

**Systembiologische Analyse der
photosynthetischen Lichtqualitätsakklimation
von *Arabidopsis thaliana***



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Katharina Bräutigam

Jena, Oktober 2007

Katharina Bräutigam

Gutachter:

1. PD. Dr. Thomas Pfannschmidt
2. Prof. Dr. Stefan Schuster
3. Prof. Dr. Bernhard Grimm

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.01.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	vii
1 Einleitung	1
1.1 Die Plastide als Bestandteil der Pflanzenzelle	1
1.2 Die Photosynthese als Hauptfunktion des Chloroplasten	6
1.2.1 Bau und Funktion des Photosyntheseapparates	6
1.2.2 Reaktion der Photosynthese auf Umweltveränderungen	7
1.3 Das Redoxnetzwerk der Zelle	9
1.3.1 Begriffe	9
1.3.2 Hauptkomponenten des zellulären Redoxnetzwerkes	10
1.3.3 Retrograde Redoxsignale	15
1.4 Lichtqualitätsakklimation	19
1.5 Systembiologie	23
1.6 Zielsetzung	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Enzyme	25
2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
2.3 Software und Datenbanken	27
2.4 Pflanzenmaterial	28
2.5 Lichtsysteme	29
2.6 Pflanzenanzucht	30
2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren	31
2.7.1 DNA-Isolation	31
2.7.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
2.7.3 RNA-Isolation	31
2.7.4 Genexpressionsanalyse mittels <i>Macroarrays</i> (<i>Expression Profiling</i>)	32
2.8 Metabolitanalysen	33
2.8.1 Stärkebestimmung	33
2.8.2 Proteinbestimmung	33
2.8.3 Lipidmessungen	33
2.8.4 Bestimmung der ATP/ADP und NADPH/NADP-Verhältnisse	34
2.8.5 Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses	34
2.8.6 Bestimmung des Aktivierungszustandes der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (NADP-MDH)	34
2.8.7 Analyse von Stoffwechselmetaboliten mit GC-MS (<i>Metabolic Profiling</i>)	34
2.9 Datenanalyse	36
2.9.1 Analyse und Interpretation der Genexpressionsdaten	36
2.9.2 Analyse und Interpretation der Daten des <i>Metabolic Profiling</i>	36
2.9.3 Clusteranalysen	37

2.9.4 Hauptkomponentenanalyse	37
2.9.5 Vergleich der zeitig regulierten Gene mit publizierten Expressionsdatensätzen	38
2.9.6 Promotoranalysen	41
2.10 Chlorophyllfluoreszenzmessungen	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Untersuchung der LTR auf der Transkriptebene	43
3.1.1 Überblick über den zeitlichen Verlauf der Akklimationsreaktion auf Transkriptebene: <i>Transcript Profiling</i>	45
3.1.2 Identifikation, funktionelle Zuordnung und Regulation von primär regulierten Genen	49
3.1.3 Vergleich der primär regulierten Gene mit Expressionsdatensätzen anderer Experimente	55
3.1.4 <i>In silico</i> -Promotoranalyse der primär regulierten Gene	58
3.2 Untersuchung des LTR-Einflusses auf die metabolische Ebene	60
3.2.1 Untersuchung ausgewählter Produkte des Grund- und Energiestoffwechsels nach Lichtakklimation	61
3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Stärkeakkumulation nach Lichtakklimation	64
3.2.3 Umfassende Untersuchung der LTR auf Metabolitebene: <i>Metabolic Profiling</i>	65
3.2.4 Einfluss der Lichtqualität auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und der <i>stn7</i> -Mutante	71
3.3 Physiologische Untersuchung ausgewählter PRGs anhand von Mutantenlinien	73
3.3.1 Genotypische Analyse der T-DNA-Mutanten	75
3.3.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenz und Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses	76
3.3.3 Mutanten mit beeinträchtigter LTR	80
4 Diskussion	81
4.1 Veränderungen während der LTR auf der Transkriptebene	82
4.1.1 Die Dynamik der LTR auf Transkriptebene	82
4.1.2 Zeitige Veränderungen und primär regulierte Gene	84
4.1.3 „Signaturen“ anderer Einflüsse bei primär regulierten Genen	88
4.1.4 <i>In-silico</i> Promotoranalyse der primär regulierten Gene	89
4.2 Veränderungen während der LTR auf metabolischer Ebene	91
4.2.1 Beteiligung ausgewählter Produkte des Grund- und Energiestoffwechsels an der LTR	91
4.2.2 <i>Metabolic Profiling</i> : Parallele Analyse von Stoffwechselmetaboliten	94
4.3 Untersuchung ausgewählter PRGs anhand von Mutanten	99
4.4 Redoxkontrolle der photosynthetischen Lichtakklimation	101
5 Bibliographie	105
6 Anhang	i
Publikationen	I
Posterpräsentationen und Vorträge	I
Vorträge	I
Posterpräsentationen	II
Selbständigkeitserklärung	III
Lebenslauf	IV
Danksagung	V

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ABA	<i>abscisic acid</i>
Abb.	Abbildung
AGPase	ADP-Glucose-Phosphorylase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
APX	Ascorbatperoxidase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Chl	Chlorophyll
CHS	Chalconsynthase
Cyt	Cytochrom
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heisst
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FBPase	Fruktose-1,6-bisphosphatase
FG	Frischgewicht
FDR	<i>false discovery rate</i>
FNR	Ferredoxin-NADP-Reduktase
FTR	Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase
<i>et al.</i>	et alii (Latein, und andere; hier: Mitarbeiter/innen)
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
Grx	Glutaredoxin
GSH / GSSG	Glutathion (reduzierte / oxidierte Form)
GST	<i>gene sequence tag</i>
GUS	β-Glucuronidase
HCL	Hierarchisches Clustern
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LHC	lichtsammelnder Antennenkomplex der Photosysteme (<i>light harvesting complex</i>)
LRE	lichtresponsives Element
LTR	<i>Long Term Response</i>
μE	Mikroeinsteint
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS-Medium	Medium nach (Murashige und Skoog 1962)
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat) + H ⁺
NADP-MDH	NADP-abhängige Malatdehydrogenase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEP	<i>nuclear encoded polymerase</i>
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung

PC	Plastocyanin
PCA	<i>principal component analysis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	<i>plastid encoded polymerase</i>
PET	photosynthetischer Elektronentransport
pH	<i>pondus hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Hydrogenium-Ionen-Konzentration)
Phy	Phytochrom
PQ	Plastochinon
PRGs	primär regulierte Gene
Prx	Peroxiredoxin
PS / PSI / PSII	Photosystem / Photosystem I / Photosystem II
®	<i>registered</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäuren)
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s. / s.o. / s.u.	siehe / siehe oben / siehe unten
SBPase	Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab.	Tabelle
TBE	Trisbase/Borsäure/EDTA
t-DNA	Transfer-DNA
™	Markenzeichen (Trade Mark)
t-RNA	transfer-RNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trx	Thioredoxin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewichts-Volumen-Verhältnis
WL	Weißlicht
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Die Lichtbedingungen in der Umwelt einer Pflanze sind entscheidend für den Ablauf und die Effizienz der Photosynthese. Je nach Habitat sind Pflanzen Veränderungen in der Lichtintensität oder Lichtqualität, d.h. der spektralen Zusammensetzung des Lichtes, ausgesetzt. Lichtqualitätsgradienten treten bspw. in dichten Pflanzenbeständen wie Wäldern oder Wiesen auf. Um bei veränderten Lichtbedingungen eine effiziente Photosynthese zu gewährleisten, verfügen Pflanzen über eine Reihe von Akklimationsmechanismen.

In dieser Arbeit wurde die Akklimation an veränderte Lichtqualitäten bei dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die betrachtete Langzeitantwort (*long term response*, LTR) ist durch Umstrukturierung des Photosyntheseapparates, d.h. die Anpassung der Photosystemstöchiometrie, charakterisiert. Sie ist vor allem unter Schwachlichtbedingungen von entscheidender Bedeutung und wird durch photosynthetische Redoxsignale reguliert. Da der Photosyntheseapparat aus Untereinheiten besteht, die im Zellkern und in der Plastide kodiert sind, ist während der LTR eine genaue Koordination der Genexpression in beiden Kompartimenten erforderlich.

Während die Anpassung der Photosystemstöchiometrie bereits gut untersucht wurde, ist der Ablauf und die Regulation der LTR v.a. auf Ebene der Zelle oder Pflanze zum Großteil noch unverstanden. In welchem Umfang retrograde Kommunikation stattfindet, wie schnell Signale übertragen werden oder inwiefern verschiedene Regulationsebenen an der LTR beteiligt sind, ist weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit wurde die LTR erstmalig mit einem systembiologischen Ansatz untersucht und umfassend auf verschiedenen Ebenen parallel analysiert. Dazu wurden Lichtquellen verwendet, die bevorzugt eines der beiden Photosysteme anregen. Sie wurden genutzt, um Lichtqualitätsunterschiede und damit ein Oxidations- bzw. Reduktionssignal im photosynthetischen Elektronentransport zu erzeugen und die LTR unter reproduzierbaren Bedingungen zu untersuchen.

Anhand von *Array*-Analysen wurde gezeigt, dass der zeitliche Verlauf der LTR durch umfangreiche Veränderungen auf Transkriptebene charakterisiert ist. Neben Photosyntheseenen wurde eine Vielzahl von Genen reguliert, deren Produkte regulatorische Funktion erfüllen oder am Stoffwechsel beteiligt sind. Die Daten deuten auf eine komplexe Regulation während der LTR hin, die über die reine Anpassung der Photosystemstöchiometrie hinausgeht, und lassen eine Beteiligung des Stoffwechsels an der LTR vermuten. Der zeitliche Verlauf der LTR auf Transkriptebene zeigt, dass es sich bei der Reaktion auf ein Oxidations- bzw. auf ein Reduktionssignal nicht direkt um die Hin- und Rückreaktion eines Prozesses, sondern vielmehr um verschiedene Akklimationsprogramme handelt. Dabei wurden erste Veränderungen in der Genexpression innerhalb von 30 min nach Erzeugung

eines Redoxsignales beobachtet, was auf eine schnelle Übertragung photosynthetischer Signale aus den Chloroplasten in den Zellkern (retrograde Kommunikation) schließen lässt.

In dieser Arbeit wurden 105 Gene identifiziert, die schnell und deutlich nach Veränderung der Lichtqualität reguliert wurden. Bei diesen primär regulierten Genen (PRGs) handelt es sich um mögliche direkte Zielgene photosynthetischer Redoxsignale. Die meisten dieser Gene wurden erstmalig mit einer Redoxregulation und der LTR in Verbindung gebracht und stellen interessante Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen dar.

Der umfangreiche Vergleich der PRGs mit publizierten Expressionsdatensätzen zeigt, dass Phytochrome (Phy) und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu Beginn der LTR kaum eine Rolle spielen. Damit wird bestätigt, dass die LTR eine eigenständige Reaktion darstellt und unabhängig von Phy- und ROS-vermittelten Prozessen abläuft. Um mögliche Regulationsmechanismen zu verstehen, wurden die Promotoren der PRGs auf gemeinsame Motive untersucht. *In-silico*-Analysen zeigen, dass lichtresponsive Elemente überwiegen, ein „redox-responsives Element“ konnte nicht identifiziert werden.

Die tatsächliche Beteiligung des Metabolismus als weitere Funktions- und Regulationsebene bei der LTR wurde anhand von Messungen des Stärkegehaltes und des Redoxstatus von NADP nachgewiesen. Dabei sind Veränderungen auf der Ebene des Stoffwechsels nicht auf Einzelmetabolite beschränkt. Signifikante Veränderungen treten während der LTR bei einer Reihe von Verbindungen des Zuckermetabolismus, der Aminosäuresynthesen sowie der Atmung auf, wie mittels *Metabolic Profiling* nachgewiesen wurde. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Pflanzen je nach Lichtqualität verschiedene metabolische Zustände annehmen und die Anpassung des Primärmetabolismus an „Zustand 1“ bzw. „Zustand 2“ reversibel erfolgt. Langzeitversuche mit Wildtyp-Pflanzen und der *stm7*-Mutante belegen die Auswirkung dieser metabolischen Zustände auf physiologischer Ebene.

Ausgehend von den Daten der *Array*-Analysen wurden für zwanzig ausgewählte PRGs *knock-out* Mutanten auf physiologischer Ebene überprüft und auf eine Beeinträchtigung der LTR hin untersucht. Auf diese Weise konnten zwei Kandidaten für LTR-Mutanten identifiziert werden.

Basierend auf den in dieser Arbeit erhobenen Daten wurde ein neues übergreifendes Modell entwickelt, das die LTR über das Zusammenspiel von Signalen aus zwei Redoxsystemen, dem Plastochinon-Pool und dem NADP/Thioredoxin-System, erklärt. Die Annahme zweier zusammenwirkender Redoxsignale ermöglicht es weiterhin, die LTR in Beziehung zu anderen Lichtakklimationsreaktionen zu stellen. Existierende Modelle zur photosynthetischen Redoxkontrolle und Daten, die bisher nicht miteinander in Verbindung gebracht wurden bzw. gegensätzliche Daten können mit dem hier vorgeschlagenen hierarchisch strukturierten Modell zusammengeführt werden.

1 Einleitung

1.1 Die Plastide als Bestandteil der Pflanzenzelle

Plastiden stellen eigene genetische und metabolische Kompartimente der Pflanzenzelle dar und sind für fast alle Aspekte pflanzlichen Lebens von essenzieller Bedeutung. Neben ihrer Hauptfunktion, der Photosynthese, sind sie an einer Reihe von zentralen Stoffwechselwegen wie der Assimilation von Stickstoff und Schwefel oder dem Metabolismus von Aminosäuren, Lipiden, Hormonen oder Sekundärstoffen beteiligt. Bei höheren Pflanzen können sich je nach Lichtverhältnissen und Gewebe aus den Proplastiden junger Zellen unterschiedliche Plastidentypen mit verschiedener Morphologie und Funktion entwickeln. Grüne Chloroplasten treten in photosynthetisch aktiven Geweben auf, während farbige, Xanthophyll- oder Carotinoid-reiche Chromoplasten vor allem in Blüten und Früchten vorkommen. Amyloplasten, Elaioplasten und Proteoplasten dienen der Speicherung von Stärke, Fetten und Proteinen.

Plastiden sind vermutlich vor ca. 1,5 Milliarden Jahren endosymbiontisch durch die Aufnahme eines photosynthetischen Prokaryoten (ein Vorfahr der heutigen Cyanobakterien) in eine heterotrophe, eukaryotische Wirtszelle entstanden (Mereschkowski 1905; Douglas 1998; Douglas und Raven 2003). Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass die Plastiden heutiger Pflanzen monophyletischen Ursprungs sind (Douglas 1998). Während der Entwicklung vom ursprünglich frei lebenden Prokaryoten zum Zellorganell verlor der Endosymbiont einen Großteil seiner Autonomie. Die Mehrheit der Gene des Endosymbionten wurde in das Genom der Wirtszelle integriert oder ging verloren (Martin und Herrmann 1998). Dieser massive Gentransfer ermöglichte es dem Wirt, Kontrolle über Funktion und Entwicklung der neuen Organelle auszuüben. Dennoch ist das „Erbe“ der Endosymbiose erhalten geblieben. Die Plastide bleibt von zwei Membranen umgeben, deren äußere ursprünglich von der Wirtszelle stammt, während die innere auf den cyanobakteriellen Endosymbiont zurückgeht. Auch bleibt die Plastide weiterhin Ort der Photosynthese und anderer biochemischer Stoffwechselwege. Sie enthält ein eigenes kleines Genom (Plastom) sowie eine eigene Maschinerie zur Proteinbiosynthese (Transkription, Translation). Daher handelt es sich bei Plastiden um genetisch semiautonome Organellen. Das Plastom höherer Pflanzen umfasst etwa 120 – 200 kb und deckt etwa 80-130 Gene ab, deren Zusammensetzung relativ konserviert ist (Goldschmidt-Clermont 1998; Howe *et al.*, 2003). Die im Plastom verbliebenen Gene kodieren v.a. für Komponenten des plastidären Transkriptions- und Translationsapparates (wie rRNAs, tRNAs, Ribosomen, Untereinheiten

der RNA-Polymerase) sowie für Proteine, die an der Photosynthese beteiligt sind. Eine wachsende Zahl von bekannten Plastom-Sequenzen – bisher wurden 114 verschiedene Plastome sequenziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/ORGANELLES/>) – stellen Information zum Verständnis der Phylogenie der Plastiden und beteiligter Evolutionsmechanismen zu Verfügung (Shimada und Sugiura 1991; Martin *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006).

Die große Mehrheit der Proteine der Plastide ist jedoch im Zellkern kodiert. Nach derzeitigen Schätzungen besteht das plastidäre Proteom je nach Plastidentyp und Entwicklungszustand aus ca. 2500-4500 verschiedenen Proteinen (Abdallah *et al.*, 2000; Kleffmann *et al.*, 2004; van Wijk 2004). Das bedeutet: für die meisten Proteine des Plastiden müssen je nach Bedarf Kerngene exprimiert, ihre mRNA im Zytoplasma translatiert und die synthetisierten Proteine in die Plastide importiert werden. Die enge Verknüpfung von Plastide und Zellkern spiegelt sich u.a. besonders deutlich in der Regulation der Genexpression im Plastiden und dem Aufbau von Multiproteinkomplexen wider. An der Transkription von Plastidengenen ist neben der plastidenkodierten PEP (*plastid encoded polymerase*) prokaryotischen Ursprungs eine kernkodierte phagentypische RNA-Polymerase, die NEP (*nuclear encoded polymerase*), beteiligt. Multiproteinkomplexe in der Plastide bestehen typischerweise sowohl aus kern- als auch plastomkodierten Untereinheiten. Ein Beispiel dafür ist der Photosyntheseapparat, dessen zentrale Untereinheiten (*Core*) plastidär, die periphere Untereinheiten jedoch im Zellkern kodiert sind (Race *et al.*, 1999)(Abb.1.2).

Kommunikation der getragenden Kompartimente

Um die Funktion von Plastiden als Ort der Photosynthese und zentrales biochemisches Kompartiment zu gewährleisten, ist eine genaue Koordination der Vorgänge in der Plastide und dem Zellkern und damit eine umfangreiche Kommunikation zwischen den beiden Kompartimenten erforderlich. Im Laufe der Evolution hat sich ein komplexes Signalnetzwerk entwickelt, das die Organelle mit dem Funktionszustand der restlichen Zelle verknüpft (Abb. 1.1). So entstanden Signalmechanismen, die dem Zellkern die Kontrolle über den Proteinstatus der Plastide ermöglichen. Diese „anterograde“ Kontrolle wird durch die Rückkopplung über Signale aus der Plastide an den Zellkern komplementiert. Über diese „retrograden“ Signale kann die Plastide Kontrolle über die Genexpression im Zellkern ausüben. Zusätzliche Komplexität bei dem Austausch und der Verarbeitung anterograder und retrograder Signale ergibt sich u.a. daraus, dass es in einer typischen Pflanzenzelle einen Zellkern gibt, aber mehrere Plastiden (bis zu 100) mit eigenem Genom vorhanden sind. Die komplexe Kommunikation zwischen den zwei Kompartimenten ermöglicht es der Pflanze auch, Umweltveränderungen, z.B. bei Lichtbedingungen wahrzunehmen, zu integrieren und

Polymerase wird die plastidenkodierte PEP über kernkodierte σ -Faktoren reguliert. Ebenfalls entscheidend sind posttranskriptionelle Prozesse, die zum Großteil durch kernkodierte Faktoren vermittelt werden (Leon *et al.*, 1998; Choquet und Wollman 2002). Zu diesen Prozessen zählen Prozessierung, Edierung, Stabilisierung und Translation der Transkripte.

(III) Posttranslationale Modifikationen, an denen kernkodierte Komponenten beteiligt sind, beeinflussen und kontrollieren den Stoffwechsel der Plastide. Die Aktivität von Enzymen oder Proteinkomplexen wird, besonders ausgeprägt im Chloroplasten, über Modifikationen wie Phosphorylierung von Aminosäuren oder Oxidation/Reduktion von Sulfhydrylgruppen reguliert (Aro und Andersson 2001; Blankenship 2002).

(IV) Schließlich ist die Entwicklung, Differenzierung und Teilung von Plastiden eng mit dem Entwicklungszustand der Zelle verknüpft und wird anterograd über kernkodierte Faktoren kontrolliert (Osteryoung und Nunnari 2003; Aluru *et al.*, 2006).

Retrogrades Signalling

Plastiden unterliegen jedoch nicht ausschließlich der anterograden Kontrolle; sie können selbst Signale aussenden (retrograde Signale) und damit die Expression von Kerngenen kontrollieren. Diese Rückkopplung ermöglicht es, die Genexpression im Zellkern auf den funktionellen Status der Plastide abzustimmen. Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass mehrere verschiedene retrograde Signale und Signaltransduktionswege existieren. Sie gehen auf Vorgänge der Plastidengenexpression (PGE; I), der Pigmentbiosynthesen (II), der Photosynthese oder auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (III) zurück und sind in verschiedenen Übersichtsartikeln detaillierter beschrieben (z.B. Papenbrock und Grimm 2001; Rodermeil 2001; Surpin *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2003; Leister 2005; Bräutigam *et al.*, 2007). Die molekulare Identität vieler retrograder Signale bzw. die genauen Signaltransduktionsmechanismen sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

(I) Erste Hinweise auf retrogrades *Signalling* gehen auf Untersuchungen der *albostrians*-Mutante bei Gerste zurück. Diese Mutante weist Defekte bei plastidären Ribosomen auf und zeigt Veränderungen in der Transkriptakkumulation von Kerngenen (Bradbeer *et al.*, 1979; Hess *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1994). Weitere Hinweise für retrograde Signale aus der Plastidengenexpression stammen aus Experimenten mit verschiedenen Inhibitoren der plastidären Translation (Chloramphenicol, Lincomycin, Streptomycin) oder Transkription (Tagetitoxin, Rifampicin, Naldixinsäure) (Rapp und Mullet 1991; Adamska 1995; Gray *et al.*, 1995; Sullivan und Gray 1999). Retrograde Signale der PGE spielen hauptsächlich während der frühen Plastidenentwicklung eine Rolle (Hess *et al.*, 1994; Gray *et al.*, 2003). Mit GUN1 wurde ein Faktor identifiziert, der an diesem Signalweg (und möglicherweise auch anderen retrograden Signalwegen) beteiligt ist (Koussevitzky *et al.*, 2007).

(II) Bei der Grünalge *Chlamydomonas* und bei höheren Pflanzen wurde gezeigt, dass Intermediate der Chlorophyllbiosynthese die Akkumulation der Transkriptmengen von Kerngenen (*Lhcb*, *Hsp70*) beeinflussen (Johanningmeier und Howell 1984; Kittsteiner *et al.*, 1991; Kropat *et al.*, 1997) und daher mögliche retrograde Signale darstellen (Rüdiger und Grimm, 2006). Die Beeinträchtigung der Biosynthese von Carotenoiden durch den Inhibitor Norflurazon oder Mutationen kann zu photooxidativen Schäden führen, die, obwohl auf den Chloroplasten beschränkt (Reiß *et al.*, 1983), ebenfalls Einfluss auf die Expression von Kerngenen z.B. *Lhcb1*; *PetE* und *RbcS* haben (Mayfield und Taylor 1984; Oelmüller und Mohr 1986). Anhand der *gun*-Mutanten (*genomes uncoupled*) bei *Arabidopsis* konnten schließlich Komponenten identifiziert werden, die am retrograden *Signalling* beteiligt sind. Durch Norflurazonbehandlung wurde bei diesen Mutanten, anders als beim Wildtyp, die Expression des Kerngenes *Lhcb* nicht reprimiert (Susek *et al.*, 1993). *Gun2* und *3* kodieren für zwei Enzyme des Fe-Zweiges des Tetrapyrrolstoffwechsels; *Gun4* und *5* für einen Aktivator bzw. die Untereinheit H der Mg-Chelatase, eines Schlüsselenzyms der Chlorophyllbiosynthese (Mochizuki *et al.*, 2001; Larkin *et al.*, 2003). Als Signalmolekül werden derzeit Mg-Protoporphyrin IX bzw. Fe-Protoporphyrin IX (Häm), Intermediate des Tetrapyrrolstoffwechsels, diskutiert (Vasileuskaya *et al.*, 2005; Ankele *et al.*, 2007)

(III) Retrograde Redoxsignale, die sich direkt oder indirekt aus dem photosynthetischen Elektronentransport (PET) ableiten, verknüpfen die Lichtreaktion im Chloroplasten mit der Genexpression im Zellkern. Bisher wurden Signale identifiziert, die aus dem Plastochinonpool oder nachgeschalteten Komponenten des PET stammen (Escoubas *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1995; Pfanschmidt *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Fey *et al.*, 2005) stammen. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff (1O_2), deren Entstehung im Chloroplasten eng mit dem PET verknüpft ist, zwei verschiedene retrograde Signalwege aktivieren (Kovtun *et al.*, 2000; Meskauskiene *et al.*, 2001; op den Camp *et al.*, 2003; Apel und Hirt 2004).

Interaktionen der retrograden Signalwege untereinander und mit weiteren Signalmechanismen wie ABA- und Zucker-*Signalling* wurden diskutiert und teilweise nachgewiesen und unterstreichen die wichtige Rolle der retrograden Kommunikation als Teil des Signalnetzwerkes der Zelle (Karpinski *et al.*, 1997; Karpinski *et al.*, 1999; Oswald *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2006).

1.2 Die Photosynthese als Hauptfunktion des Chloroplasten

Die Photosynthese ist der wichtigste biochemische Prozess der Erde. Lichtenergie wird in chemische Energie umgewandelt und steht damit photosynthetischen Organismen, die wiederum die Grundlage für nahezu alles heterotrophe Leben sind, für Wachstum und Reproduktion zur Verfügung.

1.2.1 Bau und Funktion des Photosyntheseapparates

Die Photosynthese findet bei höheren Pflanzen in den Chloroplasten statt. Sie enthalten komplexe Membranstrukturen, die Thylakoide, in welche die Komponenten des Photosyntheseapparates eingebettet sind. Im Wesentlichen besteht der Photosyntheseapparat aus den integralen Multiproteinkomplexen Photosystem II (PSII), dem Cytochrom *b₆f*-Komplex (Cyt *b₆f*-Komplex), Photosystem I (PSI) und der ATP-Synthase (Abb. 1.2). Während PSII vorwiegend in den Granathylakoiden, Regionen gestapelter Thylakoidmembranen, lokalisiert ist, befinden sich PSI und die ATP-Synthase hauptsächlich in Stromthylakoiden, d.h. in ungestapelten Membranbereichen. Der Cyt *b₆f*-Komplex ist sowohl über Grana- als auch über Stromathylakoide verteilt. Elektrochemisch sind die zwei Photosysteme (PSI und PSII) in Serie geschaltet und über den Cyt *b₆f*-Komplex sowie die mobilen Elektronenüberträger Plastochinon (PQ) und Plastocyanin (PC) energetisch gekoppelt. Jedes Photosystem setzt sich aus einem Kern-(*Core*-)Komplex einschließlich Reaktionszentrum und einem Lichtsammelsystem (Antennenkomplex) zusammen. Die Antennenkomplexe (*light harvesting complex, LHC*) enthalten eine Reihe von akzessorischen Pigmenten, hauptsächlich Chlorophylle, und sind für die Absorption von Lichtquanten und die Weiterleitung der absorbierten Strahlungsenergie zu den Reaktionszentren (Förster-Energietransfer) verantwortlich (Förster 1946). Dabei weisen PSII und PSI unterschiedliche Absorptionsmaxima auf (680 und 700 nm). Im Reaktionszentrum der Photosysteme führt schließlich die Anregung eines speziellen Chlorophyll *a*-Paares (*special pair*) zu einer gerichteten Ladungstrennung und der Abgabe eines „energiereichen“ Elektrons, das einen primären Elektronenakzeptor reduziert.

Im Licht werden durch Ladungstrennung im PSII Elektronen auf den Primärakzeptor (Phäophytin) und anschließend entlang eines Redoxpotential-Gradienten über Plastochinon zum Cyt *b₆f*-Komplex übertragen. Vom Cyt *b₆f*-Komplex werden Elektronen über Plastocyanin weiter zum PSI transportiert und damit das Elektronendefizit am oxidierten PSI ausgeglichen. Nach Anregung von PSI (Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase) durch Lichtenergie werden schließlich Elektronen über Ferredoxin und die Ferredoxin-NADP-

hohe Effizienz der Photosynthese bei einem breiten Spektrum von Umweltbedingungen zu gewährleisten, verfügen Pflanzen als sessile Organismen über eine Reihe von Strategien und Anpassungsmechanismen.

Unter Starklichtbedingungen (oder auch bei niedrigen Temperaturen) kann überschüssige Anregungsenergie dazu führen, dass verstärkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen und Photoinhibition, z.B. durch Schäden am D1 Protein des PSII, auftritt. Um das zu vermeiden, können Quenchingprozesse wie der Xanthophyllzyklus oder PsbS überschüssige Anregungsenergie als Wärme abgeben (Young *et al.*, 1997; Niyogi 2000). Weiterhin können Starklichtschäden am PSII durch schnellen Abbau und Ersetzen des D1-Proteins effizient repariert werden (Vasilikiotis und Melis 1994; Baena-González und Aro 1999).

Darüber hinaus stehen der Zelle eine Reihe von Mechanismen zur Entgiftung von hochreaktiven ROS zur Verfügung (siehe 1.3). Bei einer längerfristigen Anpassung an erhöhte Lichtintensitäten nimmt die Menge von Proteinen des LHCII ab, während die Anzahl von Komplexen des Photosyntheseapparates (PSII, Cyt *b6f*, ATP-Synthase) und von Komponenten des Calvinzyklus erhöht wird (Bailey *et al.*, 2001; Walters 2005).

Unter Schwachlichtbedingungen wirken sich dagegen Lichtqualitätsgradienten, die bspw. in dichten Pflanzenbeständen auftreten, auf die Effizienz der Photosynthese aus. Ungleichgewichte in der Verteilung der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen werden kurzfristig über die *state transition* ausgeglichen (Bonaventura und Myers 1969; Murata 1969). Dabei wird der relative Antennenquerschnitt der beiden Photosysteme über die Verschiebung des mobilen LHCII angepasst. Längerfristig können Pflanzen Anregungsungleichgewichte über die Anpassung der Photosystemstöchiometrie kompensieren (Melis 1991; Fujita 1997; Allen und Pfannschmidt 2000). Diese Langzeitantwort (*long term response*, LTR) erfordert die Synthese neuer Komponenten und damit die Regulation der Genexpression in Chloroplast und Zellkern. Auf die LTR wird unter 1.4 genauer eingegangen.

Bei vielen Umweltveränderungen werden Komponenten des PET oder daran gekoppelte Komponenten wie bspw. Thioredoxin oder Glutathion in ihrem Redoxzustand verändert. Redox-aktive Komponenten wiederum spielen bei photosynthetischen Akklimationsantworten eine entscheidende Rolle und können, als Teil des Redoxnetzwerkes der Zelle, gezielt Enzymaktivitäten bzw. die Expression von plastidären und nukleären Genen beeinflussen (Scheibe 1991; Link 2003; Baier und Dietz 2005; Fey *et al.*, 2005b; Pfannschmidt und Liere 2005). Die Photosynthese erfüllt damit eine doppelte Funktion: Sie dient der Energiefixierung und fungiert außerdem als Umweltsensor, der Redoxsignale erzeugen und entsprechende Akklimationsantworten initiieren kann.

1.3 Das Redoxnetzwerk der Zelle

1.3.1 Begriffe

In biologischen Systemen wird ein Großteil der Energie über Redoxreaktionen freigesetzt oder gespeichert. Darüber hinaus kann über den Zustand redox-aktiver Komponenten Information aufgenommen bzw. weitergeleitet werden (siehe 1.2). Zunächst eine kurze Erklärung der verwendeten Begriffe:

Reduktions-Oxidations-(Redox)-Reaktionen sind chemische Reaktionen, bei denen sich die Oxidationszahl von Atomen durch die tatsächliche oder formale Übertragung von Elektronen verändert. Reduktion (Erniedrigung der Oxidationszahl) steht dabei für Elektronenaufnahme durch einen Akzeptor, Oxidation (Erhöhung der Oxidationszahl) für die Abgabe von Elektronen durch einen Donor. Der „Redoxzustand“ einer Verbindung bezieht sich somit auf den oxidierten bzw. reduzierten Zustand eines Moleküls oder eines Pools von Molekülen. Verändert sich der Redoxzustand einer Verbindung z.B. durch Veränderungen in der Umwelt, enthält diese Veränderung Information, die weitergegeben und eine Reaktion auslösen kann. Daher können Veränderungen im Redoxzustand auch als „Redoxsignale“ wirken. Die Redoxregulation eines biologischen Prozesses beschreibt schließlich die Abhängigkeit einer molekularen Antwort vom Redoxzustand von einer oder mehreren beteiligten Komponenten. Jedes Redoxpaar, das Elektronen austauschen kann, besitzt ein elektrisches Potential. Dieses Redoxpotential E (in Volt) ist konzentrationsabhängig und wird durch die Nernst-Gleichung beschrieben.

$$E = E_m - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}}$$

Gl. 1.1: Nernst-Gleichung: E : Redoxpotential, E_m : Standard- oder Mittelpunktspotential, R : universelle Gaskonstante, T : absolute Temperatur, z : Anzahl der übertragenen Elektronen, F : Faraday-Konstante, a : Aktivität des betreffenden Redoxpartners. Die Aktivität ist eine konzentrationsabhängige Größe („effektive Konzentration“), die bei verdünnten Lösungen näherungsweise durch die analytische Konzentration ersetzt werden kann.

Die Gleichung gibt das Redoxpotential eines Redoxpaares gegenüber einer Normal-Wasserstoffhalbzelle unter Standardbedingungen an. Konventionsgemäß zeigen positivere Werte eine stärkere Tendenz zur Aufnahme von Elektronen an.

1.3.2 Hauptkomponenten des zellulären Redoxnetzwerkes

Das zelluläre Redoxgleichgewicht wird durch eine Vielzahl von redoxaktiven Komponenten bestimmt und ist entscheidend für die Funktion der Zelle. Daher verfügt die Zelle über eine Reihe von Mechanismen, um die Redoxhomöostase aufrechtzuerhalten. Für viele redoxaktive Komponenten wurde darüber hinaus eine Beteiligung am *Signalling* (als Ursprung oder Überträger von Signalen) beobachtet bzw. diskutiert. Hauptkomponenten des zellulären Redoxnetzwerkes sind Pyridinnukleotide, Ascorbat, Glutathion, Tocopherole, Thioredoxine, Glutaredoxine sowie Peroxiredoxine; reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen ebenfalls entscheidend das Redoxgleichgewicht der Zelle.

Die *Pyridinnukleotide* Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) und das zugehörige Phosphat (NADP) fungieren in ihrer reduzierten Form (NADH, NADPH) als „Reduktionsäquivalente“ und sind an einer Vielzahl von assimilatorischen und dissimilatorischen Prozessen beteiligt. Sie sind Kofaktoren von zahlreichen Wasserstoff-übertragenden Enzymen wie Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen und können über allosterische Effekte Enzymaktivitäten regulieren oder Einfluss auf den Redoxzustand weiterer zellulärer Redoxkomponenten, bspw. Glutathion, nehmen. Bei der Photosynthese spielt NADP eine zentrale Rolle als Elektronenendakzeptor des PET. Über ihre Beteiligung an Stoffwechselprozessen und am *Signalling* sind Pyridinnukleotide fest in das Redoxnetzwerk der Zelle eingebunden (s.u.).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxid Anionen ($\text{O}_2\cdot^-$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) stellen hochreaktive Verbindungen dar und werden ständig bei Prozessen des aeroben Stoffwechsels wie der Respiration oder der Photosynthese als Nebenprodukte gebildet. Um oxidative Schäden zu vermeiden, verfügt die Pflanze über ein umfangreiches Arsenal von Entgiftungsmechanismen. Unter biotischen oder abiotischen Stressbedingungen kann jedoch die Entstehung den Abbau übersteigen und zur Anreicherung von ROS führen. Vor allem unter Starklichtbedingungen oder Kälte, Nährstoffmangel oder Trockenheit in Kombination mit Licht nimmt die Bildung von ROS am PSI und PSII stark zu. Wasserstoffperoxid stellt das häufigste ROS der Pflanzenzelle dar. Im Chloroplasten wird H_2O_2 überwiegend am PSI gebildet, wenn Elektronen vom reduzierten Ferredoxin auf Sauerstoff übertragen und gebildete Superoxid-Anionen disproportioniert werden (Mehler Reaktion, Mehler 1951). Singulett-Sauerstoff, eine nicht-radikalische ROS, entsteht verstärkt am PSII, wenn bei „Überreduktion“ des PET Triplet P680 entsteht und Energietransfer auf Sauerstoff stattfindet. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von $^1\text{O}_2$ (~ 200 ns) treten oxidative

Schäden v.a. am Entstehungsort im Reaktionszentrum von PSII auf (op den Camp *et al.*, 2003). Neben den Chloroplasten sind Mitochondrien und Peroxisomen Hauptorte der ROS-Entstehung; ROS können allerdings auch im endoplasmatischen Retikulum (ER), Zytoplasma und an der Plasmamembran gebildet werden (Mittler *et al.*, 2004). Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass ROS nicht nur toxische Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels darstellen. Sie spielen auch bei der Vermittlung und Regulation biologischer Prozesse wie Wachstum, Stressantworten oder dem programmierten Zelltod eine wichtige Rolle (Mittler *et al.*, 2004).

An der Entgiftung von ROS sind bedeutende zelluläre Redoxpuffer wie Ascorbat und Glutathion (GSH) und Enzyme wie Superoxid-Dismutasen (SOD), Ascorbat-Peroxidasen (APX), Glutathion-Peroxidasen (GPX) oder Katalasen (CAT) beteiligt.

Ascorbat (Vitamin C) ist das wichtigste primäre Antioxidanz bei Pflanzen und tritt im Chloroplasten in Konzentrationen von bis zu 300 mM auf (Smirnoff 2000). Ascorbat wird durch ROS zu Monodehydroascorbat (MDA) bzw. Dehydroascorbat (DHA) oxidiert. Durch diese Reaktion werden ROS unschädlich gemacht.

Bei *Glutathion* (GSH) handelt es sich um ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin (γ -glu-cys-gly), das insbesondere im Chloroplasten in hohen Konzentrationen (im mM Bereich) vorkommt und neben seiner Funktion als Antioxidanz auch im Schwefelmetabolismus und als Signalgeber eine wichtige Rolle spielt (Noctor und Foyer 1998; Mullineaux und Rausch 2005). Glutathion kann mit Hilfe der Glutathion-Reduktase (GR) reversibel von der oxidierten, dimeren Form (GSSG) wieder in die reduzierte (GSH) überführt werden.

Die erste „Verteidigungslinie“ gegen ROS stellt die SOD dar, indem sie $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 dismutiert. Wasserstoffperoxid wird durch Katalasen (Peroxisomen), den GPX-Zyklus (Zytosol) und den Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Chloroplast u.a. Kompartimente) entgiftet (Asada 1999; Apel und Hirt 2004). Bei letzterem wird H_2O_2 durch Ascorbat-Peroxidasen zu Wasser reduziert, wobei Ascorbat als Elektronendonator fungiert und reduziertes Glutathion benötigt wird, um Ascorbat zu regenerieren. Schließlich wird oxidiertes Glutathion durch die Glutathionreduktase (GR) unter NAD(P)H-Verbrauch wieder in seine reduzierte Form überführt. Alternativ dazu kann oxidiertes Ascorbat im Chloroplasten durch Elektronen aus dem PET durch reduziertes Ferredoxin regeneriert werden (Grodin und Beck 1979; Asada 1999; Mittler *et al.*, 2004). Damit dient der sogenannte Wasser-Wasser-Zyklus neben der Entgiftung von ROS auch dem Ableiten überschüssiger Anregungsenergie.

Schließlich stellen *Tocopherole* (Vitamin E-Verbindungen) fettlösliche Redox-Komponenten dar, die in der Plastide synthetisiert werden und Membranen durch das Abfangen von Fettsäureradikalen oder ROS schützen. Die Regeneration von Tocopherol erfolgt bspw. durch

Ascorbat (Munne-Bosch und Alegre 2002; Dietz 2003). Oxidationsprodukte wie z.B. Jasmonat, die sich aus Lipidhydroperoxiden ableiten, gehören zur Gruppe der sogenannten Oxilipine, die bspw. Abwehrreaktionen oder Stresstoleranz bei Pathogenbefall oder bei Verwundung durch Herbivore vermitteln (Feussner und Wasternack 2002).

Thioredoxine (Trx) sind kleine (~12 kDa), ubiquitäre, redox-aktive Proteine, welche die Aktivität von Enzymen über die Reduktion intramolekularer Disulfidbrücken regulieren (Abb. 1.3). Pflanzen verfügen im Gegensatz zu anderen Organismen über komplexe Thioredoxinsysteme: Bisher sind bei Pflanzen etwa 20 verschiedene Trx bekannt, die alle kernkodiert sind und in 6 Gruppen unterteilt werden können (Laloi *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2002; Buchanan und Luan 2005). Thioredoxine der Gruppen *f*, *m*, *x* und *y* sind im Chloroplasten lokalisiert, während Thioredoxine vom Typ *o* im Mitochondrium aktiv sind und Typ *h* Thioredoxine in verschiedenen Kompartimenten wie Zytosol, ER, Mitochondrium oder Zellkern auftreten.

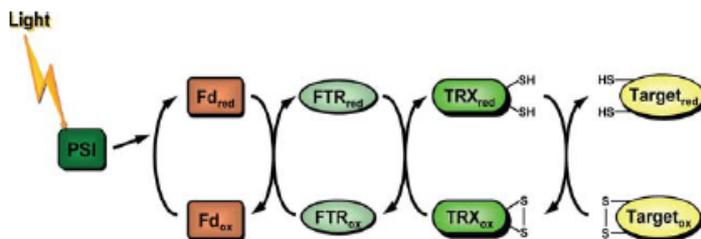


Abb. 1.3: Redox-Regulation über das Ferredoxin-Thioredoxin-System.

Über Ferredoxin (Fd) werden Elektronen aus dem PET mit Hilfe der Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) auf Thioredoxin (Trx) übertragen und dessen regulatorische Disulfidbrücke reduziert. Reduziertes Trx wiederum kann Disulfidbrücken bei einer Reihe von Proteinen reduzieren und damit ihre Aktivität regulieren (aus Lemaire *et al.*, 2007).

Im Chloroplasten spielen Thioredoxine, hauptsächlich von Typ *f* und *m*, eine zentrale Rolle bei der Regulation von Schlüsselenzymen des Photosynthesestoffwechsels. Klassische Beispiele umfassen Enzyme des Calvinzyklus wie Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase), Seduheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) und Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die ATP-Synthase oder die NADP-Malatdehydrogenase (NADP-MDH) werden ebenfalls durch Thioredoxine reguliert (Buchanan 1991; Scheibe 1991; Buchanan *et al.*, 2002). Im Chloroplasten erfolgt die Reduktion von Trx durch Elektronen, die von Ferredoxin mittels der Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) übertragen werden (Ferredoxin-Thioredoxin-System). Damit stellen Trx eine Verbindung zwischen dem PET (und damit Licht) und CO₂-Fixierung her. Beim zytosolischen Trx-System werden Elektronen von NADPH mit Hilfe der NADPH-Thioredoxin-Reduktase (NTR) auf Trx übertragen, wobei NTRs auch aus Mitochondrien und Chloroplasten bekannt sind (Laloi *et al.*, 2001; Serrato *et al.*, 2004; Buchanan und Luan 2005). Neben der Regulation von Schlüsselenzymen der CO₂-Fixierung spielen Trx bei einem breiten Spektrum weitere Prozesse eine Rolle. Sie sind z.B. an der Regulation von Enzymen des Stärke- und Stickstoffmetabolismus, der Regulation der

plastidären Translation oder an Stressantworten beteiligt (Lemaire *et al.*, 2007). Die große Anzahl möglicher Substrate, bisher ca. 300, unterstreicht die Bedeutung von Trx bei der Regulation zellulärer Prozesse (Lemaire *et al.*, 2007).

Ähnlich den Thioredoxinen sind *Glutaredoxine* (Grx) kleine Proteine mit Thiol:Disulfid-Oxidoreduktase-Funktion. Sie werden allerdings, anders als typische Trx, durch Glutathion reduziert. Im Genom von *Arabidopsis* wurden ca. 30 verschiedene Grx identifiziert, über ihre Funktion ist jedoch noch relative wenig bekannt (Lemaire 2004). Die am besten untersuchte Funktion der Grx ist ihre direkte oder indirekte Beteiligung an Reaktionen auf oxidativen Stress. Grx können Peroxide und Dehydroaskorbat (allerdings mit sehr geringer Effizienz) sowie Peroxiredoxine von Typ II reduzieren und sind vermutlich an Mechanismen zum Schutz von Thiolgruppen über eine reversible Glutathionylierung beteiligt (Sha *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2007).

Peroxiredoxine (Prx), eine eigene Familie von Peroxidasen, können verschiedene Peroxide z.B. H₂O₂ oder Lipidperoxide entgiften und werden durch Trx oder Grx als Elektronendonator reduziert und damit regeneriert (Dietz 2003b). Peroxiredoxine werden durch eine Reihe von Reizen auf Transkript- und Proteinebene reguliert und sind neben ihrer Funktion als Antioxidantien als Teil des Redoxsignalnetzwerkes der Zelle an der Übertragung von Redoxsignalen beteiligt (Dietz 2003b; Baier *et al.*, 2004).

Eine zentrale Stellung im Redoxnetzwerk des Chloroplasten und der photosynthetischen Zelle nimmt der photosynthetische Elektronentransport ein. Die oben beschriebenen Redoxkomponenten sind eng mit dem PET verknüpft und werden durch ihn direkt oder indirekt in ihrem Redoxzustand beeinflusst. NADP und Thioredoxine werden durch Elektronen aus dem PET reduziert und sind ihrerseits für die Reduktion von Antioxidantien (Ascorbat, Glutathion) erforderlich bzw. an der Regulation von Enzymaktivitäten beteiligt. ROS, die ständig als Nebenprodukte bei der Lichtreaktion entstehen, werden mit Hilfe von Ascorbat und Glutathion und einer Reihe von Enzymen (SOD, APX) entgiftet. Eine Zusammenfassung ist in Abb. 1.4 dargestellt.

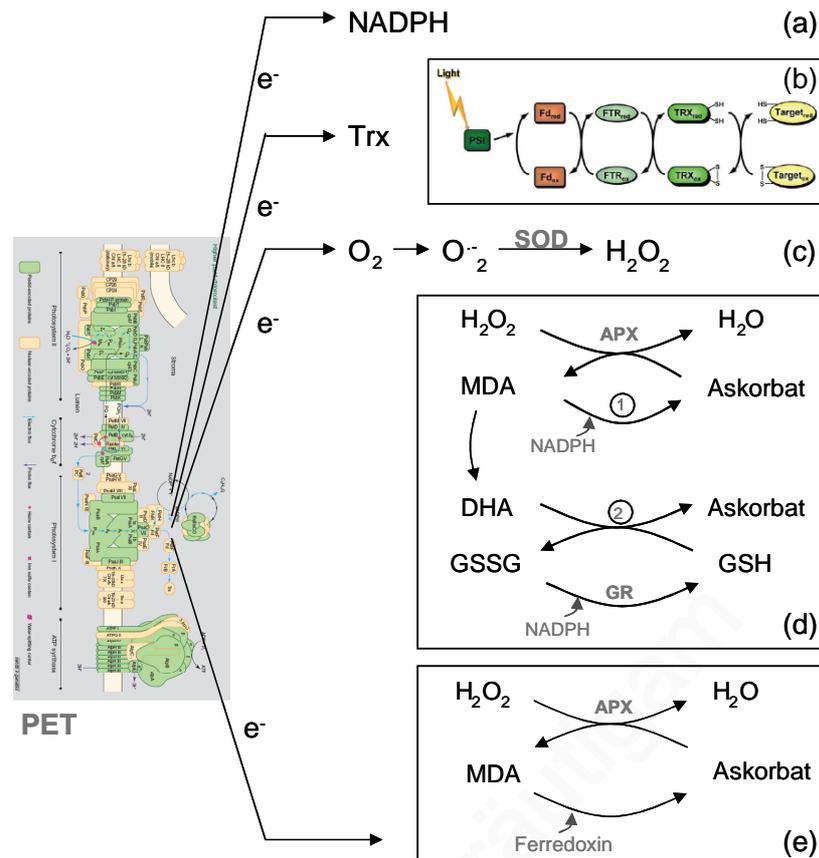


Abb. 1.4: Zentrale Stellung des PET im Redoxnetzwerk des Chloroplasten. (a) und (b): Reduktion von NADP und Trx durch Elektronen aus dem PET. (c): Entstehung von Superoxid-Anionen und Umwandlung in H_2O_2 . (d) und (e): Entgiftung von H_2O_2 im Ascorbat-Glutathion-Zyklus oder im Wasser-Wasser-Zyklus. PET: photosynthetischer Elektronentransport, Trx: Thioredoxin, SOD: Superoxid-Dismutase, APX: Ascorbatperoxidase, MDA: Monodehydroaskorbat, DHA: Dehydroaskorbat, GSH: Glutathion (reduzierte Form), GSSG: Glutathion (oxidierte Form), 1: MDA-Reduktase, 2: DHA-Reduktase.

1.3.3 Retrograde Redoxsignale

Viele Kerngene, die für plastidäre o.a. Proteine kodieren, werden in ihrer Expression durch Signale aus der Plastide reguliert und sind damit eng mit dem funktionellen Zustand der Organelle verknüpft (Surpin *et al.*, 2002). Dabei spielen retrograde Redoxsignale eine entscheidende Rolle (siehe auch 1.1). Bisher wurden Signale identifiziert, die sich direkt aus dem PET (PQ-Pool bzw. nachgeschaltete Komponenten), von ROS (H_2O_2 oder $^1\text{O}_2$) oder Glutathion ableiten (siehe 1.1 und Abb. 1.5).

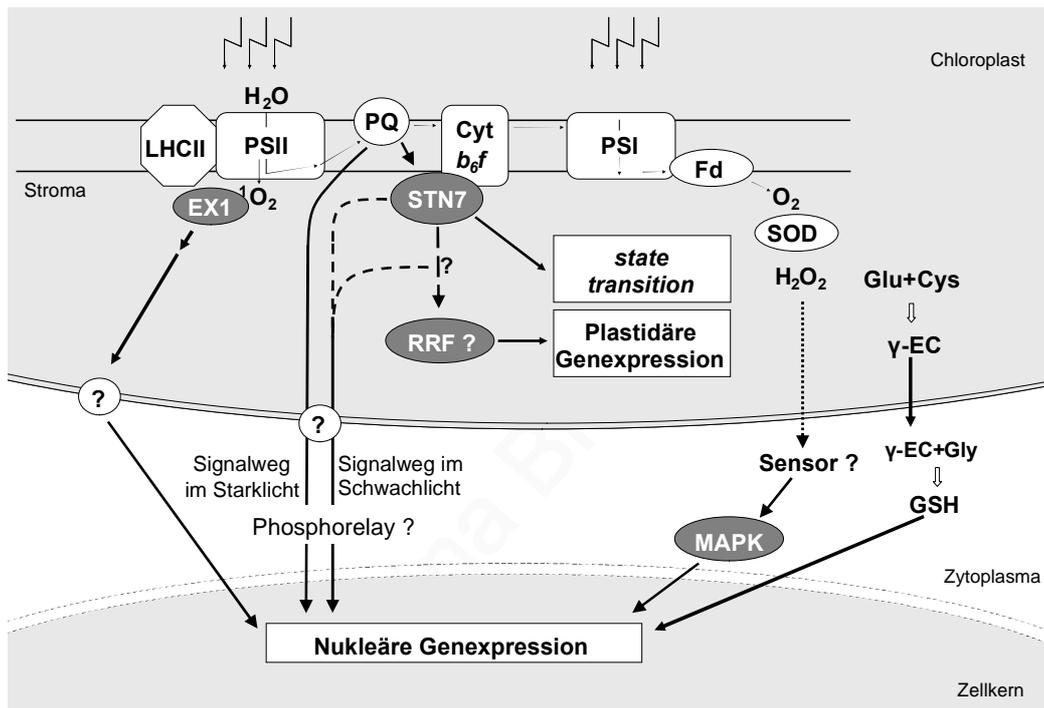


Abb. 1.5: Redoxsignale des Chloroplasten und mögliche Signaltransduktionsmechanismen in den Zellkern. Schematisch dargestellt sind die Zellkompartimente Chloroplast, Zytoplasma und Zellkern sowie die Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes im Chloroplasten. Signalwege sind durch schwarze Pfeile markiert, wobei gestrichelte Linien mögliche bzw. ungeklärte Wege darstellen. Diffusion ist durch eine gepunktete Linie, Synthesewege sind durch weiße Pfeile angegeben. Graue Ovale symbolisieren mögliche bzw. identifizierte Kandidaten, die an der Signalübertragung beteiligt sind. Der Ursprung der wichtigsten retrograden Redoxsignale ist dargestellt: Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) am PSII, der PET (PQ-Pool), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) am PSI oder Glutathionsynthese (Glutamylcystein γ -EC). Zur Beschreibung der Signalwege siehe Text. Nach Bräutigam *et al.*, 2007.

