0,1% TEMED 0,1% Ammoniumpersulfat
Trenngel 10%	375 mM TRIS-HCl pH 8,8 10% Acrylamid : Bisacrylamid (37,5 : 1) 0,1% SDS 0,04% TEMED 0,1% Ammoniumpersulfat
Elektrophoresepuffer	25 mM TRIS 250 mM Glycin 0,1% SDS

2.2.5 *Blue-Native* Gelelektrophorese

Die *Blue-Native* PAGE wurde mit dem Gerätesortiment „Protean II xi“ von BioRad durchgeführt. Es wurden 5-15%ige Gradientengele und 5% / 8%ige diskontinuierliche Gele mit einer Dicke von 1 mm hergestellt und verwendet. Alle Bearbeitungsschritte der Probe wurden unter Kühlung bei 4°C durchgeführt. Es wurden vorgekühlte Geräte, Behälter und Lösungen verwendet.

Das Pellet aus intakten Chloroplasten wurde in Lysis-Puffer resuspendiert und 5%ige Digitoninlösung zugegeben. Pro 1mg Chlorophyll wurden 500 µl Puffer und 200µl Digitoninlösung eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 200 rpm im Dunkeln wurde die Suspension bei 16.000 xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 50 µl 5%ige Serva Blau G250 Lösung pro 1 mg Chlorophyll hinzugefügt und 10 min inkubiert. Nach einer

erneuten Zentrifugation bei 16.000 xg für 10 min wurde dem Überstand 87%iges Glycerin bis zu einer Konzentration von 15% zugegeben. Die fertige Probe wurde auf das Gel geladen. Die Elektrophorese fand mit Durchflusskühlung bei 100 bis 150 Volt für 6 bis 16 Stunden statt.

Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel für 20 min in BN-Inkubationspuffer bei 50 °C geschwenkt um es für das *Western-Blotting* vorzubereiten.

Tabelle 7: *Blue-Native* PAGE

Lösung	Inhaltsstoffe
Lysis-Puffer	50 mM BIS-TRIS pH7 1 M 6-Aminohexansäure 0,5 mM $MgCl_2$ 1mM PMSF 0,1% Protease Inhibitor Mix
Natives Sammelgel 4%	50 mM BIS-TRIS pH7 0,5 M 5-Aminocapronsäure 4% Acrylamid : Bisacrylamid (37,5 : 1) 0,03% Digitonin 0,09% TEMED 0,09% Ammoniumpersulfat
Natives Trenngel	50 mM BIS-TRIS pH7 0,5 M 6-Aminohexansäure 5-16% Acrylamid : Bisacrylamid (37,5 : 1) 8% Glycerin 0,03% Digitonin 0,06% TEMED 0,06% Ammoniumpersulfat *Tabelle wird fortgesetzt*

BN-Elektrophoresepuffer	50 mM Tricin 50 mM BIS-TRIS 0,008% Serva Blau G250
BN-Inkubationspuffer	150 mM Glycin 20 mM TRIS 1% SDS 14 mM Mercaptoethanol

2.2.6 Gelfärbetechniken

Die Polyacrylamid-Gele wurden mit Silberfärbung und Serva Blau G250 gefärbt.

Die Silberfärbung wurde nach einem Protokoll durchgeführt, welches eine massenspektrometrische Analyse der Proteine erlaubt (Shevchenko et al., 1996). Bearbeitungsschritte waren das Fixieren für 30 min, das Aktivieren (2 min), das Inkubieren mit Silberreagenz bei 4 °C (40 min) und das Entwickeln. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gel mit Wasser gespült. Bei Erreichen des erwünschten Färbegrades wurde die Reaktion mit 1% Essigsäure gestoppt und das Gel aufbewahrt.

Neben der Standardmethode zur Färbung von Proteinen mit Serva Blau G250 mit Methanol und Essigsäure wurde eine kolloidale Färbelösung mit Aluminiumsulfat verwendet (Kang et al., 2002).

Tabelle 8: PAGE Färbetechniken

Lösung	Inhaltsstoffe
Silberfärbung: Fixierer	45% Methanol 5% Essigsäure
Silberfärbung: Aktivierer	0,02% Natriumthiosulfat
Silberfärbung: Inkubierer	0,1% Silbernitrat
Silberfärbung: Entwickler	0,04% Formaldehyd 2% Natriumcarbonat
$Al_2(SO_4)_3$-G250 Färbelösung	0,02% Serva Blau G250 5% Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat 10% Ethanol 2% ortho-Phosphorsäure
$Al_2(SO_4)_3$-G250 Entfärber	10% Ethanol 2% ortho-Phosphorsäure

2.2.7 Immunologischer Nachweis durch *Western-Blotting*

Die PVDF-Membranen wurden auf die Größe der Gele zurechtgeschnitten und in reinem Methanol aktiviert. Anschließend wurden die Membranen in Transferpuffer äquilibriert.

Die für den *Western-Blot* vorgesehenen SDS- oder *Blue Native*-Gele wurden von den Glasplatten gelöst, die überschüssigen Bereiche entfernt und im Transferpuffer bzw. BN-Inkubierpuffer (siehe 2.2.5) äquilibriert. Sowohl die Methode des *tank-blotting* als auch die des *semi-dry-blotting* wurde angewendet, wobei in beiden Fällen der gleiche Transferpuffer und PVDF-Membran zum Einsatz kam.

Der Transfervorgang bei der Tank-Methode fand mit einer Stromstärke von 250 mA pro Tank für 180 Minuten statt. Bei der *semi-dry*-Methode wurde die

Stromstärke in Abhängigkeit von der Fläche des Gels eingestellt (1 mA pro cm^2) und eine 30-minütige Elektrophorese durchgeführt. Nach Beendigung des Transfers wurden die Membranen mit Ponceau Färbelösung gefärbt um die Qualität des Transfers zu überprüfen und um gegebenenfalls Markerbanden zu kennzeichnen. Nach der Entfärbung mit Wasser wurden die Membranen in Blockierpuffer eine Stunde inkubiert. Die Gele wurden zur Überprüfung der Quantität des Transfers mit G250 Färbelösung gefärbt.

Nach der Blockierung wurden die Membranen in primären Antikörper enthaltenden Blockierpuffer bei RT geschwenkt. Die Konzentration des Antikörpers und die Inkubationszeit waren abhängig vom Antikörper und der gewünschten Sensitivität der Detektion. Im Falle von RuBisCO-Antikörpern betrug die Inkubationszeit maximal eine Stunde, bei GFP-Antikörpern zwei Stunden bis 16 Stunden (über Nacht). Bei längeren Zeiten wurde die Inkubation bei 4 °C durchgeführt. Die Membranen wurden schwenkend mit TBS gewaschen, indem 5 Mal im Abstand von 5 Minuten die Lösung gewechselt wurde. Der sekundäre Antikörper war stets ein HRP-Konjugat und die Inkubationszeit betrug 2 Stunden. Es folgte ein erneutes Waschen gemäss dem o.g. Schema. Anschliessend wurden die Membranen für 5 Min mit der Detektionslösung des „Immun-Star HRP chemiluminescent Detection Kit“ (BioRad) behandelt. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um ein Luminolreagenz mit zusätzlichen Additiven, welche die Lichtausbeute stark erhöhen. Nach dem Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit wurden die Membranen in transparente Dokumentenfolien gelegt. In lichtdichten Kassetten oder in der Dunkelkammer wurden fotografische Filme mit den verpackten Membranen in Kontakt gebracht und durch die Chemilumineszenz (428nm) belichtet. Die Dauer der Exposition konnte von wenigen Sekunden bis zum vollständigen Abklingen der Reaktion betragen.

Die Antikörperlösungen wurden bis zu zwei Mal wiederverwendet und zu diesem Zweck bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9: *Western Blotting*

Lösung	Inhaltsstoffe
Transferpuffer (pH 8,6)	10% Methanol 192 mM Glycin 25 mM TRIS 0,05% SDS
Ponceau Färbelösung	0,2% Ponceau S 20% Trichloressigsäure
TBS	100 mM TRIS-HCl pH 7 150 mM Natriumchlorid
Blockierpuffer	100 mM TRIS-HCl pH 7 150 mM Natriumchlorid 5% fettfreies Milchpulver

2.2.8 Gradientenzentrifugation von Chloroplastenproteinen

Die Auftrennung von nativen Chloroplastenproteinen durch Ultrazentifugation erfolgte mit Glycerin- und Saccharosegradienten. Die Gradienten wurden mit Hilfe einer Mischkammer und einer Peristaltikpumpe hergestellt und mit einer Nadelspitze als Auslauf in ein Zentrifugenröhrchen von niedriger Konzentration zu hoher Konzentration gegossen. Das Volumen eines Gradienten betrug 12 ml zuzüglich bis zu 2 ml Probe. Die Glyceringradienten wurden 8h bei 200.000 xg zentrifugiert, die Saccharosegradienten 2h bei 200.000 xg.

Nach der Zentrifugation wurden die Zentrifugenröhrchen an der Basis mit einer Injektionsnadel durchstochen und der Inhalt während des Auslaufens in 700 µl-Schritten fraktioniert. Die Fraktionen wurden in Dialyseschläuche gefüllt und 4-6 Stunden bei 4 °C mit mehrmaligem Wechsel des Dialysepuffers dialysiert. Das Dialysat wurde lyophilisiert und mit Laemmli-Puffer aufgenommen

Tabelle 10: Glycerin- und Saccharosegradienten

Lösung	Inhaltsstoffe
Glyceringradient	25 mM HEPES-KOH pH 8 5 mM EDTA 10% bzw. 30% Glycerin
Saccharosegradient	25 mM HEPES-KOH pH 8 5 mM EDTA 10% bzw. 30% Saccharose
Dialysepuffer	5 mM Ammoniumbicarbonat pH 8

2.2.9 Immunopräzipitation von EX1-GFP

Die Immunopräzipitation von EX1-GFP wurde mit GFP-Antikörpern aus Maus oder GFP-bindenden Proteinen aus Lama durchgeführt (Rothbauer et al., 2008). Als feste Phase diente Sepharosegranulat, das Protein A enthielt. Die Antikörper aus Maus wurden per Affinität an Protein A angelagert und anschliessend durch Dimethylpimelimidat chemisch kovalent gebunden (*crosslinking*). Pro 1 ml Protein A/Sepharosegranulat wurde 1 mg Antikörper verwendet. Die GFP-Antiprotein-Sepharose aus Lama wurde nicht chemisch vorbehandelt.

Zur kovalenten Bindung der Antikörper an Protein A wurde das Antikörper-Sepharosegemisch mit Natriumboratlösung mehrmals gewaschen und mit 20 mM Dimethylpimelimidat versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei RT wurde der Überstand entfernt und die Reaktion mit Ethanolamin gestoppt. Das Sepharosegranulat wurde mit TBS gewaschen und bei 4 °C gelagert. Die Effizienz der Bindung wurde durch Auftragen von 10 µl Aliquots Sepharosegranulat vor und nach der Reaktion auf ein SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

Die Antikörper-Sepharosesuspension wurde in das Chloroplastenlysat gegeben und schwenkend inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension bei 800

xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 5 Mal mit OGP-Waschlösung gewaschen und in 200 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl Mercaptoethanol wurde die Probe 10 min bei 95 °C erhitzt und anschliessend in einem 2 ml Reaktionsgefäss mit Filterfritte abzentrifugiert, so dass die Probenflüssigkeit von der Sepharose getrennt wurde. Die Probe wurde bei -80 °C gelagert.

Um das Vorhandensein von Co-Immunopräzipitaten nachzuweisen, wurde die Probe auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Zum Zweck der späteren Präparation wurde ein solches Gel lediglich 20-30 min laufen gelassen. Die Proteine werden dabei in einem möglichst kleinem Volumen Gel erhalten und trotzdem eine ausreichende Trennung herbeigeführt. Das Gel wurde mit der Silberfärbemethode angefärbt und bis zur weiteren Verarbeitung (siehe 2.2.10) in 1%iger Essigsäure gelagert.

Tabelle 11: Immunopräzipitation

Lösung	Inhaltsstoffe
Na_3BO_3-Waschlösung	200 mM Natriumborat-NaOH pH 9
Ethanolaminlösung	200 mM Ethanolamin pH 9
TBS	100 mM TRIS-HCl pH 7 150 mM Natriumchlorid
OGP-Waschlösung	100 mM TRIS-HCl pH 7 150 mM Natriumchlorid 0,1% Octyl-2-D-Glucopyranosid

2.2.10 Probenvorbereitung für Massenspektronomie

Zur Identifizierung von Co-Immunopräzipitaten aus den Proben der Immunopräzipitation von EX1-GFP (2.2.9) wurden die präparativen Gele chemisch vorbehandelt um eine massenspektrometrische Analyse zu

ermöglichen. Überschüssige Bereiche der Gele wurden entfernt und die Bereiche mit den enthaltenen Proteinen herauspräpariert. Die Gelstücke wurden in 2ml Reaktionsgefässen mit 2ml 50%igem Acetonitril drei Mal für jeweils 10 Minuten gewaschen. Das 50%ige Acetonitril wurde entfernt, 2 ml Reduzierpuffer dazugegeben und 45 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach Entfernung des Reduzierpuffers wurde 2 ml Alkylierpuffer dazugegeben und bei RT 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Alkylierpuffer entfernt und die Gelstücke erneut 3 Mal mit 50%igem Acetonitril gewaschen. Zum Abschluss wurden die Gelstücke in 1%iger Essigsäure bei 4 °C gelagert.

Der Verdau der Proteine mit Trypsin und die anschliessende Extraktion der Oligopeptide wurde dem Labor der massenspektrometrischen Analyse überlassen.

Tabelle 12: Reduzierung und Alkylierung

Lösung	Inhaltsstoffe
Reduzierpuffer	5 mM Ammoniumbicarbonat pH 8 10 mM Dithiothreitol
Alkylierpuffer	50 mM Ammoniumbicarbonat pH 8 50 mM Iodacetamid

2.2.11 Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie

Die Technik der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie wurde angewendet, um fluoreszierende Strukturen innerhalb der Chloroplasten ausreichend fein aufzulösen. Durch den Vergleich der Fluoreszenzmuster von EX1-GFP mit anderen GFP-Fusionsproteinen (RBCS-GFP, PORB-GFP) und Chlorophyll lassen sich Rückschlüsse auf die Lokalisation von EX1-GFP innerhalb des Chloroplasten ziehen. Um eine bestmögliche Auflösung und störungsfreie Aufnahme zu erreichen wurden Zellen der verschiedenen Transformanten protoplastiert. Durch das Lösen der Zellen aus ihrem Verband und das

Entfernen der Zellwände wurden Abbildungsartefakte wie Überlagerungen und Reflexionen vermieden.

Das Protoplastieren erfolgte durch das Einlegen einiger Blätter, welche zuvor mit einer Klinge mehrmals auf der Blattunterseite geritzt wurden, in eine Petrischale mit 15 ml Protoplastierlösung. Nach einer Inkubation von sechs Stunden im Dunkeln bei RT und unter leichtem Schwenken wurde die Suspension durch ein 100 µm feines Metallsieb gefiltert. Nach dem Sedimentieren der Protoplasten wurde der Überstand entfernt, das Sediment mit Waschlösung gewaschen und vorsichtig auf einen Objektträger pipettiert. Ein Objektglas, mit Knetkügelchen auf den Ecken als Abstandhalter, wurde auf dem Tropfen positioniert. Unter gelegentlicher Zufuhr von Waschlösung wurde das Präparat mikroskopiert. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde im Wellenlängenbereich 650-720 nm detektiert, die Fluoreszenz von GFP bei 450-550 nm.

Tabelle 13: Protoplastierung für die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie

Lösung	Inhaltsstoffe
Protoplastierlösung	500 mM Sorbit 1,2% Cellulase 0,8% Macerozym 8 mM Calciumchlorid 0,4 % Murashige und Skoog Medium-KOH pH 5,8
Protoplasten-Waschlösung	330 mM Sorbit 0,4 % Murashige und Skoog Medium-KOH pH 5,8

2.2.12 Messung des *Nonphotochemical Quenchings*

Um das *nonphotochemical quenching* der Pflanzen zu ermitteln wurde die Fluoreszenz der Photosysteme im Verlauf eines festgelegten Belichtungsprotokolls gemessen. Diese Messung fand mit einem

automatisierten Fluorimeter (FluorCam, PSI) statt, welches Ft, Fm und F_0 einer individuellen Pflanze misst und aus den ermittelten Daten den NPQ nach folgender Formel berechnet.

$$NPQ = \frac{Fm - Fm'}{Fm'} \qquad Fm' = Ft - (Fm - F_0)$$

Fm Quantenausbeute eines Sättigungspulses im dunkeladaptierten Zustand

Fm' Quantenausbeute eines Sättigungspulses im lichtadaptierten Zustand

Ft Fluoreszenz im aktinischen Licht (vor einem Sättigungspuls)

F_0 Minimale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand

Die Pflanzen wurden hierzu 15 Minuten vor Beginn der Messung abgedunkelt, sofern sie nicht aus einer längeren Dunkelphase stammten. Die Ergebnisse der Messungen wurden statistisch ausgewertet.

Es wurden Pflanzen der Linien WT (*Ler*), *flu*, *ex1* und *ex1/flu* verwendet. Die Pflanzen wurden mit drei verschiedenen Lichtprogrammen behandelt: Dauerlicht, 8 Stunden Dunkelheit und 8 Stunden Dunkelheit mit anschliessender Wiederbelichtung von 15 Minuten.

3. Ergebnisse

3.1 Das EXECUTER1-GFP Konstrukt

3.1.1 Fluoreszierende Keimlinge

Ein Vorteil des EX1-GFP Konstrukts ist die experimentell einfache Sichtbarkeit der Anwesenheit von GFP. Um zu Überprüfen, ob das Fusionsprotein zur Fluoreszenz fähig ist, und ob es im pflanzlichen Organismus exprimiert wird, genügt eine einfache Sichtung der Pflanzen unter Blaulicht. Dazu wurden etiolierte Keimlinge mit Blaulicht bestrahlt und unter dem Binokular betrachtet. Die GFP enthaltenden transformierten Keimlinge fluoreszieren sichtbar, während der Wildtyp dunkel bleibt (Abb. 10).

