

Untersuchungen zur Funktion des plastidären
NDH-Komplexes
in
Nicotiana tabacum (Tabak)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefan Kösling
aus Bollate / Mailand
Juni 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: PD Dr. K. Steinmüller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2001

I. Einleitung	Seite
1. Der photosynthetische und der respiratorische Elektronentransport	1
2. Der mitochondrielle Komplex I	3
3. Der Komplex I-homologe NDH-Komplex in Plastiden	5
4. Der zyklische Elektronentransport	9
5. Hinweise auf die Funktionen des NDH-Komplexes	10
6. Die Chlororespiration in Plastiden und Algen	12
7. Regulation der photosynthetischen Elektronentransportkette und ihre Schutzmechanismen	13
8. Zielsetzung der Arbeit	15
II. Material & Methoden	
1. Material	
1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	16
1.2 Pflanzenmaterial	16
1.3 Bakterienstämme und Plasmide	16
1.4 Resistenzkassette 16S-aadA	17
1.5 Konstrukte	17
1.6 Antiseren	19
2. Methoden	
2.1 Pflanzenanzucht	
2.1.1 Anzucht im Gewächshaus	20
2.1.2 Anzucht in der Klimakammer	20
2.1.3 Anzucht in Gewebekultur	21
2.2 Methoden der DNA-Analyse	
2.2.1 DNA-Präparation aus Pflanzen	22
2.2.2 Southern-Transfer	22
2.2.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	22
2.2.4 Nachweis filtergebundener Nukleinsäuren	22
2.3 Methoden der Proteinanalyse	
2.3.1 Präparation von Plastiden und Thylakoidmembranen	23
2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
2.3.3 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine	24
2.4 Plastidentransformation	
2.4.1 Biolistische Transformationsmethode	24
2.4.2 Polyethylenglykol (PEG)-vermittelte Transformationsmethode	26
2.4.3 Selektion der Transformanten	27
2.4.4 Sichtung der Plastidentransformanten	27
2.5 Quantifizierung der Stärke	27
2.6 Analyse der Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	28

2.7 Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessungen	
2.7.1 Theoretische Grundlagen	30
2.7.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve	31
2.8 Messung der P700-Redox-Kinetiken	33
2.9 Verwendete Computerprogramme	34

III. Ergebnisse

1. Herstellung der Mutagenesekonstrukte und Transformation in Plastiden

1.1 Mutagenesekonstrukte für Untereinheiten des NDH-Komplexes	35
1.2 Transformation der Konstrukte in Tabakplastiden	39
1.2.1 Sichtung der Transformanten	39
1.2.2 Stabilität der Transformation	46
1.2.3 Proteinspiegel der Transformanten	
1.2.3.1 Immunoblot-Analyse der Photosystem I und II, der ATPase und der FNR	48
1.2.3.2 Immunoblot-Analyse des NDH-Komplexes	49

2. Morphologie der Mutanten 50

3. Stärkegehalt in Mutanten und Wildtyp 53

4. Aktivität der Photosysteme I und II und der physiologische Zustand der Elektronentransportkette

4.1. Funktionsfähigkeit des Photosystems II	59
4.1.1 Anregungseffizienz : exc von Photosystem II	59
4.1.2 Photochemische Effizienz : II von Photosystem II	64
4.1.3 Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A	69
4.2 Transienter Dunkelanstieg der Chlorophyllfluoreszenz	74

5. Untersuchungen zum photosynthetischen Elektronentransport

5.1 Relative Elektronentransportrate	78
5.2 Photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung (qP & qN)	82
5.2.1 Photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung bei Wildtyppflanzen	84
5.2.2 Photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung bei den NDH-Transformanten	89
5.2.2.1 Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus der Klimakammer	90
5.2.2.2 Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus dem Gewächshaus	
I. Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus der Frühjahrsanzucht	96
II. Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus der Sommeranzucht	112

6. Redox-Kinetiken des Photosystems I

6.1 Redoxzustand des Photosystems I	121
6.2 Rereduktion des Photosystems I	126

7. Analyse des Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung der NDH-Mutanten	127
IV. Diskussion	
1. Die <i>ndh</i> -Mutanten sind homoplastomisch	132
2. Die physiologischen Effekte der NDH-Mutation	133
3. Beobachtungen zur Chlororespiration und zum Stärkeabbau	137
4. Die Effekte des Insertionsortes der Resistenzkassette	138
5. Mögliche Rolle des NDH-Komplexes in Plastiden	139
6. Mögliche Ursachen für den geringen Anteil des NDH-Komplexes an den Thylakoidmembranproteinen, bzw. dem Fehlen des NDH-Komplexes	141
V. Zusammenfassung	143
VI. Literatur	145

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
α - ³² P-dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat, markiert mit radioaktivem Phosphor
BAP	6-Benylaminopurin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CIP-A	Chloroplasten-Isolationspuffer
°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETR	Elektronentransportrate
Fa	Firma
Fd	Ferredoxin
FMN	Flavomononukleotid
FNR	Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase
F	Fluoreszenz im Elektronenfließgleichgewicht
F _m	Maximale Fluoreszenz
F _v	Variable Fluoreszenz
F _o	Grundfluoreszenz
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationsbeschleunigung
H ⁺	Proton
h	Stunde
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
kb	Kilobasen
l	Liter
LHCII	Lichtsammelkomplex des Photosystems II
M	Molar
mA	Milliampere
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mOsm	Milliosmolar
NAA	á-Naphtaleneacetic acid
NAD(P)H	Nicotinamindinukleotid(phosphat)
NDH	NDH-Komplex in Plastiden und Cyanobakterien
nm	Nanometer

PCN	Protoplasten Kulturmedium <i>Nicotiana</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFD	Photonenflussdichte
PIN	Protoplasten Inkubationsmedium <i>Nicotiana</i>
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PTN	Protoplasten Transformationsmedium <i>Nicotiana</i>
PQ	Plastoquinon
PQH	Plastohydrochinon
P680	Reaktionszentrum Photosystem II
P700	Reaktionszentrum Photosystem I
p.a.	für die Analyse
PAM	Puls-Amplituden-Modulator
PFD	Photonenflussdichte
PS I/II	Photosysteme I und II
qE	Fluoreszenzlöschung durch den Aufbau eines Protonengradient
qN	nichtphotochemische oder energieabhängige Fluoreszenzlöschung
qI	photoinhibitorische Fluoreszenzlöschung
qP	photochemisches Fluoreszenzlöschung
qT	Fluoreszenzlöschung durch Phosphorylierung der Lichtsammelkomplexe II (LHCII)
Q _A	Chinon A, primärer Elektronenakzeptor Photosystem II
SDS	Natriumdodecylphosphat
sek	Sekunde
TF	Transformante
Tris	N-Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Enzymeinheit
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
var.	Varietät
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
F _{exc}	Anregungseffizienz Photosystem II
FII	Photochemische Effizienz PSII
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μJ	Mikrojoule

I. Einleitung

Die Umwandlung von Lichtenergie durch die photosynthetische Elektronentransportkette und die Verwertung von Reduktionsäquivalenten aus dem Katabolismus durch die respiratorische Elektronentransportkette in chemische, für die Organismen verwertbare Energie ist ein universelles Prinzip der Energieversorgung in biologischen Systemen. Die Grundlage für diese Energieumwandlung bildet die chemiosmotische Theorie (Mitchell, 1961). Dabei werden in Folge des Elektronentransportes Protonen über eine Membran transloziert, die einen Protonengradienten aufbauen. Die protonenmotorische Kraft des Gradienten dient als Antrieb der ATP-Synthese über die ATPase.

In eukaryotischen Zellen laufen Photosynthese und Respiration in getrennten Organellen ab. Während die Photosynthese in den Plastiden von Algen und höheren Pflanzen stattfindet, erfolgt die Respiration in den Mitochondrien. Beide Organellen sind semiautonom und durch endosymbiotische Aufnahme aus prokaryotischen Vorläuferzellen entstanden (Howe *et al.*, 1992). Nach der Endosymbiose gingen viele der prokaryotischen Gene verloren oder wurden in den Zellkern der Wirtszelle transferiert. Ein Teil der prokaryotischen Gene blieben als Plastom in den Plastiden und als Chondriom in den Mitochondrien erhalten (Wolfe *et al.*, 1991; Martin & Herrmann, 1998).

1. Der photosynthetische und der respiratorische Elektronentransport

Der photosynthetische Elektronentransport findet in der Thylakoidmembran statt. Dabei werden Elektronen aus dem Wasser über verschiedene Proteinkomplexe auf NADP^+ übertragen. Das entstandene $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wiederum wird im anschließenden Calvin-Zyklus zur Fixierung von CO_2 gebraucht. Die photosynthetische Elektronentransportkette der Plastiden besteht aus den drei Proteinkomplexen Photosystem I, Photosystem II und Cytochrom b_6/f , sowie den beweglichen Elektronenüberträgern Plastochinon und Plastocyanin zwischen den Komplexen (Abb. 1).

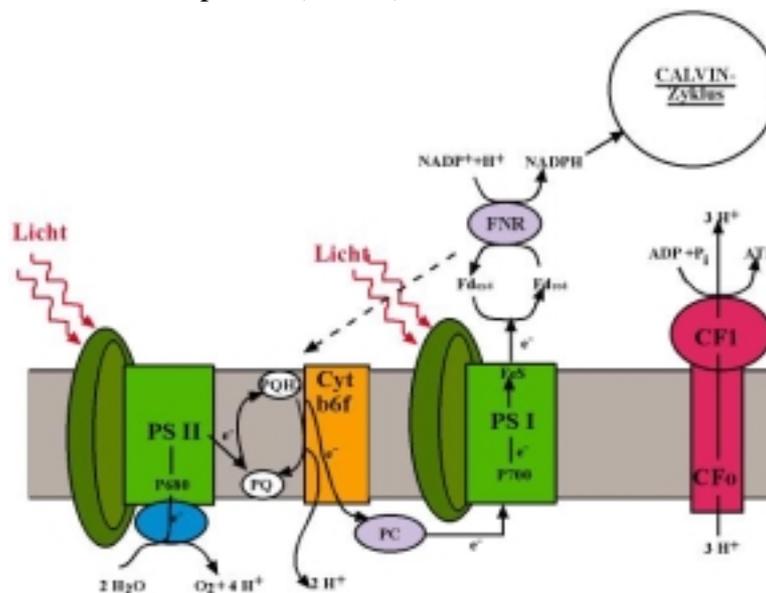


Abb. 1: Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette. Dargestellt sind die Komponenten der Elektronentransportkette und die ATPase, sowie der Weg der Elektronen im linearen und zyklischen Elektronentransport.

PS II: Photosystem II, PS I: Photosystem I, Cyt b_6/f : Cytochrom b_6/f , PQ: Plastochinon, PQH: Plastohydrochinon, PC: Plastocyanin, P680/P700: Reaktionszentren der Photosysteme II und I, $\text{Fd}_{\text{red/oxd}}$: Ferredoxin reduziert/oxidiert, FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase, CF_0/CF_1 : Subkomplexe der ATPase

Die absorbierte Lichtenergie des Photosystems II setzt bei der Wasserspaltung Elektronen frei, die auf das negativere Redoxpotential des primären Akzeptors Q_A gehoben werden. Von Q_A fließen sie dann entsprechend dem Potentialgefälle über den Cyt b_6/f -Komplex zum Photosystem I. Dort werden sie abermals durch die absorbierte Lichtenergie auf ein negatives Redoxpotential gehoben, von wo aus sie über Ferredoxin, mit Hilfe der Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR), auf $NADP^+$ übertragen werden. Die freiwerdende Energie beim Transfer von Photosystem II auf den Cytochrom b_6/f - Komplex wird von letzterem dazu verwendet, Protonen über die Membran zu translozieren. Dabei ist der Cytochrom b_6/f - Komplex keine Protonenpumpe im eigentlichen Sinne, da die translozierten Protonen aus der Oxidation des Plastohydrochinons im Q-Zyklus stammen. Der Elektronentransfer zwischen den Komplexen erfolgt durch bewegliche Elektronenüberträger. Das Plastochinon überträgt Elektronen zwischen dem Photosystem II und dem Cytochrom b_6/f - Komplex und das Plastocyanin zwischen dem Cytochrom b_6/f - Komplex und dem Photosystem I (Cramer *et al.*, 1991). Das Plastochinon kann in der Membran diffundieren, während das Plastocyanin wasserlöslich ist und im Thylakoidlumen diffundiert.

Neben dem beschriebenen linearen Elektronentransport existiert in den Plastiden und in Cyanobakterien ein zyklischer Elektronentransport (Arnon *et al.*, 1954), der unter Normalbedingungen weniger als 10 % am gesamten Elektronentransport ausmacht (Bendall & Manasse, 1995). Beim zyklischen Elektronentransport fließen die Elektronen nicht über das Ferredoxin und die FNR auf $NADP^+$, sondern kehren über das Ferredoxin in den Plastochinonpool zurück. Von dort aus gelangen sie über die gleichen Komponenten wie bei dem linearen Elektronentransport zurück zum Photosystem I. Beim zyklischen Elektronentransport entsteht kein NADPH, sondern es wird ein Protonengradient zur ATP-Synthese aufgebaut. Ungeklärt sind die genaue Identität der Redoxkomponenten und der genaue Eintrittsort der Elektronen in die lineare Elektronentransportkette (Bendall & Manasse, 1995). Auf den zyklischen Elektronentransport wird später näher eingegangen (I.4).

Die mitochondrielle Atmungskette befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und besteht aus vier Enzymkomplexen (Komplex I-IV). Der Komplex I oder die NADP-Ubichinon-Oxidoreduktase bildet die Eintrittsstelle für die Elektronen in die Atmungskette. Dabei wird $NADH$ zu NAD^+ oxidiert und die frei werdenden Elektronen werden über ein Flavinmononukleotid (FMN) und mehrere Eisen-Schwefel-Zentren auf Ubichinon, einen mobilen Redoxträger in der Membran, übertragen. Das entstandene Ubichinol wird vom Komplex III (Cytochrom b/c_1) oxidiert und die Elektronen auf das wasserlösliche Cytochrom c übertragen. Im letzten Schritt der Atmungskette wird das Cytochrom c über den Komplex IV (Cytochrom- c -Oxidase) oxidiert und die Elektronen auf den terminalen Akzeptor Sauerstoff übertragen. Der Elektronentransport ist bei jedem Schritt mit einer Protonentranslokation über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt. Der Protonengradient dient einer ATPase zur ATP-Synthese. Neben den erwähnten Komplexen gibt es noch den Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), der zwar Elektronen auf Ubichinon überträgt, aber dabei keine Protonen über die Membran transloziert (Weiss *et al.*, 1991; Walker 1992).

2. Der mitochondrielle Komplex I

Der einfachste Komplex I ist aus *Escherichia coli* bekannt. Er besteht aus 14 verschiedenen Untereinheiten, die in allen bisher bekannten Komplex I nachgewiesen werden konnten. Da es der bisher kleinste funktionsfähige Komplex I ist, wird er als Minimalkomplex bezeichnet (Leif *et al.*, 1993; Friedrich *et al.*, 1995). Der bakterielle Minimalkomplex hat eine Größe von circa 530 kDa. Die Gene *nuoA* - *nuoN* sind alle in einem Operon, dem *nuo*-Operon, organisiert. Untersuchungen haben gezeigt, dass in *E. coli* und *Buchnera aphidicola* die Untereinheiten NuoC und -D zu einer Untereinheit NuoCD verschmolzen sind (Clark *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 1998).

In Eukaryoten besitzt der mitochondrielle Komplex I, außer den 14 Untereinheiten des sogenannten Minimalkomplexes, eine große Anzahl zusätzlicher Untereinheiten. Im Ascomyceten *Neurospora crassa* besteht der Komplex aus insgesamt 27 Untereinheiten (Schulte *et al.*, 1994) und in den Mitochondrien des Rinderherzens aus 43 Untereinheiten (Walker 1992). Sieben hydrophobe Untereinheiten des Komplexes I, die Homologien zum sogenannten Minimalkomplex aufweisen, sind mitochondriell codiert. Alle zusätzlichen Untereinheiten und vier weitere Untereinheiten mit Homologien zum Minimalkomplex sind nukleär codiert. Die zusätzlichen Untereinheiten dienen wahrscheinlich dazu, den funktionellen Minimalkomplex zu umhüllen, um das Entweichen von Elektronen zu verhindern, die ansonsten reaktive Sauerstoffradikale bilden könnten (Guénebaut *et al.*, 1998). Zwei der zusätzlichen Untereinheiten mit einer Größe von 10 kDa und 40 kDa haben wahrscheinlich eine Funktion in Biosynthesewegen (Runswick *et al.*, 1991; Fearnley *et al.*, 1992). Das 10 kDa große Protein gehört zu den Acylcarrier-Proteinen. Die Deletion dieses Proteins in *Neurospora crassa* führte dazu, dass der Komplex I nicht mehr richtig assembliert wurde (Schneider *et al.*, 1997). Das 40 kDa Protein ist mit einer Hydroxysteroid-Reductase/Isomerase verwandt und spielt wahrscheinlich in der Biosynthese einer bisher noch nicht eindeutig identifizierten Redoxgruppe des Komplexes I eine Rolle (Schulte *et al.*, 1999).

Der bakterielle und der mitochondrielle Komplex bilden eine L-förmige Struktur mit etwa gleich langen Armen von circa 25 nm (Grigorieff *et al.*, 1998; Guénebaut *et al.*, 1998). Ein Teil der L-förmigen Struktur ist in die Membran integriert, während der andere Teil in den mitochondriellen Matrixraum ragt. In Abbildung 2 ist der Komplex I aus *E. coli* und *N. crassa* abgebildet und man erkennt, dass sich die Komplexe nur in der Ausdehnung unterscheiden. Die Struktur der Komplexe wurde aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen hergeleitet (Guénebaut *et al.*, 1998).

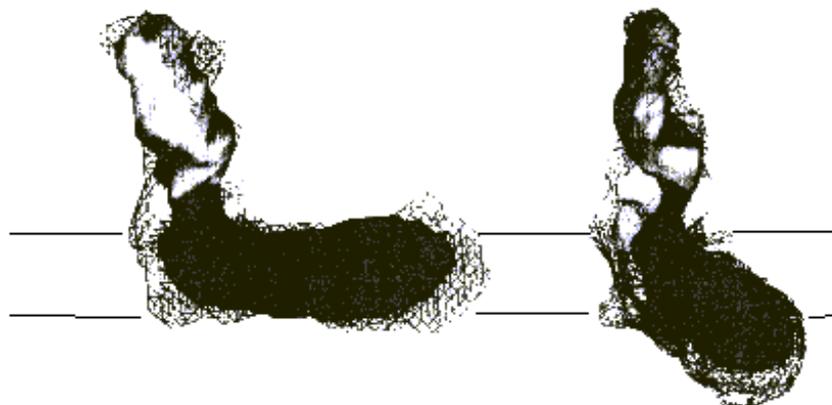


Abb. 2: Modell des Komplexes I aus *Escherichia coli* und *Neurospora crassa*. Das ausgefüllte Modell zeigt den *E.coli* - Komplex und das Gittermodell den Komplex I aus *N. crassa*. (nach Guénebaut *et al.*, 1998).

Man kann den Komplex in drei verschiedene Subkomplexe unterteilen. Der NADH-Dehydrogenase-Subkomplex besteht aus den drei Untereinheiten NuoE/-F/-G und bildet die Eintrittsstelle der Elektronen. Die NADH-Bindestelle, das Flavinmononukleotid und die Mehrzahl der Eisen-Schwefel-Zentren sind in diesem Subkomplex lokalisiert. Der NADH-Dehydrogenase-Subkomplex sitzt auf dem verbindenden Fragment, das aus den vier Untereinheiten NuoB/-C/-D und -I besteht und ein Eisen-Schwefelzentrum trägt. Das NADH-Dehydrogenase-Fragment und das verbindende Fragment bilden zusammen den membranperiphere Arm. Das membranintegrale Fragment besteht aus den restlichen sieben Untereinheiten und verankert den Komplex in der Membran. Im membranintegralen Fragment befindet sich die Ubichinon-Bindestelle, sowie mindestens eine weitere, bisher noch nicht identifizierte Redoxgruppe (Leif *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1998). Die Untereinheiten konnten zwar den jeweiligen Fragmenten zugeordnet werden, die genaue Lage und die Stöchiometrie der Untereinheiten ist jedoch nicht genau bekannt. Untersuchungen durch Fraktionierung des Komplexes aus Rinderherzmitochondrien ordnen die Untereinheiten NuoD und -F dem vorderen Teil des membranintegralen Fragments und die Untereinheiten NuoA/-H/-K/-N dem hinteren Teil, unterhalb des membranperipheren Fragments, zu (Sazanov *et al.*, 2000). Die folgenden Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Untereinheiten des bakteriellen Komplex I und homologer Komplexe I aus Säuger und Pflanzen, sowie ihre Lokalisation in den Subkomplexen und ihre vermutete Funktion.

Tab. 1: Untereinheiten des bakteriellen Komplex I und homologer mitochondrialer Komplexe I aus Säuger und Pflanzen, sowie ihre Lokalisation und die vermutete Funktion nach Friedrich & Scheide (2000). MF: membranintegrales Fragment; VF: verbindendes Fragment; NADH-DH-F: NADH-Dehydrogenase-Fragment

<i>E.coli</i>	Mitochondrien (Säuger)	Mitochondrien (Pflanzen)	Lokalisierung	vermutete Funktion
Nuo	Nd	Nad		
A	3	3	MF	
B	PSST	22	VF	
C ^{*1}	30kD	9	VF	H ⁺ -Kanal
D ^{*1}	49kD	7	VF	H ⁺ -Kanal
E	24kD	24	NADH-DH-F	
F	51kD	55	NADH-DH-F	NADH-Bindung/FMN
G	75kD	75	NADH-DH-F	
H	1	1	MF	Ubichinon-Bindestelle
I	TYKY	28,5	VF	
J	6	6	MF	H ⁺ -Translokation
K	4L	4L	MF	
L	5	5	MF	H ⁺ -Translokation
M	4	4	MF	H ⁺ -Translokation
N	2	2	MF	H ⁺ -Translokation

^{*1} in *E.coli* und *B. aphidicia* zu NuoCD

Der modulare Aufbau spiegelt sich auch in der Evolution des Enzymkomplexes wider. Wahrscheinlich entstand der Komplex I aus verschiedenen Enzymkomplexen, die Elektronen transportieren konnten. Aufgrund von Sequenzhomologien der sechs Untereinheiten NuoB/-C/-D/-H/-I und -L des Komplexes I zu Untereinheiten einer membrangebundenen Nickel-Eisen-Hydrogenasen (Ni-Fe-Hydrogenasen) geht man von einem gemeinsamen Vorläufer aus. Nach Friedrich und Scheide (2000) kann man sich die Evolution wie folgt vorstellen: Eine ursprüngliche elektronentransferierende Hydrogenase (NuoB/-D) bildete mit einem

Transportprotein für Ionen (NuoL), einem chinonbindenden Protein (NuoH), einem Vorläufer des Ferredoxin (NuoI) und einem unbekanntem Protein (NuoC) den gemeinsamen Vorläufer des Komplex I und der membrangebundenen Ni-Fe-Hydrogenase. Dieser Vorläuferkomplex dürfte als eine protonenpumpende Wasserstoff-Ferredoxin-Oxidoreduktase funktioniert haben. Durch Addition weiterer Membranproteine und spezifischer Substratbindepoteine haben sich die heutigen membrangebundenen Ni-Fe-Hydrogenasen entwickelt. Bei der Weiterentwicklung zum Komplex I gingen die Bindemotive für das Nickel verloren und es kamen die Untereinheiten NuoA/-J und -K hinzu, sowie nach einer Verdreifachung des Transportproteins NuoL die Untereinheiten NuoM und -N. Der so entstandene Enzymkomplex aus elf Untereinheiten dürfte als Ferredoxin-Ubichinon-Oxidoreduktase gearbeitet haben. Durch Hinzufügen des NADH-Dehydrogenase-Fragments (NuoE/-F/-G) entstanden im letzten Schritt der bakterielle und durch Endosymbiose der mitochondrielle Komplex I.