Retrograde Signale aus dem photosynthetischen Elektronentransport

Der Einfluss von Redoxsignalen des PET auf die Expression von Kerngenen wurde erstmalig bei Versuchen mit den Grünalgen *Dunaliella tertiolecta* und *D. salina* nachgewiesen (Escoubas *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1995). Starklicht-akklimatisierte Zellen reagierten auf eine Verringerung der Lichtintensität mit einem Anstieg der Transkription von kernlokalisierten *Lhcb*-Genen. Mit Hilfe der Inhibitoren 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (DCMU) und 2,5-Dibromo-3-methyl-6-isopropylbenzochinon (DBMIB),

die den PET spezifisch hemmen (Trebst 1980), wurde gezeigt, dass die veränderte *Lhcb*-Transkription durch den Redoxzustand des PQ-Pools kontrolliert wird (Escoubas *et al.*, 1995). Die Ergebnisse wurden durch Experimente mit verschiedenen Lichtintensitäten und Temperaturen bestätigt (Maxwell *et al.*, 1995). Auch für höhere Pflanzen wurde gezeigt, dass der PQ-Pool am retrograden *Signalling* beteiligt ist.

Das wurde bei *Lemna perpusilla* durch DCMU-Behandlung und die Verwendung einer Cyt *b₆f*-Mutante, d.h. der Blockierung der PET vor bzw. nach dem PQ-Pool, bei Experimenten mit Stark- und Schwachlicht für LHCII nachgewiesen (Yang *et al.*, 2001). Ein Anstieg der Transkription des Kerngenes *Apx2*, das für eine zytosolische Ascorbatperoxidase kodiert, wurde in Antwort auf Signale aus dem Chloroplasten bei *Arabidopsis* beobachtet (Karpinski *et al.*, 1997; Karpinski *et al.*, 1999). Starklicht- und Inhibitorbehandlungen weisen auf eine Regulation von *Apx2* durch Signale aus dem PQ-Pool und durch H₂O₂-vermittelte Signale hin. Dieses Ergebnis wird auch durch Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen unterstützt (Yabuta *et al.*, 2004). Ein alternativer experimenteller Ansatz verwendet Unterschiede in der Lichtqualität, statt der -intensität. Mit transgenen Tabakpflanzen wurde gezeigt, dass der Promotor des Kerngenes *PetE* (kodiert für Plastocyanin) durch den Redoxzustand von PQ reguliert wird, während die Promotoren der Kerngene *PsaD* und *PsaF* durch Redoxsignale von Komponenten des PET reguliert werden, die dem PQ-Pool nachgeschaltet sind (Pfannschmidt *et al.*, 2001). In einer umfassenderen Untersuchung der Kerngenexpression wurden 286 Kerngene identifiziert, die in ihrer Expression durch ein Reduktionssignal aus den PET reguliert wurden (Fey *et al.*, 2005). Experimente mit Winterroggen, bei denen Signale im PET durch veränderte Licht- und Temperaturbedingungen erzeugt wurden, weisen darauf hin, dass die Genexpression von *Lhcb* in diesem System über den Redoxzustand von Elektronenakzeptoren am PSI reguliert wird (Pursiheimo *et al.*, 2001). Die genaue Identität dieser Signale ist bisher unbekannt, ebenso wie eine mögliche Interaktion mit oder die alternative Entstehung zu Signalen des PQ-Pools.

Während umfangreiche Daten vorliegen, die eine Beteiligung von Signalen des PET an der retrograden Kommunikation belegen, ist über die Signaltransduktion wenig bekannt. Aufgrund von Experimenten mit Phosphataseinhibitoren wurde vermutet, dass die Signalweiterleitung über eine Phosphorylierungskaskade erfolgt (Escoubas *et al.*, 1995; Durnford und G. 1997). Weitere Hinweise auf einen möglichen Signalweg lassen sich aus Untersuchungen der *state transition* und der Langzeitantwort (LTR) ableiten. Beide Akklimationsprozesse werden durch den Redoxzustand des PQ-Pools reguliert und sind funktionell eng miteinander verknüpft (Allen und Pfannschmidt 2000; Pursiheimo *et al.*, 2001; Bonardi *et al.*, 2005; Pfannschmidt 2005). Der Redoxzustand des PQ-Pools wird wahrscheinlich durch eine thylakoid-assoziierte Kinase registriert, möglicherweise durch die

erst kürzlich identifizierte STT7 (*Chlamydomonas*) bzw. STN7 (*Arabidopsis*) (Depege *et al.*, 2003; Bellafigliore *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2005). Diese Kinase ist an der Phosphorylierung der mobilen LHCII-Antenne und damit der *state transition* beteiligt. Sie könnte außerdem die plastidäre Genexpression über eine Phosphorylierungskaskade (mittels eines postulierten redox-responsiven Faktors (RRF)) beeinflussen (Bonardi *et al.*, 2005; Pfannschmidt und Liere 2005; Abb. 1.5). Wie das Signal innerhalb des Chloroplasten weitergeleitet wird, ist unbekannt. An der Signaltransduktion könnte möglicherweise TSP9, ein kleines, mit PSII-assoziiertes Protein beteiligt sein, das unter reduzierenden Bedingungen partiell von PSII abgelöst werden kann (Carlberg *et al.*, 2003). Alternativ dazu könnte das Signal über den Phosphorylierungszustand von LHCII oder Veränderungen in der Thylakoidmembran weitergeleitet werden (Bonardi *et al.*, 2005). Die Kinase STN7 könnte darüber hinaus an der Regulation der Kerngenexpression während der LTR beteiligt sein und damit eine Verbindung zwischen PET und Kerngenexpression herstellen. Erste Expressionsanalysen weisen jedoch darauf hin, dass die STN7 bei der Regulation der Kerngenexpression eine untergeordnete Rolle spielt (Bonardi *et al.*, 2005; Tikkanen *et al.*, 2006).

ROS als retrograde Signale

Die Entstehung von ROS ist im Chloroplasten eng mit dem PET verknüpft (siehe 1.2). Hinweise auf H₂O₂ als Signalmolekül der retrograden Kommunikation stammen u.a. aus Starklichtexperimenten mit *Arabidopsis*. Die Expression der Kerngene *Apx1* und *Apx2*, die für zytosolische Ascorbatperoxidasen kodieren, wird im Starklicht induziert. Ihre Expression konnte auch in der Dunkelheit durch externe Zugabe von H₂O₂ induziert werden, während im Starklicht die Induktion durch Infiltrierung mit Katalase vermindert werden konnte (Karpinski *et al.*, 1997; Noctor und Foyer 1998; Karpinski *et al.*, 1999). Der Einfluss von H₂O₂ auf die Kerngenexpression wurde in größeren Umfang anhand von verschiedenen *Array*-Experimenten untersucht (Desikan *et al.*, 2001; Rizhsky *et al.*, 2003; Davletova *et al.*, 2005; Vanderauwera *et al.*, 2005; siehe auch 2.9.5). Diese Experimente zeigen, dass eine Reihe von Genen einschließlich solcher, die an Stressantworten (z.B. auf Schädlingsbefall oder abiotischen Stress) beteiligt sind, induziert bzw. reguliert werden. Die Transduktion von H₂O₂-vermittelten Signalen ist einer der am besten untersuchten Signalwege der retrograden Kommunikation. Es wird angenommen, dass H₂O₂ frei aus dem Chloroplasten ins Zytoplasma diffundiert und dort eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade aktiviert, die wiederum Einfluss auf die Expression von Kerngenen nimmt (Kovtun *et al.*, 2000; Apel und Hirt 2004). Bei *Arabidopsis* wurden bereits verschiedene Komponenten dieser MAPK-Kaskade identifiziert (z.B. MPK3, MPK6, ANP1; Kovtun *et al.*, 2000; Apel und Hirt 2004).

Singulett-Sauerstoff stellt ein eigenes retrogrades Signal dar und entsteht unter Stressbedingungen z.B. Starklicht verstärkt am PSII. Die Identifizierung der *flu*-Mutante bei *Arabidopsis* ermöglichte es, das kurzlebige $^1\text{O}_2$ unabhängig von anderen ROS, die meist parallel entstehen, zu untersuchen (Meskauskiene *et al.*, 2001; op den Camp *et al.*, 2003). Mittels *Array*-Analysen wurden dabei eine Reihe von Kerngenen identifiziert, die spezifisch durch $^1\text{O}_2$ induziert werden (op den Camp *et al.*, 2003; Danon *et al.*, 2005). Eine Komponente des beteiligten retrograden Signalweges, das plastidäre Protein EXECUTER1 (EX1), konnte bereits identifiziert werden (Wagner *et al.*, 2004b).

Schließlich ist für Glutathion, eine wichtige Komponente bei der Entgiftung von ROS, eine Beteiligung an der retrograden Kommunikation vermutet worden. Ein möglicher Signalweg könnte über γ -Glytamylcystein, ein Zwischenprodukt der Glutathionsynthese, verlaufen und letztendlich Kerngene, die an Stressantworten beteiligt sind, regulieren (Ball *et al.*, 2004; Mullineaux und Rausch 2005).

1.4 Lichtqualitätsakklimation

Lichtqualitätsgradienten treten in der Natur unter verschiedenen Bedingungen z.B. in dichten Pflanzenbeständen auf (Abb. 1.6). Da sich Photosystem I und II in ihren Absorptionsmaxima unterscheiden, können Veränderungen in der Lichtqualität ein Anregungsungleichgewicht zwischen den Photosystemen erzeugen, den linearen Elektronentransport beeinflussen und die Effizienz der Photosynthese deutlich herabsetzen. Um dem entgegenzuwirken, führen Pflanzen kurzfristig (im Bereich von Minuten) eine *state transition* und längerfristig (im Bereich von Stunden bis Tagen) die LTR durch (vergl. 1.2.2).

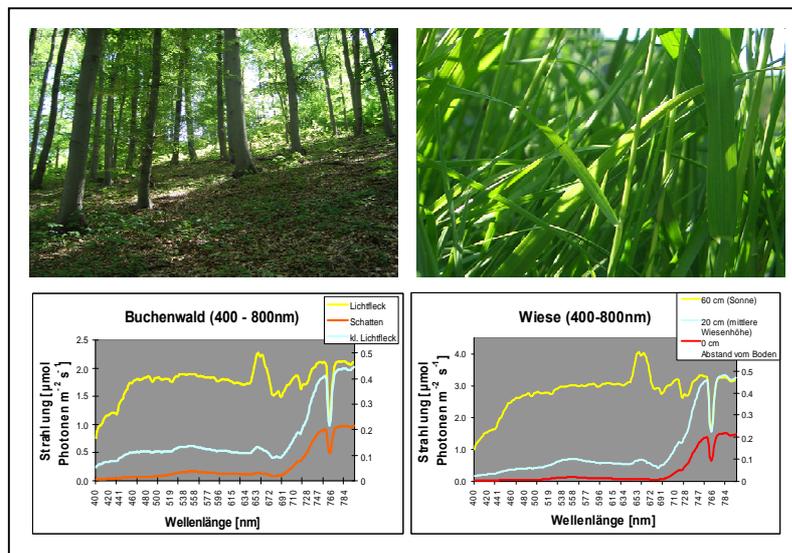


Abb. 1.6: Dichte Pflanzenbestände und ihre typischen Lichtbedingungen.

Der Photonfluss ist in Abhängigkeit von der Wellenlänge für verschiedene Lichtsituationen im Buchenwald und einer Wiese angegeben.

Bei der *state transition* erfolgt die Umverteilung von Anregungsenergie durch posttranslationale Mechanismen: Mobile Antennen des PSII (LHCII) werden in Abhängigkeit vom Redoxzustand der PQ-Pools reversibel phosphoryliert und zwischen den Photosystemen verschoben. Wird hauptsächlich PSII angeregt und damit der PQ-Pool reduziert, werden mobile Teile des LHCII phosphoryliert, lösen sich von PSII und assoziieren mit PSI, wodurch der relative Antennenquerschnitt von PSI vergrößert wird (*state 2*). Wird dagegen überwiegend PSI angeregt und damit der PQ-Pool oxidiert, ist LHCII mit PSII assoziiert (*state 1*). An der Regulation des Phosphorylierungszustandes von LHCII sind Phosphatasen sowie genau regulierte Kinasen beteiligt. Während Grünalgen bis zu 80% ihrer Antennen verschieben können (Delosme *et al.*, 1996), bewegen höhere Pflanzen nur ca. 10-20% ihrer Antennenkomplexe (Allen 1992).

Für die Phosphorylierung von LHCII wurde eine redox-abhängige Kinase postuliert, die durch den Redoxzustand des PQ-Pools in ihrer Aktivität reguliert ist. Die Phosphorylierung von LHCII wird darüber hinaus durch eine Beteiligung der PQ-Bindestelle des Cyt *b₆f*-Komplexes (Qo) (Vener *et al.*, 1997; Zito *et al.*, 1999) und durch Thioredoxine reguliert (Aro

und Ohad 2003). Als guter Kandidat für die LHCII-Kinase konnte kürzlich die thylakoid-assoziierte Serin/Threonin-Kinase STT7 bei *Chlamydomonas* bzw. das *Arabidopsis*-Ortholog STN7 identifiziert werden (Depege *et al.*, 2003; Bellafiore *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2005). Ob diese Kinase LHCII direkt phosphoryliert oder noch weitere Komponenten beteiligt sind, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

Hält das Anregungsungleichgewicht zwischen den Photosystemen weiter an, wird in der LTR die Photosystemstöchiometrie an die Lichtbedingungen angepasst. Dieser Prozess dient ebenfalls der Umverteilung von Anregungsenergie und wurde bei allen bisher untersuchten Organismen von Cyanobakterien über Grünalgen bis hin zu höheren Pflanzen beobachtet (Pfannschmidt 2003). *In vivo* Messungen der Sauerstoffentwicklung bzw. der Chlorophyllfluoreszenz belegen, dass die LTR einen effektiven Akklimationsmechanismus darstellt (Chow *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 2007). Während die *state transition* auf posttranslativaler Ebene stattfindet, erfordert die LTR die Synthese neuer Komponenten und umfasst damit die Ebene der Genexpression (Allen und Pfannschmidt 2000). Die Anpassung erfolgt, indem die Menge des schwächer angeregten Photosystems relativ zur Menge des besser mit Anregungsenergie versorgten Photosystems zunimmt. Bei der LTR handelt es sich um einen Mechanismus, der v.a. unter Schwachlichtbedingungen eine effiziente Photosynthese gewährleistet und zur Feinanpassung des Photosyntheseapparates beiträgt.

Unter Laborbedingungen kann die LTR mit künstlichen Lichtquellen, die bevorzugt PSI (PSI-Licht) bzw. PSII (PSII-Licht) anregen, untersucht werden. Die Anpassung der Photosystemstöchiometrie spiegelt sich auf Transkript- und Proteinebene wider. Das wurde bspw. bei Erbse, Gerste, Senf oder *Arabidopsis* für *psaA* und *psbA* bzw. für die von ihnen kodierten Proteine der Reaktionszentren von PSI und PSII gezeigt (Kim *et al.*, 1993; Pfannschmidt *et al.*, 1999; Fey *et al.*, 2005; Abb. 1.7A). Die Anpassung der Photosystemstöchiometrie kann ebenfalls über die Pigmentzusammensetzung detektiert werden, da Chlorophyll a bei beiden Photosystemen vorkommt und Chlorophyll b vorwiegend mit PSII assoziiert ist, oder auch anhand von Chlorophyllfluoreszenzmessungen bestimmt werden (Melis und Harvey 1981; Chow *et al.*, 1990; Walters und Horton 1994; Pfannschmidt *et al.*, 2001; Fey *et al.*, 2005; Abb. 1.7B&C). Darüber hinaus weisen Chloroplasten je nach Lichtqualität Veränderungen in ihrer Ultrastruktur auf. Unter PSI-Licht nehmen die Granastapel der Thylakoidmembran, die überwiegend PSII enthalten, deutlich zu; unter PSII-Licht sind die gestapelten Membranregionen weniger stark ausgeprägt (Deng *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2007; Abb. 1.7D).

Da die Photosysteme sowohl aus plastiden- als auch kernkodierten Untereinheiten bestehen, ist eine genaue Koordination der Genexpression erforderlich. Von photosynthetischen Organismen ist bekannt, dass verschiedene Redoxsignale aus der Plastide fast alle Ebenen der

Genexpression im Zellkern und auch in der Plastide regulieren können (Rodermeil 2001; Pfannschmidt 2003). Anhand von Experimenten mit Inhibitoren des PET (DCMU und DBMIB) konnte gezeigt werden, dass photosynthetische Redoxsignale, v.a. der Redoxzustand des PQ-Pools, eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression im Chloroplasten und auch bei Genen im Zellkern während der LTR spielen (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Pfannschmidt *et al.*, 2001; Fey *et al.*, 2005; siehe 1.3).

Über den Ablauf der Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern während der LTR, z.B. über die Geschwindigkeit, die beteiligten Komponenten oder die direkten Zielgene, ist bisher wenig bekannt. Künstliche Systeme, die mit verschiedenen Lichtqualitäten arbeiten, bieten daher eine interessante Möglichkeit zur Untersuchung der Kommunikation zwischen Zellkern und der Plastide und der möglichen Verknüpfung mit weiteren regulatorischen Ebenen.

Zur Untersuchung der LTR und der retrograden Kommunikation wurden in dieser Arbeit Lichtquellen verwendet, die überwiegend PSI (PSI-Licht) bzw. PSII (PSII-Licht) anregen und im Schwachlichtbereich (20-30 $\mu\text{E PAR}$) arbeiten. Zur detaillierten Beschreibung des Systems siehe (Fey *et al.*, 2005) sowie 2.5 und 2.6 dieser Arbeit. Im Gegensatz zu Systemen, welche die Wirkung retrograder Signale nach Veränderungen der Lichtintensität untersuchen (z.B. durch Wechsel zwischen Stark- und Schwachlicht), spielen bei der Lichtqualitätsakklimation Nebeneffekte durch Lichtstress wie z.B. Photoinhibition vermutlich keine große Rolle. Gleichzeitig belegen Langzeitversuche bei *Arabidopsis*, dass die verwendeten Lichtintensitäten über dem Lichtkompensationspunkt der untersuchten Pflanzen liegen und ausreichen, um keimfähiges Saatgut zu erzeugen (Wagner *et al.*, 2007). Die Untersuchungen, die im Dauerlicht durchgeführt werden, bieten weiterhin den Vorteil, Nebeneffekte durch zirkadiane Schwankungen auf Transkriptionsebene, v.a. aber im Stoffwechsel (z.B. Tag-Nacht-Regulation von Enzymaktivitäten über Thioredoxine) zu verringern.

Die künstlichen Lichtquellen wurden verwendet, um Anregungsungleichgewichte zu erzeugen und den PET in einen oxidierten bzw. reduzierten Zustand zu versetzen. Ein besonders deutliches Oxidations- bzw. Reduktionssignal kann erzeugt werden, wenn Pflanzen nach Vorakklimation an eine Lichtqualität in die andere Lichtquelle umgestellt werden, d.h. durch einen PSII-I- bzw. PSI-II-Wechsel. Darüber hinaus ermöglichen Lichtwechsel die Reversibilität der Antwort zu überprüfen.

Damit steht ein experimentelles System zur Verfügung, mit dem retrograde Signale gezielt erzeugt und die Regulation von Kerngenen untersucht werden kann. Darüber hinaus kann die Akklimation der Pflanze an veränderte Lichtqualitäten unter reproduzierbaren Bedingungen auf verschiedenen Ebenen analysiert werden.

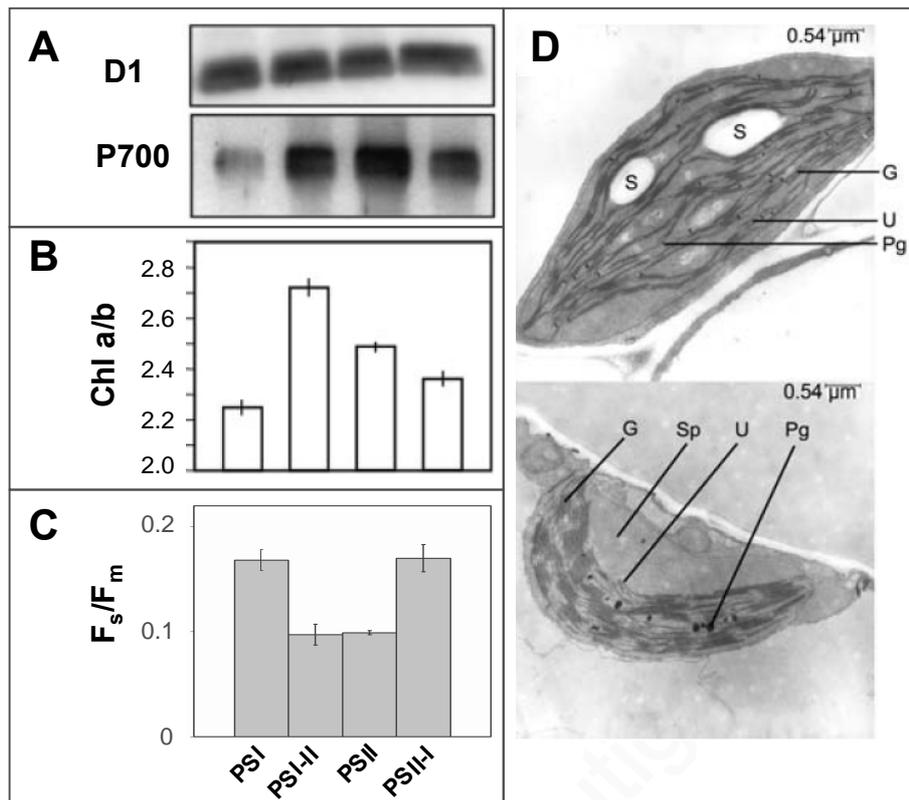


Abb. 1.7: Veränderung der Photosystemstöchiometrie und der Thylakoidstruktur während der LTR bei *Arabidopsis thaliana*. Pflanzen wurden an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert bzw. zwischen den Lichtqualitäten gewechselt (PSI-II; PSII-I). A: Veränderungen der Menge von D1 und P700, Proteinen der Reaktionszentren von PSII bzw. PSI, in Abhängigkeit von der Lichtqualität. B, C: Das Chlorophyll a/b-Verhältnis sowie der Chlorophyllfluoreszenz-Parameter F_s/F_m spiegeln die Anpassung der Photosystemstöchiometrie wider. D: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten. Pflanzen wurden an PSII-Licht (oberes Bild) bzw. PSI-Licht (unteres Bild) akklimatisiert. G: Grana, U: ungestapelte Thylakoide, S: Stärke, Pg: Plastoglobuli, Sp: Stroma (membran-frei). Aus Fey *et al.*, 2005 (A,B), Daten aus Sherameti *et al.*, 2002 (C) und Wagner *et al.*, 2007 (D).

1.5 Systembiologie

Komplexität ist ein Charakteristikum des Lebens. Eine Zelle oder ganzer Organismus stellt ein dynamisches, biologisches System dar, dessen Funktion auf einer Vielzahl von Genen, Proteinen und Stoffwechselprodukten beruht und durch vielfältige Signalprozesse und Interaktionen reguliert und kontrolliert wird.

Der Schwerpunkt der meisten biochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen der letzten Jahrzehnte lag auf der Analyse einzelner Gene bzw. ihrer Genprodukte, wobei diese häufig isoliert von ihrem zellulären Umfeld betrachtet wurden. Diese reduktionistische Herangehensweise ermöglichte es, Identität, Aufbau, Funktion und mögliche Interaktionen vieler molekularer Komponenten z.B. des Transkriptions- und Translations- oder auch des Photosyntheseapparates aufzuklären. Biologische Prozesse und ihre Kontrolle sind jedoch meist nicht auf einzelne Komponenten beschränkt, sondern werden vielfältig reguliert und beeinflusst (ter Kuile und Westerhoff 2001). Eine neue Herausforderung der Biologie stellt nun das Verständnis biologischer Prozesse auf der Ebene des gesamten lebenden Systems dar. Die Systembiologie bietet einen solchen holistischen Ansatz zur Untersuchung eines Gesamtsystems auf verschiedenen strukturellen, funktionellen und regulatorischen Ebenen und verwendet dazu Methoden verschiedener Wissenschaftszweige wie der Molekularbiologie, Biochemie sowie Bioinformatik und mathematischen Modellierung (Kitano 2000; Ideker *et al.*, 2001; Kitano 2001; Carrari *et al.*, 2006).

Um biologische Vorgänge auf Systemebene zu analysieren, werden folgende Charakteristika näher betrachtet: (1) Die Systemstruktur, welche die einzelnen Bestandteile wie bspw. Gene oder Metabolite und ihre strukturellen und funktionellen Beziehungen umfasst. (2) Die Systemdynamik, die den zeitlichen Verlauf von Reaktionen nach Veränderungen betrachtet. (3) Systemkontrolle, die sich auf Mechanismen, die vom System zur Kontrolle genutzt werden, bezieht; sowie (4) Methoden, um ein System künstlich zu modifizieren (Kitano 2000; Kitano 2001).

Die Entwicklung und Etablierung multiparalleler Analysemethoden wie Transkript-*Profiling* mittels *Arrays*, Proteomics oder Metabolit-*Profiling* innerhalb der letzten Jahre ermöglicht es, umfangreiche Information über Menge, Veränderungen und Identität von Transkripten, Proteinen und Stoffwechselprodukten parallel zu erfassen. Solche umfangreichen Datensätze wiederum ermöglichen, neben der Integration von Einzelstudien, systembiologische Untersuchungen (Kitano 2001). Um von den experimentellen Daten auf regulatorische Mechanismen bzw. Netzwerke zu schließen, können verschiedene Strategien verfolgt werden. Der sogenannte *top-down approach*, der z.B. auch im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wurde,

ermöglicht es, umfangreiche Datensätze zu analysieren und diese auf verschiedenen Skalen zu betrachten, wobei häufig Clustermethoden angewendet werden.

1.6 Zielsetzung

Die LTR ist eine Akklimationsreaktion, bei der die Photosystemstöchiometrie in den Chloroplasten an die vorherrschende Lichtqualität angepasst wird. Sie ist für die Aufrechterhaltung der Photosynthese-Effizienz unter Schwachlichtbedingungen von entscheidender Bedeutung und wird durch photosynthetische Redoxsignale reguliert.

Mit Hilfe von künstlich erzeugten Lichtqualitätsunterschieden können Oxidations- bzw. Reduktionssignale im PET erzeugt und die LTR unter Laborbedingungen untersucht werden. Wie die Pflanze als Gesamtsystem auf Veränderungen der Lichtqualität reagiert, in welchem Umfang retrograde Kommunikation stattfindet oder inwiefern verschiedene Regulationsebenen an der LTR beteiligt sind, ist weitgehend unbekannt.

In dieser Arbeit sollte die LTR erstmalig mit einem systembiologischen Ansatz untersucht und auf verschiedenen Ebenen charakterisiert werden. Auf der Ebene der Genexpression sollte die Dynamik der LTR mittels *Array*-Analysen untersucht werden. Ziel war es, den Verlauf und Umfang der Regulation auf Transkriptebene zu erfassen, die Signalgeschwindigkeit zu ermitteln und primäre Zielgene zu identifizieren. Zusätzlich zu Genexpressionsanalysen sollte die Ebene des Metabolismus betrachtet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang Metabolite während der LTR reguliert sind. Dazu sollten erstmalig umfangreiche Untersuchungen verschiedener Stoffwechselprodukte während der LTR durchgeführt werden. Ausgehend von den Daten der *Array*-Analysen sollten schließlich deutlich regulierte Gene anhand von *knock-out* Mutanten auf physiologischer/funktioneller Ebene überprüft und damit auf ihre mögliche Rolle bei der LTR hin untersucht werden.

Die Analysen sollten bei *Arabidopsis thaliana* als Modellorganismus für höhere Pflanzen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Die nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „*pro analysi*“ (p.a.) von folgenden Firmen bezogen:

- Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
- Merck Eurolab, Darmstadt
- Serva Feinbiochemika, Heidelberg
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Weitere Reagenzien und Enzyme

- | | |
|-----------------------------|--|
| - dNTP-Mix | Fermentas GmbH, St. Leon-Roth |
| - GeneRuler™ 100bp Plus | Fermentas GmbH, St. Leon-Roth |
| - MS-Salz | Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande |
| - RCDC™ Protein Assay Kit | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| - <i>Taq</i> DNA-Polymerase | Fermentas GmbH, St. Leon-Roth |
| - Oligonukleotide | JenaBioscience, Jena oder
Biomers GmbH, Ulm |

Bezeichnung	Sequenz [5'→3']	Bezeichnung	Sequenz [5'→3']
T-DNA-spezifische Oligonukleotide			
SAIL_LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC		
SALK_LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT		
SALK_LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG		
Genspezifische Oligonukleotide			
SALK_006646_LP	TGATTTTGGGTGTTGAAAAGG	SALK_006646_RP	GTCGATGAAGAGACTCATGGC
SALK_022546_LP	GGCATAATCCCAAACCTTTTG	SALK_022546_RP	GAGAAGAACATGAGCTGTCCG
SALK_021028_LP	ACAGGTGCAAGAGTTGTGGAG	SALK_021028_RP	GAGAGCATTGTTGGTTAACGC
SALK_135489_LP	GCTTTACTCGAGATGCCTGTG	SALK_135489_RP	AGCAATGTACATCACTTCCG
SALK_020831_LP	TCAAGTGTGTTTCTGAATTCCTTG	SALK_020831_RP	TCGTAAAGAGTAGCGAGGACG
SALK_039887_LP	TCTTCCCTTGTTCCCTTCTCC	SALK_039887_RP	AATAACCTTAGCCCAAGCAGG
SALK_070529_LP	TTCAACATTTGCTATCCACAGG	SALK_070529_RP	TTGTCACGACTCTCTTTGTTC
SAIL_553_E09_LP	CAGGTTGATACCTGAAGGTCC	SAIL_553_E09_RP	GTCTTGGAGACGCAGATTGAG
SALK_141851_LP	AAATCGTGTTCAGGGTCCCTC	SALK_141851_RP	AAAAAGCAGAACGCACCG
SALK_025975_LP	AAATGCGGCATCTTATGTGAC	SALK_025975_RP	ATGAGAACGTTAGTGGGCTTG
SALK_054169_LP	CAAAACAGTGCATGCAATGAC	SALK_054169_RP	GCAAAGAGAGGATCTTTTGTCC
SALK_075188_LP	TCCTGTAGATTGTATTACTATT GGTTCG	SALK_075188_RP	TGAGCAAGCAAGAGACTTGAAG

Bezeichnung	Sequenz [5'→3']	Bezeichnung	Sequenz [5'→3']
SAIL_62_A07_LP	TCATCTTTTATCGCTTGCACC	SAIL_62_A07_RP	GGGAGAAAGCAAGGACTAACG
SALK_017692_LP	TTTACGTCGCTGTATAACCGG	SALK_017692_RP	AACTCCTTCTTCCCATTGACG
SALK_138594_LP	GTGCTCTCCATAAGAACGTCG	SALK_138594_RP	AGGCTCGAGTAGAAGCAGAGG
SALK_049878_LP	TTTCGAGAATGGTGAAGTCGTC	SALK_049878_RP	CCATTTGTGATAGTCCATGGG
SALK_087650_LP	TCTACCCAGGAACATGAAACC	SALK_087650_RP	GGGATTCTGCTACATTGTTGG
SALK_007876_LP	CATGAACAGCTGTGATTCAAAC	SALK_007876_RP	TCAGTTCACAAGCTTGCATTG
SALK_018871_LP	CTGAATATGCGATGCGTGG	SALK_018871_RP	GACGTGTTAGATGGTTCACATTC
SALK_110990_LP	AAACTGTAAACAACAACCTCCC	SALK_110990_RP	CCCTAGCTTGTAGTTGGTTTTTC
SALK_150053_LP	TCGTTTGTACTCTGTACCATAGCC	SALK_150053_RP	AAGCTAGGGTTTTGCTCTTGC
SALK_015024_LP	GCGAAGCGTATTTTTGTCCATAG	SALK_015024_RP	GCACTTGAACCAGTATTCAAACC
SALK_108290_LP	ACGAAAGGATAGGTTGGTTGG	SALK_108290_RP	TTCGGATCTGTCTTCTGCATC
SALK_004769_LP	ACGAAAGGATAGGTTGGTTGG	SALK_004769_RP	TTCGGATCTGTCTTCTGCATC
SAIL_618_B09_LP	AATACCCGAAAACACTGGAC	SAIL_618_B09_RP	CATCCCCTAAACTTGGACCTC
SALK_053764_LP	TGCTTTCTGACAACCTGCACAC	SALK_053764_RP	TCTACCTGCATCTGCCAAATC
SALK_138685_LP	TGCTGCAGGTGACAAATTATG	SALK_138685_RP	CCTACAAAATTTAGATTCAAAC CCAG

Tab. 2.1 : Oligonukleotide zur Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien

2.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Neben den üblichen Materialien und Laborgeräten wurden verwendet:

Fluorometrische CCD-Kamera FluorCam 700 MF	Photon Systems Instruments, Brno, Tschechien
Phosphoimager MD Storm820	GE Healthcare, München
Phosphoscreen	GE Healthcare, München
UV/Visible Spectrophotometer	Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt
Spektroradiometer GER 1500	Geophysical & Environmental Research Corp., Millbrook, USA
Ultraschall Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin GmbH, Berlin

Zusätzlich wurden in Kooperationen folgende Geräte am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm genutzt:

Gaschromatograph 6890N und 5890 Series II	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Pegasus III <i>Time-of-Flight</i> -Massenspektrometer	Leco, St. Joseph, MI, USA

2.3 Software und Datenbanken

Software

Bioconductor	Gentleman <i>et al.</i> , 2004; http://www.bioconductor.org
MotifSampler	Thijs <i>et al.</i> , 2002
MotifScanner	Thijs <i>et al.</i> , 2002b
R Statistical Software 2.4.1	R Development Core Team 2006; http://R.project.org
SPSS 11.0	SPSS Inc. Chicago, USA
TMeV 3.0.2	Saeed <i>et al.</i> , 2003
YMF 3.0	Sinha und Tompa 2003

Datenbanken

NASC	The Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Centre http://arabidopsis.info/
NCBI	National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PLACE	A Database of Plant <i>Cis</i> -acting Regulatory DNA Elements http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/
PlantCare	A database of plant <i>cis</i> -acting regulatory elements http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource http://www.arabidopsis.org/
TransFac	http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html

Stand der Datenbanken bei Verwendung in dieser Arbeit: Februar 2007

2.4 Pflanzenmaterial

Die genetischen, molekularbiologischen und physiologischen Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ökotyp Columbia. Die T-DNA-Insertionslinien für ausgewählte Gene (Tab. 2.2) wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bezogen. Folgende Linien fanden in dieser Arbeit Verwendung:

SALK T-DNA	Gen	Ort der Insertion	Bezeichnung ^a
SALK_006646	At1g08540	Exon	LTR1-1
SALK_022546	At1g08540	Intron	LTR1-2
SALK_021028	At3g17670	Exon	LTR2
SALK_135489	At2g42300	exon	LTR3
SALK_020831	At2g47730	300-UTR5	LTR4-1
SALK_039887	At2g47730	Exon	LTR4-2
SALK_070529	At4g17740	Exon	LTR5
SAIL_553_E09	At2g41040	300-UTR5	LTR6-1
SALK_141851	At2g41040	300-UTR5	LTR6-2
SALK_025975	At1g51350	Exon	LTR7
SALK_054169	At4g29060	300-UTR3	LTR8
SALK_075188	At2g04240	1000-Promotor	LTR9
SAIL_62_A07	At2g40380	300-UTR5	LTR10
SALK_017692	At2g29670	Exon	LTR11-1
SALK_138594	At2g29670	Intron	LTR11-2
SALK_049878	At3g50140	Exon	LTR12
SALK_087650	At4g39690	Exon	LTR13-1
SALK_007876	At4g39690	Intron	LTR13-2
SALK_018871	At4g23150	300-UTR	LTR14
SALK_110990	At2g02070	Exon	LTR15-1
SALK_150053	At2g02070	Intron	LTR15-2
SALK_015024	At4g25970	Intron	LTR16
SALK_108290.	At1g03600	300-UTR5	LTR17-1
SALK_004769	At1g03600	300-UTR5	LTR17-2
SAIL_618_B09	At2g29650	1000-Promotor	LTR18
SALK_053764	At1g54630	Intron	LTR19
SALK_138685	At1g80740	Intron	LTR20

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Insertionsmutantenlinien (NASC; Alonso *et al.*, 2003)

^a Bezeichnung der homozygoten Linien bei den physiologischen Untersuchungen (siehe 3.3).

2.5 Lichtsysteme

Folgende Lichtsysteme wurden zur Untersuchung der Lichtqualitätsakklimation verwendet:

Weißlicht: 18 W Leuchtstoffröhren LW 30 „Cool White“ (Osram, München), ~ 35 $\mu\text{E PAR}$, Dauerlicht

PSI-Licht: 18 W Leuchtstoffröhren „Red“ (Osram, München), gefiltert durch Kunststofffilter „Medium Red 27“ (Lee Filters, Andover, England), ~ 25 $\mu\text{E PAR}$, Dauerlicht

PSII-Licht: 18 W Leuchtstoffröhren LW 30 „Cool White“ (Osram, München), gefiltert durch Kunststofffilter „Orange“ (Lee Filters, Andover, England), ~ 30 $\mu\text{E PAR}$, Dauerlicht

Die Spektren von PSI- und PSII-Licht wurden mit einem Spektroradiometer (GER 1500, Geophysical & Environmental Research Corp., Millbrook, USA) gemessen und sind in Abb. 2.1 angegeben.

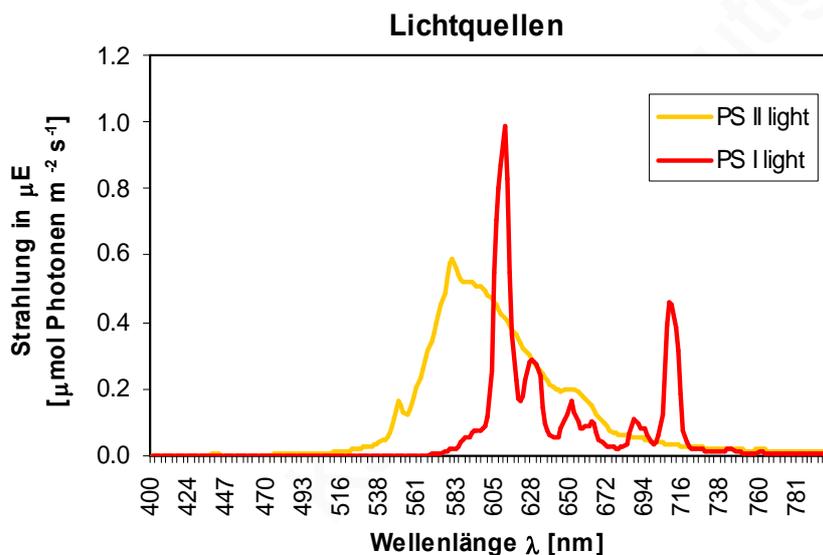


Abb. 2.1: Spektren der verwendeten Lichtquellen.

2.6 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* für Transkriptanalysen, Metabolitanalysen und Enzymmessungen erfolgte auf einem Erde-Vermiculit-Gemisch unter kontrollierten Bedingungen bei 21°C. Die Samendichte wurde so gewählt, dass sich die Pflanzen gegenseitig kaum beschatteten. Nach 2 Tagen Stratifikation im Dunkeln bei 4°C wurden die Pflanzen 21 Tage unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht/ 16 h Dunkel) bei ~ 80 µE („Cool white“ LW30, OSRAM, München) kultiviert.

Mutantenlinien und die dazugehörigen WT-Kontrollen für Chlorophyllbestimmung und Fluoreszenzmessungen wurden in Sterilkultur auf MS-Platten (0.47% (w/v) MS-Salz, 0.05% (w/v) MES, 0.3% (w/v) Gelrite, pH 5.7, 2% (w/v) Saccharose; Murashige und Skoog 1962) angezogen, da für diese Messungen geringere Mengen Pflanzenmaterial benötigt wurden. Zum Brechen der Dormanz wurden die Samen 2 Tage im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Die Kultivierung erfolgte dann im Dauerweißlicht (~35 µE, siehe 2.5) für 9-11 Tage bei einer konstanten Temperatur von 21°C.

Um die Akklimationsreaktionen der Pflanzen auf verschiedene Lichtqualitäten zu untersuchen, wurden die Pflanzen danach in die Lichtsysteme (siehe 2.5) transferiert und folgenden Lichtbedingungen (Dauerlicht) ausgesetzt:

- (I) PSI-Licht (5 Tage)
- (II) PSI-Licht (3 Tage Vorakklimation), danach PSII-Licht (2 Tage)
- (III) PSII-Licht (5 Tage)
- (IV) PSII-Licht (3 Tage Vorakklimation), danach PSI-Licht (2 Tage)
- (V) Weißlicht (5 Tage)

Gewebe für RNA-, Pigment- und Metabolitmessungen wurde direkt unter den Lichtquellen geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Genotypbestimmung und zur Saatgutgewinnung wurden die Pflanzen nach 18 Tagen Voranzucht auf MS-Platten auf Erde in Multiplatten pikiert und in Aracons (Beta Tech, Gent, Belgien) zur Samenreife gebracht.

2.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Typische Methoden wurden, sofern nicht genauer beschrieben, nach (Sambrook und Russel 2001) durchgeführt.

2.7.1 DNA-Isolation

Die Extraktion genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach (Dellaporta *et al.*, 1983). Zur Analyse einzelner Pflanzen wurden 1-3 Blätter mit 900 µl Lyse-Puffer (7.0 M Harnstoff, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.08% (v/v) N-Laurylsarkosin) homogenisiert. Nach Inkubation von 5 min bei 37°C schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Die isolierte DNA wurde in 20 µl 0.1 x TE aufgenommen.

2.7.2 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit kam die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1988) zu genomischen Analysen der T-DNA-Mutanten (Tab. 2.2) zum Einsatz. Die Bestimmung des Genotypes erfolgte mit zwei genspezifischen *Primern* und mit einer Kombination aus einem genspezifischen und einem T-DNA-spezifischen *Primer* (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.html>). Die verwendeten Oligonucleotide sind in Tab. 2.1 aufgelistet. Zur Amplifizierung der genomischen Sequenz dienten zwei genspezifische *Primer*. Die an die inserierte T-DNA angrenzenden Teilsequenzen wurden durch einen genspezifischen *Primer* in Kombination mit einem T-DNA-spezifischen *Primer* gewonnen. Die Amplifikate wurden elektrophoretisch aufgetrennt (1% Agarose in TBE). Zur Absicherung der Ergebnisse wurde jede PCR zur Identifizierung homozygoter Mutanten drei Mal durchgeführt.

2.7.3 RNA-Isolation

Blattgewebe wurde direkt unter den Lichtquellen (2.5, 2.6) geerntet und sofort in flüssigem N₂ eingefroren. Die RNA-Isolation für *Macroarray*-Analysen erfolgte - mit Modifikationen - nach (Westhoff *et al.*, 1991). Gemahlene Pflanzenmaterial wurde zu einem 2:1-Gemisch aus vorgewärmten Homogenisationspuffer (0.33 M Sorbitol; 0.2 M Tris-NaOH pH 9.0; 0.3 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2% SDS (w/v)) und Phenol gegeben. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion und einem weiteren Chloroformschritt wurden die

Nukleinsäuren gefällt (Isopropanol/ NaAcetat, pH 6.0). Im Anschluss wurde RNA mittels LiCl gefällt, mit Ethanol gewaschen und bei -80°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der RNA-Proben wurden spektrometrisch bestimmt (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg) und die Qualität mittels denaturierender Gelelektrophorese (1.2% Agarose, 2% Formaldehyd, Ethidiumbromidfärbung) überprüft.

2.7.4 Genexpressionsanalyse mittels *Macroarrays* (*Expression Profiling*)

Der zeitliche Verlauf der Akklimationsreaktion in Antwort auf eine Veränderung der Lichtqualität (2.6) wurde auf Expressionsebene mittels *Array*-Analysen untersucht. Jeweils fünf Zeitpunkte (0h, 0.5h, 2h, 8h, 48h) pro Lichtwechsel (PSI-II und PSII-I) wurden analysiert. Dazu wurde ein 3292-GST Nylonarray verwendet, der vor allem nukleäre Gene abdeckt, die für Chloroplastenproteine kodieren (Kurth *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2003). Der *Array* erfasst damit fast das gesamte kernkodierte Transkriptom des Chloroplasten. Herstellung und Verwendung des *Arrays* erfolgten wie in (Richly *et al.*, 2003) beschrieben.

Für die RNA-Extraktion wurden pro Probe ca. 200-500 Pflanzen verwendet, deren Anzucht wie in 2.6 beschrieben erfolgte. Pro Lichtwechselvariante und Zeitpunkt wurden drei unabhängige Experimente mit verschiedenen Filtern und unabhängigen cDNA-Sonden durchgeführt, um die Variation zwischen Einzelpflanzen, cDNA-Sonden und Filtern zu minimieren. Die cDNA-Synthese erfolgte mit einer *Antisense-Primer*-Mischung, die spezifisch für die 3292 Gene des *Arrays* ist. Die Hybridisierung erfolgte wie bereits beschrieben (Kurth *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2003). Die hybridisierten Filter wurden auf Phosphoimager-Platten exponiert und mit einem Phosphoimager (Storm 860, GE Healthcare, München) eingelesen. Zuordnung und Quantifizierung der Signale, Entfernung von Artefakten, Hintergrundkorrektur und Normalisierung erfolgten mit der Software *Array Vision* (Version 6.0, Imaging Research Inc., Ontario, Canada). Die vorverarbeiteten Daten wurden dann mit der Software *ArrayStat* (version 1.0 revision 2.0, Imaging Research Inc., Ontario, Canada) statistisch ausgewertet. Ein Z-Test unter Verwendung einer FDR (*false discovery rate*)-Korrektur (Benjamini und Hochberg 1995) wurde durchgeführt, um signifikant differenziell exprimierte Gene zu identifizieren. Die Expressionswerte wurden als Verhältnis zur 0h-Referenz angegeben und analysiert. Das *Transcript Profiling* erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Alexander Biehl und Prof. Dr. Dario Leister (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung Köln und Ludwig-Maximilians-Universität München).

2.8 Metabolitanalysen

2.8.1 Stärkebestimmung

Pflanzenmaterial (Anzucht siehe 2.6) wurde direkt unter den Lichtquellen geerntet. Die Stärkebestimmung erfolgte kolorimetrisch nach (Magel 1991) mit leichten Modifikationen (PD Dr. Appenroth, persönliche Kommunikation). 200 mg Gewebe wurden in 18%iger Salzsäure aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde 60 min bei 4°C geschüttelt und anschließend 20 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit *Lugol*'scher Lösung (0.5% KJ, 0.25% J₂) versetzt und die Absorption bei 530 und 605 nm gemessen.

2.8.2 Proteinbestimmung

Unter den Lichtquellen geerntetes Pflanzenmaterial (2.6) wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, mit Extraktionspuffer (0.06 M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS (w/v); 15% Saccharose (w/v), 0.04 M DTT, Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)) versetzt und im Ultraschall weiter aufgeschlossen (3 x 20 s, 10% der max. Amplitude, Puls 2, Sonoplus HD 2070 mit MS72-Spitze, Bandelin, Berlin). Der Extrakt wurde 5 min bei 75°C inkubiert, abgekühlt und kurz bei 10000 Upm zentrifugiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem RCDC™ Protein Assay Kit (Bio-Rad) nach Herstellerangaben und mit BSA als Standard.

2.8.3 Lipidmessungen

Die Bestimmung von Fettsäuren erfolgte nach (Browse *et al.*, 1986). Lipide wurden mit 1M methanolischer HCl aus Blattgewebe (je 100mg, Pflanzenanzucht siehe 2.6) extrahiert. Nach Inkubation für 30 min bei 80°C wurde das abgekühlte Reaktionsgemisch mit 1 ml 0.9% NaCl und 1 ml Hexan versetzt und gemischt. Die Hexan-Phase wurde abgenommen und die extrahierten Fettsäuremethylester mittels Gaschromatographie (GC 5890 Series II, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) aufgetrennt und quantifiziert. Pentadecanonsäure (15:0) wurde als interner Standard verwendet. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. Peter Dörmann, MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm.

2.8.4 Bestimmung der ATP/ADP und NADPH/NADP-Verhältnisse

Homogenisiertes Gewebe (Anzucht siehe 2.6) wurde mit HClO_4 extrahiert und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und 3-Phosphoglycerat (3PGA) quantifiziert (Dietz und Heber 1986). Die Bestimmung von ATP und ADP erfolgte luminometrisch nach (Kaiser und Urbach 1977). Das NADPH/NADP⁺-Verhältnis wurde über 3PGA, DHAP und das ATP/ADP-Verhältnis nach (Dietz und Heber 1989) berechnet. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. Dennis Wormuth und Prof. Dr. Karl-Josef Dietz, Universität Bielefeld.

2.8.5 Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses

Zur photometrischen Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde unter den Lichtquellen geerntetes Pflanzenmaterial mechanisch zerkleinert und Chlorophylle mit gepuffertem Aceton (80% (v/v) Aceton, 20% (v/v) 1 M Tris-HCl pH 7.0) extrahiert. Die Konzentrationen von Chlorophyll a und b wurden mit Extinktionskoeffizienten aus (Porra *et al.*, 1989) bestimmt.

2.8.6 Bestimmung des Aktivierungszustandes der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (NADP-MDH)

Die Bestimmung des Aktivierungszustandes der NADP-MDH erfolgte nach (Kolbe *et al.*, 2006) und wurde in Kooperation mit Dr. Peter Geigenberger und Dr. Sandra Oliver am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt. Proteine wurden extrahiert und für jede Probe die Enzymaktivität unter nichtreduzierenden (ohne Zugabe von Dithiotreitol (DTT)) und unter reduzierenden Bedingungen (mit DTT, vollständige Enzymaktivierung) gemessen. Als Maß für den Aktivierungszustand der NADP-MDH wurde das Verhältnis der Aktivitäten unter nichtreduzierenden und reduzierenden Bedingungen verwendet.

2.8.7 Analyse von Stoffwechselmetaboliten mit GC-MS (*Metabolic Profiling*)

Der Einfluss der Lichtqualität auf den Stoffwechsel der Pflanzen wurde mit Hilfe des sogenannten „*Metabolic Profiling*“ untersucht. Dabei wurde das komplexe Stoffgemisch der Pflanzenzellen mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) aufgetrennt und vermessen. Die Kombination von Retentionszeit und Massenspektrum ermöglichte dabei

eine Identifikation der Einzelmetabolite. Metabolitanalyse mittels GC-MS wurde nach (Roessner *et al.*, 2000) und (Lisec *et al.*, 2006) durchgeführt.