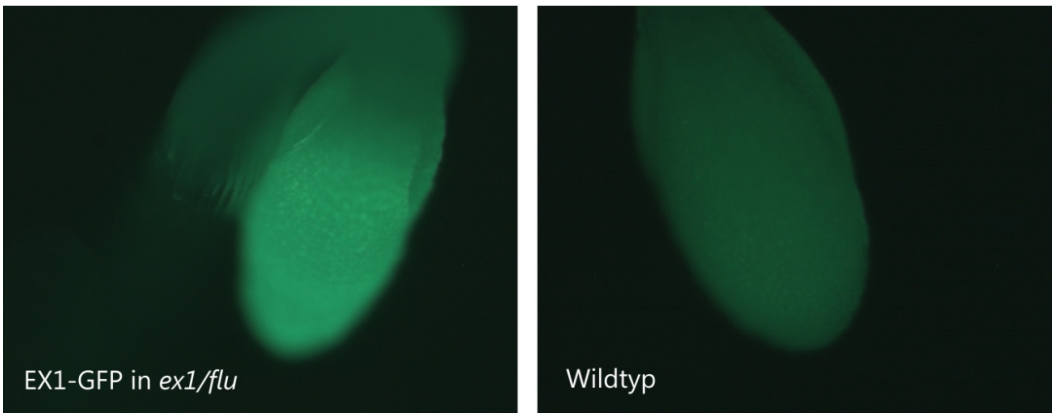

Abbildung 10: GFP-Fluoreszenz in EX1-GFP exprimierenden *ex1/flu* Pflanzen

Zu sehen sind die nicht entfalteten Kotyledonen jeweils eines Keimlings der Linien *EX1-GFP* in *ex1/flu* und Wildtyp.

3.1.2 Komplementierung von *ex1/flu* mit *EX1-GFP*

Zum Nachweis der biologischen Aktivität des EX1-GFP Konstrukts wurden Komplementierungsexperimente durchgeführt. Unter Langtag-Bedingungen bleichen Keimlinge von *flu* aus und sterben. Die Doppelmutante *ex1/flu* hingegen zeigt keine Beeinträchtigung ihrer Entwicklung gegenüber dem

Wildtyp. Die mit *EX1-GFP* transformierte *ex1/flu* Doppelmutante ähnelt *flu* bezüglich ihrer Reaktion auf das Lichtregime, da sie ausbleicht und stirbt. Es ist erkennbar, dass einzelne Individuen der transformierten Linie diesen Phänotyp nicht oder nur reduziert zeigen (Abb. 11).

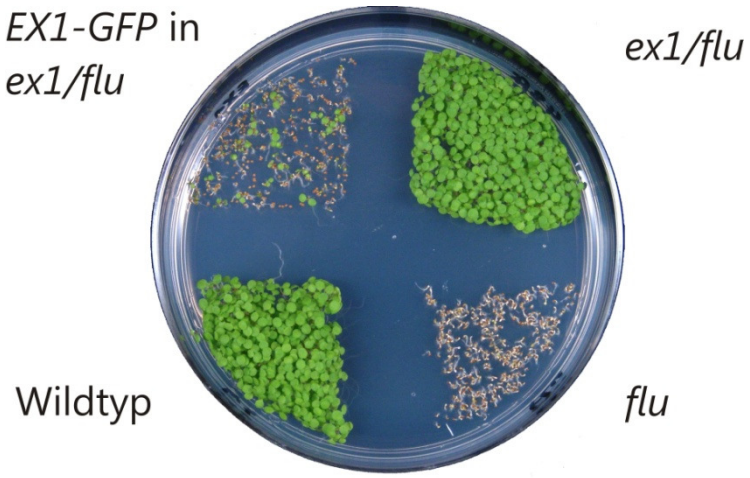

Abbildung 11: Komplementierung von *ex1/flu* mit *EX1-GFP*, Keimlinge

Eine Petrischale mit Nähragar und vier Sektoren mit Keimlingen der Linien Wildtyp, *flu*, *ex1/flu* und *EX1-GFP* in *ex1/flu*

Ähnliches konnte für die verwendeten Linien im adulten Stadium festgestellt werden. Die mit *EX1-GFP* transformierte *ex1/flu*-Linie reagiert genau wie *flu* mit Einstellung des Wachstums und nekrotischen Läsionen auf ein Langtag-Lichtregime. Die Doppelmutante als Revertante des *flu*-Phänotyps zeigt den Phänotyp des Wildtyps (Abb. 12).

Abbildung 12: Komplementierung von *ex1/flu* mit *EX1-GFP*, adulte Pflanze

Die Pflanzen wurden 30 Tage unter Langtag-Bedingungen angezogen. Zu sehen ist von links nach rechts: Wildtyp; *ex1/flu*; *flu*; *EX1-GFP* in *ex1/flu*. Foto: F. Landgraf

3.1.3 Immunologischer Nachweis von EX1-GFP

Mit Hilfe eines GFP-Antikörpers konnte das Vorhandensein von EX1-GFP in der transformierten *ex1/flu* Linie nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente eine RBCS-GFP exprimierende Transformante. Die Grösse des nachgewiesenen Proteins beträgt etwas mehr als 100 kDa, was dem gemeinsamen Molekulargewicht von EX1 (76,5 kDa) und GFP (26,8 kDa) entspricht (Abb. 13). In dieser Phase der Untersuchungen wurden verschiedene Protokolle zum Aufschluss des Pflanzenmaterials erprobt, um eine grösstmögliche Ausbeute von intakten Chloroplasten und EX1-GFP zu erreichen. Das *Blenden* (pürieren) des Pflanzenmaterials mit Pufferlösung in einem Standmixer und anschliessendes Filtrieren mit Miracloth stellte sich als vorteilhafteste Lösung heraus.

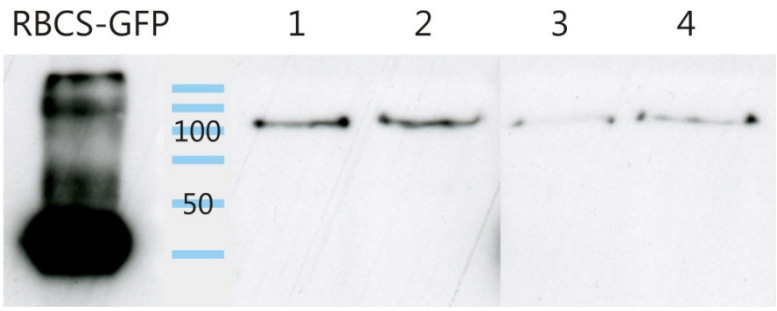

Abbildung 13: Immunologischer Nachweis von EX1-GFP, *Western Blot*

Die Inkubation dieses *Western-Blots* erfolgte mit α-GFP, die Exposition betrug zwei Stunden. Die Positivkontrolle besteht aus 300 ng RBCS-GFP. Die Proben 1-4 wurden mit einer Proteinmenge von 30 µg aufgetragen. Proben 1 und 2 wurden durch *Blenden*, 3 und 4 durch mörsern von Pflanzenmaterial gewonnen. Der Proteinmarker ist schematisch dargestellt, die Banden für 50 und 100 kDa sind bezeichnet.

3.2 Lokalisation von EX1-GFP in der Pflanzenzelle

3.2.1 EX1-GFP in der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie

Bei geeigneter Wellenlänge des Anregungslichts fluoresziert GFP im Grünlichtbereich. Damit kann GFP in der konfokalen *Laserscanning*-Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Die grüne Fluoreszenz des GFP kann gut von der roten Fluoreszenz des Chlorophylls unterschieden werden. Daher wurde während der Mikroskopie beides gleichzeitig betrachtet und ein Additionsbild beider Fluoreszenzen erstellt, das die räumliche Verteilung im direkten Vergleich zeigt. Bei Überlagerung der grünen und roten Signale auf einem Bildpunkt resultiert eine gelbe Farbe. Zusammen mit EX1-GFP wurden noch die Fusionsproteine PORB-GFP und RBCS-GFP betrachtet. Durch Vergleichen der Verteilungsmuster dieser Referenzproteine lässt sich die Lokalisation von EX1-GFP bestimmen.

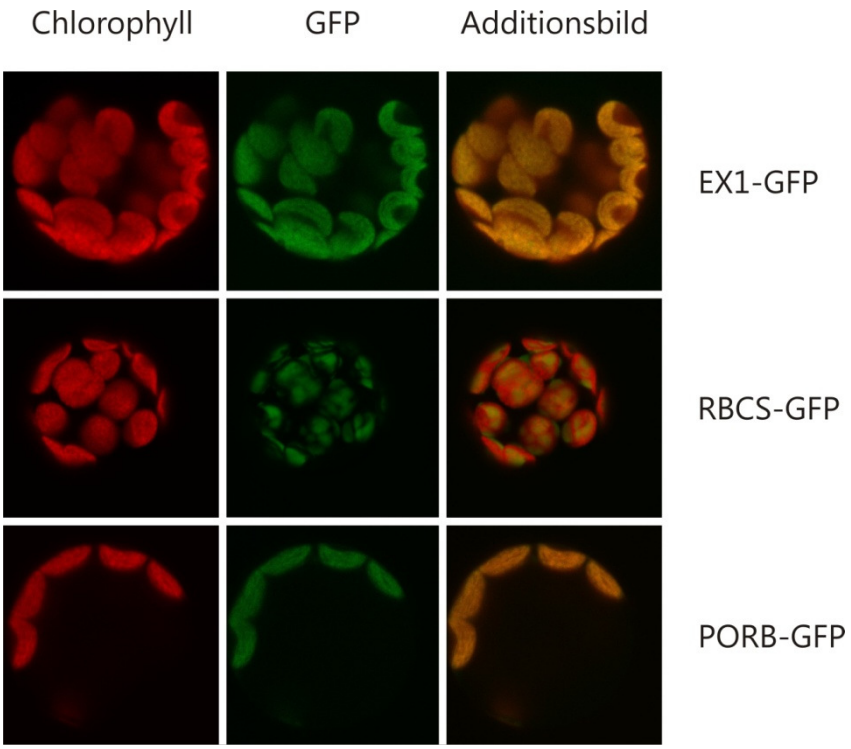

Abbildung 14: Vergleich verschiedener GFP-Konstrukte im CLSM-Bild

Zu sehen ist das konfokale *Laserscanning*-Bild jeweils eines Protoplasten der Linien *EX1-GFP* in *ex1/flu*, *RBCS-GFP* und *PORB-GFP*. Von links nach rechts in den Spektralbereichen rot, grün und einem Bild in dem die Farbwerte addiert wurden.

Die Aufnahmen des CLSM zeigen, dass die Fluoreszenz von PORB-GFP deckungsgleich mit der des Chlorophylls ist. Das Fluoreszenzmuster von RBCS-GFP erscheint als blasenförmige Struktur innerhalb der Chloroplasten und unterscheidet sich von der Fluoreszenz von Chlorophyll. Das Muster von EX1-GFP entspricht der Verteilung des Chlorophylls und unterscheidet sich von dem Muster des RCBS-GFP.

3.2.2 Fraktionierung und immunologischer Nachweis

Mit Hilfe von GFP-Antikörpern und einer geeigneten Methode zur Trennung der Zellkompartimente konnte EX1-GFP innerhalb der Zelle lokalisiert werden. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen charakteristische Proteine der Kompartimente wurde mit *Western-Blots* die Qualität der Trennung überprüft (Abb. 15). Der Nachweis von LHCP diente als Zeiger für Anwesenheit von

Thylakoidmembran in der Probe. Stroma wurde durch RBCL und Lumen durch Plastocyanin angezeigt. Durch Vergleich des Verteilungsmusters von EX1-GFP zu den Markerproteinen ist es möglich die Lokalisation von EX1-GFP innerhalb des Chloroplasten festzustellen.

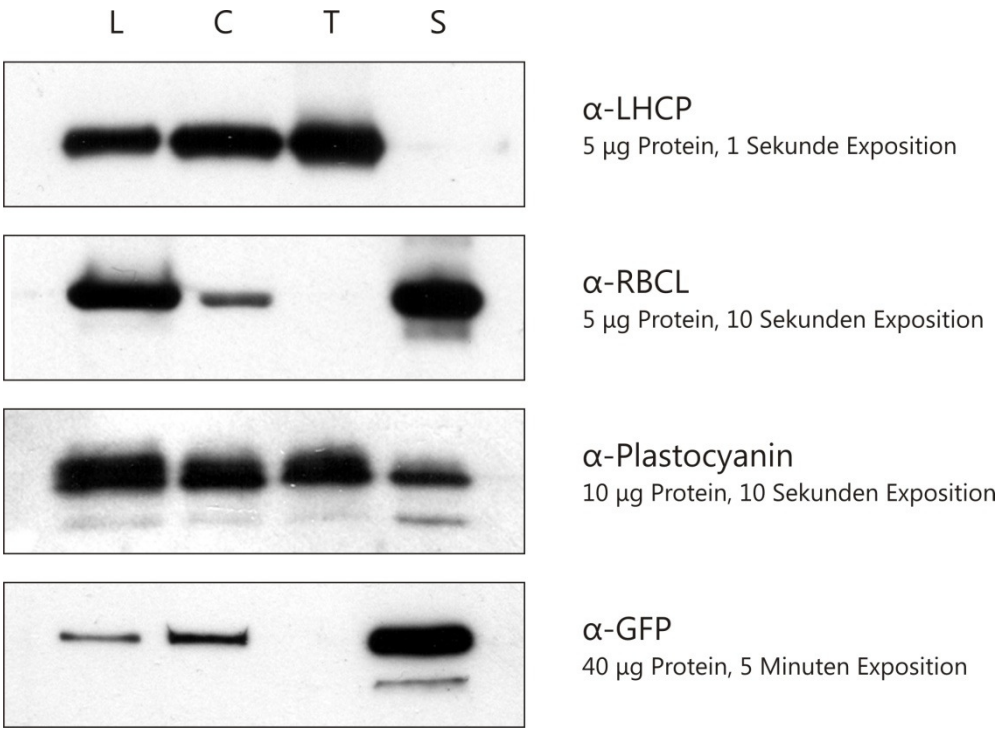

Abbildung 15: Fraktionierung von intakten Chloroplasten, *Western-Blots*

Pflanzen der Linie *EX1-GFP* in *ex1/flu* wurden fraktioniert. Charakteristische Proteine der Fraktionen wurden immunologisch nachgewiesen. L: Gesamtprotein, C: Chloroplast, T: Thylakoide (mit Lumen), S: Stroma

Die Verteilung von EX1-GFP entspricht dem Muster von RBCL. Es ist im Stroma anzutreffen, nicht jedoch in der Membranfraktion. Das integrale Membranprotein LHCP befindet sich erwartungsgemäss ausschliesslich in der Membranfraktion. Plastocyanin, als Markerprotein für Lumen gewählt, ist in geringerer Menge auch im Stoma anzutreffen, was als ein Artefakt der Präparation zu werten ist.

3.3 Nachweis einer komplexen Form von EX1-GFP

3.3.1 *Blue Native*-Gelelektrophorese

Die Extraktion von EX1-GFP in nativer Form bietet die Möglichkeit, die Assoziation der natürlichen Bindungspartner an EX1 zu erhalten und mit diesem zusammen in einem Gel als Bande nachzuweisen. Die resultierende Molekülgrösse wäre um das Molekulargewicht der Bindungspartner grösser als die von EX1-GFP allein. Die Methode der *Blue Native*-Gelelektrophorese wurde angewendet, um eine solche Verschiebung im Molekulargewicht gegenüber dem denaturierenden Verfahren zu überprüfen.

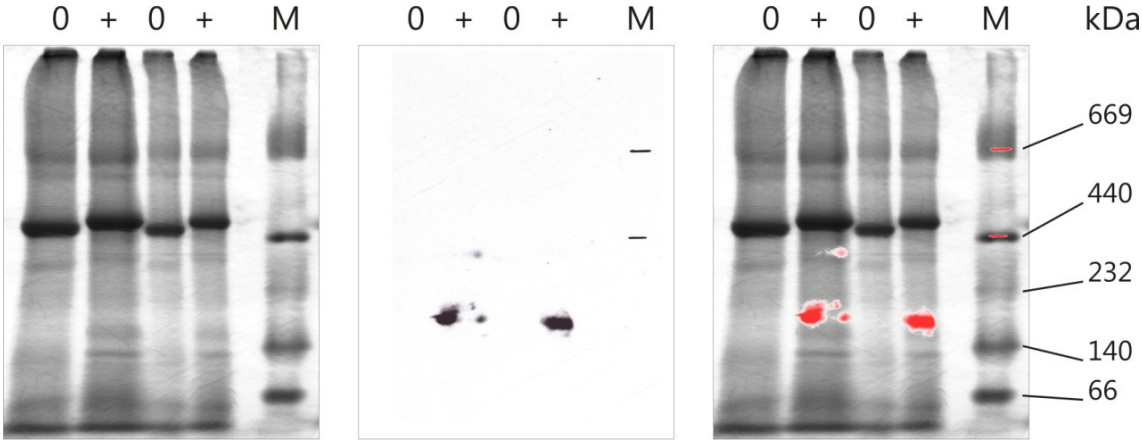

Abbildung 16: *Blue Native*-Gel und dessen *Western-Blot*

Links dargestellt ist ein G250 gefärbtes *Blue-Native*-Gel. Geladen wurden Chloroplastenlysate, die ohne (0) oder mit *Crosslinker* und Proteaseinhibitoren (+) vorbehandelt wurden. In der Mitte ist ein Western-Blot dieses nativen Gels zu sehen, das mit α-GFP detektiert wurde (16 h Exposition). In der rechten Teilabbildung wurden Gel und Blot überlagert und die Bildinhalte des *Blots* rot hervorgehoben.

Der mit α-GFP inkubierte *Western-Blot* eines BN-PAGE Gels zeigt, dass EX1-GFP in einem höheren Molekulargewichtsbereich wandert, als von dem solitären Protein zu erwarten gewesen wäre (Abb. 16). Das apparente Molekulargewicht lässt sich grob mit 170 kDa angeben. Ein zusätzliches

schwaches Signal bei ca. 400 kDa konnte in einer der Proben detektiert werden. Zudem ist EX1-GFP nur in solchen Proben nachweisbar, die mit dem *Crosslinker* DTSP und Proteaseinhibitoren behandelt wurden. Im G250-gefärbtem Gel ist zu erkennen, dass DTSP auch auf andere Proteinkomplexe wirkt, da prominente Banden in ein höheres Molekulargewicht verlagert, und neue Banden sichtbar wurden.