3. Der Komplex I-homologe NDH-Komplex in Plastiden

Bei der vollständigen Sequenzierung der Plastidengenome von *Marchantia polymorpha* (Ohyama *et al.*, 1986), *Nicotiana tabacum* (Shinozaki *et al.*, 1986) und *Oryza sativa* (Hiratsuka *et al.*, 1989) wurden elf Gene (*ndhA-K*) identifiziert, die hohe Homologien zu Untereinheiten des mitochondrialen Komplex I aufwiesen (Ohyama, 1988). Aufgrund der Sequenzhomologien zum Komplex I wurde das von den *ndh*-Genen kodierte Enzym zunächst als NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreduktase bezeichnet. Da die Funktion bisher noch nicht eindeutig geklärt ist, wird der Komplex inzwischen nur noch als NDH-Komplex bezeichnet

Die zu den elf plastidären Untereinheiten homologen Untereinheiten aus dem Komplex I sind Bestandteile des sogenannten Minimalkomplexes aus *E. coli* (Friedrich *et al.*, 1995). Auch in Cyanobakterien, zuerst in *Synechocystis sp. PCC 6803*, wurden *ndh*-Gene gefunden (Steinmüller *et al.*, 1989; Ogawa 1991; Eilersiek & Steinmüller, 1992; Steinmüller 1992). Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte sich, dass der NDH-Komplex aus den Cyanobakterien eine größere Ähnlichkeit zu dem plastidären Komplex zeigt, als zu dem mitochondrialen Komplex I (Tab. 2).

Tab. 2: Bezeichnung und Aminosäureähnlichkeit der Untereinheiten des NDH-Komplex aus Plastiden und Cyanobakterien und der homologen Untereinheiten im Komplex I aus *E. coli* und Rinderherzmitochondrien.

Bezeichnung	NUO	ND	Ähnlichkeiten zu NDH aus Tabakplastiden (%)		
			Cyanobakterien	<i>E.coli</i>	Mitochondrium (Rind)
NDH	<i>E. coli</i>	Mitochondrium (Rind)			
Plastiden/ Cyanobakterien					
A	H	1	52	39	35
B	N	2	55	32	26
C	A	3	63	32	29
D	M	4	52	33	28
E	K	4L	60	37	27
F	L	5	49	37	29
G	J	6	40	26	17
H	D	49kD	72	36	41
I	I	TYKY	64	25	27
J	C	30kD	53	33	27
K	B	PSST	56	37	44

In den meisten bisher untersuchten Plastomen konnten Gene für den NDH-Komplex nachgewiesen werden (z.B. Maier *et al.*, 1995), wobei in der sehr primitiven Alge *Nephroselmis olivacea*, mit dem bisher ursprünglichsten bekannten Plastidengenom, das *ndhJ*-Gen fehlt (Turmel *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu dem mitochondriellen Komplex I sind alle bekannten Untereinheiten des NDH-Komplexes auf dem Plastidengenom kodiert.

In parasitären Pflanzen wie *Cuscuta reflexa* (Haberhausen *et al.*, 1992) und *Epifagus virginiana* (Morden *et al.*, 1991), sowie in den Algen *Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis* (Hallik *et al.*, 1993), *Cyanophora paradoxa* (Löffelhardt *et al.*, 1994), *Guillardia theta* (Douglas & Penny, 1999) und *Chlorella vulgaris* (Wakasugi *et al.*, 1997) wurden keine *ndh*-Gene gefunden. Für das Fehlen der *ndh*-Gene in den Plastidengenomen aus Algen wird ein Transfer dieser Gene im Laufe der Evolution in den Zellkern postuliert (Wakasugi *et al.*, 1997). In höheren photosynthesetreibenden Pflanzen fehlen dem Plastidengenom von *Pinus thunbergii* funktionsfähige *ndh*-Gene. Die Gene für die Untereinheiten NDH-A/-F/-G und -J fehlen vollständig und die übrigen sieben *ndh*-Gene liegen nur als Pseudogene vor, d.h. sie werden nicht transkribiert und translatiert. Dabei fehlen den Genen *ndhB*/-D/-H und -I ganze Sequenzabschnitte und die Gene *ndhC*/-E und -K weisen Stopcodons, Leserasterverschiebungen und Insertionen auf. Vergleiche mit den Plastomen anderer höherer Pflanzen zeigen, dass das Plastom von *Pinus thunbergii* umfangreiche Rearrangements aufweist. Die Gründe für den Verlust funktioneller *ndh*-Gene in *Pinus thunbergii* sind noch völlig ungeklärt (Wakasugi *et al.*, 1994)

Die plastidären *ndh*-Gene liegen in vier Transkriptionseinheiten vor (Abb.3). Die Gene für die Untereinheiten NdhC/-K/-J liegen in einem Operon im Large-Single-Copy-Bereich (LSC) des Plastoms, das *ndhB*-Gen existiert in zwei Kopien und ist im linken und rechten Inverted-Repeat-Bereich (IR) lokalisiert. Die übrigen *ndh*-Gene liegen alle im Small-Single-Copy-Bereich (SSC). Dabei liegt das *ndhF*-Gen von den anderen Genen (*ndhH*/-A/-I/-G/-E/-D) getrennt, die ebenfalls in einem Operon angeordnet sind. Zwischen den Genen *ndhE* und *ndhD* liegt noch das *psaC*-Gen, das eine Untereinheit des Photosystems I kodiert. Bis auf die Gene *ndhA* und -B sind alle *ndh*-Gene intronfrei.

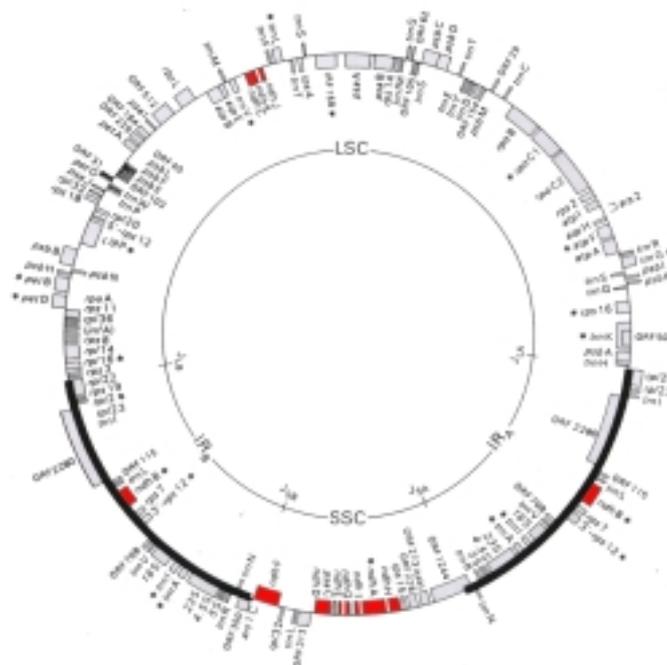


Abb. 3: Plastomkarte von *Nicotiana tabacum*. Die *ndh*-Gene sind rot markiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die *ndh*-Gene in den Plastiden transkribiert werden (Matsubayashi *et al.*, 1987; Schantz & Bogorad, 1988; Steinmüller *et al.*, 1989). Das Transkriptionsmuster für die *ndh*-Gene ist in den einzelnen Prozessierungsschritten noch nicht eindeutig geklärt (Kanno & Hirai, 1993; Kubicki *et al.*, 1996; Oczkowski *et al.*, 1997). Die *ndh*-Gene, vor allem *ndhA*, *-D* und *-B*, sind Gegenstand intensiver Untersuchungen zur RNA-Editierung (z.B. Hirose *et al.*, 1999; Campo del *et al.*, 2000).

Bei einer Größe von circa 700 kDa macht der NDH-Komplex circa 0,2% der Gesamtproteine der Thylakoidmembran aus, d.h. auf einhundert photosynthetische Reaktionszentren kommt ein NDH-Komplex (Sazanov *et al.*, 1996; Burrows *et al.*, 1998). In den Plastiden wurde der Komplex auf den Stromathylakoiden lokalisiert (Nixon *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1993; Funk 1997; Quiles *et al.*, 1999) und in Cyanobakterien sowohl auf der Cytoplasma- als auch auf der Thylakoidmembran (Berger *et al.*, 1991).

Die elf NDH-Untereinheiten in Plastiden und Cyanobakterien konnten den jeweiligen homologen Untereinheiten in den Teilkomplexen des Komplexes I aus *E. coli* zugeordnet werden. Die sieben Untereinheiten NDH-A/-B/-C/-D/-E/-F und -G bilden das membran-integrale Fragment des Komplexes. Die Untereinheiten NDH-H/-I/-J/-K entsprechen dem verbindenden Fragment im membranperipheren Teilkomplex (Walker *et al.* 1992). Bisher konnten aber noch keine Gene oder Proteine für das NADH-Dehydrogenase-Fragment identifiziert werden. Bei den Isolierungen des Gesamtkomplexes (Cuello *et al.*, 1995; Sazanov *et al.*, 1998; Matsuo *et al.*, 1998) oder von Teilen des Komplexes (Berger *et al.*, 1993; Sazanov *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 1999) aus Plastiden von Kartoffel, Erbse und Mais, sowie dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. PCC 6803* wurden keine entsprechenden Proteine gefunden. In der Aufreinigung von Sazanov *et al.* (1998) konnten zwar Proteine mit Massen ähnlich denen des Dehydrogenase-Fragments nachgewiesen werden, aber eine eindeutige Identifizierung dieser Proteine ist bisher noch nicht erfolgt. Entweder fehlt das Dehydrogenase-Fragment in dieser Form völlig oder ist, ähnlich wie Untereinheiten des Komplex I, im Kern kodiert und wird in die Plastiden importiert. Ein im Genom von *Solanum tuberosum* kodiertes Homolog zu *nuoF* konnte als Untereinheit des Dehydrogenase-Fragmentes des mitochondrialen Komplex I identifiziert werden. Importstudien mit isolierten Plastiden konnten keinen Import des Proteins in die Chloroplasten nachweisen (Grohmann *et al.*, 1996).

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf das Fehlen eines Komplex I-typischen NADH-Dehydrogenase-Fragment lieferte die vollständige Sequenzierung des Genoms des Cyanobakteriums *Synechocystis sp. PCC 6803* (Kaneko *et al.*, 1996). Dabei wurden jedoch Homologien zwischen den Untereinheiten NuoE/-F/-G des NADH-Dehydrogenase-Fragments aus dem Komplex I von *E. coli* und den Untereinheiten HoxE/-F/-U der Diaphorase-Domäne einer bidirektionalen NAD(P)H-Hydrogenase gefunden. Die drei Gene bilden zusammen mit Genen für die Untereinheiten HoxY und -H aus der Hydrogenase-Domäne das *hoxS*-Operon (Appel & Schulz, 1996). Der Aufbau der NAD(P)H-Hydrogenase aus *Synechocystis sp. PCC 6803* lässt sich mit dem Aufbau einer reversiblen Ni-Fe-Hydrogenase aus dem chemolithotrophen Purpurbakterium *Alcaligenes eutrophus* vergleichen (Tran-Betcke *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1992). Der Diaphoraseteil, der aus HoxF und -U besteht, trägt ein nicht-kovalent gebundenes Flavinmononukleotid und drei Eisen-Schwefel-Zentren und besitzt NADH-Oxidoreduktase-Aktivität. Die Hydrogenase-Domäne, bestehend aus HoxY und -H, trägt als prosthetische Gruppe ein Ni-Atom, sowie zwei Eisen-Schwefel-Zentren.

Tab. 3 Homologiebeziehungen zwischen Untereinheiten des NADH-Dehydrogenase-Fragments aus dem Komplex I (*E.coli*) und Untereinheiten einer bidirektionalen Ni-Fe-Hydrogenase (*A. eutrophus* / *Synechocystis PCC 6803*):

<u>Komplex I</u>	<u>Ni-Fe-Hydrogenase</u>		
<i>E.coli</i>	<i>A. eutrophus</i>	<i>Synechocystis PCC 6803</i>	
NuoE	HoxF (N-Terminus)	HoxE	
NuoF	HoxF (C-Terminus)	HoxF	FMN / NADH- Bindestelle
NuoG (N-Terminus)	HoxU	HoxU	Fe-S-Zentren

Aufgrund der gefundenen Homologien wurde für die Cyanobakterien vorgeschlagen, dass die Hydrogenase mit dem „Rumpfkomples“ des NDH-Komplexes, bestehend aus membran-integralen und verbindendem Fragment, assoziiert, und so das NADH-Dehydrogenase-Fragment bildet (Schmitz & Bothe, 1996; Appel & Schulz 1996, 1998).

Offen ist, ob die ganze bidirektionale Hydrogenase mit dem Rumpfkomples assoziiert vorliegt, so dass neben NADH auch Wasserstoff oxidiert wird und die Elektronen auf Plastochinon übertragen werden, oder ob nur das Diaphorasefragment assoziiert ist und somit die H₂-Oxidation wegfällt. Bei der Assoziation der ganzen bidirektionalen Hydrogenase wäre auch ein reverser Elektronentransport denkbar, d.h. dass Elektronen aus dem Plastochinonpool über den NDH-Komplex NAD(P)⁺ reduzieren könnten. Ein vergleichbarer Weg ist aus den Prokaryoten *Thiobacillus ferrooxidans* und *Rhodobacter capsulatus* bekannt. In diesen Prokaryoten konnte unter Mangelbedingungen ein reverser Elektronentransport über den Komplex I auf NAD⁺ nachgewiesen werden. Dabei hydrolysiert die ATPase ATP und der Protonenfluss kehrt sich um, so dass der Komplex I NAD⁺ zu NADH reduziert. Mit dem reversen Elektronentransport stellen diese Organismen Reduktionsäquivalente für die CO₂-Fixierung zur Verfügung (Herter *et al.*, 1998; Elbethi *et al.*, 2000).

Die spezifische Aktivität des NDH-Komplexes für NADPH oder für NADH ist weiterhin ungeklärt. Obwohl in Untersuchungen gezeigt wurde, dass sowohl NADPH als auch NADH verwertet wurde, konnten die gemessenen Aktivitäten nicht eindeutig dem NDH-Komplex zugeordnet werden (Guedeney *et al.*, 1996; Corneille *et al.*, 1998; Teicher & Scheller 1998).

In den sequenzierten Plastomen höherer Pflanzen wurden keine den *hox*-Genen homologe Sequenzen gefunden. Für das fehlende Dehydrogenase-Fragment werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Eine Möglichkeit wäre, dass die entsprechenden Gene nach der Endosymbiose ins Genom gelangt sind, oder die Plastiden das NADH-Dehydrogenase-Fragment in Komplex I-typischer Form während der Evolution sekundär verloren haben.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der NDH-Komplex in Plastiden nur aus membranintegralen und verbindendem Fragment besteht und über einen mobilen Elektronenträger direkt reduziert wird. Als Kandidat kommt das Ferredoxin, das neben der NADP-Reduktion auch an anderen reduktiven Prozessen in Plastiden beteiligt ist, in Frage. In diesem Falle wäre der Komplex als Ferredoxin-Plastochinon-Oxidoreduktase in den Plastiden aktiv (Friedrich *et al.*, 1995). Damit ist der Komplex ein möglicher Kandidat für das gesuchte Bindeglied im zyklischen Elektronentransport, das den Rückfluss der Elektronen in die Elektronentransportkette der Thylakoidmembran katalysiert (Abb. 1).

Eine Reduktion des NDH-Komplexes durch die Assoziation mit der Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR), bei der die Elektronen vom NADPH über die FNR und den Rumpfkomples auf Plastochinon übertragen würden, wird als wahrscheinlichste Möglichkeit diskutiert

(Cuello *et al.* 1995; Guedeney *et al.*, 1996; Quiles & Cuello 1998; Funk *et al.*, 1999). Das Modell der Interaktion zwischen der FNR und dem NDH-Komplex ist jedoch umstritten (Sazanov *et al.*, 1996; Endo *et al.*, 1997; Burrows *et al.*, 1998; Teicher & Scheller 1998; Corneille *et al.*, 1998). Physiologische Messungen an Cyanobakterien (Van Thor *et al.*, 2000) und an Chloroplasten (Shahak *et al.*, 1981) zeigten eine Beteiligung der FNR am zyklischen Elektronentransport.

Auch in diesem Fall könnte der Gesamtkomplex aus NDH-Komplex und FNR am zyklischen Elektronentransport beteiligt sein. Daher soll dieser Prozess im folgenden näher erläutert werden.

4. Der zyklische Elektronentransport

Wie bereits beschrieben fließen die Elektronen beim zyklischen Elektronentransport vom Ferredoxin zurück zum Plastochinon. Von dort gelangen sie über den Cytochrom b_6/f – Komplex und das Plastocyanin wieder zum Photosystem I, das diesen Prozess antreibt. Bei diesem Prozess entstehen keine Reduktionsäquivalente in Form von NADPH, sondern die Lichtenergie wird nur zum Aufbau eines Protonengradienten und damit zur ATP-Produktion genutzt.

Eine Hauptaufgabe des zyklischen Elektronentransports besteht wahrscheinlich im Aufrechterhalten des ATP/NADPH-Quotienten für eine effektive CO_2 -Fixierung. Der ATP/NADPH-Quotient hängt von der Protonenstöchiometrie der ATPase, d.h. dem H^+/ATP -Verhältnis, ab. Für die Synthese von einem ATP werden 4 Protonen gebraucht (Kobayashi *et al.*, 1995) und für die Produktion von einem NADPH werden 6 Protonen über die Membran verlagert (Cramer *et al.*, 1996), was einen ATP/NADPH-Quotienten von 1.5 zur Folge hat. Der Wert von 1.5 ist jedoch ein idealer Wert, in dem die geringen Leckströme der Thylakoidmembran und der ATP-Verbrauch bei der Stärkesynthese nicht berücksichtigt wurden. Der reale Wert für das ATP/NADPH-Verhältnis dürfte bei einem Wert von 1.3 liegen. Die beschriebenen Werte wurden bereits früher in Spinat und Cyanobakterien gemessen (Bakels *et al.*, 1993). Der lineare Elektronentransport kann den geforderten $\text{H}^+/\text{Elektron}$ -Quotient von 3 und den ATP/NADPH-Quotienten von 1.5 nicht völlig gewährleisten, so dass zusätzliche Protonen, bzw. ATP, über den zyklischen Elektronentransport bereitgestellt werden müssen (Berry & Rumberg, 1999).

Eine besondere Bedeutung kommt dem zyklischen Elektronentransport im Metabolismus der C_4 -Pflanzen zu. Bei diesem Weg der CO_2 -Fixierung werden 3 zusätzliche ATP benötigt, da das ATP/NADPH-Verhältnis bei 2,5 liegt (Hatch, 1987). Das zusätzliche ATP wird über den zyklischen Elektronentransport in den Bündelscheidenzellen bereitgestellt (Chapmann *et al.*, 1980).

Darüber hinaus stellt der zyklische Elektronentransport ATP für andere energieverbrauchende Prozesse zur Verfügung. So konnte eine Erhöhung der Aktivität des zyklischen Elektronentransports im Zusammenhang mit dem Protonentransport in die Vakuole (Yin *et al.*, 1991) und der Nitratassimilation, die ein höheres ATP/NADPH-Verhältnis braucht, gezeigt werden (Turpin & Bruce, 1990).

Auch bei der Regulation von Stressantworten, wie bei Hitze- und Salzstress, sowie der Regulation, bzw. dem Schutz der Photosynthese, spielt der zyklische Elektronentransport eine wichtige Rolle (Canaani *et al.*, 1989; Canaani, 1990). Bei Starklicht oder Begrenzung des CO_2 -Angebots kann der zyklische Elektronentransport die Elektronentransportkette auf verschiedenen Wegen vor einer Überreduktion schützen. Durch das Absenken des intrathylakoiden pH-Wertes und der Erhaltung des Protonengradienten zur ATP-Synthese kommt es zu einer Reduktion der Photosystem II-Aktivität und einer Erhöhung der nicht-

photochemischen Energiedissipation (Heber & Walker, 1992; Heber *et al.*, 1995; Gerst *et al.*, 1995; Bukhov *et al.*, 1999; Cornic *et al.*, 2000)

Die Regulation des zyklischen Elektronentransport findet vor allem durch das NADP/NADPH-Verhältnis statt. Wenn NADPH nicht mehr effizient über die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase im Calvin-Zyklus oxidiert wird, wird der zyklische Elektronentransport verstärkt (Ivanov *et al.*, 1998).

Wie bereits erwähnt sind die Redoxträger für den Rückfluss der Elektronen von Photosystem I zum Plastochinon noch nicht eindeutig identifiziert. Das Lehrbuchmodell, wonach der Cytochrom b_6/f -Komplex direkt durch Ferredoxin reduziert wird und anschließend den Plastochinonpool reduziert, muss nach Bendall und Manasse (1995) korrigiert werden. Zur Zeit werden für die Elektroneneinspeisung in den Plastochinonpool zwei Modelle, nämlich der ferredoxinabhängige und der NAD(P)H-abhängige Weg, diskutiert.

Der ferredoxinabhängige Weg beinhaltet die Reduktion des Plastochinonpools über das Ferredoxin, wofür eine Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase (FQR) postuliert wird (Moss & Bendall, 1984; Bendall & Manasse, 1995). Die Aktivität einer solchen FQR konnte gemessen und durch Antimycin A gehemmt werden, allerdings haben Messungen an isolierten Thylakoiden aus Gerste Hinweise auf einen Antimycin A-insensitiven Weg ergeben (Cleland & Bendall, 1992; Scheller 1996). Zudem ist es bisher noch nicht gelungen die FQR-Aktivität einem bestimmten Protein zuzuordnen. Sollte der NDH-Komplex aufgrund eines fehlenden NAD(P)H-Dehydrogenase-Fragments direkt durch Ferredoxin reduziert werden (I.4), könnte er das gesuchte Enzym sein.