Generell wurden dabei Metabolite aus Pflanzengewebe extrahiert und anschließend derivatisiert, um eine Auftrennung im Gaschromatographen zu ermöglichen. Carbonylgruppen wurden dabei durch Methoxyamin (MEOX) geschützt und aktive Wasserstoffatome durch Trimethylsilylgruppen (TMS) ausgetauscht.

Je 100 mg Pflanzenmaterial wurde direkt unter den Lichtquellen in flüssigem Stickstoff geerntet. Zur Extraktion wurde das Gewebe homogenisiert (Schwingmühle MM200, Retsch GmbH, Düsseldorf) und mit 1.4 ml Methanol versetzt, wobei 60 µl Ribitol (20 mg/ml) als interner Quantifizierungsstandard zugegeben wurden. Das Gemisch wurde für 15 min bei 70°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, mit 750 µl Chloroform und 1.4 ml Wasser vermischt und erneut zentrifugiert (15 min, 4000 Upm). 150 µl-Aliquots der wässrigen Phase wurden in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die anschließende Derivatisierung erfolgte in zwei Schritten: Inkubation der getrockneten Proben für 2 h bei 37°C in 40 µl Methoxyaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin) gefolgt von einer weiteren Inkubation mit 70 µl N-Methyl-N-Trimethylsilyl-Trifluoracetamid (MSTFA) für 30 min bei 37°C. 20 µl eines Fettsäuremethylestergemisches wurden als Zeitstandard zugesetzt. Leere Gefäße ohne Probenmaterial wurden genauso behandelt und dienten als Negativkontrolle.

Anschließend wurden die Proben in einem GC-MS-System, bestehend aus einem Gaschromatograph 6890N (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) und einem Pegasus III *Time-of-Flight*-Massenspektrometer-System (Leco, St. Joseph, MI, USA) gemessen. Für die Auswertung der Chromatogramme und Massenspektren wurde die Software ChromaTOF V.1.6 (Leco, St. Joseph, MI, USA) sowie NIST 2.0 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, US) herangezogen und Metabolite unter Verwendung der Bibliothek GMD (*Golm Metabolome Database*: <http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html>; Kopka *et al.*, 2005; Schauer *et al.*, 2005) identifiziert. Zur Quantifizierung wurden relevante *Peaks* auf den internen Standard Ribitol und das eingesetzte Frischgewicht normalisiert. Zur weiteren Datenverarbeitung wurden die Daten logarithmiert (Basis 2). Das *Metabolic Profiling* wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Nicolas Schauer, Dr. Alisdair Fernie und Dr. Peter Geigenberger am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt.

2.9 Datenanalyse

2.9.1 Analyse und Interpretation der Genexpressionsdaten

Die Expressionswerte der untersuchten Zeitpunkte nach einem Lichtwechsel wurden als Verhältnis zur 0h-Referenz angegeben. Mit der Software MapMan, Modul ImageAnnotator (Version 2.0.0; Thimm et al., 2004; Usadel et al., 2005) wurden die Expressionswerte nach funktionellen Gruppen geordnet visualisiert.

Mit dem statistischen Modul dieser Software wurde überprüft, ob sich Gene einer funktionellen Gruppe anders verhalten als die gesamten verbliebenen Gene. Der implementierte Wilcoxon Rangsummentest wurde dazu in Verbindung mit einer Korrektur für multiples Testen verwendet (Benjamini und Hochberg 1995).

Gene, die bereits 30 min nach einem Lichtwechsel (PSI-II oder PSII-I) signifikant um Faktor ≥ 2.5 reguliert und deren Transkripte über den gesamten Verlauf der Akklimationsantworten nachweisbar waren, wurden im Anschluss selektiert. Dieser Teildatensatz wurde genauer untersucht. Die Gene wurden jeweils einer von drei übergeordneten Kategorien zugeordnet (Regulation, Metabolismus, Unklassifiziert). Detailliertere funktionelle Klassifizierung erfolgte wie in (Biehl *et al.*, 2005) beschrieben, wobei neuere Datenbankinformationen mit berücksichtigt wurden (NCBI, TAIR, Stand: Dezember 2006). Um Gruppen ähnlich regulierter Gene zu erhalten, wurde anschließend Clustering (siehe 2.9.3) durchgeführt.

2.9.2 Analyse und Interpretation der Daten des *Metabolic Profiling*

Die Auswertung der Metabolitdaten erfolgte in Excel (Microsoft, 2000) bzw. in R version 2.4.1 (<http://R.project.org>; R Development Core Team 2006). Pro Lichtbedingung wurden 6 unabhängige Proben gemessen. Um den Einfluss veränderter Lichtqualitäten zu untersuchen, wurden die Verhältnisse aus den Mittelwerten der Lichtwechselvarianten (PSI-II bzw. PSII-I) und den Pflanzen unter konstanter Lichtqualität (PSI bzw. PSII) gebildet. Ob Unterschiede signifikant waren, wurde statistisch getestet (Student's *t*-Test; $p \leq 0.05$, $n = 3-6$), wobei für multiples Testen korrigiert wurde (Benjamini und Hochberg 1995).

Metabolite mit ähnlichem Regulationsmuster können – wie auch Genexpressionsdaten – durch Clusteralgorithmen gruppiert werden. Um die Regulation der Metabolite unabhängig von den Signalstärken untereinander vergleichen zu können, wurden die Daten zuerst standardisiert d.h. auf Mittelwert Null und Standardabweichung Eins transformiert (*z*-Transformation). Alle Metabolite mit mindestens 3 Messwerten pro Lichtbedingung wurden berücksichtigt und hierarchisch gruppiert (siehe 2.9.3). Aufgrund fehlender Messwerte

wurden Glucose-6-Phosphat und Galakturonsäure daher nicht weiter berücksichtigt. Zur Charakterisierung der Lichtsysteme hinsichtlich der gesamten Metabolite wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt (siehe 2.9.4).

2.9.3 Clusteranalysen

Clustering unterteilt einen Datensatz – nach Ähnlichkeit der Objekte zueinander - in Untergruppen (Cluster) und ermöglicht es, vorher unbekannte Muster im Datensatz zu finden. Ähnliche Objekte werden derselben Gruppe zugeordnet, während Objekte aus unterschiedlichen Gruppen nur geringe Ähnlichkeit besitzen. Die Ähnlichkeit zwischen Objekten kann mathematisch durch verschiedene Distanzmaße beschrieben werden. In dieser Arbeit wurden euklidische Distanzen verwendet.

Die Datensätze des Transkript- und des Metabolitprofilings aus dieser Arbeit wurden mit Hierarchischem Clustering (HCL) und *k-means* Clustering untersucht. Hierarchisches Clustering erzeugt eine ineinander geschachtelte Folge von Clustern, welche graphisch als Dendrogramm dargestellt werden. *k-means* Clustering ist eine Methode, bei der keine hierarchische Struktur zugrunde gelegt wird und die einen Datensatz in eine vorgegebene Anzahl von Gruppen (*k*) unterteilt.

Die Analysen wurden mit der Software TMeV (Version 3.0.2, (Saeed *et al.*, 2003)) durchgeführt. Die Genexpressionsraten (Zeitpunkt vs. 0h) wurden log₂-transformiert und Metabolitdaten z-transformiert (Mittelwert Null, Standardabweichung Eins). Bei HCL wurde die *average linkage*-Methode verwendet. Um eine sinnvolle Anzahl von Clustern *k* beim *k-means* Clustering vorgeben zu können, wurde von dem *k-means*-Clustering der Genexpressionsdaten HCL durchgeführt.

2.9.4 Hauptkomponentenanalyse

Bei der Hauptkomponentenanalyse (PCA: *Principal Component Analysis*) wird ein mehrdimensionaler Datensatz auf deutlich weniger Dimensionen reduziert, welche die Hauptinformation (Varianz des Datensatzes) enthalten. Für die Hauptkomponentenanalyse der Metabolitprofile wurden alle sechs Messungen pro Lichtbedingung untersucht und Metabolite als Variablen verwendet. Alle Metabolite mit mindestens drei Messwerten pro Lichtbedingung wurden berücksichtigt, die Werte der Metabolite standardisiert und fehlende Werte durch Mittelwerte ersetzt. Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago) durchgeführt und eine Abb. der ersten drei Hauptkomponenten in SigmaPlot10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath) erstellt.

2.9.5 Vergleich der zeitig regulierten Gene mit publizierten Expressionsdatensätzen

Um den Einfluss anderer Signale bzw. Prozesse im verwendeten experimentellen System (2.5; 2.6) abschätzen zu können, wurden die primär regulierten Gene (Tab. 3.2) mit Expressionsdatensätzen publizierter Studien verglichen. Für den Vergleich mit Genen, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in ihrer Expression reguliert sind, wurden Expressionsdatensätze aus den in Tab. 2.3 aufgeführten Experimenten verwendet. Alle verwendeten Publikationen beziehen sich auf *A. thaliana*. Eine detaillierte Beschreibung der Experimente befindet sich in der Tabellenunterschrift.

ROS	Beschreibung	Arraytyp ^A	f.c. ^B	# Gene ^C	Publikation
ROS	ROS-Netzwerk: Gene, die ROS-Metabolismus kontrollieren	ATH1	/	152	Mittler <i>et al.</i> , 2004 ¹
O ₂ ⁻	Mutanten mit verringerter Menge an thylakoidassoziiertes Cu/Zn Superoxiddismutase (Cu/Zn SOD- <i>knock-down</i>)	ATH1	2.0*	777	Rizhky <i>et al.</i> , 2003 ²
H ₂ O ₂	<i>knock-out</i> -Mutanten für Apx1 unter moderatem Starklichtstress	ATH1	2.0	843	Davletova <i>et al.</i> , 2005 ³
H ₂ O ₂	Katalase-defiziente Pflanzen mit 20% Restaktivität (CATHP1) und Starklichtbehandlung	ATH1	3.0	437	Vanderauwera <i>et al.</i> , 2005 ⁴
H ₂ O ₂	externe Zugabe von 20 mM H ₂ O ₂ zu <i>Arabidopsis</i> -Zellkulturen	AFGC, Cycle1	1.5	175	Desikan <i>et al.</i> , 2001
¹ O ₂	<i>flu</i> -Mutante nach Dunkel-Licht-Shift erzeugt verstärkt ¹ O ₂	ATH1	2.5	70	op den Camp <i>et al.</i> , 2003 ⁵
ROS	<i>flu</i> -Mutante nach Dunkel-Licht-Shift sowie Methylviologenbehandlung	ATH1	2.5	1206	op den Camp <i>et al.</i> , 2003 ⁵

Tab. 2.3 : Überblick der zum Vergleich mit ROS-regulierten Genen verwendeten Datensätze. Für jedes Experiment sind das untersuchte ROS, eine kurze Beschreibung des verwendeten Systems und relevante Parameter der Expressionsanalyse angegeben. O₂⁻: Superoxidanion; H₂O₂: Wasserstoffperoxid; ¹O₂: Singulett-Sauerstoff. ^A Der Affymetrix ATH1 Array deckt fast das gesamte *Arabidopsis*-Genom ab. ^B Faktor, um den betrachtete Gene mindestens reguliert sind. ^C Anzahl der regulierten Gene. * ein Faktor von 2.0 wurde eingeführt.

¹ Beschreibt ein Netzwerk aus 152 Genen, dass die Menge an ROS streng kontrolliert und damit deren toxische Wirkung einschränkt, aber gleichzeitig *Signalling* noch ermöglicht. Die meisten dieser Gene zeigen veränderte Expression unter verschiedensten Stressbedingungen.

² Der Einfluss von Superoxidradikalen (O₂⁻) wurde bei Mutanten mit verringerter Menge an thylakoidassoziiertes Cu/Zn Superoxiddismutase untersucht, einem Enzym, welches Superoxidradikale in H₂O₂ umwandelt. Beobachtete Veränderungen im Transkriptprofil der *knock-down* Mutante im Vergleich zu Wildtyppflanzen zeigen Ähnlichkeiten zu Stressantworten (Starklicht). Für den Vergleich mit den primär regulierten Genen wurde bei diesem Datensatz eine Regulation um Faktor ≥ 2.0 betrachtet.

³ Ascorbatperoxidasen bauen H₂O₂ ab. Fehlt die zytosolische Ascorbatperoxidase1 (Apx1), werden zusätzlich Schutzmechanismen des Chloroplasten beeinträchtigt und die Menge an H₂O₂ steigt an. Die Auswirkung der H₂O₂-Akkumulation auf die Genexpression wurde in *knock-out* Mutanten für Apx1 unter moderatem Lichtstress untersucht.

⁴ Katalasen – ebenfalls wichtige Enzyme der H₂O₂-Entgiftung – sind v.a. in Peroxisomen lokalisiert. Werden Katalase-defiziente Pflanzen Starklicht ausgesetzt, akkumulieren sie H₂O₂. In einem komplexen Experiment wurden Katalase-defiziente Pflanzen mit 20% Restaktivität und Wildtyppflanzen unter Vergleichs- und Starklichtbedingungen untersucht. Mit diesem Ansatz konnten spezifisch H₂O₂-regulierte Gene identifiziert werden. Zum Datenvergleich wurden die 437 H₂O₂-regulierten Gene aus Suppl. Tables 2B und 2C verwendet.

⁵ Der Einfluss von erhöhten Mengen Singulett-Sauerstoff, einem plastidenspezifischen ROS, auf die Genexpression wurde in der *flu*-Mutante analysiert. Diese Mutante ermöglicht es, Singulett-Sauerstoff unabhängig von anderen ROS zu untersuchen. Aus dieser Publikation wurden 2 Datensätze verwendet: (I) spezifisch durch ¹O₂ induzierte Gene (70) sowie (II) Gene, die generell und z.T. unspezifisch auf ROS reagieren (1206); verfügbar als Suppl. Tables.

Für den Vergleich wurden die Daten der Publikationen wie folgt bearbeitet:

Zuerst wurden zuerst bei (Rizhsky *et al.*, 2003), (Davletova *et al.*, 2005) und (Desikan *et al.*, 2001) den Affymetrix- bzw. EST-Identifiern AGI-Nummern zugeordnet. Bei der Studie von (Rizhsky *et al.*, 2003) wurden anschließend die 777 Gene selektiert, die um Faktor 2.0 oder mehr reguliert waren. Bei (Davletova *et al.*, 2005) wurde die Reaktion auf moderates Starklicht zu sieben Zeitpunkten untersucht. Aus den 3915 Genen mit Transkriptveränderung (*online* verfügbar als Suppl. Table 6) wurden diejenigen 843 Gene herausgefiltert, bei denen sich Wildtyp und Mutante zu mindestens einem Zeitpunkt um Faktor ≥ 2.0 in ihrer Expression unterschieden. Bei (Vanderauwera *et al.*, 2005) und (op den Camp *et al.*, 2003) konnten Parameter und Teildatensätze direkt verwendet werden (siehe Unterschrift Tabelle 2.3)

Publizierte Experimente, die den Einfluss von Phytochrom auf die Genexpression bei *Arabidopsis* untersuchten und aus denen Datensätze verwendet wurden, sind in Tab. 2.4 aufgeführt. Für eine genauere Beschreibung siehe Tabellenunterschrift.

Einfluss	Beschreibung	Array / Technik ^A	f.c. ^B	# Gene ^C	Publikation
PhyA	Lichtpuls mit schwachem Dunkelrotlicht bei WT und <i>phyA</i> -Mutante Dunkelrotlicht (VLFR)	FDD ^x	1.5	15	Kuno <i>et al.</i> , 2000 ¹
PhyA	Dauerbestrahlung (5Tage) mit Dunkelrotlicht bei 4 Ökotypen von <i>Arabidopsis</i> und einer <i>phyA</i> -Mutante (HIR)	9.2K EST-Array	2.0	309	Wang <i>et al.</i> , 2002 ²
PhyA	45 min Dunkelrotlichtbestrahlung WT-Keimlingen	ATH1	2.0*	122	Dr. Kretsch, AFGN ³
PhyA	4 h Dunkelrotlichtbestrahlung WT-Keimlingen	ATH1	2.0*	1345	Dr. Kretsch, AFGN ³
PhyB	Bestrahlung mit Rotlicht für 1h bei WT-Keimlingen (LFR)	ATH1	2.0*	201	Monte <i>et al.</i> , 2004 ⁴

Tab. 2.4: Überblick der verwendeten Datensätze, um den Einfluss von Phytochrom abzuschätzen. Für jedes Experiment sind das hauptsächlich beeinflusste Phytochrom, eine kurze Beschreibung des experimentellen Aufbaus und relevante Parameter der Expressionsanalyse angegeben. PhyA: Phytochrom A, PhyB: Phytochrom B; ^x Fluorescent Differential Display, ^A Der Affymetrix ATH1 Array deckt fast das gesamte *Arabidopsis*-Genom ab, der 9.2K EST-Array ca. 25%. ^B Faktor, um den betrachtete Gene mindestens reguliert sind. ^C Anzahl der regulierten Gene. * Ein Faktor wurde eingeführt.

¹ Untersucht wurde die Reaktion von Wildtyppflanzen und einer PhyA-defizienten Mutante auf eine kurze Behandlung mit schwachem Dunkelrotlicht bei etiolierten Keimlingen. Um PhyA-regulierte Gene der VLFR (*very low fluence response*) zu identifizieren, wurde *Fluorescent Differential Display* angewandt. Mit den verwendeten *Primer*-Kombinationen sollten mehr als 95% aller mRNAs detektiert werden können.

² Veränderungen der Genexpression in Antwort auf Dauerbestrahlung mit Dunkelrotem Licht wurde bei vier verschiedenen Ökotypen von *Arabidopsis* und Mutanten der *phyA*-Antwort untersucht, wobei v.a. die HIR (Hochintensitätsreaktion) analysiert wurde.

³ Expressionsdatensätze des AtGenExpress-Projektes des AFGN (*Arabidopsis Functional Genomic Network*). Die Experimente wurden von Dr. Kretsch (Freiburg) durchgeführt. Expressionsprofile von *Arabidopsis*-Keimlingen nach 45 min bzw. 4 h Bestrahlung mit Dunkelrotlicht und der zugehörigen Kontrollen wurden verwendet, um den Einfluss von Phytochrom A abzuschätzen. Erläuterungen zur Datenquelle und -bearbeitung siehe unten.

⁴ Untersucht u.a. die frühe Reaktion (innerhalb 1 h) des Transkriptom auf Bestrahlung mit rotem Dauerlicht.

Für den Vergleich wurden die Daten der Publikationen wie folgt bearbeitet:

Bei (Wang *et al.*, 2002) wurden aus Genen, die bei vier verschiedenen Ökotypen auf dunkelrotes Licht reagieren (696 Gene, Gruppe 1B) und aus den Genen, bei denen die Reaktion auf Dunkelrotlicht in der *phyA*-Mutante beeinträchtigt ist (441 Gene, Gruppe 2B, Faktor 2.0) diejenigen Gene herausgefiltert und verwendet, die beide Kriterien erfüllen (309 Gene). Expressionsdatensätze der im Rahmen des AtGenExpress-Projektes von Dr. Kretsch (Freiburg) durchgeführten Experimente wurden über die NASCArray-Plattform heruntergeladen (<http://affymetrix/arabidopsis.info/>; ExperimentID:124, MAS5.0-Dateien, jeweils 3 Replikate). Anschließend wurden mit Hilfe der Bioconductor Software in R, Version 2.4.1 (<http://www.bioconductor.org/>, Gentleman *et al.*, 2004) differenziell exprimierte Gene identifiziert. Dazu wurden letztendlich Expressionsunterschiede um Faktor ≥ 2.0 betrachtet, wobei Signifikanz unter Verwendung einer p-Wert-Korrektur für multiples Testen (Benjamini und Hochberg 1995) geprüft wurde (Student's *t*-Test, $p \leq 0.05$). 112 Gene erfüllen nach 45 min Dunkelrotlichtbestrahlung diese Bedingungen; nach 4h sind es 1395 Gene. Das verwendete R-Skript wurde freundlicherweise von Dipl. Biochem. Dörte Radke (HKI, Jena) zur Verfügung gestellt.

Bei (Monte *et al.*, 2004) wurden 201 Gene selektiert, die signifikant um Faktor 2.0 oder mehr reguliert waren, wenn rotlichtbehandelte WT-Pflanzen mit der Dunkelkontrolle verglichen wurden.

2.9.6 Promotoranalysen

Für die zeitig regulierten Gene des *Array*-Experimentes (Tab 3.2) wurden Promotorsequenzen bis 800 bp stangaufwärts des Startkodons über die *RSA-homepage* (van Helden 2003; <http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>) heruntergeladen, wobei Überlappungen mit Nachbargenen ausgeschlossen wurden. Die Sequenzen wurden für jeden der Cluster (Abb. 3.6, Tab. A.1) innerhalb der zeitig regulierten Gene untersucht.

Um bereits bekannte Motive zu identifizieren, wurden die Promotorsequenzen mittels der MotifScanner 3.11 Software (Thijs *et al.*, 2002) mit den Datenbanken PlantCARE (Lescot *et al.*, 2002) und Transfac (Matys *et al.*, 2006) verglichen.

Um überrepräsentierte Motive zu finden, wurden folgende Programme verwendet: MotifSampler (Thijs *et al.*, 2002) als Gibbs Sampler und YMF 3.0 (Sinha und Tompa 2003) als „*word-counting*“ Methode. Gibbs Sampling ist eine auf Wahrscheinlichkeiten basierte Methode und beruht auf Schätzung der Maximum-Likelihood, während bei „*word-counting*“ im Rahmen vorgegebener Parameter die Anzahl ähnlicher Motive ermittelt und ggf. mit der erwarteten Häufigkeit verglichen wird. Für jeden Cluster und jede Parameterkombination (2-3 Motive der Länge 6-14 bp, $p = 0.3-0.5$) wurden 100 Suchläufe in MotifSampler durchgeführt, daraus die jeweils besten 5 Kandidaten mittels MotifRanking extrahiert und diese wieder untereinander verglichen. Es wurde ein *A.thaliana*-Hintergrundmodel 3.Ordnung verwendet (Thijs *et al.*, 2001). In YMF 3.0 wurde ebenfalls jeder Cluster mit jeweils verschiedenen Parametern (Länge 6-11bp, gaps 0-5) analysiert. ‚FindExplanators‘ Software wurde dann verwendet, um innerhalb der signifikanten Motive die besten 5 zu ermitteln. Anschließend wurde geprüft, ob und welche Information zu den erhaltenen Kandidaten in den Datenbanken PlantCARE und Transfac vorliegt.

2.10 Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Chlorophyllfluoreszenzmessungen können Aufschluß über Verteilung der absorbierten Lichtenergie am PSII auf verschiedene Prozesse (Photochemie, Fluoreszenz, Wärmedissipation) geben. Auch die Effizienz der Photosynthese oder Veränderungen des Photosyntheseapparates können so ermittelt werden (Maxwell und Johnson 2000; Pfannschmidt *et al.*, 2001). *In-vivo*-Chlorophyllfluoreszenzmessungen erfolgten mittels Puls-Amplituden-Modulation (PAM) nach Bestrahlung mit Lichtpulsen (Meßlicht, aktinisches Licht und Sättigungspulse). Definierte Fluoreszenzparameter wurden, wie in (Wagner *et al.*, 2004) beschrieben, ermittelt. Zur Messung wurde eine Kamera mit PAM (FluorCam 700 MF, Photon Systems Instruments, Brno, Tschechien) verwendet. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur statt.

Zur Chlorophyllfluoreszenzmessung wurden Pflanzen auf MS-Platten angezogen (2.6) und nach Akklimation an die verschiedenen Lichtsysteme untersucht. Um Platteneffekte ausschließen zu können, enthielt jede MS-Platte zur Hälfte Wildtyp- und zur Hälfte Mutantpflanzen. Pro Lichtsystem (und Mutantenlinie) wurden 3 Platten gemessen, wobei jede Platte 8-12 Wildtyppflanzen und 8-12 Mutanten enthielt.

Zuerst wurden Pflanzen (Tab. 2.2) für 15 min an Dunkelheit adaptiert und die Minimalfluoreszenz bei Dunkelheit (F_0) gemessen. Anschließend wurde die maximale Fluoreszenz nach Dunkeladaptation (F_m) mit einem sättigenden Lichtpuls (1600 ms, 2000 μ E) bestimmt. Nach einer kurzen Dunkelperiode von 60 s wurde aktinisches Licht (orange LED, $\lambda_{\max}=620$ nm) mit einer Intensität von 90 μ E für 10 min eingestrahlt und nach Erreichen eines Gleichgewichtes die Fluoreszenz im Licht (F_t) gemessen. Parallel dazu wurde alle 3 min ein weiterer Sättigungspuls (1600 ms, 2000 μ E) zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand (F_m') abgegeben. Minimalfluoreszenz nach Lichtadaptation (F_0') wurde im Anschluß durch 120 s Dunkelheit bestimmt. Die *steady-state*-Fluoreszenz wurde wie folgt berechnet: $F_s = F_t - F_0'$. Eine Akklimation an PSI- oder PSII-Licht ist durch eine Veränderung im F_s/F_m -Wert charakterisiert (Pfannschmidt *et al.*, 2001; Sherameti *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde u.a. die maximale Quantenausbeute von PSII (nach Dunkeladaptation) $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Schreiber *et al.*, 1997; Maxwell und Johnson 2000) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der LTR auf der Transkriptebene

Bei der Untersuchung der LTR auf Transkriptebene stand die Dynamik dieses Prozesses im Vordergrund. Um den Verlauf der LTR zu verstehen, sind besonders frühe Zeitpunkte von Interesse, da diese für den weiteren Ablauf der LTR entscheidend sind und direkt durch photosynthetische Redoxsignale beeinflusst werden. Bisher ist allerdings nicht bekannt, welche Veränderungen unmittelbar zu Beginn der Langzeitantwort auftreten. Daher sollte hier der Verlauf der LTR mit besonderem Schwerpunkt auf frühen Zeitpunkten analysiert werden. Untersuchungen der zentralen (*Core*)-Proteine von PSI und PSII, die Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses sowie spektroskopische Messungen zeigten, dass die Anpassung der Photosystemstöchiometrie während der LTR relativ langsam verläuft (Kim *et al.*, 1993; Walters und Horton 1994; Pfannschmidt *et al.*, 2001). Die Halbwertszeit liegt dabei bei höheren Pflanzen im Bereich von 12-24 h. Anhand von β -Glucuronidase (GUS)-*Assays* bei transgenen Pflanzen, die ein PC-Promotor::GUS-Konstrukt enthielten, wurden ähnliche zeitliche Veränderungen beobachtet (Schütze und Pfannschmidt, unveröffentlicht). Zur Untersuchung früher Veränderungen sind die genannten Ansätze somit eher ungeeignet.

Um zeitige und auch umfassende Veränderungen zu erfassen, wurden daher Genexpressionsanalysen mittels *Arrays* durchgeführt (2.7.4). Dazu wurde ein Makroarray verwendet, mit dem die Expression von ca. 3300 Genen analysiert werden kann und der v.a. Kerngene abdeckt, die für plastidäre Proteine kodieren (kernkodiertes Transkriptom des Chloroplasten) (Kurth *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2003). Diese Vorauswahl der Gene ermöglicht es, die enge Verknüpfung von Chloroplast und Zellkern während der LTR zu berücksichtigen und den Einfluss retrograde Signale zu erfassen. Die enge Verbindung der beiden Zellkompartimente ergibt sich u.a. daraus, dass an Veränderungen und Umstrukturierungen im Chloroplasten während der LTR eine Reihe von kernkodierten Chloroplastenproteinen beteiligt sind. Die Verlässlichkeit des gewählten Makroarrays wurde bereits in verschiedenen Studien mit unabhängigen Methoden bestätigt (Kurth *et al.*, 2002; Bosco *et al.*, 2004; Kubis *et al.*, 2004).

Für die Analyse der Genexpression wurden hier, ausgehend von Untersuchungen zur Anpassung der Photosystemstöchiometrie (s.o.), fünf Zeitpunkte ausgewählt, die den zeitlichen Verlauf der LTR abdecken und gleichzeitig eine genaue Analyse früher Zeitpunkte ermöglichen. Die LTR wurde auf Transkriptebene 30 min, 2 h, 8 h sowie 48 h nach Erzeugung eines Reduktionssignales im PET (PSI-II-Wechsel) bzw. eines Oxidationssignales

(PSII-I-Wechsel) untersucht (Abb. 3.1). Die 0 h-Zeitpunkte (vor einem Lichtwechsel) dienten dabei als Referenz. Der erhaltene Datensatz der Expressionsprofile ist in der GEO-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) unter dem Zugangscode GSE9235 öffentlich zugänglich.

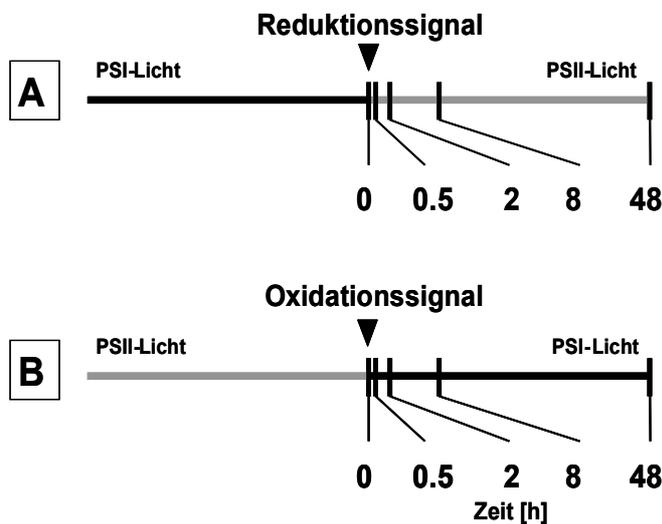
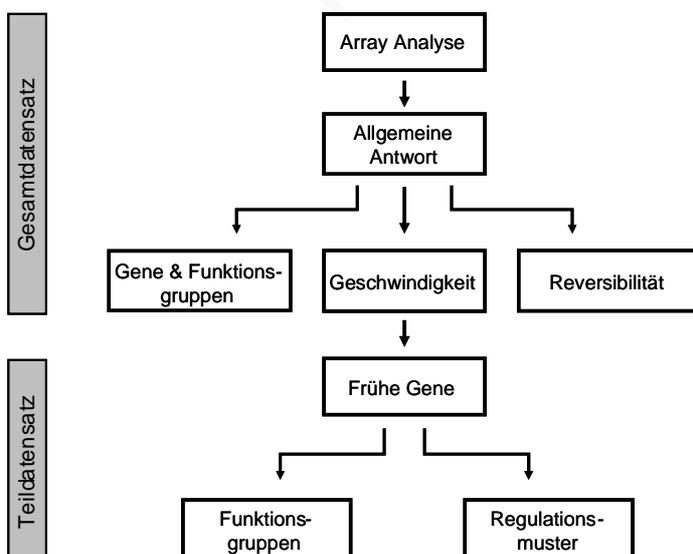


Abb. 3.1: Experimenteller Ansatz zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Langzeitantwort. 3 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen wurden 3 Tage entweder in PSI-Licht oder PSII-Licht vorakklimatisiert und in das jeweils andere Lichtsystem umgestellt, um ein deutliches Reduktions- (A) bzw. Oxidationssignal (B) im photosynthetischen Elektronentransport zu erzeugen. Die Akklimationsreaktionen in Antwort auf diese Redoxsignale wurden nach 0.5, 2, 8 und 48 h untersucht. Der 0 h-Zeitpunkt (vor dem Umstellen) diente dabei als Kontrolle.

Zur Analyse der Expressionsdaten wurde zunächst der gesamte Datensatz betrachtet, um diesen auf allgemeine Muster hin zu untersuchen. Danach wurden Teile des Gesamtdatensatzes, v.a. Expressionsprofile früher Zeitpunkte, ausgewählt und von diesen wiederum weitere Untergruppen genauer untersucht.

Diese Herangehensweise (*top-down approach*) ermöglicht es, die Daten auf verschiedenen Skalen zu analysieren und ggf. Regulationsmechanismen, die auf verschiedenen Ebenen stattfinden, zu erfassen. Die Strategie der Datenanalyse ist in Abb. 3.2 dargestellt.



Es sollte u.a. untersucht werden, welche Gene reagieren, wie schnell die Regulation erfolgt und ob ein Reduktions- und ein Oxidationssignal entgegengesetzt wirken. Ausgehend davon wurde anschließend ein Teildatensatz zur detaillierteren Analyse ausgewählt.

Abb. 3.2: Strategie zur Analyse der Expressionsprofile.

3.1.1 Überblick über den zeitlichen Verlauf der Akklimationsreaktion auf Transkriptebene: *Transcript Profiling*

Der zeitliche Verlauf der Akklimation auf Transkriptebene nach einem Reduktions- bzw. Oxidationssignal ist in Abb. 3.3 dargestellt. Nur Gene, die sich in ihrer Expression signifikant von der Referenz (Zeitpunkt 0h vor dem Lichtwechsel) unterscheiden (2.7.4), wurden betrachtet.

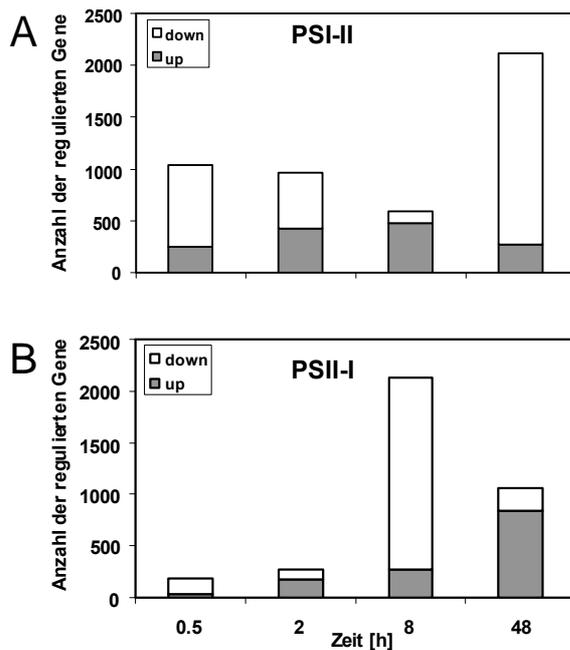


Abb. 3.3: Anzahl der signifikant regulierten Gene im Verlauf der Akklimation nach einem Reduktions- bzw. Oxidationssignal. Unterschiede in der Expression nach einem photosynthetischen Redoxsignal wurden bei *Arabidopsis* mit einem GST-Array untersucht. Gene mit signifikantem Unterschied in der Expression sind aufgeführt (Z-Test, $p < 0.05$, $n = 4-6$, FDR-Korrektur). Induzierte Gene sind grau, reprimierte weiß dargestellt.

A: Reaktion auf ein Reduktionssignal.
B: Reaktion auf ein Oxidationssignal.

Bei beiden Experimenten reagierten die ersten Gene innerhalb von 30 min mit signifikanter Veränderung der Transkriptmenge (Z-Test, $p < 0.05$). Das deutet auf eine schnelle Übertragung der untersuchten photosynthetischen Redoxsignale aus dem Chloroplasten in den Zellkern hin.

30 min nach Erzeugung des Reduktionssignals (Abb. 3.3A) zeigten 1039 Gene signifikante Expressionsänderungen, wobei die meisten davon reprimiert wurden (~ 76%). Das Expressionsprofil 2 h nach einem Reduktionssignal war dem des 30 min-Zeitpunktes ähnlich, wobei die Anzahl der induzierten Gene anstieg (von ca. 250 auf 430) und die Anzahl der reprimierten Gene abfiel (von 790 auf 540). Ein weiterer Rückgang in der Anzahl der reprimierten Gene trat nach 8 h auf (120 von 600). Ein deutlich anderes Expressionsprofil zeigte sich schließlich nach 48 h. Es spiegelte den Endzeitpunkt der Akklimationsantwort auf ein Reduktionssignal wider, da bereits auf physiologischer Ebene gezeigt wurde, dass nach 48h die LTR weitestgehend abgeschlossen ist (Kim *et al.*, 1993; Pfanschmidt *et al.*, 2001). Zum 48 h-Zeitpunkt wurden 1840 reprimierte und 267 induzierte Gene detektiert.

Anders als bei der Reaktion auf ein Reduktionssignal reagierten nur 190 Gene innerhalb von 30 min auf ein Oxidationssignal (Abb. 3.3B), wobei die meisten davon reprimiert wurden. Die

Anzahl der signifikant regulierten Gene stieg auch 2 h nach einem Oxidationssignal nur leicht an (269 Gene). Nach 8 h allerdings zeigten viele Gene eine veränderte Expression, wobei vor allem die Anzahl der reprimierten Gene erheblich zunahm (1862 vs. 99 bei 2 h). Zum 48 h-Zeitpunkt überwogen induzierte Gene (840). Das Expressionsprofil zu diesem Zeitpunkt repräsentierte den Endzustand der Akklimation an ein Oxidationssignal.

Während bei der Akklimation auf ein Reduktionssignal regulierte Gene vorwiegend reprimiert waren, überwogen bei der Reaktion auf ein Oxidationssignal (den 8 h-Zeitpunkt ausgenommen) eher induzierte Gene.

Um einen detaillierteren Überblick über die Regulation zu erhalten, wurden die Expressionsdaten mit Hilfe der Software MapMan (Version 2.0.0; Thimm *et al.*, 2004; Usadel *et al.*, 2005) genauer untersucht und alle Gene funktionellen Gruppen zugeordnet. Die dabei verwendeten 35 funktionellen Kategorien sind bei (Thimm *et al.*, 2004) genauer beschrieben und umfassen bspw. Photosynthese, Transport, *Signalling*, Stress sowie verschiedene metabolische Funktionsgruppen.

Bei der genaueren Analyse der Expressionsdaten wurde deutlich, dass es meist nicht dieselben Gene waren, die auf ein Reduktions- bzw. auf ein Oxidationssignal reagierten (als ein Bsp. siehe Abb. 3.4). Bei der Akklimation nach einem Reduktions- bzw. Oxidationssignal handelt es sich daher vermutlich um unterschiedliche Reaktionen, an denen auch verschiedene Prozesse beteiligt sind.

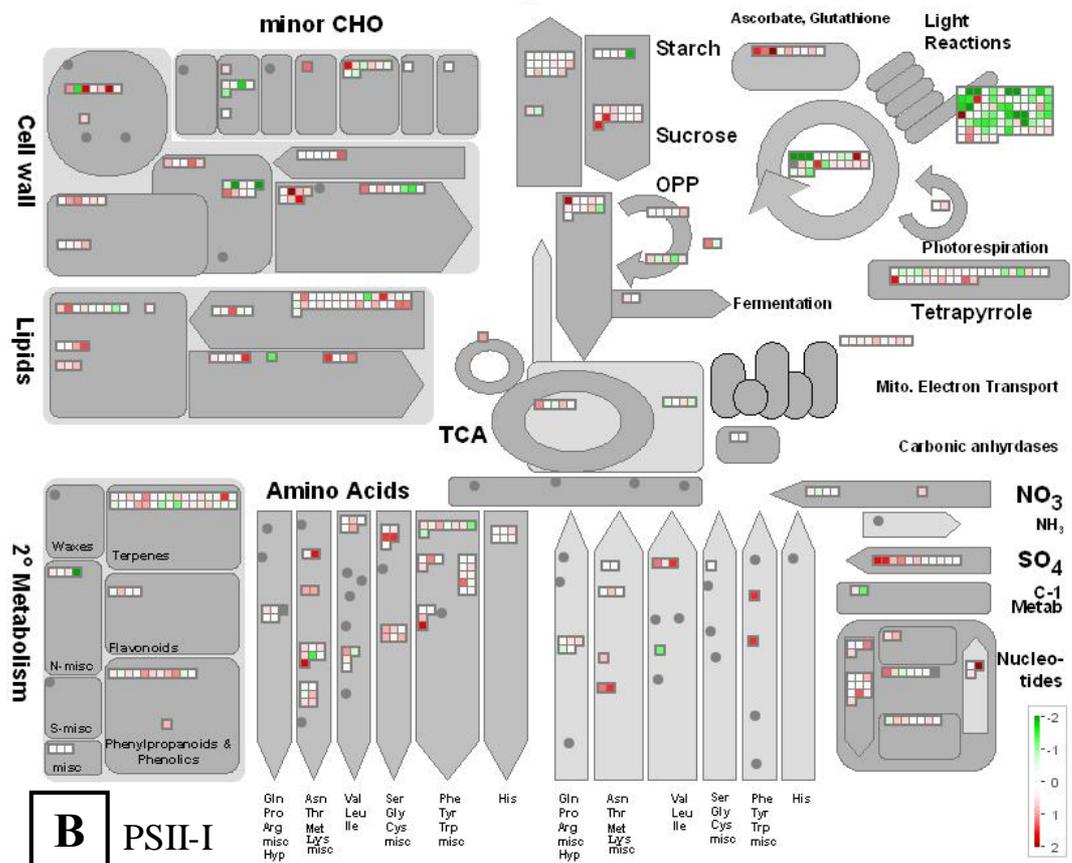
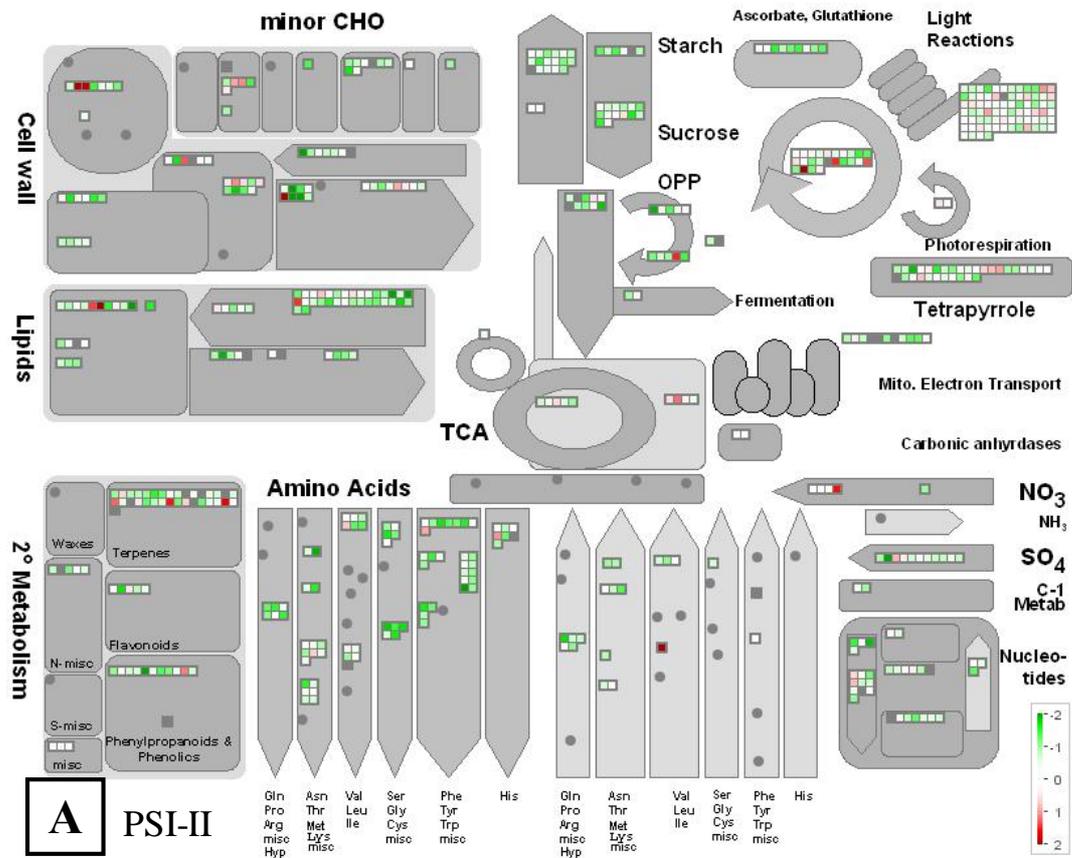
Da die Langzeitantwort durch Umstrukturierung des Photosyntheseapparates charakterisiert ist, wurde angenommen, dass Photosynthesegene während der LTR spezifisch kontrolliert werden (Pfannschmidt *et al.*, 2001b). Um das zu überprüfen und mögliche weitere Zusammenhänge aufzudecken, wurde für jede einzelne funktionelle Gruppe (s.o.) zu jedem Zeitpunkt getestet, ob sie sich hinsichtlich ihrer Expressionswerte von der Gesamtheit aller anderen Funktionsgruppen unterschied (Wilcoxon Rangsummentest, p-Wert-Korrektur nach Benjamini und Hochberg). Der Test zeigte, dass Photosynthesegene die einzige Kategorie darstellten, die sich signifikant in ihrer Expression von allen anderen Gruppen unterschied ($p < 0.05$, Tab. 3.1). Photosynthesegene, als Gesamtgruppe betrachtet, zeigten somit eine andere Regulation als alle anderen mit dem *Array* untersuchten Gene. Dieses Ergebnis wurde für den 30 min-Zeitpunkt nach Erzeugung eines Oxidationssignales, vor allem aber zu späteren Zeitpunkten bei beiden Akklimationsreaktionen (nach einem Oxidations- und nach einem Reduktionssignal) erhalten (Tab. 3.1). Die beobachtete spezifische Regulation der Photosynthesegene bestätigt damit eindeutig die oben getroffene Annahme.

Experiment	Zeitpunkt	n	p-Wert*
PSI-II	0.5h	102	5.00E-02
	2h	102	1.33E-06
	8h	102	2.62E-06
	48h	100	9.30E-07
PSII-I	0.5h	100	1.00E-20
	2h	102	8.00E-02
	8h	101	7.15E-03
	48h	101	1.42E-13

Tab. 3.1: Vergleich des Expressionsverhaltens von Photosyntheseenen mit dem der Gene aller anderen Funktionsgruppen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten wurden Expressionsprofile mit einem GST-Array erstellt. Mit dem Wilcoxon Rangsummentest (MapMan Software, Version 2.0.0) wurde zu jedem Zeitpunkt für jede Gruppe funktionell ähnlicher Gene überprüft, ob diese sich signifikant von allen anderen verbliebenen Funktionsgruppen unterschied. Das traf einzig bei der Gruppe der hier aufgeführten Photosyntheseene bei einigen Zeitpunkten zu ($p < 0.05$ fett hervorgehoben). n: Anzahl der berücksichtigten Photosyntheseene, * unter Verwendung einer Korrektur für multiples Testen nach Benjamini und Hochberg 1995.

Weiterhin wurden die Expressionsprofile nach Zuordnung der Gene zu funktionellen Gruppen graphisch dargestellt. Am Beispiel der 48 h - Zeitpunkte sind die Genexpressionsänderungen (durch einen Farbcode wiedergegeben) in einem Überblickschema des pflanzlichen Stoffwechsels in Abb. 3.4 veranschaulicht. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da es sich um den Endpunkt der untersuchten Kinetik handelt und im Vergleich zur Referenz (0 h) viele Gene Veränderungen in ihrer Expression zeigten. Wie erwartet, wurden Genexpressionsänderungen bei einer Reihe von Photosyntheseenen beobachtet (Abb. 3.4: Lichtreaktionen, Calvinzyklus). Interessanter Weise wurden außerdem Gene verschiedenster weiterer Funktionsgruppen reguliert. Diese weiteren Funktionsgruppen betrafen u.a. Aminosäure-, Nukleotid- und Lipidstoffwechsel. Damit wurden umfassende Veränderungen auf der Ebene der Genexpression, die nicht nur auf Photosyntheseene beschränkt waren, beobachtet, was auf komplexe Regulationsmechanismen während der LTR hindeutet.

Abb. 3.4 (umseitig): Akklimationsantwort auf Transkriptebene 48 h nach Veränderung der Lichtqualität. A: Wechsel von PSI- nach PSII-Licht. B: Lichtwechsel von PSII- nach PSI-Licht. *Expression Profiling* erfolgte mit einem GST-Array. Genexpressionsänderungen d.h. Verhältnisse der Signale 48h nach Wechsel der Lichtqualität im Vergleich zur 0h-Referenz ohne Lichtwechsel sind (als \log_2 -transformierte Verhältnisse) graphisch dargestellt. Rote Quadrate bedeuten Anstieg der Transkriptmenge, grün steht für Herunterregulation. Zur Veranschaulichung sind die Daten nach funktionellen Gruppen sortiert in einem Überblickschema des pflanzlichen Stoffwechsels dargestellt. Dazu wurde die Software MapMan (Version 2.0.0) verwendet. Da sich die Farbskala auf \log_2 -transformierte Werte bezieht, bedeuten blasser Farben halbe bzw. doppelte Expression; Farbsättigung steht für Expressionsänderung um Faktor ≥ 4 .



3.1.2 Identifikation, funktionelle Zuordnung und Regulation von primär regulierten Genen

Betrachtet man den Verlauf der Akklimationsreaktionen, so zeigen die Expressionsprofile, dass verschiedene Gene unterschiedlich schnell reagieren. Änderungen in der Genexpression traten zeitig, zu mittleren Zeitpunkten oder erst am Ende der Akklimation auf. Gene, bei denen die Expressionsänderungen zu Beginn der LTR auftraten, könnten direkt durch photosynthetische Redoxsignale reguliert sein. Um mögliche primäre *Targets* der Redoxsignale zu identifizieren, wurden daher die Expressionsprofile der 30 min-Zeitpunkte genauer untersucht. Schnell und deutlich regulierte Gene wurden dabei nach folgenden Kriterien ausgewählt:

- (1) signifikante Änderung der Transkriptmenge um Faktor 2.5 oder mehr im Vergleich zur Referenz (0h).
- (2) Detektierbarkeit des Transkriptes zu allen Zeitpunkten

Nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht erfüllten 45 Gene diese Kriterien; nach einem PSII-I-Lichtwechsel wurden 60 Gene selektiert. Diese Gene sind in Tabelle 3.2 aufgeführt und werden im Folgenden als „primär regulierte Gene“ oder kurz „PRGs“ bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit erstmalig 105 Gene identifiziert werden, die während der LTR schnell und deutlich reguliert waren und damit mögliche direkte Zielgene photosynthetischer Redoxsignale darstellen.