3.3.2 Zentrifugation im Saccharosegradienten

Durch die Zentrifugation des Chloroplastenlysats auf einem Saccharose-gradienten sollte überprüft werden, ob EX1 an grosse Proteinkomplexe der Thylakoidmembran assoziiert ist. Sollte dies der Fall sein, dann befände sich EX1 nach der Zentrifugation in einer Fraktion mit hoher Dichte. Durch Trennung der Fraktionen und anschliessender Immunodetektion mit α-GFP kann das Verhalten von EX1-GFP im Saccharosegradienten beobachtet werden. Der Gradient wurde anhand der grünen Bänderung in sechs Fraktionen (A-F) aufgeteilt. Die Banden A und B bestehen aus den hochmolekularen Komplexen des PSI und des PSII. Bande C enthält LHC-Superkomplexe, Bande E monomere Antennenproteine (D'Amici et al., 2009). Fraktion F enthält freie Pigmente und die siebte Fraktion (G) besteht aus dem Auftragsvolumen der Probe (Abb. 17). Die nach der Zentrifugation darin enthaltenen Proteine stellen somit den Anteil dar, der nicht in den Gradienten eingewandert ist.

In den Fraktionen A-E konnte EX1-GFP nicht nachgewiesen werden. In den Fraktionen F und G erscheint eine Anzahl von Banden, die darauf schliessen lassen, dass EX1-GFP nur sehr wenig in den Gradienten gewandert ist (Abb. 17 rechts).

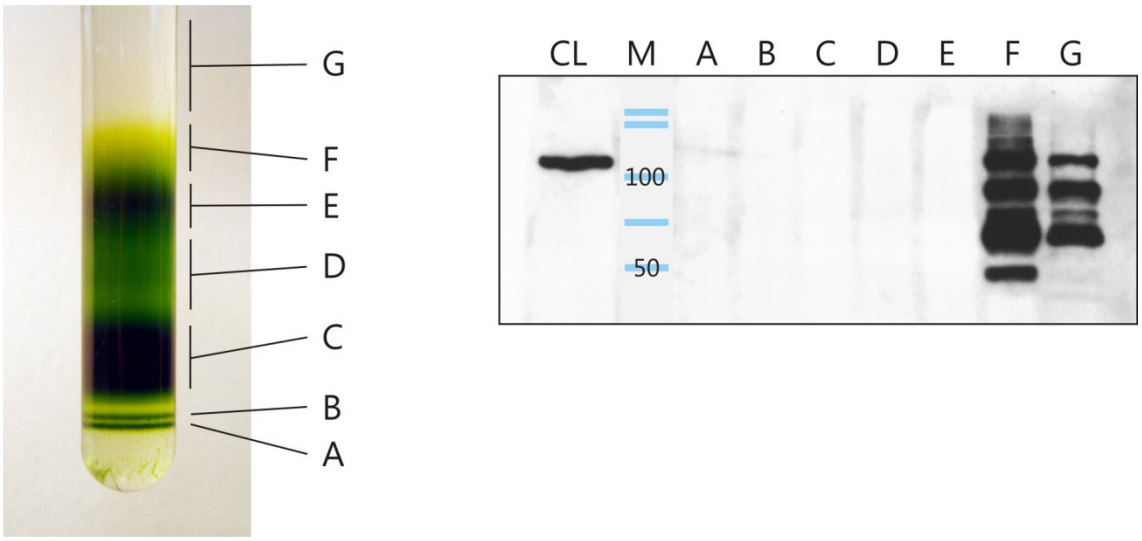

Abbildung 17: Saccharosegradient mit *Western-Blot* der Fraktionen

Auf der linken Seite ist ein zentrifugierter Gradient abgebildet. Die Fraktionen A bis G sind als Zonen markiert. Auf der rechten Seite ist ein *Western-Blot* mit den Einzelnen Fraktionen zu sehen. Inkubiert wurde mit α-GFP, Exposition betrug 2 Stunden. CL ist das Chloroplastenlysat vor Zentrifugation als Kontrolle, M der Marker.

3.3.3 Zentrifugation im Glyceringradienten

Um festzustellen, ob sich EX1-GFP als Teil eines Proteinkomplexes darstellen lässt, wurde das dialysierte Chloroplastenlysat auf einen Glyceringradient geladen und zentrifugiert. Lösliche Proteinkomplexe, die nicht direkt an Membranen gebunden sind, werden in Fraktionen hoher Dichte abzentrifugiert. Der Gradient wurde nach Zentrifugation in Fraktionen getrennt, auf SDS-Gele geladen, geblottet und mit α-GFP und α-RBCS detektiert (Abb. 18). Der RuBisCO-Komplex diente als Grössenvergleich.

Während sich der Grossteil an RBCS-GFP in den Fraktionen 5 bis 9 von 18 befindet, ist EX1-GFP hauptsächlich in den Fraktionen 9 bis 14 zu finden. Die Fraktionen 14 bis 18 stellen das Auftragsvolumen der Probe dar. Aufgrund der Proteinkonzentrationsverteilung liegt nahe, dass der RuBisCO-Komplex den grössten Teil der in der Probe vorhandenen Proteinmasse ausmacht.

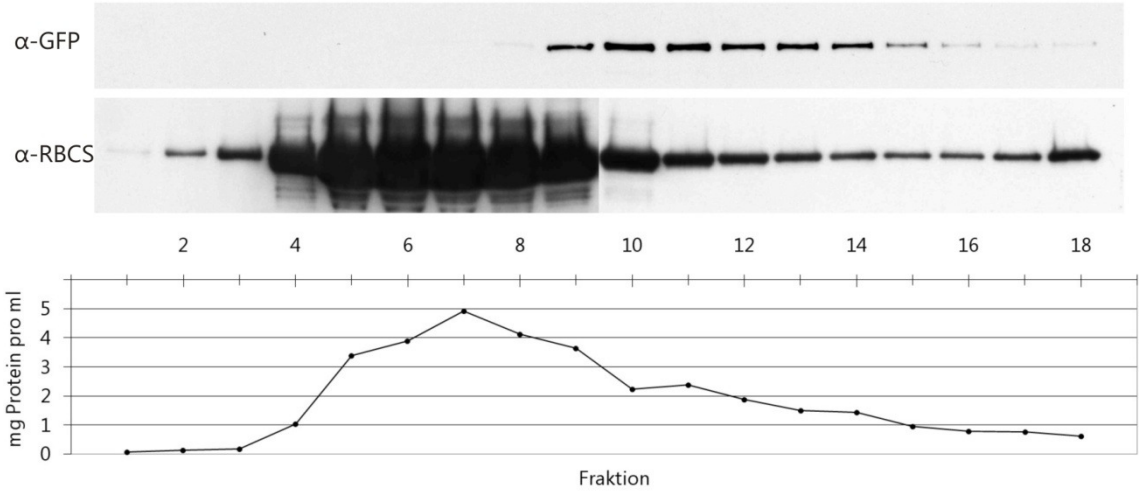

Abbildung 18: *Western-Blots* der Fraktionen des Glyceringradienten

Die Fraktionen des Gradienten wurden von links (Fraktion 1) nach rechts (Fraktion 18) mit abnehmender Konzentration aufgetragen. Von jeder Reihe wurde ein *Western-Blot* mit α-GFP und mit α-RBCS detektiert. Von jeder Fraktion wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Belichtungsdauer α-GFP: 4 Stunden, α-RBCS: 20 Sekunden

Die Anwendung von Glyceringradienten wurde mit dem Ziel wiederholt, bessere Bedingungen für den Erhalt von Proteinkomplexen zu schaffen. Dazu wurden Proteaseinhibitoren in das Chloroplastenlysat gegeben, EDTA statt Magnesiumchlorid in der Extraktionslösung verwendet und die Dauer der Dialyse verkürzt (Abb. 19).

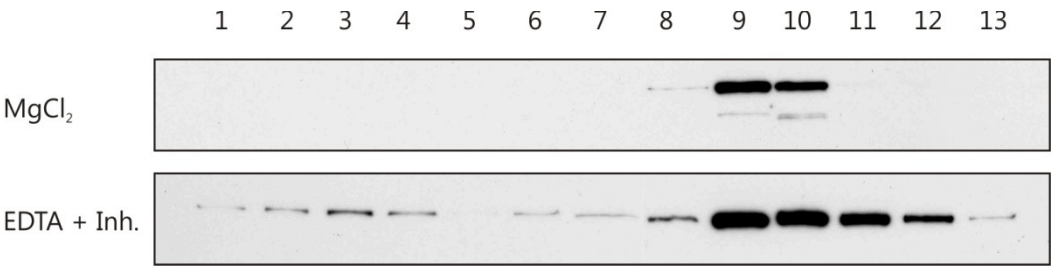

Abbildung 19: Glyceringradienten mit EDTA bzw. $MgCl_2$, *Western Blot*

Die *Western-Blots* wurden mit den Fraktionen zweier Gradienten, welche sich durch die Zugabe von EDTA und Proteaseinhibitoren bzw. Magnesiumchlorid unterscheiden, hergestellt. Die Fraktionen 14 bis 18 wurden verworfen. Exposition: 2 Stunden.

Nach der Verbesserung der Extraktionsmethode konnte ein zuvor nicht sichtbarer Nachweis von EX1-GFP in den dichteren Fraktionen des Gradienten erfolgen. Das neu auftretende EX1-GFP Signal befindet sich vor allem in den Fraktionen 2 bis 4 (von 18).

Bei dem in den Fraktionen 2 bis 4 auftretenden Signal könnte es sich um einen Proteinkomplex handeln, der EX1-GFP enthält. Um zu testen, ob der Komplex stabil ist oder es sich um eine unspezifische Aggregation handelt, wurden in einem weiteren Experiment die Fraktionen 1 bis 5 vereinigt, erneut dialysiert und auf einen weiteren Gradienten geladen. Im Fall einer unspezifischen Aggregation sollte es zu einer zumindest teilweisen Dissoziation der Proteine kommen, so dass EX1-GFP auch in Fraktionen geringerer Dichte nachweisbar wäre.

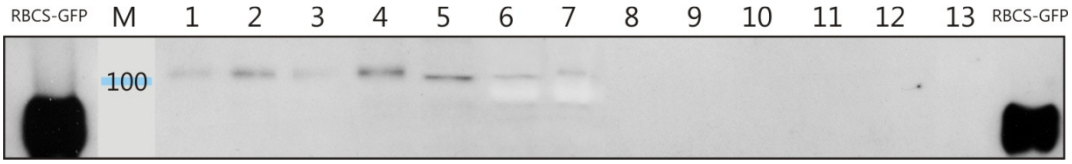

Abbildung 20: Glyceringradient der Fraktionen 2 bis 5, *Western Blot*

Die Fraktionen 2 bis 5 eines Glyceringradienten wurden vereinigt, erneut auf einen Gradienten geladen, zentrifugiert, fraktioniert und EX1-GFP immunologisch nachgewiesen. Exposition: 16 Stunden.

Nach der Ultrazentrifugation, dem Fraktionieren und dem immunologischen Nachweis mit α-GFP stellte sich heraus, dass das Signal wiederum vornehmlich in den dichteren Fraktionen zu finden ist (Abb. 20). Auch in den Fraktionen 6 und 7 ist ein schwaches Signal nachweisbar, jedoch keines in den Fraktionen 9 bis 11 wie im Ausgangsmaterial.

3.4 Untersuchung des EX1-GFP im Proteinkomplex

3.4.1 Immunopräzipitation von EX1-GFP

Durch Ausnutzung des GFP-Tags konnte mithilfe von an Protein A-Sepharose gebundenen GFP-Antikörpern EX1-GFP aus dem Chloroplastenlysat isoliert werden. Das Ziel bestand darin, Bindungspartner des EX1 ebenfalls zu isolieren und so der massenspektrometrischen Identifikation zugänglich zu machen.

Unter Verwendung chemisch gekoppelter GFP-Antikörper aus Maus konnte EX1-GFP erfolgreich präzipitiert werden (Abb. 21). Die hohe Anzahl der im Eluat auftretenden Proteinspezies stellten jedoch die Spezifität dieser Methode in Frage.

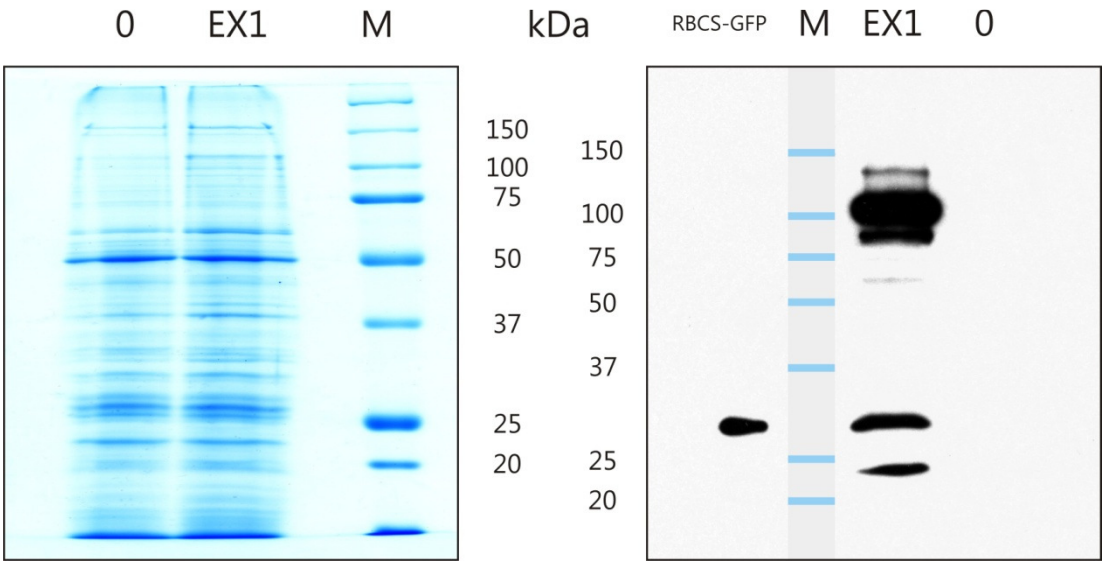

Abbildung 21: Eluat der Immunopräzipitation mit GFP-Antikörpern

Auf dem SDS-PAGE Gel (links) wurden die Eluate der Negativkontolle aus *ex1/flu* (0) und der Probe aus *EX1-GFP* in *ex1/flu* (EX1) aufgetrennt. Im mit α-GFP detektiertem Blot (rechts) ist das GFP-Signal in der Probe aus *EX1-GFP* in *ex1/flu* zu sehen. Die Positivkontrolle wurde mit RBCS-GFP durchgeführt. Exposition: 4 Stunden.

Um das Mengenverhältnis von EX1-GFP Komplex zu störenden Proteinen und monomeren EX1-GFP zu verbessern, wurde der Versuch unternommen, den Komplex aus den dichten Fraktionen des Glyceringradienten zu präzipitieren

(siehe Abb. 19 „EDTA + Inh.“). Obgleich die komplexe Form im *Western-Blot* der Fraktionen nachweisbar war, konnte sie im Eluat nicht detektiert werden. Die Immunopräzipitation wurde letztendlich direkt aus dem vorbehandelten Chloroplastenlysat durchgeführt.

Zusätzlich zu den Massnahmen zur Stabilisierung der Proteinkomplexe durch Zugabe von Proteaseinhibitoren und EDTA wurde dem Lysat der *Crosslinker* DTSP zugegeben. Durch die kovalente Bindung der Proteine untereinander wird der EX1-GFP Komplex zusätzlich stabilisiert und konserviert. Dies ist bei den Waschschritten nach der Inkubation mit der Antiprotein-Sepharose von Vorteil, da das Verhältnis von verunreinigenden Proteinen zu den Proteinen im EX1-Komplex zu Gunsten der kovalent gebundenen Proteine verschoben und der Hintergrund an unspezifischen Proteinen gesenkt wird.

Durch einen einfachen Test an Chloroplastenlysat konnte die Wirksamkeit von DSTP nachgewiesen werden. Die Reversibilität der kovalenten Bindung duch Zugabe von Mercaptoethanol ist vollständig (Abb. 22).

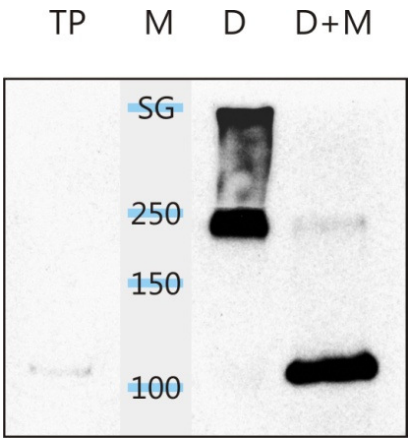

Abbildung 22: Test des *Crosslinkers* DTSP, *Western Blot*

Durch die Zugabe von DTSP wird EX1-GFP in seinem Proteinkomplex kovalent gebunden (D). Durch anschliessende Zugabe von Mercaptoethanol wird die Bindung aufgehoben (D+M). TP: Totales Proteinextrakt, M: Marker, SG: Oberkante des Sammelgels bzw. Boden der Probentasche

Um den Hintergrund von unspezifisch gebundenen Proteinen noch weiter zu verringern, wurde ein spezielles GFP-Antiprotein verwendet, das aus einem Lama-Antikörper gegen GFP entwickelt wurde. Dieses besteht aus nur einem Peptid und ist mit 13 kDa zudem kleiner als α-GFP aus Maus (50 und 25 kDa). Die Kontaktfläche für unspezifische Bindungen wird so stark verkleinert (Rothbauer et al., 2008).

Das durch Inhibitoren und *Crosslinker* stabilisierte Chloroplastenlysat wurde mit der Antiprotein-Sepharose vereint, inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert. Die Probe wurde in Laemmli-Puffer aufgenommen und Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Probe wurde auf ein präparatives Gel geladen, gefahren und mit der Silbermethode gefärbt. Es wurden deutliche Unterschiede in den Bandenmustern der Probe und der Negativkontrolle festgestellt (Abb. 23). Die Probe zeigt einige zusätzliche Banden, darunter eine sehr deutliche bei ca. 100 kDa, was dem Molekulargewicht von EX1-GFP entspricht.