Der alternativ diskutierte Weg für die Einspeisung der Elektronen in den Plastochinonpool ist der NAD(P)H-abhängige Weg. Die Elektronen, die in den Plastochinonpool eingespeist werden, können von reduzierten Komponenten, wie z.B. Triosephosphate und NADPH, aus dem Plastidenstroma stammen (Asada *et al.*, 1993; Havaux 1996; Wieckowski & Bojko, 1997). Daher muss für diesen Weg eine NADPH-Plastochinon-Oxidoreduktase postuliert werden. Die Proteinkomponenten dieses NADPH-abhängigen Weges sind ebenfalls nicht bekannt. Die Aktivität ließe sich aber durch eine Assoziation der FNR mit dem verbindenden Fragment des NDH-Komplexes erklären (I.4).

Sowohl für den ferredoxinabhängigen als auch für den NAD(P)H-abhängigen Weg des zyklischen Elektronentransports ist eine Beteiligung des von den *ndh*-Genen kodierten NDH-Komplex denkbar. Der Komplex würde im zyklischen Elektronentransport eine zusätzliche Protonenpumpe darstellen und somit die ATP-Ausbeute des zyklischen Weges erhöhen. Für den gesamten photosynthetischen Elektronentransport ergäbe sich dadurch ein höheres ATP/NADPH-Verhältnis.

5. Hinweise auf die Funktionen des NDH-Komplexes

Durch Untersuchungen an *ndh*-Mutanten in Cyanobakterien konnte man eine Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport und an der Atmung nachweisen (Mi *et al.*, 1992, 1995; Schluchter *et al.*, 1993). In Cyanobakterien liegen die Komponenten der Photosynthese- und Atmungskette gemeinsam auf der Thylakoidmembran und teilen sich den Chinonpool und den Cytochrom b_6/f -Komplex. Die Regulation der beiden Elektronentransportketten ist nicht geklärt (Scherer, 1990). Untersuchungen haben gezeigt, dass der NDH-Komplex an beiden Elektronentransportketten beteiligt ist und die Untereinheiten NDH-D und -F, die in Cyanobakterien in mehrfachen Kopien vorliegen, membranspezifisch in den Komplex eingebaut werden (Kösling, 1996; Klughammer *et al.*, 1999; Ohkawa *et al.*, 2000). Als elektronenliefernde Einheit für den cyanobakteriellen

Komplex kommt die bereits erwähnte bidirektionale Hydrogenase in Frage (I.3). Physiologische Untersuchungen und Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen an *hox*-Mutanten konnten dem cyanobakteriellen NDH-Komplex eine Rolle im Schutzmechanismus des Photosyntheseapparates zuweisen, in dem er als Ventil für Elektronen bei hohen Photosyntheseraten wirkt (Appel *et al.*, 2000).

Der plastidäre NDH-Komplex ist definiert als das Enzym, das von den *ndh*-Genen kodiert wird. Da der Gesamtkomplex biochemisch bisher noch nicht eindeutig charakterisiert ist, sind Aussagen über die Funktion des Enzyms nur indirekt möglich.

Für die Beteiligung am zyklischen Elektronentransport sprechen, außer der beschriebenen möglichen Beteiligung des NDH-Komplexes am ferredoxinabhängigen oder am NAD(P)H-abhängigen Weg (I.4), weitere Befunde. Die Lokalisation des Komplexes in den Stromathylakoiden der Plastiden (Nixon *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1993) spricht für eine Beteiligung am photosynthetischen Elektronentransport, speziell dem zyklischen Elektronentransport, da die Stromathylakoide auf den zyklischen Elektronentransport spezialisiert sind (Albertsson 1995). Zudem zeigen Immunoblot-Analysen an Mesophyll- und Bündelscheidenzellen aus *Sorghum bicolor*, dass das Enzym in den Bündelscheidenzellen, in denen nur der zyklische Elektronentransport stattfindet, stark angereichert ist (Kubicki *et al.*, 1996). Außerdem wird die Lage des *psaC*-Gens, eines Gens für die Untereinheit C aus dem Photosystem I, zwischen dem *ndhE*- und dem *ndhD*-Gen als Beleg für die Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport angesehen. Das *psaC*-Gen unterliegt zudem der gleichen Transkriptionskontrolle wie die umgebenden *ndh*-Gene (Kanno & Hirai, 1993). Die Photosystem I-Untereinheiten C und E (PsaC & PsaE) gelten als Interaktionspartner zwischen dem Photosystem I und Ferredoxin (Cramer *et al.*, 1991). Das Ferredoxin wurde bereits als möglicher Elektronenlieferant für den NDH-Komplex genannt.

Physiologische Untersuchungen an Mutanten der NDH-Untereinheit B in Tabakplastiden zeigten unter normalen Gewächshausbedingungen eine Schwächung des zyklischen Elektronentransports um das Photosystem I (Shikanai *et al.*, 1998). Als weiterer Beleg für die Beteiligung am zyklischen Elektronentransport werden Untersuchungen mit Mutanten der Untereinheit B angeführt, die eine erhöhte Sensitivität für den Hemmstoff Antimycin A zeigen. In der Veröffentlichung von Joët *et al.* (2001) werden zwei zyklische Elektronentransportwege postuliert, zum einen ein Antimycin A-sensitiver Weg über eine Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase (FQR) und zum anderen ein Antimycin A-insensitiver Weg über den NDH-Komplex.

Wie bereits oben beschrieben (I.4) spielt der zyklische Elektronentransport bei der Regulation von Stressantworten eine wichtige Rolle. Daher wird auch für den NDH-Komplex eine Funktion im Schutzmechanismus der Elektronentransportkette unter Stressbedingungen, vor allem Hitze und Starklicht, diskutiert (Martin *et al.*, 1996; Sazanov *et al.*, 1998; Casano *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 1999). Auf die Regulation der photosynthetischen Elektronentransportkette und ihre Schutzmechanismen bei Stressbedingungen wird in Kapitel I.7 näher eingegangen.

Der NDH-Komplex ist bereits in Etioplasten von Mais, Reis, Senf und Gerste (Fischer *et al.*, 1997; Guéra *et al.*, 2000) nachweisbar und wird nicht wie die übrigen Photosynthesegene lichtinduziert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Funktionen des Komplexes nicht ausschließlich in der Photosynthese zu suchen ist. Vermutlich spielt das Enzym eine Rolle bei der Energetisierung der Prothylakoide, bzw. der sich entwickelnden Thylakoidmembran. Dadurch wird z.B. ein Protonengradient für den pH-abhängigen Import von Proteinen bereitgestellt, bevor der Gradient durch die photosynthetische Elektronentransportkette aufgebaut wird.

Durch die Fähigkeit, Elektronen in den Plastochinonpool einzuspeisen (Mano *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1998), ist für den NDH-Komplex neben einer Beteiligung am zyklischen Elektronentransport auch eine Rolle in der Redoxkontrolle des Plastochinonpools und somit in der Regulation der Genexpression in Plastiden und Kern (Allen, 1995) denkbar.

Eine weitere Vorstellung zur Funktion des Enzyms könnte im Rahmen der Chlororespiration zu suchen sein. Dies soll im Folgenden näher erläutert werden.

6. Die Chlororespiration in Plastiden und Algen

Der respiratorische Elektronenfluss von NADPH auf Sauerstoff in Plastiden, die sogenannte Chlororespiration, wurde zuerst in *Chlamydomonas reinhardtii* entdeckt (Bennoun, 1982, 1994). Ein chlororespiratorischer Weg konnte auch in Cyanobakterien (Scherer 1990; Büchel *et al.*, 1998) und in den Plastiden höherer Pflanzen nachgewiesen werden (Garab *et al.*, 1989). Als erstes Glied in der Chlororespiration wird eine NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreduktase gefordert, die die Elektronen von NADPH in den Plastochinonpool einspeist. Für die Übertragung der Elektronen von Plastochinon auf Sauerstoff wird, aufgrund physiologischer Messungen, eine terminale Oxidase postuliert, die aber auf Proteinebene bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte. In Cyanobakterien ist eine alternative cyanidsensitive Oxidase als terminale Oxidase in der Diskussion (Büchel *et al.*, 1998). Für *Chlamydomonas reinhardtii* wurde eine Chinol-Oxidase identifiziert, die für die Rolle der terminalen Oxidase in Frage käme. Die Chinol-Oxidase wurde über Hemmstoffexperimente und ihre Ähnlichkeit zu einer alternativen Oxidase aus den Mitochondrien in *Arabidopsis thaliana* gefunden. Die Größe des Enzyms beträgt circa 43 kDa (Cournac *et al.*, 2000). In den Plastiden höherer Pflanzen konnte bisher noch keine terminale Oxidase identifiziert werden. Daher wird das Modell diskutiert, in dem der Plastochinonpool durch eine Hydrochinon-Peroxidase über H_2O_2 reoxidiert wird (Casano *et al.*, 2000).

Ungeklärt ist auch die genaue Funktion und die Regulation der Chlororespiration, die nur bis zu 20% der Gesamtrespiration ausmacht und durch Licht gehemmt werden kann (Bennoun, 1982; Peltier *et al.*, 1987). Es wurde auch beobachtet, dass die Chlororespiration durch das Photosystem II stimuliert (Ravenel & Peltier, 1992) und durch das Photosystem I gehemmt werden kann (Peltier *et al.*, 1987).

Eine Funktion, die für die Chlororespiration diskutiert wird, ist, dass während der Dunkelphase durch die Chlororespiration der Protonengradient über der Thylakoidmembran aufrecht erhalten wird und der Plastochinonpool in einem Redoxzustand gehalten wird, der es der Photosynthese erlaubt, nach dem Übergang in die Lichtphase wieder schnell anzulaufen (Peltier *et al.*, 1987). Nach einem weiteren Modell ist die Chlororespiration in den Abbau der transienten Stärke involviert. Dabei soll sie überschüssige Reduktionsäquivalente, die beim Abbau der Stärke über den oxidativen Pentosephosphatweg anfallen, oxidieren und somit dem Metabolismus wieder zur Verfügung stellen (Bennoun, 1982). Da während der Chlororespiration Reduktionsäquivalente oxidiert werden, wird auch eine Rolle im Schutzmechanismus vor oxidativen Stress durch einen Regulation des NADP/NADPH-Verhältnisses vorgeschlagen (Casano *et al.*, 2000).

7. Regulation der photosynthetischen Elektronentransportkette und ihre Schutzmechanismen

Der zyklische Elektronentransport und die Chlororespiration spielen bei der Regulation von Stressantworten, wie Hitze- und Salzstress, eine wichtige Rolle (I.4 & I.5). An beiden Elektronentransportketten ist der NDH-Komplex durch seine Fähigkeit, Elektronen in den Plastochinonpool einzuspeisen, beteiligt (Mano *et al.*, 1995; Endo *et al.*, 1998). Daher wird eine Funktion des NDH-Komplexes im Schutzmechanismus der Elektronentransportkette unter Stressbedingungen, vor allem Hitze und Starklicht, diskutiert (Martin *et al.*, 1996; Sazanov *et al.*, 1998; Casano *et al.*, 1999, 2001; Endo *et al.*, 1999). Im Folgenden soll die Regulation und die Schutzmechanismen der photosynthetischen Elektronentransportkette näher betrachtet werden.

Die photosynthetische Elektronentransportkette ist bei hohen Lichtintensitäten anfällig für lichtinduzierte Schädigungen, die vor allem durch reaktive Intermediate hervorgerufen werden können. Diese können bei Stressbedingungen wie Hitze, Salz und Trockenheit gebildet werden oder bei einer Restriktion im CO₂-Angebot, wenn mehr Lichtenergie absorbiert als verbraucht wird. Um den Schädigungen vorzubeugen, haben die Plastiden eine Reihe von Schutzmechanismen entwickelt, die neben antioxidativen Molekülen und Enzymen (Niyogi, 1999) auch Reparaturmechanismen für Membranen (Baier & Dietz, 1999) und für photosynthetische Reaktionszentren (Melis, 1999), sowie Signal- und Akklimationsprozesse (Karpinski, 1999) umfassen.

Eine Möglichkeit, überschüssige Energie abzuführen, ist der Weg über Chlorophylle im Triplettzustand (³Chl). Diese Chlorophylle im Triplettzustand können ihre Energie an Carotinoide abgeben und so in ihren Grundzustand zurückgeführt werden. Nur 4 bis 25 % der überschüssigen Energie kann so eliminiert werden (Niyogi, 2000). Das Chlorophyll im Triplettzustand, das an sich inaktiv ist, kann mit Sauerstoff reagieren und den sehr reaktiven Singuletsauerstoff (¹O) erzeugen, der dann Proteine, Pigmente und Lipide des Photosyntheseapparates schädigt (Hideg *et al.*, 1998).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der nicht-photochemischen Löschung (qN) von überschüssiger Energie. Dabei handelt es sich um eine schnell induzierbare Löschung, die über den Protonengradienten reguliert wird. Dieser wiederum wird vom photosynthetischen Elektronentransport aufgebaut, so dass für die nicht-photochemische Energielöschung eine Art Rückkopplungskontrolle besteht (Horton *et al.*, 1996). Bei hoher Energieabsorption kommt es zum Aufbau eines hohen Protonengradienten über der Thylakoidmembran, was zu einem Absinken des luminalen pH-Wertes führt. Die zusätzlichen Protonen werden durch den zyklischen Elektronentransport, an dem der NDH-Komplex beteiligt sein soll, über die Membran transloziert. Das Absinken des pH-Wertes führt zu einer Konformationsänderung des Lichtsammelkomplexes im Photosystem II (LHC II) und aktiviert die Violaxanthin-Deepoxidase, ein Enzym des Xanthophyllzyklus. Im Xanthophyllzyklus wird das Violaxanthin, ein Protein des Lichtsammelkomplexes, in Zeaxanthin umgewandelt, das in der Lage ist, überschüssige Energie zu löschen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht völlig verstanden. Bei Nachlassen der Lichtintensitäten verringert sich der Protonengradient und die Konformationsänderungen in den Lichtsammelkomplexen sowie die Aktivierung des Xanthophyllzyklus sind schnell reversibel (Demming-Adams & Adams, 1996; Young & Frank, 1996).

Neben diesen schnellen Mechanismen der Löschung überschüssiger Strahlungsenergie verfügen Pflanzen über die Möglichkeit, Elektronen in der photosynthetischen Elektronentransportkette abzuführen. Um eine Überreduktion der Elektronenüberträger zu verhindern, werden alternative Elektronenakzeptoren angeboten. Eine Möglichkeit dabei ist die NADPH-abhängige Reduktion von Oxalacetat zu Malat über die NADPH-Malat-Dehydrogenase.

Das Malat wird dann über entsprechende Transporter aus den Plastiden in das Cytosol transportiert (Fridyland *et al.*, 1998; Backhaus *et al.*, 1998). Eine weitere Möglichkeit stellt die sogenannte Mehler-Reaktion dar (Mehler, 1957). Bei der Mehler-Reaktion werden, bei einem hohen Reduktionsgrad von Ferredoxin, Elektronen auf Sauerstoff übertragen. Dabei entsteht das sehr aggressive Superoxidradikal, das über die Superoxid-Dismutase in der Thylakoidmembran in Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Das Wasserstoffperoxid wird über die Ascorbat-Peroxidase eliminiert. Dabei wird das Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert und das dabei anfallende Monodehydroascorbatradikal, ein Zwischenprodukt aus dem Antioxidans Ascorbat, wird über Ferredoxin wieder zu Ascorbat oxidiert. Da bei dieser Reaktion Elektronen aus der Wasseroxidation am Photosystem II zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser verwendet werden, spricht man auch vom Wasser-Wasser-Zyklus (Polle, 1996; Asada, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei photooxidativem Stress in Gerste Wasserstoffperoxid eine Erhöhung des Proteinspiegels von NDH-F und nach 16 Stunden auch eine der Erhöhung der Transkriptionsspiegel von *ndhB* und *ndhF* induziert (Casano *et al.*, 2001).

Eine andere Möglichkeit der Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff haben Plastiden mit der Chlororespiration (I.6) entwickelt. Dabei wird bei hohen Lichtintensitäten über den NDH-Komplex Plastochinon durch die Elektronen aus überschüssigen Reduktionsäquivalenten reduziert. Die Reoxidation des Plastohydrochinons erfolgt durch eine Hydrochinon Peroxidase über Wasserstoffperoxid zu Wasser (Casano *et al.*, 2000).

Eine längerfristige Anpassung an geänderte Lichtverhältnisse stellt die Regulation auf Ebene der Genexpression dar. Die Regulation erfolgt dabei über den Redoxzustand des Plastochinonpool, wobei der Plastochinonpool aber nicht den eigentlichen Redoxsensor darstellt (Allen, 1993, 1995). Dabei wird der NDH-Komplex als Elektronenlieferant für den Plastochinonpool postuliert.

8. Zielsetzung der Arbeit

Über die genaue Struktur und Funktionsweise des plastidären NDH-Komplexes ist bisher wenig bekannt, ebenso über seine physiologische Rolle in den Plastiden.

In den bisher veröffentlichten Untersuchungen an NDH-Mutanten wurde nur ein Teil der elf Untereinheiten mutagenisiert. Die Untersuchungen erbrachten Hinweise für die Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport, am Schutzmechanismus bei photooxidativem Stress und an der Chlororespiration (Burrows *et al.*, 1998; Kofer *et al.*, 1998; Shikanai *et al.*, 1998; Casano *et al.*, 2001). Bei diesen Untersuchungen gab es jedoch Hinweise darauf, dass die Insertionsrichtung der Spectino- und Streptomycin-Resistenzkassette Einfluss auf den Phänotyp haben könnte (Steinmüller & Kofer, unveröffentl.).

Um die aus den vorangegangenen Untersuchungen erhaltenen Hinweise auf die Funktion des NDH-Komplexes zu erhärten, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Untereinheiten NDH-A/-E/-G/-H/-I des NDH-Komplexes mittels Insertions- und Deletionsmutagenese ausgeschaltet werden. Dabei wurde die Resistenzkassette in beide Richtungen inseriert, um den Einfluss der Insertionsrichtung näher zu charakterisieren. Zusammen mit den Transformanten aus Kofer *et al.* (1998) und Steinmüller *et al.* (1998) sollten somit für alle Untereinheiten, mit Ausnahme von NDH-B, Mutanten für die Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Sowohl NDH-Mutanten sollten im Frühjahr und im Sommer unter Gewächshausbedingungen angezogen und auf molekularer und physiologischer Ebene charakterisiert werden. Die veröffentlichten Ergebnisse aus Kofer *et al.* (1998) stammten aus Untersuchungen an Gewebekulturpflanzen und waren Gegenstand kontroverser Diskussionen (Maliga & Nixon, 1998; Koop *et al.*, 1998). Hauptpunkte der Diskussionen waren die Fragen, ob die NDH-Mutanten homo- oder heteroplastomisch sind und wie die beobachteten unterschiedlichen Phänotypen der Transformanten zu erklären sind.

Daher wurden diese Pflanzen erneut unter Gewächshausbedingungen angezogen und in die Untersuchungen dieser Arbeit aufgenommen.

Molekularbiologische Analysen sollten Aufschluss über die Stabilität und den plastomischen Zustand der Transformanten geben, sowie Auswirkungen auf Proteinebene aufzeigen. Die physiologischen Untersuchungen mittels Messungen der Chlorophyllfluoreszenzinduktion und der P700-Redoxkinetik sowie Untersuchungen zum Stärkeabbau und der Pigment-zusammensetzung in den Pflanzen sollten weitere Hinweise auf die Rolle des NDH-Komplexes im zyklischen Elektronentransport, dem Schutzmechanismus der Elektronentransportkette bei photooxidativem Stress und in der Chlororespiration liefern.

II. Material & Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Chemikalien (p.a.-Qualität):	Amersham Pharmacia (Freiburg), Baker (Deventer, Niederlande), Boehringer (Mannheim), Clonetech (Palo Alto, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Janssen (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München)
Nährmedien:	Gibco BRL (Neu-Isenburg), Difco Laboratories (Detroit, USA), Fluka (Buchs, Schweiz)
Radioaktive Nukleotide:	Amersham Pharmacia (Freiburg).
Enzyme:	Boehringer (Mannheim), Calbiochem (La Jolla, USA), Sigma (München), Fluka (Buchs, Schweiz), Yakult (Honsha, Japan).
Antibiotika:	Serva (Heidelberg) .
Chemilumineszenz-Reagenzien:	ECL-Reagenziensatzes (Amersham Pharmacia, Freiburg).
Immobilon-(PVDF)-Membranen:	Millipore (Eschborn)
Nitrocellulosemembranen:	Biodyne (Portsmouth, England)
Röntgenfilme:	CEA (Strängnäs, Schweden), Eastman Kodak (Rochester, USA)
Diafilme:	Agfa (Leverkusen)

1.2 Pflanzenmaterial

Nicotiana tabacum var. Petite Havana

Das Saatgut wurde freundlicherweise von Frau Dr. Waltraud Kofer (Botanisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt.

1.3 Bakterienstämme und Plasmide

Es wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

DH5a: F⁻endA1, hsd R17 rk⁻, mk⁺, supE44, thi-1, l-recA1, gyrA96, D(lacZ-rA-argF)u169, 80lacZDm15 (Bethesda Res. Lab. 1986)

SCS110: rpsL (Str^R), thr, leu, endA, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, D(lac-proAB), [F', tra D36, proAB, lacI^YZ, Dm15] (Stratagene, 1997)

Für die Klonierungen wurde der Vektor pBluescript KS II+ (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

1.4 Resistenzkassette 16S-aadA

Für die Herstellung der Mutageneseonstrukte wurde die Resistenzkassette 16S-aadA verwendet (Koop *et al.*, 1996).

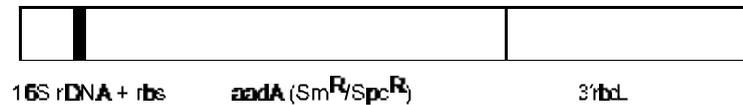


Abb. 4: 16SaadA-Resistenzkassette

Sie beinhaltet das *aadA*-Gen aus dem Omega Interposon (Prentki & Krisch, 1984, Prentki *et al.*, 1991), das eine Aminoglycosid 3'-Adenyltransferase kodiert. Die Aminoglycosid 3'-Adenyltransferase verleiht Resistenz gegen Spectinomycin und Streptomycin (Svab *et al.*, 1990a; Goldschmidt-Clermont, 1991). Das *aadA*-Gen steht unter Kontrolle des 16S rDNA-Promotors aus Tabakplastiden und zwischen Promotor und Gen befindet sich die Ribosomenbindestelle des *rbcL*-Gens aus Tabak. Als Terminator dient das 3'-Ende des *rbcL*-Gens aus *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Integration in das Tabakplastom erfolgte durch homologe Rekombination über plastomhomologe Sequenzabschnitte am 3' und 5'-Ende der Resistenzkassette.