ATG ^A	Expression ^B	Annotation	funktionelle Klassifizierung
PSI-II			
Metabolism / Structure			
At3g17670	0.19	ferredoxin-related protein	photosynthesis
At3g43610	0.40	tubulin family protein	cell organization
At1g73110	2.55	putative RuBisCO activase	photosynthesis
At4g26220	2.72	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase-like (CCoAMT)	secondary metabolism
		cofactor of nitrate reductase and xanthine dehydrogenase	
At1g01290	2.75	3 (CNX3)	secondary metabolism
At4g20930	3.13	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase, putative	amino acid metabolism
Regulation			
At4g17740	0.27	putative PSII D1 protein processing enzyme	photosynthesis
At1g07460	0.29	putative lectin	sensing, signalling, communication
At1g08540	0.29	sigma factor (SIGB)	transcription
At2g47730	0.36	glutathione S-transferase 6 (GST6)	stress response
At3g23230	0.37	ethylene responsive factor family protein	transcription
At2g17840	0.38	early-responsive to dehydration (ERD7)	stress response
At2g42300	0.39	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	transcription
At5g20730	2.51	auxin-responsive factor (ARF7)	transcription
At5g14580	2.59	putative polyribonucleotide nucleotidyltransferase	RNA metabolism
At4g07990	2.59	DNAJ protein	stress response

ATG ^A	Expression ^B	Annotation	funktionelle Klassifizierung
At2g04240	2.68	RING-zinc finger protein	sensing, signalling, communication
At1g68725	2.80	rabinogalactan-protein 19 (AGP19)	sensing, signalling, communication
At5g17820	2.91	peroxidase (ATP13)	stress response
At2g40380	2.92	prenylated rab acceptor (PRA1) family protein	sensing, signalling, communication
At4g11230	3.24	respiratory burst oxidase homolog F - like protein	stress response
At2g14890	3.53	arabinogalactan protein (AGP9)	sensing, signalling, communication
At4g29060	3.60	elongation factor Ts family protein	protein synthesis
At5g47610	3.88	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	sensing, signalling, communication
Unclassified			
At4g03530	0.29	putative reverse transcriptase	unclassified
At2g15890	0.30	expressed protein	unclassified
At1g67400	0.32	phagocytosis related, putative	unclassified
At4g31510	0.32	expressed protein	unclassified
At4g31930	0.32	MAM33 family protein	unclassified
At4g22650	0.33	hypothetical protein	unclassified
At3g57280	0.33	expressed protein	unclassified
At2g29670	0.34	expressed protein	unclassified
At5g32490	0.34	hypothetical protein	unclassified
At1g18290	0.35	hypothetical protein	unclassified
At4g35170	0.35	hypothetical protein	unclassified
At4g38150	0.37	PPR repeat-containing protein	unclassified
At2g36050	0.39	ovate protein-related	unclassified
At2g16460	2.59	expressed protein	unclassified
At4g39690	2.63	expressed protein	unclassified
At3g50140	2.82	unknown protein	unclassified
At1g74220	2.98	expressed protein	unclassified
At4g01650	3.83	putative lipid transport protein	unclassified
At2g41040	3.91	methyltransferase-related	unclassified
At1g51350	4.84	armadillo/beta-catenin repeat family protein	unclassified
At1g05130	5.20	expressed protein	unclassified

ATG ^A	Expression ^B	Annotation	funktionelle Klassifizierung
PSII-I			
Metabolismus / Structure			
At2g37250	0.10	adenylate kinase family protein	nucleotide metabolism
At1g69200	0.11	b3 pfkB-type carbohydrate kinase family protein	carbohydrate metabolism
At4g12060	0.14	Clp amino terminal domain-containing protein	protein metabolism
At5g13550	0.19	sulfate transporter 4.1	transport
At3g58990	0.19	aconitase domain-containing protein	amino acid metabolism
At1g32220	0.20	expressed protein	carbohydrate metabolism
At1g14230	0.20	nucleoside phosphatase family protein	nucleotide metabolism
At2g27810	0.20	nucleobase-ascorbate transporter 12 (NAT12)	transport
At3g55800	0.21	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)	photosynthesis
At3g01180	0.22	starch synthase gene (STS2)	carbohydrate metabolism
At4g18180	0.23	polygalacturonase (pectinase) family protein	cell wall
At4g32540	0.25	flavin-containing monooxygenase (YUCCA)	hormon metabolism
At2g23800	0.27	geranylgeranyl pyrophosphate synthase	secondary metabolism
At2g44800	0.30	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	secondary metabolism
At1g03600	0.31	photosystem II family protein	photosynthesis
At1g16250	0.34	kelch repeat-containing F-box family protein	protein metabolism
At5g10100	0.37	putative trehalose-6-phosphate phosphatase	carbohydrate metabolism
At2g23890	0.37	5' nucleotidase family protein	nucleotide metabolism
At1g54630	0.38	acyl carrier protein 3 (ACP3)	lipid metabolism

ATG ^A	Expression ^B	Annotation	funktionelle Klassifizierung
At2g29650	0.40	putative, inorganic phosphate transporter	transport
At3g60750	0.40	transketolase	photosynthesis/carbohydrate met.
At2g06520	2.51	photosystem II subunit X	photosynthesis
At4g25720	2.60	glutamine cyclotransferase family protein	protein metabolism
At3g11670	2.76	digalactosyldiacylglycerol synthase 1 (DGD1)	lipid metabolism
At3g12120	2.84	fatty acid desaturase 2 (FAD2)	lipid metabolism
At4g25970	3.24	phosphatidylserine decarboxylase 3 (PSD3)	lipid metabolism
At2g17120	4.00	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein	cell wall
At5g38420	4.39	RuBisCO small subunit 2B	photosynthesis
At3g56940	5.09	dicarboxylate diiron protein (Crd1)	tetrapyrrol metabolism
Regulation			
At1g80740	0.29	chromomethylase 1 (CMT1)	transcription
At3g54660	0.29	glutathione reductase	stress response
At2g36480	0.31	zinc finger (C2H2-type) family protein	transcription
At2g02070	0.31	zinc finger (C2H2 type) family protein	transcription
At4g33500	0.31	protein phosphatase type 2C	protein modification
At5g57180	0.32	chloroplast import apparatus 2 (CIA2)	transcription
At4g23150	0.35	protein kinase	protein modification
At1g26970	0.36	protein kinase	protein modification
At4g39710	0.37	putative immunophilin	protein modification
At2g29100	0.37	glutamate receptor family protein (GLR2.9)	sensing, signalling, communication
At2g37060	0.37	putative CCAAT-box binding transcription factor	transcription
At1g64890	0.38	integral membrane transporter family protein	transport
At4g03260	0.38	leucine-rich repeat family protein	protein modification
At5g07770	2.51	FH2 domain-containing protein	sensing, signalling, communication
At1g12090	3.65	extensin-like protein	protein modification
Unclassified			
At1g24350	0.22	expressed protein	unclassified
At4g04430	0.23	CACTA-like transposase family	unclassified
At2g16270	0.26	expressed protein	unclassified
At2g29670	0.27	expressed protein	unclassified
At5g58930	0.30	expressed protein	unclassified
At4g09970	0.32	expressed protein	unclassified
At2g34700	0.36	pollen oleosin and extensin family protein	unclassified
At1g41670	0.36	hypothetical protein	unclassified
At5g07540	0.36	glycine-rich protein 16 (GRP16)	unclassified
At3g52550	0.38	hypothetical protein	unclassified
At1g67460	0.38	expressed protein	unclassified
At2g01580	0.38	expressed protein	unclassified
At4g11910	0.39	expressed protein	unclassified
At5g23060	0.39	expressed protein	unclassified
At4g16080	0.40	hypothetical protein	unclassified
At4g10810	2.49	expressed protein	unclassified

Tab. 3.2: Primär regulierte Gene (PRGs) während der LTR. Expressionsprofile 30 min nach dem Reduktionssignal (PSI-II) bzw. dem Oxidationssignal (PSII-I) wurden analysiert. Aufgelistet sind die Gene, deren Expression sich zu diesem Zeitpunkt um Faktor ≥ 2.5 ändert und deren Transkripte über den Verlauf der Akklimation detektiert wurden. Die funktionelle Klassifizierung erfolgte wie in Biehl *et al.*, 2005 beschrieben, wobei neuere Datenbankinformationen (NCBI, TAIR, Stand Febr. 2007) berücksichtigt wurden. ^A AGI Accession number. ^B Verhältnis der Genexpression 30 min nach Lichtwechsel im Vergleich zur Referenzbedingung.

Anschließend wurde die Funktion der primär regulierten Gene (Tab. 3.2) genauer betrachtet. Die Zuordnung zu funktionellen Gruppen ist in Tab. 3.2 aufgeführt und in Abb. 3.5 graphisch dargestellt.

Knapp die Hälfte der nach einem PSI-II-Lichtwechsel selektierten Gene (47%) ist bisher nicht klassifiziert. Innerhalb der klassifizierten Gene wurde die Mehrheit (83%) regulatorischen Funktionsklassen zugeordnet. Produkte dieser Gene sind vor allem an *Sensing* und *Signalling*, an Stressantworten oder an der Regulation der Transkription beteiligt. Nur ca. 13% der PSI-II-Gene kodierten für Proteine mit metabolischen Funktionen (Abb. 3.5A).

Im Gegensatz dazu konnten die meisten der nach einem PSII-I-Lichtwechsel selektierten Gene laut Datenbankinformationen metabolischen Funktionsklassen zugeordnet werden (48%). Sie kodieren für Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen, die vor allem bei der Photosynthese, dem Kohlenhydratmetabolismus sowie dem Fett- und Sekundärstoffwechsel eine Rolle spielen. Regulatorischen Funktionsgruppen wurden ca. 25% der Gene zugeordnet, wobei hier Proteinmodifikation und Regulation der Transkription überwogen (73% der Gene regulatorischer Funktionsklassen). Gene der Funktionsgruppen *Signalling* und Stressantwort waren kaum vertreten. Etwa 27% der frühen PSII-I Gene sind bis jetzt nicht klassifiziert (Abb. 3.5B).

Zusammenfassend ergibt sich, dass nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht vor allem Gene reguliert sind, die für Proteine mit regulatorischer Funktion kodieren. Auf einen PSII-I-Lichtwechsel reagieren dagegen überwiegend Gene, die metabolischen Funktionsklassen zugeordnet sind.

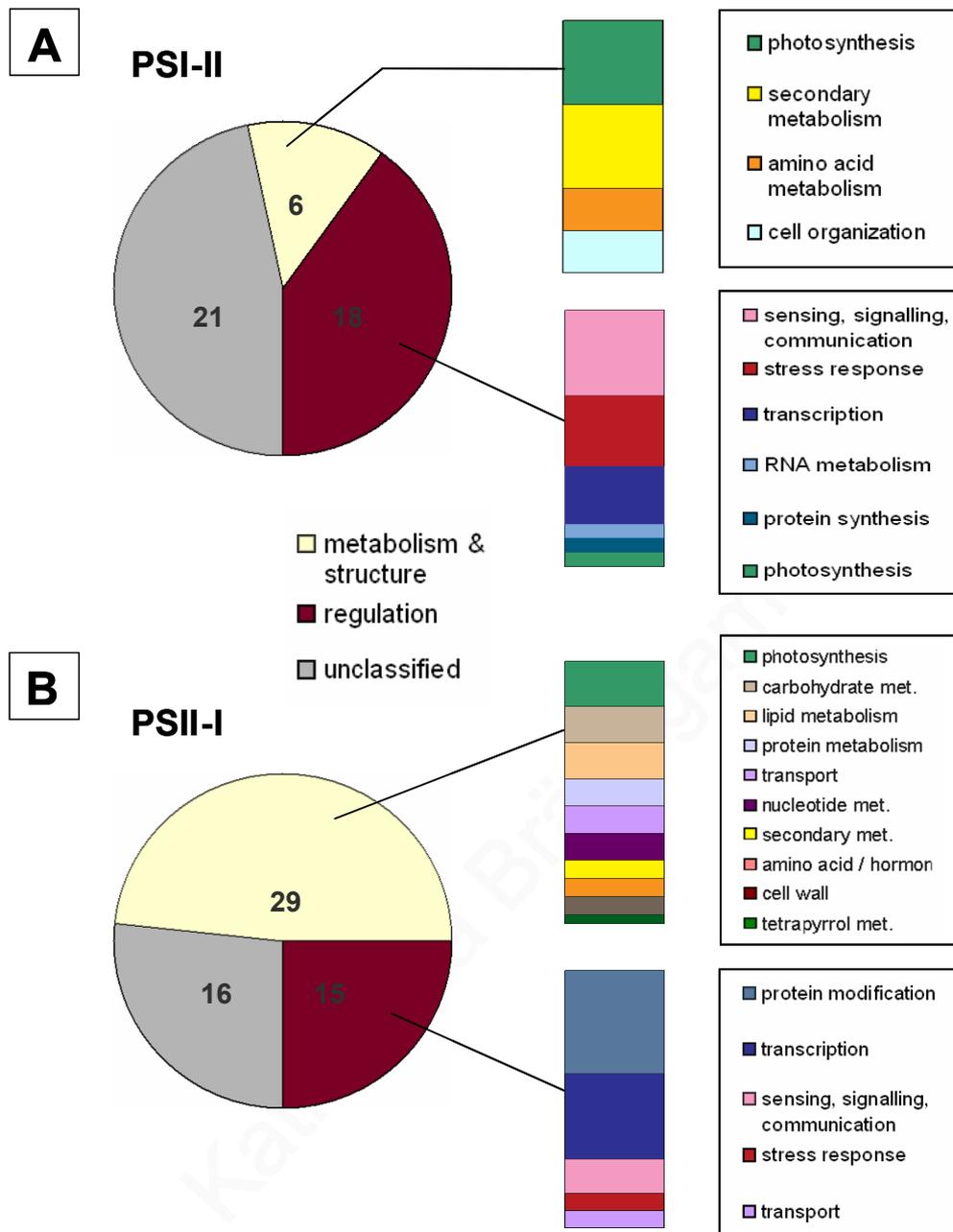


Abb. 3.5: Funktionelle Klassifizierung der primär regulierten Gene. Gene mit mindestens 2.5-facher Regulation (Tab. 3.2) wurden einer von drei übergeordneten Kategorien (Regulation, Metabolismus/Struktur und Unklassifiziert) zugeordnet und für den Wechsel von PSI- nach PSII-Licht (PSI-II) sowie den entgegengesetzten Lichtwechsel (PSII-I) im Tortendiagramm dargestellt. Die Aufteilung der Genfunktionen auf detaillierte Funktionsklassen innerhalb der Kategorien Regulation und Metabolismus ist im farbigen Balken im rechten Teil der Abb. veranschaulicht (jeder Balken entspricht 100%).

Nachdem 105 Gene verschiedener Funktionsklassen als „primär regulierte Gene“ identifiziert werden konnten, wurde nun untersucht, inwiefern diese Gene während der LTR zueinander in Beziehung stehen. Anhand der Daten des *Transcript Profiling* war es möglich, dieser Frage nachzugehen und das Expressionsverhalten der PRGs im gesamten zeitlichen Verlauf der LTR zu betrachten. Zeigen verschiedene Gene ein ähnliches Expressionsverhalten, kann das

auf Koregulation und eine funktionelle Verbindung dieser Gene hindeuten (*guilt-by-association*, D'Haeseleer *et al.*, 2000; Quackenbush 2003). Dagegen können abweichende Expressionsmuster unterschiedliche Regulationsmechanismen oder die Beteiligung der Genprodukte an verschiedenen Prozessen in der Zelle widerspiegeln.

Mit Hilfe eines Clusteralgorithmus wurden die PRGs in Gruppen ähnlich regulierter Gene unterteilt. Hier wurde *k-means-Clustering* verwendet, da keine hierarchische Struktur angenommen wurde (2.9.3). Die erhaltenen strukturellen Gruppen sind in Abb. 3.6 dargestellt und die Zuordnung der Gene zu den einzelnen Clustern ist in Tab. A.1 angegeben.

Nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht (Reduktionssignal) konnten drei deutliche Cluster unterschieden werden, die sich durch Reprimierung der Expression (Cluster1), Induktion (Cluster2) und gemischte Regulation (Cluster3) auszeichnen (Abb. 3.6A). Nach einem PSII-I-Lichtwechsel (Oxidationssignal) wurden vier Gruppen unterschieden, die ebenfalls durch Reprimierung (Cluster1), Induktion (Cluster2) und gemischte Regulation (Cluster3&4) charakterisiert sind (Abb. 3.6B). Allerdings folgte bei diesem Lichtwechsel (anders als bei dem PSI-II-Wechsel) direkt nach der Reprimierung bzw. Induktion wieder ein Anstieg bzw. eine Abnahme der Transkriptmenge.

Wird die funktionelle Klassifizierung der Gene in den einzelnen Clustern betrachtet (Tab. 3.2, Tab. A.1), so zeigt sich, dass keiner der Cluster eindeutig durch Gene einer einzelnen Funktionsklasse dominiert oder charakterisiert ist. Damit konnte für keinen der Cluster eine eindeutige Verbindung zwischen Expressionsmuster und Funktion der kodierten Genprodukte (funktionelle Klassifizierung) hergestellt werden.

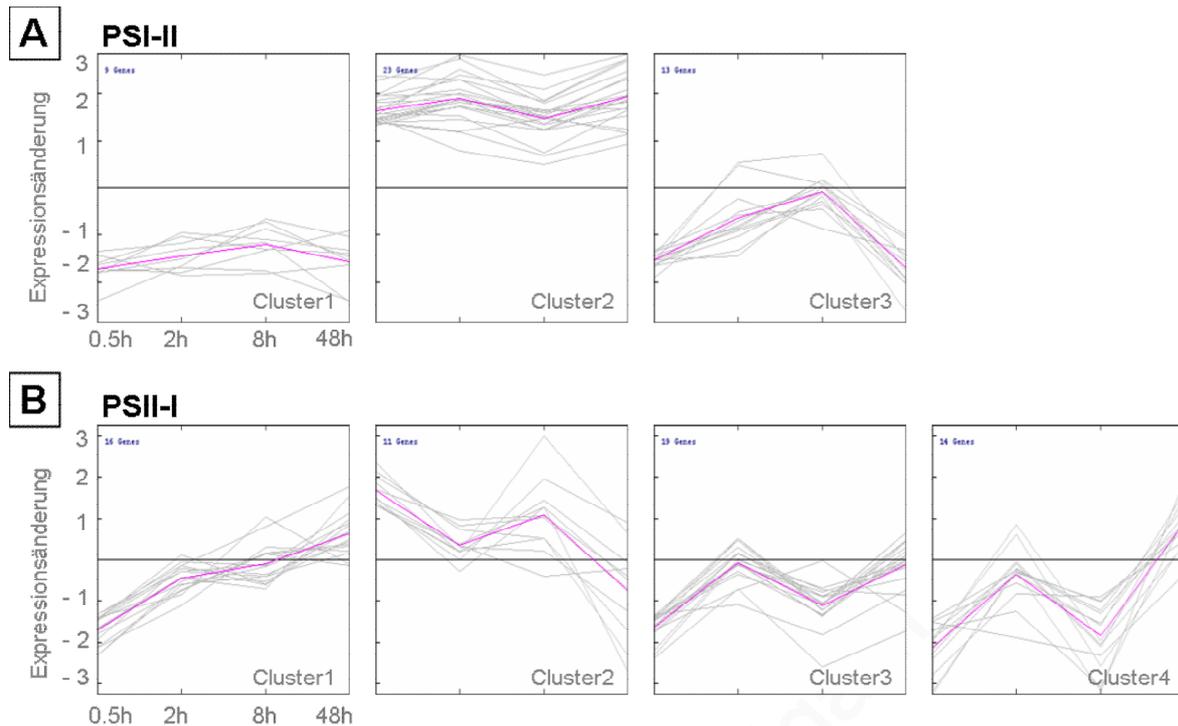


Abb. 3.6: Regulationsmuster innerhalb der früh regulierten Gene. Die Unterteilung in Gruppen ähnlich regulierter Gene erfolgte mittels *k-means*-Clustering. Nach einem PSI-II-Lichtwechsel wurden drei und nach dem PSII-I-Lichtwechsel vier deutliche Gruppen unterschieden. Für jeden Cluster ist der zeitliche Verlauf der Akklimation dargestellt. Der mittlere Expressionsverlauf der Gene eines Clusters (Centroid) ist rosa wiedergegeben. Positive Werte stehen für Hoch-, negative Werte für Herunterregulation, wobei ein Teilstrich doppelte bzw. halbe Expression bedeutet.

3.1.3 Vergleich der primär regulierten Gene mit Expressionsdatensätzen anderer Experimente

Zur Untersuchung der LTR wurden in dieser Arbeit Lichtquellen verschiedener Qualität verwendet (PSI- und PSII-Licht) und die Akklimationsreaktionen nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht bzw. einem II-I-Wechsel analysiert (2.5). Bei der Akklimation an eine veränderte Lichtqualität können allerdings auch Überlappungen mit anderen lichtabhängigen Prozessen bzw. Interaktionen photosynthetischer Redoxsignale mit anderen Signalwegen auftreten. Da sich die verwendeten Lichtquellen in ihrem Dunkelrotlichtanteil unterscheiden (Abb. 2.1), könnten beispielsweise auch Phytochrom-vermittelte Antworten eine Rolle spielen. Weiterhin könnten reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche u.U. bei Umweltveränderungen verstärkt erzeugt werden, auch bei einer Veränderung der Lichtqualität verstärkt gebildet werden.

Dass auch bei Photorezeptormutanten eine LTR stattfindet, und damit funktionelle Photorezeptoren für die LTR nicht erforderlich sind, wurde mit Fluoreszenzmessungen

gezeigt (Fey *et al.*, 2005). Weiterhin gibt der Redoxzustand des Antioxidanz Gluthation keinen Hinweis auf einem erhöhten Gehalt an ROS nach Ablauf der LTR (Fey *et al.*, 2005).

Allerdings stellen photosynthetische Redoxsignale, Photorezeptoren und ROS Teile eines Signalnetzwerkes dar, bei dem Überlappungen der Signalwege und der vermittelten Antworten auftreten können. Ob und in welchem Umfang solche Überlappungen während der LTR auftreten und wie sich diese auf die Ebene der Genexpression auswirken, ist bisher nicht bekannt. Um das zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein neuer Ansatz verwendet. Dabei wurden Expressionsdaten dieser Arbeit umfangreich mit *Array*-Daten aus Studien verglichen, die den Einfluss von Phytochrom (Phy) oder ROS untersuchen. Falls während der Akklimation an eine veränderte Lichtqualität auch andere Einflüsse (z.B. Phy, ROS) eine Rolle spielen, müssten diese Einflüsse eine „Signatur“ in den Expressionsprofilen hinterlassen, die nach einem Lichtwechsel erstellt wurden. Das heißt, Gene, die durch Phytochrome oder ROS reguliert werden, müssten auch während der Lichtqualitätsakklimation Veränderungen in der Genexpression aufweisen. Die Anzahl der Gene, die sowohl nach Veränderung der Lichtqualität als auch bei ROS- bzw. Phy-Experimenten reguliert werden (überlappende Gene), vermittelt einen Eindruck, wie stark sich die verschiedenen Prozesse überlappen. Der hier durchgeführte Vergleich ist, da er auf Transkriptdaten beruht, sehr sensitiv und ermöglicht es, Einflüsse von ROS und Phy auch dann zu detektieren, wenn diese auf physiologischer Ebene noch nicht nachweisbar sind.

Für den Vergleich wurden die primär regulierten Gene (PRGs, Tab. 3.2) aus dieser Arbeit herangezogen, da hier am ehesten Überlappungen zu erwarten sind. Des Weiteren wurden verschiedene *Array*-Datensätze verwendet, die den Einfluss von ROS bzw. Phy widerspiegeln. Dabei wurden v.a. solche Datensätze ausgewählt, die möglichst das gesamte *Arabidopsis*-Genom abdecken (z.B. ATH1-*Array*). Falls nötig, wurden die Datensätze vor dem Vergleich bearbeitet (siehe 2.9.5). Um die Ergebnisse abzusichern und individuelle Unterschiede im jeweiligen experimentellen Aufbau nicht zu stark zu gewichten, wurden insgesamt 12 Datensätze verwendet.

Sechs Studien, die den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen oder Singulett-Sauerstoff auf das Transkriptom von *A. thaliana* untersuchten, wurden berücksichtigt (Desikan *et al.*, 2001; op den Camp *et al.*, 2003; Rizhsky *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Vanderauwera *et al.*, 2005). Für eine genauere Beschreibung der Datensätze und Publikationen siehe 2.9.5. Der Vergleich erbrachte keine oder nur wenige Übereinstimmungen mit den primär regulierten Genen (Abb. 3.7A).

Verschiedene Experimente, die den Einfluss von Photorezeptoren wie beispielsweise Phytochrom A oder B auf die Genexpression untersuchten, wurden ebenfalls zum Vergleich

herangezogen (Kuno *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Monte *et al.*, 2004; Kretsch 2005). Für eine genauere Beschreibung der Datensätze und Publikationen siehe 2.9.5. Wiederum erbrachte der Vergleich keine oder nur wenige Übereinstimmungen mit den primär regulierten Genen (Abb. 3.7B).

Daraus ist zu schließen, dass die Überlappung von PRGs mit Genen, die durch ROS bzw. Phytochrome reguliert wurden, nur gering ist. Bei den Genen, die im verwendeten experimentellen System schnell und deutlich auf eine Veränderung der Lichtqualität reagierten (PRGs), wurde somit keine oder nur eine schwache „Signatur“ reaktiver Sauerstoffspezies oder von Phytochromen detektiert.

Das verdeutlicht, dass die in dieser Arbeit untersuchten Akklimationsantworten eigenständige Reaktionen darstellen und unabhängig von Phy- oder ROS-vermittelten Prozessen ablaufen.

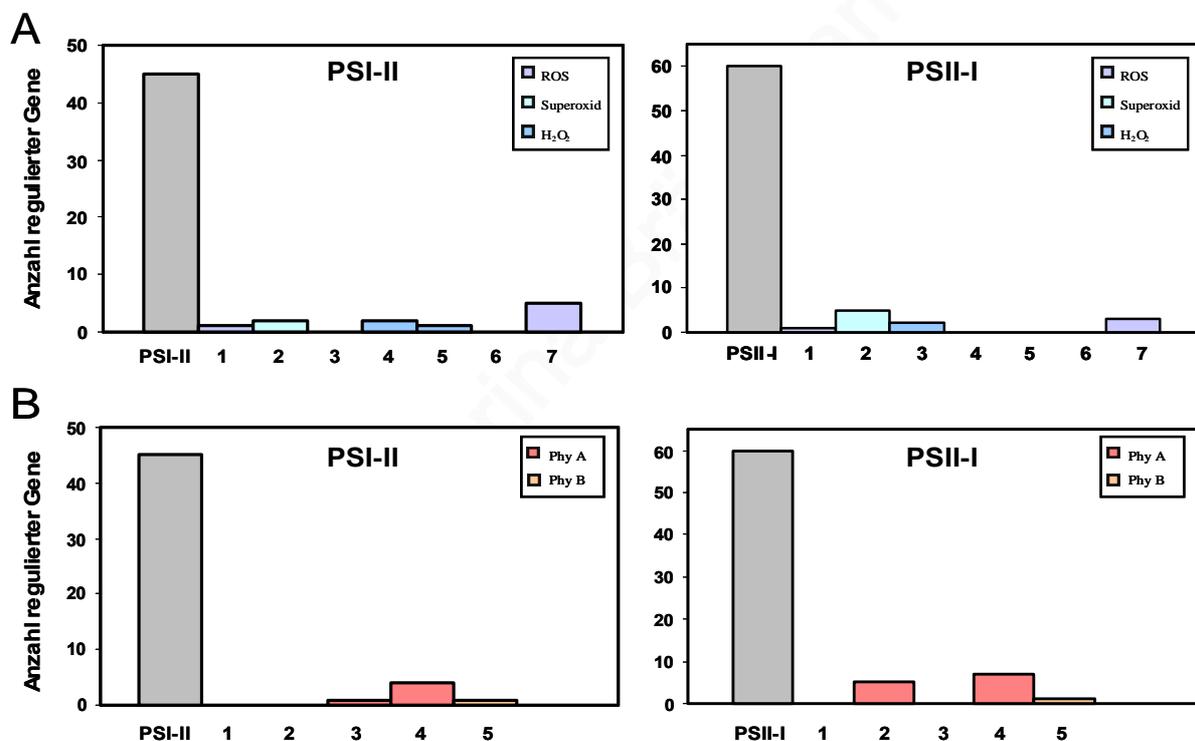


Abb. 3.7: Vergleich früher redox-regulierter Gene (PRGs) mit Transkriptomdaten aus ROS- & Phytochromexperimenten. Die primär regulierte Gene aus dieser Studie (grau) wurden mit Expressionsprofilen aus ROS-Experimenten (A) und Phytochromexperimenten (B) verglichen. Verwendete Publikationen und Datensätze sind unter 2.9.5 genauer beschrieben.

A: Farblich dargestellt ist die Anzahl der Gene, die sowohl auf photosynthetische Redoxsignale als auch auf ROS reagieren. Zahlen stehen für die verwendeten Vergleichsdatsätze bzw. Publikationen. 1: Mittler *et al.*, 2004; 2: Rizhky *et al.*, 2003; 3: Davletova *et al.*, 2005; 4: Vanderauwera *et al.*, 2005; 5: Desikan *et al.*, 2001; 6 und 7: Op den Camp *et al.*, 2003.

B: Gene, die sowohl auf photosynthetische Redoxsignale als auch bei Phytochromexperimenten reagieren, sind farblich dargestellt. Zahlen stehen für die verwendeten Vergleichsdatsätze bzw. Publikationen. 1: Kuno *et al.*, 2000; 2: Wang *et al.*, 2002; 3: Kretsch, AFGN 45 min; 4: Kretsch, AFGN 4 h; 5: Monte *et al.*, 2004.

3.1.4 *In silico*-Promotoranalyse der primär regulierten Gene

Der Mechanismus, über den photosynthetische Redoxsignale aus dem Chloroplasten in den Zellkern übertragen werden und dort die Expression von Kerngenen während der LTR regulieren, ist bisher weitgehend unbekannt. Um mögliche Regulationsmechanismen zu verstehen, wurden die Promotorbereiche der PRGs genauer betrachtet. Da die Transkription eines Genes u.a. über *cis*-Elemente im Promotor reguliert wird, könnten die PRGs durch spezifische Motive („redox-responsives Motiv“) oder eine typische Kombination von Motiven in ihren Promotoren gekennzeichnet sein. Daher wurden die Promotorsequenzen der PRGs auf häufige gemeinsam auftretende *cis*-Elemente (Motive) hin untersucht und dabei auch Gruppen koregulierter Gene innerhalb der PRGs (Cluster, Abb. 3.6) berücksichtigt.

Bereits bekannte Motive wurden durch Vergleich mit Datenbanken (PlantCARE, Transfac) identifiziert. Bei den untersuchten Promotorsequenzen traten besonders häufig lichtresponsive Elemente, Motive, die mit Meristementwicklung im Zusammenhang stehen und allgemeine Promotorelemente wie bspw. G-, NON- oder CAAT-Box auf (Tab. A.2).

Unabhängig vom bisherigen Wissensstand und verfügbaren Datenbankinformationen wurden die Promotorsequenzen außerdem nach Motiven durchsucht, die häufiger auftreten als zufällig für *Arabidopsis* erwartet (überrepräsentierte Motive). Die besten überrepräsentierten Sequenzmotive pro Cluster, die mit der Software MotifSampler (Gibbs Sampler) identifiziert wurden, sind in Tab. 3.3 aufgeführt. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Software YMF3.0 („*word counting*“-Methode) erzielt. Die Nukleotidsequenzen der gefundenen Motive (Tab. 3.3) wurden anschließend mit Datenbankeinträgen verglichen, um ihnen eine mögliche Funktion zuzuordnen. Der Vergleich zeigt, dass in fast allen Clustern Abschnitte lichtresponsiver Elemente überwiegen. Die G-Box und konservierte Promotorelemente lichtresponsiver Gene (SBPase, CHS) wurden u.a. gefunden. Neben generellen regulatorischen Elementen wurden außerdem ein stress- und ein ethylenresponsives Element identifiziert (Tab. 3.3).

Die *in silico*-Analyse zeigt, dass die Promotoren der PRGs v.a. durch lichtresponsive Motive bzw. Abschnitte lichtresponsiver Elemente charakterisiert sind.

Cluster ^A	Motiv	# seq ^B	# inst ^C	ll ^D	Name ^E	Funktion ^F
PSI-II						
Cluster1	ACTGTT	6	8	46.8	OBP1	<i>cis</i> -regulatory element
	wmrnCgGm	7	14	53.2	DRE LRE	dehydration-responsive element part of LRE
	rGnCknwCnGnC	7	13	64.5	CHS-unit-1	part of LRE in Chs genes
Cluster2	TCwCTC	15	23	101.6	G-box	part of LRE
	CTynCTCT	18	29	141.9	Sbp-CMA1c	part of LRE in Sbp genes
Cluster3	GGAnTCAG	9	16	82.5	EIN3*	ethylene response*
	nTyTTTCTwTTynT	10	20	94.3	E4-ERE TATA-box	ethylene-responsive element core promoter
Cluster1-3	TCwCTC	27	40	187.7	G-box	part of LRE
	CGAGTk	22	35	169.8	CAAT-box	common <i>cis</i> -acting element
	yTnTCTCnsTCn	31	54	259.4	Sbp-CMA1c	part of LRE
PSII-I						
Cluster1	TsACTC	13	15	95.2	G-box	part of LRE
	CTCwCTCn	12	17	111.9	-	5UTR Py-rich stretch part of LRE
Cluster2	wTCCTG	9	11	64.0	LAMP-element GTGGC-motif	part of LRE part of LRE
	kkAATCrA	10	17	82.1	Ocs-element	auxin, SA and oxidative stresses
Cluster3	TCTkyTTC	16	28	127.8	CHS-unit-1 Sbp-CMA1c	part of LRE
	AykCnsCG	16	28	120.1	G-box	part of LRE
Cluster4	mTCTCyAC	12	22	94.2	Sbp-CMA1c	part of LRE
	AAnsyCAw	13	22	91.9	several	mostly LRE
Cluster1-4	TCTnTnTC	48	76	334.1	TATA-box LRE	core promoter LRE
	CTCnyTCG	52	81	335.6	5UTR Py-rich stretch	conferring high transcription levels

Tab. 3.3: Überrepräsentierte Motive der Länge 6-14 bp in den Promotorsequenzen zeitig regulierter Gene. Die Motive wurden mit der Software MotifSampler identifiziert. ^A Bezeichnung der Cluster (vgl. Abb. 3.6); ^B Anzahl der Sequenzen, in denen das Motiv gefunden wurde; ^C Gesamtzahl, wie oft das Motiv gefunden wurde; ^D Loglikelihood; ^{E,F} Angaben aus PlantCARE-Datenbank (Stand: April 2007) grau: keine Angaben zu *Arabidopsis* vorhanden; Information stammt aus Einträgen für andere Pflanzenspezies; *Angabe aus PLACE-Datenbank; LRE: *light responsive element*; Chs: Chalkonsynthase; Sbp: Seduheptulose-bisphosphatase; CMA: *conserved modular arrangement*.

3.2 Untersuchung des LTR-Einflusses auf die metabolische Ebene

Der Metabolismus stellt eine weitere regulatorische Ebene dar und spiegelt den funktionalen Zustand einer Zelle bzw. Pflanze wider. Während die LTR auf der Ebene der Genexpression relativ gut untersucht ist (siehe Abschnitt 3.1: Fey *et al.*, 2005), liegen bisher kaum Daten über den Einfluss der LTR auf den Stoffwechsel vor.

Die Untersuchungen der Genexpression zeigen, dass neben Photosynthesegenen auch Gene aus verschiedenen anderen Funktionsgruppen während der LTR reguliert werden (3.1). Viele der regulierten Gene kodieren Proteine, die an Prozessen des Stoffwechsels beteiligt sind, wie z.B. am Aminosäure-, Kohlenhydrat- oder Fettstoffwechsel. Das wurde sowohl bei den möglichen primären Targets (Tab. 3.2, Abb. 3.5) zu Beginn der Akklimation als auch für spätere Zeitpunkte (Abb. 3.4) beobachtet. Die Daten der Transkriptanalysen geben somit einen deutlichen Hinweis darauf, dass auch der Stoffwechsel während der LTR Veränderungen unterliegt und an die Lichtqualität angepasst wird. Inwiefern der Metabolismus tatsächlich während der Lichtqualitätsakklimation reguliert wird, wurde daher als nächstes untersucht.

Dazu wurden zunächst ausgewählte Produkte des Grund- und Energiestoffwechsels betrachtet, gefolgt von einer umfassenden Analyse v.a. des Primärmetabolismus (*Metabolic Profiling*).

Für die Untersuchungen wurden wieder PSI- bzw. PSII-Licht akklimatisierte Pflanzen (PSI- oder PSII-Pflanzen) und die Lichtwechselvarianten (PSI-II bzw. PSII-I Pflanzen) verwendet (2.6). Während durch einen Lichtwechsel photosynthetische Signale erzeugt werden und sich die Pflanzen an die veränderte Lichtqualität anpassen, dienen die nicht gewechselten Pflanzen als Vergleich. Sie spiegeln die generelle Anpassung an PSI- bzw. PSII-Licht wider. Die LTR wurde hier zwei Tage nach einem Lichtwechsel bzw. bei gleich alten nicht gewechselten Pflanzen untersucht. Zusätzlich wurden Weißlichtpflanzen untersucht.

3.2.1 Untersuchung ausgewählter Produkte des Grund- und Energiestoffwechsels nach Lichtakklimation

Um einen Überblick über metabolische Veränderungen bei der LTR zu bekommen, wurden zuerst wichtige Grundbausteine untersucht und der generelle Gehalt an Stärke, Proteinen und Fettsäuren gemessen (Abb. 3.8).

Der Stärkegehalt war bei PSI- und PSII-I-Pflanzen deutlich verringert. Sie akkumulierten im Vergleich zu PSII-, PSI-II- und Weißlichtpflanzen ungefähr 40% weniger Stärke. Die Lichtwechselvarianten verdeutlichten außerdem, dass die Anpassung des Stärkegehaltes in Abhängigkeit von der Lichtqualität reversibel erfolgte.

Der Gesamtgehalt an Proteinen war bei allen Pflanzen unter den vier untersuchten Lichtsystemen gleich, allerdings im Vergleich zur Weißlichtkontrolle verringert. Der allgemeine Gehalt an Fettsäuren wurde durch die Lichtqualität kaum beeinflusst. Eine detailliertere Analyse einzelner Fettsäuren zeigte ebenfalls keine signifikanten Effekte (Abb. A.1).

Die Daten zeigen, dass während der Akklimation an verschiedene Lichtqualitäten v.a. der Stärkegehalt beeinflusst wird. Veränderungen im Stärkemetabolismus könnten generell auf Umverteilung der Anregungsenergie zwischen Speicherkohlenhydraten und direkt verfügbarer Energie bei den Pflanzen hindeuten.

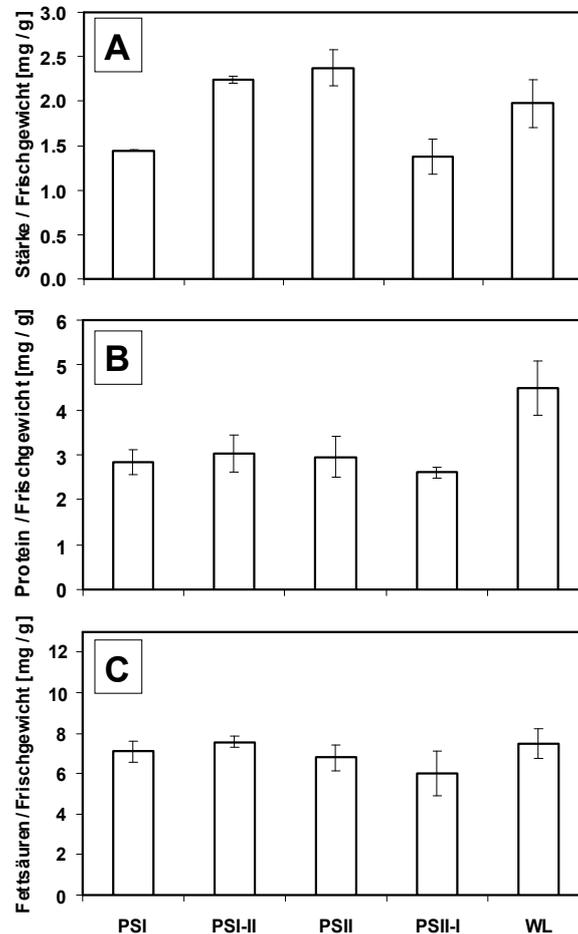


Abb. 3.8: Gehalt der Pflanzen an Stärke, Proteinen und Fettsäuren während der LTR. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert, bzw. nach einem Lichtwechsel (PSI-II und PSII-I) untersucht. WL: Weißlichtkontrolle. Stärkegehalt (A), Proteingehalt (B) und der Gehalt an Fettsäuren (C) wurde gemessen. Balken stellen Mittelwerte von 3-4 unabhängigen Proben dar, Fehlerbalken eine Standardabweichung (SD).

Im nächsten Schritt wurde daher der Energiestatus (ATP/ADP-Verhältnis) und der Reduktionsstatus (NADPH/NADP-Verhältnis) der Pflanzen während der LTR genauer betrachtet. Dazu wurden die primären Photosyntheseprodukte ATP und NADPH sowie die Verhältnisse von ATP/ADP und NADPH/NADP untersucht (Abb. 3.9).

Für das ATP/ADP-Verhältnis konnte kein signifikanter Einfluss der Lichtqualität festgestellt werden (Abb. 3.9A). Bei PSII-Licht akklimatisierten Pflanzen (PSII; PSI-II) war das ATP/ADP-Verhältnis leicht erhöht, unterschied sich aber nicht signifikant von PSI-Licht akklimatisierten Pflanzen (PSI; PSII-I). Bei allen verwendeten Lichtqualitäten lag das ATP/ADP-Verhältnis zwischen 0.4 und 0.8. Für im Weißlicht angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen, allerdings bei etwas höherer Lichtintensität, wurde ein Verhältnis von 2.2 gemessen (Wormuth *et al.*, 2006). Die Pflanzen in den Lichtsystemen haben somit einen eher geringen Energiestatus.

Der berechnete Redoxstatus von NADP lag bei PSI-Licht akklimatisierten Pflanzen

(PSI; PSII-I) bei etwa 13, während für PSII-akklimatisierte Pflanzen (PSII; PSI-II) deutlich niedrigere Werte bestimmt wurden (6 und 2) (Abb. 3.9B). Das NADPH/NADP-Verhältnis bei Weißlichtpflanzen unter etwas höherer Lichtintensität (PAR: ~ 100 vs. ~35 μE) betrug dagegen etwa 17 (Wormuth *et al.*, 2006).

Diese Daten machen deutlich, dass reduzierendes PSII-Licht und Weißlicht (allerdings bei etwas höheren Lichtintensitäten) nicht unbedingt vergleichbare Auswirkungen auf die Pflanzen haben müssen. Die Pflanzen befinden sich vielmehr in unterschiedlichen energetischen Zuständen.

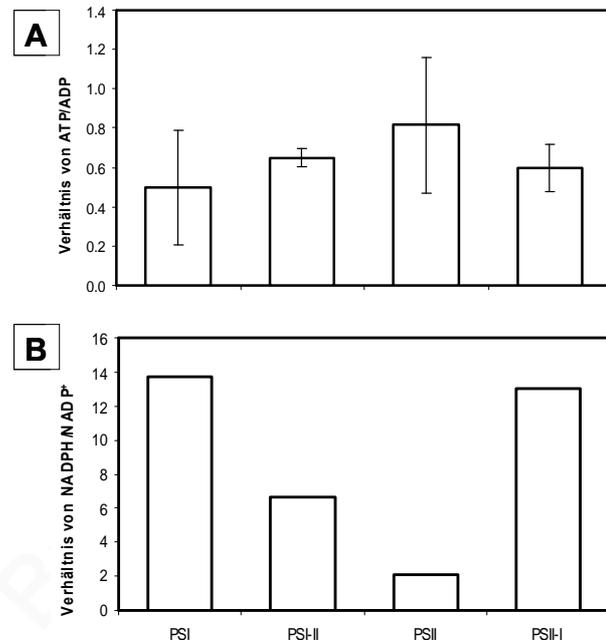


Abb. 3.9: Energie- und Redoxstatus der Pflanzen während der Langzeitantwort.

Die Verhältnisse von ATP/ADP und NADPH/NADP wurden bei *Arabidopsis*-Pflanzen während der LTR ermittelt. Pflanzen wurden an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert (PSI; PSII) bzw. nach einem Lichtwechsel (PSII und PSII-I) untersucht. Mittelwerte von 3 unabhängigen Bestimmungen (\pm SD) sind angegeben.

Unter PSII-Licht, welches reduzierender auf Komponenten des PET (z.B. den PQ-Pool) wirkt als PSI-Licht, wurde auch eine stärkere Reduktion von NADP vermutet. Ebenso wurde für oxidierendes PSI-Licht ein niedrigeres NADPH/NADP-Verhältnis als unter PSI-Licht erwartet. Interessanter Weise waren die NADPH/NADP-Werte von PSI-Pflanzen deutlich höher als bei PSII-Licht akklimatisierten Pflanzen, was im Gegensatz zu den erwarteten Ergebnissen stand.

Um die unerwarteten Ergebnisse der NADPH/NADP-Bestimmung zu bestätigen, wurde eine weitere unabhängige Methode angewandt. Bei Pflanzen aus den verschiedenen Lichtsystemen wurde der Aktivierungszustand der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (NADP-MDH) bestimmt. Die plastidäre NADP-MDH ist ein Substrat von Thioredoxin; zur Aktivierung im Licht ist allerdings ebenfalls das Verhältnis von NADPH/NADP entscheidend. Ein hohes Verhältnis von NADPH/NADP führt zur verstärkten Aktivierung, während ein niedriges Verhältnis eine Aktivierung verhindert. Daher ist der Aktivierungszustand der NADP-MDH ein Indikator für das Verhältnis von NADPH/NADP im Chloroplasten (Scheibe 1991; Kolbe *et al.*, 2006). Die Enzymmessungen ergaben eine Aktivierung der NADP-MDH von ca. 40 % für PSII-, PSI-II- und Weißlichtpflanzen (Abb. 3.10). Im Gegensatz dazu zeigten PSI- und PSII-I-Pflanzen einen höheren Aktivierungszustand (55-60%). Das deutet auf ein höheres NADPH/NADP-Verhältnis bei PSI- und PSII-I-Pflanzen hin und stimmt mit den Daten der NADPH/NADP-Bestimmung (Abb. 3.9) überein.

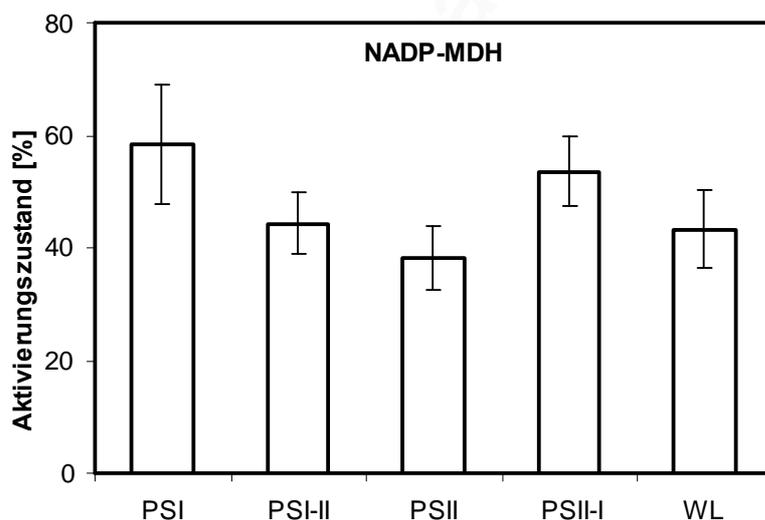


Abb. 3.10: Aktivierungszustand der NADP-MDH unter verschiedenen Lichtqualitäten. Die Enzymaktivität wurde unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Zugabe von DTT) und unter reduzierenden Bedingungen unter Zugabe von DTT (100% Aktivierung) gemessen. Das Verhältnis der Werte ergibt den Aktivierungszustand des Enzymes. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n = 3).

3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Stärkeakkumulation nach Lichtakklimation

Der Stärkegehalt und das Verhältnis von NADPH/NADP verändern sich in Abhängigkeit von der Lichtqualität. Dabei handelt es sich um reversible Anpassungen, wie die Daten der Lichtwechselvarianten zeigen (Abb. 3.8 – 3.10).

Um herauszufinden, in welchem Zeitraum metabolische Veränderungen stattfinden, wurde als nächstes der zeitliche Verlauf der Stärkeakkumulation nach einem Lichtwechsel über einen längeren Zeitraum (7 Tage) untersucht. Die Messungen zeigten, dass der Stärkegehalt der Pflanzen innerhalb von zwei Tagen nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht im Vergleich zu nicht gewechselten Pflanzen deutlich anstieg und danach erhöht blieb (Abb. 3.11A). Nach einem Wechsel von PSII- nach PSI-Licht veränderte sich der Stärkegehalt ebenfalls innerhalb von 2 Tagen. Hier nahm die Stärkemenge im Vergleich zu nicht gewechselten PSII-Pflanzen ab und blieb danach erniedrigt (Abb. 3.11B).

Der Gehalt an Stärke nach einem Lichtwechsel spiegelt also die Akklimation an die neue Lichtqualität wider, d.h. erhöhter Stärkegehalt nach Akklimation an PSII-Licht und verringerter Gehalt nach Anpassung an PSI-Licht.

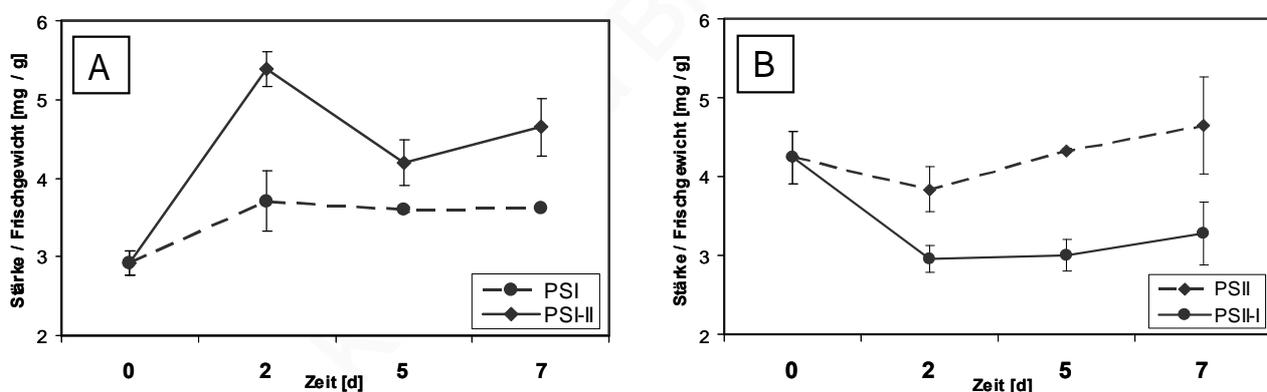


Abb. 3.11: Bestimmung des Stärkegehaltes während der Lichtqualitätsakklimation über einen Zeitraum von 7 Tagen. Pflanzen wurden an PSI-Licht (A) und PSII-Licht (B) vorakklimatisiert und in die jeweils andere Lichtquelle umgestellt (durchgezogene Linie); bei Vergleichspflanzen wurde die Lichtqualität beibehalten (gestrichelte Linie). Der Stärkegehalt der Pflanzen wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht; Mittelwerte \pm SD (n = 3) sind angegeben.

Die gemessenen Veränderungen der Stärkemenge während der Lichtqualitätsakklimation (Abb. 3.11) traten etwa im selben Zeitraum auf wie der Umbau des Photosyntheseapparates und damit die Anpassung der Photosystemstöchiometrie. Daher wurde der Zeitpunkt zwei Tage nach Veränderung der Lichtqualität für umfassendere Metabolitmessungen ausgewählt.

3.2.3 Umfassende Untersuchung der LTR auf Metabolitebene: *Metabolic Profiling*

Ähnlich der umfassenden Analyse der Genexpression (*Transcript Profiling*) wurde der Metabolismus während der Akklimation an unterschiedliche Lichtqualitäten untersucht (*Metabolic Profiling*). Verschiedene Stoffwechselprodukte der Pflanzen wurden dabei mittels an Gaschromatographie gekoppelter Massenspektroskopie (GC-MS) aufgetrennt und analysiert (Roessner *et al.*, 2000; Lisec *et al.*, 2006).

Es wurde untersucht, welche Metabolite v.a. des Primärstoffwechsels während der Lichtqualitätsakklimation reguliert werden und inwiefern sich die fünf verschiedenen Lichtsysteme (PSI, PSI-II, PSII, PSII-I, WL) in ihrem Metabolismus unterscheiden. Schließlich wurde geprüft, ob es sich bei der metabolischen Akklimation an eine veränderte Lichtqualität (PSI-II bzw. PSII-I) um eine reversible Antwort handelt.

Dazu wurden Pflanzen wie bereits beschrieben den fünf verschiedenen Lichtbehandlungen ausgesetzt und nach zwei Tagen Akklimation untersucht (siehe 2.6. und 3.2.2). GC-MS-Messungen wurden mit 6 Proben pro Lichtsystem durchgeführt. Eindeutig identifizierte Metabolite wurden quantifiziert und Substanzklassen zugeordnet. Um die gemessenen Proben untereinander vergleichen zu können, wurden die Werte metabolitspezifischer *Peaks* auf den internen Quantifizierungsstandard (Ribitol) und das eingesetzte Frischgewicht bezogen (siehe 2.8.7).

In den untersuchten Proben konnten 61 Substanzen eindeutig identifiziert werden. Dabei handelte es sich vor allem um Aminosäuren, Zucker und zentrale organische Säuren. Unter den organischen Säuren wurden wichtige Stoffwechselintermediate wie Pyruvat, Malat oder Shikimat erfasst. Alle gemessenen Substanzen sind in Anhang in Tabelle A.3 aufgeführt.