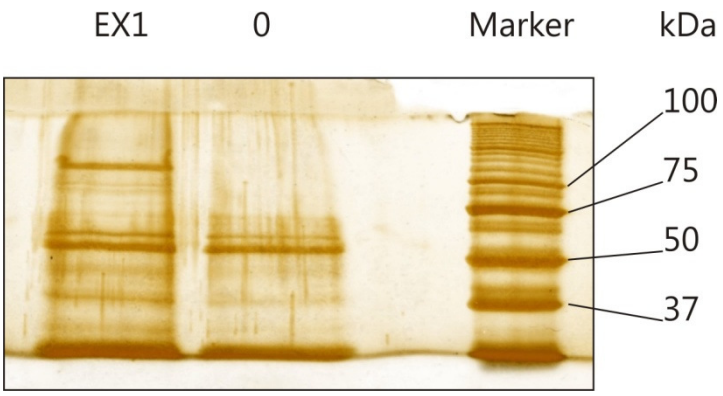

Abbildung 23: Präparatives SDS-Gel, silbergefärbt

Die Eluate der Co-Immunopräzipitation wurden auf ein präparatives SDS-Gel geladen, gefahren und mit der Silberfärbemethode gefärbt. In der linken Tasche befand sich das Eluat von *EX1-GFP* in *ex1/flu*, in der rechten Tasche das der Kontrolllinie *ex1/flu*.

3.4.2 Identifizierung von Co-Immunopräzipitaten

Zur Überprüfung der erfolgreichen Präzipitation von EX1-GFP wurde das Eluat durch *Western-Blotting* auf einer Membran fixiert und mit α-GFP inkubiert. Das detektierte GFP-Signal ist im Eluat deutlich zu sehen und hat im Vergleich zum Chloroplastenlysat stark an Intensität zugenommen (Abb. 24).

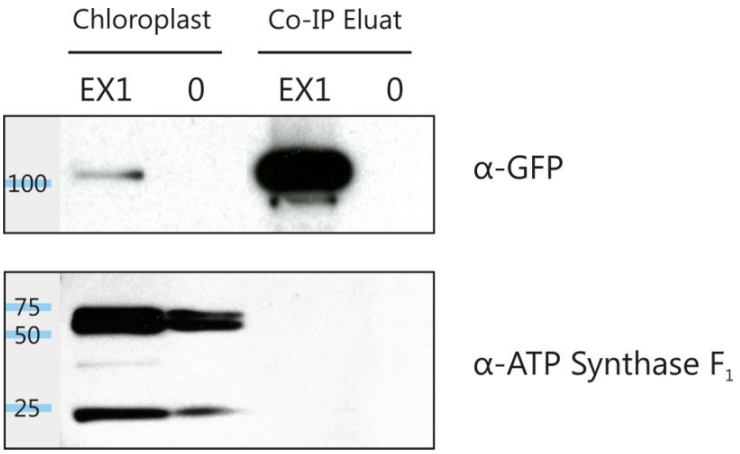

Abbildung 24: Kontrolle der Co-Immunopräzipitation

Die Eluate der Co-Immunopräzipitation wurden geblottet und mit α-GFP und einem Antikörper gegen den ATP-Synthase F_1-Komplex inkubiert. Die α- und β-Untereinheiten des F_1-Komplexes erscheinen als Doppelbande zwischen 50 und 75 kDa. Die δ-Untereinheit befindet sich bei etwa 25 kDa. Die γ-Untereinheit ist nur als sehr schwaches Signal zu sehen.

Die Gelstücke wurden nach chemischer und enzymatischer Vorbehandlung massenspektrometrisch analysiert und die gefundenen tryptischen Fragmente den jeweiligen Proteinen von *A. thaliana* zugeordnet. In der Tabelle Nr 14 aufgeführt sind ausschliesslich Proteine, die unter gleichen Bedingungen mehrmals in biologisch verschiedenen Proben von EX1-GFP in *ex1/flu* und nicht in der jeweiligen Kontrolle *ex1/flu* aufgetreten sind. Es ergeben sich Unterschiede in den Resultaten je nachdem, ob die Pflanzen vor der Extraktion 15 Minuten lang belichtet wurden oder nicht.

Tabelle 14: Resultate der Massenspektronomie

Protein		Belichtung	
		keine	15 min
EX1	Executer1	vorhanden	vorhanden
ATPγ	γ-Untereinheit der ATP-Synthase	vorhanden	vorhanden
FtsH5	Variegated1	vorhanden	fehlt
FtsH2	Variegated2	vorhanden	fehlt
PSbD	D2-Untereinheit des PSII	fehlt	vorhanden
PSbB	CP47-Untereinheit des PSII	fehlt	vorhanden
PSbC	CP43-Untereinheit des PSII	fehlt	teilw. vorh.
PTAC16	Plastiden Transkriptionsfaktor 16	vorhanden	teilw. vorh.

Die Ergebnisse aus der massenspektrometrischen Analyse wurden per *Western-Blotting* der Eluate mit den entsprechenden Antikörpern überprüft. Um gleizeitig die Spezifität der Immunopräzipitation zu testen, wurde ein Antikörper gegen den F_1-Komplex der ATP-Synthase eingesetzt. Die α-, β- und δ-Untereinheiten der ATP-Synthase sind im Eluat nicht mehr nachzuweisen, was unter der Bedingung der hohen Spezifität zu erwarten war (Abb. 25). Die γ-Untereinheit konnte mit dem Antikörper gegen den gesamten F_1-Komplex nicht effizient genug nachgewiesen werden, um eine eindeutige Aussage über ihr Auftreten im Eluat zu machen. Ebenso konnte die ε-Untereinheit in keiner Probe nachgewiesen werden. Diese Unsicherheit wurde mit dem Einsatz eines Antikörpers speziell gegen die γ-Untereinheit behoben.

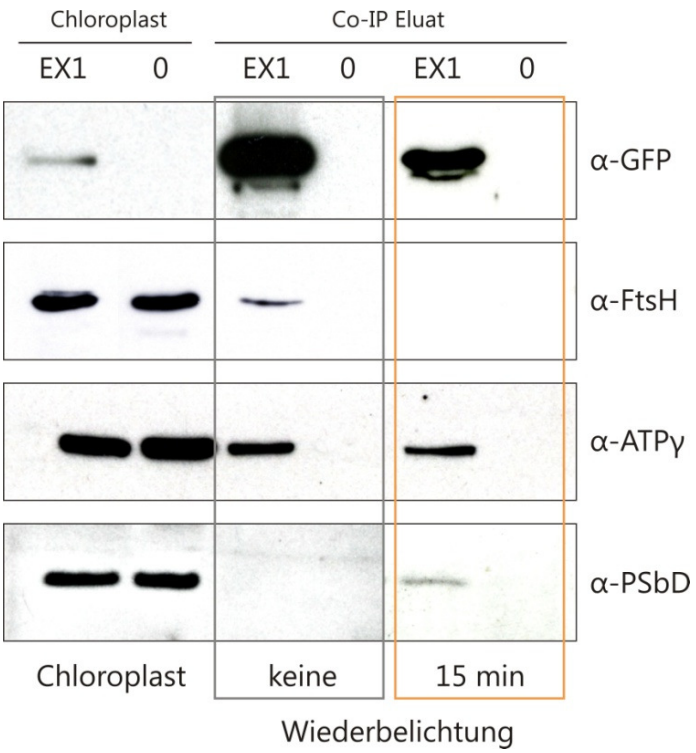

Abbildung 25: *Western-Blots* der Co-Immunopräzipitation

Die Eluate der Co-Immunopräzipitation der Proben mit *EX1-GFP* in *ex1/flu* (EX1) und *ex1/flu* als Negativkontrolle (0) wurden geblottet und mit verschiedenen Antikörpern detektiert.

Es ergab sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Proteine, je nach Behandlung mit oder ohne Wiederbelichtung. Das GFP-Signal trat, als Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Immunopräzipitation, in beiden Probentypen auf. Ebenso die γ-Untereinheit der ATP-Synthase. Das FtsH-Protein konnte nur in der Probe der unbelichteten Pflanzen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu steht PSbD, welches nur in der wiederbelichteten Probe nachgewiesen wurde.

3.5 Fluoreszenzmessungen

Aus der Chlorophyll-Fluoreszenz bei einer bestimmten Messungsprozedur mit Rotlicht und sättigenden Lichtpulsen berechnet sich die Energiemenge, welche die Photosysteme durch *nonphotochemical exciton quenching* (NPQ), d.h. als Wärme, abgeben. Unter zunehmendem physiologischen Stress geben die Photosysteme eine steigende Energiemenge als Wärme ab, so dass das NPQ ein direkter Messwert des Stresszustands ist.
Das NPQ wurde mit einer Reihe von Fluoreszenzmessungen ermittelt. Von jeder Pflanzenlinie und jedem Zeitpunkt wurden mindestens 16 Individuen gemessen und die Werte gemittelt (Abb. 26). Die Differenzen der NPQ-Werte zwischen den Linien wurden jeweils paarweise mit einem t-Test auf ihre Signifikanz hin geprüft.

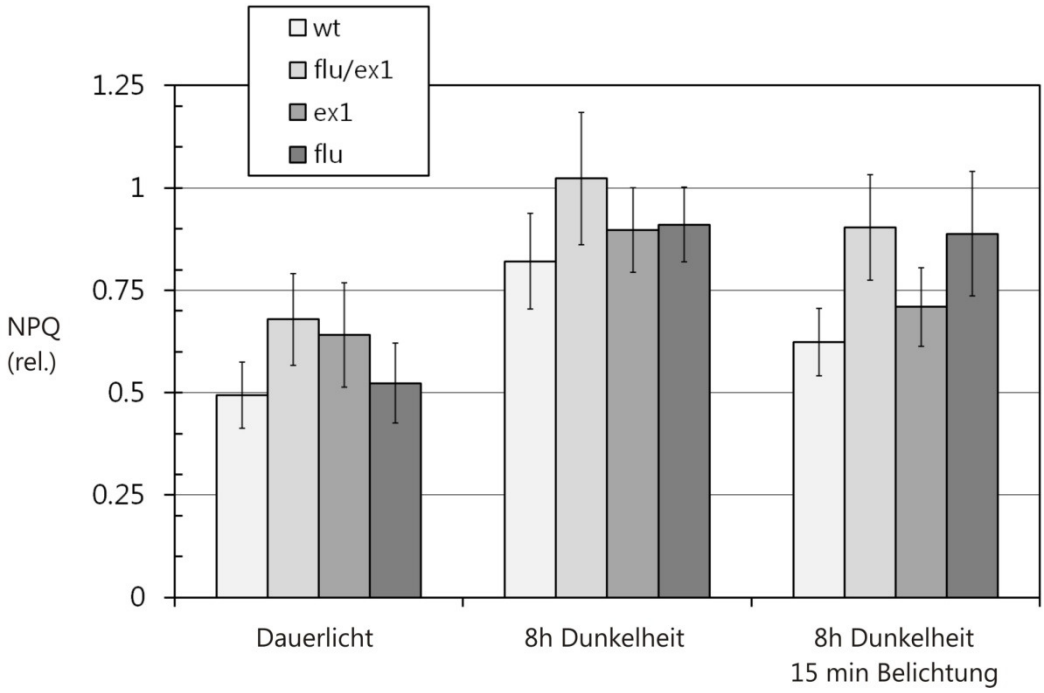

Abbildung 26: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen

Das NPQ der Linien WT, *ex1/flu*, *ex1* und *flu* wurde mit einem Fluorimeter gemessen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der jeweiligen Messreihe.

Es ergeben sich unterschiedliche Reaktionen der Linien hinsichtlich ihres NPQ auf die Belichtungsprozeduren. Wildtyp und *flu* haben im Dauerlicht einen ähnlichen NPQ von 0,5, während *flu/ex1* und *ex1* auf etwa 0,65 kommen. Nach achtstündiger Dunkelphase ist das NPQ bei allen Linien deutlich erhöht. Der Wildtyp liegt bei 0,82, die beiden Einfachmutanten sind etwa gleichauf bei 0,9 während die Doppelmutante auf einen Wert von über 1 kommt. Die Wiederbelichtung bewirkt bei allen Linien ausser *flu* eine Erniedrigung des NPQ. In der folgenden Tabelle sind die Wahrscheinlichkeitswerte einer Übereinstimmung in einem Zweistichproben-t-Test für alle Zweierkombinationen zu einer Belichtungsprozedur aufgeführt. Die Signifikanzschwelle von 5% (p=0,05) wurde als Grenze zur Unterscheidung von ähnlichen und verschiedenen Reaktionen auf das experimentelle Milieu festgelegt.

Tabelle 15: NPQ-Werte im t-Test

	Dauerlicht	8h Dunkelheit	8h D. → 15 min Licht
WT : *ex1/flu*	verschieden ($p=3{,}4\times10^{-6}$)	verschieden ($p=2{,}6\times10^{-7}$)	verschieden ($p=6{,}2\times10^{-9}$)
WT : *ex1*	verschieden ($p=8{,}1\times10^{-5}$)	ähnlich (p=0,067)	verschieden ($p=1{,}7\times10^{-3}$)
WT : *flu*	ähnlich (p=0,25)	verschieden ($p=1{,}6\times10^{-3}$)	verschieden ($p=4{,}3\times10^{-8}$)
ex1/flu : *ex1*	ähnlich (p=0,39)	verschieden ($p=9{,}6\times10^{-4}$)	verschieden ($p=5{,}8\times10^{-6}$)
ex1/flu : *flu*	verschieden ($p=1{,}1\times10^{-4}$)	verschieden ($p=2{,}5\times10^{-3}$)	ähnlich (p=0,74)
ex1 : *flu*	verschieden ($p=2{,}0\times10^{-3}$)	ähnlich (p=0,64)	verschieden ($p=3{,}9\times10^{-5}$)

4. Diskussion

4.1 Eigenschaften von EXECUTER1

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass EX1 ein kerncodiertes, im Plastiden lokalisiertes Protein ist. Es hat eine Masse von 71,6 kDa und eine Länge von 638 Aminosäuren (76,5 kDa, 684 Aminosäuren mit Transitpeptid). Die Transformation des Konstrukts *EX1-GFP* in *ex1/flu* konnte den Phänotyp dieser Doppelmutante komplementieren (3.1.2). Der konditionale *flu*-Phänotyp von Keimlingen und adulten Pflanzen wurde wiederhergestellt. Die Ergebnisse der Komplementierungsexperimente zeigten, dass EX1-GFP in *A. thaliana* wie EX1 funktioniert. Das am C-Terminus fusionierte GFP verhindert weder den Import in den Chloroplast noch die Aktivität des EX1-Proteins. Die natürliche Funktionalität des Fusionsproteins war eine notwendige Voraussetzung aller nachfolgenden Experimente.

Durch die Expression von EX1-GFP mit einem 35S-Promoter könnte es zu einer Überproduktion von EX1-GFP in der Zelle kommen. Erste Versuche das EX1-GFP per Immunodetektion nachzuweisen zeigten jedoch, dass das Protein lediglich in einer ungewöhnlich geringen Konzentration vorhanden ist. Im Vergleich dazu wird das RBCS-GFP, ebenfalls durch einen 35S-Promoter, um ein vielhundertfaches stärker exprimiert (3.1.3). Da sich der 35S-Promoter der Regulation der Genaktivierung entzieht und eine konstitutive Exprimierung bewirkt, muss die Begrenzung auf die sehr niedrige Menge an EX1 an einer strikten Regulation auf mRNS- oder auf Proteinebene liegen.

Aus den Aufnahmen des konfokalen *Laserscanning*-Mikroskops lässt sich ableiten, dass EX1-GFP mit den Thylakoidmembranen assoziiert ist. Die Fluoreszenz des Fusionsproteins ist mit dem membranständigen PORB-GFP und Chlorophyll deckungsgleich (3.2.1). Die Analyse der separierten Chloroplastenfraktionen ergab zudem, dass sich EX1-GFP auf der stromatären Seite der Thylakoide befindet und sich bei der Präparation mit EDTA sehr leicht von den Membranen löst (3.2.2). Angesichts der Verteilung von Plastocyanin

und RBCL in den Fraktionen wird deutlich, dass während der Extraktion Lumenproteine in die Stromafraktion gelangen können, jedoch nicht umgekehrt. Damit kann als ausgeschlossen gelten, dass sich EX1-GFP im Lumen befindet. Es ist ebenfalls nicht in die Thylakoidmembran integriert, sondern befindet sich nach der Fraktionierung im Stroma. EX1 könnte über ein anderes Protein mit der Thylakoidmembran assoziiert vorliegen, von dem es unter Einsatz von EDTA oder Detergenz in das Stroma hinein freigesetzt wird.

Die Primärstruktur von EX1 lässt keine Verwandtschaft mit anderen Proteinfamilien erkennen. Es besitzt eine Chloroplasten-Importsequenz, eine UVR-Domänen ähnliche Sequenz (25 Aminosäuren) und eine 20 Aminosäuren lange *coiled coil*-Domäne. Die Homologie von EX1 mit der UVR-Sequenz ist hoch genug, um durch eine Analyse mithilfe der statistischen Modellierung der Pfam-A (*protein family database*) als solche vorhergesagt zu werden (Finn et al., 2009). Jedoch wird EX1 weder in der PROSITE- (http://www.expasy.org/tools/scanprosite/) noch in der Pfam-Datenbank (http://pfam.sanger.ac.uk/) als UVR-Domäne tragendes Protein aufgeführt. Die *coiled coil*-Domäne könnte zur Interaktion mit anderen Proteinen dienen. Darüber hinaus lassen sich keine Sequenzen erkennen, die auf eine Funktion des Proteins hindeuten.

Sequenzvergleiche mit anderen pflanzlichen Organismen lassen den Schluss zu, dass EXECUTER1 seinen evolutionären Ursprung in der Entwicklunglinie der aeroben Photosynthese hat. Die Aufspaltung in EX1 und das nah verwandte EX2 könnte mit der Entwicklung der höheren Pflanzen zusammenfallen. Beide Versionen des Proteins finden sich in höheren Pflanzen, jedoch nur eine in *Physcomitrella* und einzelligen Algen. Dies fügt sich in das Bild der durch oxidativen Stress aktivierten Signaltransduktion, die mit der Entwicklung der aeroben Photosynthese an Notwendigkeit gewonnen haben muss.