1.5 Konstrukte

Folgende Ausgangsplasmide und Mutageneseonstrukte, bzw. Saatgut bereits mutagenisierter Pflanzen, wurden von Herrn PD Dr. Klaus Steinmüller, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt (Tab. 4 & 5):

Tab. 4: Zur Verfügung gestellte Ausgangsplasmide für die Mutageneseonstrukte. Darstellungen der Plasmide befinden sich in Abbildung 9 im Ergebnisteil.

Plasmid	Größe (bp)	kloniertes Plastomfragment ^a	enthaltene Gene
pXS6.3	6303	<i>XhoI</i> 118604 / <i>SalI</i> 124907	<i>ndhH</i> / -A / -I / -G / -E; <i>psaC</i> ; <i>ndhD</i>
pXS8.5	8516	<i>XhoI</i> 118604 / <i>StuI</i> 127120	<i>ndhH</i> / -A / -I / -G / -E; <i>psaC</i> ; <i>ndhD</i>
pSB3.8	3766	<i>SalI</i> 49833 / <i>BamHI</i> 53599	<i>ndhC</i> / -K / -J
pD3368BX	3368	<i>XbaI</i> 119540 / <i>BglIII</i> 116171	ORF 313; <i>ndhD</i> ; <i>psaC</i>
p4656BB	46565	<i>BglIII</i> 116171 / <i>BglIII</i> 111515	<i>ndhF</i> ; <i>rpl32</i> ; <i>sprA</i> ; <i>trnL</i>
pUC-16SaadA (Resistenzkassette)	4133	<i>EcoRI</i> / <i>XbaI</i>	<i>aadA</i> ; 16SrRNA, rbs, 3'- <i>rbcL</i>

^a Basenpaarnummer nach der Nummerierung von Shinozaki *et al.* (1986).

Tab. 5: Zur Verfügung gestellte *ndh*-Mutagenese- und Kontrollkonstrukte.

Konstrukt	Zielgen(e)	Mutation	Insertionsstelle ^a	Orientierung der aadA-Kassette ^b	Referenz
pndhC-H(-I)	<i>ndhC</i>	Insertion	<i>HindIII</i> 52368	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhC-H-II	<i>ndhC</i>	Insertion	<i>HindIII</i> 52368	-	K. Steinmüller (unveröffentl.)
pndhCKJ-HN(-I)	<i>ndhC/-K/-J</i>	Deletion	<i>HindIII</i> 52368 / <i>NdeI</i> 51112	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhCKJ-HN-II	<i>ndhC/-K/-J</i>	Deletion	<i>HindIII</i> 52368 / <i>NdeI</i> 51112	-	K. Steinmüller (unveröffentl.)
pndhHAI-RV(-I)	<i>ndhH/-A/-I</i>	Deletion	<i>EcoRV</i> 123868 / <i>EcoRV</i> 120818	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhJ-N(-I)	<i>ndhJ</i>	Insertion	<i>NdeI</i> 51112	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhD-NN(-I)	<i>ndhD</i>	Deletion	<i>NdeI</i> 117993/ <i>NdeI</i> 117299	+	Steinmüller <i>et al.</i> (1998)
pndhD-NN-II	<i>ndhD</i>	Deletion	<i>NdeI</i> 117993/ <i>NdeI</i> 117299	-	K. Steinmüller (unveröffentl.)
pndhF-BB-I	<i>ndhF</i>	Deletion	<i>BstEII</i> 113447 / <i>BamHI</i> 113119	+	K. Steinmüller (unveröffentl.)
pndhF-N-I	<i>ndhF</i>	Insertion	<i>NcoI</i> 113436	+	K. Steinmüller (unveröffentl.)
pIGE-aad I		Insertion	<i>XbaI</i> 11954	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pIGE-aad II		Insertion	<i>XbaI</i> 11954	-	K. Steinmüller (unveröffentl.)
pF-aad I		Insertion	<i>SnaI</i> 115265	+	Koop <i>et al.</i> (1996)
pF-aad II		Insertion	<i>SnaI</i> 115265	-	Koop <i>et al.</i> (1996)
pUC19-rpoB		Insertion	<i>SmaI</i> 28195	-	W. Kofer

^a Basenpaarnummer nach der Nummerierung von Shinozaki *et al.* (1986).

^b (+) und (-) geben die Orientierung der 16SaadA-Kassette an: (+) in Leserichtung der *ndh*-Gene und (-) gegen die Leserichtung der *ndh*-Gene

Die in Klammern gesetzten Bezeichnungen „-I“ stellt eine Veränderung gegenüber der in der Veröffentlichung (Kofer *et al.*, 1998) benutzten Bezeichnung dar und dient zur Unterscheidung von nachträglich hergestellten Mutagenesekonstrukten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert wurden („-II“).

Bei den Konstrukten pIGE-aadI/II und pF-aadI/II wurde die Resistenzkassette in die Nähe eines oder mehrerer *ndh*-Gene inseriert ohne das Leseraster zu zerstören. Bei dem Konstrukt pUC19-rpoB wurde die Kassette vor den Promotorbereich des *rpoB*-Gens inseriert und somit in großer Entfernung zu den *ndh*-Genen. Die Transformanten sollten als Kontrollen dienen.

Die aufgeführten Mutagenesekonstrukte pndhC-H-I, pndhCKJ-HN-I, pndhHAI-RV-I, pndhJ-N-I und pIGE-aadI/II wurden über PEG-vermittelte Transformation (2.4.2) in Tabakplastiden transformiert (Kofer *et al.*, 1998), die restlichen über die biolistische Transformationsmethode (2.4.1).

1.6 Antiseren

Folgende Antiseren wurden für die Immunodetektion von Proteinen verwendet:

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Antiseren

Antikörper	Spezifität	Herkunft	Verdünnung
NDH-H	Tabak	E. Funk	1:1000
NDH-J	Reis	K. Steinmüller	1:500
Photosystem I-D	Spinat	R. Nechushtai	1:1000
Photosystem II- D	Erbse	P. Gamble	1:2000
α -/b-UE ATPase	Spinat	N. Nelson	1:2000
FNR	Spinat	L. Klein-Hitpaß	1:5000

2. Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

2.1.1 Anzucht im Gewächshaus

Für die Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus wurden Tabaksamen in kleinen Tontöpfen auf Anzuchterde (Floraton, Torfprodukt DIN 11549-F80, pH 5,5 - 6,5; Floragrad, Oldenburg) ausgesät, leicht in die Erde eingedrückt und zur Keimung gebracht. Bei einer Größe von circa 1 cm wurden die Keimlinge pikiert und in Torfanzuchtschalen (The Jiffy Group, Kristiansand, Norwegen) auf Floraton-Erde umgesetzt. Bei der weiteren Anzucht in Tontöpfen wurde Topferde mit einem pH von 7 - 8 verwendet. Mit zunehmender Größe wurden die Pflanzen regelmäßig bis zu einer Topfgröße von 14 cm Durchmesser umgetopft.

Die Wachstumstemperatur lag, abhängig von den äußeren Witterungsbedingungen, zwischen 22 °C im Frühjahr und 29 °C im Sommer. Die Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 45 % und 60 %. Die Pflanzen wurden in einem 14 h-Hell-10 h-Dunkel-Zyklus mit Pflanzenlampen (Quecksilber- und Natriumdampflampen HPL, SON, SON-T, Philips, Köln) beleuchtet. Die Lichtstärke betrug in einer Höhe von 50 cm über der Stellfläche, $350 \mu\text{mol sec}^{-1}\text{m}^{-2}$. Um Mangelerscheinungen vorzubeugen, wurden die Pflanzen ab der 8. Woche regelmäßig mit Stickstoffdünger gedüngt. Die Schädlingsbekämpfung erfolgte auf biologische Weise durch Fressfeinde.

Zur Samengewinnung wurden die Blütenstände kurz vor der Blütenöffnung mit Pergamenttüten an der Pflanze verpackt. Nach Ende der Samenreife wurden die Blütenstände samt Tüten abgeschnitten, die Samenkapseln getrocknet und ausgeleert. Die Samen wurden in Kunststoffröhrchen bei 4 °C gelagert.

Das Blattmaterial für die molekularbiologischen und physiologischen Untersuchungen wurde zwischen der siebten und zwölften Woche, in der Phase des maximalen Pflanzenwachstums, geerntet. Aus voll entwickelten Blättern der Pflanzenmitte, die dem Licht exponiert waren, wurden Blattscheiben entnommen. Blattmaterial für die DNA-Analyse, Pigmentanalyse und Stärkequantifizierung wurde zum jeweiligen Zeitpunkt sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Blattscheiben für die Chlorophyllfluoreszenzmessungen bis zur Verwendung auf feuchtem Filterpapier bei Schwachlicht gelagert (Backhausen & Scheibe, 1999).

2.1.2 Anzucht in der Klimakammer

Einige Pflanzen wurden auf Erde in einem Pflanzenwuchsschrank (PSM1.5 / 1.5, Noske-Kaaser / Realtest, Moers) angezogen. Dabei wurde ein 14 h-Hell-10 h-Dunkel-Zyklus bei einer Lichtintensität von $250 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, und einer konstanten Temperatur von 25 °C gewählt. Die Lichtintensität wurde 50 cm über der Stellfläche gemessen.

2.1.3 Anzucht in Gewebekultur

Tabakpflanzen wurden in Glasgefäßen oder in GA-7-Kunststoffbehältern (Magenta, Chicago, USA) auf 100 ml B5-Medium (Gamborg's B5 Basal Medium, Sigma, St. Louis, USA) mit 1 % Agar und 2 % Saccharose angezogen. Für die Selektion von transformierten Pflanzen wurde dem Medium 500 mg/l Spectinomycin hinzugesetzt. Die Pflanzen wurden in einem 14 h-Hell-10 h-Dunkel-Zyklus bei einer Temperatur von 24 °C und einer Lichtintensität von 120 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Weißlicht, Philips, TLD 58W/86 und TLD 65W/25RS) in der Klimakammer angezogen.

Zur Erhaltung wurden kleine Sprossstücke auf frisches Medium umgesetzt. Um das Wachstum zu verlangsamen, wurden die Sprossstücke nach der Wurzelbildung einer verringerten Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ ausgesetzt.

Um die Gewebekulturpflanzen zur Samenbildung zu bringen, wurden sie ins Gewächshaus transferiert. Nachdem das Medium unter fließendem Wasser sorgfältig entfernt wurde, wurden sie auf ein Erde-Sandgemisch im Verhältnis 3:1 gesetzt. Zur Akklimatisierung an die Gewächshausbedingungen wurden die frisch umgesetzten Pflanzen eine Woche lang in einem beheizten Kleingewächshaus mit erhöhter Luftfeuchtigkeit (29 °C / 85 %) angezogen und regelmäßig mit Wasser besprüht. Anschließend wurden sie unter normalen Gewächshausbedingungen (2.1.1) weiter angezogen und zur Samenreife gebracht.

2.2 Methoden der DNA-Analyse

Molekularbiologische Grundtechniken wie die Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Phenol-Chloroform-Extraktion, Präzipitationen, gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und deren Anfärbung wurden, sofern nicht anders erwähnt, nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des JetSorb-Reagenziensatzes (Genomed, Bad Oeynhausen) den Herstellerangaben entsprechend aus Agarosegelen eluiert. Restriktionen und Ligationen zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden jeweils nach den Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Die Transformation der gefrierkompetenten Bakterienstämme *E. coli* DH5a und SCS 110 erfolgte mittels Hitzeschock (Hanahan *et al.*, 1985).

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde im Kleinmaßstab mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979) durchgeführt. Präparationen der Ausgangsplasmide im größeren Maßstab erfolgten mittels JetStar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Herstellerangaben. Präparationen der Konstrukte im größeren Maßstab erfolgte über Fällung mittels PEG (Krieg & Melton, 1987).

2.2.1 DNA-Präparation aus Pflanzen

Für die Southern-Analyse wurden circa 300 mg frisches Blattmaterial geerntet und die Blattmittelrippe entfernt. Das gefrorene Material wurde für mindestens 60 h bei 4 °C und 0,06 mbar lyophilisiert (Alpha 1-4, Christ, Osterode/Harz). Die DNA-Isolierung erfolgte mittels des DNeasy-Reagenziensatzes der Firma Qiagen (Hilden). Dazu wurde das vorgekühlte Material mit einem motorgetriebenen Pistill in 1 ml vorgelegtem Homogenisationspuffer zerrieben. Die Qualität der DNA wurde über ein 0,8 %-iges Agarosegel überprüft und über eine Verdünnungsreihe mit λ-DNA quantifiziert.

2.2.2 Southern-Transfer

Jeweils 0,5 - 1 µg genomische DNA wurden auf einem 1,2 %-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Agarosegel wurde anschließend nach der Methode von Southern (1975) zur Depurinisierung 15 min in 0,25 M HCl inkubiert und zur Denaturierung danach zweimal für jeweils 15 min in 0,4 M NaOH / 0,6 M NaCl geschwenkt. Mittels Saugströmung wurde die DNA über Nacht auf eine Hybond-N⁺-Nylonmembran transferiert. Als Transferpuffer diente 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5). Zur Neutralisierung wurde die Membran nach dem Transfer kurz in 200 mM Na₂HPO₄ (pH 7,5) inkubiert. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung in einem UV-Crosslinker (Amersham, Braunschweig) bei 30000 µJ / cm² (Khandijan, 1986).

2.2.3 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Als Sonden für radioaktive Markierungen wurden definierte Restriktionsfragmente aus verschiedenen Plasmiden verwendet. Die Fragmente wurden mit Hilfe des „Megaprime Labeling Kit“ (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) radioaktiv markiert.

2.2.4 Nachweis filtergebundener Nukleinsäuren

An Nylonmembranen gebundene DNA wurde durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Die Hybridisierung wurde nach der Methode von Church und Gilbert (1984) in 250 mM Na₂HPO₄, 7 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und 2,5 mM EDTA durchgeführt. Die Filter wurden dabei nach ein bis zwei Stunden Vorhybridisierung mindestens 16 Stunden mit der radioaktiven Sonde bei 64 °C in rotierenden Röhren hybridisiert. Bei Hybridisierungen mit heterologen Sonden betrug die Hybridisierungstemperatur 54 °C. Anschließend wurden die Filter nacheinander jeweils 45 min bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur in 1 × SSC / 0,5 % SDS und zweimal in 0,5 × SSC / 0,5 % SDS gewaschen (20 × SSC: 3 M NaCl / 0,3 M NaCitrat).

Die gewaschenen Filter wurden in Frischhaltefolie eingeschlagen und mehrere Stunden bis Tage bei -80 °C einem Röntgenfilm (X-Omat AR 5, Kodak, USA oder Wicor-X RP Blue sensitive, CEA GmbH, Schweden) unter der Verwendung von Verstärkerfolie (Cronex Quanta III) exponiert.

Alternativ wurden die Filter zur Quantifizierung und bei schwachen Signalen für 2 - 16 Stunden einer Detektierfolie (Fuji-Film, Tokio, Japan) exponiert und anschließend im Bio Imaging Analyzer BAS-1800 mit dem Programm Image Reader BAS-1800 Version 1.4 E und Image Gauge Version 3.0 bearbeitet (Fuji-Film, Tokio, Japan).

Um die radioaktive Sonde wieder vom Filter zu entfernen, wurden die Southern-Filter bei 37 °C je 15 Minuten zunächst in 0,1 M NaOH / 0,25 % SDS und anschließend in 0,2 M Tris-HCl (pH 7.5) / 0,1 × SSC / 0,25 % SDS unter leichtem Schütteln gewaschen.

2.3 Methoden der Proteinanalyse

2.3.1 Präparation von Plastiden und Thylakoidmembranen

Plastiden und Thylakoidmembranen wurden in kleinem Maßstab isoliert. Dazu wurden 2 g Blattmaterial ohne Mittelrippe kurz mit demineralisiertem Wasser gewaschen und in einem kleinen Waring Blender in 20 ml CIP-A-Puffer (44 mM MES-KOH pH 5,7 / 450 mM Sorbitol / 10 mM NaCl / 0,5 mM KH₂PO₄ / 1 mM MgCl₂ / 1 mM MnCl₂ / 2 mM EDTA / 0,1 % β -Mercaptoethanol) dreimal 5 Sekunden zerkleinert. Das Homogenat wurde über eine Doppellage Miracloth (Calbiochem, La Jolla, USA) in einen Zentrifugenbecher auf Eis filtriert und 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/10 Volumen CIP-A-Puffer resuspendiert, auf einen zweistufigen Percoll-Gradient mit 45 % und 85 % geladen und für 10 min bei 4 °C und 10000 x g in einem Ausschwingrotor aufgetrennt. Aufgrund des kleinen Maßstabes von 2 ml und im Hinblick auf die weitere Verwendung wurden die Banden mit den Thylakoiden und mit den intakten Chloroplasten vereinigt und zweimal mit 1,5 ml CIP-A gewaschen, um das Percoll zu entfernen. Die aufgereinigten Thylakoide wurden in wenig CIP-A zurückgelöst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) und der Chlorophyllgehalt nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Isolierte Proteine wurden auf SDS-haltigen Polyacrylamidgelen (Verhältnis Acrylamid / N,N-Bisacrylamid 38:1) nach der Methode von Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden Gele mit einer 12,5 %-igen Trennschicht und einer etwa 5 %-igen Sammelschicht verwendet. Die Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert, indem sie mit 1/5 Volumen Lauffpuffer (310 mM Tris-HCl pH 6,8 / 10 % (w/v) SDS / 50 % (v/v) Glycerin / 0,5 % Bromphenolblau-Farbstoff) sowie 1/10 Volumen β -Mercaptoethanol versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine für 45 Sekunden auf 85 °C erhitzt und anschließend für 5 min abzentrifugiert. Der Elektrophoresepuffer enthielt 25 mM Tris / HCl pH 8,8, 192 mM Glycin und 0,06 % SDS. Die aufgetrennten Proteine wurden nach der Elektrophorese mittels Coomassie-Farbstoff (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure) eingefärbt (Congdon *et al.*, 1993) oder für die immunologische Analyse weiterbehandelt.

2.3.3 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine

Für die immunologischen Analysen wurden die Proteine nach erfolgter Elektrophorese mittels einer Trockenblot-Apparatur (cti, Idstein/Taunus) auf eine Immobilon P-(PVDF)-Membran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Abweichend von der Methode von Kyhse-Andersen (1984) wurde für den Proteintransfer nur ein Transferpuffer eingesetzt (96 mM Glycin / 10 mM Tris / 10 % (v/v) Methanol, Towbin *et al.*, 1979). Vor dem Aufbau der Western-Blot-Apparatur wurden das SDS-Polyacrylamidgel und die Membranen für 15 min im Transferpuffer äquilibriert. Zum Transfer wurde für zwei Stunden lang eine Spannung von 0,6 mA/cm² Filterfläche angelegt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Filter nach dem Proteintransfer für eine Stunde in TBS-B (20 mM Tris-HCl (pH 7,6) / 137 mM NaCl = TBS mit 1 % (w/v) Rinderserumalbumin) oder in Rotiblock-Reagenz (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Die Filter wurden über Nacht bei 4 °C mit Antikörpern in TBS-T (TBS mit 0,1 % (v/v) Triton X-100) inkubiert.

Nach der Entfernung der Antikörperlösung wurden die Filter dreimal in TBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei 4 °C mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten Antikörper-Peroxidase-Konjugat inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in TBS-T wurde der gebundene Antikörper mittels des Enhanced Chemiluminescence Systems detektiert.

Sollte ein Filter wiederverwendet werden, wurden die gebundenen Erst- und Zweitantikörper durch eine 30-minütige Inkubation in 62,5 mM Tris pH 6,7 mit 100 mM β -Mercaptoethanol und 2 % (w/v) SDS bei 60 °C entfernt. Nach zwei 15-minütigen Waschung in TBS-T konnte der Filter erneut mit Erstantikörper inkubiert werden.

2.4 Plastidentransformation

2.4.1 Biolistische Transformationsmethode

Bei der biolistischen (biologisch-ballistischen) Methode zur Plastidentransformation wird die Fremd-DNA mittels Beschuss mit DNA-beschichteten Goldkugeln in die Pflanzenzelle eingebracht (Boynton *et al.*, 1988, Finer *et al.*, 1999). Die Goldkugeln („microcarrier“) werden auf ein Plättchen („macrocarrier“) aufgebracht. Im Gasbeschleunigungsrohr wird mit Helium ein Überdruck aufgebaut, der ein weiteres Plättchen mit definiertem Berstdruck („rupture disc“) zerreißt. Das ausströmende Gas beschleunigt in der evakuierten Objektkammer den „Macrocarrier“, der an einem Drahtnetzchen („stopping screen“) abgebremst wird und dabei die Goldkugeln freigibt, die in das unterhalb in der Kammer positionierte Blattgewebe eindringen.

Zur Beschichtung der Goldkugeln mit DNA wurden 35 μ l der Goldkugeln (0,6 μ m, 60 mg in 1 ml EtOH, Bio-Rad, München, Randolph-Anderson *et al.*, 1995) kurz sedimentiert, der Überstand wurde abgenommen und das Sediment wurde in 1 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut sedimentiert. Danach wurde das Goldsediment in 230 μ l Wasser und 250 μ l 2,5 M CaCl₂ zusammen mit 25 μ g DNA resuspendiert. Vor der 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 50 μ l 0,1 M Spermidin (Sigma, München) zugegeben. Im nächsten Schritt wurde das beschichtete Gold sedimentiert und zweimal mit 600 μ l reinem Ethanol gewaschen. Nach den Waschungen wurde das Gold sorgfältig in 72 μ l reinem Ethanol resuspendiert.

Die zu beschießenden Tabakblätter stammten von 3 Wochen alten Pflanzen aus der Gewebekultur. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass für die Transformation die vier jüngsten Blätter die besten Ergebnisse liefern. Die Blätter wurden mit der Blattoberseite für 24 h bei 25 °C, einem 16h-Hell-8h-Dunkel-Zyklus und $200 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^2$ auf RMOP-Medium (4,4 g/l MS-Salze / 1 mg/l BAP / 100 $\mu\text{g/l}$ NAA / 100 mg/l myo-Inositol / 100 $\mu\text{g/l}$ Thiaminium-dichlorid / 3 % (w/v) Saccharose) nach Svab *et al.* (1990) vorinkubiert .