Mittels *Metabolic Profiling* wurde somit ein Datensatz erhalten, der einen umfassenden Eindruck über den Primärmetabolismus in den verschiedenen Lichtsystemen gibt. Zur Erkennung von Mustern im Datensatz, der Veranschaulichung der Ergebnisse und um eine (vereinfachte) Interpretation zu ermöglichen, wurden verschiedene Analysen und Darstellungsweisen gewählt.

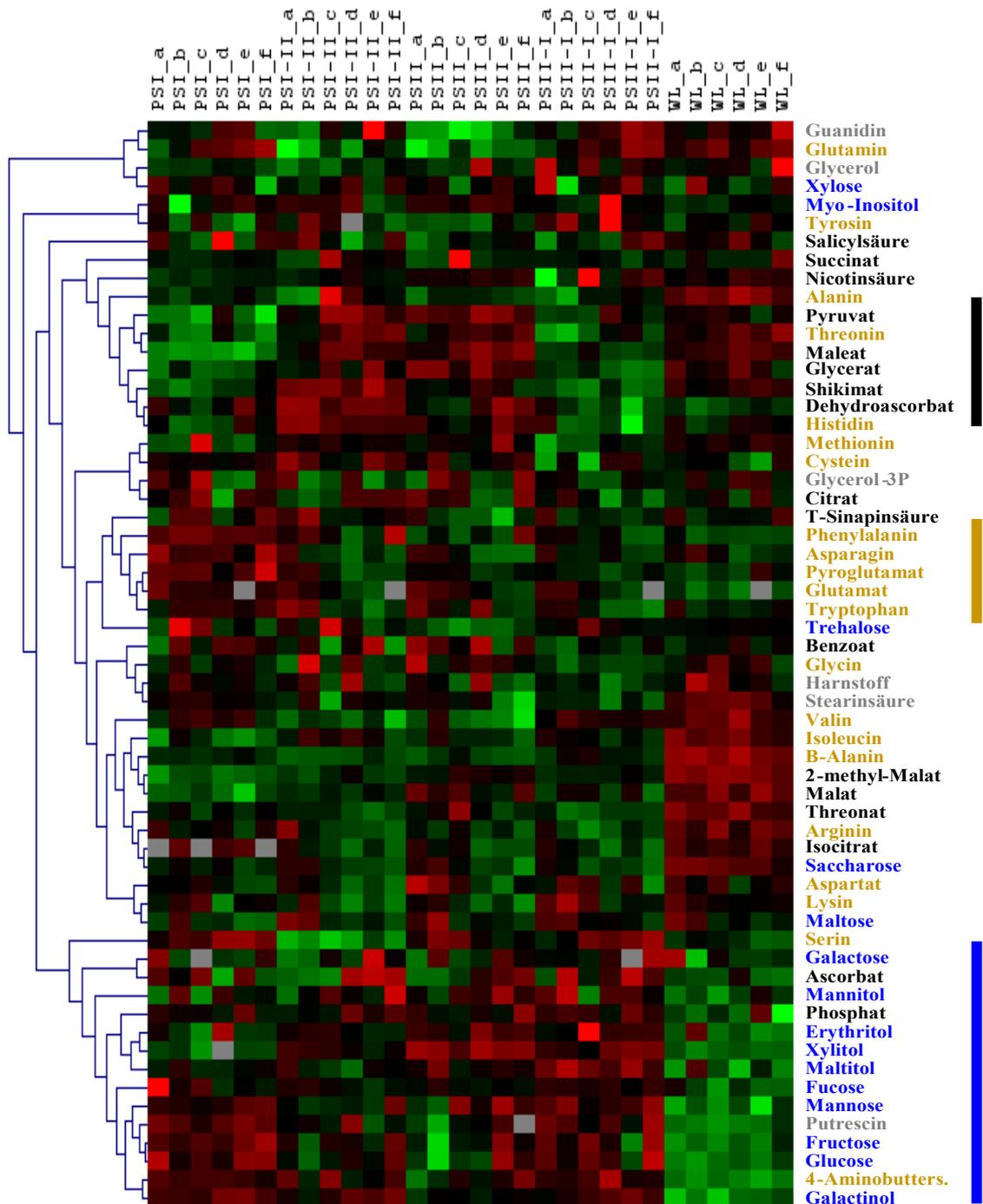


Abb. 3.12: Überblick über die Daten des *Metabolic Profiling* und hierarchisches Clustern der Metabolitdaten. Metabolite unterschiedlicher Substanzklassen wie Aminosäuren (**gelb**), organische Säuren (**schwarz**), Zucker- und Zuckeralkohole (**blau**) sowie einige andere Verbindungen (**grau**) wurden erfasst. Pro Lichtsystem (PSI, PSI-II, PSII, PSII-I, WL) wurden jeweils 6 Proben (a-f) gemessen.

Mittels Clustering wurden die Metabolite nach ihrer Ähnlichkeit in der Regulation gruppiert. Die Messdaten wurden wie unter 2.9.2 und 2.9.3 beschrieben standardisiert. Erhöhte Mengen eines Metaboliten im Vergleich zum Durchschnitt über alle Messungen und Lichtsysteme sind **rot** dargestellt, unterdurchschnittliche Metabolitmengen sind **grün** angegeben und fehlende Messwerte durch graue Kästchen dargestellt. Balken markieren Cluster, die sich hauptsächlich aus Metaboliten einer Substanzklasse zusammensetzen.

Zunächst wurden alle Metabolite aus allen Proben betrachtet und graphisch dargestellt, um einen Überblick über den gesamten Datensatz zu bekommen (Abb. 3.12). Gemessene Metabolite sind dazu je nach Substanzklasse farblich markiert angegeben, gemessene Mengen als Kästchen dargestellt. Erhöhte Mengen eines Metaboliten im Vergleich zum Durchschnitt über alle Messungen in allen Lichtsystemen sind in rot dargestellt, unterdurchschnittliche Metabolitmengen sind in grün angegeben (übliche Datentransformation, 2.9.2). Um zu veranschaulichen, welche Substanzen in allen untersuchten Proben und über alle Lichtsysteme ähnlich reguliert sind, wurden die Metabolite nach ihrem Regulationsmuster mittels hierarchischem Clustern gruppiert. Fast alle Zucker und Zuckeralkohole wurden ähnlich reguliert (Abb. 3.12 blauer Balken). Koregulation wurde auch für einige Aminosäuren (gelber Balken) und andere organische Säuren (schwarzer Balken) beobachtet. Die Koregulation von Zuckerverbindungen, zentraler organischer Säuren oder einiger Aminosäuren (Metabolite einer Substanzklasse) könnte die gemeinsame Regulation eng verknüpfter Stoffwechselwege in den verschiedenen Lichtsystemen widerspiegeln.

Als nächstes wurden die Metabolite betrachtet, die während der Lichtakklimation signifikant reguliert wurden. Dazu wurden die Pflanzen 48 h nach einem Lichtwechsel (PSI-II bzw. PSII-I) mit den Pflanzen unter konstanten Lichtbedingungen (PSI bzw. PSII) verglichen und die Ergebnisse in einem Überblickschema des Stoffwechsels (Abb. 3.13) graphisch dargestellt.

Ein Lichtwechsel von PSI- nach PSII-Licht führte zu einem Anstieg einiger zentraler Stoffwechselintermediate wie Pyruvat, Shikimat oder Glycerat. Gleichzeitig wurden verringerte Mengen der Zucker Fructose, Mannose und Glucose gemessen. Aminosäuren zeigen unterschiedliche Regulation: Erhöhung bei Histidin und Threonin sowie erniedrigte Mengen bei Asparagin, Glutamin und Serin.

Auf einen Lichtwechsel von PSII- nach PSI-Licht reagieren die Pflanzen vor allem mit Erniedrigung einiger Aminosäuren oder organischer Säuren wie Alanin und Methionin bzw. Pyruvat und Shikimat. Bei den wichtigsten Zuckern blieben die gemessenen Mengen dagegen unverändert.

In Abhängigkeit von der Lichtqualität konnten damit signifikante Veränderungen bei einigen Zuckerverbindungen, verschiedenen Aminosäuren sowie zentralen organischen Säuren detektiert werden.

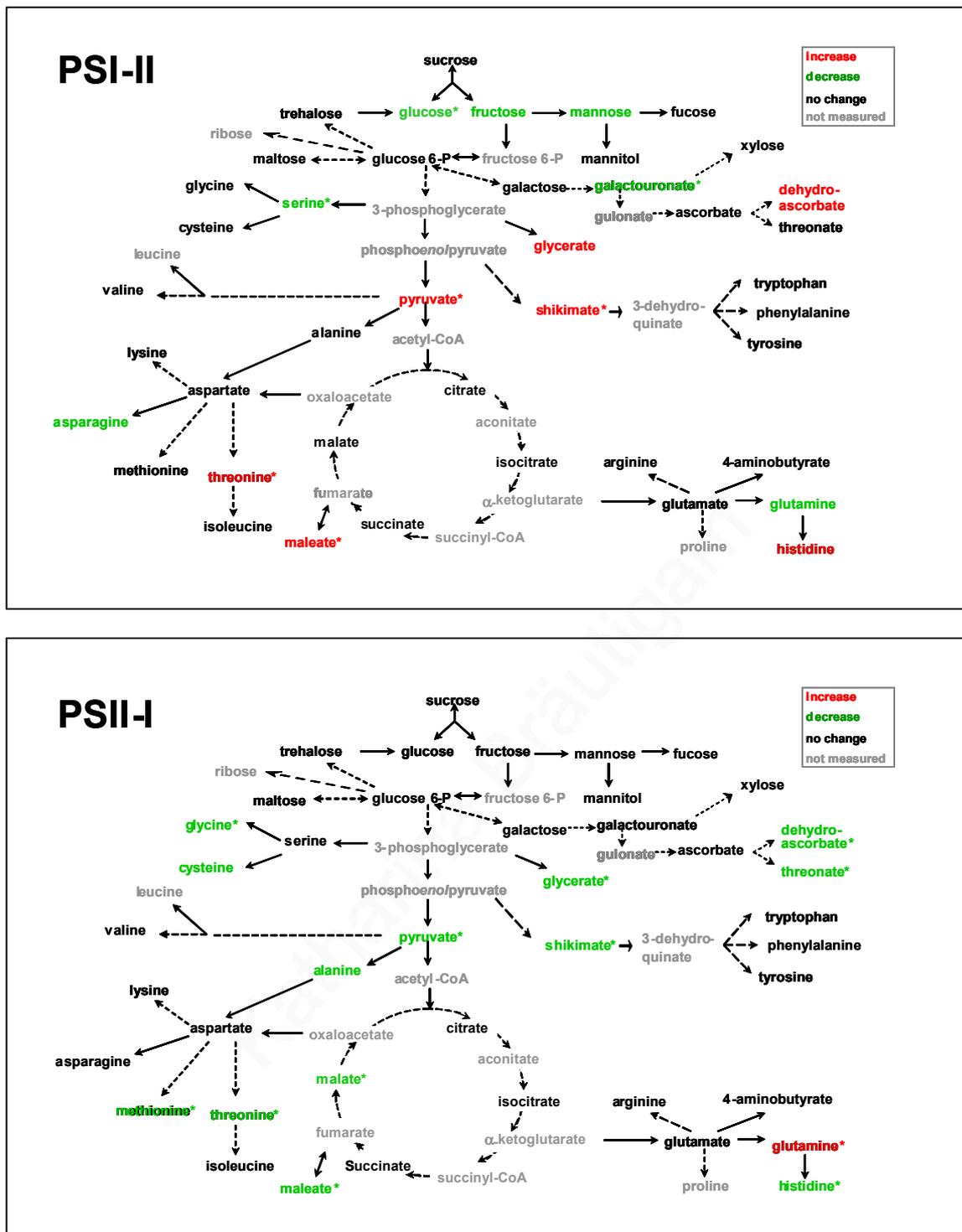


Abb. 3.13: Veränderungen im Primärmetabolismus nach Akklimation an veränderte Lichtqualitäten.

Die Abbildung enthält zentrale Stoffwechselwege wie die Umwandlung von Zuckern, den Citratzyklus und verschiedene Wege des Aminosäuremetabolismus. Unterschiede nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht im Vergleich zu PSI-Licht akklimatisierten Pflanzen sind im oberen Teil dargestellt; der Zustand des Primärstoffwechsels nach einem Lichtwechsel von PSII- nach PSI-Licht im Vergleich zu PSII-Licht akklimatisierten Pflanzen im unteren Teil der Abbildung. Unterschiede wurden als Verhältnisse berechnet (siehe Tab. A.3) und signifikante Unterschiede farblich markiert (Student's *t*-Test, $p \leq 0.05$, $n=4-6$), wobei **rot** erhöhte Mengen und **grün** verringerte Mengen bedeuten. In grau angegebene Metabolite wurden nicht gemessen und schwarz markierte zeigten keine signifikanten Änderungen. * markiert Signifikanz auch nach einer Korrektur für multiples Testen (Benjamini und Hochberg 1995). Das Stoffwechselschema wurde nach Kolbe *et al.*, 2006 verwendet.

Die Untersuchungen von Einzelmetaboliten (Stärke, NADPH; Abb. 3.8-3.11) und auch der Vergleich der Metabolitprofile (Abb. 3.13) zeigen, dass nach Veränderung der Lichtqualität verschiedene Metabolite reguliert werden. Aufgrund dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Pflanzen unter PSI- und unter PSII-Licht in verschiedenen „metabolischen Zuständen“ befinden (siehe auch 3.2.1). Ob sich die Unterschiede zwischen PSI- und PSII-Licht ausschließlich auf einzelne Metabolite beziehen oder ob sich die verschiedenen „metabolischen Zustände“ generell im Primärmetabolismus widerspiegeln, sollte daher anhand der Metabolitprofile geprüft werden.

Dazu wurde untersucht, wie sich Pflanzen aus den verschiedenen Lichtsystemen (PSI, PSI-II, PSII, PSII-I & WL) generell bezüglich ihres Metabolismus zueinander verhalten und eine Hauptkomponentenanalyse (PCA: *Principal Component Analysis*) durchgeführt (2.9.4). Dabei wird ein mehrdimensionaler Datensatz auf weniger Dimensionen reduziert, welche die Hauptinformation (Varianz des Datensatzes) enthalten.

Zur Analyse wurden alle sechs Einzelproben pro Lichtsystem (a-f) verwendet, wobei die Metabolite als Variablen dienten. In der graphischen Darstellung der ersten drei Hauptkomponenten (Abb. 3.14) ist das Metabolitprofil jeder Einzelprobe durch einen Datenpunkt repräsentiert. Innerhalb der Datenpunkte lassen sich drei deutlich getrennte Gruppen erkennen. Die Proben der Weißlichtpflanzen (grau) verhalten sich hinsichtlich ihres Metabolismus ähnlich zueinander, unterscheiden sich aber deutlich von den anderen Proben. Metabolitprofile von Pflanzen aus PSII-Licht und nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht ähneln einander und sind mittels PCA nicht zu unterscheiden (gelbe Symbole). Auch sie unterscheiden sich deutlich von Metabolitprofilen aus anderen Lichtsystemen. Proben aus PSI-Licht bzw. nach einem PSII-I-Wechsel bilden ebenfalls eine eigene Gruppe (rote Symbole). Anhand der Metabolitprofile können also PSI-Licht- und PSII-Licht-akklimatisierte Pflanzen unterschieden werden. Es wird deutlich, dass die Pflanzen nach einem Lichtwechsel ihren Metabolismus auf die neue Lichtqualität abstimmen. Das zeigt, dass der Stoffwechsel während der Lichtqualitätsakklimation tatsächlich unterschiedliche Zustände annimmt und die Umstellung zwischen diesen Zuständen reversibel erfolgt. Letzteres ist besonders interessant, da Reversibilität kennzeichnend für echte Akklimationsantworten ist.

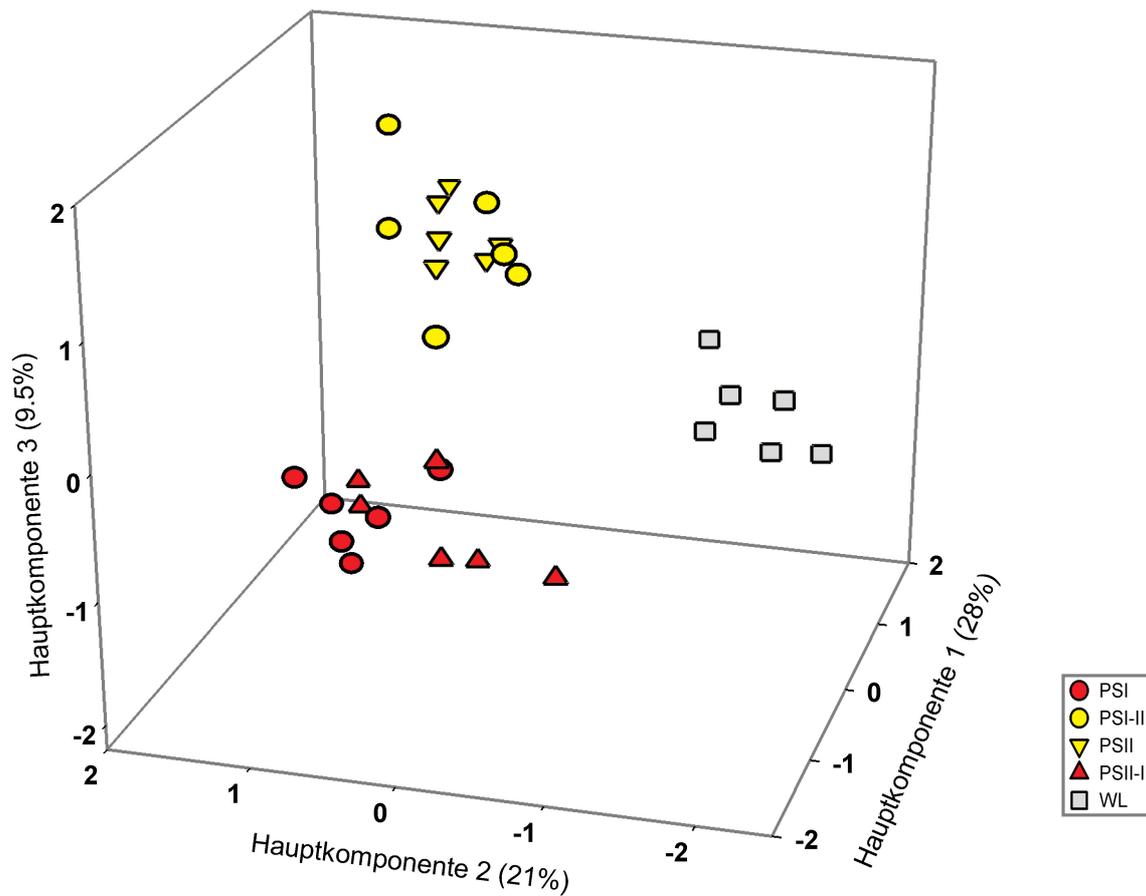


Abb. 3.14: Hauptkomponentenanalyse der Metabolitprofile von Pflanzen unter verschiedenen Lichtsystemen. Für die Hauptkomponentenanalyse wurden standardisierte Werte aller Metabolite als Variablen verwendet und alle sechs Replikate pro Lichtsystem analysiert (siehe 2.9.4). Der Anteil der Hauptkomponenten an der Gesamtvarianz ist in Klammern angegeben. Die drei dargestellten Hauptkomponenten erklären zusammen etwa 59% der Gesamtvarianz des Datensatzes.

3.2.4 Einfluss der Lichtqualität auf das Wachstum von Wildtyppflanzen und der *stn7*-Mutante

Die hier durchgeführten Metabolitbestimmungen zeigen, dass sich *Arabidopsis*-Pflanzen nach Akklimation an PSI- bzw. PSII-Licht in unterschiedlichen metabolischen Zuständen befinden (siehe 3.2.1 und 3.2.3). Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen metabolischen Zustände Auswirkungen auf das Wachstum und die Fitness der Pflanzen haben, wurden Langzeitversuche durchgeführt.

Pflanzen wurden nach Voranzucht für mehrere Wochen unter den verschiedenen Lichtqualitäten (PSI- bzw. PSII-Licht) beobachtet. Für Dauerlicht ist bekannt, dass Wildtyppflanzen unter PSI- bzw. PSII-Licht keine Fitnessunterschiede aufweisen (Wagner *et al.*, 2007). Daher wurde die Lichtphase verkürzt und eine Dunkelphase eingeführt, um Bedingungen zu schaffen, unter denen die Zeit der Photosynthese begrenzt ist und die metabolischen Zustände sich bei Wachstum und Fitness bemerkbar machen.

Zunächst wurden Wildtyppflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkel) untersucht. Dabei wurden ebenfalls keine Fitnessunterschiede zwischen PSI- und PSII-Pflanzen festgestellt (Bräutigam, unveröffentlicht). Anschließend wurde die Dauer der Lichtphase weiter verringert und Kurztagsbedingungen verwendet (8 h Licht / 16 h Dunkel). Dabei traten deutliche Wachstumsunterschiede beim Wildtyp auf: Pflanzen unter PSI-Licht waren kleiner als PSII-Licht-Pflanzen (Abb. 3.15).

Zusätzlich zum Wildtyp wurde die *stn7*-Mutante, die weder *state transition* noch LTR durchführen kann, untersucht. Bei dieser Mutante ist die Kinase STN7, welche für die Phosphorylierung des LHCII erforderlich ist, ausgeschaltet (Bellafiore *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2005). Auch für *stn7* wurden unter Kurztagsbedingungen Unterschiede zwischen PSI- und PSII-Licht-Pflanzen beobachtet (Abb. 3.15). *stn7*-Pflanzen zeigten unter PSI-Licht ein deutlich geringeres Wachstum als unter PSII-Licht. Außerdem fiel unter beiden Lichtbedingungen (PSI- und PSII-Licht) das Wachstum von *stn7*-Pflanzen geringer aus als beim Wildtyp.

Im Kurztag sind die Pflanzen damit Bedingungen ausgesetzt, unter denen sich die unterschiedlichen metabolischen Zustände bemerkbar machen und Auswirkungen auf das Wachstum der Pflanzen haben. Das verringerte Wachstum der *stn7*-Mutante zeigt deutlich den Fitnessnachteil einer LTR-Mutante unter den untersuchten Lichtbedingungen.

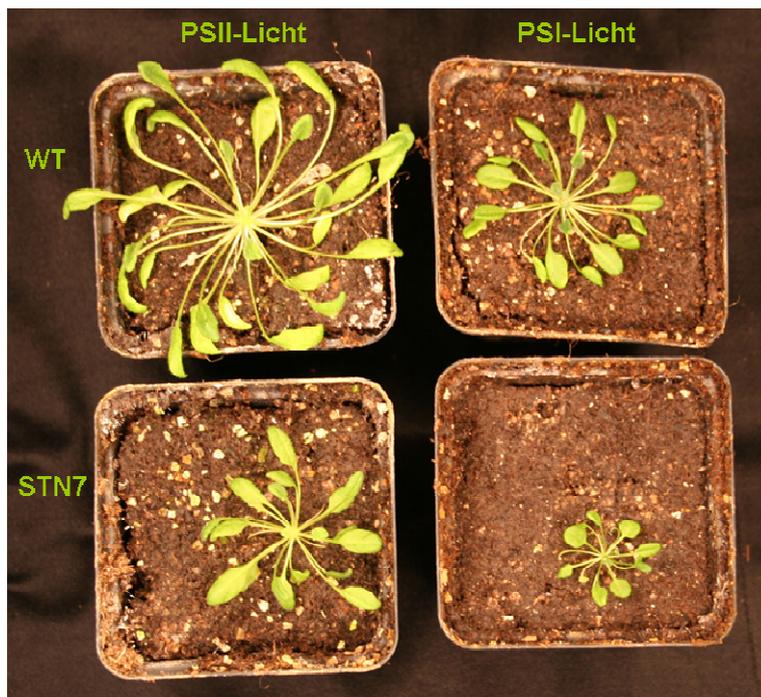


Abb. 3.15: Wachstumsunterschiede bei WT und *stn7*-Pflanzen unter verschiedenen Lichtqualitäten im Kurztag. Pflanzen wurden 3 Wochen im Weißlicht angezogen (siehe 2.6.) und dann für 12 Wochen in PSI- oder PSII-Licht gestellt. Dabei wurden Kurztagsbedingungen (8 h Licht / 16 h Dunkel) untersucht.

3.3 Physiologische Untersuchung ausgewählter PRGs anhand von Mutantenlinien

In einem ersten Schritt wurden Untersuchungen mit *knock-out* Mutanten durchgeführt, um die anhand von Expressionsdaten identifizierten PRGs auf physiologischer Ebene zu überprüfen. Kann für eine Komponente gezeigt werden, dass sie für die LTR benötigt wird, kann diese bei späteren Analysen als Marker für die LTR verwendet werden. Da die Signaltransduktion während der LTR bisher nicht aufgeklärt ist, kann bspw. mit Hilfe eines solchen Markergens ein *Screen* zur Identifizierung von zytosolischen Signaltransduktionskomponenten durchgeführt werden.

Aus den PRGs wurden zwanzig Gene ausgewählt und anhand von *knock-out* Mutanten untersucht, ob die Produkte dieser Gene für die LTR erforderlich sind.

Zur genaueren Untersuchung wurden v.a. solche PRGs ausgewählt, deren Produkte regulatorische Funktionen besitzen oder die im Zusammenhang mit der Photosynthese bzw. dem Stoffwechsel stehen (Tab. 2.2 und 3.2). Bspw. kodieren die ausgewählten Gene für Regulatoren der Transkription und Translation (SIGB, bHLH- und Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, CMT1, Elongationsfaktor) oder Komponenten, die an Signalaufnahme und -transduktion (PRA1, RING-Finger-Protein), Proteinmodifikation (Proteinkinase) oder Photosynthese (Ferredoxin-verwandtes Protein, Untereinheit von PSII) beteiligt sind. Zusätzlich wurden einige deutlich regulierte Gene berücksichtigt, deren Funktion bisher unbekannt ist.

Für die ausgewählten PRGs wurden dazugehörige T-DNA-Insertionslinien über das *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen (Tab. 2.2) und unter verschiedenen Lichtsystemen (PSI, PSI-II, PSII, PSII-I, WL) untersucht. Insgesamt wurden 27 Mutantenlinien verwendet, da für einige Gene, sofern verfügbar, zwei genetisch unabhängige Linien bezogen wurden. Ob sich homozygote Mutanten von Wildtyp unterscheiden und die LTR beeinträchtigt war, wurde mittels Chlorophyllfluoreszenzmessungen (Fs/Fm-Parameter) und Pigmentanalysen (Chlorophyll a/b-Verhältnis) überprüft. Der Fs/Fm-Wert und das Chl a/b-Verhältnis wurden verwendet, da es sich um etablierte Parameter zur Untersuchung der LTR handelt (Wagner *et al.*, 2004; Bonardi *et al.*, 2005; Fey *et al.*, 2005). Ein Schema der Vorgehensweise ist in Abb. 3.16 gezeigt.

Während der Akklimation an eine veränderte Lichtqualität, ändert sich beim Wildtyp der F_s/F_m -Wert und das Chl a/b-Verhältnis signifikant im Vergleich zu Pflanzen unter konstanten Lichtbedingungen (Abb. 3.18 weiße Balken, 3.19A). Werden bei Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede im Verhalten der F_s/F_m - bzw. Chl a/b-Werte festgestellt, deutet das auf eine Beeinträchtigung der LTR hin, wie bereits für eine *knock-out* Mutante der plastidenlokalisierte STN7-Kinase gezeigt werden konnte (Bonardi *et al.*, 2005).

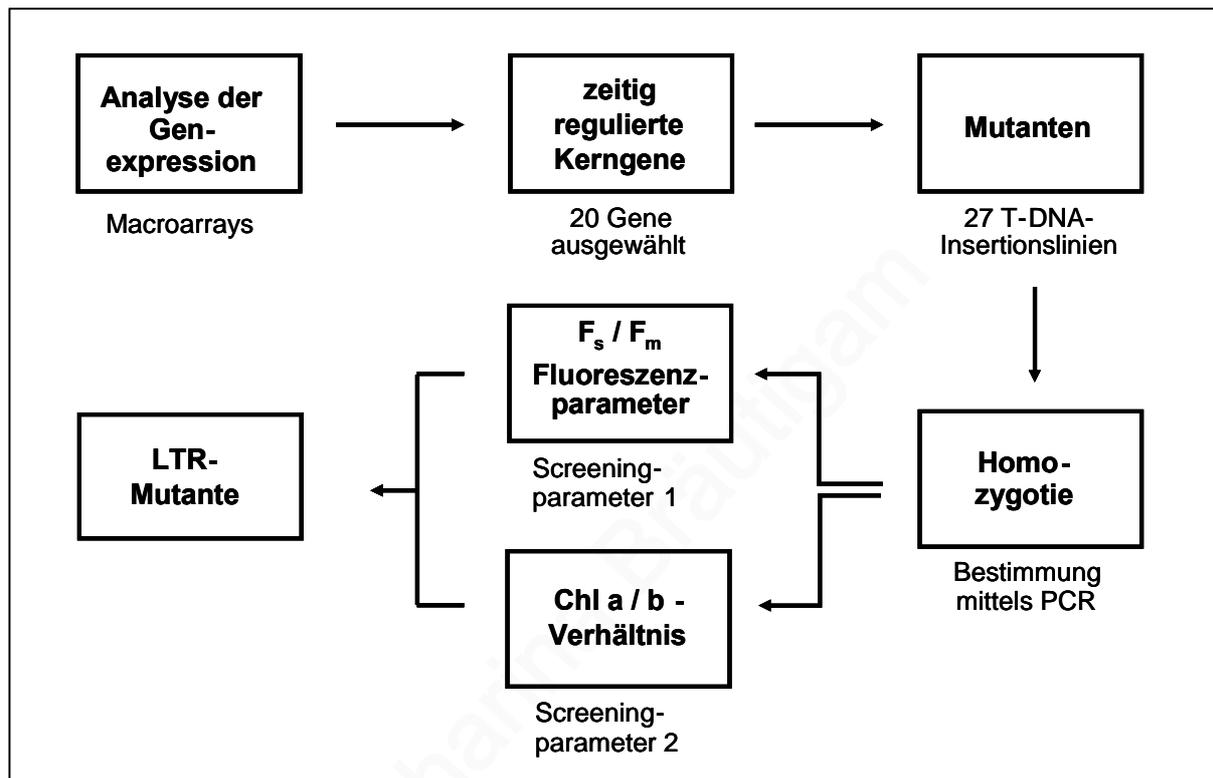


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifikation von akklimatorischen Mutanten. Aus den mittels *Array*-Analysen identifizierten PRGs wurden 20 Kandidaten ausgewählt und homozygote *knock-out*-Pflanzen auf ihre Fähigkeit zur Anpassung der Photosystemstöchiometrie (LTR) unter verschiedenen Lichtsystemen untersucht. Dazu wurde der Chlorophyllfluoreszenzparameter F_s/F_m und das Chlorophyll a/b-Verhältnis bestimmt. Mutanten mit beeinträchtigter LTR sollten über diese Vorgehensweise identifiziert werden.

3.3.1 Genotypische Analyse der T-DNA-Mutanten

Die vom NASC bezogenen T-DNA-Insertionslinien lagen als Gemisch aus homozygoten Samen, heterozygoten Samen und Wildtypsamen vor. Die Unterscheidung der Genotypen erfolgte auf molekularer Ebene mittels PCR. Ein Amplifikat konnte nur in folgenden Fällen erhalten werden (Abb. 3.17):

(I) Zwei genspezifische *Primer* (LP und RP) amplifizieren das WT-Allel bei heterozygoten Mutanten und beim WT.

(II) Ein genspezifischer *Primer* (RP) in Kombination mit einem T-DNA-spezifischen *Primer* (LB1, Lba1 oder Lbb1) amplifizieren den an die T-DNA-Insertion angrenzenden Sequenzbereich bei homo- und heterozygoten Pflanzen (mutiertes Allel).

Bei allen 27 verwendeten Linien wurden homozygote Pflanzen identifiziert. Ein Beispiel ist in Abb. 3.17 aufgeführt.

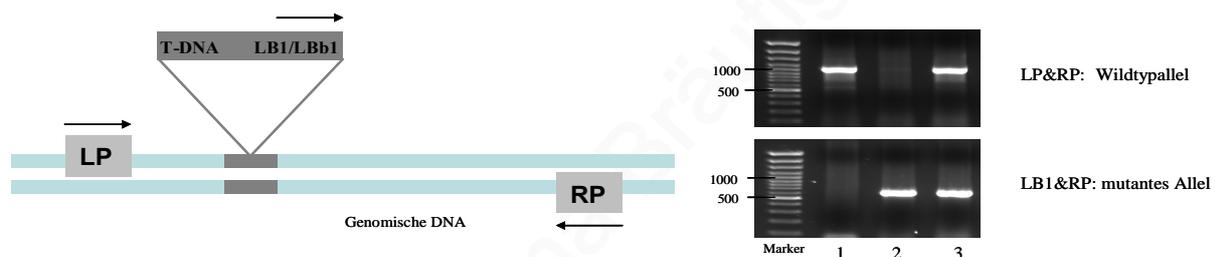


Abb. 3.17: Strategie zur Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutanten sowie drei Pflanzen der Linie LTR10 als Beispiel. Links: Schema zur Identifizierung von Wildtyp und Mutanten. LP: linker genspezifischer *Primer*, RP: rechter genspezifischer *Primer*, LB1 bzw. LBb1: T-DNA-spezifische *Primer*. Rechts: Die Bestimmung des Genotypes ist am Beispiel von drei Pflanzen der T-DNA-Insertionslinie SAIL_62_A07 gezeigt. Unter Verwendung der beiden *Primer*-Kombinationen wurde das Wildtypallel bzw. das mutierte Allel amplifiziert. Aus den erhaltenen Amplifikaten ergibt sich, dass es sich bei Pflanze 1 um einen Wildtyp, bei Pflanze 2 um eine homozygote und bei Pflanze 3 um eine heterozygote T-DNA-Mutante handelt.

Homozygote Pflanzen aller untersuchten Linien wurden zur Samenreife gebracht und das homozygote Saatgut dann zur weiteren Analyse verwendet.

Im Folgenden werden die homozygoten Mutantenlinien der zwanzig ausgewählten PRGs als „LTR 1 – LTR 20“ bezeichnet (Tab. 2.2), da es sich dabei um Kandidaten für Mutanten handelt, bei denen die LTR beeinträchtigt ist.

3.3.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenz und Bestimmung des Chlorophyll a/b-Verhältnisses

Mutanten, bei denen die LTR beeinträchtigt ist, sollten sowohl in ihrer Chlorophyllfluoreszenz (Fs/Fm-Parameter) als auch in der Zusammensetzung der Pigmente (Chl a/b-Verhältnis) Unterschiede zum Wildtyp aufweisen (Abb. 3.16).

Für die Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurden Pflanzen auf sterilen MS-Platten angezogen und an PSI- und PSII-Licht akklimatisiert bzw. einem Lichtwechsel unterzogen (PSI-II und PSII-I) (2.6). Weißlichtpflanzen (WL) wurden zum Vergleich ebenfalls analysiert. Pro Lichtsystem (PSI; PSI-II; PSII; PSII-I; WL) und Mutantenlinie (LTR 1 bis LTR 20) wurden je 3 Parallelen angezogen und gemessen. Jede MS-Platte enthielt dabei neben den zu untersuchenden homozygoten Mutantenpflanzen (8-10 Individuen) auch Wildtyppflanzen (8-10 Pflanzen) als interne Kontrolle.

Da ein Defekt in einem Gen tiefgreifende Folgen für die Funktion der Zelle haben kann und damit auch pleiotrope Auswirkungen auf die LTR zustande kommen können, wurde zunächst für alle Mutantenlinien geprüft, ob die allgemeine Funktion der Photosynthese beeinträchtigt war. Als Indikator dafür wurde der Chlorophyllfluoreszenz-Parameter F_v/F_m (maximale Quantenausbeute von Photosystem II nach Dunkeladaptation) verwendet. Werte, die kleiner als 0.8 sind, können auf Lichtstress oder physiologische Defekte hindeuten (Maxwell und Johnson 2000; Fey *et al.*, 2005). Bei den meisten der untersuchten Linien wurden unter allen Lichtsystemen Werte über 0.8 gemessen (Tab A.4). Werte <0.8 wurden bei fünf Linien erhalten (LTR 5, 11-2, 12, 13-1, 17-2); dort allerdings meist auch für die internen Kontrollpflanzen (Wildtyp). Daher sind die geringen F_v/F_m -Werte vermutlich nicht durch eine Mutation bedingt. Die F_v/F_m -Werte der Mutanten zeigen, dass Lichtstress keine Rolle spielt und die Photosynthese normal ablaufen kann.

Zur Untersuchung der LTR wurde der Fluoreszenzparameter F_s/F_m verwendet. Im Wildtyp zeigt dieser Parameter typische Veränderungen in Abhängigkeit von der Lichtqualität: Nach Akklimation an PSII-Licht (oder nach einem PSI-II-Wechsel) nimmt der F_s/F_m -Wert signifikant ab und steigt nach Akklimation an PSI-Licht (oder nach einem PSII-I-Lichtwechsel) an. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 3.18 (erstes Diagramm; bzw. weiße Balken) dargestellt.

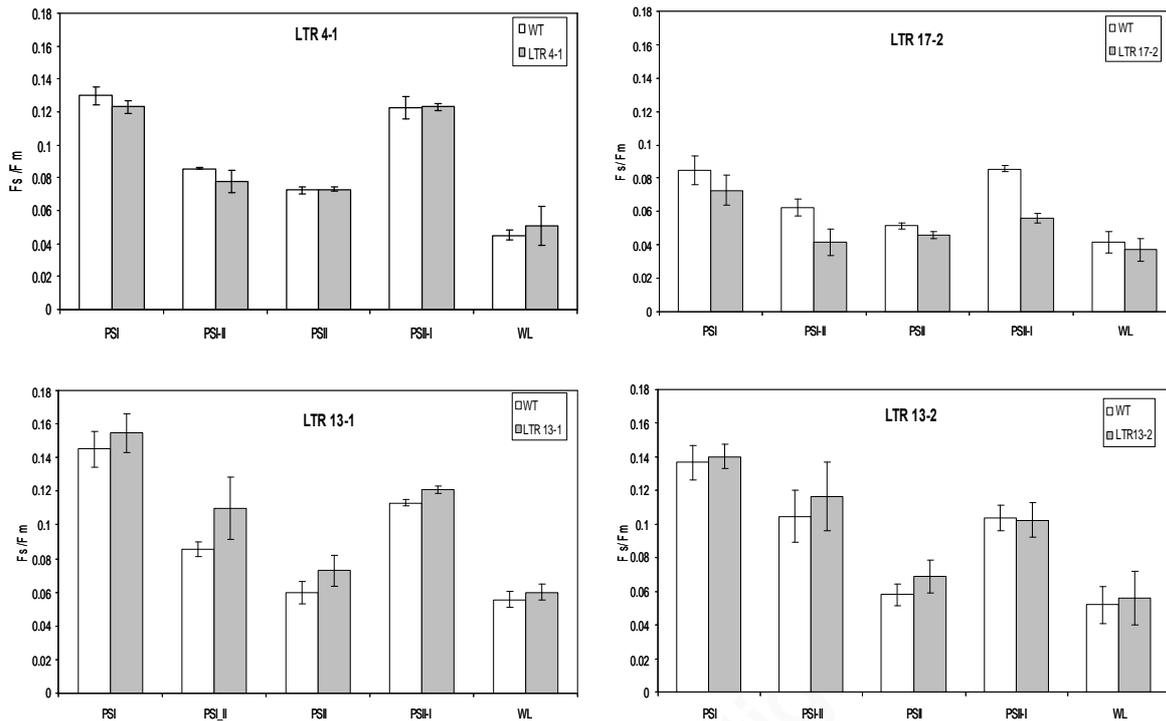


Abb. 3.18: Der Fluoreszenzparameter F_s/F_m bei Wildtyp und Mutanten nach Akklimation an verschiedene Lichtbedingungen. Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Messungen mit jeweils 8-10 Pflanzen dar, Mutanten sind grau und Wildtypkontrollen (WT) weiß markiert. Bei Linie LTR 4-1 verläuft die Lichtqualitätsakklimation wie beim Wildtyp. Linien LTR 13-1, 13-2 und 17-2 weisen Unterschiede zu Wildtyppflanzen bei der LTR auf.

Die F_s/F_m -Werte aller Mutantenlinien und Wildtypkontrollen sind in Tab. A.5 aufgelistet. Da für alle untersuchten Linien neben den Mutanten- auch Wildtyppflanzen auf der gleichen MS-Platte angezogen wurden, enthielt jede Messung eine interne Kontrolle.

Die meisten Linien reagierten auf die Lichtbehandlungen wie die interne Wildtypkontrolle, was darauf hindeutet, dass die LTR nicht beeinträchtigt ist. Als Beispiel dafür ist die Linie LTR 4-1 in Abb. 3.18 gezeigt. Diejenigen Mutantenlinien, die Abweichungen im Verhalten der F_s/F_m -Werte zum Wildtyp aufwiesen, sind ebenfalls in Abb. 3.18 aufgeführt. Unterschiede zum Wildtyp wurden bei den Linien LTR 13-1, 13-2 und 17-2 beobachtet. Nach einem PSI-II-Wechsel fiel bei Linie LTR 17-2 die Abnahme des F_s/F_m -Wertes deutlich geringer aus als beim Wildtyp, während die Linien LTR 13-1 und 13-2 eine abgeschwächte Akklimation nach einem Wechsel von PSII- nach PSI-Licht zeigten. In mindestens einem Lichtsystem wurden bei LTR 17-2 niedrigere und bei LTR 13-1 und 13-2 höhere F_s/F_m -Werte gemessen als beim Wildtyp.

Bei großen Schwankungen der Messwerte (LTR 11-1, 15-1, 16, 18 und 19) wurden keine Aussagen getroffen.

Als zweiten Parameter zur Untersuchung der Mutantenlinien auf eine Beeinträchtigung der LTR wurde das Chl a/b-Verhältnis verwendet. Während bei höheren Pflanzen Chlorophyll a bei beiden Photosystemen vorkommt, ist Chlorophyll b vorwiegend mit PSII-Antennen assoziiert. Eine Abnahme der Menge von Photosystem II im Verhältnis zur Menge an Photosystem I führt demzufolge zu einem Anstieg des Chl a/b-Wertes (und umgekehrt).

Wildtyp und Mutantenlinien (LTR 1 – LTR 20) wurden nach Voranzucht (2.6) unter den verschiedenen Lichtsystemen (PSI; PSII; PSII-I; WL) untersucht und die Chl a/b-Verhältnisse bestimmt. Alle erhaltenen Chl a/b-Werte sind in Tab. A.6 aufgelistet.

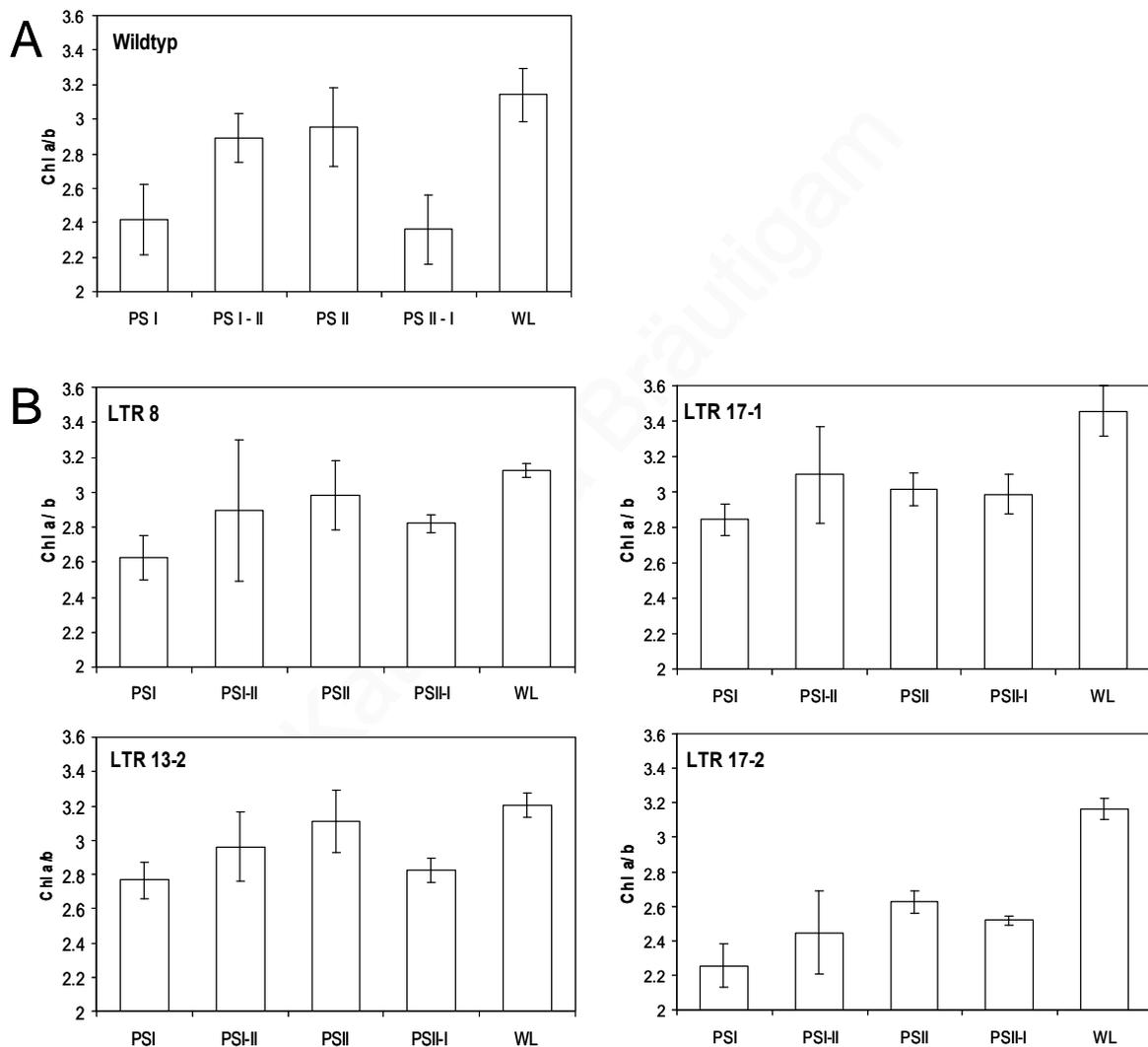


Abb. 3.19: Chlorophyll a/b-Verhältnis bei Wildtyp und Mutantenlinien nach Akklimation an verschiedene Lichtbedingungen. A: Wildtyppflanzen. B: Mutantenlinien mit Unterschieden zum Wildtyp. Anders als bei Wildtyppflanzen sind bei diesen vier Linien die Veränderungen der Chl a/b-Werte nach einem Lichtwechsel (PSII vs. PSI; PSII-I vs. PSII) nicht signifikant (t-Test, $p < 0.05$, Tab. A.6). Balken stellen Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen \pm Standardabweichung dar.

Der Wildtyp zeigt nach Akklimation an PSII-Licht bzw. nach einem Wechsel von PSI- in PSII-Licht deutlich erhöhte Chl a/b-Werte. Unter PSI-Licht und nach einem PSII-I-Wechsel ist das Chl a/b-Verhältnis dagegen signifikant erniedrigt (Abb. 3.19A).

Zeigen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Unterschiede im Verhalten der Chl a/b-Werte, deutet das auf eine Beeinträchtigung der LTR hin. Solche Unterschiede wurden bei den Linien LTR 8, 13-2, 17-1 und 17-2 beobachtet (Abb. 3.19B). Bei diesen Mutantenlinien fiel die Veränderung des Chl a/b-Wertes nach einem Lichtwechsel deutlich geringer aus als beim Wildtyp. Während LTR 8 und 13-2 generell einen abgeschwächten Verlauf der Akklimation zeigten, war bei LTR17-1 und LTR17-2 vor allem die Akklimation nach einem PSII-I-Wechsel betroffen.

Die meisten anderen Mutantenlinien reagierten wie Wildtyppflanzen auf Veränderungen der Lichtqualität. Zu Linien mit großen Schwankungen der Messwerte (LTR 11-1, 12, 15-2, 16 und 19, Tab. A.6) wurden keine Aussagen getroffen.

Bei der Untersuchung der Mutantenlinien LTR 1 – LTR 20 unter den verschiedenen Lichtsystemen mittels Chlorophyllfluoreszenzmessungen und Pigmentanalysen wurden für die Linien LTR 13-1, 13-2 und 17-2 (Fs/Fm-Parameter) bzw. LTR 8, 13-2, 17-1 und 17-2 (Chl a/b-Parameter) Unterschiede zum Wildtyp beobachtet. Die Linien LTR 13-2 und 17-2 unterschieden sich bei beiden Parametern vom Wildtyp, was auf eine Beeinträchtigung der LTR hinweist. Es konnten somit zwei LTR-Mutanten identifiziert werden.

Ein weiterer Hinweis dafür ergibt sich aus dem Verhalten der Linien LTR 13-1 und 17-1, die Unterschiede zum Wildtyp im Fs/Fm-Wert bzw. im Chl a/b-Verhältnis aufwiesen. Bei LTR 13-1 und 17-1 handelt es sich um genetisch unabhängige Linien (andere Position der T-DNA-Insertion, s. Tab. 2.2), bei denen jedoch das gleiche Gen wie bei LTR 13-2 bzw. 17-2 betroffen ist. Wenn sich die Insertionsstelle der T-DNA an unterschiedlichen Stellen befindet, kann das Gen unterschiedlich stark betroffen sein (*knock-down* vs. *knock-out*), womit auch Unterschiede zwischen LTR 13-1 und 13-2 bzw. 17-1 und 17-2 zu erklären sein könnten.

3.3.3 Mutanten mit beeinträchtiger LTR

Bei den LTR-Mutanten LTR 13-2 und 17-2 (siehe 3.3.2) sind Gene betroffen, die für eine Untereinheit von Photosystem II und ein Protein mit bisher unbekannter Funktion kodieren. Die Struktur der Gene, vorhergesagte Transitpeptide und konservierte Domänen, die über Datenbankinformationen und *Online-Tools* erhalten wurden, sind in Abb. 3.20 dargestellt.

Bei LTR 17-2 befindet sich die T-DNA-Insertion in der 5' UTR des Genes At1g03600. Dieses Gen kodiert für ein kleines, luminales, mit PSII-assoziiertes Plastidenprotein. Beim Vergleich mit Datenbankinformationen über NCBI bzw. PROSITE (Hulo *et al.*, 2006) wurden keine konservierten Domänen detektiert. Bei LTR 13-2 ist das Gen At4g39690 betroffen, das für ein mitochondriales Protein unbekannter Funktion kodiert und eine konservierte ERM-Domäne (Ezrin/Radixin/Moesin-Domäne, NCBI) enthält. Proteine der ERM Familie verbinden das Aktinzytoskelett mit der Plasmamembran und spielen bei der Signaltransduktion eine Rolle (Ivetic und Ridley 2004).