4.2 EXECUTER1 ist Teil eines Proteinkomplexes

Die Ergebnisse der Gradientenzentrifugation und Blue-Native Gelelektrophorese gaben einen Hinweis darauf, dass EXECUTER1 *in vivo* als Teil eines Proteinkomplexes vorliegt. Das mit BN-PAGE näherungsweise ermittelte Molekulargewicht beträgt 170 kDa. Auch das Vorhandensein eines 400 kDa grossen Proteinkomplexes konnte gezeigt werden, allerdings tritt dieser nur in geringen Mengen auf (3.3.1). Das Ergebnis des BN-PAGE kann jedoch nicht ohne weiteres für sich sprechen, da die Detektion nur im Beisein des *Crosslinkers* DTSP im Chloroplastenlysat erfolgreich war. Dass es sich hierbei lediglich um ein Artefakt durch unspezifische Aggregation verschiedener Proteine mit EXECUTER1 handelt, ist angesichts der relativ scharf abgegrenzten Banden im BN-Page Gel wenig wahrscheinlich. Das Fehlen der Detektion in den Proben ohne DTSP und Proteaseinhibitoren muss auf die Wirkung von Proteasen oder die zu schwachen Bindungskräfte im EX1-Komplex zurückzuführen sein. Durch die BN-PAGE wurde keine offensichtliche Assoziation des EX1-GFP an einen Teil des Photosyntheseapparates beobachtet. Eine eingehendere Prüfung dieser Frage wurde mit einem Saccharosegradienten unternommen.

Im Saccharosegradienten wurde EX1-GFP lediglich in die oberste Schicht hinein sedimentiert (3.3.2). Dies lässt nur den Schluss zu, dass EX1-GFP nicht an einen hochmolekularen Komplex der membranständigen Photosysteme assoziiert ist.

Um die Existenz des EX1-Komplexes nachzuweisen wurden Glyceringradienten angefertigt. In diesen Gradienten war EX1-GFP in zwei Populationen anwesend. Die Form mit kleinerem Molekulargewicht war in den Glyceringradienten stets anwesend, so dass sie die Form mit den geringsten Ansprüchen an den methodischen Aufwand darstellt. Hierbei könnte es sich um das monomere Protein handeln (Abb. 18). Verbesserungen an der Methode haben die Detektion einer hochmolekularen Form ermöglicht, wobei es sich um einen Proteinkomplex handeln muss (Abb. 19). Die Migration im Gradienten lässt darauf schliessen, dass die Grösse des EX1-Komplexes diejenige des RuBisCO-Komplexes übertrifft.

Die methodischen Verbesserungen führten nicht dazu, dass die monomere Form durch die komplexe verdrängt wurde – sie blieb im Masseanteil dominierend. Eine Erklärung dafür wäre die konstitutive Expression des Fusionsproteins durch den 35S-Promoter. Trotz der relativ niedrigen Expression (3.1.3) könnte ein Überschuss an EX1-GFP im Vergleich zum Wildtyp bestehen. Durch das stöchiometrische Ungleichgewicht zu seinen Bindungspartnern wäre stets ein Teil der EX1-GFP Proteine nicht im Komplex gebunden und läge daher frei vor.

Die Stabilität des Komplexes wurde getestet, indem nur Fraktionen, welche die komplexe Form enthalten, dialysiert und erneut auf einen Glyceringradienten geladen wurden. Sollte es sich bei dem Komplex um eine unspezifische Aggregation an das EX1-GFP handeln, die im Gleichgewicht zu der monomeren Form steht, käme es zur spontanen Dissoziation und erneutem Auftreten der monomeren Form im zweiten Gradienten. Dies war nicht der Fall: der Komplex blieb stabil und wanderte in den dichten Bereich des Gradienten (Abb. 20). Aufgrund der Tatsache, dass bei der zweiten Beschickung des Gradienten das Auftragsvolumen ebenfalls geringe Mengen Glycerin enthalten hat, ist der Komplex etwas weniger weit sedimentiert als im ersten Durchlauf. Daher ist das GFP-Signal auch in den Fraktionen 6 und 7 zu sehen. Umgekehrt kam es nicht zu einer spontanen Komplexbildung der monomeren Form. Die Fraktionen niedriger Dichte zeigten nach dem zweiten Durchlauf das GFP-Signal in den gleichen Fraktionen wie im ersten. Auch der Nachweis von zwei unterscheidbaren Populationen des EX1-GFP im Gradienten unterstützt die Annahme, dass es sich um einen nativen Komplex handelt. Eine unspezifische Aggregation hätte zur Bildung von Komplexen unterschiedlichster Grösse geführt, was zu einem, in allen Fraktionen des Gradienten gleichförmigen, Nachweis von GFP hätte führen müssen.

Der erfolgreiche Nachweis und die Methode zur Präparation des EX1-Komplexes *in vivo* machten es möglich, die Interaktionspartner zu isolieren und zu identifizieren.

4.3 Die Interaktionspartner von EXECUTER1

4.3.1 EX1 im *Yeast-Two-Hybrid Assay*

In einer parallelen Arbeit mit einem *Yeast-Two-Hybrid Assay* wurde durch F. Landgraf eine Reihe von potentiellen Bindungspartnern von EX1 gefunden. Unter den Proteinen der erfolgreichen Interaktionen in Hefe (Anzahl: 30) sind überproportional viele plastidäre Proteine (16), von denen ein Grossteil membranassoziierte Proteine sind (11) (siehe 5.1). Die Trefferliste ist aufgrund der immanenten Fehlerhaftigkeit der Methode mit 30 Einträgen zu lang, um daraus eigenständige Erkenntnisse abzuleiten. Verglichen mit den Ergebnissen der Interaktionsstudie *in vivo* ergibt sich jedoch ein Zusammenhang: unter den putativen Interaktionspartnern findet sich die γ-Untereinheit der ATP-Synthase (ATPγ). Eine darauffolgende Durchführung des Experiments mit gezielt in den „prey"-Vektor klonierter vollständiger cDNS der γ-Untereinheit bestätigte deren Interaktion mit EX1 im Y2H-System.

4.3.2 Die Interaktionspartner von EX1 *in vivo*

Die Auswertung der massenspektrometrischen Analysen ergab, dass EX1-GFP zusammen mit einer kleinen Anzahl anderer Proteine präzipitiert wird. Neben der γ-Untereinheit der ATP-Synthase und den beiden Metalloproteasen FtsH2 und FtsH5 befinden sich Teile des Photosystems II unter den gefundenen Interaktionspartnern (3.4.2). Da ATPγ in allen Proben und in keiner Kontrolle vorkam, ist sie unter diesen Resultaten der Kandidat mit der höchsten Sicherheit des Nachweises.

Die in der Y2H-Studie und der Co-Immunopräzipitation gleichermassen beobachtete Interaktion der ATPγ mit EX1 kann als Nachweis der Interaktion dieser Proteine gelten. Zu dieser Information kommt das Wissen um die physiologische Bedeutung von EX1 für die ATPγ (vergl. 4.4.1, 4.4.2), was die zentrale Rolle dieser Interaktion unterstreicht.

Der plastidäre Transkriptionsfaktor 16 konnte ebenfalls als möglicher Interaktionspartner identifiziert werden. Dieses Protein (Katalognummer:

Q9STF2) wird in der Datenbank UniProtKB/TrEMBL lediglich als „putativ, uncharakterisiert“ aufgeführt. Seine Existenz als Protein wurde in der Massenspektronomie der Co-Immunopräzipitation nun nachgewiesen. PTAC16 besitzt eine *coiled-coil*-Domäne und die Domäne NmrA, die durch negative Transkriptionsregulatoren der Stickstoffmetabolisierung in Pilzen charakterisiert wurde (Kotaka et al., 2008). In den vorliegenden massenspektrometrischen Daten ist dieses Protein mit einem ausreichend hohen *score* vertreten, jedoch bleibt aufgrund der unklaren Rolle des PTAC16 in der Pflanze die Bedeutung des Zusammenhangs mit EX1 offen.

Zwei weitere Proteine, die durch die Co-Immunopräzipitation identifiziert werden konnten, sind die Metalloproteasen FtsH2 und FtsH5. In der Rolle als molekulare Chaperone und spezielle Proteasen des PSII wurde ihre Verbindung zu oxidativem Stress bereits durch eine grosse Anzahl von Arbeiten belegt. Die FtsH-Proteine, welche in den *variegated* Mutanten defekt sind, spielen eine wichtige Rolle beim Abbau der durch ROS geschädigten Proteine sowie bei der Reifung von Chloroplasten. Die Interaktion mit EX1 erhält noch einen weiteren interessanten Aspekt, da in den *var1/2*-Mutanten die Signaltransduktion des oxidativen Stresses gestört zu sein scheint, ohne dass bisher eine befriedigende Erklärung dafür gefunden worden ist.

Untersuchungen der FtsH-Proteine haben ergeben, dass diese Proteine membranständige Hetero-Hexamere aus zwei FtsH-Varianten pro Komplex bilden (Bieniossek et al., 2006). Hierbei stellt sich die Frage, in welcher Weise EX1 mit diesem Komplex interagiert. Für die Interaktion von EX1 mit FtsH2/5 könnten die hexamere Struktur und das Vorhandensein einer zweiten FtsH-Variante notwendig sein, was eine Erklärung für das Fehlen der FtsH unter den möglichen Interaktionspartnern im Y2H-*Assay* wäre. Aus den Daten der Immunopräzipitation lassen sich keine Bindungsverhältnisse ableiten, da die Stöchiometrie der gefundenen Proteine nicht bekannt ist.

Drei essentielle Proteine des PSII, das D2-Protein und die Proteine CP47 und CP43, gehören ebenfalls zu den Proteinen, die durch Co-Immunopräzipitation mit EX1 eluiert und massenspektrometrisch bestimmt wurden. Im Gegensatz zu FtsH2/5 treten diese Proteine erst nach Stressinduzierung auf. Die Interaktion von EX1 mit D2, CP47 und CP43 wird durch die verstärkte Bildung von $^1O_2$

induziert. Die Interaktion könnte im direkten Zusammenhang mit der oxidativen Schädigung des PSII, insbesondere des D1-Proteins stehen. Da es sich bei den Proteinen des PSII um integrale Membranproteine handelt, muss die Interaktion entweder an Domänen erfolgen, die an der Stromaseite exponiert sind, oder die Interaktion findet statt wenn das PSII dissoziiert vorliegt. Möglich ist, dass die Interaktion des EX1 mit den Untereinheiten des PSII über FtsH vermittelt wird, nachdem der FtsH-Komplex das PSII disassembliert hat.

4.4.Die Physiologie des EXECUTER1

4.4.1 EX1 und die γ-Untereinheit der ATP-Synthase

S. Steiner konnte in seiner Msc.-Abschlussarbeit „Investigations on the Impact of Singlet Oxygen in *Arabidopsis thaliana*“ nachweisen, dass die Modifikation der γ-Untereinheit der ATP-Synthase von der Anwesenheit des EXECUTER1-Proteins abhängig ist (5.3). Wie im *Western-Blot* der 2D-Gele zu sehen, ist in der Revertante *ex1/flu* die Modifikation auch ohne Stressinduzierung vorhanden. Das Auftreten von oxidativem Stress ist keine Voraussetzung für die Bildung der modifizierten Isoform ATPγ^{m}. Es ist allerdings möglich, dass bereits der unter Normalbedingungen erzeugte Singulett-Sauerstoff die Modifikation herbeiführt. Die Bildung einer detektierbaren Menge von ATPγ^{m} in der 2D-PAGE von *ex1/flu* wäre auf das Fehlen einer EX1-abhängigen Reparaturfunktion zurückzuführen. ATPγ^{m} würde unter Normalbedingungen aus dem Komplex entfernt und durch neugebildetes Protein ersetzt werden. Die im Wildtyp beobachteten Isoformen und die modifizierte Form koexistieren in *ex1/flu*, was auf kontinuierliche Neubildung kompletter ATP-Synthasen zurückzuführen sein könnte.

Entgegen vorangegangener Untersuchungen konnte in der 2D-PAGE das Verschwinden der Komponenten des F_1-Komplexes der ATP-Synthase innerhalb von 90 Minuten nach Stressinduktion nicht beobachtet werden (Abb. 32; vergl.

Diplomarbeit Mahler, 2004). Für die ATPγ konnte gezeigt werden, dass sie für zumindest 120 Minuten nach Stressinduktion stabil bleibt (Abb. 33). Die nun erhaltenen Resultate zeigen jedoch die Situation in intakten Chloroplasten und nicht wie zuvor an isolierten Thylakoiden. Zudem wurden bei den nun vorliegenden Ergebnissen eine Dunkelperiode von 8 statt zuvor 16 Stunden eingehalten. Die Unterschiedlichkeit beider Ergebnisse könnte auf die abweichenden experimentellen Vorgehensweisen zurückzuführen sein.

4.4.2 Folgen der Mutation von *EX1*

Das Protein EXECUTER1 übt seine Funktion an einer entscheidenden Stelle der durch Singulett-Sauerstoff aktivierten Transduktionskette aus. Dies konnte durch die Revertierung des *flu*-Phänotyps durch den *ex1/flu*-Genotyp gezeigt werden. Das Ausbleiben der Stressantwort in *ex1/flu* ist dabei nicht auf eine geringere $^1O_2$-Freisetzung zurückzuführen, sondern auf eine Unterdrückung der Genaktivierung. Die Aktivierung eines zellulären Programms zur Stressabwehr oder des programmierten Zelltods muss mit Beteiligung der genetischen Information im Nucleus geschehen. EXECUTER1 ist daher ein Element der Signaltransduktion vom Chloroplast zum Nucleus – ein Element des *retrograde signaling*. Mit *Microarrays* erstellte Expressionsprofile zeigen, dass die in *flu* beobachtete Genaktivierung nach Stressinduktion in *ex1/flu* fast vollständig unterdrückt wird (Lee et al., 2007). EXECUTER1 wurde nicht ausserhalb des Chloroplasten detektiert, daher muss ein noch unbekannter Faktor das Signal aus dem Chloroplast in den Zellkern weiterleiten. Dieser ist jedoch nahezu vollständig abhängig von der Aktivität von EXECUTER1.

EXECUTER1 übt offenbar in diesem Zusammenhang auch noch weitere Funktionen aus, die nicht notwendigerweise zwingend für die Signaltransduktion erforderlich zu sein scheinen. In *ex1/flu* findet eine kontinuierliche Modifikation der γ-Untereinheit der ATP-Synthase statt – ein Effekt, der in *flu* nur unter oxidativem Stress beobachtet wurde (Mahler et al., 2007). Gleichzeitig hat *ex1* im ungestressten Zustand ein gegenüber *flu* erhöhtes NPQ, während sich *flu* nicht vom Wildtyp unterscheidet (3.5). Der hohe NPQ der Doppelmutante im Dauerlicht ist im Wesentlichen auf die Wirkung der *ex1*-Mutation zurückzuführen. Unter Stressbedingungen zeigt *ex1* ebenso wie *flu* ein

im Vergleich zum Wildtyp erhöhtes NPQ. Dies steht offenbar im Zusammenhang mit der Isoform ATPγ^{m}.

Die Mutation von *EXECUTER1* bewirkt eine ständige Erhöhung des NPQ, verursacht durch eine Modifikation der ATPγ und damit verminderte Protonendurchlässigkeit der ATP-Synthase. Die Beeinträchtigung der Aktivität konnte bereits experimentell anhand der verminderten Phosphorylierungsrate und der erhöhten protonenmotorischen Kraft nachgewiesen werden (K. Kohozuma, Washington State Univ. 2009, unveröffentlicht). Dass dies die Vitalität der Pflanze nicht sichtbar vermindert, liegt an dem gleichzeitigen Vorhandensein der normalen Isoformen (siehe 5.3). So existieren an den Thylakoidmembranen noch genügend unbeeinträchtigte ATP-Synthasen, um ausreichend ATP zur Verfügung zu stellen. Unter anhaltendem oxidativen Stress konnte in *flu* bereits gezeigt werden, dass sich das Verhältnis der Isoformen zugunsten der modifizierten verschiebt. Schliesslich kommt es zur Dissoziation der ATP-Synthase, was einen Zusammenbruch des Energiehaushalts bedeuten dürfte und möglicherweise neben der durch Signaltransduktion ausgelösten Stressreaktion ein weiterer Faktor für den Tod der Zelle ist.

Während es bei der *ex1*-Mutante keinerlei Hinweise auf eine mögliche Fehlfunktion des Stärkeabbaus gibt, zeigt die homozygote Linie von *EX1-GFP* in *ex1/flu* deutliche Auffälligkeiten. Diese Linie hat ein verzögertes Wachstum, eine hellere Blattfarbe und unter Dauerlicht eine stark erhöhte Menge an Speicherstärke in den Chloroplasten (siehe 5.2). Die Abbaugeschwindigkeit der Speicherstärke scheint im Vergleich zur *sex4*-Mutante (*starch-excess4*) normal zu sein. Die *sex4*-Mutante zeigt einen verminderten Stärkeabbau und diente hierbei als Vergleich (Kotting et al., 2009). Ob diese Beobachtung mit der Rolle von EX1 bei der Plastidenentwicklung zusammenhängt, oder es sich um einen pleiotropen Effekt handelt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden.

4.4.3 Die Funktionsweise von EX1

EX1 ist ein Teil der Signaltransduktionskette, die durch die Perzeption von $^{1}O_{2}$ im Chloroplast ausgelöst wird und zu einer massiven Genaktivierung im Kern führt. Ob EX1 direkt an der Übertragung des Signals beteiligt ist oder eine

scaffolding-Funktion ausführt, ist nicht bekannt. Aufgrund der Interaktionsstudien im Y2H-System und *in planta* liegt es nahe anzunehmen, dass EX1 direkt mit der γ-Untereinheit der ATP-Synthase interagiert. Unter dem Gesichtspunkt der Funktion dieses Proteins als Regulator der ATP-Synthaseaktivität (Ueoka-Nakanishi et al., 2004) kommt dieser Interaktion eine besondere Bedeutung zu.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das Auftreten der modifizierten Form der ATPγ durch das Aufkommen von oxidativem Stress durch $^1O_2$ ausgelöst wird. In der *ex1*-Mutante ist ATPγ^m unabhängig vom Stresszustand dauerhaft vorhanden. Das EX1-Protein könnte demnach die ATPγ^m erkennen und einen Vorgang einleiten, der die Entfernung der modifizierten Isoform bewirkt. Es kann nicht zweifelsfrei davon ausgegangen werden, dass es sich bei ATPγ^m um ein durch $^1O_2$ oxidiertes Protein handelt. Der zu Grunde liegende Chemismus der Bildung von ATPγ^m konnte bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden. Da in *flu* nach Stressinduktion das massive Auftreten von ATPγ^m innerhalb weniger Minuten erfolgt, ist eine *de novo*-Synthese auszuschliessen. Für die oxidative Veränderung des Proteins sprechen massenspektrometrische Daten, die einen Hinweis auf den Ort der Modifikation geben (Mahler et al., 2007). Dieser befindet sich in unmittelbarer Nähe zu der für die regulatorische Funktion notwendigen Domäne der ATPγ und könnte daher die Aktivität des gesamten Komplexes beeinflussen. Der Zweck der Interaktion von EX1 mit der ATPγ wäre somit die Erkennung der modifizierten Form und die Aktivierung eines Reparaturprozesses, der die ATP-Synthase wiederherstellt.