Für die Transformationen wurde die „Particle gun PDS 1000/He“ von Bio-Rad (München) mit folgenden, für Tabak optimierten, Parametern verwendet (Kofer, persönliche Mitteilung; Heiser, 1992; Sanford *et al.*, 1993; Demel, 1995):

Berstdruck: 900 psi
Unterdruck: 0,06 bar

Abstände:
„rupture disc“ - „macrocarrier“ 8 mm
„macrocarrier“ - „stopping screen“ 8 mm
„stopping screen“ - Tabakblatt 7 cm

Goldsuspension / Beschuss 5 μl

Bei jeder Transformation wurden ungefähr 3 μg DNA pro Schuss eingesetzt. Nach dem Beschuss wurden die Blätter für zwei Tage auf RMOP-Medium in der Klimakammer kultiviert. Danach wurden sie in 3 x 3 mm große Stückchen geschnitten und mit der Blattunterseite nach unten auf RMOP-Medium, das 500 mg/l Spectinomycin enthielt, gelegt. Nachdem sich die Blattstücke stark gewölbt und vergrößert hatten, wurden sie erneut zerschnitten und auf frisches antibiotikahaltiges RMOP-Medium umgesetzt. Nach circa 3 Wochen bildeten sich die ersten spectinomycinresistenten grünen Kalli oder Sprosse. Vitrifizierte, d.h. glasig durchscheinende Kalli, wurden erneut zerteilt und wieder auf spectinomycinhaltiges RMOP-Medium gesetzt.

Die resistenten Sprosse wurden auf spectinomycinhaltigem B5-Medium (2.1.3) bewurzelt und angezogen.

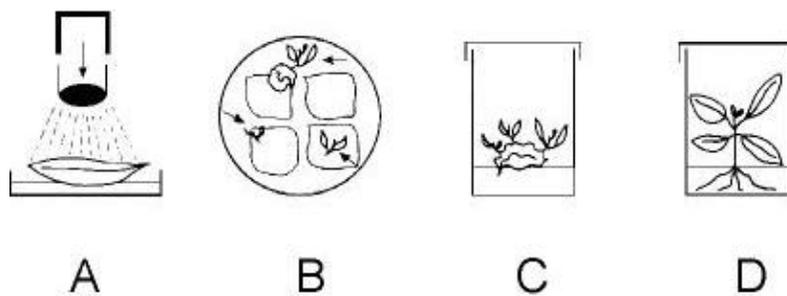


Abb. 5: Schematische Darstellung der biolistischen Plastidentransformation. (A) Beschuss des Blattgewebes mit DNA-beschichteten Goldkügelchen, (B) Selektion auf antibiotikahaltigem Medium, (C) Kultivierung der resistenten Kalli zu Sprossen, (D) Bewurzelung der Sprosse und Haltung der transformierten Pflanzen in Gewebekultur (nach Maliga, 1993)

2.4.2 Polyethylenglykol (PEG)-vermittelte Transformationsmethode

Die PEG-vermittelte Plastidentransformation (Spörlein *et al.*, 1991; Golds *et al.*, 1993; Kofer *et al.*, 1998), im weiteren als PEG-Transformation bezeichnet, ist eine Alternative zur biolistischen Transformationsmethode (O'Neill *et al.*, 1993). Vor der eigentlichen Transformation steht die Gewinnung der Protoplasten und danach die Regeneration und Anzucht der transformierten Pflanzen.

Blätter von zwei bis drei Wochen alten *in-vitro* gezogenen Tabaksprosskulturen wurden von der Mittelrippe befreit und in 1 mm dünne Streifen geschnitten, die in 10 ml PIN-Lösung (MS-Macrosalze modifiziert: 10 mM KNO₃ / 440 mg/l CaCl₂ / 370 mg/l MgSO₄ / 170 mg/l KH₂PO₄ / 20 mM NH₄-Succinat / 0,1 % MS-Microsalze (Murashige & Skoog, 1968) / 0,1 % PC-Vitamine / 0,1 % Polypuffer 74 (LKB-Pharmacia, Uppsala, Schweden) / 1 mg 6-Benylaminopurin (BAP) / 100 µg α-Naphtalenessigsäure (NAA) / mit Saccharose auf 550 mOsm eingestellt, pH 5,8) für 1 h präplasmolysiert wurden. Danach wurden die Blattstreifen in 10 ml frische PIN-Lösung, die jeweils 50 µg Cellulase Onozuka R10 und Maceroenzym R-10 enthielt, für 16-18 Stunden im Dunkeln inkubiert.

Die Protoplastensuspension wurde durch einen 100 µm-Metallfilter in sterile Röhrchen überführt, mit 2 ml PCN (entspricht der Zusammensetzung von PIN mit dem Unterschied, dass die Osmolarität durch Glucose und 20 g Saccharose auf 550 mOsm eingestellt wird) überschichtet und für 10 min lang bei 70 x g zentrifugiert. Von den drei entstandenen Banden enthielt die mittlere die für die Transformation geeigneten Protoplasten, die mit einer Pasteurpipette entnommen wurde. Nach dem Auffüllen auf 10 ml mit PTN (0,4 M Mannitol / 15 mM CaCl₂ mit 1N KOH auf pH 5,6) wurde mittels einer Zählkammer die Anzahl der Protoplasten bestimmt. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 70 x g wurden die Protoplasten sedimentiert und auf eine Zelldichte von 5 x 10⁶ Protoplasten/ml eingestellt.

Für die Transformation wurden zu 100 µl der Protoplastensuspension 50 µg DNA in 18 µl TE-Puffer (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH 5,6), sowie 7 µl PCN und 125 µl PEG-Lösung (70 mM Ca(NO₃)₂ / 40 % PEG 1500, pH 9,7) hinzugegeben. Nach 7,5 min wurden abermals 125 µl PCN und nach weiteren 2 min 2,6 ml PCN hinzugegeben.

Zur Regeneration wurde die Protoplastensuspension im Verhältnis 1:1 mit 2,8 % Alginate (Roth, Karlsruhe; in 0,5 mM Mannitol / 7 mM MES, pH 5,7) gemischt. Die Suspension wurde auf 6 x 6 cm große Kunststoffnetze mit einer Maschenweite von 0,5 mm (Spörl, Sigmaringendorf) getropft, die auf Ca²⁺-Agar gelegt wurden. Nach dem Aushärten wurden die eingebetteten Protoplasten für eine halbe Stunde in PCN äquilibriert und danach zur Zellwandbildung über Nacht in PCN inkubiert.

Nach sieben Tagen wurden die Netze mit den Mikrokolonien, die sich aus den Protoplasten gebildet hatten, von dem Flüssigmedium PCN auf das Festmedium RMOP gesetzt, das nach der zweiten Kulturwoche mit jeweils 500 mg/l Streptomycin und Spectinomycin versetzt wurde. Nach der 13. Woche wurde nur noch mit Spectinomycin selektiert. Grüne Kalli wurden von den Netzen gepickt, auf RMOP-Medium zu Sprossen regeneriert und in Gewebekultur auf B5-Medium mit Antibiotikazusatz (2.1.3) bewurzelt.

2.4.3 Selektion der Transformanten

Die aus der PEG- und der biolistischen Transformation erhaltenen Sprosse wurden auf spectinomycinhaltigem B5-Medium angezogen. Diese Pflanzen wurden als *F₀-in-vitro*-Pflanzen bezeichnet, da es die erste „Pflanzengeneration“ in Gewebekultur war, die aus dem Transformationsereignis hervorgeging.

Die *F₀* -Pflanzen wurden nun zyklisiert, um den homoplastomischen Zustand zu erreichen, d.h. dass das Mutagenesekonstrukt in allen Plastomkopien inseriert wird. Dazu wurden kleine Blattstücke von ca. 3 x 3 mm zur Sprossbildung mit der Blattunterseite auf spectinomycinhaltiges RMOP-Medium gelegt. Die daraus entstandenen Sprosse wurden zur Bewurzelung wieder auf spectinomycinhaltiges B5-Medium gesetzt. Dieser Vorgang wurde mindestens zweimal wiederholt. Nach der letzten Zyklisierungsrunde wurden die Sprosse zur Bewurzelung auf spectinomycinhaltiges B5-Medium gesetzt. Diese Pflanzen wurden als „*F₀-in vitro* I, II, III“ bezeichnet. Bei der PEG-vermittelten Transformation wurden 9 bis 12 Zyklisierungen und bei der biolistischen Transformation 3 bis 4 Zyklisierungen durchgeführt.

Die Transformationen wurden von Frau Dr. Waltraud Kofer am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität in München durchgeführt und die transformierten Tabakpflanzen als „*F₀-in vitro*“-Pflanzen zum Sichten nach Düsseldorf gebracht.

2.4.4 Sichtung der Plastidentransformanten

Die Transformanten wurden auf physiologischer und molekularer Ebene gesichtet. Zur Sichtung der Transformanten wurden ca. 3 Wochen alte „*F₀-in vitro*“-Pflanzen aus Gewebekultur verwendet, die noch nicht zyklisiert waren.

Mittels Southern-Analyse (2.2.2) wurde die korrekte Insertion des Mutagenesekonstruktes ins Plastom und der plastomische Zustand der Pflanzen untersucht. Die Verwendung spezifischer DNA-Sonden erlaubte die Identifizierung von Pflanzen mit Wildtypkopien des Plastoms, Transformanten und der korrekten Integration der Resistenzkassette ins Plastom. Über die Signalstärke, bzw. das Verhältnis von Transformanten- und Wildtypsignal, konnte auch der homo- oder heteroplastomische Zustand der Pflanzen abgeschätzt werden.

Die physiologische Sichtung wurde über die Messung der Chlorophyllfluoreszenz (2.7.2) vorgenommen.

2.5 Quantifizierung der Stärke

Zur Bestimmung des Stärkegehaltes der Blätter wurde in einem ersten Schritt die Stärke aus dem Blattmaterial isoliert und zu Glucose abgebaut. In einem zweiten Schritt wurde die Glucose durch eine Enzymreaktion quantitativ nachgewiesen (Lloyd & Whelan, 1969).

In definierten Zeitabständen (Ende der Belichtungsphase, 12 h, 24 h und 48 h) wurden von jeder Pflanze aus zwei benachbarten Blättern jeweils zwei Blattscheiben mit einem Durchmesser von 10 mm entnommen. Die Blattscheiben wurden sofort in 1 ml 80 %-iges Ethanol gegeben und bis zur Quantifizierung bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung der Stärke wurden durch Extraktion in heißem Ethanol zunächst die Blattpigmente entfernt. Dazu wurden die Proben für 10 min bei 100 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und der Überstand durch frisches Ethanol ersetzt, bis keine Grünfärbung mehr auftrat. Das entfärbte Gewebe wurde durch eine 30-minütige Inkubation mit 0,2 N KOH bei 100 °C lysiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde der pH-Wert der Suspension mit 1 N Essigsäure auf 5,5 eingestellt. In der nachfolgenden Enzymreaktion wurde die Stärke im Überstand durch eine einstündige Inkubation bei 55 °C mit Amyloglucosidase (35 U in 50 mM NaAcetat-Puffer pH 4,5; Fluka, Buchs, Schweiz) zu Glucose abgebaut. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 100 °C gestoppt.

Die Quantifizierung der Glucose erfolgte über eine enzymatische Reaktion. 500 µl des glucosehaltigen Überstandes wurde für 30 Minuten bei 25 °C mit 1 ml Glucose-Oxidase-Reagenz inkubiert (4 U Glucose-Oxidase / 2 U Meerrettich-Peroxidase / 200 µg o-Dianisidine Dihydrochlorid in 300 mM Tris / 360 mM NaH₂PO₄ / 40 % (v/v) Glycerol). Dabei wird Glucose zu Gluconat umgewandelt. Das dabei entstandene FADH₂ reagierte mit Wasser zu FAD und Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid reagierte anschließend über die Peroxidase mit o-Dianisidine Dihydrochlorid zu Wasser und 3,3-Dimethoxy-4,4-Diimnodiphenon, wodurch eine Rotfärbung hervorgerufen wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 N HCl gestoppt wodurch die Farbe von rot in violett umschlug. Die Extinktion wurde bei 525 nm gemessen und die Glucosekonzentration über eine Eichreihe bestimmt. Die Enzymreaktion ist eine Endpunktbestimmung, bei der die maximale Rotfärbung nach 20 Minuten eintritt und die Färbung danach für 18 h stabil ist.

2.6 Analyse der Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Pigmentzusammensetzung der Pflanzen wurde mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht (Färber und Jahns, 1998). Das Blattmaterial, eine Blattscheibe mit einem Durchmesser von 1 cm, wurde am Ende einer Belichtungsphase geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Extraktion der Pigmente wurde die Probe, bei ständiger Kühlung in flüssigem Stickstoff, mit einem motorgetriebenen Pistill zerkleinert und in reinem Aceton resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen 0,2 µm-Filter (Sartorius, Göttingen) filtriert und auf einer *reversed-phase*-Säule (Gilmore & Yamamoto, 1991) aufgetrennt. Die Trennung auf der Säule beruhte auf der Polarität der Pigmente, d.h. unpolare Pigmente verweilten länger auf der Säule und wurden erst mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels eluiert.

Das HPLC-System bestand aus der Pumpe L-7100, Integrator L-500, Autosample L-7200 und dem D-7000-HPLC-System-Manager (alle Hitachi / Merck, Darmstadt). Ein Probenvolumen von 20 µl wurde über eine Vorsäule (LiChroCART 4-4) vorgereinigt und auf einer LiChroCART 250-4 – Säule mit LiChrospher 100 RP-18 als Trennmateriale (Säulen und Trennmateriale, Merck, Darmstadt) aufgetrennt.

Die Pigmente wurden bei einer Flussrate von 2 ml/min mit folgendem Elutionsprogramm von der Säule eluiert:

	Minuten
100% A	0 – 9
lin. Gradient auf 100% B	9 - 12,5
100% B	12,5 – 18
lin. Gradient auf 100% A	18 – 19
100% A	19 – 23

Das Lösemittel A bestand aus Acetonitril, Methanol und 0,1 M Tris-NaOH (pH 8,0) im Verhältnis 87:10:3 und das Lösemittel B aus Methanol und Hexan im Verhältnis 4:1. Eluierte Pigmente wurden photometrisch über ihre Absorption bei 440 nm detektiert und das Elutionsprofil aufgezeichnet. Die Identifikation erfolgte über ihre Retentionszeiten, die über kommerziell erhältliche Pigmentstandards und selbst isoliertes Violaxanthin und Neoxanthin ermittelt wurden (Färber, 1997).

Die Quantifizierung der Pigmente erfolgte durch die Umrechnung der Fläche unter den Spitzen (Absorption x min) mit den folgenden Koeffizienten (Havier *et al.*, 1997; Färber *et al.*, 1997):

Pigment	Retentionszeit (min)	Koeffizient (Fläche / pmol Pigment)
Neoxanthin	3	2722
Violaxanthin	4	3211
Antheraxanthin	6	2192
Lutein	9	2192
Zeaxanthin	10	2707
Chlorophyll b	13	1298
Chlorophyll a	14	1609
β-Carotinoid	17	2001

Die jeweilige Pigmentmenge wurde auf pmol/μmol Chlorophyll umgerechnet. Außerdem wurde mit den ermittelten Werten das Verhältnis Chlorophyll a zu Chlorophyll b bestimmt, sowie das Verhältnis des Gesamtchlorophylls zu den Carotinoiden.

Die Pigmentanalyse wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Thomas Graßes am Institut für Biochemie der Pflanzen, Düsseldorf, durchgeführt.

2.7 Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessungen

2.7.1 Theoretische Grundlagen

Die Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessung ist eine nicht-invasive Methode um Vorgänge im photosynthetischen Elektronentransport zu verfolgen.

In Abbildung 6 ist eine typische Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve mit ihren Parametern gezeigt.

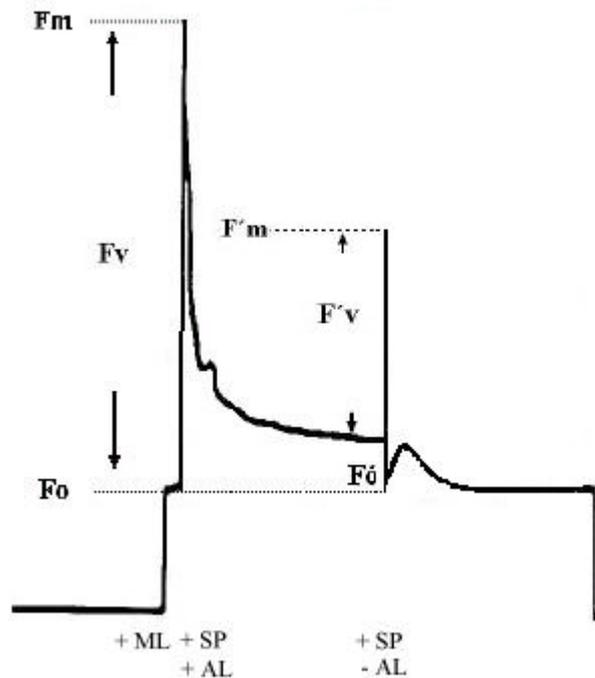


Abb. 6: Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve (nach van Kooten & Snel, 1990). ML: Messlicht, AL: Aktinisches Licht, SP: Sättigungspuls, F_0 : Grundfluoreszenz, F_m : Maximale Fluoreszenz, F_v : variable Fluoreszenz, F : Fluoreszenz bei konstanter Photosyntheserate, F'_m/F'_v : Maximale und variable Fluoreszenz bei konstanter Photosyntheserate, F'_0 : Grundfluoreszenz nach Abschalten des aktinischen Lichtes.

Durch Einschalten des Messlichtes (ML) mit geringer Lichtintensität kann man die Grundfluoreszenz F_0 ermitteln. Die Grundfluoreszenz F_0 wird von den Antennenpigmenten des Photosystem II emittiert noch bevor Excitonen das Reaktionszentrum erreichen. Die Grundfluoreszenz F_0 ist somit unabhängig von photochemischen Ereignissen. Der reale F_0 - Wert kann ermittelt werden, wenn der Primärakzeptor Q_A vollständig oxidiert, d.h. alle Reaktionszentren offen, vorliegt (Butler, 1977).

Nach Gabe von aktinischem Licht, d.h. photosynthetisch aktivem Licht, und eines Sättigungspulses (SP) steigt die Chlorophyllfluoreszenz auf den maximalen Wert F_m . Der Anstieg spiegelt die vollständige Reduktion von Q_A wider (Schreiber *et al.*, 1986). Die Differenz zwischen maximaler Fluoreszenz und Grundfluoreszenz wird als variable Fluoreszenz F_v bezeichnet (Krause und Weis, 1984, 1991). Nach dem Erreichen von F_m fällt die Fluoreszenz bis zur Einstellung des photosynthetischen Fließgleichgewichtes (F) auf ein konstantes Niveau oberhalb der Grundfluoreszenz F_0 ab. Nach dem Abschalten des aktinischen Lichtes erreicht die Fluoreszenz ein Niveau nahe der Grundfluoreszenzniveau. Anschließend kann man einen kurzzeitigen Fluoreszenzanstieg beobachten, den sogenannten

transienten Dunkelanstieg, der nach 2 - 3 min wieder auf ein Niveau nahe der Grundfluoreszenz zurückfällt (Mano *et al.*, 1995).

Der Abfall der Kurve nach dem Erreichen des Maximums F_m erfolgt in mehreren Phasen, bis sich ein konstantes Niveau F einstellt und wird durch Löschungsfaktoren, bestimmt. Die Auflösung der Lösungskomponenten liefert wichtige Informationen über den Zustand des Photosyntheseapparates.

Man unterscheidet zwischen der photochemischen und der nicht-photochemischen oder energieabhängigen Fluoreszenzlöschung (Bradbury und Baker, 1983). Die photochemische Fluoreszenzlöschung qP hängt vom Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A ab. Die Reoxidation von Q_A gilt als hauptsächlicher Lösungskomponente.

Die nicht-photochemische oder energieabhängige Fluoreszenzlöschung qN wird in drei Hauptmechanismen unterteilt. Die energieabhängige Löschung qE wird durch den Aufbau eines Protonengradienten über der Thylakoidmembran hervorgerufen und macht den Hauptanteil der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung aus (Briantais *et al.*, 1979). Die Fluoreszenzlöschung qT wird durch Phosphorylierung der Lichtsammelkomplexe des Photosystems II (LHCII) bei „state I / state II“ Übergängen verursacht (Briantais *et al.*, 1986), während es bei der photoinhibitorischen Löschung qI (Powles und Björkman, 1982) zu Beschädigungen des Photosyntheseapparates kommt.

2.7.2 Messung der Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve wurde bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometers (Walz, Effeltrich) durchgeführt. Das Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer besteht aus der Kontrolleinheit PAM 101/103, der Weißlichtquelle FL 101, der Fernrotlichtquelle 102 FR, der Emitter- / Detektoreinheit 101 ED und der Faseroptik 101 F (Schreiber *et al.* 1986; Schreiber 1983, 1986).

Die Blattproben wurden 2-3 Stunden nach Beginn der Belichtungsphase entnommen und auf feuchtem Filterpapier leicht abgedunkelt gelagert. Die zu messenden Blattscheiben (1 cm Durchmesser) wurden in einer Messküvette (LSC-2, ADC Ltd., Hoddeson, England) eingespannt, so dass der Abstand zwischen der Blattprobe und der Faseroptik konstant 0,5 cm betrug.

Die Grundfluoreszenz F_0 wurde durch gepulstes Messlicht (Taktfrequenz 100 kHz, Pulsdauer 1 μ sec, $PFD = 1 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, Wellenlänge 650 nm) angeregt. Um den realen F_0 - Wert zu ermitteln, wurde die zu messende Blattprobe vor der Messung für mindestens zehn Minuten dunkeladaptiert, um Q_A vollständig zu oxidieren.

Durch das Auslösen eines sättigenden Weißlichtpulses ($PFD > 6000 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, Pulsdauer 300 msec) wurde die maximale Fluoreszenz F_m ermittelt. Nach dem sättigenden Lichtpuls wurde langwelliges Fernrotlicht (720 nm, $PFD = 0,3 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) zugeschaltet, bis die Fluoreszenz wieder das F_0 - Niveau erreichte.

Die Photosynthese wurde durch aktinisches Licht mit verschiedenen Lichtintensitäten ($PFD = 20, 130, 360$ und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) angeregt, wobei über einen Zeitraum von zehn Minuten anhand der abnehmenden Fluoreszenz die Einstellung des photosynthetischen Fließgleichgewichtes (F) verfolgt wurde. Nach dem Einstellen des photosynthetischen Gleichgewichtes wurde erneut ein sättigender Lichtpuls ausgelöst, wodurch F'_m bestimmt wurde. Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes wurde die Grundfluoreszenz (F_0') bestimmt, die von F_0 abweichen konnte. Der transiente Dunkelanstieg wurde bei einer Lichtstärke von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ nachgewiesen.

Zur Bestimmung der photochemischen und energieabhängigen Löschungsfaktoren qP und qN wurde die Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve mit Hilfe der Sättigungspulsmethode (Schreiber *et al.*, 1995) gemessen. Dabei wurde nach Einschalten des aktinischen Lichtes alle 10 sec ein sättigender Lichtpuls ausgelöst, der das Photosystem II kurzfristig vollständig reduziert. Die Sättigungspulsmethode erlaubt es die Entwicklung der beiden Löschungsfaktoren über die Zeit zu beobachten.