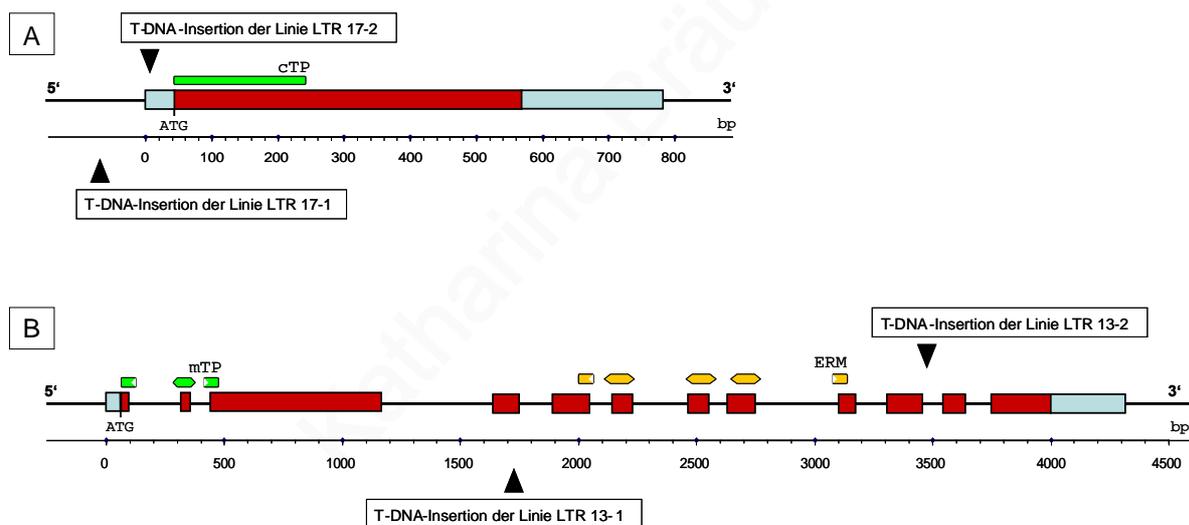


Abb. 3.20: Schematische Darstellung der Gene, die bei LTR 17 (At1g03600; A) und LTR 13 (At4g39690; B) betroffenen sind. Balken markieren Exons, wobei kodierende Bereiche rot dargestellt sind. Der Ort der T-DNA-Insertion ist durch ein schwarzes Dreieck markiert. Genstruktur und Ort der T-DNA-Insertion wurden über die Datenbanken NCBI und TAIR erhalten. Lokalisation und plastidäre (cTP) bzw. mitochondriale (mTP) Transitpeptide (grün) wurden über *TargetP*, *ChloroP* (Emanuelsson *et al.*, 1999; Emanuelsson *et al.*, 2000), *Mitoprot* (Claros und Vincens 1996) und *Predotar* (Small *et al.*, 2004) ermittelt. Konservierte Domänen sind gelb dargestellt. ERM: *Ezrin/radixin/moesin family domain*. Bei der Suche nach konservierten Domänen wurden Prosite (Hulo *et al.*, 2006) und NCBI berücksichtigt.

4 Diskussion

Veränderungen in den Lichtbedingungen können die Effizienz der Photosynthese beeinträchtigen. Pflanzen verfügen deshalb über eine Reihe von akklimatorischen Mechanismen, um bei veränderten Lichtverhältnissen eine hohe Photosynthese-Effizienz zu gewährleisten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* die Akklimationsreaktion an eine Veränderung der Lichtqualität untersucht. Diese hier betrachtete Langzeitreaktion (*Long Term Response*, LTR) ist durch Umstrukturierungen des Photosyntheseapparates, d.h. die Anpassung der Photosystemstöchiometrie, charakterisiert. Dabei spielen photosynthetische Redoxsignale als Auslöser der LTR eine entscheidende Rolle (s. Einleitung). Die Beteiligung von Redoxsignalen aus dem Plastochinon-Pool an der Regulation der Genexpression in Chloroplast und Zellkern während der LTR wurde bereits nachgewiesen (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Fey *et al.*, 2005). Dagegen ist der Zusammenhang mit weiteren Redoxsignalen (z.B. aus dem Trx-Pool), die Dynamik der Genexpression, besonders zu frühen Zeitpunkten, und die Rolle des Stoffwechsels während der LTR bisher kaum verstanden.

Um diese ungeklärten Zusammenhänge zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein systembiologischer Ansatz gewählt. Dabei wurde erstmalig die Pflanze als Gesamtsystem betrachtet und die Akklimationsreaktion auf verschiedenen Ebenen parallel untersucht. Zum einen wurden Veränderungen auf der Ebene der Genexpression im zeitlichen Verlauf der LTR mittels Makroarrays analysiert. Des Weiteren wurde anhand von Einzelmetaboliten sowie ganzen Metabolitprofilen die Ebene der Stoffwechselprodukte während der LTR untersucht. Schließlich wurden die so erhaltenen Ergebnisse bzw. daraus abgeleitete Hypothesen anhand physiologischer Untersuchungen mit Mutanten überprüft.

Zur Untersuchung der LTR unter Laborbedingungen wurden in dieser Arbeit Lichtquellen verwendet, die bevorzugt PSI bzw. PSII anregen (PSI- und PSII-Licht; siehe 1.4 und 2.6).

4.1 Veränderungen während der LTR auf der Transkriptebene

Um einen Überblick über die Dynamik auf der Ebene der Kerngenexpression, den Umfang der Regulation und die Geschwindigkeit bei der Übertragung retrograder Signale aus dem Chloroplasten zu erhalten, wurden Transkriptanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der LTR durchgeführt. Erste Analysen lagen bereits vor, bezogen sich allerdings nur auf einen späten Zeitpunkt und nur auf ein Reduktionssignal (Fey *et al.*, 2005). Der Schwerpunkt der hier durchgeführten Untersuchung lag auf der Dynamik der LTR und auf frühen Zeitpunkten, da diese entscheidend für den späteren Verlauf der LTR sind. Anhand der Analyse früher Zeitpunkte können mögliche primäre Zielgene retrograder Redoxsignale identifiziert werden.

Die Genexpressionsanalysen wurden mittels Makroarrays durchgeführt und die Expression v.a. nukleärer Chloroplastengene in zwei Experimenten (nach einem Reduktions- bzw. einem Oxidationssignal) untersucht. Um den Verlauf der LTR abzudecken und gleichzeitig eine genauere Analyse früher Zeitpunkte zu ermöglichen, wurden Transkriptprofile 30 min, 2 h, 8 h und 48 h nach Erzeugung eines Reduktions- (PSI-II-Wechsel) bzw. Oxidationssignals (PSII-I) erstellt und Profile vor einem Lichtwechsel (0 h) als Referenz verwendet (3.1). Die anschließende Auswertung aller erhaltenen *Array*-Daten sowie die detaillierte Analyse ausgewählter Teile ermöglichte es, Muster im Datensatz auf verschiedenen Skalen zu untersuchen (*top-down approach*).

4.1.1 Die Dynamik der LTR auf Transkriptebene

Die Analyse der Transkriptprofile zeigt, dass der gesamte zeitliche Verlauf der LTR durch umfangreiche Genexpressionsänderungen charakterisiert ist. Das konnte sowohl für die Akklimation nach Erzeugung eines Reduktionssignales als auch für die Reaktion auf ein Oxidationssignal nachgewiesen werden (siehe 3.1; Abb. 3.3).

Die Daten weisen darauf hin, dass die Akklimation auf Transkriptebene in verschiedenen Stufen verläuft. Auf zeitige Genexpressionsänderungen (bei 0.5 und 2 h) folgt ein deutlich verschiedenes Zwischenstadium (8 h), bis schließlich der Endzustand der Akklimation (48 h) erreicht wird (siehe 3.1; Abb. 3.3). Das Zwischenstadium kann dabei nicht ausschließlich durch zirkadiane Veränderungen erklärt werden, da die Versuche (einschließlich der Vorakklimation) im Dauerlicht durchgeführt wurden und damit die zirkadiane Rhythmik abgedämpft ist. Während die Akklimation an ein Reduktionssignal hauptsächlich durch Reprimierung der Genexpression charakterisiert ist, überwiegen bei Akklimation an ein Oxidationssignal eher induzierte Gene.

Der Verlauf der LTR auf Transkriptebene zeigt, dass nach einem Reduktions- und auch nach einem Oxidationssignal die ersten Gene bereits innerhalb von 30 min mit signifikanten Veränderungen in der Transkriptmenge reagierten (Abb. 3.3). Das weist deutlich auf eine schnelle Übertragung photosynthetischer Redoxsignale aus dem Chloroplasten in den Zellkern (retrograde Signalübertragung) hin. Die an der Signalübertragung beteiligten Komponenten liegen daher vermutlich in der Zelle bereits vor und müssen nicht erst gebildet werden. Untersuchungen, bei denen die Expression einzelner Kerngene nach Erzeugung von Redoxsignalen im PET durch veränderte Lichtintensitäten analysiert wurde, weisen auf ähnliche Geschwindigkeiten bei der Signalübertragung hin. Diese Versuche zeigen, dass je nach Organismus und experimentellen Bedingungen erste Veränderungen der Genexpression von *Lhcb*, *Apx1* oder *Apx2* innerhalb von 15 min – 3 Stunden nach Erzeugung von Redoxsignalen im PET auftreten (Maxwell *et al.*, 1995; Karpinski *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2004). Experimente mit Phosphataseinhibitoren lassen dabei auf die Beteiligung einer Phosphorylierungskaskade an der Übertragung von Signalen aus der Plastide in den Zellkern schließen (Escoubas *et al.*, 1995; Durnford und Falkowski 1997; Chen *et al.*, 2004; 1.3.3).

Je nach Zeitpunkt und Lichtwechsel wurden im Verlauf der Akklimationsreaktionen signifikante Expressionsänderungen bei 200 bis 2000 Genen detektiert (Abb. 3.3). Diese große Anzahl regulierter Gene verdeutlicht, dass es sich bei der LTR um eine komplexe Akklimationsantwort handelt, bei der photosynthetische Redoxsignale einen umfassenden Einfluss auf die Genexpression ausüben und als Teil eines Signalnetzwerkes agieren können. Viele der regulierten Gene zeigen signifikante, aber nicht sehr starke Veränderungen in ihrer Genexpression (<Faktor 2.5). Das lässt sich damit erklären, dass die LTR einen Mechanismus zur Feinanpassung der Photosynthese darstellt und alle Untersuchungen im physiologischen Akklimationsbereich von Wildtyppflanzen durchgeführt wurden. Bei Experimenten, die deutlich stärkere Einflüsse untersuchen, wie z.B. genetische Defekte (Mutationen), Starklichtstress oder Hormonbehandlungen, wurden z.T. auch wesentlich stärkere Veränderungen in der Genexpression detektiert (op den Camp *et al.*, 2003; Goda *et al.*, 2004; Vanderauwera *et al.*, 2005).

Um einen detaillierteren Überblick über Transkriptveränderungen während der LTR zu erhalten und die Daten unter einem funktionellen Gesichtspunkt zu analysieren, wurden die Gene funktionellen Gruppen zugeordnet, statistisch untersucht und graphisch dargestellt (MapMan-Software Version 2.0.0). Dabei wurde deutlich, dass sich die Expressionsprofile nach Akklimation an ein Reduktions- bzw. Oxidationssignal nicht nur in der Anzahl der

regulierten Gene z.T. beträchtlich unterschieden (s.o., Abb. 3.3). Es waren auch verschiedene Gene, die auf ein Reduktions- bzw. Oxidationssignal reagierten (s. Abschnitt 3.1.1). Bei den beiden untersuchten Akklimationsantworten handelt es sich daher nicht direkt um die Hin- und Rückreaktion eines Prozesses, sondern vielmehr um verschiedene Akklimationsprogramme.

Die Untersuchung der einzelnen Funktionsgruppen zeigte weiterhin, dass Photosynthesegene die einzige Kategorie darstellen, die sich in ihrer Expression als Gesamtgruppe signifikant von allen anderen Funktionsgruppen unterschied (Wilcoxon Rangsummentest, $p < 0.05$; Tab. 3.1). Bei beiden Akklimationsreaktionen (nach einem Oxidations- und nach einem Reduktionssignal) wurde dieses Ergebnis v.a. zu späteren Zeitpunkten erhalten (8 h & 48 h, Tab. 3.1). Die somit beobachtete spezifische Regulation von Photosynthesegenen steht im Einklang mit der Annahme, dass die LTR die Expression dieser Gene kontrolliert (Pfannschmidt *et al.*, 2001b).

Schließlich verdeutlicht die graphische Darstellung der Expressionsdaten in einem Überblicksschema des pflanzlichen Stoffwechsels, dass neben Photosynthesegenen interessanter Weise auch eine Reihe von Genen aus anderen Funktionsgruppen reguliert wurden (Abb. 3.4). Als Beispiel sind die Expressionsprofile des 48 Stunden-Zeitpunktes in Abb. 3.4 gezeigt. Deutliche Veränderungen in der Expression traten bspw. bei Genen auf, deren Produkte am Aminosäure-, Kohlenstoff- oder Lipidstoffwechsel, also verschiedenen metabolischen Prozessen, beteiligt sind. Die beobachteten Expressionsänderungen deuten somit auf eine komplexe Regulation der Genexpression und auch auf eine Beeinflussung des Metabolismus während der LTR hin und bestätigen deren Komplexität.

4.1.2 Zeitige Veränderungen und primär regulierte Gene

Um Gene zu identifizieren, die in ihrer Expression direkt durch photosynthetische Redoxsignale kontrolliert werden, wurden zeitig regulierte Gene genauer betrachtet und die Expressionsprofile des 30 Minuten-Zeitpunktes ausführlicher untersucht. Dabei wurden die Gene ausgewählt, deren Transkriptmengen im Vergleich zur 0 h-Referenz signifikant und mindestens um Faktor 2.5 reguliert waren und die im gesamten Verlauf der LTR detektiert werden konnten. Nach einem Lichtwechsel von PSI- nach PSII-Licht erfüllten 45 Gene, nach einem PSII-I-Wechsel 60 Gene diese Kriterien und wurden als „primär regulierte Gene“ (PRGs) bezeichnet (Tab. 3.2). Damit konnten in Rahmen dieser Arbeit 105 Gene identifiziert werden, die mögliche primäre Zielgene photosynthetischer Redoxsignale während der LTR darstellen. Zwei der PRGs (At3g11670 und At4g11230) wurden bereits als redox-regulierte

Gene während der späten LTR beschrieben (Fey *et al.*, 2005). Alle anderen PRGs wurden dagegen erstmalig mit der Langzeitantwort und photosynthetischen Redoxsignalen in Verbindung gebracht und bieten interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Erste anschließende Untersuchungen ausgewählter PRGs erfolgten über Mutanten und sind unter 3.3 beschrieben.

Die PRGs wurden hinsichtlich ihrer bekannten oder vermuteten Funktion genauer betrachtet. Interessanter Weise befinden sich unter den PRGs nur relativ wenige Gene (<10%), die im Zusammenhang mit der Photosynthese stehen. Das weist darauf hin, dass die Regulation vieler Photosynthesegene mittelbar erfolgt und lässt ebenfalls darauf schließen, dass die LTR eine komplexere Akklimationsantwort darstellt als bisher angenommen.

Die Zuordnung der PRGs zu den übergeordneten Kategorien „Regulation“, „Metabolismus/Struktur“ und „Unklassifiziert“ sowie die detailliertere funktionelle Klassifizierung verdeutlichen weiterhin, dass sich die Reaktionen auf ein Oxidations- bzw. auf ein Reduktionssignal auf Transkriptebene deutlich unterscheiden (Abb. 3.5).

Bei den Genen mit bekannter Funktion überwogen nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht Gene regulatorischer, nach einem PSII-I-Wechsel dagegen Gene metabolischer Funktionsklassen:

Von den PRGs, die nach einem Reduktionssignal (PSI-II) selektiert wurden, ist etwas über die Hälfte (53%) klassifiziert (Abb. 3.5 A). Davon konnte die Mehrheit (83%) regulatorischen Funktionsgruppen, die v.a. Signalwahrnehmung und -übertragung, Stressantworten und Regulation der Transkription umfassen, zugeordnet werden (Beispiele s.u.). Nur wenige der klassifizierten Gene (13%) kodierten für Proteine mit metabolischer Funktion.

Dagegen überwogen bei den PRGs, die nach einem Oxidationssignal (PSII-I) selektiert wurden, vor allem Gene, deren Produkte an Stoffwechselprozessen beteiligt waren (48%) (Abb. 3.5 B). Sie konnten diversen funktionellen Gruppen wie Photosynthese, Kohlenhydrat-, Fett-, Sekundärstoffwechsel u.a. zugeordnet werden. Nur 25 % wurden regulatorischen Funktionsgruppen, hauptsächlich den Funktionsklassen Proteinmodifikation und Regulation der Transkription, zugeordnet. Direkt nach einem Wechsel von PSII- nach PSI-Licht scheint die Regulation von Genen, deren Produkte an Stressantworten sowie der Signalwahrnehmung und -weiterleitung beteiligt sind, eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die LTR erfordert u.a. für die Anpassung der Photosystemstöchiometrie eine genaue Abstimmung der Transkription in Chloroplast und Zellkern. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sowohl *SigB* als auch Gene, die für verschiedene Transkriptionsfaktoren (bHLH-Faktor, ERF/AP2-Protein, ARF7; Tab. 3.2, I-II) kodieren, als primär regulierte Gene

identifiziert wurden. SIG B ist einer von bisher 6 bekannten Sigma-Faktoren bei *Arabidopsis* (Fujiwara *et al.*, 2000; Privat *et al.*, 2003). Sigma-Faktoren vermitteln die Promotorspezifität der plastidenkodierten RNA-Polymerase (PEP) und sind somit direkt an der Regulation der plastidären Genexpression beteiligt (siehe 1.1). Die anderen Transkriptionsfaktoren sind laut Vorhersageprogrammen im Zellkern lokalisiert und nehmen daher Einfluss auf die Regulation der Expression von Kerngenen. Obwohl der verwendete Macroarray vorwiegend Kerngene abdeckt, die für Plastidenproteine kodieren, werden auch einige Kerngene berücksichtigt, die Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Genen aufweisen und deren Produkte im Mitochondrium oder Zellkern lokalisiert sind (Abdallah *et al.*, 2000; Kurth *et al.*, 2002; Richly *et al.*, 2003). Letztere können interessante Zusatzinformationen über den Einfluss photosynthetischer Redoxsignalen im Regulationsnetzwerk der Zelle bieten. Weitere PRGs aus regulatorischen Funktionsgruppen kodieren für einen Elongationsfaktor (Ts; Proteinsynthese), ein *Prenylated Rab Acceptor Family1 Protein* (PRA1, *Sensing* und *Signalling*) sowie für RING-Finger-Proteine (evtl. Protein-Protein-Interaktion) (Tab. 3.2; I-II). Einige der PRGs kodieren auch für Produkte, die v.a. im Zusammenhang mit Stressantworten bekannt sind (Gluthation-S-Transferase GST6, Peroxidase ATP13, *Respiratory Burst Oxidase*; Tab. 3.2, I-II). Schließlich deutet die Regulation von PRGs, die für Proteinkinasen (At1g26970; At4g23150) sowie eine Protein-Phosphatase (At4g33500) kodieren (Tab. 3.2, II-I) auf die Beteiligung posttranslationaler Regulationsmechanismen im weiteren Verlauf der LTR hin. Nach bisherigem Wissensstand spielen Stressreaktionen während der LTR keine oder kaum eine Rolle (s.u. und Fey *et al.*, 2005). Dagegen ist die Beteiligung von Phosphorylierungskaskaden an der LTR durchaus wahrscheinlich (Fey *et al.*, 2005b; Bräutigam *et al.*, 2007; 1.3.3).

Als PRGs wurden weiterhin - v.a. nach einem PSII-I-Wechsel - eine Reihe von Genen identifiziert, deren Produkte für den Stoffwechsel und die Struktur der Zelle von Bedeutung sind (Tab. 3.2; II-I). Darüber, ob die Produkte dieser Gene zusätzlich auch regulatorische Funktionen bei der LTR wahrnehmen, kann vorerst nur spekuliert werden. Zu den PRGs gehören u.a. zwei Gene, die für die Enzyme Stärkesynthase 2 und eine putative Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase kodieren, was auf eine Beteiligung bzw. Regulation des Stärkemetabolismus während der LTR hindeuten könnte. Eine Redox-Regulation des Stärkemetabolismus wurde kürzlich bei Untersuchungen an *Arabidopsis*-Pflanzen gezeigt (Geigenberger *et al.*, 2005; Kolbe *et al.*, 2005). Die Produkte weiterer primär regulierter Gene stehen im Zusammenhang mit der Photosynthese und sind am Tetrapyrrolstoffwechsels (Crd1) oder an der Dunkelreaktion der Photosynthese (Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase, SBPase; kleine Untereinheit der RuBisCO; Transketolase) beteiligt oder stellen Komponenten des Photosyntheseapparates dar (zwei PSII-Untereinheiten). Schließlich kodieren eine Reihe von PRGs für Enzyme des Fettstoffwechsels wie die Digalactosyldiacylglycerol-Synthase1

(DGD1), Fettsäuredesaturase 2 (FAD2), Phosphatidylserin-Dekarboxylase 3 (PSD3) oder für einen Kofaktor der Fettsäuresynthese (Acylcarrierprotein 3, ACP3). Das deutet auf eine Beteiligung des Fettstoffwechsels besonders zu frühen Zeitpunkten während der Lichtakklimation hin. Die Digalactosyldiacylglycerol-Synthase bzw. die Phosphatidylserin-Dekarboxylase katalysieren die Bildung von häufigen Galaktolipiden bzw. Phospholipiden und damit Hauptkomponenten der Membranen der Pflanzenzelle (Nerlich *et al.*, 2007). Von besonderem Interesse könnte hier die Regulation des Genes für DGD1 sein, da dieses Enzym eines der Hauptlipide des Chloroplasten synthetisiert, welches auch für die Stabilität und Funktion der Photosysteme unentbehrlich ist (Dörmann *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 2006). Eine Regulation der Synthese von Galaktolipiden, den Hauptlipiden in Chloroplasten, würde auch im Einklang mit Ultrastrukturanalysen von Chloroplasten stehen, die je nach Lichtqualität Unterschiede in den Membranstrukturen (Grana) bzw. der Anzahl von Plastoglobuli zeigen (Deng *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2007).

Nach der Betrachtung der PRGs hinsichtlich ihrer funktionellen Klassifizierung wurden die Regulationsmuster der PRGs analysiert. Genexpressionsmuster, über den zeitlichen Verlauf einer Antwort betrachtet, können Hinweise auf zugrunde liegende Regulationsmechanismen bzw. die Beteiligung der Genprodukte an bestimmten biologischen Prozessen liefern. Um einen Überblick über Ähnlichkeiten und Unterschiede der Expressionsmuster zu erhalten, wurden die PRGs – ohne die bereits diskutierte Zuordnung zu funktionellen Klassen zu berücksichtigen – mit Hilfe eines Clusteralgorithmus (*k-means Clustering*) in Gruppen ähnlich regulierter Gene eingeteilt (2.9.3).

Bei den PRGs, die nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht identifiziert wurden, konnten drei deutliche Cluster unterschieden werden; bei den PRGs nach einem Wechsel von PSII- nach PSI-Licht waren es vier Gruppen (Abb. 3.6A,B). Somit konnten die PRGs in Cluster unterteilt werden, die verschiedene Regulationsmuster repräsentieren und möglicherweise verschiedene Regulationsmechanismen widerspiegeln. Allerdings überwogen in keinem der Cluster Gene einer bestimmten Funktionsklasse, weshalb kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Regulation der PRGs und Funktion der kodierten Genprodukte hergestellt werden konnte. Das kann die Interaktion verschiedener regulatorischer Prozesse, die im Verlauf der Lichtqualitätakklimation eine Rolle spielen, widerspiegeln. Allerdings muß auch berücksichtigt werden, dass ein Teil der PRGs bisher nicht oder nur ungenau klassifiziert und die Anzahl der PRGs für Clusteranalysen relativ gering ist.

4.1.3 „Signaturen“ anderer Einflüsse bei primär regulierten Genen

Bei der LTR sind Überlappungen mit anderen lichtabhängigen Prozessen, die sich *in planta* nur bedingt voneinander trennen lassen bzw. Interaktionen photosynthetischer Redoxsignale mit anderen Signalwegen denkbar. Die Untersuchung der LTR erfolgte in dieser Arbeit unter Schwachlichtbedingungen und wurde mit Hilfe von Lichtquellen verschiedener Qualität durchgeführt.

PSI-Licht enthält Wellenlängen über 700 nm, während das bei PSII-Licht nicht der Fall ist. Daher verändert sich bei einem Lichtwechsel während der Pflanzenanzucht auch das Hellrot/Dunkelrot-Verhältnis, was wiederum das Verhältnis der P_r- zu P_{fr}-Form von Phytochrom beeinflussen und Phytochrom-vermittelte Antworten auslösen könnte. Weiterhin könnten reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die bei einer Reihe von Umweltveränderungen, v.a. in Stresssituationen, in erhöhten Mengen entstehen, auch bei einer Veränderung der Lichtqualität verstärkt erzeugt werden. Das könnte insbesondere kurzfristig bei einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht der Fall sein, da dieser Wechsel zur deutlichen Reduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette führt.

Die Identifikation der PRGs ermöglicht damit erstmals einen bioinformatischen Ansatz, mit dem zeitig regulierte Gene auf Expressionssignaturen von ROS oder Phytochromen untersucht werden können (2.9.5, 3.1.3). Dieser sensitive Ansatz bietet somit die Möglichkeit, Überlagerungen der LTR mit ROS- oder Phy- vermittelten Prozessen zu detektieren.

Dazu wurden Expressionsdaten dieser Arbeit (PRGs) umfassend mit publizierten *Array*-Datensätzen aus Experimenten anderer Forschungsgruppen verglichen, die den Einfluss von verschiedener ROS wie Wasserstoffperoxid, Superoxidationen oder Singulett-Sauerstoff bzw. Phytochrom A und B auf das Transkriptom von *Arabidopsis* untersuchten (Kuno *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; op den Camp *et al.*, 2003; Rizhsky *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2004; Monte *et al.*, 2004; Davletova *et al.*, 2005; Kretsch 2005; Vanderauwera *et al.*, 2005). Falls Einflüsse von ROS oder Phytochromen bei der Lichtqualitätsakklimation eine Rolle spielen, müssten diese auch eine „Signatur“ in den Expressionsprofilen hinterlassen, die nach einem Lichtwechsel erstellt wurden.

Der Vergleich der PRGs mit den zwölf verschiedenen Datensätzen, die den Einfluss von Phytochromen bzw. ROS widerspiegeln, ergab keine oder nur eine geringe Anzahl von Übereinstimmungen (3.1.3, Abb. 3.7). Bei den primär regulierten Genen wurden damit keine oder nur schwache „Signaturen“ reaktiver Sauerstoffspezies (H₂O₂, O₂⁻, ¹O₂) bzw. von Phytochromen (PhyA, PhyB) detektiert. Das deutet darauf hin, dass zu Beginn der LTR Überlappungen mit ROS- bzw. Phytochrom-vermittelten Reaktionen auf Ebene der Genexpression keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Während die PRGs deutlich

den Einfluss photosynthetischer Redoxsignal widerspiegeln (3.1, Einleitung), wurde ihre Regulation vermutlich nur in begrenztem Umfang durch ROS- oder Phytochrom-bedingte Signale beeinflusst. Das Ergebnis der Datensatzvergleiche verdeutlicht weiterhin, dass die in dieser Arbeit untersuchten Akklimationsantworten eigenständige Reaktionen darstellen und unabhängig von Phytochrom- oder ROS-vermittelten Prozessen ablaufen.

Das steht auch im Einklang mit Untersuchungen an Mutanten, die zeigen, dass wichtige Photorezeptoren für Rot- und Blaulicht (PHYA, PHYB, CRY1, CRY2) direkt für die LTR nicht erforderlich sind (Fey *et al.*, 2005). Weiterhin wurden bei Wildtyppflanzen am Ende der LTR keine Veränderungen im Redoxzustand von Glutathion gemessen (Fey *et al.*, 2005). Glutathion ist ein wichtiges Antioxidanz der Zelle, das u.a. bei der Entgiftung von ROS oxidiert wird. Damit wurden, allerdings nach am Ende der LTR, keine Hinweise auf einem erhöhten Gehalt an ROS erhalten, was auch durch die Ergebnisse des Datensatzvergleiches bestätigt wird.

Der in dieser Arbeit durchgeführte bioinformatische Vergleich konnte damit die Ergebnisse vorangegangener physiologischer und biochemischer Analysen bestätigen und damit auf molekularer Ebene komplementieren.

4.1.4 *In-silico* Promotoranalyse der primär regulierten Gene

Bisherige Untersuchungen der Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern zeigen, dass verschiedene „Plastidensignale“ existieren (s. 1.1). Wie jedoch die Expression von Kerngenen durch solche Signale reguliert wird, ist bisher nur teilweise geklärt. Dass diese Regulation über begrenzte Promotorbereiche vermittelt werden kann, wurde anhand von Promotor-Reportergen-Konstrukten gezeigt (Bolle *et al.*, 1996; Kusnetsov *et al.*, 1996; Baier *et al.*, 2004). Über einzelne Promotormotive, die spezifisch auf Plastidensignale reagieren, ist bisher jedoch bei höheren Pflanzen wenig bekannt.

Daher wurden die Promotorsequenzen der PRGs auf gemeinsam auftretende *cis*-Elemente (Motive) hin untersucht (2.9.6; 3.1.4) und dabei auch Gruppen koregulierter Gene innerhalb der PRGs (Cluster, Abb. 3.6) berücksichtigt. Tabelle A.2 enthält die beim Vergleich mit Datenbankeinträgen (PlantCARE und Transfac) am häufigsten identifizierten bekannten *cis*-Elemente, während überrepräsentierte Motive in Tabelle 3.3 aufgeführt sind.

Die Analyse zeigte, dass in den Promotersequenzen der PRGs lichtresponsive Motive (z.B. G-Box, GAG-Motiv, ATC-Motiv und weitere Abschnitte lichtresponsiver Elemente) überwogen (Tab. 3.3, Tab. A.2). Bei der Zusammensetzung der häufigsten Motive unterschieden sich die einzelnen Cluster allerdings voneinander. Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass die verschiedenen Cluster unterschiedliche Regulationsmuster (und damit ggf.

Regulationsmechanismen) repräsentieren. Neben lichtresponsiven und allgemeinen Motiven wurden auch solche identifiziert, die bei Wachstumsprozessen (Non-Box, CAT-Box) eine Rolle spielen; einige Motive sind als ABA- oder stressresponsiv beschrieben. Bei Genen, die nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht reprimiert sind (PSI-II: Cluster3), trat außerdem ein Motiv überdurchschnittlich häufig auf, dessen Sequenz am ehesten mit EIN3, einem ethylenresponsiven Element übereinstimmt.

Vorhergehende Untersuchungen, die für einzelne Kerngene wie *AtpC*, *PetE* oder *Fnr* durchgeführt wurden, zeigen, dass Lichtregulation und retrograde Kommunikation über ähnliche Promotorregionen erfolgen kann (Kusnetsov *et al.*, 1994; Bolle *et al.*, 1996; Kusnetsov *et al.*, 1996; Puente *et al.*, 1996). Untersuchung mit dem Transkriptionsfaktor ABI4 (*abscisic acid insensitive-4*) lassen auch auf Überlagerungen von ABA- und Lichtvermittelten Signalen sowie retrograder Kommunikation schließen (Acevedo-Hernandez *et al.*, 2005; Koussevitzky *et al.*, 2007). Bei *Chlamydomonas* konnte kürzlich mit Hilfe von Promotor-Deletionskonstrukten ein „*plastid responsive element*“ identifiziert werden (von Gromoff *et al.*, 2006). Dieses Motiv reagiert spezifisch auf Licht oder Mg-Proto IX, welches ein mögliches Plastidensignal aus der Tetrapyrrolbiosynthese darstellt. Analog dazu konnte ein „redox-responsives Element“ in den Promotoren der hier untersuchten PRGs nicht identifiziert werden.

Während die Regulation der Kerngenexpression durch retrograde Signale bisher nur teilweise verstanden ist, ist die photorezeptorvermittelte Regulation kernkodierter Photosynthesegene (*photosynthesis associated nuclear genes* PhANGs) wie beispielsweise *Lhcb* und *RbcS* gut untersucht (Argüello-Astorga und Herrera-Estrella 1998). Die Promotoren solcher PhANGs enthalten eine Reihe unterschiedlicher lichtresponsiver Motive, die oft auch in Kombination mit anderen Elementen (z.B. ABA-responsiven Motiven) auftreten.

Die Ergebnisse der hier erfolgten Analyse deuten auf eine Beteiligung verschiedener, v.a. lichtresponsiver, *cis*-Elemente an der Regulation der Genexpression durch plastidäre Redoxsignale hin. Sie stimmen mit bisherigen Untersuchungen überein, die darauf hinweisen, dass Licht und andere Signale über ähnliche Motive vermittelt werden und eine Kombination verschiedener Motive ausschlaggebend ist.

Zukünftige *in-silico*-Promotoranalysen können genauere und detailliertere Information liefern, wenn größere Datensätze bspw. durch die Verwendung umfangreicherer *Arrays* oder Datenbankinformationen zur Verfügung stehen. Alternativ dazu könnten die Promotoren einzelner ausgewählter PRGs für detaillierte Analysen mittels Promotor-Reportergenkonstrukten herangezogen werden.

4.2 Veränderungen während der LTR auf metabolischer Ebene

Eine weitere Regulationsebene der Pflanzen umfasst die des Metabolismus. Verändert sich die Umwelt, können Stoffwechselprodukte akkumulieren bzw. in verringerter Menge auftreten und damit Funktionen und Signalübertragungswege innerhalb der Pflanzenzelle bis hin zur gesamten Pflanze beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Veränderungen im Metabolismus während der Langzeitantwort umfassend und bei einer höheren Pflanze untersucht. Deutliche Hinweise auf metabolische Veränderungen während der hier betrachteten LTR ergaben sich aus den bereits diskutierten Daten des *Transcript Profiling* (3.1) und auch aus Ultrastrukturanalysen von Chloroplasten (Deng *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2007).

4.2.1 Beteiligung ausgewählter Produkte des Grund- und Energiestoffwechsels an der LTR

Um einem allgemeinen Eindruck zu bekommen, ob und inwiefern der Stoffwechsel während der LTR Veränderungen unterworfen ist, wurden zunächst wichtige Grundbausteine der Pflanzenzellen betrachtet und der Gesamtgehalt an Stärke, Proteinen und Fettsäuren gemessen.

Die Messungen zeigten, dass nur der Gehalt an Stärke durch die Lichtqualität beeinflusst wird und sich während der LTR deutlich verändert. Unter PSII-Licht enthielten Pflanzen etwa 40-50 % mehr Stärke als unter PSI-Licht (Abb. 3.8A). Diese Beobachtung steht im Einklang mit bisherigen Ultrastrukturanalysen von Chloroplasten. Unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen wurde für Spinat und *Arabidopsis* gezeigt, dass Chloroplasten unter PSII-Licht deutliche Stärkekörner ausbilden, während dies unter PSI-Licht nicht der Fall ist (Deng *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2007). Die Lichtwechselvarianten verdeutlichen außerdem die reversible Anpassung des Stärkegehaltes an die Lichtqualität. Pflanzen nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht enthielten etwa soviel Stärke wie Pflanzen aus PSII-Licht; nach einem PSII-I-Wechsel entsprach der gemessene Stärkegehalt dem von PSI-Pflanzen. Eine solche Reversibilität ist charakteristisch für „echte“ akklimatorische Antworten.

Für die Regulation des Stärkegehaltes in Abhängigkeit von der Lichtqualität sind verschiedene Mechanismen denkbar. Eine interessante Regulationsmöglichkeit ergibt sich aus dem direkten Zusammenhang zwischen Stärkemetabolismus und photosynthetischem Elektronentransport (Geigenberger *et al.*, 2005). Das Schlüsselenzym der Stärkesynthese im Plastiden ist ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), das durch lichtabhängige Signale posttranslational reguliert werden kann. Bei Belichtung wird dieses Enzym durch Thioredoxin

über die Reduktion einer regulatorischen Disulfidbrücke redox-aktiviert und ermöglicht so einen Anstieg der Stärkesynthese (Tiessen *et al.*, 2002; Tetlow *et al.*, 2004; Geigenberger *et al.*, 2005). Darüber hinaus sind verschiedene weitere Regulationsmechanismen im komplexen Stärkemetabolismus bekannt (Tetlow *et al.*, 2004; Geigenberger *et al.*, 2005). Sie umfassen allosterischen Modifikationen der beteiligten Enzyme (bspw. AGPase durch 3-Phosphoglycerat und anorganisches Phosphat), weitere Redoxregulationen (bspw. über Zuckerspiegel) oder Phosphorylierungen und betreffen sowohl Stärkeauf- als auch Stärkeabbauprozesse.

Die Genexpressionsdaten dieser Arbeit (Abschnitt 3.1) und Untersuchungen der Ultrastruktur von Chloroplasten (Deng *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 2007) lassen weiterhin Veränderungen im Lipidstoffwechsel während der LTR vermuten. Messungen ergaben jedoch, dass der Gesamtgehalt an Fettsäuren durch die Lichtqualität kaum beeinflusst wird (Abb. 3.8C). Daher wurde der Gehalt an einzelnen Fettsäuren wie Palmitin-, Linol- oder Linolensäure untersucht, für die allerdings ebenfalls keine Veränderungen in Abhängigkeit von der Lichtqualität beobachtet wurden (Abb. A.1). Die Daten zeigen, dass Veränderungen auf Transkriptebene sich nicht unmittelbar auf metabolischer Ebene widerspiegeln müssen. Neuere Untersuchungen zeigen auch, dass lipidreiche Plastoglobuli, die verstärkt unter PSI-Licht auftreten, nicht nur im Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel stehen, sondern auch Zwischenspeicher von Thylakoidmembranen darstellen (Bréhélin *et al.*, 2007). Veränderungen in der Ultrastruktur von Chloroplasten könnten daher auch auf interne Umlagerungen zurückzuführen sein.

Die Messungen wichtiger Grundbausteine der Zellen zeigen (Abb. 3.8), dass der Gesamtgehalt der Pflanzen an Fettsäuren und auch an Proteinen während der LTR unverändert bleibt. Dagegen wird der Stärkegehalt deutlich reguliert und reversibel an die jeweilige Lichtqualität angepasst. Zusätzlich zum bisher bekannten Umbau des Photosyntheseapparates und umfassenden Genexpressionsänderungen konnte somit gezeigt werden, dass akklimatorische Veränderungen während der LTR auch auf metabolischer Ebene stattfinden.

Die beobachteten Unterschiede im Stärkegehalt deuten darauf hin, dass sich Pflanzen unter PSI- und unter PSII-Licht, also in Abhängigkeit von der Lichtqualität, in unterschiedlichen metabolischen und damit auch energetischen Zuständen befinden.

Um diese Annahme genauer zu untersuchen, wurden die primären Produkte der Photosynthese: ATP (Energieäquivalente) und NADPH (Reduktionsäquivalente) genauer betrachtet und die Verhältnisse von ATP/ADP (Energiestatus) und NADPH/NADP (Reduktionsstatus) unter den verschiedenen Lichtsystemen analysiert (Abb. 3.9).

Hinsichtlich ihres ATP/ADP-Verhältnisses unterschieden sich PSI- und PSII-Licht akklimatisierte Pflanzen kaum (Abb. 3.9A). Nach Akklimation an PSII-Licht (PSII; PSI-II)

wurden etwas höhere ATP/ADP-Werte als nach PSI-Akklimation (PSI; PSII-I) gemessen. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Für alle untersuchten Lichtsysteme wurden relativ geringe ATP/ADP-Verhältnisse bestimmt (0.5-0.8). Sie lagen deutlich unter ATP/ADP-Werten, die für *Arabidopsis*-Pflanzen im Weißlicht, allerdings bei etwas höheren Lichtintensitäten, ermittelt wurden (2.2; Wormuth *et al.*, 2006). Während der Energiestatus von Pflanzen unter den verschiedenen Lichtsystemen generell gering ist, wird also das ATP/ADP-Verhältnis kaum durch die Lichtqualität beeinflusst.

Dagegen unterlag der Redoxstatus von NADP deutlichen Veränderungen während der LTR (Abb. 3.9B). Das NADPH/NADP-Verhältnis von Pflanzen unter PSI-Licht und nach einem PSII-I-Wechsel lag deutlich über den Werten von PSII- und PSI-II-Pflanzen. Aus den Daten der Lichtwechselvarianten ergibt sich außerdem, dass die Anpassung des NADPH/NADP-Verhältnisses an die Lichtqualität reversibel verläuft. Eine ähnliche reversible Anpassung wurde bereits für den Stärkegehalt beobachtet. Neben den Daten der Stärkebestimmung geben die NADPH/NADP-Verhältnisse einen weiteren Hinweis darauf, dass sich Pflanzen unter PSI- und PSII-Licht in ihrem Metabolismus und Energiestoffwechsel unterscheiden und verschiedene Zustände annehmen können.

Betrachtet man die Unterschiede im NADPH/NADP-Verhältnis, waren es interessanter Weise PSI-Licht akklimatisierte Pflanzen (PSI; PSII-I), die deutlich höhere Werte aufwiesen als Pflanzen unter PSII-Licht (PSII; PSI-II). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Annahme, dass PSI-Licht, welches oxidierend auf den PQ-Pool wirkt, auch zu einer stärkeren Oxidation des NADP-Pools führt. Umgekehrt wurde unter PSII-Licht, welches stärker reduzierend auf den PQ-Pool wirkt als PSI-Licht, ein geringerer Reduktionsstatus von NADP beobachtet.

Die unerwarteten Ergebnisse der NADPH/NADP-Bestimmung (Abb. 3.9B) wurden durch eine unabhängige Methode, die Messung des Aktivierungszustandes der NADP-abhängigen Malatdehydrogenase (NADP-MDH), überprüft und bestätigt (Abb. 3.10). Pflanzen unter PSI-Licht und nach einem PSII-I-Wechsel zeigen eine stärkere Aktivierung der NADP-MDH (55-60%) als unter PSII-Licht bzw. einem PSI-II-Wechsel (~ 40%). Das deutet auf ein höheres NADPH/NADP-Verhältnis nach Akklimation an PSI-Licht hin.

Weißlichtpflanzen zeigen eine NADP-MDH Aktivität (~ 0.4; Abb. 3.10), die mit publizierten Daten für *Arabidopsis* unter vergleichbaren Anzuchtbedingungen übereinstimmt (Yoshida *et al.*, 2007). Für den Einfluss der Lichtqualität auf den Aktivierungszustand der NADP-MDH wurden dagegen auch andere Ergebnisse erhalten (Piippo *et al.*, 2006). Allerdings sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar, da in dieser Arbeit ein anderes Lichtregime verwendet wurde. Bei Piippo *et al.* wurde die Aktivität der NADP-MDH 3 h nach Veränderung der

Lichtbedingungen (Lichtintensität und -qualität) ermittelt, während sie in dieser Arbeit bei bereits vorakklimatisierten Pflanzen 48 h nach Veränderung der Lichtqualität erfolgte.

Mit zwei unabhängigen Methoden wurde gezeigt, dass im hier verwendeten experimentellen System NADP unter PSI-Licht stärker reduziert vorliegt als unter PSII-Licht (Abb. 3.9B; Abb. 3.10). Aus bisherigen Untersuchungen ist weiterhin bekannt, dass PSI-Licht auf den Plastochinonpool stärker oxidierend wirkt als PSII-Licht (s. 1.4; Sherameti *et al.*, 2002; Fey *et al.*, 2005). Damit wurde eine gegensätzliche Wirkung der Lichtqualität auf den Reduktionsstatus des NADP-Systems und des PQ-Pools beobachtet. Der Redoxstatus von Komponenten des photosynthetischen Elektronentransportes (PQ-Pool) und von stromalen Komponenten, die an den PET gekoppelt sind (NADP, Thioredoxin) kann also einzeln variiert werden. Die Beobachtungen geben weiterhin einen Hinweis darauf, dass während der LTR verschiedene Redoxkomponenten (PQ-Pool, NADP) eine wichtige Rolle spielen können. Auf diese Möglichkeiten wird später im Zusammenhang mit Akklimationsmechanismen der Photosynthese genauer eingegangen (siehe 4.4).

4.2.2 Metabolic Profiling: Parallele Analyse von Stoffwechselmetaboliten

Die bisher diskutierten Untersuchungen ausgewählter Produkte des Grund- und Energiestoffwechsels belegen, dass die Lichtqualitätsakklimation auch Veränderungen auf metabolischer Ebene umfasst (Abb. 3.8 - 3.10). In welchem Umfang weitere metabolische Veränderungen auftreten und inwiefern Metabolite bei der Regulation der Lichtqualitätsakklimation eine Rolle spielen, ist bisher unbekannt.

Zum genaueren Verständnis der LTR wurden daher erstmalig umfangreichere Messungen, sogenanntes *Metabolic Profiling*, durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.3). Da es sich bei der LTR um einen dynamischen Akklimationsprozess handelt, wurde zuerst ein geeigneter Zeitpunkt für die ausführlicheren Metabolitmessungen bestimmt. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass der Akklimationsprozess auf funktioneller, Protein- und Transkriptebene nach zwei Tagen abgeschlossen ist (Walters und Horton 1994; Pfannschmidt *et al.*, 1999; Pfannschmidt *et al.*, 2001).

Einen Hinweis auf den Zeitraum, in dem metabolische Veränderungen stattfinden, ergab sich aus Messungen des Stärkegehaltes zu verschiedenen Zeitpunkten während der LTR (Abb. 3.11). Die Anpassung des Stärkegehaltes an eine veränderte Lichtqualität erfolgte ebenfalls innerhalb von zwei Tagen und fand damit etwa im selben Zeitraum statt wie die Anpassung der Photosystemstöchiometrie. Dieser Zeitpunkt (48h nach Veränderung der Lichtqualität) wurde daher für detaillierte Metabolitmessung ausgewählt.

In PSI- und PSII-Lichtpflanzen, den Lichtwechselvarianten (PSI-II-, PSII-I-Pflanzen) und Weißlichtpflanzen wurde eine Vielzahl von Stoffwechselprodukten (ca. 60) analysiert. Vor allem polare Metabolite des Primärstoffwechsels wie Aminosäuren, Zucker, Zuckeralkohole, und zentrale organische Säuren wurden dabei untersucht. Die Daten vermitteln einen umfassenden Eindruck vom Verhalten des Metabolismus während der LTR und zeigen, dass eine Veränderung der Lichtqualität zu deutlichen Unterschieden in den Metabolitprofilen führt. Diese Unterschiede betrafen Verbindungen des Zuckermetabolismus, der Aminosäuresynthesen sowie der Atmung und damit wichtige Stoffwechselwege innerhalb und auch außerhalb des Chloroplasten (Abb. 3.13). Signifikante Veränderungen nach einem Lichtwechsel (PSI-II vs. PSI; PSII-I vs. PSII) wurden bei 16 bzw. 17 Metaboliten detektiert (Tab. A.3) und sind nicht ausschließlich auf Produkte der Photosynthese (Stärke, NADPH, s. o.) beschränkt. Die LTR umfasst somit zusätzlich zur direkten Anpassung des Photosyntheseapparates eine Reihe metabolischer Veränderungen und stellt damit eine komplexere Akklimationsreaktion dar als bisher angenommen. Das steht auch im Einklang mit den umfangreichen Veränderungen der Transkriptmengen, die im Verlauf der LTR detektiert wurden (s. 3.1).

Analog der Analyse der Transkriptdaten (Abschnitt 3.1) wurden zunächst die Metabolitprofile von Pflanzen nach einem Lichtwechsel (PSI-II; PSII-I) mit denen von Pflanzen unter konstanter Lichtqualität (PSI; PSII) verglichen (Tab. A.3; Abb. 3.13). Die genauere Betrachtung der metabolischen Veränderungen nach einem Lichtwechsel von PSI- nach PSII-Licht (im Vergleich zu PSI-Licht) zeigte für einzelne Metabolite unterschiedliche Reaktionen (Abb. 3.13 oben). Während die Menge an zentralen Stoffwechselverbindungen wie Pyruvat und Shikimat anstieg, wurde gleichzeitig ein geringerer Gehalt an Glucose, Fruktose und Mannose gemessen. Der PSI-II-Wechsel war weiterhin durch Veränderungen im Gehalt einiger Aminosäuren gekennzeichnet: Eine Erhöhung wurde bei Histidin und Threonin, eine Abnahme für Serin, Glutamin und Asparagin beobachtet.

Dagegen führt der Lichtwechsel von PSII- nach PSI-Licht hauptsächlich zur Verringerung der Menge verschiedener Aminosäuren und organischer Säuren wie bspw. Glycin, Methionin, Threonin und Histidin bzw. Malat, Glycerat, Pyruvat und Shikimat (Abb. 3.13 unten). Weiterhin wurde nach einem PSII-I-Wechsel ein erhöhter Gehalt an Glutamin gemessen.

Bei keinem der Lichtwechsel wurden Veränderungen im Gehalt an Hexosephosphaten, welche den Ausgangspunkt für Stärkeaufbau, Zellwandsynthese und Atmung bilden, beobachtet. Bei zentralen Zuckern (Glucose, Fructose, Mannose) traten zwar Veränderungen nach einem PSI-II-Lichtwechsel auf, nach dem entgegengesetzten Lichtwechsel (PSII-I) war das jedoch nicht der Fall. Eine reversibel Anpassung des Gehaltes an zentralen Zuckern wurde somit nicht festgestellt. Das deutet u.a. darauf hin, dass die Anpassung des Stärkegehaltes an die Lichtqualität nicht direkt über die Menge an Hexosephosphat oder zentrale Hexosen erfolgt, sondern auf anderen Regulationsmechanismen (z.B. Enzymaktivität s.o., Umsatzraten) beruhen dürfte.

Im Gegensatz zu Zuckerverbindungen unterlagen die zentralen Stoffwechselintermediate Pyruvat und Shikimat deutlichen Veränderungen in Abhängigkeit von der Lichtqualität. Der Gehalt stieg nach Akklimation an PSII-Licht an und nahm unter PSI-Licht signifikant ab. Pyruvat stellt ein wichtiges Stoffwechselintermediat dar, welches vorwiegend glycolytisch gebildet wird, über den Citratcyclus vollständig zu CO_2 oxidiert werden kann und damit wesentlich zur Energieerzeugung im Mitochondrium beiträgt. Pyruvat ist außerdem an der Biosynthese von Aminosäuren bspw. Leucin, Valin und Isoleucin (Pyruvatfamilie) beteiligt. Bei Shikimat handelt es sich um ein wichtiges Intermediat der Synthese aromatischer Aminosäuren und sekundärer Metabolite. Die Regulation von Pyruvat und Shikimat könnte die generelle Anpassung des Stoffwechsels während der LTR widerspiegeln und damit den Bedarf an Energie und Intermediaten für verschiedene Prozesse.

Während kaum Veränderungen bei Metaboliten des Citratzyklus auftraten, reagierten verschiedene Aminosäuren bspw. Threonin, Methionin, Glycin oder Glutamin deutlich auf eine Veränderung der Lichtqualität (Abb. 3.13). Für die Regulation des Aminosäurestoffwechsels sind bisher eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen bekannt (Allosterie, Kofaktoren, posttranslationale Modifikationen, Veränderung der Enzymmenge). Eine interessante Regulationsmöglichkeit ergibt sich allerdings für Glutamin aus dem Zusammenhang des GS/GOGAT-Zyklus und dem photosynthetischen Elektronentransport. Glutamin spielt bei der Stickstoffassimilation im Glutamin-Synthetase (GS)/Glutamin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase (GOGAT)-Zyklus eine wichtige Rolle.

Die beteiligten Enzyme können über Thioredoxine posttranslational redox-reguliert werden (Choi *et al.*, 1999; Motohashi *et al.*, 2001; Geigenberger *et al.*, 2005). Des Weiteren verwendet Fd-GOGAT, die vorherrschende Isoform in grünen Geweben, Ferredoxin als Elektronendonator und steht damit in direkter Verbindung mit dem PET. Um jedoch für einzelne Aminosäuren den Regulationsmechanismus während der Lichtqualitätsakklimation zu verstehen, sind detailliertere Untersuchungen nötig, die jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

Bisher wurden die Auswirkungen einer veränderten Lichtqualität auf den Stoffwechsel über den Vergleich von Metabolitprofilen untersucht. Für den Vergleich aller Metabolite untereinander wurde anschließend hierarchisches Clustern durchgeführt. Die Ähnlichkeiten der Metabolite hinsichtlich ihrer Regulation über alle untersuchten Lichtsysteme wurde dabei in einem Kladogramm veranschaulicht (Abb. 3.12). Diese Analyse zeigt, dass fast alle untersuchten Zucker und Zuckeralkohole ähnlich auf die verschiedenen Lichtbedingungen reagieren, sich aber deutlich von anderen Metaboliten unterscheiden. Sie treten im Weißlicht in deutlich verringerten Mengen auf und werden durch die verschiedenen Lichtqualitäten (PSI, PSII-Licht) nur gering beeinflusst. Eine weitere Gruppe ähnlich regulierter Metabolite umfasst v.a. zentrale organische Säuren und ist durch deutliche Unterschiede zwischen PSI- und PSII-Licht charakterisiert. Des Weiteren wurde Koregulation für einige Aminosäuren beobachtet.