Das vermehrte Auftreten von ATPγ^m unter oxidativem Stress könnte mehr als nur eine zufällige Schädigung eines Proteins darstellen. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um eine spezifische Eigenschaft von ATPγ handelt. Die modifizierte Isoform könnte die Permeabilität der ATP-Synthase für Protonen vermindern. Dadurch erniedrigt sich der pH im Lumen, was zu einem erhöhten NPQ in den Photosystemen führt. Die Folge davon wäre die Verminderung der $^1O_2$-Generierung, was im Sinne einer negativen Rückkopplung eine direkte Linderung des Stresszustands bedeutet. Die gleichzeitig mit dem Auftreten der ATPγ^m stattfindende Erhöhung des NPQ in *flu* und *ex1/flu* kann als Nachweis des Zusammenhangs von Modifikation und dem NPQ interpretiert werden.

In *flu* kommt es zu dieser Reaktion erst nach Einsetzen des oxidativen Stresses, was den Verlauf der Reaktion im Wildtyp unter gleichen Stressbedingungen abbilden könnte. Die veränderte Isoform der ATPγ muss letztendlich aus dem Komplex entfernt und ersetzt werden, um die Funktion der ATP-Synthase wiederherzustellen. Diese Aufgabe könnten die FtsH-Proteasen in einem Vorgang analog zu den Untereinheiten des PSII bewerkstelligen. Am PSII sind sie essentiell notwendig für die Reparatur photooxidativer Schäden, insbesondere an der D1-Untereinheit. Die in einer früheren Arbeit beobachtete Dissoziation des F_1-Komplexes der ATP-Synthase wäre auf solch einen Vorgang zurückzuführen (Diplomarbeit Mahler, 2004).

Die FtsH-Proteasen liegen als Hetero-Hexamer an der Thylakoidmembran fixiert vor. Die mit EX1 in Verbindung stehenden FtsH2 und FtsH5 kommen dabei in zwei verschiedenen Formen von Hexameren vor, den FtsH1/5 und FtsH2/8 Komplexen (Kato et al., 2009). Es darf spekuliert werden, ob nur die Varianten 2 und 5 mit EX1 interagieren können, da 1 und 8 im Co-Immunopräzipitat nicht gefunden wurden. In diesem Fall könnten pro FtsH-Hexamer drei EX1 interagieren.

Anhand in Deletionsmutanten auftretenden partiell degradierten D1-Untereinheiten des PSII konnten den einzelnen FtsH-Komplexen unterschiedliche Funktionen im Reparaturzyklus des PSII zugeordnet werden. Gemeinsam ist jedoch, dass stets oxidativ geschädigte Proteine selektiv aus dem Komplex entfernt und degradiert werden, was gleichzeitig der Neubildung von $^1O_2$ vorbeugt (Kato and Sakamoto, 2009). In den *var*-Mutanten ist die Reparatur des PSII gestört und es kommt zu einer fortwährenden Produktion von $^1O_2$. EX1 könnte als Regulator der FtsH-Proteasen funktionieren und beim Auftreten von oxidativ geschädigten Proteinen den Proteasekomplex aktivieren.

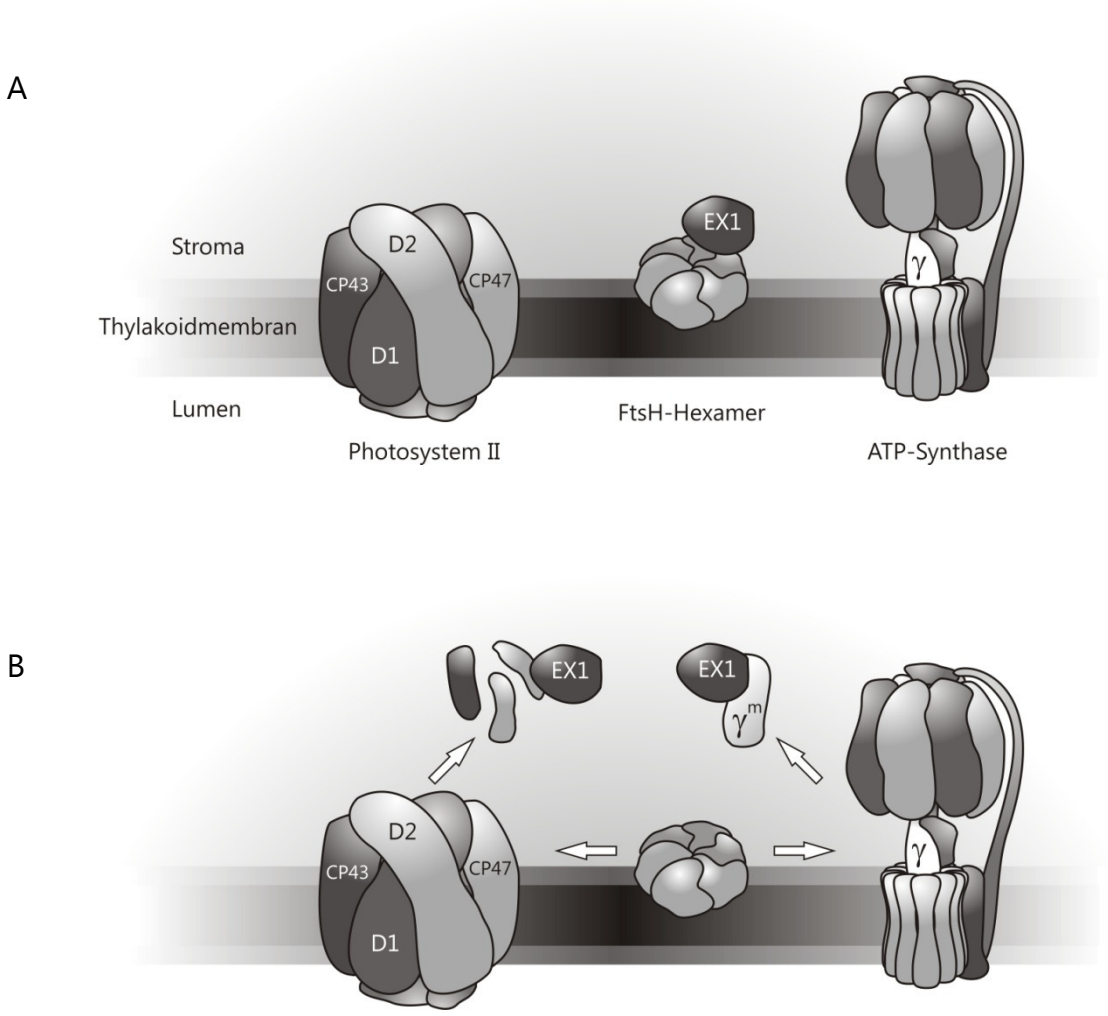

Abbildung 27: Modell der Lokalisation von EX1

Auf der Basis der Ergebnisse der Lokalisationsstudie und der Co-Immunopräzipitation könnte EX1 an das FtsH-Hexamer assoziiert vorliegen (A). Nach dem Auftreten von oxidativem Stress wechselt EX1 zu den möglichen Zielproteinen des FtsH (B).

Das Auftreten von Teilen des PSII im Co-Immunopräzipitat nach Stressinduktion könnte ein Hinweis auf die regulative Funktion von EX1 sein. Da der FtsH-Komplex bei dem Reparaturprozess oxidativ geschädigter Proteinkomplexe notwendig ist, muss er insbesondere nach Einsetzen des oxidativen Stresses aktiv werden. Als Chaperon muss der FtsH-Komplex mit allen Untereinheiten um das D1-Protein interagieren um das defekte D1 aus dem Komplex zu lösen und proteolytisch abzubauen. EX1 könnte mit den Untereinheiten des PSII in dem Moment interagieren, wenn sie in disassemblierter Form vorliegen. Das D1 selbst wird durch die FtsH-

Proteasefunktion sofort abgebaut und konnte möglicherweise daher nicht im Co-Immunopräzipitat gefunden werden. Die anderen Teile des Komplexes wurden durch den *Crosslinker* während der Präparation fixiert.

Der Anstoss der Signaltransduktion des oxidativen Stresses könnte in der Erkennung oxidativ geschädigter Proteine durch EX1 liegen. Singulett-Sauerstoff erzeugt an Proteinen spezifische Oxidationsprodukte, wie Aminoamidgruppen (Foote, 1968). Durch FtsH-Proteasen erzeugte proteolytische Abbauprodukte des PSII und der ATPγ, die solche Veränderungen aufweisen, könnten mit EX1 wechselwirken. Es ist bereits gezeigt worden, dass Abbauprodukte, die vom FtsH-Komplex freigesetzt werden, eine regulative Funktion erfüllen. In *Synechococcus* beeinflussen sie die Transkription des D1 und aktivieren die Expression eines alternativen Elektronenakzeptors des Elektronentransports (Stelljes and Koenig, 2007). Im Laufe der Evolution der Chloroplasten als Endosymbiont im pflanzlichen Eukaryoten könnte eine solche stressaktivierte Rückkopplung eine zusätzliche Schaltebene erworben haben. Diese würde die bereits vorhandene interne Stressregulation des Chloroplasten mit einem Signalweg verknüpfen, der eine Genaktivierung im Zellkern bewirkt.

In der hier vorgeschlagenen Hypothese sind die primären Akzeptoren von $^1O_2$ die Proteine des PSII und die γ-Untereinheit der ATP-Synthase. Das Auslösen der Signaltransduktion des oxidativen Stresses findet statt, wenn Abbauprodukte dieser Proteine durch den FtsH-Komplex in das Stroma freigesetzt werden und von EX1 perzipiert werden (Abb. 28). Der weitere Verlauf des Signalweges ist noch unbekannt. EX1 könnte einen Transkriptionsfaktor im Chloroplasten aktivieren, dessen Zielgene die Signalweiterleitung aus dem Plastiden in den Kern bewirken. Unter den Interaktionspartnern in 3.4.2 findet sich ein Transkriptionsfaktor, dessen Eigenschaften bislang jedoch unbekannt sind.

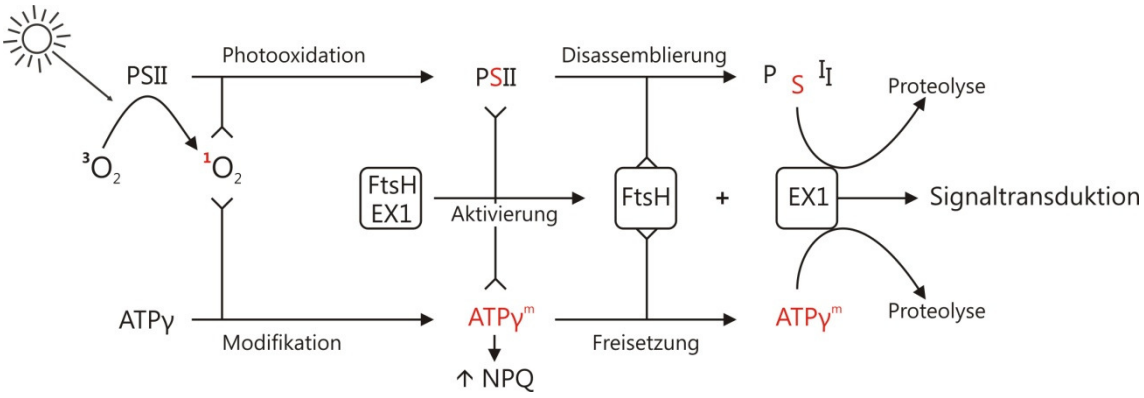

Abbildung 28: Hypothetische Funktion von EX1

Die schematische Darstellung zur Funktionsweise von EX1 zeigt den Reaktionsverlauf beginnend mit der Bildung von $^1O_2$ im PSII. Im Laufe der Reaktion werden Oxidationsprodukte von Proteinen freigesetzt, die von EX1 perzipiert und als Signal für oxidativen Stress interpretiert werden. Oxidativ veränderte Proteine sind rot hervorgehoben.

Das Ausbleiben des programmierten Zelltods in den *var*-Mutanten könnte auf den Ausfall der Reparaturfunktion zurückzuführen sein, die durch EX1 eingeleitet wird. In den Mutanten werden wesentlich weniger Abbauprodukte freigesetzt als für den Stresszustand in den grünen Blattteilen typisch wäre (Kato et al., 2009). Unter der Annahme, dass EX1 in der Lage ist, auf ein erhöhtes Vorkommens solcher Abbauprodukte eine Stressantwort auszulösen, imitiert dies einen stressfreien Zustand.

Eine wichtige Frage, die es zu klären gilt, ist, wie der auslösende Faktor der Signaltransduktion des oxidativen Stresses zwischen permissiven und kritischen Zuständen unterscheidet. Ein Problem hierbei ist, dass Photoinhibition und Produktion von $^1O_2$ unter allen Bedingungen stattfinden – sogar unter extremen Schwachlicht (Tyystjarvi and Aro, 1996). Der damit verbundene PSII-*turnover* und die Freisetzung von proteolytischen Abbauprodukten durch den FtsH-Komplex finden damit jederzeit statt. Beim Auftreten des Stresszustands intensivieren sich die Schadvorgänge enorm und EX1 könnte in einer dosisabhängigen Weise den Signalvorgang einleiten. Es ist jedoch denkbar, dass noch ein zusätzlicher Faktor EX1 beeinflusst und so zu einer adäquaten Aktivierung führt. Bei diesem Faktor könnte es sich um eine Störung des RedOx-Gleichgewichts im Chloroplasten handeln.

Das RedOx-Verhältnis in den Chloroplasten kann bei einer Verschiebung in den oxidierten Zustand zur Auslösung einer Signaltransduktion führen. Eine solche Verschiebung des Gleichgewichts kann aufgrund der Oxidation von Glutathion durch *scavenger*-regenerierende Zyklen entstehen (Foyer and Noctor, 2005). Dieser Signalweg könnte in *ex1/flu* ebenfalls gestört sein, da selbst anhaltender oxidativer Stress keine Auswirkungen auf die Doppelmutante zu haben scheint. Es ist auch möglich, dass die noch sehr geringe Genaktivierung in *ex1/ex2/flu* nach Stressinduktion (Lee et al., 2007) auf diesen Signalweg zurückzuführen ist. Die stressabhängige Bindungspräferenz des EX1 könnte auf den RedOx-Zustand im Stroma zurückzuführen sein. Unter oxidierenden Bedingungen könnte die Affinität zu den Proteinen des PSII steigen. Dies würde erklären, warum EX1 nicht auch schon bei dem Auftreten von $^1O_2$ unter Normalbedingungen eine Signalkaskade auslöst.

Eine weitere Möglichkeit von EX1 zwischen Normal- und Stresszustand zu unterscheiden und nur im letzteren Fall eine Stressreaktion auszulösen, läge in einer differentiellen Erkennung der PSII-Degradationsprodukte. Untersuchungen der D1-Proteolyse haben ergeben, dass in Abhängigkeit von der Lichtintensität verschiedene Produkte gebildet werden (Edelman and Mattoo, 2008). EX1 könnte trotz fortlaufendem PSII-*turnover* inaktiv bleiben, solange keine für oxidativen Stress typischen proteolytischen Produkte auftreten.

4.5 Ausblick

Zu der Verifizierung und Vervollständigung der hier vorgeschlagenen Hypothese der Funktion von EX1 können zukünftige Arbeiten in verschiedenen Ansätzen beitragen. Die Art der Modifikation der ATPγ sollte aufgeklärt werden. Die zugrundeliegende chemische Umwandlung könnte für die Signaltransduktion und die Regulation der ATP-Synthase von Bedeutung sein. Dies könnte durch eine präzise massenspektrometrische Analyse des Proteins auf Peptidebene stattfinden. Es muss geprüft werden, ob der EX1-Komplex in den *var*-Mutanten vorhanden ist und ob dort ebenfalls die modifizierte Form der ATPγ auftritt. Die Rolle des PTAC16 in der Signaltransduktion sollte untersucht werden. Hierzu bieten sich ein gezielter Y2H-*Assay* mit EX1 und die Betrachtung der entsprechenden Mutante in *A. thaliana* an. Die Rolle des EX2 in der Signaltransduktion wurde bis jetzt lediglich aus Expressionsprofilen abgeleitet – die Bindungspartner und die Funktion auf Proteinebene sind noch unbekannt. Durch eine Charakterisierung des Proteins analog zu der vorliegenden Arbeit könnte dessen Rolle in der Signaltransduktion des oxidativen Stresses aufgedeckt werden.

Die vorliegende Untersuchung des EX1-Proteins hat es möglich gemacht, einen molekularen Schalter bei seiner Arbeit zu betrachten. Zusammen mit der induzierbaren *flu*-Mutante ergibt sich ein einzigartiges System, mit dem die Signaltransduktion des oxidativen Stresses untersucht werden konnte und das viel Potential für zukünftige Forschung bereithält. In dieser Arbeit wurde mit der Aufklärung der EX1-vermittelten Signaltransduktion begonnen. Das hier vorgestellte Modell ist noch unvollständig und bedarf weiterer Forschungsarbeit. Jedoch fügen sich die bereits jetzt erhaltenen Informationen in ein Gesamtbild, dass die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeiten und Beobachtungen sinnvoll miteinander verknüpft.

5. Anhang

5.1 Ergebnisse des *Yeast-Two-Hybrid Assays*

In einem *Yeast-Two-Hybrid Assay*, durchgeführt von Dr. F. Landgraf, wurde nach möglichen Interaktionspartnern des EXECUTER1 gesucht. Die cDNS von *EXECUTER1* wurde in den in den Vektor pGBKT7 als *bait* kloniert. Als *prey* wurde eine cDNS-Bank aus *Arabidopsis thaliana* in pGADT7-Rec kloniert. Beide Vektoren wurden in Hefe co-transformiert und auf *triple-drop-out* Selektionsmedium (ohne: Leucin, Tryptophan, Histidin) selektiert. In der folgenden Tabelle sind die Proteine mit positiver Interaktion im Y2H-*Assay* aufgeführt. Die Zahlen in Klammern hinter dem Locus geben die Anzahl der aufgetretenen Interaktionsereignisse an.