Mit den ermittelten Werten für F_0 , F_m , F_v , F'_m , F'_v , und F'_0 konnten verschiedene Parameter des photosynthetischen Elektronentransports bestimmt werden.

Die Anregungseffizienz von Photosystem II F_{exc} lässt sich aus dem Verhältnis F_v/F_m bestimmen ($F_{exc} = F_v/F_m$) (Björkmann & Demmings, 1987).

Die Anregungseffizienz F_{exc} von Photosystem II beschreibt die Effizienz, mit der die Energie zu den Reaktionszentren des Photosystem II weitergeleitet wird, und somit die Effizienz der Reduktion des Primärakzeptors Q_A .

Die photochemische Effizienz oder effektive Quantenausbeute von Photosystem II F_{II} („Genty-Koeffizient“) wird mittels der Formel F_{II} (oder F_e) = $(F'_m - F) / F'_m = DF/F_m$ berechnet (Genty *et al.*, 1989).

Die photochemische Effizienz F_{II} beschreibt die tatsächliche Effizienz des Photosystems II mit der Elektronen pro absorbiertes Quant in die Elektronentransportkette eingespeist werden.

Die photochemische Fluoreszenzlöschung qP lässt sich durch $qP = F'_m - F/F'_v$ (Bilger & Schreiber, 1986) bestimmen.

Die photochemische Fluoreszenzlöschung beruht auf der Weiterleitung der Elektronen in die photosynthetische Elektronentransportkette. Je höher der Wert für qP ist, desto mehr Energie wird durch die Elektronentransportkette geleitet.

Die nichtphotochemische oder energieabhängige Fluoreszenzlöschung qN wird durch $qN = 1 - F'_v/F_v$ (Bilger & Schreiber 1986, Bilger & Björkman 1990) bestimmt, wobei $F'_v = F'_m - F$ ist.

Die Hauptkomponente der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung besteht in der Energetisierung der Thylakoidmembran in Form eines ΔpH -Gradienten über der Membran. Je höher der Wert für qN liegt, desto stärker ist die Thylakoidmembran energetisiert und trägt so zur Löschung bei.

Der Redoxzustand von Q_A ergibt sich aus der Rechnung: $Q_{A\ red} = 1 - qP$ (Huner *et al.*, 1996).

Der Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A , auch als Elektronendruck im Photosystem II bezeichnet, zeigt das Gleichgewicht zwischen Energieangebot und Nutzung im Photosystem II. Steigt der Wert, so wird Q_A nicht im gleichen Maß reoxidiert, wie es reduziert wurde. Somit dient der Wert als Indikator für den Redoxzustand von Photosystem II und die Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette.

Die relative Elektronentransportrate für den linearen Elektronentransport wird durch die Gleichung: $rel. ETR J = F_{II} \times PFD \times 0,42$ ermittelt.

Der konstante Wert von 0,42 entspricht der durchschnittlichen Absorption von 84% der eingestrahlenen Quanten, verteilt auf zwei Photosysteme. Die relative Elektronentransportrate dient als Maß für die Ladungstrennung im Photosystem II (Schreiber *et al.*, 1994).

2.8 Messung der P700-Redox-Kinetiken

Da die Chlorophyllfluoreszenz des Photosystems I bei Raumtemperatur zu gering ist, kann das Photosystem I nicht über die Chlorophyllfluoreszenz charakterisiert werden. Deshalb wurde mittels eines modifizierten PAM-Fluorometers, das zusätzlich mit einer Emittor-Detektor-Einheit ED-P700DW (Walz, Effeltrich) ausgestattet war, der Redoxzustand des Photosystems I bestimmt (Schreiber et al. 1988a). Gemessen wurde die Absorptionsänderung des P700 bei einer Wellenlänge von 830 nm. Dazu wurden die vorher für 15 min dunkeladaptierten Blattstücke für 10 min mit aktinischem Licht ($130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) bestrahlt. Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes wurde bei eingeschaltetem Messlicht (Taktfrequenz 100 kHz, maximal mögliche Lichtintensität, die sich an der Detektoreinheit abgleichen ließ) die maximale Absorptionsänderung ΔA_{max} durch Zugabe von Fernrotlicht (720 nm, $\text{PFD} = 0,3 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) bestimmt. Die Absorptionsänderung ΔA_{max} entsteht durch die Oxidation des Photosystems I. Durch einen sättigenden Weißlichtpuls (300 msec, $\text{PFD} > 6000 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) wurde eine kurzzeitige Reduktion des P700 induziert. Nach der Reoxidation wurde bei eingeschaltetem Fernrotlicht aktinisches Licht der verschiedenen Lichtintensitäten (20, 130, 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) zugeschaltet und nach Erreichen eines Gleichgewichtes die Absorptionsänderung ΔA , die durch eine Reduktion des Photosystems I entsteht, gemessen. Mit den ermittelten Werten ΔA und ΔA_{max} wurde der Anteil an reduziertem Photosystem I bei der jeweiligen Lichtintensität bestimmt (Harbinson und Woodward 1987).

$$\text{P700}_{\text{red.}} (\%) = 1 - (\Delta A / \Delta A_{\text{max}}) \times 100$$

Bei einer erhöhten Schreiberauflösung wurde nach Abschalten des Fernrotlichtes die Rereduktion des Photosystems I gemessen und die Halbwertszeit des Kurvenabfalls bestimmt, um Aussagen über die Geschwindigkeit der Rereduktion machen zu können.

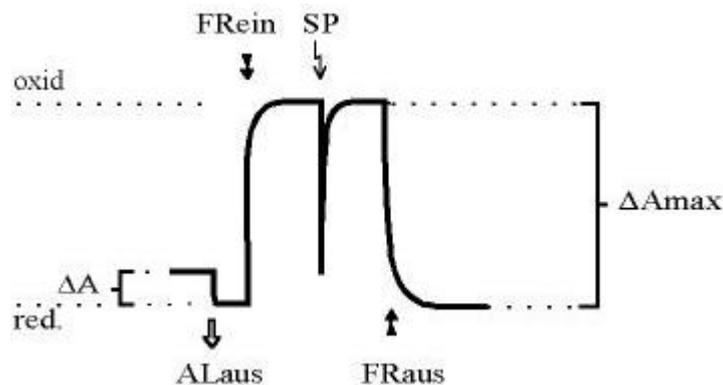


Abb. 7: Redoxkinetik von P700.

FR: Fernrotlicht; AL: Aktinisches Licht; SP: Sättigungspuls; DA: Absorptionsänderung; oxid./red.: oxidiert/reduziert

Um repräsentative Aussagen aufgrund der Chlorophyllfluoreszenzmessungen und der P700-Redoxkinetiken treffen zu können, wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

Von jedem Mutagenese-konstrukt wurden mindestens zwei unabhängige Linien, untersucht. Es wurden von jeder Linie drei Pflanzen für die Chlorophyllfluoreszenzmessungen ausgewählt. Aus den gemessenen Werten wurde die photochemische Effizienz FII ermittelt und gegen die verwendeten Lichtintensitäten aufgetragen. Die beiden Pflanzen, die den ähnlichsten Kurvenverlauf aufwiesen, wurden für die Messungen der P700-Redoxkinetiken verwendet. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass das Zeitfenster für die Messungen möglichst klein blieb (circa 3 Wochen) und so die physiologischen Veränderungen der Pflanzen in dieser Zeit die Messwerte nicht zu stark beeinflussten.

2.9 Verwendete Computerprogramme

Für die Auswertung und die Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme Sigma-Plot 5.0 (SPSS), Photoshop 3.0.5 (Adobe Systems), Freehand 7 für Windows (Macromedia) und das Microsoft Office Paket verwendet.

III. Ergebnisse

1. Herstellung der Mutagenesekonstrukte und Transformation in Plastiden

1.1 Mutagenesekonstrukte für Untereinheiten des NDH-Komplexes

Für die in der Plastidentransformation verwendeten Mutagenesekonstrukte der *ndh*-Gene wurden die Ausgangsplasmide der Tabelle 4 verwendet. Im ersten Schritt wurden aus dem Plasmid pXS6.3 die beiden Subklone pIGE2846 und pGE2214 hergestellt (s. Tab. 7, Abb. 8). Der Subklon pIGE2846, der bei der Mutagenese von *ndhI* und *ndhG* verwendet wurde, diente zur Eliminierung der *EcoRV*- und der *XbaI*-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors. Auf diese Weise wurden singuläre Schnittstellen in den Zielgenen erhalten. Der Subklon pGE2214 wurde in den methylierungsdefizienten *E.coli*-Stamm SCS110 transformiert, da bei der Mutagenese von *ndhE* ein Restriktionsverdau mit dem methylierungssensitiven Enzym *BclI* durchgeführt werden sollte.

Tab. 7: Subklone aus pXS6.3

Plasmid	Größe (bp)	Restriktionsstellen	Inhalt
pIGE2846	2846	<i>AsnI</i> 119558/ <i>AsnI</i> 122404	<i>ndhA</i> / -I / -G / -E
pGE2214	2214	<i>XhoI</i> 118604 / <i>EcoRV</i> 120818	<i>ndhG</i> / -E; <i>psaC</i> ; <i>ndhD</i>

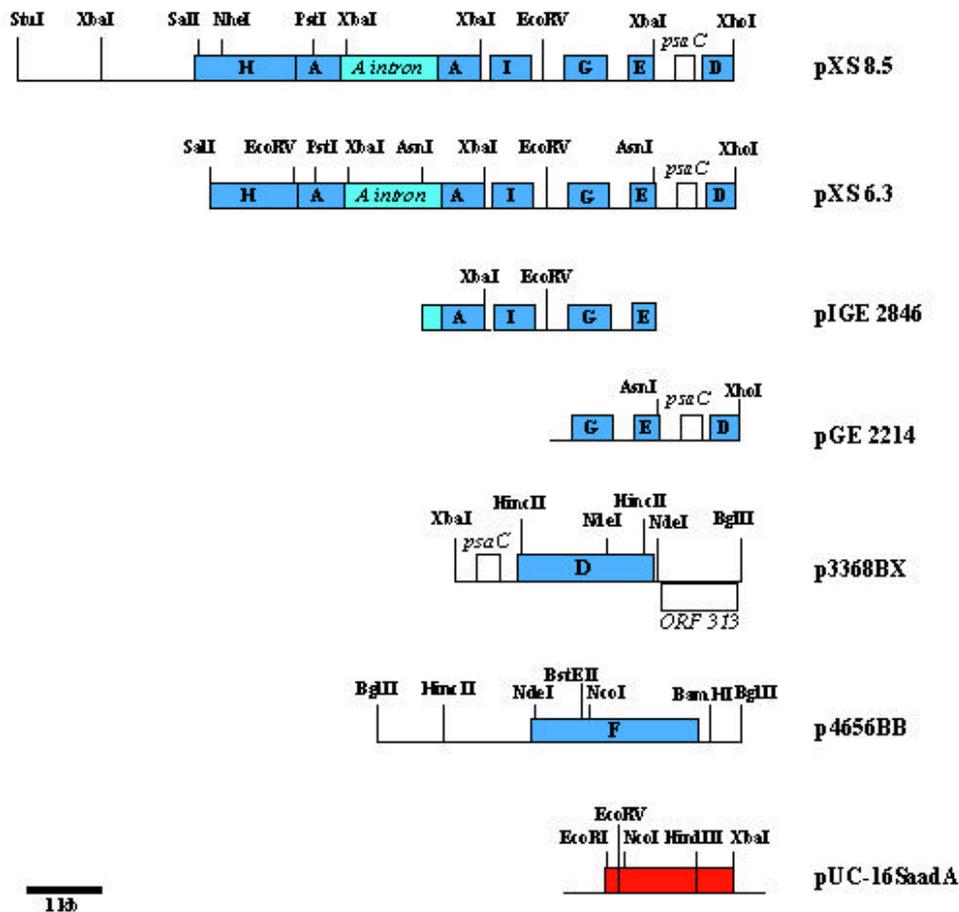


Abb. 8: Zur Verfügung gestellte Ausgangsplasmide pXS 8.5 und pXS 6.3 mit den neuen Subklonen pIGE2846 und pGE2214 und die zur Mutagenese verwendete Resistenzkassette pUC-16SaadA. Zudem sind die Plasmide pD3368BX und p4656BB dargestellt, die für neue Mutagenesekonstrukte von *ndhD* und *ndhF* verwendet wurden (Tab. 8 A)

Für die Insertion der Resistenzkassette, bzw. für die Deletion eines Fragments des Zielgens und der anschließenden Insertion der Resistenzkassette, wurden singuläre Schnittstellen in den entsprechenden Zielgenen so ausgewählt, dass die flankierenden Bereiche groß genug waren um eine homologe Rekombination in den Plastiden zu ermöglichen.

Sowohl die Excisionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* der Resistenzkassette, als auch die Schnittstellen in den Zielgenen wurden durch eine Inkubation mit der Klenow-DNA-Polymerase aufgefüllt. So konnte die Ligation mit der Resistenzkassette mit glatten Enden an den gewünschten Positionen in beiden Orientierungen, d.h. in und gegen die Leserichtung der Zielgene, erfolgen. Mit der gleichen Methode wurden auch die in Tabelle 7 aufgeführten Subklone pIGE2846 und pGE2214 hergestellt.

Über Restriktionsanalysen wurde die Orientierung der Resistenzkassette überprüft. Die Plasmide mit der jeweiligen Orientierung wurden im Großmaßstab präpariert und für die Plastidentransformation eingesetzt. Einzelheiten zu den Mutagenesekonstrukten sind in Tabelle 8 B und Abbildungen 9 A - J aufgeführt.

Tab. 8: Untersuchte Mutagenesekonstrukte. Teiltabelle A beinhaltet die zur Verfügung gestellten Mutagenesekonstrukte, die bereits zum Teil in Koop *et al.* (1996), Kofer *et al.* (1998) und Steinmüller *et al.* (1998) veröffentlicht wurden. Teiltabelle B beinhaltet die neu hergestellten Mutagenesekonstrukte aus der vorliegenden Arbeit.

A.

Konstrukt	Zielgen(e)	Mutation	Insertionsstelle ^a	Orientierung der aadA-Kassette ^b	Referenz
pndhC-H(-I)	<i>ndhC</i>	Insertion	<i>HindIII</i> 52368	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhC-H-II	<i>ndhC</i>	Insertion	<i>HindIII</i> 52368	-	K. Steinmüller
pndhCKJ-HN(-I)	<i>ndhC</i> / -K / -J	Deletion	<i>HindIII</i> 52368 / <i>NdeI</i> 51112	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhCKJ-HN-II	<i>ndhC</i> / -K / -J	Deletion	<i>HindIII</i> 52368 / <i>NdeI</i> 51112	-	K. Steinmüller
pndhHAI-RV(-I)	<i>ndhH</i> / -A / -I	Deletion	<i>EcoRV</i> 123868 / <i>EcoRV</i> 120818	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhJ-N(-I)	<i>ndhJ</i>	Insertion	<i>NdeI</i> 51112	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pndhD-NN(-I)	<i>ndhD</i>	Deletion	<i>NdeI</i> 117993 / <i>NdeI</i> 117299	+	Steinmüller <i>et al.</i> (1998)
pndhD-NN-II	<i>ndhD</i>	Deletion	<i>NdeI</i> 117993 / <i>NdeI</i> 117299	-	K. Steinmüller
pndhF-BB-I	<i>ndhF</i>	Deletion	<i>BstEII</i> 113447 / <i>BamHI</i> 113119	+	K. Steinmüller
pndhF-N-I	<i>ndhF</i>	Insertion	<i>NcoI</i> 113436	+	K. Steinmüller
pIGE-aad I	^c	Insertion	<i>XbaI</i> 11954	+	Kofer <i>et al.</i> (1998)
pIGE-aad II	^c	Insertion	<i>XbaI</i> 11954	-	K. Steinmüller
pF-aad I	^c	Insertion	<i>SnaI</i> 115265	+	Koop <i>et al.</i> (1996)
pF-aad II	^c	Insertion	<i>SnaI</i> 115265	-	Koop <i>et al.</i> (1996)
pUC19-rpoB	^c	Insertion	<i>SmaI</i> 28195	-	W. Kofer

B. (Fortsetzung Tabelle 7)

Konstrukt	Zielgen	Mutation	Restriktions-schnittstelle ^a	Orientierung der aadA-Kassette ^b	Ausgangs-plasmid
pndhE-BX-I	<i>ndhE</i>	Deletion	<i>BclI</i> 119794 / <i>XbaI</i> 119540	+	pGE2214
pndhE-BX-II	<i>ndhE</i>	Deletion	<i>BclI</i> 119794 / <i>XbaI</i> 119540	-	pGE2214
pndhI-XE-I	<i>ndhI</i>	Deletion	<i>XbaI</i> 121578 / <i>EcoRV</i> 120818	+	pIGE2846
pndhI-XE-II	<i>ndhI</i>	Deletion	<i>XbaI</i> 121578 / <i>EcoRV</i> 120818	-	pIGE2846
pndhA-NA-I	<i>ndhA</i>	Deletion	<i>NdeI</i> 123758 / <i>AocI</i> 122294	+	pXS6.3
pndhA-NA-II	<i>ndhA</i>	Deletion	<i>NdeI</i> 123758 / <i>AocI</i> 122294	-	pXS6.3
pndhA-N-I	<i>ndhA</i>	Insertion	<i>NdeI</i> 123758	+	pXS6.3
pndhA-N-II	<i>ndhA</i>	Insertion	<i>NdeI</i> 123758	-	pXS6.3
pndhG-EM-I	<i>ndhG</i>	Deletion	<i>EcoRV</i> 120818 / <i>MunI</i> 120101	+	pIGE2846
pndhG-EM-II	<i>ndhG</i>	Deletion	<i>EcoRV</i> 120818 / <i>MunI</i> 120101	-	pIGE2846
pndhH-N-I	<i>ndhH</i>	Insertion	<i>NheI</i> 124727	+	pXS8.5
pndhH-N-II	<i>ndhH</i>	Insertion	<i>NheI</i> 124727	-	pXS8.5
pndhH-SN-I	<i>ndhH</i>	Deletion	<i>SalI</i> 124907 / <i>NheI</i> 124727	+	pXS8.5
pndhH-SN-II	<i>ndhH</i>	Deletion	<i>SalI</i> 124907 / <i>NheI</i> 124727	-	pXS8.5

^a Basenpaarnummer nach der Nummerierung von Shinozaki *et al.* (1986).

^b (+) und (-) geben die Orientierung der 16SaadA-Kassette an: (+) in Leserichtung der *ndh*-Gene und (-) gegen die Leserichtung der *ndh*-Gene

Die in Klammern gesetzten Bezeichnungen „-I“ in Teiltabelle A stellt eine Veränderung gegenüber der in der Veröffentlichung (Kofer *et al.*, 1998) benutzten Bezeichnung dar und dient zur Unterscheidung von nachträglich hergestellten Mutagenesekonstrukten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert wurden („-II“).

^c Bei den Konstrukten pIGE-aadI/II und pF-aadI/II wurde die Resistenzkassette in die Nähe eines oder mehrerer *ndh*-Gene inseriert, ohne das Leseraster zu zerstören. Bei dem Konstrukt pUC19-rpoB wurde die Kassette vor den Promotorbereich des *rpoB*-Gens inseriert und somit in großer Entfernung zu den *ndh*-Genen. Die Transformanten sollten als Kontrollen dienen.

Die Bezeichnungen der Mutagenesekonstrukte wurden nach der Plastidentransformation als Bezeichnungen für die Transformanten übernommen.

Nachstehende Pflanzen wurden in den folgenden Untersuchungen als „Serie A“ zusammengefasst. Dabei handelt es sich um bereits transformierte und teilcharakterisierte Pflanzen aus der Gewebekultur, die näher charakterisiert werden sollen: pndhC-H(-I), pndhCKJ-HN(-I), pndhHAI-RV(-I), pndhJ-N(-I), pIGE-aadI, pIGE-aadII, pF-aadI, pF-aadII und pndhD-NN(-I) (Koop *et al.*, 1996; Kofer *et al.*, 1998; Steinmüller *et al.*, 1998).

Die positiven Transformanten mit den Mutagenesekonstrukten aus der Teiltabelle B sowie die bisher nicht transformierten Konstrukte aus der Teiltabelle A (pndhD-NN-II, pndhF-BB-I, pndhF-N-I, pndhCKJ-HN-II, pndhC-H-II) und die zur Verfügung gestellte Transformante pUC19-rpoB wurden als „Serie B“ bezeichnet.

1.2 Transformation der Konstrukte in Tabakplastiden

Die Mutageneseonstrukte der Serie A wurden über PEG-vermittelte Transformation (II.2.4.2) und die Konstrukte der Serie B über biolistische Transformation (II.2.4.1) in die Tabakplastiden gebracht. Die biolistische Transformationsmethode wurde gewählt, um die Anzahl der Zyklisierungen zu vermindern, und so eventuelle phänotypische Anomalien durch zu langes Kultivierung auf spectino- und streptomycinhaltigem Medium auszuschließen (Maliga & Nixon, 1998).