Die ähnliche Regulation von Zuckerverbindungen, zentralen organischen Säuren bzw. einiger Aminosäuren d.h. von Metaboliten einer Substanzklasse könnte die gemeinsame Regulation eng verknüpfter Stoffwechselwege (z.B. innerhalb des Kohlenhydratstoffwechsels) bei verschiedenen Lichtbedingungen widerspiegeln. Des Weiteren deuten die beobachteten Regulationsmuster darauf hin, dass verschiedene Lichtbedingungen (PSI-Licht, PSII-Licht, WL) unter gemeinsamer Berücksichtigung von Zuckerverbindungen, Aminosäuren und org. Säuren metabolisch unterschieden werden können.

Diese Annahme wurde mittels einer Hauptkomponentenanalyse (PCA, Abschnitt 3.2.3) überprüft. Es wurde untersucht, wie sich Pflanzen aus allen Lichtsystemen generell zueinander bezüglich ihres Metabolismus verhalten (Abb. 3.14). Dabei wurden nicht einzelne Metabolite, sondern das gesamte Metabolitprofil, welches ca. 60 verschiedene Metabolite umfasst, berücksichtigt.

Der Vergleich aller Metabolitprofile zeigte zuerst, dass die biologische Variabilität der Pflanzen innerhalb einer Lichtbedingung (sechs Replikate pro Lichtsystem) gering ist. Des Weiteren unterscheiden sich Weißlichtpflanzen hinsichtlich ihres Metabolismus deutlich von allen anderen Lichtqualitäten. Das ist wahrscheinlich auf die spektrale Zusammensetzung des Lichtes und den darin enthaltenen Blaulichtanteil zurückzuführen, der bei PSI- und PSII-Licht fehlt.

Weiterhin wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Metabolitprofilen von PSI- und PSII-Licht akklimatisierten Pflanzen festgestellt. Die Veränderungen des Stärkegehaltes und des NADPH/NADP-Verhältnisses gaben bereits Hinweise darauf, dass sich PSI- und unter PSII-Licht akklimatisierte Pflanzen in verschiedenen metabolischen Zuständen befinden. Das konnte nun mit den Daten des *Metabolic Profiling* zusätzlich bestätigt werden.

Metabolitprofile von Pflanzen unter PSI-Licht und nach einem Lichtwechsel von PSII- nach PSI-Licht, also PSI-Licht akklimatisierte Pflanzen, weisen große Ähnlichkeiten auf und unterscheiden sich deutlich von allen anderen Metabolitprofilen. Sie befinden sich im gleichen metabolischen Zustand, der im Folgenden als „metabolischer Zustand 1“ bezeichnet werden soll. Ebenso sind PSII-akklimatisierte Pflanzen (PSII; PSI-II) in ihren Metabolitprofilen sehr ähnlich. Sie befinden sich damit ebenfalls im gleichen metabolischen Zustand, dem „metabolischen Zustand 2“.

Anhand der Lichtwechselvarianten konnte damit gezeigt werden, dass die Anpassung des Primärmetabolismus an „Zustand 1“ bzw. „Zustand 2“ reversibel in Abhängigkeit von der Lichtqualität erfolgen kann, was wiederum ein Charakteristikum für eine Akklimation ist.

Katharina Bräutigam

4.3 Untersuchung ausgewählter PRGs anhand von Mutanten

Bisher ist nur eine Mutante bekannt, die keine LTR durchführen kann und deren Wachstum und Photosynthese unter Standardbedingungen nicht beeinträchtigt ist. Bei dieser Mutante ist sowohl die LTR als auch die *state transition* durch einen Defekt der plastidären Kinase STN7 ausgeschaltet (Bellafiore *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2005). Diese Kinase wird für die Phosphorylierung des Antennenkomplexes LHCI benötigt. Aufgrund ihrer Funktion und Lokalisation steht die Kinase STN7 vermutlich am Beginn der Signaltransduktion photosynthetischer Redoxsignale vom Chloroplast in den Zellkern während der LTR. Die Signaltransduktion selbst und die daran beteiligten Komponenten sind bisher unbekannt.

Endglieder der Signalkette könnten die mittels *Transcript Profiling* identifizierten PRGs darstellen (Tab. 3.2), da es sich bei diesen Genen um primäre *Targets* photosynthetischer Redoxsignale handelt. Wird für das Produkt eines PRGs gezeigt, dass dieses für die LTR erforderlich ist, so kann dieses PRG bei späteren Analysen als Marker für die LTR und als Werkzeug für die Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen verwendet werden.

Zum Studium von Signalwegen hat sich die Verwendung von Markergenen bzw. deren Promotoren bewährt. So wurden bspw. die Promotoren der Gene für 2-Cystein Peroxiredoxin A (2-CPA) und LHCB1.2 fusioniert mit einem Reporter gen verwendet, um die Übertragung von Signalen aus Plastidengenexpression und -entwicklung oder von Signalen ausgehend von stromalen Redoxkomponenten zu untersuchen (Susek *et al.*, 1993; Heiber *et al.*, 2007). Dabei wurden *gun* (*genomes uncoupled*)- bzw. *rimb* (*redox imbalanced*)-Mutanten identifiziert, bei denen die jeweiligen Signalwege betroffen waren.

In dieser Arbeit wurden für zwanzig ausgewählte PRGs homozygote T-DNA-Mutanten isoliert und auf eine Beeinträchtigung der LTR mittels zweier Parameter, dem Chlorophyllfluoreszenz-Parameter Fs/Fm und dem Chlorophyll a/b-Verhältnis, untersucht. Mit LTR 13-2 und LTR 17-2, wurden zwei Mutanten identifiziert, bei denen die LTR im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt war (s. 3.3.2 und 3.3.3). Bei beiden Mutantenlinien war die LTR, im Gegensatz zur *stn7*-Mutante, nicht komplett ausgeschaltet, verlief aber deutlich abgeschwächt. Die betroffenen Gene kodieren interessanter Weise für ein Photosynthese-assoziiertes Protein sowie für ein Protein bisher unbekannter Funktion (Abb. 3.20).

Bei Linie LTR 17-2 ist das Gen At1g03600 betroffen, welches für eine kleine, im Lumen des Chloroplasten lokalisierte Untereinheit von PSII (*psb27*) kodiert (Abb. 3.20A). *Psb27* wurde erstmalig bei dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 identifiziert und später bei *Arabidopsis* untersucht (Ikeuchi *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2006). Nach bisherigen Untersuchungen hat *Psb27* keinen Einfluss auf die Effizienz der Photosynthese und die

Biogenese von PSII, unterstützt aber die Reparatur von PSII nach Photoinhibition (Chen *et al.*, 2006). Da die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente im Schwachlicht stattfanden, spielt die Reparatur von Starklichtschäden vermutlich eine untergeordnete Rolle. Die hier durchgeführten Untersuchungen deuten somit auf eine weitere Funktion von Psb27 hin. Damit wurde ein Photosynthesegen als mögliches primäres Zielgen photosynthetischer Redoxsignale und die dazugehörige Mutante als LTR-Mutante identifiziert, was die enge Verknüpfung von Photosynthese und der Regulation der LTR verdeutlicht.

Bei der zweiten LTR-Mutante, LTR 13-2, betraf die T-DNA-Insertion das Gen At4g39690, das für ein mitochondriales Protein unbekannter Funktion kodiert (Abb. 3.20B). Die Identifikation eines mitochondrialen Proteins als mögliche, an der LTR beteiligte Komponente, ist nicht ungewöhnlich, da eine effiziente Photosynthese von der genauen Abstimmung der Prozesse in Chloroplasten, Mitochondrien und Zellkern abhängt (Pesaresi *et al.*, 2006). Bei Untersuchungen zur Lichtakklimation der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurde bspw. die Mutante *stm6* isoliert, die keine *state transition* mehr durchführen kann (Schönfeld *et al.*, 2004). Bei dieser Mutante ist ein Gen betroffen, das für ein mitochondriales Protein, den Transkriptionsterminationsfaktor MOC1, kodiert.

Bei der Untersuchung zwanzig ausgewählter PRGs anhand von homozygoten T-DNA-Insertionslinien wurden zwei Kandidaten für LTR Mutanten identifiziert. Diese können in weiterführenden Studien molekular charakterisiert und ggf. als Markergene für die LTR eingesetzt werden.

4.4 Redoxkontrolle der photosynthetischen Lichtakklimation

In der hier vorgestellten Arbeit wurde gezeigt, dass im Verlauf der LTR eine umfassende Regulation der Kerngenexpression erfolgt (siehe 3.1). Weiterhin wurden umfangreiche Veränderungen des Metabolismus während der LTR nachgewiesen (siehe 3.2). Eine reversible Anpassung an die jeweilige Lichtqualität wurde bspw. für den Gehalt an Stärke, Glutamin, Pyruvat oder Shikimat beobachtet. Die parallele Analyse verschiedener polarer Metabolite (organische Säuren, Aminosäuren, Zuckerverbindungen) zeigte schließlich, dass der Stoffwechsel generell unter PSI- und PSII-Licht verschiedene Zustände annimmt und die Umstellung zwischen dem „metabolischen Zustand 1“ (PSI-Licht) und „metabolischen Zustand 2“ (PSII-Licht) in Abhängigkeit von der Lichtqualität reversibel erfolgt (Abb. 3.14).

Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass sich der Redoxzustand von Plastochinon je nach Lichtqualität verändert und dass bei der LTR Redoxsignale aus dem Plastochinonpool eine entscheidende Rolle spielen (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Pfannschmidt *et al.*, 2001; Sherameti *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch der Redoxstatus von NADP in Abhängigkeit von der Lichtqualität Veränderungen unterliegt (Abb. 3.9 und 3.10). Das NADPH/NADP-Verhältnis steht im engen Zusammenhang mit dem Redoxzustand von Thioredoxinen, redox-aktiven Komponenten, die Enzymaktivitäten über die Reduktion von intramolekularen Disulfidbrücken regulieren können.

Ausgehend von diesen Daten wird hier ein Modell vorgeschlagen, dass die LTR über Signale aus zwei verschiedenen Redoxsystemen, dem Plastochinonpool und dem NADP/Thioredoxin-System, erklärt. Die Annahme, dass das Zusammenspiel zweier verschiedener Redoxsignale erheblich ist, ermöglicht es darüber hinaus, die LTR in Beziehung zu anderen Lichtakklimationsreaktionen zu stellen. Existierende Modelle zur photosynthetischen Redoxkontrolle (Pfannschmidt *et al.*, 2001b) werden erweitert und ein neues hierarchisch strukturiertes Modell entwickelt. Dabei werden photosynthetische Akklimationsreaktionen durch zwei kooperierende Redoxsignale (aus dem PQ-Pool und dem NADP/Trx-System) erklärt und die Auswirkungen sowohl auf die Genexpression als auch auf den Stoffwechsel berücksichtigt (Abb. 4.1).

Für das Modell wurde angenommen, dass Veränderungen in der Umwelt spezifische Kombinationen der Redoxgleichgewichte des PQ-Pools und des NADP-Systems erzeugen. Die vier möglichen Kombinationen können wie folgt beschrieben werden:

- 1) PQ- und NADP-Pool sind vorwiegend oxidiert, was bei Dunkelheit der Fall ist.
- 2) Während der PQ-Pool überwiegend oxidiert ist, liegt NADP vorwiegend reduziert vor.

Diese Situation tritt unter PSI-Licht auf.

- 3) Der PQ-Pool ist vorwiegend reduziert, während NADP stärker oxidiert ist, was unter PSII-Licht zu beobachten ist.
- 4) Beide Redoxsysteme (PQ, NADP) sind überwiegend reduziert, was im Weißlicht bei höheren Lichtintensitäten der Fall ist.

Diese vier Redoxzustände stellen vier verschiedene Eingangssignale für das Regulationsnetzwerk der Zelle dar und lösen verschiedene Akklimationsantworten aus. Redoxkontrollierte Änderungen von Enzymaktivitäten und der Genexpression werden integriert; die Pflanzen nehmen je nach Lichtbedingung verschiedene metabolische Zustände an (Abb. 4.1).

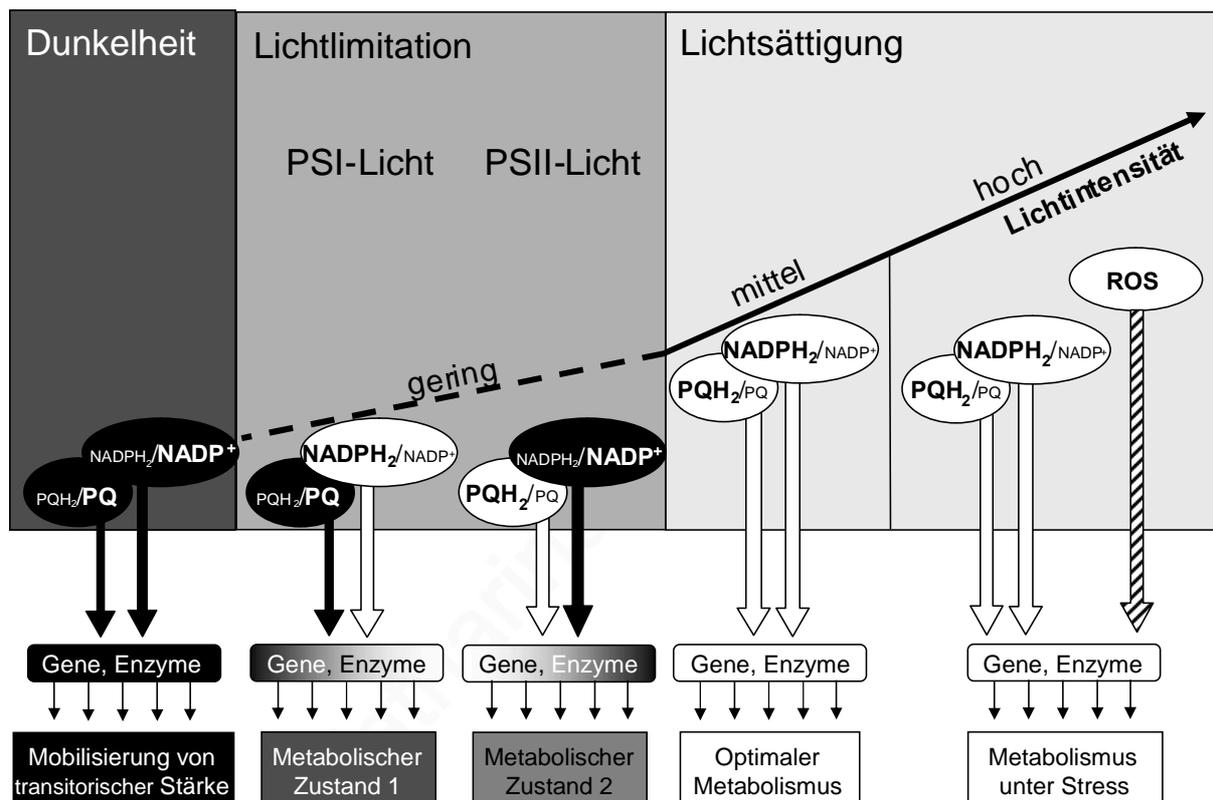


Abb. 4.1: Übergreifendes Modell zur Redoxkontrolle der photosynthetischen Akklimation

Verschiedene Lichtbedingungen der Umwelt (Dunkelheit, PSI-Licht, PSII-Licht, Weißlicht mit ansteigender Lichtintensität) erzeugen spezifische Redoxgleichgewichte im PQ-Pool und im NADP-System. Ein vorwiegend oxidiertes Pool ist durch ein schwarzes Oval, ein überwiegend reduzierter Pool durch ein weißes Oval gekennzeichnet, wobei die Beschriftung des vorherrschenden Redoxzustandes **fett** hervorgehoben ist. Die Kombinationen der Redoxgleichgewichte (siehe Text; Kombinationen aus weißen und schwarzen Pfeilen) stellen verschiedene Eingangssignale für das Regulationsnetzwerk der Zelle dar, welches wiederum Genexpression und Enzymaktivitäten (mit „Gene, Enzyme“ beschriftete Boxen) auf die vorherrschende Lichtbedingung abstimmt. Die Eingangssignale werden integriert und schließlich eine Akklimationsreaktion ausgelöst, die dazu führt, dass die Pflanzen je nach Lichtbedingung verschiedene metabolische Zustände annehmen. ROS, die vermutlich als zusätzliche Signale unter Starklichtbedingungen fungieren, sind ebenfalls berücksichtigt (schraffierter Pfeil).

Bei Redoxzustand 1 wird das Fehlen von Licht signalisiert und gespeicherte Energie (Stärke) mobilisiert. Redoxzustand 2 signalisiert eine Limitierung von Photosystem II und führt vermutlich dazu, dass die Enzyme des Calvinzyklus aktiviert sind, um so viel wie möglich an CO₂ zu fixieren. Es findet vermutlich verstärkt zyklischer Elektronentransport statt, um ATP

zu synthetisieren. Durch den Redoxzustand 3 wird dagegen eine Limitierung an Photosystem I signalisiert und unter diesen Bedingungen v.a. der lineare Elektronentransport gefördert. Redoxzustand 4 spiegelt schließlich optimale Bedingungen für eine effiziente Photosynthese wider. Während die Redoxzustände 1-3 für Bedingungen angenommen werden, bei denen Lichtenergie limitiert ist, d.h. hauptsächlich unter Schwachlichtbedingungen, finden bei Redoxzustand 4 alle Prozesse der Lichtreaktion unter Lichtsättigung statt. Bei einem weiteren Anstieg der Lichtintensität können verstärkt ROS gebildet und damit ROS-vermittelte Antworten ausgelöst werden, die bei Starklicht oder anderen biotischen oder abiotischen Stressbedingungen eine Rolle spielen.

Da das Modell je nach Lichtbedingung verschiedene metabolische Zustände vorschlägt, sollten physiologische Bedingungen existieren, unter denen sich diese Zustände bemerkbar machen und das Wachstum und die Fitness der Pflanzen beeinflussen. Um das zu überprüfen, wurden Wildtyppflanzen und die LTR-Mutante *stn7* unter PSI- und PSII-Licht angezogen. Dabei wurde die Länge der Dunkelperiode im Tag-Nacht-Rhythmus schrittweise erhöht. In der Dunkelphase ist die Pflanze dann auf ihre Reservestoffe (Stärke), die in der Lichtphase synthetisiert werden, angewiesen. Im Dauerlicht und unter Langtagbedingungen wurden keine Fitnessunterschiede beobachtet (Wagner *et al.*, 2007; Bräutigam, unveröffentlicht).

Dagegen traten unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht / 16 h Dunkel) deutliche Wachstumsunterschiede auf (Abb. 3.15). Pflanzen unter PSI-Licht waren kleiner als PSII-Licht-Pflanzen. Das war sowohl beim Wildtyp als auch bei der *stn7* Mutante der Fall und deutet auf Energielimitation unter PSI-Licht hin. Die beobachteten Wachstumsunterschiede bestätigen somit die oben getroffene Annahme und unterstützen das vorgeschlagene Modell. Die *stn7* Mutante zeigt unter beiden Lichtqualitäten (PSI- und PSII-Licht) ein deutlich geringeres Wachstum als der Wildtyp, was vermutlich den Anteil des PQ-Pools an der Lichtakklimation widerspiegelt, da diese Mutante keine LTR durchführen kann und die Übertragung von Signalen aus dem PET vermutlich beeinträchtigt ist (Bellafiore *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2005).

Das hier vorgestellte Modell integriert Ergebnisse verschiedener Studien, die photosynthetische Akklimationsreaktionen bei unterschiedlichen Spezies untersuchten und vereint eine Reihe von scheinbar widersprüchlichen Beobachtungen: Untersuchungen, die zeigen, dass der Redoxzustand von PQ bei der Regulation der Genexpression eine entscheidende Rolle spielt, sind in Übereinstimmung mit dem Modell (Escoubas *et al.*, 1995; Pfannschmidt *et al.*, 1999; Pfannschmidt *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Sherameti *et al.*, 2002; Fey *et al.*, 2005). Experimente, die dagegen auf eine Beteiligung von stromalen Elektronenakzeptoren am PSI (z.B. Trx/NADP-System) an der Regulation der Genexpression schließen lassen, können ebenfalls durch das Modell erklärt werden (Pursiheimo *et al.*, 2001;

Baier *et al.*, 2004). Das Modell stellt darüber hinaus die *in vitro* beobachtete kombinierte Redox-Regulation der LHCII-Kinase durch Trx und PQ in einen physiologischen Zusammenhang. Redoxzustand 2 (s.o.) aktiviert die Kinase, während sie durch Redoxzustand 3 inaktiviert wird. Durch reduziertes Thioredoxin (Wechsel von Schwach- in Starklicht) wird die Kinase auch bei reduziertem PQ-Pool inaktiviert (Redoxzustand 4).

Das hier entwickelte neue Modell erweitert diese bisher bekannten photosynthetischen Regulationsmechanismen. Redoxsignale werden im Regulationsnetzwerk der Zelle integriert, beeinflussen neben der Genexpression auch Enzymaktivitäten und regulieren damit zelluläre Aktivitäten der Pflanze. Das Modell der Lichtakklimation umfasst somit zusätzlich zur Regulation der Genexpression auch eine Redoxkontrolle des Metabolismus. Die LTR wird durch eine Kombination aus Anpassung der Photosystemstöchiometrie und des Stoffwechsels erklärt. Für die Grünalge *Chlamydomonas* ist bekannt, dass *state transitions* einen Mechanismus darstellen, um zwischen zwei extremen metabolischen Zuständen umzuschalten: der ATP-Erzeugung mittels zyklischen Elektronentransportes und dem linearen Elektronentransport zur Bildung von ATP und NADPH (Wollman 2001). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch höhere Pflanzen verschiedene metabolische Zustände annehmen können. Der Übergang zwischen den metabolischen Zuständen, die vermutlich auch Veränderungen im Energiestoffwechsel widerspiegeln, erfordert dabei komplexere Regulationsmechanismen als ein An- bzw. Abschalten durch einen Licht-Dunkel-Übergang.

Die hier betrachteten Kontrollmechanismen zur Feinanpassung der Photosynthese sind v.a. im Schwachlicht von Bedeutung. Diese Mechanismen sind essenziell für die Energieausbeute und damit auch für das Wachstum von Pflanzen und sind in dichten Pflanzenbeständen wie bspw. in Wäldern oder Kulturen landwirtschaftlicher Nutzpflanzen von großer Bedeutung.

5 Bibliographie

- Abdallah, F., F. Salamini and D. Leister (2000). "A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis." *Trends Plant Sci* **5**(4): 141-2.
- Acevedo-Hernandez, G. J., P. Leon and L. R. Herrera-Estrella (2005). "Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4." *Plant J* **43**(4): 506-19.
- Adamska, I. (1995). "Regulation of Early Light-Inducible Protein Gene Expression by Blue and Red Light in Etiolated Seedlings Involves Nuclear and Plastid Factors." *Plant Physiol* **107**(4): 1167-1175.
- Allen, J. F. (1992). "Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis." *Biochim Biophys Acta* **1098**(3): 275-335.
- Allen, J. F. and T. Pfannschmidt (2000). "Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1402): 1351-9.
- Alonso, J. M., A. N. Stepanova, T. J. Lisse, C. J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C. C. Meyers, H. Parker, L. Prednis, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D. E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W. L. Crosby, C. C. Berry and J. R. Ecker (2003). "Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana." *Science* **301**(5633): 653-7.
- Aluru, M. R., F. Yu, A. Fu and S. Rodermeil (2006). "Arabidopsis variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis." *J Exp Bot* **57**(9): 1871-81.
- Ankele, E., P. Kindgren, E. Pesquet and A. Strand (2007). "In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast." *Plant Cell* **19**(6): 1964-79.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-99.
- Argüello-Astorga, G. and L. Herrera-Estrella (1998). "Evolution of Light-Regulated Plant Promoters." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 525-555.
- Aro, E. M. and B. Andersson (2001). *Regulation of Photosynthesis*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Aro, E. M. and I. Ohad (2003). "Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation." *Antioxid Redox Signal* **5**(1): 55-67.
- Asada, K. (1999). "The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601-639.
- Baena-González, E. and E. M. Aro (1999). "Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II." *Planta* **208**: 196-204.
- Baier, M. and K. J. Dietz (2005). "Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology." *J Exp Bot* **56**(416): 1449-62.
- Baier, M., E. Stroher and K. J. Dietz (2004). "The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in Arabidopsis thaliana." *Plant Cell Physiol* **45**(8): 997-1006.
- Bailey, S., R. G. Walters, S. Jansson and P. Horton (2001). "Acclimation of Arabidopsis thaliana to the light environment: the existence of separate low light and high light responses." *Planta* **213**(5): 794-801.
- Ball, L., G. P. Accotto, U. Bechtold, G. Creissen, D. Funck, A. Jimenez, B. Kular, N. Leyland, J. Mejia-Carranza, H. Reynolds, S. Karpinski and P. M. Mullineaux (2004). "Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis." *Plant Cell* **16**(9): 2448-62.
- Bellaïf, S., F. Barneche, G. Peltier and J. D. Rochaix (2005). "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7." *Nature* **433**(7028): 892-5.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing." *J R Stat Soc Ser B* **57**: 289-300.
- Biehl, A., E. Richly, C. Noutsos, F. Salamini and D. Leister (2005). "Analysis of 101 nuclear transcriptomes reveals 23 distinct regulons and their relationship to metabolism, chromosomal gene distribution and co-ordination of nuclear and plastid gene expression." *Gene* **344**: 33-41.
- Blankenship, R. E. (2002). *Molecular mechanisms of photosynthesis*. Oxford, Blackwell Science Ltd.
- Bolle, C., V. V. Kusnetsov, R. G. Herrmann and R. Oelmüller (1996). "The spinach AtpC and AtpD genes contain elements for light-regulated, plastid-dependent and organ-specific expression in the vicinity of the transcription start sites." *Plant J* **9**(1): 21-30.
- Bonardi, V., P. Pesaresi, T. Becker, E. Schleiff, R. Wagner, T. Pfannschmidt, P. Jahns and D. Leister (2005). "Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases." *Nature* **437**(7062): 1179-82.
- Bonaventura, C. and J. Myers (1969). "Fluorescence and oxygen evolution from Chlorella pyrenoidosa." *Biochim Biophys Acta* **189**(3): 366-83.
- Bosco, C. D., L. Lezhneva, A. Biehl, D. Leister, H. Strotmann, G. Wanner and J. Meurer (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**(2): 1060-9.
- Bradbeer, J. W., Y. E. Atkinson, T. Börner and R. Hagemann (1979). "Cytoplasmic synthesis of plastid polypeptides may be controlled by plastid-synthesized RNA." *Nature* **279**: 816-817.
- Bräutigam, K., L. Dietzel and T. Pfannschmidt (2007). "Plastid-nucleus communication: Anterograde and retrograde signalling in the development and function of plastids." *Topics in Current Genetics* ("Cell and molecular biology of plastids"): 409-455.
- Bréhélin, C., F. Kessler and K. J. van Wijk (2007). "Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids." *Trends Plant Sci* **12**(6): 260-6.
- Browse, J., P. J. McCourt and C. R. Somerville (1986). "Fatty acid composition of leaf lipids determined after combined digestion and fatty acid methyl ester formation from fresh tissue." *Anal Biochem* **152**(1): 141-5.

- Buchanan, B. B. (1991). "Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development." *Arch Biochem Biophys* **288**(1): 1-9.
- Buchanan, B. B. and S. Luan (2005). "Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research." *J Exp Bot* **56**(416): 1439-47.
- Buchanan, B. B., P. Schurmann, R. A. Wolosiuk and J. P. Jacquot (2002). "The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond." *Photosynth Res* **73**(1-3): 215-22.
- Carlberg, I., M. Hansson, T. Kieselbach, W. P. Schroder, B. Andersson and A. V. Vener (2003). "A novel plant protein undergoing light-induced phosphorylation and release from the photosynthetic thylakoid membranes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 757-62.
- Carrari, F., N. Schauer, L. Willmitzer and A. R. Fernie (2006). *Systems Biology: A Renaissance of the Top-down Approach for Plant Analysis*. Plant Metabolomics. K. Saito, D. A. Dixon and L. Willmitzer. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Chen, H., D. Zhang, J. Guo, H. Wu, M. Jin, Q. Lu, C. Lu and L. Zhang (2006). "A Psb27 homologue in *Arabidopsis thaliana* is required for efficient repair of photodamaged photosystem II." *Plant Mol Biol* **61**(4-5): 567-75.
- Chen, Y. B., D. G. Durnford, M. Koblizek and P. G. Falkowski (2004). "Plastid regulation of Lhcb1 transcription in the chlorophyte alga *Dunaliella tertiolecta*." *Plant Physiol* **136**(3): 3737-50.
- Choi, Y. A., S. G. Kim and Y. M. Kwon (1999). "The plastidic glutamine synthetase activity is directly modulated by means of redox change at two unique cysteine residues." *Plant Science* **149**(2): 175-182.
- Choquet, Y. and F. A. Wollman (2002). "Translational regulations as specific traits of chloroplast gene expression." *FEBS Lett* **529**(1): 39-42.
- Chow, W. S., A. Melis and J. M. Anderson (1990). "Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(19): 7502-6.
- Claros, M. G. and P. Vincens (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences." *Eur J Biochem* **241**(3): 779-86.
- Danon, A., O. Miersch, G. Felix, R. G. Camp and K. Apel (2005). "Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **41**(1): 68-80.
- Davletova, S., L. Rizhsky, H. Liang, Z. Shengqiang, D. J. Oliver, J. Coutu, V. Shulaev, K. Schlauch and R. Mittler (2005). "Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*." *Plant Cell* **17**(1): 268-81.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983). "A plant DNA minipreparation: Version II." *Plant Molecular Biology Reporter* **1**: 19-21.
- Delosme, R., J. Olive and F. A. Wollman (1996). "Changes in light energy distribution upon state transitions: An in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* **1273**(2): 150-158.
- Deng, X. W., J. C. Tonkyn, G. F. Peter, J. P. Thornber and W. Grissem (1989). "Post-transcriptional control of plastid mRNA accumulation during adaptation of chloroplasts to different light quality environments." *Plant Cell* **1**(6): 645-54.
- Desikan, R., A. H.-M. S, J. T. Hancock and S. J. Neill (2001). "Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress." *Plant Physiol* **127**(1): 159-72.
- D'Haeseleer, P., S. Liang and R. Somogyi (2000). "Genetic network inference: from co-expression clustering to reverse engineering." *Bioinformatics* **16**(8): 707-26.
- Dietz, K. J. (2003b). "Plant peroxiredoxins." *Annu Rev Plant Biol* **54**: 93-107.
- Dietz, K. J. (2003). "Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells." *Int Rev Cytol* **228**: 141-93.
- Dietz, K. J. and U. Heber (1986). "Light and CO₂ limitation of photosynthesis and states of the reactions regenerating ribulose 1,5-bisphosphate or reducing 3-phosphoglycerate." *Biochim Biophys Acta* **848**: 392-401.
- Dietz, K. J. and U. Heber (1989). *Assimilatory force and regulation of photosynthetic carbon reduction in leaves. Techniques and new developments in photosynthesis*. J. Barber. New York, Plenum Press: 341-363.
- Dörmann, P., I. Balbo and C. Benning (1999). "Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1." *Science* **284**(5423): 2181-4.
- Douglas, A. E. and J. A. Raven (2003). "Genomes at the interface between bacteria and organelles." *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **358**: 5-18.
- Douglas, S. E. (1998). "Plastid evolution: origins, diversity, trends." *Curr Opin Genet Dev* **8**(6): 655-61.
- Durnford, D. G. and F. P. G. (1997). "Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation." *Photosynthesis Research* **53**: 229-241.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak and G. von Heijne (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." *J Mol Biol* **300**(4): 1005-16.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen and G. von Heijne (1999). "ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites." *Protein Sci* **8**(5): 978-84.
- Escoubas, J. M., M. Lomas, J. LaRoche and P. G. Falkowski (1995). "Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22): 10237-41.
- Feussner, I. and C. Wasternack (2002). "The lipoxygenase pathway." *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-97.
- Fey, V., R. Wagner, K. Bräutigam and T. Pfannschmidt (2005b). "Photosynthetic redox control of nuclear gene expression." *J Exp Bot* **56**(416): 1491-8.
- Fey, V., R. Wagner, K. Bräutigam, M. Wirtz, R. Hell, A. Dietzmann, D. Leister, R. Oelmüller and T. Pfannschmidt (2005). "Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* **280**(7): 5318-28.
- Förster, T. (1946). "Energiewanderung und Fluoreszenz." *Naturwissenschaften* **33**: 166-175.
- Fujita, Y. (1997). "A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishments and problems for future studies." *Photosynth Res* **53**: 83-93.

- Fujiwara, M., A. Nagashima, K. Kanamaru, K. Tanaka and H. Takahashi (2000). "Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*." *FEBS Lett* **481**(1): 47-52.
- Geigenberger, P., A. Kolbe and A. Tiessen (2005). "Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars." *J Exp Bot* **56**(416): 1469-79.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang and J. Zhang (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." *Genome Biol* **5**(10): R80.
- Goda, H., S. Sawa, T. Asami, S. Fujioka, Y. Shimada and S. Yoshida (2004). "Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*." *Plant Physiol* **134**(4): 1555-73.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998). "Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells." *Int Rev Cytol* **177**: 115-80.
- Gray, J. C., R. Sornarajah, A. A. Zabron, C. M. Duckett and M. S. Khan (1995). Chloroplast control of nuclear gene expression. *Photosynthesis, from light to biosphere*. P. Mathis. Dordrecht, Kluwer. **3**: 543-550.
- Gray, J. C., J. A. Sullivan, J. H. Wang, C. A. Jerome and D. MacLean (2003). "Coordination of plastid and nuclear gene expression." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1429): 135-44; discussion 144-5.
- Groden, D. and E. Beck (1979). "H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts." *Biochim Biophys Acta* **546**(3): 426-35.
- Heiber, I., E. Stroher, B. Raatz, I. Busse, U. Kahmann, M. W. Bevan, K. J. Dietz and M. Baier (2007). "The redox imbalanced mutants of *Arabidopsis* differentiate signaling pathways for redox regulation of chloroplast antioxidant enzymes." *Plant Physiol* **143**(4): 1774-88.
- Hess, W. R., A. Muller, F. Nagy and T. Börner (1994). "Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal." *Mol Gen Genet* **242**(3): 305-12.
- Hess, W. R., R. Schendel, T. Börner and W. Rüdiger (1991). "Reduction of mRNA levels for two nuclear encoded light regulated genes in the barley mutant *albostrians* is not correlated with phytochrome content and activity." *J Plant Physiol* **138**(292-298).
- Howe, C. J., A. C. Barbrook, V. L. Koumandou, R. E. Nisbet, H. A. Symington and T. F. Wightman (2003). "Evolution of the chloroplast genome." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1429): 99-106; discussion 106-7.
- Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, E. De Castro, P. S. Langendijk-Genevaux, M. Pagni and C. J. Sigrist (2006). "The PROSITE database." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D227-30.
- Ideker, T., T. Galitski and L. Hood (2001). "A new approach to decoding life: systems biology." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 343-72.
- Ikeuchi, M., Y. Inoue and W. F. J. Vermaas (1995). "Characterization of photosystem II subunits from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." Mathis P. (ed) *Photosynthesis: from light to biosphere*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands: 297-300.
- Ivanov, A. G., L. Hendrickson, M. Krol, E. Selstam, G. Oquist, V. Hurry and N. P. Huner (2006). "Digalactosyl-diacylglycerol deficiency impairs the capacity for photosynthetic intersystem electron transport and state transitions in *Arabidopsis thaliana* due to photosystem I acceptor-side limitations." *Plant Cell Physiol* **47**(8): 1146-57.
- Ivetic, A. and A. J. Ridley (2004). "Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes." *Immunology* **112**(2): 165-76.
- Johanningmeier, U. and S. H. Howell (1984). "Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein mRNA accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Possible involvement of chlorophyll synthesis precursors." *J Biol Chem* **259**(21): 13541-9.
- Johnson, G. N. (2005). "Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact?" *J Exp Bot* **56**(411): 407-16.
- Kaiser, W. and W. Urbach (1977). "The effect of dihydroxyacetone phosphate and 3-phosphoglycerate on O₂ evolution and on the levels of ATP, ADP and Pi in isolated intact chloroplasts." *Biochim Biophys Acta* **459**(3): 337-46.
- Karpinski, S., C. Escobar, B. Karpinska, G. Creissen and P. M. Mullineaux (1997). "Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress." *Plant Cell* **9**(4): 627-40.
- Karpinski, S., H. Reynolds, B. Karpinska, G. Wingsle, G. Creissen and P. Mullineaux (1999). "Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*." *Science* **284**(5414): 654-7.
- Kim, J. H., R. E. Glick and A. Melis (1993). "Dynamics of Photosystem Stoichiometry Adjustment by Light Quality in Chloroplasts." *Plant Physiol* **102**(1): 181-190.
- Kitano, H. (2000). "Perspectives on systems biology." *New Generation Computing* **18**(3): 199-216.
- Kitano, H. (2001). *Systems Biology: Toward System-level Understanding of Biological Systems*. *Foundations of Systems Biology*. H. Kitano. Cambridge/MA, MIT Press: 1-29.
- Kittsteiner, U., H. Brunner and W. Rüdiger (1991). "The greening process in cress seedlings. II. Complexing agents and 5-aminolevulinic acid inhibit accumulation of cab-mRNA coding for the light-harvesting chlorophyll a/b protein." *Physiol Plant* **81**: 190-196.
- Kleffmann, T., D. Russenberger, A. von Zychlinski, W. Christopher, K. Sjolander, W. Grussem and S. Baginsky (2004). "The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions." *Curr Biol* **14**(5): 354-62.
- Kolbe, A., S. N. Oliver, A. R. Fernie, M. Stitt, J. T. van Dongen and P. Geigenberger (2006). "Combined transcript and metabolite profiling of *Arabidopsis* leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism." *Plant Physiol* **141**(2): 412-22.
- Kolbe, A., A. Tiessen, H. Schlupepmann, M. Paul, S. Ulrich and P. Geigenberger (2005). "Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11118-23.

- Kopka, J., N. Schauer, S. Krueger, C. Birkemeyer, B. Usadel, E. Bergmüller, P. Dormann, W. Weckwerth, Y. Gibon, M. Stitt, L. Willmitzer, A. R. Fernie and D. Steinhauser (2005). "GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database." *Bioinformatics* **21**(8): 1635-8.
- Koussevitzky, S., A. Nott, T. C. Mockler, F. Hong, G. Satchetto-Martins, M. Surpin, J. Lim, R. Mittler and J. Chory (2007). "Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression." *Science* **316**(5825): 715-9.
- Kovtun, Y., W. L. Chiu, G. Tena and J. Sheen (2000). "Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2940-5.
- Kretsch, T. (2005). "AtGenExpress: Light treatments: Red and Far-red." <http://affymetrix.arabidopsis.info>: Experiment ID=124.
- Kropat, J., U. Oster, W. Rudiger and C. F. Beck (1997). "Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 14168-72.
- Kubis, S., R. Patel, J. Combe, J. Bedard, S. Kovacheva, K. Lilley, A. Biehl, D. Leister, G. Rios, C. Koncz and P. Jarvis (2004). "Functional specialization amongst the Arabidopsis Toc159 family of chloroplast protein import receptors." *Plant Cell* **16**(8): 2059-77.
- Kuno, N., T. Muramatsu, F. Hamazato and M. Furuya (2000). "Identification by large-scale screening of phytochrome-regulated genes in etiolated seedlings of Arabidopsis using a fluorescent differential display technique." *Plant Physiol* **122**(1): 15-24.
- Kurth, J., C. Varotto, P. Pesaresi, A. Biehl, E. Richly, F. Salamini and D. Leister (2002). "Gene-sequence-tag expression analyses of 1,800 genes related to chloroplast functions." *Planta* **215**(1): 101-9.
- Kusnetsov, V., C. Bolle, T. Lubberstedt, S. Sopory, R. G. Herrmann and R. Oelmüller (1996). "Evidence that the plastid signal and light operate via the same cis-acting elements in the promoters of nuclear genes for plastid proteins." *Mol Gen Genet* **252**(6): 631-9.
- Kusnetsov, V., R. Oelmüller, M. I. Sarwat, S. A. Porfirova, G. N. Cherepneva, R. G. Herrmann and O. N. Kulaeva (1994). "Cytokinins, anisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons without notable effect on steady-state mRNA levels." *Planta* **194**(3): 318-327.
- Laloi, C., N. Rayapuram, Y. Chartier, J. M. Grienenberger, G. Bonnard and Y. Meyer (2001). "Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 14144-9.
- Larkin, R. M., J. M. Alonso, J. R. Ecker and J. Chory (2003). "GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling." *Science* **299**(5608): 902-6.
- Lee, K. O., J. R. Lee, J. Y. Yoo, H. H. Jang, J. C. Moon, B. G. Jung, Y. H. Chi, S. K. Park, S. S. Lee, C. O. Lim, D. J. Yun, M. J. Cho and S. Y. Lee (2002). "GSH-dependent peroxidase activity of the rice (*Oryza sativa*) glutaredoxin, a thioltransferase." *Biochem Biophys Res Commun* **296**(5): 1152-6.
- Lee, S. B., C. Kaittanis, R. K. Jansen, J. B. Hostetler, L. J. Tallon, C. D. Town and H. Daniell (2006). "The complete chloroplast genome sequence of *Gossypium hirsutum*: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms." *BMC Genomics* **7**: 61.
- Leister, D. (2005). "Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in Arabidopsis." *Gene* **354**: 110-6.
- Lemaire, S. D. (2004). "The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms." *Photosynth Res* **79**(3): 305-18.
- Lemaire, S. D., L. Michelet, M. Zaffagnini, V. Massot and E. Issakidis-Bourguet (2007). "Thioredoxins in chloroplasts." *Curr Genet* **51**(6): 343-65.
- Leon, P., A. Arroyo and S. Mackenzie (1998). "Nuclear Control of Plastid and Mitochondrial Development in Higher Plants." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 453-480.
- Lescot, M., P. Dehais, G. Thijs, K. Marchal, Y. Moreau, Y. Van de Peer, P. Rouze and S. Rombauts (2002). "PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences." *Nucleic Acids Res* **30**(1): 325-7.
- Link, G. (2003). "Redox regulation of chloroplast transcription." *Antioxid Redox Signal* **5**(1): 89-94.
- Lisec, J., N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer and A. R. Fernie (2006). "Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants." *Nat Protoc* **1**(1): 387-96.
- Magel, E. (1991). "Qualitative and quantitative determination of starch by a colorimetric method." *Starch/Stärke* **10**: 384-387.
- Martin, W. and R. G. Herrmann (1998). "Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why?" *Plant Physiol* **118**(1): 9-17.
- Martin, W., T. Rujan, E. Richly, A. Hansen, S. Cornelsen, T. Lins, D. Leister, B. Stoebe, M. Hasegawa and D. Penny (2002). "Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19): 12246-51.
- Matys, V., O. V. Kel-Margoulis, E. Fricke, I. Liebich, S. Land, A. Barre-Dirrie, I. Reuter, D. Chekmenev, M. Krull, K. Hornischer, N. Voss, P. Stegmaier, B. Lewicki-Potapov, H. Saxel, A. E. Kel and E. Wingender (2006). "TRANSFAC and its module TRANSCOMP: transcriptional gene regulation in eukaryotes." *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D108-10.
- Maxwell, D. P., D. E. Laudenbach and N. Huner (1995). "Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and cab mRNA Abundance in *Dunaliella salina*." *Plant Physiol* **109**(3): 787-795.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000). "Chlorophyll fluorescence - a practical guide." *J Exp Bot* **51**(345): 659-68.
- Mayfield, S. P. and W. C. Taylor (1984). "Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA." *Eur J Biochem* **144**(1): 79-84.
- Melis, A. (1991). "Dynamics of Photosynthetic Membrane-Composition and Function." *Biochim Biophys Acta* **1058**: 87-106.
- Melis, A. and G. W. Harvey (1981). "Regulation of photosystem stoichiometry, chlorophyll a und chlorophyll b content and relation to chloroplast ultrastructure." *Biochim Biophys Acta* **637**: 138-145.
- Mereschkowski, K. S. (1905). "Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche." *Biol. Centralbl.* **25**: 593-604; 689-691.

- Meskauskiene, R., M. Nater, D. Goslings, F. Kessler, R. op den Camp and K. Apel (2001). "FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12826-31.
- Meyer, Y., F. Vignols and J. P. Reichheld (2002). "Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position." *Methods Enzymol* **347**: 394-402.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Van Breusegem (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends Plant Sci* **9**(10): 490-8.
- Mochizuki, N., J. A. Brusslan, R. Larkin, A. Nagatani and J. Chory (2001). "Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 2053-8.
- Monte, E., J. M. Tepperman, B. Al-Sady, K. A. Kaczorowski, J. M. Alonso, J. R. Ecker, X. Li, Y. Zhang and P. H. Quail (2004). "The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(46): 16091-8.
- Motohashi, K., A. Kondoh, M. T. Stumpp and T. Hisabori (2001). "Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11224-9.
- Mullineaux, P. M. and T. Rausch (2005). "Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression." *Photosynth Res* **86**(3): 459-74.
- Munekage, Y., M. Hashimoto, C. Miyake, K. Tomizawa, T. Endo, M. Tasaka and T. Shikanai (2004). "Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis." *Nature* **429**(6991): 579-82.
- Munne-Bosch, S. and L. Alegre (2002). "Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants." *FEBS Lett* **524**(1-3): 145-8.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture." *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Murata, N. (1969). "Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*." *Biochim Biophys Acta* **172**(2): 242-51.
- Nerlich, A., M. von Orlow, D. Rontein, A. D. Hanson and P. Dörmann (2007). "Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the psd1 psd2 psd3 triple mutant of *Arabidopsis* affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria." *Plant Physiol* **144**(2): 904-14.
- Niyogi, K. K. (2000). "Safety valves for photosynthesis." *Curr Opin Plant Biol* **3**(6): 455-60.
- Noctor, G. and C. H. Foyer (1998). "Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 249-279.
- Oelmüller, R. and H. Mohr (1986). "Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes." *Planta* **167**: 434-439.
- op den Camp, R. G., D. Przybyla, C. Ochsenbein, C. Laloi, C. Kim, A. Danon, D. Wagner, E. Hideg, C. Gobel, I. Feussner, M. Nater and K. Apel (2003). "Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **15**(10): 2320-32.
- Osteryoung, K. W. and J. Nunnari (2003). "The division of endosymbiotic organelles." *Science* **302**(5651): 1698-704.
- Oswald, O., T. Martin, P. J. Dominy and I. A. Graham (2001). "Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 2047-52.
- Papenbrock, J. and B. Grimm (2001). "Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids." *Planta* **213**(5): 667-81.
- Pesaresi, P., S. Masiero, H. Eubel, H. P. Braun, S. Bhushan, E. Glaser, F. Salamini and D. Leister (2006). "Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria." *Plant Cell* **18**(4): 970-91.
- Pfannschmidt, T. (2003). "Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes." *Trends Plant Sci* **8**(1): 33-41.
- Pfannschmidt, T. (2005). "Acclimation to varying light qualities: Toward the functional relationship of state transitions and adjustment of photosystem stoichiometry." *J Phycol* **41**: 723-725.
- Pfannschmidt, T., J. F. Allen and R. Oelmüller (2001b). "Principles of redox control in photosynthesis gene expression." *Physiol Plant* **112**: 1-9.
- Pfannschmidt, T. and K. Liere (2005). "Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression." *Antioxid Redox Signal* **7**(5-6): 607-18.
- Pfannschmidt, T., A. Nilsson and J. F. Allen (1999). "Photosynthetic control of chloroplast gene expression." *Nature* **397**: 625-628.
- Pfannschmidt, T., K. Schütze, M. Brost and R. Oelmüller (2001). "A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment." *J Biol Chem* **276**(39): 36125-30.
- Piippo, M., Y. Allahverdiyeva, V. Paakkarinen, U. M. Suoranta, N. Battchikova and E. M. Aro (2006). "Chloroplast-mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress." *Physiol Genomics* **25**(1): 142-52.
- Porra, R. J., W. A. Thompson and P. E. Kriedemann (1989). "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents; verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta* **975**: 384-394.
- Privat, I., M.-A. Hakimi, L. Buhot, J.-J. Favory and S. Lerbs-Mache (2003). "Characterization of *Arabidopsis* sigma-like transcription factors SIG1, SIG2, SIG3." *Plant Molecular Biology* **55**: 385-399.
- Puente, P., N. Wei and X. W. Deng (1996). "Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*." *Embo J* **15**(14): 3732-43.
- Pursiheimo, S., P. Mulo, E. Rintamaki and E. M. Aro (2001). "Coregulation of light-harvesting complex II phosphorylation and lhcb mRNA accumulation in winter rye." *Plant J* **26**(3): 317-27.

- Quackenbush, J. (2003). "Genomics. Microarrays--guilt by association." *Science* **302**(5643): 240-1.
- R Development Core Team (2006). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.
- Race, H. L., R. G. Herrmann and W. Martin (1999). "Why have organelles retained genomes?" *Trends Genet* **15**(9): 364-70.
- Rapp, J. C. and J. E. Mullet (1991). "Chloroplast transcription is required to express the nuclear genes *rbcS* and *cab*. Plastid DNA copy number is regulated independently." *Plant Mol Biol* **17**: 813-123.
- Reiß, T., R. Bergfeld, G. Link, W. Thien and H. Mohr (1983). "Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for cytosolic enzyme levels and plant development." *Planta* **159**: 518-528.
- Richly, E., A. Dietzmann, A. Biehl, J. Kurth, C. Laloi, K. Apel, F. Salamini and D. Leister (2003). "Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch." *EMBO Rep* **4**(5): 491-8.
- Rizhsky, L., H. Liang and R. Mittler (2003). "The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress." *J Biol Chem* **278**(40): 38921-5.
- Rodermel, S. (2001). "Pathways of plastid-to-nucleus signaling." *Trends Plant Sci* **6**(10): 471-8.
- Roessner, U., C. Wagner, J. Kopka, R. N. Trethewey and L. Willmitzer (2000). "Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry." *Plant J* **23**(1): 131-42.
- Rouhier, N., J. Couturier and J. P. Jacquot (2006). "Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems." *J Exp Bot* **57**(8): 1685-96.
- Rouhier, N., E. Gelhaye and J. P. Jacquot (2002). "Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism." *J Biol Chem* **277**(16): 13609-14.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush (2003). "TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis." *Biotechniques* **34**(2): 374-8.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Sambrook, J. and D. W. Russel (2001). *Molecular Cloning. A laboratory Manual. Third Edition*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schauer, N., D. Steinhauser, S. Strelkov, D. Schomburg, G. Allison, T. Moritz, K. Lundgren, U. Roessner-Tunali, M. G. Forbes, L. Willmitzer, A. R. Fernie and J. Kopka (2005). "GC-MS libraries for the rapid identification of metabolites in complex biological samples." *FEBS Lett* **579**(6): 1332-7.
- Scheibe, R. (1991). "Redox-Modulation of Chloroplast Enzymes : A Common Principle for Individual Control." *Plant Physiol* **96**(1): 1-3.
- Schönfeld, C., L. Wobbe, R. Borgstädt, A. Kienast, P. J. Nixon and O. Kruse (2004). "The nucleus-encoded protein MOC1 is essential for mitochondrial light acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*." *J Biol Chem* **279**(48): 50366-74.
- Schreiber, U., W. Bilger, H. Hormann and C. Neubauer (1997). Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. *Photosynthesis: a Comprehensive Treatise*, A. S. Raghavendra. Cambridge, UK, Cambridge University, UK.
- Serrato, A. J., J. M. Perez-Ruiz, M. C. Spinola and F. J. Cejudo (2004). "A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* **279**(42): 43821-7.
- Sha, S., K. Minakuchi, N. Higaki, K. Sato, K. Ohtsuki, A. Kurata, H. Yoshikawa, M. Kotaru, T. Masumura, K. Ichihara and K. Tanaka (1997). "Purification and characterization of glutaredoxin (thioltransferase) from rice (*Oryza sativa* L.)." *J Biochem (Tokyo)* **121**(5): 842-8.
- Shen, Y. Y., X. F. Wang, F. Q. Wu, S. Y. Du, Z. Cao, Y. Shang, X. L. Wang, C. C. Peng, X. C. Yu, S. Y. Zhu, R. C. Fan, Y. H. Xu and D. P. Zhang (2006). "The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor." *Nature* **443**(7113): 823-6.
- Sherameti, I., S. K. Sopory, A. Trebicka, T. Pfanschmidt and R. Oelmüller (2002). "Photosynthetic electron transport determines nitrate reductase gene expression and activity in higher plants." *J Biol Chem* **277**(48): 46594-600.
- Shimada, H. and M. Sugiura (1991). "Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes." *Nucleic Acids Res* **19**(5): 983-95.
- Sinha, S. and M. Tompa (2003). "YMF: A program for discovery of novel transcription factor binding sites by statistical overrepresentation." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3586-8.
- Small, I., N. Peeters, F. Legeai and C. Lurin (2004). "Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences." *Proteomics* **4**(6): 1581-90.
- Smirnov, N. (2000). "Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**(1402): 1455-64.
- Soll, J. and E. Schleiff (2004). "Protein import into chloroplasts." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3): 198-208.
- Sullivan, J. A. and J. C. Gray (1999). "Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant." *Plant Cell* **11**(5): 901-10.
- Surpin, M., R. M. Larkin and J. Chory (2002). "Signal transduction between the chloroplast and the nucleus." *Plant Cell* **14** **Suppl**: S327-38.
- Susek, R. E., F. M. Ausubel and J. Chory (1993). "Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development." *Cell* **74**(5): 787-99.
- ter Kuile, B. H. and H. V. Westerhoff (2001). "Transcriptome meets metabolome: hierarchical and metabolic regulation of the glycolytic pathway." *FEBS Lett* **500**(3): 169-71.
- Tetlow, I. J., M. K. Morell and M. J. Emes (2004). "Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants." *J Exp Bot* **55**(406): 2131-45.