Tabelle 16: Resultate des Y2H-*Assays*

Locus	Beschreibung (lt. TAIR, www.arabidopsis.org)	Lokalisation
At3g56910	UNKNOWN PROTEIN; similar to chloroplast ribosomal protein CL18 precursor in pea	Chloroplast
At1g61170	UNKNOWN PROTEIN; (PSORT; TargetP)	Nucleus
At5g59880 (29)	ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 3	Mitochondrium
At5g11790 (2)	UNKNOWN PROTEIN; cell differentiation (contains Pfam profile PF03096: Ndr family)	unbekannt
At4g04020	PLASTID-LIPID ASSOCIATED PROTEIN PAP, putative/fibrillin	Chloroplast
At1g48300	UNKNOWN PROTEIN	Endomembran
At4g24330	UNKNOWN PROTEIN	Endomembran
		Tabelle wird fortgesetzt

At4g05180	CALCIUM ION BINDING; OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 3; (16 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II)	Chloroplast
At1g31812	ACYL-COA BINDING PROTEIN	Plasmamembran
At1g74470 (2)	GERANYLGERANYL REDUCTASE	Chloroplast
At1g56050	GTP-BINDING PROTEIN	Chloroplast
At1g52220	UNKNOWN PROTEIN	Chloroplast
At5g38430 (2)	RuBisCO small subunit 1B	Chloroplast
At2g47470	ATPDIL2-1; electron transporter/ isomerase/thiol-disulfide exchange intermediate	Endomembran
At1g42970	GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE B SUBUNIT (glycolysis; response to light stimulus)	Chloroplast
At3g13120	STRUCTURAL CONSTITUENT OF RIBOSOME (30S ribosomal protein S10);	Chloroplast
At4g04640	ATP SYNTHASE GAMMA CHAIN 1	Chloroplast
At2g46390	UNKNOWN PROTEIN	Endomembran
At3g12800	OXIDOREDUCTASE (short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein)	unbekannt
At1g19000	DNA BINDING/TRANSCRIPTION FACTOR (myb family transcription factor)	Nucleus
At2g01918 (2)	UNKNOWN PROTEIN (similar to oxygen-evolving enhancer protein 3)	Chloroplast
At2g46735	UNKNOWN PROTEIN	Mitochondrium
At1g76450	UNKNOWN PROTEIN (oxygen-evolving complex-related, contains a PsbP domain)	Chloroplast
		Tabelle wird fortgesetzt

At2g37170	Plasma membrane intrinsic protein 2B (PIP2B)/aquaporin PIP2.2 (PIP2.2)	Plasmamembran
At1g08380	Arabidopsis thaliana mRNA for photosystem I subunit O (psaO gene)	Chloroplast
At4g09650	ATP synthase delta chain (H(+)-transporting two-sector ATPase, delta (OSCP) subunit)	Chloroplast
At1g56045	Ribosomal protein L41 family protein (structural constituent of ribosome)	unbekannt
At5g49160	MET1 (DECREASED METHYLATION 2DNA), encodes a cytosine methyltransferase; negative regulation of flower development	unbekannt
At4g01150	UNKNOWN PROTEIN	Chloroplast
At3g27830	50S ribosomal protein L12-1	Chloroplast

Die vielversprechendsten Kandidaten aus dieser Tabelle wurden einem weiteren Test unterzogen, indem gezielt die cDNS des jeweiligen Gens in den *prey*-Vektor kloniert wurde. Zusammen mit dem *EXECUTER1*-tragenden *bait*-Vektor wurde dieser in Hefe co-transformiert und die Interaktion auf einem *triple-drop-out* Selektionsmedium überprüft (Abb. 29).

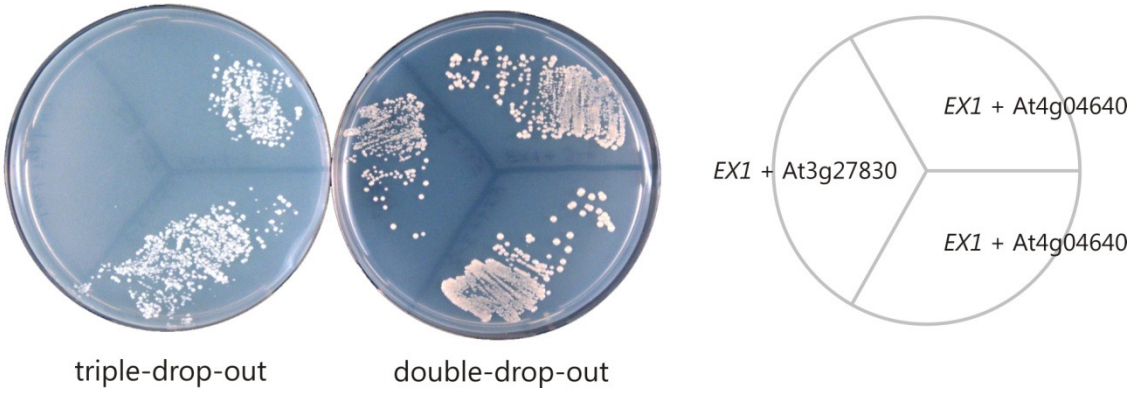

Abbildung 29: Verifizierung der Interaktion von EX1 mit ATPγ im Y2H-*Assay*

Im Gegensatz zum 50S-ribosomalen Protein L12-1 (At3g27830) zeigt die ATPγ (At4g04640) ein positives Resultat bei der erneuten Überprüfung der Interaktion mit EX1 unter Verwendung vollständiger cDNS der jeweiligen Gene als *prey* im Y2H-*Assay*.

5.2 Ergebnisse der Stärkequantifizierung

Im Folgenden aufgeführt sind Ergebnisse aus der Arbeit von F. Ramseyer während seines Semesterpraktikums im Herbstsemester 2008. In dieser Arbeit wurde der Abbau der Stärke in den Blättern während der Dunkelphase mittels einer enzymatischen Stärkequantifizierung gemessen; nach: (Carpita and Kanabus, 1987).

Aus der segregierenden Transformantenlinie *EX1-GFP* in *ex1/flu* wurde durch Selektion eine homozygote Linie gewonnen, die eine stärkere Expression von EX1-GFP zeigt. Die auffällig hohe Stärkemenge dieser Linie wurde bei dem Versuch bemerkt, intakte Plastiden zu isolieren. Eine grosse Menge Stärke sammelte sich am Boden des Percollgradienten und die Plastiden wurden zerstört. Die homozygote Linie konnte daher nicht für die Plastidenisolation verwendet werden.

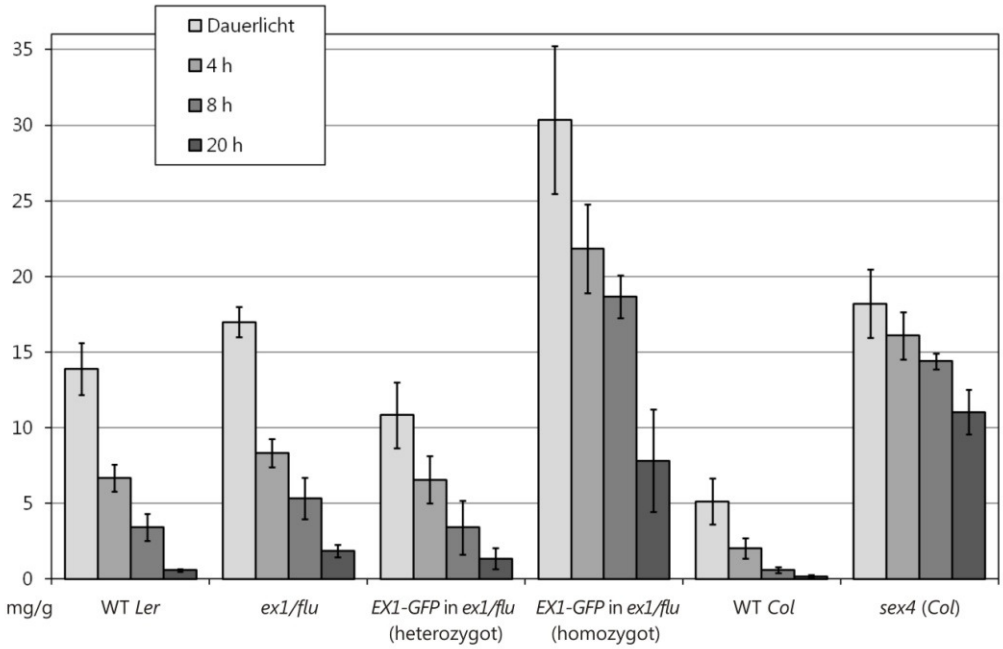

Abbildung 30: Kinetik des Stärkeabbaus im Dunkeln bis 20 h

Der Stärkegehalt der einzelnen Linien vor, 4 h, 8 h und 20 h nach Beginn der Verdunkelung ist in Milligramm pro Gramm Frischgewicht angegeben.

Die beiden Transformantenlinien wurden mit dem Wildtyp und der Doppelmutante verglichen. Insbesondere die homozygote *EX1-GFP* in *ex1/flu* zeigt eine Auffälligkeit im Stärkegehalt und –abbau (Abb. 30). Das Experiment wurde auch mit der Mutante *sex4* (*starch-excess4*) durchgeführt, für die ein verminderter Stärkeabbau bereits dokumentiert ist (Kotting et al., 2009). Die Mutante *sex4* war nur im Ökotyp *Columbia* verfügbar, daher wurde der entsprechende Wildtyp ebenfalls getestet.

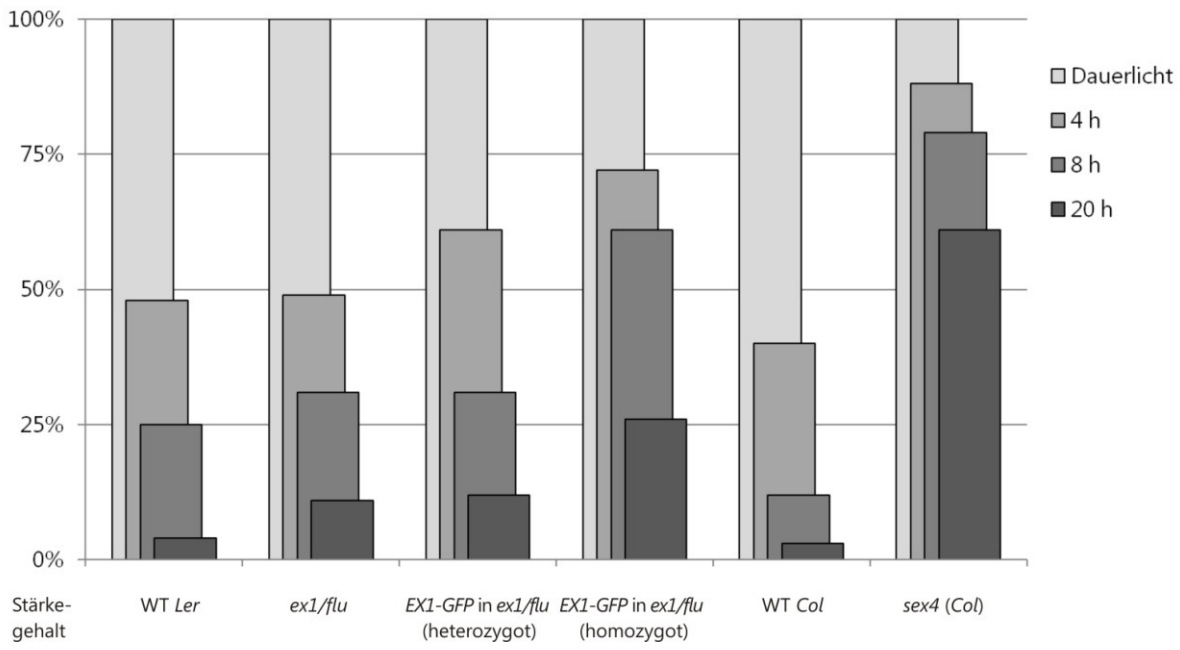

Abbildung 31: Stärkeabbau im Verhältnis zum Ausgangswert im Licht

Die Kinetik des Stärkeabbaus wird durch die Angabe des Stärkegehalts in Prozent relativ zur Menge zum Beginn der Verdunkelung verdeutlicht.

Um die Verhältnismässigkeit des Stärkeabbaus zu verdeutlichen, wurden die Daten auf die jeweilige Ausgangsmenge zum Zeitpunkt vor Beginn der Dunkelphase bezogen. Die verbliebenen Stärkemengen zu den Testzeitpunkten wurden in Prozente des Ausgangswertes umgerechnet (Abb. 31).

5.3 Ergebnisse der 2D-PAGE von EX1

Im Folgenden aufgeführt sind Ergebnisse aus der Arbeit „Investigations on the Impact of Singlet Oxygen in Arabidopsis thaliana“ von S. Steiner.

In dieser Arbeit wurden die Muster plastidärer Proteine von Wildtyp, *flu* und *ex1/flu* per 2D-PAGE auf Veränderungen nach Stressinduktion untersucht. Die Ergebnisse aus vorangegangenen Arbeiten zum Stress durch Singulett-

Sauerstoff konnten hierbei bestätigt und um neue Beobachtungen erweitert werden.

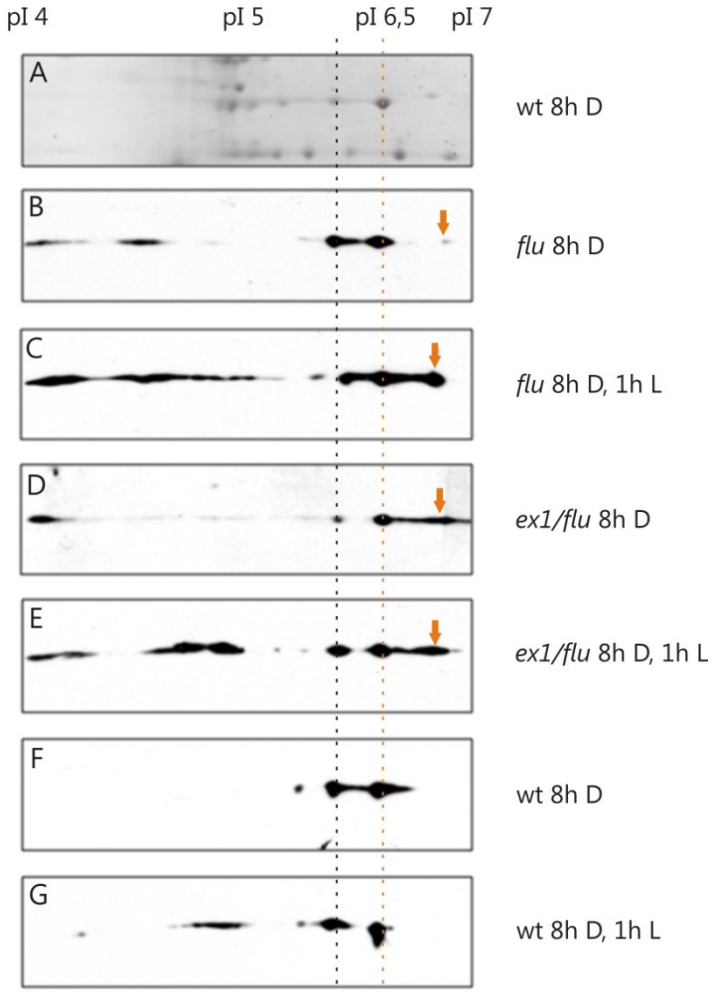

Abbildung 32: Die γ-Untereinheit der ATP Synthase in der 2D-PAGE

A) Ausschnitt eines 2D-Gels, Silberfärbung, B-G) Entsprechende Ausschnitte von *Western-Blots*, mit Antikörper gegen ATPγ inkubiert, maximale Belichtungsdauer. Die Pfeile kennzeichnen die in *flu* erwartete Isoform. Gestrichelte Linien kennzeichnen die Lage identischer Isoformen. Aus: Masterarbeit S. Steiner 2009.

Auf den *Western-Blots* der 2D-Gele ist zu sehen, dass in *flu* nach Stressinduktion eine in Wildtyp nicht beobachtete Isoform der γ-Untereinheit der ATP-Synthase auftritt. Diese Isoform ist in *ex1/flu* unter allen getesteten Bedingungen vorhanden (Abb. 32).

Es gibt mehrere Isoformen der ATPγ, die einen pI kleiner oder gleich 6,5 besitzen. Die beiden prominentesten liegen bei etwa pI 6,5 und 6,2. Diese sind in allen Linien und unter allen Bedingungen vorhanden. Fehlt EX1 oder wird in *flu* oxidativer Stress induziert, tritt eine neue Isoform ($ATP\gamma^{m}$) mit einem pI von etwa 6,8 auf. Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass Teile der ATP-Synthase aus dem Proteinmuster der Thylakoidmembran mit zunehmender Dauer des oxidativen Stresses verschwinden.

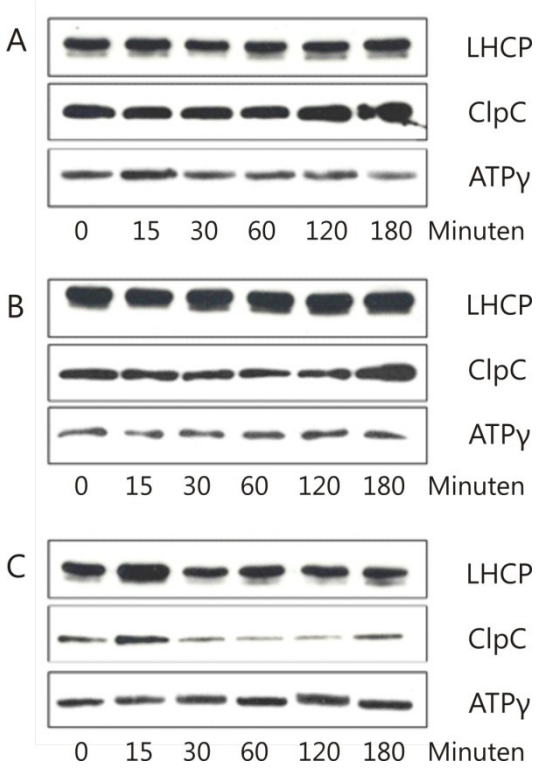

Abbildung 33: Kinetik der ATPγ unter Stressbedingungen

Western Blots mit Gesamtextrakten, extrahiert nach Beginn der Wiederbelichtung. Die Inkubation geschah mit Antikörpern gegen LHCP, CLpC und ATPγ. A) *flu*, B) *ex1/flu*, C) WT.