1.2.1 Sichtung der Transformanten

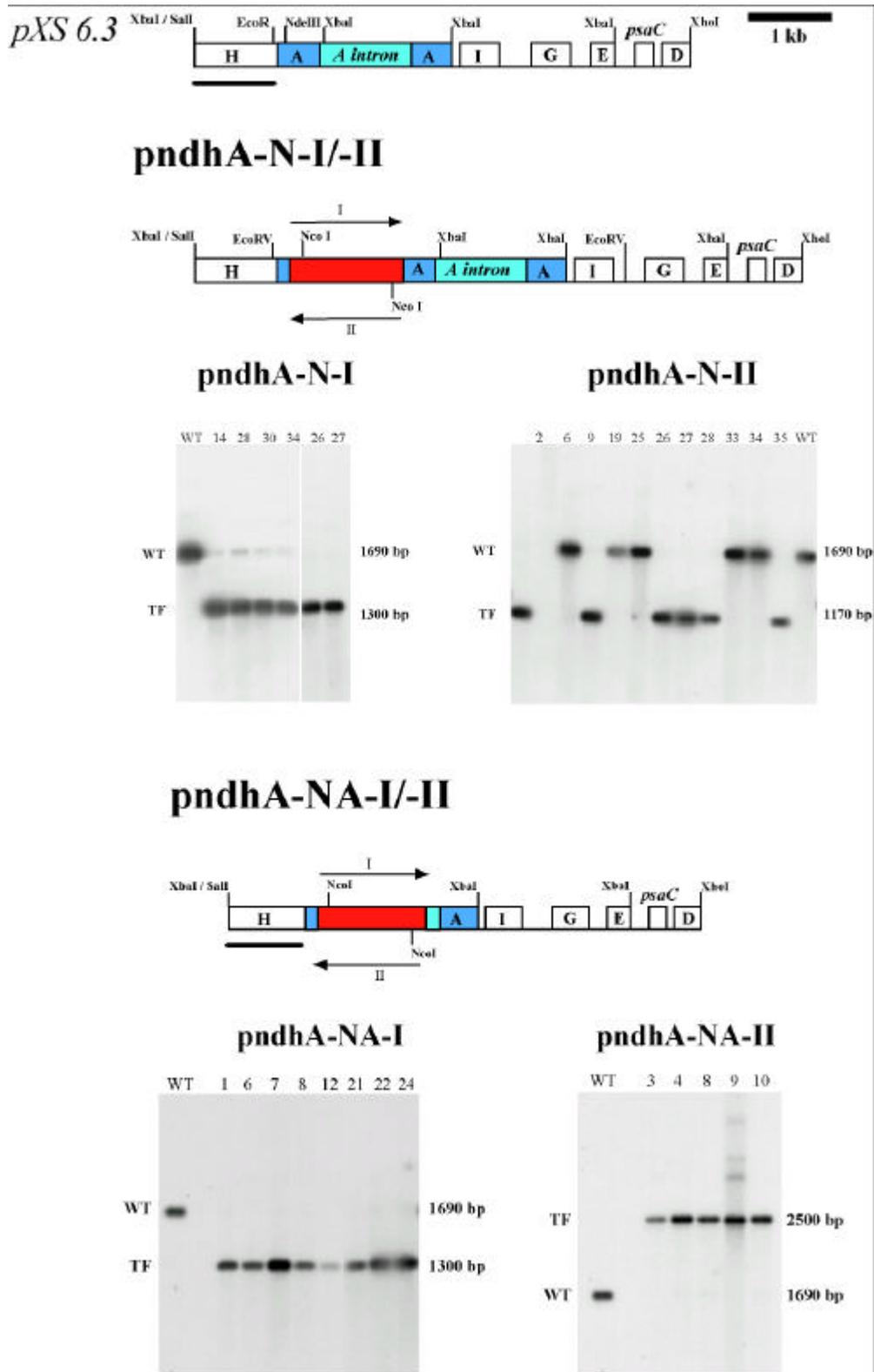
In der ersten Selektionsrunde wurden 50 Kalli selektiert, die weiter in Gewebekultur auf spectinomycin- und streptomycinhaltigem Medium angezogen wurden. Nach der ersten Selektionsrunde wurden mindestens 20 der aus den resistenten Sprossen regenerierten Pflanzen mittels einer Southern-Analyse und einer Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessung auf ihren Transformationszustand untersucht.

Für die Southern-Analyse wurde die Gesamt-DNA der Pflanzen mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, die so gewählt waren, dass anhand der Signale zwischen Wildtyp und korrekt transformierten Pflanzen unterschieden werden konnte (Tab. 9 und Abb. 9 A - J). Für die Southern-Analyse wurden jeweils mehrere Pflanzen einer Konstruktlinie unabhängig voneinander getestet.

Tab. 9: Übersicht über die erwartete Größe der Signale in der Southern-Analyse für den Wildtyp (WT) und die Transformanten (TF).

Konstrukt	Enzymkombination für Southern- Analyse	erwartete Fragmentgröße (bp)	
		WT	TF
pndhE-BX-I	<i>XbaI / HindIII</i>	2040	2700
pndhE-BX-II	<i>XbaI / HindIII</i>	2040	2300
pndhI-XE-I	<i>EcoRV</i>	3050	2400
pndhI-XE-II	<i>EcoRV</i>	3050	3600
pndhA-NA-I	<i>XbaI / NcoI</i>	1690	1300
pndhA-NA-II	<i>XbaI / NcoI</i>	1690	2500
pndhA-N-I	<i>XbaI / NcoI</i>	1690	1300
pndhA-N-II	<i>XbaI / NcoI</i>	1690	1170
pndhG-EM-I	<i>XbaI / HindIII</i>	2040	1700
pndhG-EM-II	<i>XbaI / HindIII</i>	2040	760
pndhH-N-I	<i>XbaI / HindIII</i>	1690	2010
pndhH-N-II	<i>XbaI / HindIII</i>	1690	2420
pndhH-SN-I	<i>XbaI / HindIII</i>	1690	2010
pndhH-SN-II	<i>XbaI / HindIII</i>	1690	2420
pndhD-NN-II	<i>HincII / EcoRV</i>	1441	2267
pndhF-BB-I	<i>HincII / EcoRV</i>	3916	2000
pndhF-N-I	<i>BglIII / EcoRV</i>	4746	2830
pndhCKJ-HN-II	<i>BglIII</i>	1743	3606
pndhC-H-II	<i>BglIII</i>	1743	3190

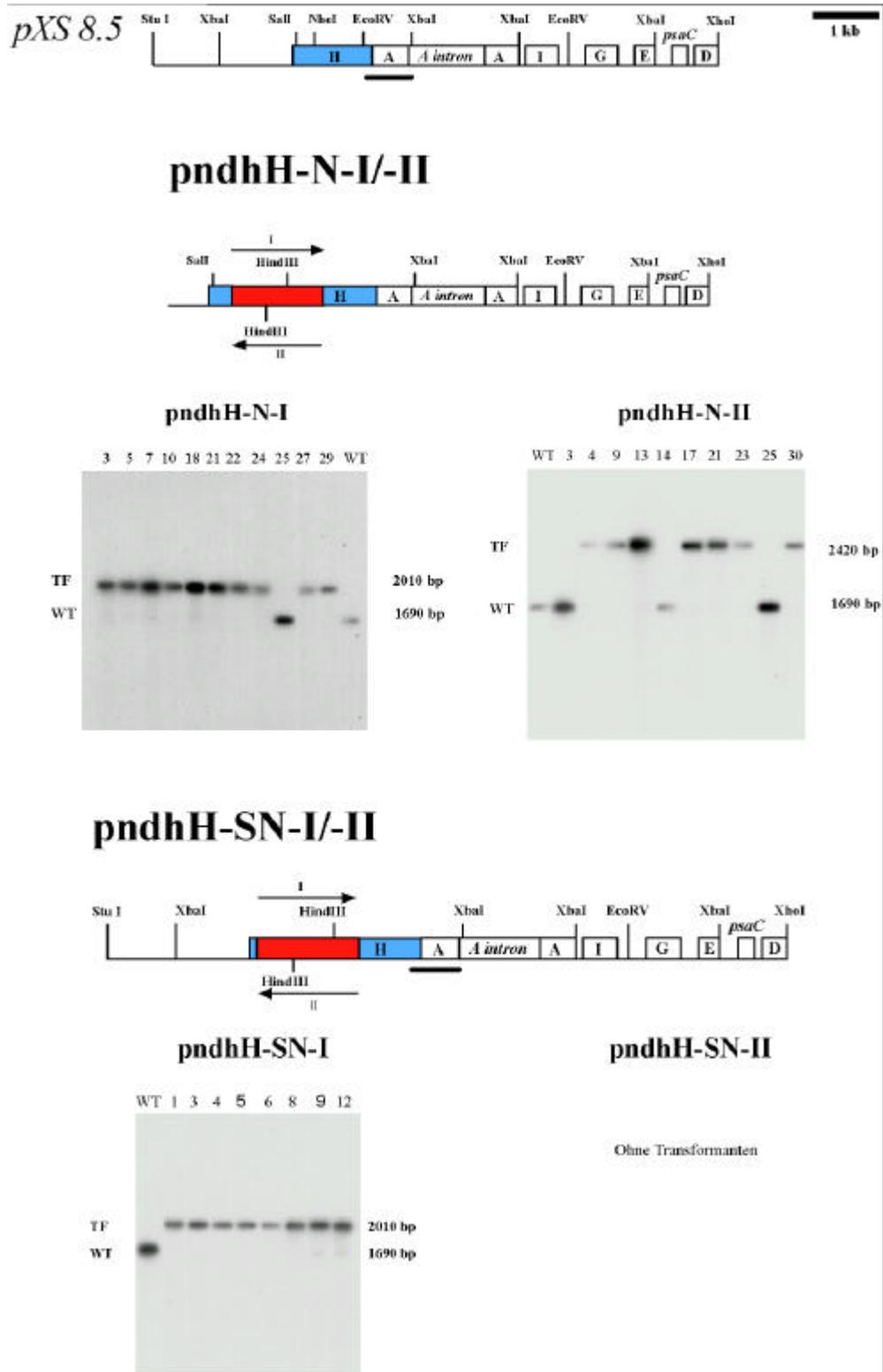
A.



B.

Abb. 9 A und B

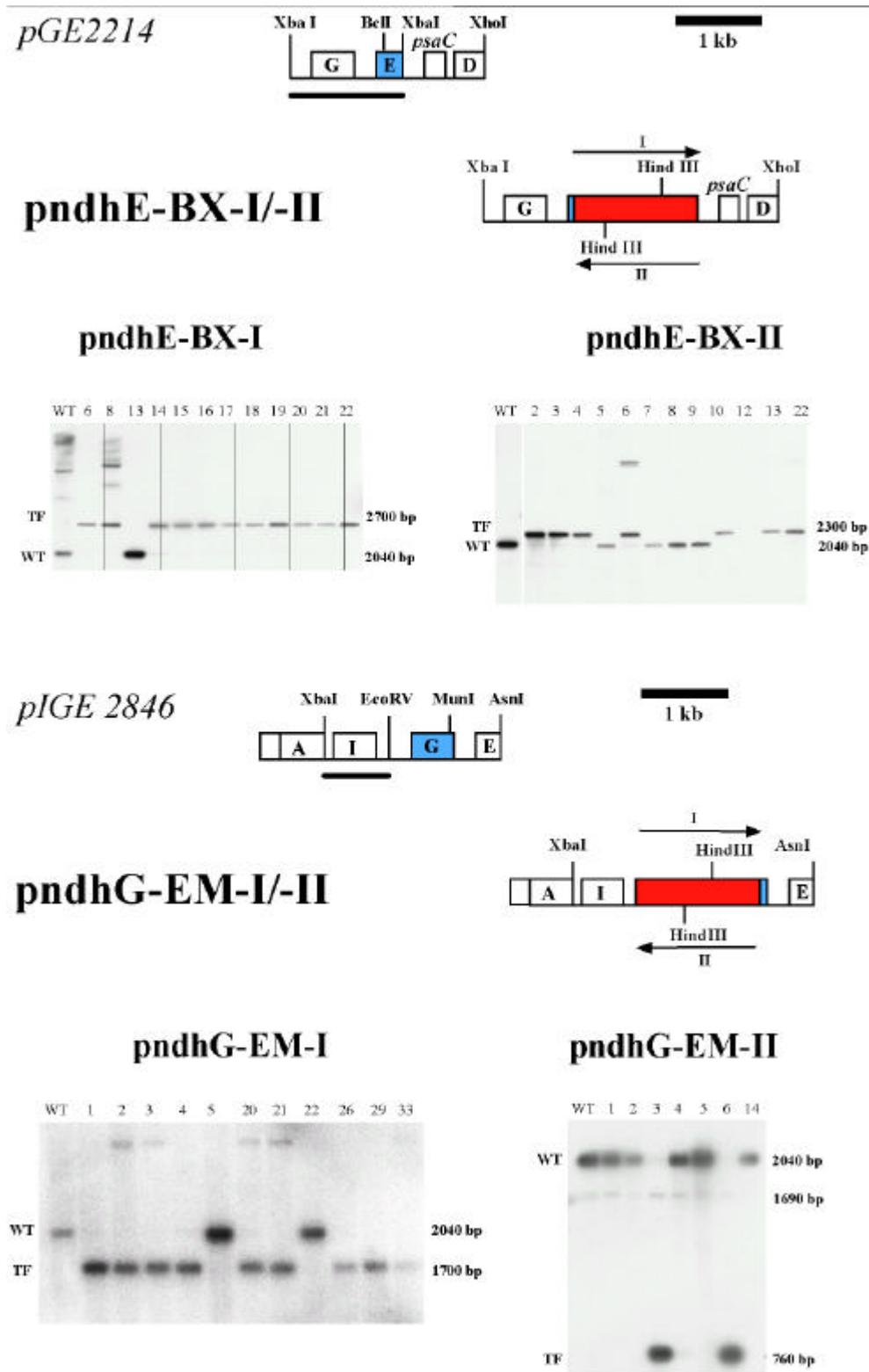
C.



D.

Abb. 9 C und D

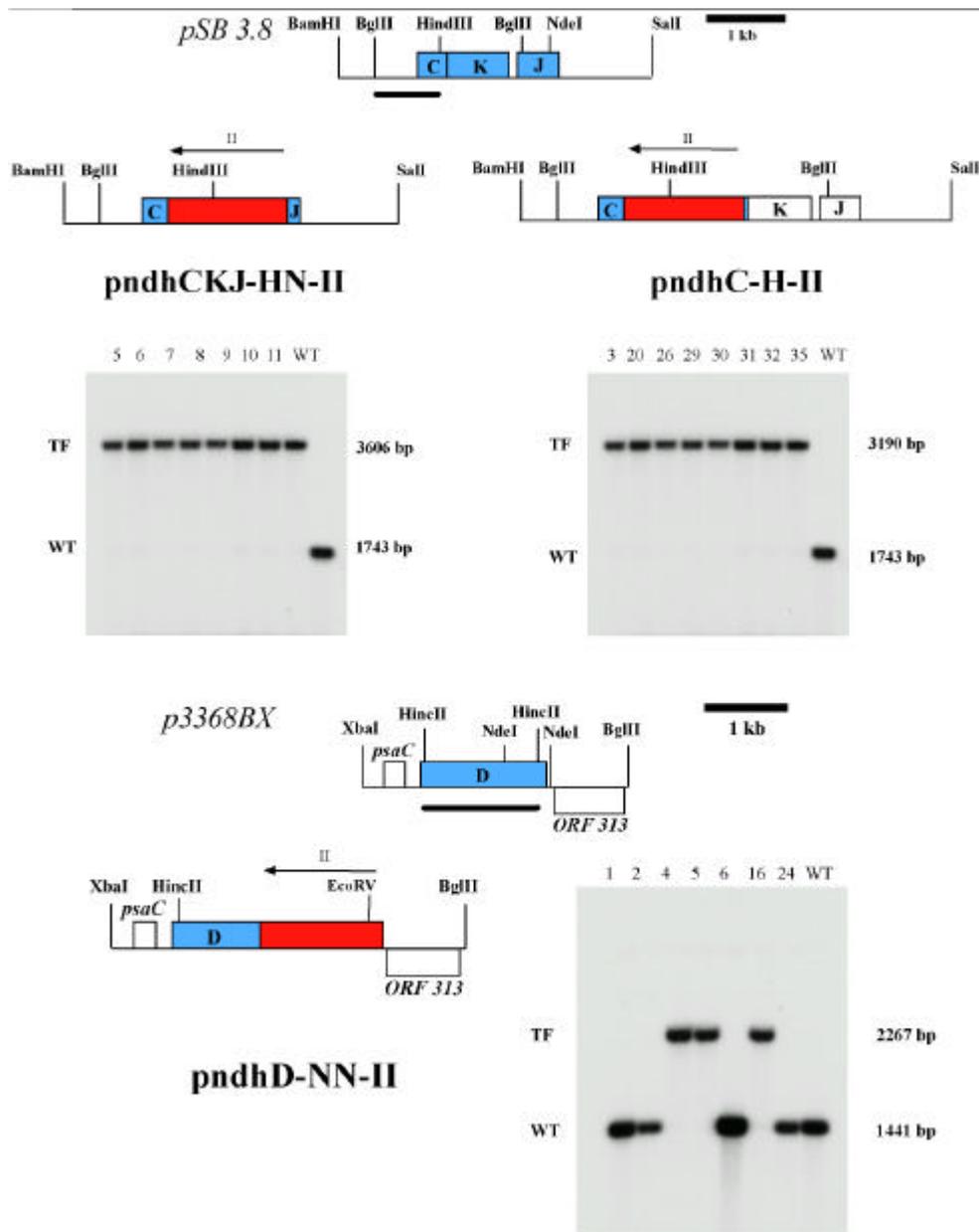
E.



F.

Abb. 9 E und F

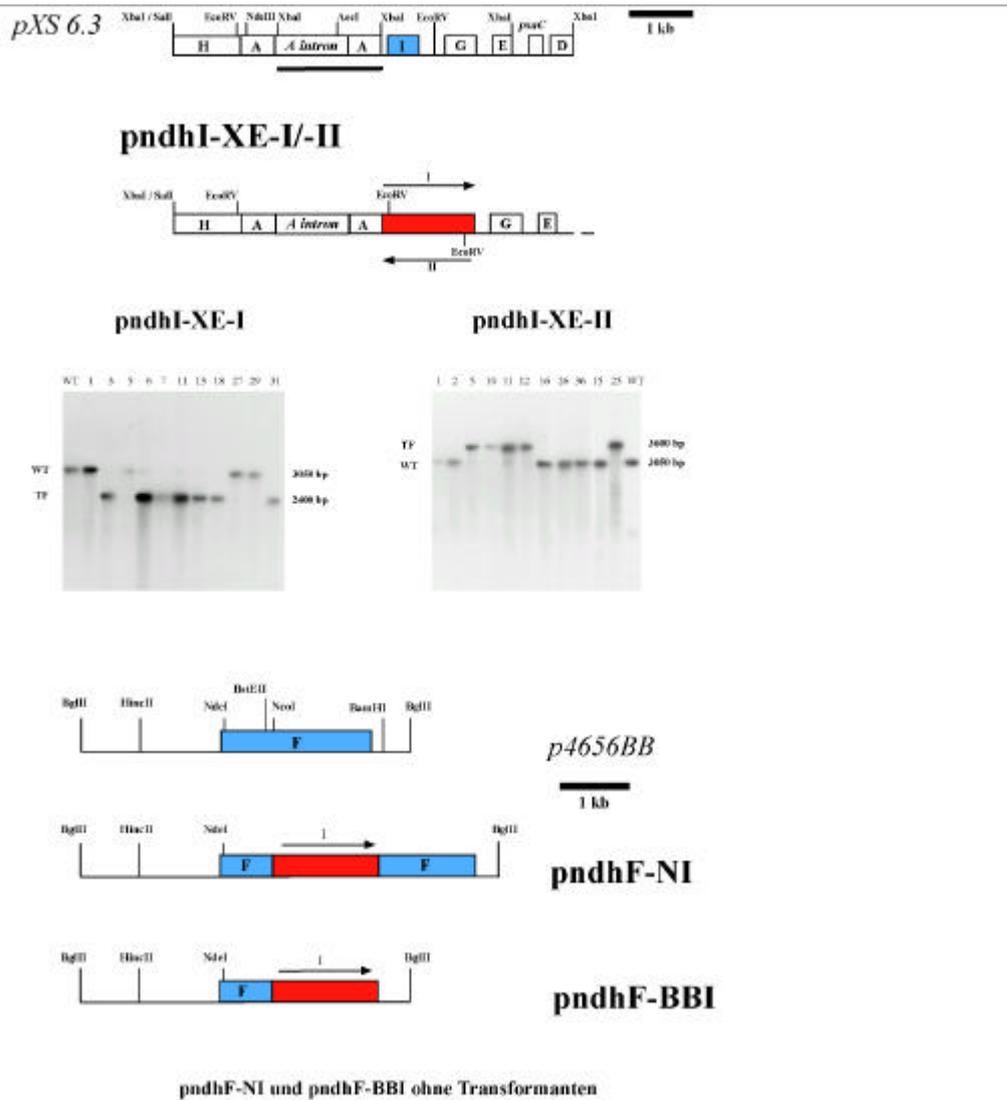
G.



H.

Abb. 9 G und H

I.



J.

Abb. 9 A - J: Mutagenesekonstrukte und die zugehörigen Southern-Analyse. Das mutagenisierte *ndh*-Gen ist blau dargestellt und die Resistenzkassette rot.

Die Pfeile an der Resistenzkassette zeigen die Orientierung der Resistenzkassette an: „ori I“ kennzeichnet die Orientierung in Leserichtung der *ndh*-Gene und „ori II“ die Orientierung gegen die Leserichtung der *ndh*-Gene. Der schwarze Balken unter dem Ausgangskonstrukt kennzeichnet die verwendete Sonde für die Southern-Analyse.

Es wurden jeweils circa 0,5 µg geschnittene DNA pro getestete Pflanze eingesetzt. Die Markierung der Sonden und die Hybridisierung erfolgte wie in II.2.2. beschrieben. Aufgrund der großen Anzahl der getesteten Pflanzen werden nicht alle Southern-Analysen gezeigt.

Wie ein Vergleich mit Tabelle 9 zeigt, erkennt man in den Southern-Analysen bei den meisten Transformanten die erwarteten Fragmentgrößen. Diese positiven Transformanten wurden durch die Insertion des Mutagenesekonstruktes über homologe Rekombination an der erwünschten Stelle im Plastom erzeugt. Einige der Transformanten, wie z.B. pndhA-N-II Nr. 6, 19, 25, 33, 34 (Abb. 9 A) oder pndhE-BX-II Nr. 5, 7, 8, 9 (Abb. 9 E), zeigen keine Signale für das mutierte *ndh*-Gen, sondern deutliche Signale von der Größe des Wildtypsignals. Bei diesen Pflanzen wurde das Mutagenesekonstrukt nicht an der gewünschten Stelle inseriert, sondern die Pflanzen haben durch ein anderes Ereignis eine Resistenz gegen die Selektionsmarker Spectinomycin und Streptomycin erworben. Die Transformanten pndhA-N-I Nr. 14, 28, 30, 34 (Abb. 9 A) und pndhA-NA-II Nr. 4, 8, 10 (Abb. 9 B) zeigen neben den deutlichen Signalen für das mutierte Gen schwache Signale in der Größe des Wildtypsignals. Die Transformante pndhG-EM-II Nr. 1,2,3,4,5,6 (Abb. 9 F) zeigt neben den deutlichen Signalen für Wildtyp und Transformanten schwache Signale in einer Größe von circa 1700 bp.

Die nachfolgende Tabelle 10 zeigt eine Übersicht über die durch Southern-Analyse gesichteten Mutantenlinien und den prozentualen Anteil an positiven Transformanten. Man erkennt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Insertionsrichtungen der Resistenzkassette. Die Konstrukte mit der Kassette in Leserichtung der *ndh*-Gene zeigten einen höheren Anteil positiver Transformationsereignisse als solche, in der die Kassette gegen die Leserichtung der *ndh*-Gene inseriert wurde. Die Transformante pndhCKJ-HN-II (Abb. 9 G) bildete eine Ausnahme, bei der alle getesteten Pflanzen positive Transformanten waren. Die Deletionsmutagenese von *ndhH* mit der Resistenzkassette gegen die Leserichtung (pndhH-SN-II, Abb. 9 D), sowie die beiden Mutagenesen von *ndhF* (pndhF-BB-I und pndhF-N-I, Abb. 9 J) erbrachten keine Transformanten.

Tab. 10: Übersicht über die durch Southern-Analyse gesichteten Mutanten und deren prozentuale Anteil an positiven Transformanten. Von jeder Linie wurden mindestens 20 Pflanzen gesichtet.