- Thijs, G., M. Lescot, K. Marchal, S. Rombauts, B. De Moor, P. Rouze and Y. Moreau (2001). "A higher-order background model improves the detection of promoter regulatory elements by Gibbs sampling." *Bioinformatics* **17**(12): 1113-22.
- Thijs, G., K. Marchal, M. Lescot, S. Rombauts, B. De Moor, P. Rouze and Y. Moreau (2002). "A Gibbs sampling method to detect overrepresented motifs in the upstream regions of coexpressed genes." *J Comput Biol* **9**(2): 447-64.
- Thijs, G., Y. Moreau, F. De Smet, J. Mathys, M. Lescot, S. Rombauts, P. Rouze, B. De Moor and K. Marchal (2002). "INCLUSive: integrated clustering, upstream sequence retrieval and motif sampling." *Bioinformatics* **18**(2): 331-2.
- Thimm, O., O. Blasing, Y. Gibon, A. Nagel, S. Meyer, P. Kruger, J. Selbig, L. A. Muller, S. Y. Rhee and M. Stitt (2004). "MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes." *Plant J* **37**(6): 914-39.
- Tiessen, A., J. H. Hendriks, M. Stitt, A. Branscheid, Y. Gibon, E. M. Farre and P. Geigenberger (2002). "Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply." *Plant Cell* **14**(9): 2191-213.
- Tikkanen, M., M. Piippo, M. Suorsa, S. Sirpio, P. Mulo, J. Vainonen, A. V. Vener, Y. Allahverdiyeva and E. M. Aro (2006). "State transitions revisited—a buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis*." *Plant Mol Biol* **62**(4-5): 779-93.
- Trebst, A. (1980). "Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites." *Methods Enzymol* **69**: 675-715.
- Usadel, B., A. Nagel, O. Thimm, H. Redestig, O. E. Blasing, N. Palacios-Rojas, J. Selbig, J. Hannemann, M. C. Piques, D. Steinhäuser, W. R. Scheible, Y. Gibon, R. Morcuende, D. Weicht, S. Meyer and M. Stitt (2005). "Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses." *Plant Physiol* **138**(3): 1195-204.
- van Helden, J. (2003). "Regulatory sequence analysis tools." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3593-6.
- van Wijk, K. J. (2004). "Plastid proteomics." *Plant Physiol Biochem* **42**(12): 963-77.
- Vanderauwera, S., P. Zimmermann, S. Rombauts, S. Vandenberghe, C. Langebartels, W. Gruissem, D. Inze and F. Van Breusegem (2005). "Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis." *Plant Physiol* **139**(2): 806-21.
- Vasilikiotis, C. and A. Melis (1994). "Photosystem II reaction center damage and repair cycle: chloroplast acclimation strategy to irradiance stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15): 7222-6.
- Vener, A. V., P. J. van Kan, P. R. Rich, I. I. Ohad and B. Andersson (1997). "Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome b₆ mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: Thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1585-1590.
- von Gromoff, E. D., M. Schroda, U. Oster and C. F. Beck (2006). "Identification of a plastid response element that acts as an enhancer within the *Chlamydomonas* HSP70A promoter." *Nucleic Acids Res* **34**(17): 4767-79.
- Wagner, D., D. Przybyla, R. Op den Camp, C. Kim, F. Landgraf, K. P. Lee, M. Wursch, C. Laloi, M. Nater, E. Hideg and K. Apel (2004b). "The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*." *Science* **306**(5699): 1183-5.
- Wagner, R., L. Dietzel, K. Bräutigam, W. Fischer and T. Pfannschmidt (2007). "Long-term light quality acclimation is important for photosynthetic performance and physiology of *Arabidopsis thaliana* under low light conditions." *Plant Cell and Environment* **submitted**.
- Wagner, R., V. Fey, R. Borgstädt, O. Kruse and T. Pfannschmidt (2004). Screening for *Arabidopsis thaliana* mutants deficient in acclimatory long-term response to varying light qualities using chlorophyll fluorescence imaging. 13th International Congress of Photosynthesis, Montréal, Allen Press.
- Walters, R. G. (2005). "Towards an understanding of photosynthetic acclimation." *J Exp Bot* **56**(411): 435-47.
- Walters, R. G. and P. Horton (1994). "Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: Changes in composition of the photosynthetic apparatus." *Planta* **195**: 248-256.
- Wang, H., L. Ma, J. Habashi, J. Li, H. Zhao and X. W. Deng (2002). "Analysis of far-red light-regulated genome expression profiles of phytochrome A pathway mutants in *Arabidopsis*." *Plant J* **32**(5): 723-33.
- Westhoff, P., K. Offermann-Steinhard, M. Höfer, K. Eskins, A. Oswald and M. Streubel (1991). "Differential Accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the bundle-sheath cells of the monocotyledonous NADP-malic enzyme type C4 plants." *Planta* **184**: 377-388.
- Wollman, F. A. (2001). "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus." *Embo J* **20**(14): 3623-30.
- Wormuth, D., M. Baier, A. Kandlbinder, R. Scheibe, W. Hartung and K. J. Dietz (2006). "Regulation of gene expression by photosynthetic signals triggered through modified CO₂ availability." *BMC Plant Biol* **6**: 15.
- Yabuta, Y., T. Maruta, K. Yoshimura, T. Ishikawa and S. Shigeoka (2004). "Two distinct redox signaling pathways for cytosolic APX induction under photooxidative stress." *Plant Cell Physiol* **45**(11): 1586-94.
- Yang, D. H., B. Andersson, E. M. Aro and I. Ohad (2001). "The redox state of the plastoquinone pool controls the level of the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex II (LHC II) during photoacclimation." *Photosynth Res* **68**(2): 163-74.
- Yoshida, K., I. Terashima and K. Noguchi (2007). "Up-regulation of mitochondrial alternative oxidase concomitant with chloroplast over-reduction by excess light." *Plant Cell Physiol* **48**(4): 606-14.
- Young, A. J., D. Phillip, A. V. Ruban, P. Horton and H. A. Frank (1997). "The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis." *Pure & Appl Chem* **69**(10): 2125-2130.
- Zito, F., G. Finazzi, R. Delosme, W. Nitschke, D. Picot and F. A. Wollman (1999). "The Qo site of cytochrome b₆ complexes controls the activation of the LHCII kinase." *Embo J* **18**(11): 2961-9.

6 Anhang

Cluster	Regulationsmuster	Gene
PSI-II		
1	Repression	At1g07460, At1g08540, At2g15890, At2g42300, At3g17670, At3g57280 At4g03530, At4g31930, At4g38150
2	Induktion	At1g01290, At1g05130, At1g51350, At1g68725, At1g73110, At1g74220, At2g04240, At2g14890, At2g16460, At2g40380, At2g41040, At3g50140, At4g01650, At4g07990, At4g11230, At4g20930, At4g26220, At4g29060, At4g39690, At5g14580, At5g17820, At5g20730, At5g47610
3	Gemischte Regulation	At1g18290, At1g67400, At2g17840, At2g29670, At2g36050, At2g47730, At3g23230, At3g43610, At4g17740, At4g22650, At4g31510, At4g35170, At5g32490
PSII-I		
1	Repression, danach Anstieg	At1g03600, At1g14230, At1g54630, At1g67460, At1g80740, At2g16270, At2g27810, At2g29100, At2g29650, At2g37060, At3g52550, At4g04430, At4g16080, At4g18180, At5g07540, At5g57180
2	Induktion, danach Anstieg	At1g12090, At2g06520, At2g17120, At3g11670, At3g12120, At3g56940, At4g10810, At4g25720, At4g25970, At5g07770, At5g38420
3	Gemischte Regulation I	At1g16250, At1g26970, At1g32220, At1g41670, At2g01580, At2g02070, At2g23890, At3g01180, At3g54660, At3g58990, At3g60750, At4g03260, At4g09970, At4g11910, At4g33500, At4g39710, At5g10100, At5g23060, At5g58930
4	Gemischte Regulation II	At1g24350, At1g64890, At1g69200, At2g23800, At2g29670, At2g34700, At2g36480, At2g37250, At2g44800, At3g55800, At4g12060, At4g23150, At4g32540, At5g13550

Tab. A.1: Zuordnung der Gene zu Gruppen mit ähnlichen Expressionsverhalten. Nach einem PSI-II-Lichtwechsel wurden die PRGs nach ihrem Regulationsmuster mittels *k-means*-Clustering in 3 Gruppen unterteilt; nach dem entgegengesetzten Lichtwechsel (PSII-I) wurden 4 deutliche Gruppen unterschieden. Die Zuordnung der Gene zu den einzelnen Clustern ist aufgelistet.

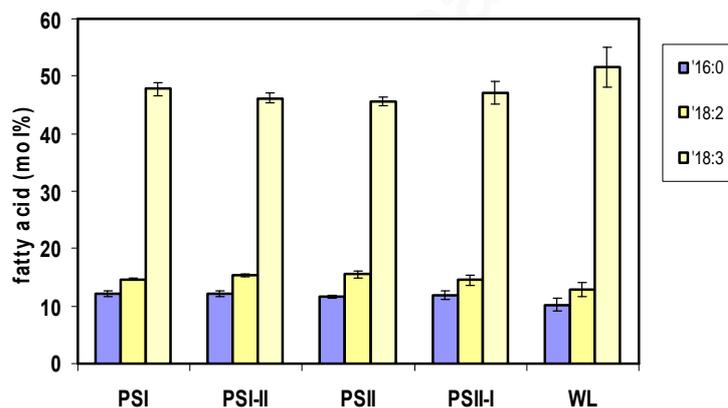


Abb. A.1: Gehalt der Pflanzen an einzelnen Fettsäuren während der LTR. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für 5 Tage an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert (Beschriftung: PSI bzw. PSII) oder nach 3 Tagen Vorakklimation an PSI- bzw. PSII-Licht für 2 Tage in das jeweils andere Licht umgestellt (als PSI-II bzw. PSII-I beschriftet). Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SD von 4 unabhängigen Replikaten. Gesättigte Fettsäuren sind blau, ungesättigte gelb dargestellt. 16:0: Palmitinsäure, 18:2: Linolsäure; 18:3: Linolensäure.

Cluster	ID ^A	Consensus	#seq ^B	#inst ^C	Funktion
PSI-II					
Cluster1	AT~CCGTCC-box	CCGTCC	6	7	related to meristem specific activation
	AT~CAAT-box	CAAT	4	6	common cis-acting promoter element
	M00352 Dof1	AnnwAAAGnnn	4	4	light response; tissue specificity (maize)
Cluster2	AT~NON-box	AGATCGACG	11	19	related to meristem specific activation
	AT~CCGTCC-box	CCGTCC	9	19	related to meristem specific activation
	M00353 Dof2	nnnwAAAGCnn	9	10	light response; tissue specificity (maize)
	AT~CAAT-box	CAAT	8	11	common cis-acting promoter element
	AT~GAG-motif	-	8	10	part of a light response element
Cluster3	AT~GAG-motif	-	7	8	part of a light response element
	M00182 GBP	nnnsACGTGnCm	3	4	light responsiveness, G-box
Cluster1-3	AT~CCGTCC-box	CCGTCC	19	33	related to meristem specific activation
	AT~NON-box	AGATCGACG	16	24	related to meristem specific activation
	AT~GAG-motif	-	16	19	part of a light response element
	AT~CAAT-box	CAAT	15	20	common cis-acting promoter element
PSII-I					
Cluster1	AT~GAG-motif	-	7	11	part of a light responsive element
	AT~GT1-motif	TGTGTGGTTAATATG	6	6	light responsive element
Cluster2	M00182 GBF	nnnsACGTGnCm	4	8	light responsiveness, G-box
	AT~ATC-motif	rsCwATCC	6	6	light responsiveness
Cluster3	AT~NON-box	AGATCGACG	9	14	related to meristem specific activation
	AT~CAT-box	GCCACT	8	8	related to meristem expression
	M00345 GAmyb	yAACsGmC agaaatgCCACGTGG	8	8	GA-regulated myb gene from barley
	AT~Unnamed_4	acgaatac	7	10	GBF3 binding site, response to light / ABA
Cluster4	M00355 PBF	nwnwAAAGnGn	7	7	involved in development (maize)
	M00353 Dof2	nnnwAAAGCnn	6	7	light response; tissue specificity (maize)
	AT~TATA-box	TATAAA	6	7	core promoter element
Cluster1-4	AT~GT1-motif	TGTGTGGTTAATATG agaaatgCCACGTGG	21	22	light responsive element
	AT~Unnamed_4	acgaatac	20	25	GBF3 binding site, response to light / ABA
	M00353 Dof2	nnnwAAAGCnn	20	21	light response; tissue specificity (maize)
	AT~GAG-motif	-	19	26	part of a light responsive element
	AT~NON-box	AGATCGACG	18	28	related to meristem specific activation
	M00182 GBF	nnnsACGTGnCm	16	26	light responsiveness, G-box

Tab. A.2: Bekannte Motive in den Promotorsequenzen der zeitig regulierten Gene. Innerhalb der primär regulierten Gene wurden Gruppen mit ähnlichem Expressionsverhalten (Cluster) unterschieden (Abb. 3.6). Bereits bekannte Motive wurden durch Vergleich mit den Datenbanken PlantCARE und Transfac mit Hilfe der MotifScanner-Software identifiziert. Die häufigsten Motive und eine kurze Beschreibung sind aufgeführt.

^A Bezeichner des Motives bei PlantCARE bzw. Transfac, ^B Anzahl der Sequenzen, in denen das Motiv gefunden wurde ^C Gesamtzahl, wie oft das Motiv gefunden wurde; ID, consensus und Funktion wurden PlantCARE und Transfac übernommen (Stand: April 2007)

Aminosäuren	PSI-II	PSII-I		PSI-II	PSII-I		PSI-II	PSII-I
Alanin	1.09	0.83	Glutamin	0.45	1.64	Phenylalanin	0.81	0.84
4-Amino- buttersäure	0.88	1.01	Glutaminsäure	0.75	0.75	Pyroglutamin- säure	0.64	0.74
Arginin	0.81	0.62	Glycin	1.15	0.41	Serin	0.56	0.92
Asparagin	0.36	0.70	Histidin	1.54	0.56	Threonin	1.57	0.55
Asparaginsäure	0.94	0.78	Isoleucin	1.23	0.91	Tryptophan	0.88	0.71
beta-Alanin	0.88	0.89	Lysin	0.87	1.04	Tyrosin	1.15	1.36
Cystein	1.15	0.58	Methionin	1.13	0.53	Valin	0.85	1.10
organische Säuren								
2-methyl- Äpfelsäure	1.41	0.55	Dehydroascorbin- säure (Dimer)	1.41	0.56	Salicylsäure	0.85	0.70
Äpfelsäure	1.33	0.58	Galacturonsäure	0.25	2.24	Shikimisäure	2.02	0.54
Ascorbinsäure	1.23	1.00	Glycerinsäure	1.24	0.62	<i>trans</i> -Sinapinsäure	1.00	0.95
Benzoessäure	0.91	0.67	Isocitronensäure	0.58	0.70	Threoninsäure	0.87	0.55
Bernsteinsäure	1.32	0.37	Maleinsäure	2.78	0.39	Zitronensäure	0.81	0.40
Brenztraubensäure	1.74	0.62	Nicotinsäure	1.11	0.67			
Zucker								
Fructose	0.42	1.09	Glucose	0.34	1.36	Saccharose	1.00	0.77
Fucose	0.86	0.94	Maltose	1.11	0.90	Trehalose	0.87	1.42
Galactose	0.97	0.81	Mannose	0.64	0.86	Xylose	0.99	0.65
Alkohole								
Erythritol	1.09	0.90	Mannitol	1.44	0.74	Glycerol	0.94	1.04
Galactinol	0.66	0.96	<i>myo</i> -Inositol	1.26	0.78			
Maltitol	0.97	1.07	Xylitol	1.58	0.63			
Stickstoffverbindung								
Guanidin	1.25	2.84	Harnstoff	0.98	0.75	Putrescin	0.53	1.21
Phosphate								
Glucose-6- Phosphat	0.76	0.68	Glycerol-3- phosphat	0.50	0.38	Phosphorsäure	1.06	0.64
Fettsäure								
Stearinsäure	0.89	0.80						

Tab. A.3: Identifizierte Metabolite bei *Arabidopsis*-Pflanzen nach induzierter LTR. Die Metabolite wurden mittels GC-MS bestimmt. Neben dem Substanznamen ist jeweils das Verhältnis der Metabolitmengen nach Lichtwechsel (PSI-II bzw. PSII-I) und der Vergleichsbedingung mit gleichbleibender Lichtqualität (PSI bzw. PSII) angegeben. Signifikante Veränderungen (Student's *t*-Test, $p \leq 0.05$, $n = 3-6$) sind **fett hervorgehoben.**

Linie	PSI	PSI-II	PSII	PSII-I	WL
LTR 1-1	0.847 ± 0.001	0.844 ± 0.005	0.850 ± 0.003	0.851 ± 0.004	0.866 ± 0.005
WT	0.841 ± 0.003	0.842 ± 0.004	0.849 ± 0.003	0.850 ± 0.004	0.864 ± 0.007
LTR 1-2	0.823 ± 0.005	0.834 ± 0.003	0.830 ± 0.005	0.841 ± 0.004	0.848 ± 0.004
WT	0.816 ± 0.002	0.835 ± 0.007	0.833 ± 0.009	0.840 ± 0.005	0.853 ± 0.007
LTR 2	0.821 ± 0.022	0.821 ± 0.010	0.827 ± 0.006	0.813 ± 0.003	0.854 ± 0.018
WT	0.824 ± 0.029	0.822 ± 0.010	0.829 ± 0.004	0.811 ± 0.004	0.855 ± 0.020
LTR 3	0.828 ± 0.005	0.834 ± 0.007	0.837 ± 0.009	0.846 ± 0.005	0.861 ± 0.006
WT	0.823 ± 0.006	0.829 ± 0.008	0.834 ± 0.008	0.846 ± 0.003	0.857 ± 0.010
LTR 4-1	0.821 ± 0.013	0.835 ± 0.001	0.847 ± 0.004	0.853 ± 0.002	0.859 ± 0.004
WT	0.817 ± 0.009	0.824 ± 0.006	0.846 ± 0.001	0.848 ± 0.006	0.859 ± 0.001
LTR 4-2	0.823 ± 0.012	0.837 ± 0.006	0.843 ± 0.001	0.846 ± 0.001	0.842 ± 0.004
WT	0.820 ± 0.017	0.837 ± 0.005	0.842 ± 0.003	0.845 ± 0.004	0.835 ± 0.005
LTR 5	0.804 ± 0.036	0.809 ± 0.005	0.815 ± 0.010	0.818 ± 0.007	0.786 ± 0.005
WT	0.792 ± 0.033	0.804 ± 0.003	0.804 ± 0.012	0.818 ± 0.006	0.780 ± 0.004
LTR 6-1	0.818 ± 0.005	0.833 ± 0.007	0.844 ± 0.004	0.824 ± 0.006	0.847 ± 0.011
WT	0.817 ± 0.005	0.829 ± 0.008	0.841 ± 0.005	0.811 ± 0.023	0.837 ± 0.020
LTR 6-2	0.844 ± 0.003	0.834 ± 0.003	0.846 ± 0.001	0.848 ± 0.001	0.855 ± 0.009
WT	0.838 ± 0.006	0.829 ± 0.005	0.842 ± 0.002	0.846 ± 0.002	0.851 ± 0.011
LTR 7	0.827 ± 0.008	0.827 ± 0.009	0.827 ± 0.007	0.835 ± 0.003	0.849 ± 0.001
WT	0.824 ± 0.009	0.822 ± 0.007	0.820 ± 0.005	0.829 ± 0.007	0.842 ± 0.0007
LTR 8	0.804 ± 0.056	0.819 ± 0.016	0.825 ± 0.012	0.801 ± 0.012	0.801
WT	0.795 ± 0.050	0.812 ± 0.002	0.818 ± 0.010	0.800 ± 0.001	0.796
LTR 9	0.806 ± 0.033	0.801 ± 0.013	0.813 ± 0.006	0.808 ± 0.007	0.803 ± 0.002
WT	0.818 ± 0.029	0.809 ± 0.011	0.821 ± 0.006	0.819 ± 0.005	0.810 ± 0.005
LTR 10	0.827 ± 0.01	0.832 ± 0.01	0.838 ± 0.007	0.846 ± 0.005	0.840 ± 0.019
WT	0.819 ± 0.011	0.820 ± 0.022	0.829 ± 0.019	0.833 ± 0.010	0.839 ± 0.013
LTR 11-1	0.822 ± 0.007	0.815 ± 0.018	0.833 ± 0.008	0.840 ± 0.004	0.848 ± 0.007
WT	0.817 ± 0.012	0.812 ± 0.018	0.819 ± 0.008	0.839 ± 0.004	0.848 ± 0.001
LTR 11-2	0.772 ± 0.095	0.728 ± 0.076	0.731 ± 0.108	0.622 ± 0.028	0.840 ± 0.007
WT	0.762 ± 0.100	0.724 ± 0.072	0.729 ± 0.110	0.621 ± 0.025	0.835 ± 0.008
LTR 12	0.759 ± 0.003	0.794 ± 0.005	0.797 ± 0.008	0.807 ± 0.002	0.809 ± 0.005
WT	0.759 ± 0.014	0.780 ± 0.021	0.796 ± 0.009	0.809 ± 0.007	0.802 ± 0.006
LTR 13-1	0.800 ± 0.029	0.782 ± 0.015	0.818 ± 0.007	0.801 ± 0.011	0.794 ± 0.013
WT	0.819 ± 0.030	0.816 ± 0.007	0.832 ± 0.003	0.814 ± 0.005	0.819 ± 0.004
LTR 13-2	0.837 ± 0.018	0.811 ± 0.009	0.829 ± 0.017	0.835 ± 0.011	0.843 ± 0.002
WT	0.835 ± 0.015	0.827 ± 0.005	0.829 ± 0.012	0.831 ± 0.010	0.842 ± 0.002
LTR 14	0.842 ± 0.030	0.843 ± 0.010	0.849 ± 0.002	0.839 ± 0.004	0.838 ± 0.005
WT	0.838 ± 0.033	0.835 ± 0.011	0.842 ± 0.008	0.838 ± 0.005	0.834 ± 0.004
LTR 15-1	0.809 ± 0.022	0.804 ± 0.009	0.825 ± 0.021	0.812 ± 0.009	0.820 ± 0.009
WT	0.818 ± 0.017	0.821 ± 0.006	0.839 ± 0.022	0.816 ± 0.012	0.832 ± 0.004
LTR 15-2	0.821 ± 0.016	0.823 ± 0.008	0.828 ± 0.005	0.822 ± 0.002	0.832 ± 0.007
WT	0.830 ± 0.016	0.831 ± 0.013	0.835 ± 0.001	0.832 ± 0.006	0.847 ± 0.004
LTR 16	0.853	0.847 ± 0.006	0.852 ± 0.011	0.844 ± 0.005	0.850 ± 0.001
WT	0.863	0.852 ± 0.005	0.858 ± 0.013	0.852 ± 0.003	0.852 ± 0.008
LTR 17-1	0.849 ± 0.002	0.851 ± 0.002	0.861 ± 0.003	0.860 ± 0.003	0.835 ± 0.049
WT	0.847 ± 0.003	0.846 ± 0.004	0.855 ± 0.007	0.853 ± 0.004	0.823 ± 0.052
LTR17-2	0.771 ± 0.015	0.762 ± 0.018	0.821 ± 0.003	0.825 ± 0.004	0.835 ± 0.006
WT	0.790 ± 0.011	0.805 ± 0.003	0.856 ± 0.003	0.859 ± 0.004	0.866 ± 0.001
LTR 18	0.815 ± 0.007	0.808 ± 0.020	0.815 ± 0.006	0.823 ± 0.010	0.802 ± 0.029
WT	0.829 ± 0.012	0.816 ± 0.018	0.829 ± 0.004	0.831 ± 0.006	0.809 ± 0.029
LTR 19	0.852 ± 0.026	0.842 ± 0.003	0.840 ± 0.011	0.846 ± 0.008	0.854 ± 0.003
WT	0.850 ± 0.025	0.840 ± 0.002	0.833 ± 0.016	0.839 ± 0.011	0.850 ± 0.003
LTR 20	0.813 ± 0.013	0.831 ± 0.004	0.835 ± 0.001	0.847 ± 0.019	0.841 ± 0.013
WT	0.831 ± 0.013	0.836 ± 0.009	0.844 ± 0.001	0.851 ± 0.016	0.844 ± 0.018

Tab. A.4: Chlorophyllfluoreszenzparameter F_v/F_m der Mutanten LTR 1–20 und zugehöriger Wildtypkontrollen (WT) nach Anzucht in den verschiedenen Lichtregimen. Pflanzen wurden auf MS-Platten angezogen und an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert bzw. zwischen den Lichtquellen gewechselt (PSI-II; PSII-I). WL: Weißlicht. Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen (mit jeweils 8-10 Pflanzen) ± Standardabweichung sind aufgeführt. Der Fluoreszenzparameter F_v/F_m spiegelt die maximale Quantenausbeute von PSII wider.

Linie	PSI	PSI-II	PSII	PSII-I	WL	PSI & PSI-II p-Wert ^{a)}	PSII & PSII-I p-Wert ^{b)}
LTR 1-1	0.108 ± 0.007	0.068 ± 0.008	0.055 ± 0.004	0.109 ± 0.003	0.059 ± 0.007	0.0031	0.0000
WT	0.115 ± 0.010	0.069 ± 0.012	0.053 ± 0.005	0.110 ± 0.008	0.061 ± 0.004	0.0068	0.0004
LTR 1-2	0.139 ± 0.042	0.059 ± 0.003	0.058 ± 0.008	0.107 ± 0.004	0.057 ± 0.003	0.0370	0.0025
WT	0.141 ± 0.048	0.070 ± 0.008	0.074 ± 0.010	0.116 ± 0.006	0.064 ± 0.005	0.0730	0.0078
LTR2	0.158 ± 0.010	0.084 ± 0.006	0.058 ± 0.004	0.126 ± 0.008	0.051 ± 0.006	0.0003	0.0002
WT	0.161 ± 0.011	0.083 ± 0.007	0.058 ± 0.003	0.127 ± 0.011	0.047 ± 0.006	0.0005	0.0005
LTR 3	0.135 ± 0.012	0.087 ± 0.005	0.080 ± 0.013	0.128 ± 0.007	0.063 ± 0.002	0.0035	0.0049
WT	0.138 ± 0.013	0.080 ± 0.007	0.085 ± 0.018	0.127 ± 0.002	0.065 ± 0.004	0.0023	0.0176
LTR 4-1	0.123 ± 0.004	0.078 ± 0.006	0.073 ± 0.001	0.123 ± 0.002	0.051 ± 0.012	0.0004	0.0001
WT	0.130 ± 0.006	0.086 ± 0.001	0.073 ± 0.002	0.122 ± 0.007	0.045 ± 0.003	0.0002	0.0023
LTR 4-2	0.117 ± 0.010	0.074 ± 0.004	0.063 ± 0.006	0.096 ± 0.007	0.056 ± 0.020	0.0024	0.0036
WT	0.118 ± 0.009	0.074 ± 0.006	0.065 ± 0.010	0.106 ± 0.003	0.073 ± 0.027	0.0018	0.0025
LTR 5	0.120 ± 0.016	0.088 ± 0.004	0.076 ± 0.015	0.099 ± 0.003	0.066 ± 0.012	0.0273	0.0552
WT	0.123 ± 0.024	0.098 ± 0.010	0.083 ± 0.020	0.102 ± 0.003	0.070 ± 0.016	0.1689	0.1852
LTR 6-1	0.131 ± 0.003	0.075 ± 0.009	0.054 ± 0.005	0.123 ± 0.005	0.121 ± 0.025	0.0004	0.0001
WT	0.137 ± 0.005	0.076 ± 0.013	0.054 ± 0.007	0.125 ± 0.003	0.139 ± 0.044	0.0016	0.0001
LTR 6-2	0.122 ± 0.006	0.090 ± 0.011	0.069 ± 0.006	0.121 ± 0.001	0.055 ± 0.005	0.0121	0.0001
WT	0.117 ± 0.007	0.088 ± 0.008	0.069 ± 0.007	0.120 ± 0.004	0.062 ± 0.006	0.0069	0.0004
LTR 7	0.115 ± 0.010	0.078 ± 0.013	0.059 ± 0.006	0.097 ± 0.003	0.060 ± 0.013	0.0179	0.0006
WT	0.115 ± 0.011	0.083 ± 0.011	0.068 ± 0.006	0.100 ± 0.009	0.066 ± 0.001	0.0236	0.0068
LTR 8	0.165 ± 0.007	0.101 ± 0.012	0.067 ± 0.004	0.117 ± 0.008	0.051	0.0066	0.0029
WT	0.173 ± 0.003	0.112 ± 0.011	0.073 ± 0.010	0.122 ± 0.003	0.045	0.0048	0.0069
LTR 9	0.148 ± 0.012	0.090 ± 0.017	0.074 ± 0.006	0.118 ± 0.005	0.053 ± 0.002	0.0083	0.0006
WT	0.142 ± 0.005	0.091 ± 0.014	0.073 ± 0.012	0.110 ± 0.002	0.052 ± 0.002	0.0039	0.0053
LTR 10	0.136 ± 0.017	0.089 ± 0.016	0.075 ± 0.006	0.119 ± 0.005	0.095 ± 0.047	0.0263	0.0005
WT	0.153 ± 0.009	0.102 ± 0.029	0.082 ± 0.015	0.125 ± 0.005	0.078 ± 0.029	0.0428	0.0092
LTR 11-1	0.136 ± 0.026	0.105 ± 0.033	0.077 ± 0.011	0.104 ± 0.004	0.055 ± 0.004	0.2659	0.0145
WT	0.146 ± 0.023	0.107 ± 0.025	0.086 ± 0.015	0.096 ± 0.005	0.058 ± 0.011	0.1130	0.3667
LTR 11-2	0.128 ± 0.009	0.062 ± 0.008	0.072 ± 0.023	0.131 ± 0.009	0.086 ± 0.008	0.0007	0.0143
WT	0.132 ± 0.005	0.064 ± 0.009	0.073 ± 0.031	0.137 ± 0.012	0.088 ± 0.005	0.0004	0.0285
LTR 12	0.147 ± 0.006	0.123 ± 0.009	0.082 ± 0.007	0.108 ± 0.011	0.048 ± 0.004	0.0460	0.0304
WT	0.160 ± 0.001	0.125 ± 0.020	0.085 ± 0.006	0.105 ± 0.015	0.052 ± 0.003	0.0986	0.0931
LTR 13-1	0.155 ± 0.011	0.110 ± 0.019	0.073 ± 0.009	0.121 ± 0.002	0.060 ± 0.005	0.0234	0.0008
WT	0.145 ± 0.011	0.086 ± 0.005	0.060 ± 0.007	0.113 ± 0.002	0.056 ± 0.005	0.0009	0.0002
LTR 13-2	0.140 ± 0.007	0.117 ± 0.021	0.069 ± 0.010	0.102 ± 0.010	0.056 ± 0.016	0.1371	0.0157

Linie	PSI	PSI-II	PSII	PSII-I	WL	PSI & PSI-II p-Wert ^{a)}	PSII & PSII-I p-Wert ^{b)}
WT	0.137 ± 0.010	0.105 ± 0.016	0.058 ± 0.006	0.103 ± 0.008	0.052 ± 0.011	0.0405	0.0013
LTR 14	0.112 ± 0.006	0.071 ± 0.006	0.063 ± 0.002	0.096 ± 0.007	0.042 ± 0.007	0.0010	0.0011
WT	0.118 ± 0.020	0.077 ± 0.001	0.068 ± 0.015	0.094 ± 0.015	0.044 ± 0.002	0.0233	0.0994
LTR 15-1	0.143 ± 0.012	0.079 ± 0.014	0.050 ± 0.005	0.104 ± 0.005	0.066 ± 0.028	0.0039	0.0002
WT	0.127 ± 0.011	0.067 ± 0.014	0.044 ± 0.005	0.102 ± 0.005	0.055 ± 0.011	0.0042	0.0001
LTR 15-2	0.119 ± 0.001	0.084 ± 0.017	0.075 ± 0.010	0.082 ± 0.000	0.056 ± 0.004	0.0244	0.4085
WT	0.111 ± 0.009	0.081 ± 0.015	0.074 ± 0.007	0.079 ± 0.006	0.048 ± 0.013	0.0393	0.4724
LTR 16	0.153	0.075 ± 0.003	0.062 ± 0.002	0.088 ± 0.019	0.054 ± 0.016		0.1598
WT	0.137	0.071 ± 0.003	0.052 ± 0.001	0.080 ± 0.017	0.056 ± 0.010		0.1104
LTR17-2	0.073 ± 0.009	<i>0.042</i> ± 0.008	0.046 ± 0.002	<i>0.056</i> ± 0.003	0.037 ± 0.007	0.0109	0.0089
WT	0.085 ± 0.009	0.062 ± 0.005	0.051 ± 0.002	0.086 ± 0.002	0.042 ± 0.006	0.0182	0.0000
LTR 18	0.094 ± 0.032	0.067 ± 0.004	0.053 ± 0.000	0.070 ± 0.011	0.055 ± 0.011	0.2173	0.1137
WT	0.088 ± 0.020	0.067 ± 0.003	0.051 ± 0.003	0.069 ± 0.008	0.048 ± 0.006	0.1434	0.0579
LTR 19	0.108 ± 0.009	0.062 ± 0.002	0.062 ± 0.012	0.079 ± 0.001	0.050 ± 0.008	0.0010	0.0777
WT	0.104 ± 0.013	0.061 ± 0.003	0.065 ± 0.018	0.085 ± 0.003	0.050 ± 0.004	0.0056	0.1284
LTR 20	0.142 ± 0.011	0.075 ± 0.004	0.057	0.123	0.057 ± 0.002	0.0229	
WT	0.129 ± 0.015	0.082 ± 0.017	0.062	0.112	0.077 ± 0.021	0.0005	

Tab. A.5: Chlorophyllfluoreszenz-Parameter Fs/Fm der Mutanten LTR 1- 20 und zugehöriger Wildtypkontrollen (WT) nach Akklimation an verschiedene Lichtbedingungen. Pflanzen wurden auf MS-Platten angezogen und an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert bzw. zwischen den Lichtquellen gewechselt (PSI-II; PSII-I). WL: Weißlicht. Daten stellen Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen mit jeweils 8-10 Pflanzen dar. Bei jeder Messung wurden parallel zur untersuchten Mutantenlinie auch 8-10 Wildtyppflanzen als interne Kontrolle vermessen. Der Fs/Fm-Parameter wurde verwendet, um Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutantenlinien zu detektieren und das Auftreten der Langzeitakklimation an veränderte Lichtqualitäten zu überprüfen. Fs/Fm-Werte, die sich in einem der Lichtsysteme (PSI, PSI-II, PSII, PSII-I) um mehr als 20 % vom Wildtypwert unterscheiden sind kursiv dargestellt. Bei der Akklimation an veränderte Lichtqualitäten (LTR) fällt bei Wildtyppflanzen der Fs/Fm-Wert typischerweise nach einem Wechsel von PSI- nach PSII-Licht ab und nimmt nach einem PSII-I-Wechsel zu. Um zu prüfen, ob eine LTR auftritt wurden Fs/Fm-Werte von PSI-Pflanzen und PSI-II-Pflanzen ^{a)} bzw. von PSII-Pflanzen und PSII-I-Pflanzen ^{b)} verglichen (Student's *t*-Test) und die p-Werte aufgelistet. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zeigen ein Auftreten der LTR an. p-Werte > 0.05 deuten entweder auf Schwankungen der Messungen (wenn auch beim WT $p > 0.05$ ist) oder auf eine Beeinträchtigung der LTR hin (wenn nur die Mutante betroffen ist).

Linie	PSI	PSI-II	PSII	PSII-I	WL	PSI & PSI-II p-Wert ^{a)}	PSII & PSII-I p-Wert ^{b)}
WT	2.42 ± 0.207	2.89 ± 0.139	2.95 ± 0.229	2.36 ± 0.201	3.14 ± 0.153	0.030	0.028
LTR 1-1	2.61 ± 0.119	2.95 ± 0.055	3.20 ± 0.102	2.82 ± 0.188	3.09 ± 0.433	0.010	0.038
LTR 1-2	2.53 ± 0.122	3.11 ± 0.087	3.07 ± 0.132	2.82 ± 0.031	3.18 ± 0.117	0.003	0.041
LTR 3	2.65 ± 0.040	2.98 ± 0.033	3.20 ± 0.006	2.69 ± 0.056	3.07 ± 0.183	0.000	0.000
LTR 4-1	2.72 ± 0.040	3.18 ± 0.052	3.20 ± 0.137	2.85 ± 0.104	3.21 ± 0.061	0.000	0.045
LTR 4-2	2.55 ± 0.102	3.12 ± 0.064	3.36 ± 0.086	2.89 ± 0.077	3.18 ± 0.192	0.001	0.002
LTR 5	2.51 ± 0.047	2.92 ± 0.045	3.07 ± 0.128	2.26 ± 0.003	2.96 ± 0.170	0.000	0.003
LTR 6-1	2.83 ± 0.040	3.36 ± 0.098	3.26 ± 0.041	2.73 ± 0.037	3.37 ± 0.086	0.001	0.000
LTR 6-2	2.72 ± 0.074	3.12 ± 0.082	3.22 ± 0.106	2.80 ± 0.094	3.34 ± 0.118	0.003	0.007
LTR 7	2.83 ± 0.109	3.12 ± 0.083	3.10 ± 0.022	2.74 ± 0.096	3.22 ± 0.101	0.020	0.003
LTR 8	2.63 ± 0.130	2.90 ± 0.402	2.98 ± 0.195	2.82 ± 0.049	3.12 ± 0.041	0.446	0.235
LTR 9	2.64 ± 0.059	2.94 ± 0.008	2.94 ± 0.086	2.50 ± 0.139	3.06 ± 0.031	0.007	0.010
LTR 10	2.68 ± 0.367	3.19 ± 0.228	3.47 ± 0.079	3.05 ± 0.147	3.31 ± 0.106	0.108	0.036
LTR 11-1	2.50 ± 0.095	2.87 ± 0.274	2.80 ± 0.304	2.44 ± 0.134	3.24 ± 0.143	0.090	0.139
LTR 11-2	2.89 ± 0.069	3.48 ± 0.101	3.43 ± 0.160	2.79 ± 0.025	3.55 ± 0.059	0.001	0.002
LTR 12	2.77 ± 0.084	3.05 ± 0.269	3.24 ± 0.141	2.94 ± 0.133	3.04 ± 0.141	0.166	0.057
LTR 13-1	2.49 ± 0.080	2.76 ± 0.171	2.74 ± 0.022	2.27 ± 0.113	2.75 ± 0.136	0.066	0.012
LTR 13-2	2.77 ± 0.107	2.96 ± 0.201	3.11 ± 0.183	2.82 ± 0.070	3.21 ± 0.071	0.212	0.063
LTR 14	2.50 ± 0.081	3.13 ± 0.261	3.10 ± 0.052	2.63 ± 0.057	2.82 ± 0.179	0.025	0.013
LTR 15-1	2.65 ± 0.125	3.14 ± 0.130	3.25 ± 0.105	2.73 ± 0.066	3.24 ± 0.141	0.009	0.002
LTR 15-2	2.58 ± 0.128	2.97 ± 0.055	3.00 ± 0.254	2.53 ± 0.383	3.16 ± 0.127	0.008	0.157
LTR 16	2.70 ± 0.096	3.04 ± 0.204	3.15 ± 0.223	2.76 ± 0.212	2.93 ± 0.033	0.056	0.091
LTR 17-1	2.85 ± 0.089	3.10 ± 0.274	3.01 ± 0.093	2.99 ± 0.109	3.46 ± 0.142	0.205	0.781
LTR 17-2	2.26 ± 0.127	2.45 ± 0.243	2.63 ± 0.065	2.52 ± 0.028	3.17 ± 0.060	0.296	0.055
LTR 18	2.71 ± 0.056	3.00 ± 0.047	3.03 ± 0.100	2.73 ± 0.087	3.03 ± 0.037	0.002	0.017
LTR 19	2.64 ± 0.133	3.06 ± 0.066	3.12 ± 0.198	2.62 ± 0.310	3.13 ± 0.113	0.008	0.075
LTR 20	2.71 ± 0.142	2.96 ± 0.043	3.09 ± 0.097	2.81 ± 0.022	3.23 ± 0.175	0.044	0.009

Tab. A.6: Chlorophyll a/ b-Verhältnis unter verschiedenen Lichtbedingungen beim Wildtyp (WT) und den Mutantenlinien LTR 1 – 20. Pflanzen wurden auf MS-Platten angezogen und an PSI- oder PSII-Licht akklimatisiert bzw. zwischen den Lichtquellen gewechselt (PSI-II; PSII-I) sowie im Weißlicht (WL) untersucht. Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen ± Standardabweichung sind aufgeführt. Das Chl a/b-Verhältnis wurde als Indikator für die LTR verwendet. Werte von PSI-Pflanzen und PSI-II-Pflanzen ^{a)} bzw. von PSII-Pflanzen und PSII-I-Pflanzen ^{b)} wurden verglichen (Student's *t*-Test). *p*-Werte < 0.05 spiegeln signifikante Unterschiede wider. Die LTR verläuft wie beim Wildtyp. Werden keine signifikanten Unterschiede detektiert (*p*>0.05) deutet das entweder auf relativ große Schwankungen der Meßwerte (siehe Standardabweichungen) oder eine Beeinträchtigung der LTR hin.

Publikationen

Aus dieser Arbeit sind während der Promotionszeit folgende Publikationen hervorgegangen:

Fey, V., R. Wagner, K. Bräutigam, M. Wirtz, R. Hell, A. Dietzmann, D. Leister, R. Oelmüller and T. Pfannschmidt (2005). "Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* **280**(7): 5318-28.

Fey, V., R. Wagner, K. Bräutigam and T. Pfannschmidt (2005). "Photosynthetic redox control of nuclear gene expression." *J Exp Bot* **56**(416): 1491-8.

Wagner, R., K. Bräutigam and T. Pfannschmidt (2006). "Die Photosynthese Ein Umweltsensor, der Gene reguliert." *Bioforum* **1**: 57-59.

Bräutigam, K., L. Dietzel and T. Pfannschmidt (2007). "Plastid-nucleus communication: Anterograde and retrograde signalling in the development and function of plastids." *Topics in Current Genetics* **19**: 409-455

Dietzel, L., K. Bräutigam and T. Pfannschmidt (2007). "The functional relationship of state transitions and long-term light quality acclimation." *FEBS Journal*, **im Druck**.

Wagner, R., L. Dietzel, K. Bräutigam, W. Fischer and T. Pfannschmidt (2007). "Long-term light quality acclimation is important for photosynthetic performance and physiology of *Arabidopsis thaliana* under low light conditions." *Plant Cell and Environment* **eingereicht**.

Bräutigam, K., A. Biehl, D. Wormuth, K. J. Dietz, D. Radke, P. Dörmann, N. Schauer, A. R. Fernie, S. N. Oliver, P. Geigenberger, D. Leister and T. Pfannschmidt (2007). "A binary redox control mode in gene expression and metabolism in plants." **eingereicht**.

Posterpräsentationen und Vorträge

Vorträge

Bräutigam, K. (2004). Control of nuclear gene expression by redox signals originating from the PET. Doktorandentreffen der Forschergruppe FOR 387, Jena

Bräutigam, K. (2005). Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. Mitteldeutsches Symposium der Pflanzenphysiologie, Wittenberg

Bräutigam, K; Fey, V; Wagner, R; Biehl, A; Leister, D; Pfannschmidt, T. (2005). Photosynthetic redox signals in chloroplast-to-nucleus communication. 14. Photosynthese-Workshop Nordwest, Bielefeld

- Bräutigam, K; Fey, V; Wagner, R; Biehl, A; Leister, D; Pfannschmidt, T. (2006). Photosynthetic redox signals control nuclear gene expression and represent a new class of plastid signals. Mitteldeutsche Pflanzenphysiologie-Tagung, Dresden
- Bräutigam, K; Biehl, A, Schauer, N; Fernie, A; Geigenberger, P; Leister, D; Pfannschmidt, T. (2006). Redox-controlled transcript and metabolite profiles in *Arabidopsis thaliana*. 1th International Workshop on Redox Regulation and Plant Signalling, Jena
- Bräutigam, K; Biehl, A, Schauer, N; Fernie, A; Geigenberger, P; Leister, D; Pfannschmidt, T. (2006). The impact of photosynthetic redox signals in chloroplast-to-nucleus communication. 15. Photosynthese-Workshop Nordwest, Aachen
- Bräutigam, K; Biehl, A, Schauer, N; Fernie, A; Geigenberger, P; Leister, D; Pfannschmidt, T. (2006). The impact of photosynthetic redox signals in chloroplast-to-nucleus communication. Jahrestagung der Internationalen Gesellschaft for Endocytobiologie, Sektion Deutschland, Marburg. **Auszeichnung mit dem Peter-Sitte-Preis**
- Bräutigam, K; Biehl, A, Schauer, N; Fernie, A; Geigenberger, P; Leister, D; Pfannschmidt, T. (2007). Photosynthetische Redoxsignale und ihre Rolle bei der Kommunikation zwischen Chloroplast und Zellkern. 20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen

Posterpräsentationen

- Fey, V; Wagner, R; Bräutigam, K, Pfannschmidt, T. Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. 13th International Congress on Photosynthesis, Montréal
- Bräutigam, K; Wagner, R; Dietzmann, A; Leister, D; Altschmied, L; Pfannschmidt, T. (2004). The impact of chloroplast redox signals on nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Deutsche Botanikertagung, Braunschweig
- Voigt, C, Bräutigam, K, Pfannschmidt (2006). Redox regulation of nuclear encoded genes - investigation of the special involvement of SigB. 15. Photosynthese-Workshop Nord-West, Aachen.

Weitere Aktivitäten

Forschergruppe FOR 387 „Redoxsteuerung als zentrales Regulativ der Anpassung von Organismen mit oxygener Photosynthese“: Organisation des Doktorandentreffens 2004 in Jena zusammen mit Raik Wagner.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Es wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters noch die Hilfe Dritter, nicht in dieser Arbeit erwähnter Personen, in Anspruch genommen. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, den 15.10.2007

Katharina Bräutigam

Lebenslauf

Persönliche Daten: Katharina Bräutigam, geb. 19.10.1976 in Halle / Saale

Anschrift: Mühlenstraße 97, 07745 Jena

Ausbildung:

- 1983-1989 Polytechnische Oberschule in Halle / Saale
- 1989-1991 Polytechnische Oberschule in Görlitz
- 1991-1995 Joliot-Curie-Gymnasium Görlitz
Abschluss: Abitur
- 1995-1997 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Abschluss: Vordiplom (Biologie)
- 1997-1998 School of Biological Sciences, Manchester, U.K.
Stipendiat des ERASMUS-Programmes
- 1998-2003 Friedrich-Schiller-Universität Jena
Ökologie, Kybernetik, Genetik, Mikrobiologie
Diplomarbeit: MPI für Chemische Ökologie, Jena
Thema: Transcription and sequence analysis of apomixis
candidate genes in natural populations of *Arabidopsis*
Abschluss: Diplombiologin (01/2003)
- 02-07 2003 Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena
Wissenschaftlich-technische Mitarbeit
Thema: Elicitoren pflanzlicher Abwehrmechanismen
- 2003-2007 Promotion bei PD. Dr. Thomas Pfannschmidt am
Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena
voraussichtlicher Abschluss: Dr. rer.nat.

Jena, den 15.10.2007

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Ohne ihre Unterstützung und Mitarbeit wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater PD. Dr. Thomas Pfannschmidt, der nicht nur diese Arbeit ermöglicht, sondern auch während der gesamten Zeit unterstützt und betreut hat. Für das Interesse, die zahlreichen Anregungen und gewinnbringenden Diskussionen, das entgegengebrachte Vertrauen, die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und nicht zuletzt für das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich herzlich bedanken.

PD. Dr. Klaus Appenroth danke ich für seine Unterstützung und die freundliche Übernahme des Koreferates. Prof. Dr. Bernhard Grimm danke ich ebenfalls für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Unserer Arbeitsgruppe sowie den Mitarbeitern des Institutes möchte ich für das freundliche Arbeitsklima, Diskussionen und Ratschläge danken. Insbesondere danke ich Meta Brost, der guten Seele unserer Arbeitsgruppe, für ihre technische Hilfe bei der Pflanzenanzucht, der Laborarbeit und der Lösung 1000er Probleme sowie die freundschaftliche und auch kulinarische Unterstützung. Auf gleiche Weise möchte ich mich herzlich bei Nicole Manthei für ihre technische Arbeit bedanken.

Meinen Laborkollegen Lars Dietzel, Patrick Frettinger, Ute Holtzegel, Paul Hein und Corinna Drzewiecki danke ich für interessante Diskussionen, Tips in Labor, Unterstützung und Ablenkungen. Christian Voigt und Doreen Köhler, die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten an diesem Thema mitgearbeitet haben, sei herzlich gedankt. Ebenso danke ich Yvonne, Sebastian, Alla, Raik und Vidal für Tips und Unterstützung.

Dr. Nic Schauer, Dr. Peter Geigenberger und Dr. Alidair Fernie danke ich für die Möglichkeit, in Golm Metolitprofilanalysen durchführen zu können. Prof. Dr. Dario Leister und Dr. Alexander Biehl danke ich für die Ermöglichung der Array-Analysen und die kurze, aber sehr interessante Zeit in Köln.

Prof. Dr. Karl-Josef Dietz und Dr. Dennis Wormuth danke ich für die ATP/ADP- und NADPH/NADP-Bestimmungen, Dr. Peter Dörmann für die Lipidmessungen und Dr. Sandra Oliver und Dr. Peter Geigenberger für NADP-MDH-Messungen.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich Stefan Heinen, der mich während der gesamten Zeit auf vielfältige Weise unterstützt und durch alle Höhen und Tiefen begleitet hat. Vielen Dank für deine Liebe, Inspiration, Motivation und Geduld.