Die Stabilität der ATPγ wurde mit *Western-Blots* des Gesamtextrakts überprüft. In der Kinetik nach Stressinduktion ist zu sehen, dass keine offensichtliche Degradation des Proteins innerhalb von 120 Minuten stattfindet. In *flu* ist ein schwacher Rückgang der Menge an ATPγ nach einer Dauer von 180 Minuten zu beobachten (Abb. 33). Als Kontrolle dienten LHCP und ClpC.

Abkürzungsverzeichnis

$^1O_2$	Singulett-Sauerstoff
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPγ	γ-Untereinheit der ATP-Synthase
ATPγ^m	Modifizierte γ-Untereinheit der ATP-Synthase
BCA	Bicinchoninsäure
Bis-TRIS	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BN-PAGE	*Blue-Native* Polyacrylamid Gelelektrophorese
cDNS	komplementäre DNS
ClpC	Plastidäre Form des HSP100 (*Heat Shock Protein* 100)
Col	*Arabidopsis thaliana* subsp. *Columbia*
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DMSO	Dimethylsufoxid
DTSP	3,3-Dithiodipropionsäure-di(N-hydroxysuccinimidester)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
EX1	EXECUTER 1
FLU	FLUORESCENT
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (urspr. *Aequorea victoria*)
GluTR	Glutamyl-tRNS-Reduktase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	Meerettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*)
Ler	*Arabidopsis thaliana* subsp. *Landsberg erecta*
LHCP	*Light Harvesting Complex* Protein
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie

NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NPQ	*Nonphotochemical (exciton) quenching*
OGP	Octyl-2-D-Glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POR	NADPH-Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
PSII	Photosystem II
PSbA	D1 Untereinheit des Photosystems II
PSbD	D2 Untereinheit des Photosystems II
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBCL / S	RuBisCO grosse Untereinheit / kleine Untereinheit
ROS	*Reactive oxygen species*
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tricin	*N*-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
α-	Antikörper gegen
Y2H	*Yeast-Two-Hybrid*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchsmaterial 20
Tabelle 2: Antikörper..... 22
Tabelle 3: Laborgeräte..... 23
Tabelle 4: Lösungen für die Plastidenisolation..... 25
Tabelle 5: Lösungen für die Isolation von Plastidenproteinen..... 27
Tabelle 6: SDS-PAGE..... 28
Tabelle 7: *Blue-Native* PAGE..... 29
Tabelle 8: PAGE Färbetechniken 31
Tabelle 9: *Western Blotting*..... 33
Tabelle 10: Glycerin- und Saccharosegradienten 34
Tabelle 11: Immunopräzipitation..... 35
Tabelle 12: Reduzierung und Alkylierung 36
Tabelle 13: Protoplastierung für die konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie... 37
Tabelle 14: Resultate der Massenspektronomie..... 54
Tabelle 15: NPQ-Werte im t-Test 57
Tabelle 16: Resultate des Y2H-*Assays* 74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: FLU-regulierte Chlorophyllsynthese in *Arabidopsis thaliana* 7
Abbildung 2: Orbitalschema des Triplett- und Singulettzustands von O_2 8
Abbildung 3: Keimlinge von *flu* unter verschiedenen Lichtbedingungen..... 10
Abbildung 4: Adulte *flu*-Mutanten in verschiedenen Belichtungsprozeduren . 10
Abbildung 5: Die *ex1*-Mutation revertiert den *flu*-Phänotyp..... 12
Abbildung 6: Phylogramm der EXECUTER-Proteinfamilie..... 13
Abbildung 7: Die plastidäre ATP-Synthase 16
Abbildung 8: Habitus der Mutante *var2* 18
Abbildung 9: Der *Crosslinker* DTSP 26
Abbildung 10: GFP-Fluoreszenz in EX1-GFP exprimierenden *ex1*/*flu* Pflanzen 39
Abbildung 11: Komplementierung von *ex1*/*flu* mit *EX1-GFP*, Keimlinge..... 40
Abbildung 12: Komplementierung von *ex1*/*flu* mit *EX1-GFP*, adulte Pflanze . 41
Abbildung 13: Immunologischer Nachweis von EX1-GFP, *Western Blot* 42
Abbildung 14: Vergleich verschiedener GFP-Konstrukte im CLSM-Bild 43
Abbildung 15: Fraktionierung von intakten Chloroplasten, *Western-Blots* 44
Abbildung 16: *Blue Native*-Gel und dessen *Western-Blot* 45
Abbildung 17: Saccharosegradient mit *Western-Blot* der Fraktionen 47
Abbildung 18: *Western-Blots* der Fraktionen des Glyceringradienten..... 48
Abbildung 19: Glyceringradienten mit EDTA bzw. $MgCl_2$, *Western Blot* 48
Abbildung 20: Glyceringradient der Fraktionen 2 bis 5, *Western Blot* 49
Abbildung 21: Eluat der Immunopräzipitation mit GFP-Antikörpern 50
Abbildung 22: Test des *Crosslinkers* DTSP, *Western Blot*..... 51
Abbildung 23: Präparatives SDS-Gel, silbergefärbt 52
Abbildung 24: Kontrolle der Co-Immunopräzipitation 53
Abbildung 25: *Western-Blots* der Co-Immunopräzipitation 55
Abbildung 26: Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen..... 56
Abbildung 27: Modell der Lokalisation von EX1 69
Abbildung 28: Hypothetische Funktion von EX1..... 71
Abbildung 29: Verifizierung der Interaktion von EX1 mit ATPγ im Y2H-*Assay*. 77
Abbildung 30: Kinetik des Stärkeabbaus im Dunkeln bis 20 h..... 78
Abbildung 31: Stärkeabbau im Verhältnis zum Ausgangswert im Licht..... 79

Abbildung 32: Die γ-Untereinheit der ATP Synthase in der 2D-PAGE..... 80
Abbildung 33: Kinetik der ATPγ unter Stressbedingungen..... 81

Literaturverzeichnis

Alloza I, Martens E, Hawthorne S, Vandenbroeck K (2004) Cross-linking approach to affinity capture of protein complexes from chaotrope-solubilized cell lysates. Anal Biochem **324:** 137-142

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiologia Plantarum **100:** 224-233

Aluru MR, Yu F, Fu A, Rodermel S (2006) Arabidopsis variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. J Exp Bot **57:** 1871-1881

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu Rev Plant Biol **55:** 373-399

Aronsson H, Jarvis P (2002) A simple method for isolating import-competent Arabidopsis chloroplasts. Febs Letters **529:** 215-220

Bald D, Noji H, Yoshida M, Hirono-Hara Y, Hisabori T (2001) Redox regulation of the rotation of F(1)-ATP synthase. J Biol Chem **276:** 39505-39507

Bieniossek C, Schalch T, Bumann M, Meister M, Meier R, Baumann U (2006) The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. Proc Natl Acad Sci U S A **103:** 3066-3071

Bosco CD, Lezhneva L, Biehl A, Leister D, Strotmann H, Wanner G, Meurer J (2004) Inactivation of the chloroplast ATP synthase gamma subunit results in high non-photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in Arabidopsis thaliana. J Biol Chem **279:** 1060-1069

Canfield DE, Habicht KS, Thamdrup B (2000) The Archean sulfur cycle and the early history of atmospheric oxygen. Science **288:** 658-661

Carpita NC, Kanabus J (1987) Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay. Anal Biochem **161:** 132-139

D'Amici GM, Huber CG, Zolla L (2009) Separation of thylakoid membrane proteins by sucrose gradient ultracentrifugation or blue native-SDS-PAGE two-dimensional electrophoresis. Methods Mol Biol **528:** 61-70

Danon A, Coll NS, Apel K (2006) Cryptochrome-1-dependent execution of programmed cell death induced by singlet oxygen in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **103:** 17036-17041

Danon A, Miersch O, Felix G, Camp RG, Apel K (2005) Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in Arabidopsis thaliana. Plant J **41:** 68-80

Edelman M, Mattoo AK (2008) D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. Photosynth Res **98:** 609-620

Finn RD, Mistry J, Tate J, Coggill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L,

Sonnhammer EL, Eddy SR, Bateman A (2009) The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res

Foote CS (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. Science **162:** 963-970

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell **17:** 1866-1875

Fryer MJ, Oxborough K, Mullineaux PM, Baker NR (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. J Exp Bot **53:** 1249-1254

Fufezan C, Rutherford AW, Krieger-Liszkay A (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. FEBS Lett **532:** 407-410

Girotti AW (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. J Photochem Photobiol B **63:** 103-113

Goslings D, Meskauskiene R, Kim C, Lee KP, Nater M, Apel K (2004) 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. Plant J **40:** 957-967

Hatz S, Lambert JD, Ogilby PR (2007) Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. Photochem Photobiol Sci **6:** 1106-1116

Kanazawa A, Kramer DM (2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of the chloroplast ATP synthase. Proc Natl Acad Sci U S A **99:** 12789-12794

Kang DH, Gho YS, Suh MK, Kang CH (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Bulletin of the Korean Chemical Society **23:** 1511-1512

Kato Y, Miura E, Ido K, Ifuku K, Sakamoto W (2009) The variegated mutants lacking chloroplastic FtsHs are defective in D1 degradation and accumulate reactive oxygen species. Plant Physiol

Kato Y, Miura E, Matsushima R, Sakamoto W (2007) White leaf sectors in yellow variegated2 are formed by viable cells with undifferentiated plastids. Plant Physiol **144:** 952-960

Kato Y, Sakamoto W (2009) Protein quality control in chloroplasts: a current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. J Biochem **146:** 463-469

Keren N, Gong H, Ohad I (1995) Oscillations of reaction center II-D1 protein degradation in vivo induced by repetitive light flashes. Correlation between the level of RCII-QB- and protein degradation in low light. J Biol Chem **270:** 806-814

Kim C, Lee KP, Baruah A, Nater M, Gobel C, Feussner I, Apel K (2009) (1)O2-mediated retrograde signaling during late embryogenesis predetermines plastid differentiation in seedlings by recruiting abscisic acid. Proc Natl Acad Sci U S A **106:** 9920-9924

Kopp RE, Kirschvink JL, Hilburn IA, Nash CZ (2005) The Paleoproterozoic snowball Earth: a climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A **102:** 11131-11136

Kotaka M, Johnson C, Lamb HK, Hawkins AR, Ren J, Stammers DK (2008) Structural analysis of the recognition of the negative regulator NmrA and DNA by the zinc finger from the GATA-type transcription factor AreA. J Mol Biol **381:** 373-382

Kotting O, Santelia D, Edner C, Eicke S, Marthaler T, Gentry MS, Comparot-Moss S, Chen J, Smith AM, Steup M, Ritte G, Zeeman SC (2009) STARCH-EXCESS4 is a laforin-like Phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in Arabidopsis thaliana. Plant Cell **21:** 334-346

Kruk J, Hollander-Czytko H, Oettmeier W, Trebst A (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. J Plant Physiol **162:** 749-757

Lee KP, Kim C, Landgraf F, Apel K (2007) EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **104:** 10270-10275

Macpherson AN, Telfer A, Barber J, Truscott TG (1993) Direct-Detection of Singlet Oxygen from Isolated Photosystem-Ii Reaction Centers. Biochimica Et Biophysica Acta **1143:** 301-309

Mahler H, Wuennenberg P, Linder M, Przybyla D, Zoerb C, Landgraf F, Forreiter C (2007) Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its gamma subunit. Planta **225:** 1073-1083

Meskauskiene R, Apel K (2002) Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU. FEBS Lett **532:** 27-30

Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, op den Camp R, Apel K (2001) FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci U S A **98:** 12826-12831

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci **7:** 405-410

Miura E, Kato Y, Matsushima R, Albrecht V, Laalami S, Sakamoto W (2007) The balance between protein synthesis and degradation in chloroplasts determines leaf variegation in Arabidopsis yellow variegated mutants. Plant Cell **19:** 1313-1328

Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. Genes Cells **6:** 575-597

op den Camp RG, Przybyla D, Ochsenbein C, Laloi C, Kim C, Danon A, Wagner D, Hideg E, Gobel C, Feussner I, Nater M, Apel K (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. Plant Cell **15:** 2320-2332

Przybyla D, Gobel C, Imboden A, Hamberg M, Feussner I, Apel K (2008) 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. Plant J **54:** 236-248

Rebeiz CA, Montazerzouhoor A, Mayasich JM, Tripathy BC, Wu SM, Rebeiz CC (1988) Photodynamic Herbicides - Recent Developments and Molecular-Basis of Selectivity. Crc Critical Reviews in Plant Sciences **6:** 385-436

Reinbothe S, Reinbothe C, Lebedev N, Apel K (1996) PORA and PORB, Two Light-Dependent Protochlorophyllide-Reducing Enzymes of Angiosperm Chlorophyll Biosynthesis. Plant Cell **8:** 763-769

Rosso D, Bode R, Li W, Krol M, Saccon D, Wang S, Schillaci LA, Rodermel SR, Maxwell DP, Huner NP (2009) Photosynthetic Redox Imbalance Governs Leaf Sectoring in the Arabidopsis thaliana Variegation Mutants immutans, spotty, var1, and var2. Plant Cell

Rothbauer U, Zolghadr K, Muyldermans S, Schepers A, Cardoso MC, Leonhardt H (2008) A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. Mol Cell Proteomics **7:** 282-289

Sakamoto W (2003) Leaf-variegated mutations and their responsible genes in Arabidopsis thaliana. Genes Genet Syst **78:** 1-9

Sakamoto W, Tamura T, Hanba-Tomita Y, Murata M (2002) The VAR1 locus of Arabidopsis encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. Genes Cells **7:** 769-780

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem **68:** 850-858

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem **150:** 76-85

Stelljes C, Koenig F (2007) Specific binding of D1 protein degradation products to the psbAI promoter in Synechococcus sp. strain PCC 7942. J Bacteriol **189:** 1722-1726

Triantaphylides C, Havaux M (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. Trends Plant Sci **14:** 219-228

Triantaphylides C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. Plant Physiol **148:** 960-968

Tyystjarvi E, Aro EM (1996) The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. Proc Natl Acad Sci U S A **93:** 2213-2218

Ueoka-Nakanishi H, Nakanishi Y, Konno H, Motohashi K, Bald D, Hisabori T (2004) Inverse regulation of rotation of F1-ATPase by the mutation at the regulatory region on the gamma subunit of chloroplast ATP synthase. J Biol Chem **279:** 16272-16277

Vranova E, Inze D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. J Exp Bot **53:** 1227-1236

Wagner D, Przybyla D, Op den Camp R, Kim C, Landgraf F, Lee KP, Wursch M, Laloi C, Nater M, Hideg E, Apel K (2004) The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of Arabidopsis thaliana. Science **306:** 1183-1185

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hanno Mahler
Adresse	Tièchestrasse 49 8037 Zürich
Geburtsdatum	21. Juli 1978
Geburtsort	61169 Friedberg (D)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Berufsausbildung

Feb. 2005 bis Jan 2010	Doktorat Institut für Pflanzenwissenschaften an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich Gruppe Pflanzengenetik, Prof. Klaus Apel
7. Dez. 2004	Abschluss des Studiums der Biologie (Dipl. biol.)
Jan. bis Dez. 2004	Diplomarbeit Justus-Liebig-Universität, 35390 Giessen (D) Inst. für allgem. Botanik und Pflanzenphysiologie Titel: „Untersuchungen zur Wirkung von Singulett-Sauerstoff in *Arabidopsis thaliana*“
Okt. 1998 bis Dez. 2003	Studium Justus-Liebig-Universität, 35390 Giessen (D) Fächerschwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Genetik und Philosophie der Biologie
Juli 1997 bis Okt. 1998	Zivildienst Salus-Klinikum, 61381 Friedrichsdorf (D), Abteilung psychosomatische Ambulanz

Schulausbildung

17. Juni 1997	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
Aug. 1988 bis Juni 1997	Gymnasiale Schulausbildung an der Augustinerschule, 61169 Friedberg (D)

Publikationen

Mahler, H. et al. (2007). "Singlet oxygen affects the activity of the thylakoid ATP synthase and has a strong impact on its gamma subunit." Planta 225(5): 1073-83

Zürich, den

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Klaus Apel danken – für die Überlassung des Themas der Arbeit, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die immerwährende gute Betreuung und das kollegiale Arbeitsverhältnis.

Ich bin Prof. Claudia Köhler sehr dankbar, dass sie die Aufgabe als Referentin für meine Dissertation übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Landgraf für die Betreuung meiner Arbeit. Seine Unterstützung in Rat und Tat war mir eine sehr grosse Hilfe.

Für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pflanzengenetik. Insbesondere danke ich meinen lieben Laborkollegen Dr. Klára Šimková, Dr. Marco Würsch, Dr. Keun Pyo Lee und Mena Nater.

André Imboden danke ich vielmals für seine Hilfe und seine Zuverlässigkeit bei der Pflanzenanzucht.

Roman Cervera hat als Auszubildender meine Arbeit ein Jahr lang begleitet. Sandro Steiner und Fabian Ramseyer führten ihre Master- bzw. Semesterarbeit unter meiner Anleitung durch. Ihnen allen bin ich für die Unterstützung bei meiner Arbeit und die sehr gute Zusammenarbeit zu Dank verpflichtet.

Für die vielen anregenden Diskussionen bedanke ich mich bei Dr. Chanhong Kim, Dr. Rasa Meskauskiene, Dr. Christoph Laloi und Dr. Dieter Rubli.

Dr. Oliver Kötting, ETH Zürich, danke ich für die Hilfe bei der Stärkequantifizierung. Bei Prof. Sakamoto, Okayama University, bedanke ich mich für freundliche Überlassung der *var*-Mutanten und der entsprechenden Antikörper. Prof. Rothbauer, LMU München, danke ich für die GFP-Nanotrap. Mein Dank für die massenspektrometrischen Analysen geht an Prof. van Wijk.

Zum Abschluss möchte ich mich bei Julia bedanken – für ihre Liebe und die unendliche Geduld, die sie mit mir während meiner Arbeit in Zürich hatte.