Konstrukt	% Transformanten	Konstrukt	% Transformanten
pndhE-BX-I	92	pndhH-N-I	83
pndhE-BX-II	64	pndhH-N-II	70
pndhI-XE-I	58	pndhH-SN-I	100
pndhI-XE-II	44	pndhH-SN-II	-
pndhA-NA-I	89	pndhD-NN-II	43
pndhA-NA-II	55	pF-BB-I	-
pndhA-N-I	100	pndhF-N-I	-
pndhA-N-II	50	pndhCKJ-HN-II	100
pndhG-EM-I	82	pndhC-H-II	75
pndhG-EM-II	28		

Die positiven Transformanten wurden zweimal in Gewebekultur zyklisiert und dann im Gewächshaus zur Samenbildung gebracht, wobei die Transformante pndhD-NN-II zwar zur Blüte kam, aber keine Samen bildete.

Neben der Sichtung durch die Southern-Analyse wurden alle Transformanten über eine Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessung gesichtet. Der auffälligste Unterschied zwischen Wildtyp und Transformanten ist der fehlende transiente Dunkelanstieg nach dem Abschalten des aktinischen Lichtes bei den Transformanten (II.2.7.1, III.3.2). Die Sichtung der Transformanten über Chlorophyllfluoreszenzmessung zeigte, dass den über Southern-Analyse identifizierten positiven Transformanten der transiente Dunkelanstieg fehlte. Die Sichtung durch die Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessung eignete sich um eine große Anzahl an

Transformanten schnell zu sichten. Die Amplituden der Chlorophyllfluoreszenz-induktionskurve der Pflanzen aus der Gewebekultur waren im Vergleich zu den Gewächshauspflanzen größer (ohne Abbildung).

Zur weiteren Analyse auf molekularer und physiologischer Ebene wurden von jedem Konstrukt zwei Transformanten ausgewählt, die unter Gewächshausbedingungen auf Erde angezogen wurden.

1.2.2 Stabilität der Transformation

Um die Stabilität der Transformation zu überprüfen, wurden Transformanten ohne Selektionsdruck durch Spectinomycin im Gewächshaus auf Erde angezogen. Neben den neuen Transformanten der Serie B wurden auch Transformanten der Serie A angezogen, da diese Pflanzen bisher nur in Gewebekultur untersucht worden waren. Die Überprüfung der Stabilität erfolgte über Southern-Analyse. Es wurden die gleichen Bedingungen gewählt, wie in den Southern-Analysen der jeweiligen Gewebekulturpflanzen.

A.

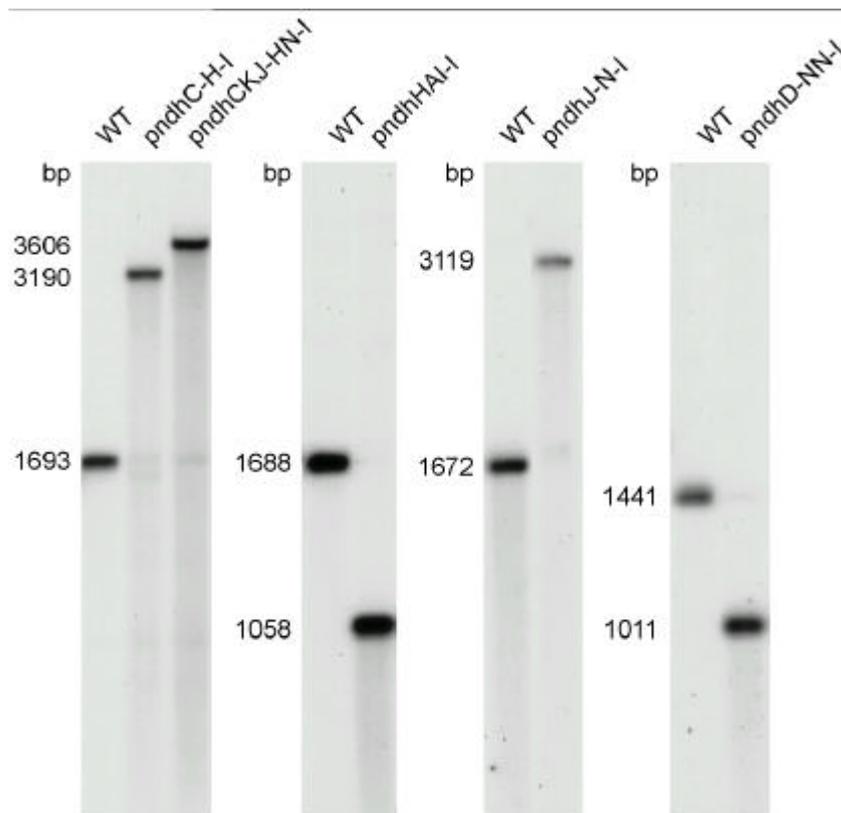


Abb. 10 A

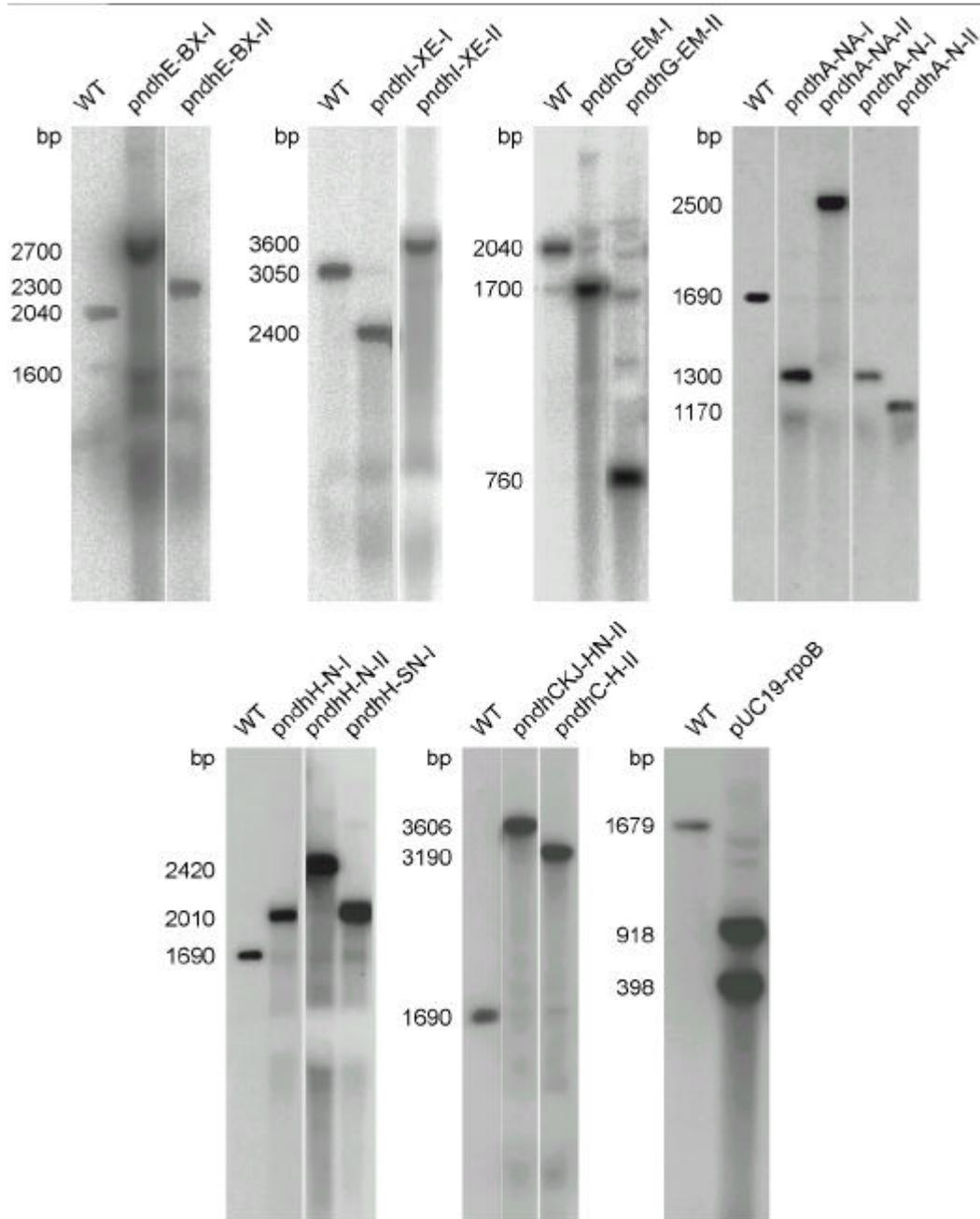
B.

Abb. 10: Southern-Analyse der Pflanzen der Serie A (A) und Serie B (B). Es wurde 1 μ g DNA eingesetzt und die Hybridisierung erfolgte wie in II.2.2.4. Es wird jeweils nur eine Transformante gezeigt.

Die Southern-Analysen der Gewächshauspflanzen der Serie A und B (Abb. 10) zeigen jeweils deutliche Signale für das betroffene Gen. Schwache Signale in der Größe des Wildtypsignals sind bei pndhC-H-I / -II, pndhCKJ-HN-I / -II, pndhD-NN-I pndhI-XE-I, pndhH-N-I / -II und pndhH-SN-I zu erkennen. Die Quantifizierung einiger dieser Signale mit Hilfe des Bioimagers ergab, dass sie weniger als 5 % der Intensität des Signals im Wildtyp hatten. Der Ursprung dieser Bande auf Höhe des Wildtypsignals ist noch unklar.

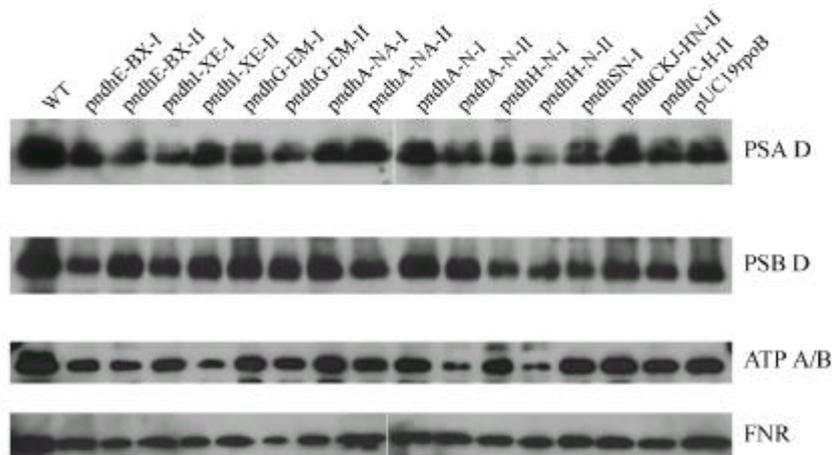
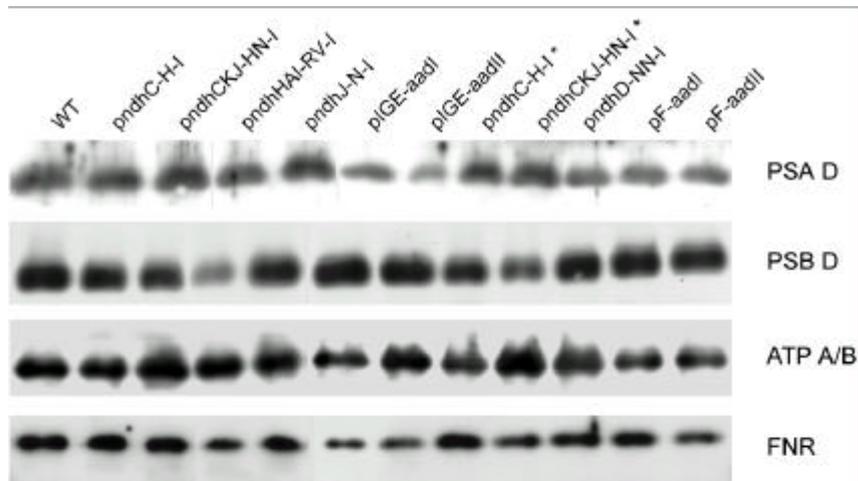
Die Southern-Analysen zeigen, dass auch ohne den Selektionsdruck durch Spectinomycin keine Wiederzunahme der Wildtypkopien erfolgte. Somit können die Transformanten als stabil angesehen werden.

1.2.3 Proteinspiegel der Transformanten

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Mutagenese des NDH-Komplexes auf die anderen Komplexe der Thylakoidmembran hat, wurden die Proteinspiegel einiger ausgewählter Untereinheiten des Photosystems I und II, der ATPase und der FNR untersucht. Für die Photosysteme I und II wurde die Untereinheit D und für die ATPase wurden die α - und β - Untereinheiten untersucht. Für den NDH-Komplex wurden die Proteinspiegel der membranperipheren Untereinheiten H und J (NDH-H / NDH-J) untersucht, da nur für diese beiden Untereinheiten Antikörper zur Verfügung standen.

1.2.3.1 Immunoblot-Analyse der Photosysteme I und II, der ATPase und der FNR

A.



B.

Abb. 11: Immunoblot-Analyse der Thylakoidmembrankomplexe der zur Verfügung gestellten Pflanzen der Serie A (A) und der neu erzeugten Mutanten der Serie B (B). PSI-D/PSII-D: Untereinheiten D aus dem Photosystem I und dem Photosystem II, α / β -UE ATPase: α - und β - Untereinheiten der ATPase, FNR: Ferredoxin-NADP-Reduktase. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen (15 μ g) aufgetragen. Die Analysen in (A) wurden zweimal und in (B) einmal durchgeführt. Bei den Konstrukten pndhC-H-I und pndhCKJ-HN-I wurden vergleichsweise Proteine aus Mutanten, die über PEG-vermittelte Transformation und biolistische Transformation (*) hergestellt worden sind, aufgetragen.

In Abbildung 11 erkennt man bei den Mutanten *pndhI-XE-I* und *pndhG-EM-II* und in den heller gefärbten Transformanten *pIGE-aadII*, *pndhH-N-II* und *pndhE-BX-II* eine Reduktion des Photosystems I. Das Photosystem II liegt außer bei den Mutanten, in denen die Untereinheit NDH-H betroffen ist und in den Transformanten *pndhCKJ-HN-I**, *pndhI-XE-I* und *ndhE-BX-I* in vergleichbaren Mengen wie der Wildtyp vor.

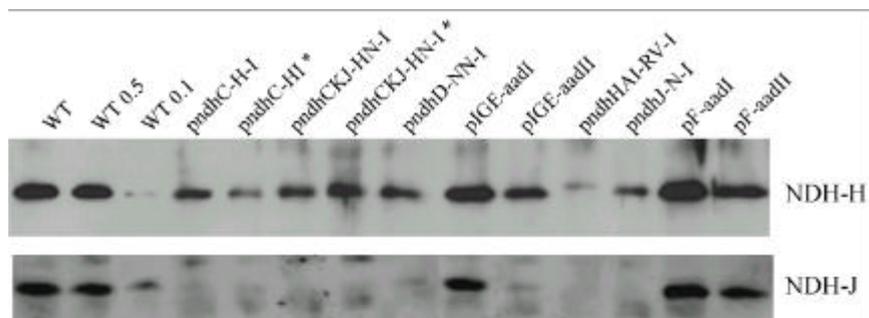
Die ATPase ist nur bei den Kontrollpflanzen *pIGE-aadI*, *pF-aadI* und *pF-aadII* leicht reduziert. Bei den Pflanzen der Serie B sind die Unterschiede in den Signalstärken stärker. Besonders stark sind die Signale bei den Transformanten *pndhI-XE-II*, *pndhA-NA-II* und *pndhH-N-II* reduziert. Für die FNR zeigen die Mutante *pndhG-EM-II* und die beiden Kontrolllinien *pIGE-aadI* und *pIGE-aadII* reduzierte Signale.

Eine Korrelation zwischen der Signalstärke und der Orientierung der Resistenzkassette lässt sich nicht erkennen. Beim Vergleich der Immunoblot-Analysen der PEG-vermittelten und den biolistisch transformierten Linien *pndhC-H-I* und *pndhCKJ-HN-I* erkennt man keine deutlichen Unterschiede. Daher werden die Transformanten aus den beiden Transformationsansätzen bei den weiteren Untersuchungen unter einer gemeinsamen Bezeichnung aufgeführt.

Die Analyse der Proteinspiegel zeigt, dass die Mutagenese des NDH-Komplexes insgesamt nur geringe Auswirkungen auf die Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette hat.

1.2.3.2 Immunoblot-Analyse des NDH-Komplexes

A.



B.

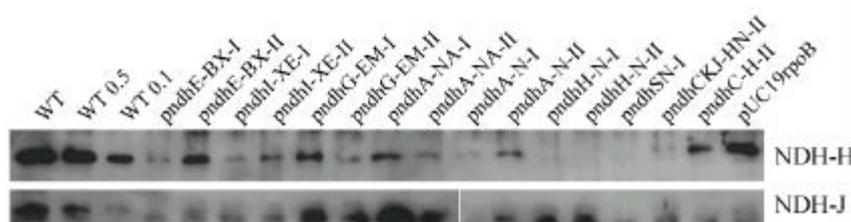


Abb. 12: Immunoblot-Analyse des NDH-Komplexes der Serie A (A) und der Serie B (B).

NDH-H / NDH-J: membranperiphere Untereinheiten H und J des NDH-Komplexes. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen (20µg) aufgetragen. Bei den Konstrukten *pndhC-H-I* und *pndhCKJ-HN-I* wurden vergleichsweise Proteine aus Mutanten, die über PEG-vermittelte Transformation und biolistische Transformation (*) hergestellt worden sind, aufgetragen.

Wie in Abbildung 12 (A) zu erkennen ist die Untereinheit NDH-H in allen Transformanten vorhanden, sie liegt jedoch im Vergleich zum Wildtyp um ca. 25 – 50% reduziert vor. Bei der Transformante *pndhHAI-RV-I*, bei der nur das 5'-Ende des *ndhH*-Gens von der Deletion betroffen ist, liegt das Signal für NDH-H etwas höher als im Wildtyp und ist deutlicher als in den anderen Transformanten reduziert. Die Größe deutet auf ein zusammengesetztes Protein hin, wie es entstehen würde wenn der Terminator der Resistenzkassette nicht richtig terminiert und neben dem *aadA*-Gen auch das *ndhH*-Gen transkribiert und translatiert würde. In den Kontrollpflanzen *pIGE-aadI*, *pF-aadI* und *pUC19rpoB* liegt NDH-H in vergleichbaren Mengen wie der Wildtyp vor. Bei den beiden Kontrolllinien *pIGE-aadII* und *pF-aadII* mit der Resistenzkassette entgegen der Leserichtung erkennt man dagegen eine Reduktion von NDH-H.

Die Immunoblot-Analyse der Untereinheit NDH-H zeigt in allen Transformanten der Serie B (Abb. 12 B) eine deutliche Reduktion auf bis zu unter 10 %. Wie zu erwarten zeigen die Mutanten, in denen die Untereinheit NDH-H betroffen ist, keine Signale. Im Vergleich zu den Pflanzen der Serie A (Abb. 12 A) erkennt man, dass die Untereinheit NDH-H in den Transformanten der Serie B stärker reduziert vorliegt.

NDH-J ist in den Mutanten *pndhC-H-I* und *pndhD-NN-I* zu weniger als 10% im Vergleich zum Wildtyp vorhanden (Abb. 12 A). In allen Mutanten, in denen *ndhJ* durch die Insertion der Resistenzkassette betroffen ist, kann man NDH-J nicht nachweisen. Das gleiche gilt für die Mutante *pndhHAI-RV-I*. Bei den Kontrollen *pIGE-aadI* und *pF-aadI*, bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, ist NDH-J in mit dem Wildtyp vergleichbaren Mengen vorhanden. Bei der Insertion der Resistenzkassette gegen die Leserichtung ist NDH-J, vor allem bei *pIGE-aad*, reduziert.

Wie in Abbildung 12 (B) zu erkennen ist, ist die Untereinheit NDH-J in allen neu erzeugten Transformanten sehr stark reduziert.

Die Pflanzen der Serien A und B zeigen bei der Immunoblot-Analyse der Untereinheit NDH-H und NDH-J ein unterschiedliches Bild. Waren bei den Mutanten Untereinheiten aus dem membranintegralen Teil des Komplexes betroffen, wie z.B. NDH-A / -E oder -G, so zeigten sie eine deutlich stärkere Reduktion, als bei den Untereinheiten aus dem verbindenden Fragment, wie z.B. NDH-I und -K. In den Mutanten, in denen die Untereinheiten NDH-H und NDH-J direkt durch die Mutagenese betroffen waren, waren diese nicht mehr nachzuweisen.

2. Morphologie der Mutanten

Bei der Anzucht in Gewebekultur zeigte sich zwischen Wildtyp und den verschiedenen Transformanten keine morphologischen Unterschiede.

Bei der Anzucht auf Erde unter Gewächshausbedingungen zeigten sich bei den meisten Mutanten bis zur siebten Woche ebenfalls keine auffallenden Unterschiede. Keimungsverhalten, Wuchsform und Färbung der Keimlinge und der jungen Pflanzen waren in Wildtyp und Transformanten vergleichbar. Ausnahmen bildeten die Mutanten *pIGE-aadII*, *pndhE-BX-II* und *pndhH-N-II*, die kleiner und heller gefärbt waren als die restlichen Mutanten und der Wildtyp. Während die ersten beiden Mutanten ihre helle Färbung beibehielten, glich sich die dritte Mutante in ihrer Färbung bei weiterem Wachstum den übrigen Pflanzen an. Der Größenunterschied blieb jedoch bestehen.

Erst ab der siebten Woche traten zwischen Wildtyp und Transformanten immer stärkere Unterschiede auf.



Abb. 13: Habitus von Wildtyp (links) und Transformante (rechts) zu Beginn der achten Woche nach der Aussaat. Exemplarisch ist die Mutante pndhC-H-I abgebildet.

Der auffallendste Unterschied zwischen Wildtyp und Transformanten war der Blühzeitpunkt. Die Mutanten blühten zwischen der achten und zehnten Woche, während der Wildtyp erst ab der vierzehnten Woche mit der Blütenbildung begann.

In Abbildung 13 erkennt man, dass die Transformante zu Beginn der achten Woche, aufgrund eines verstärkten Internodienwachstum, größer waren als der Wildtyp. Danach stagnierten die Transformanten im Wachstum, was sich zum Ende der Wachstumsphase nach ungefähr vierzehn Wochen in einer verminderten Größe von circa 80 cm, gegenüber dem Wildtyp mit einer Größe von circa 130 cm, zeigte. Die Blattanzahl war bei den Transformanten von 22-24 Blätter auf 12-14 Blätter reduziert und der Stängel erschien dünner und instabiler, so dass die Transformanten oftmals während der Blühphase gestützt werden mussten. Auch mit zunehmenden Alter verfestigten sich die Stängel der Transformanten nicht, während beim Wildtyp der Stängel an Umfang und Festigkeit deutlich zunahm.

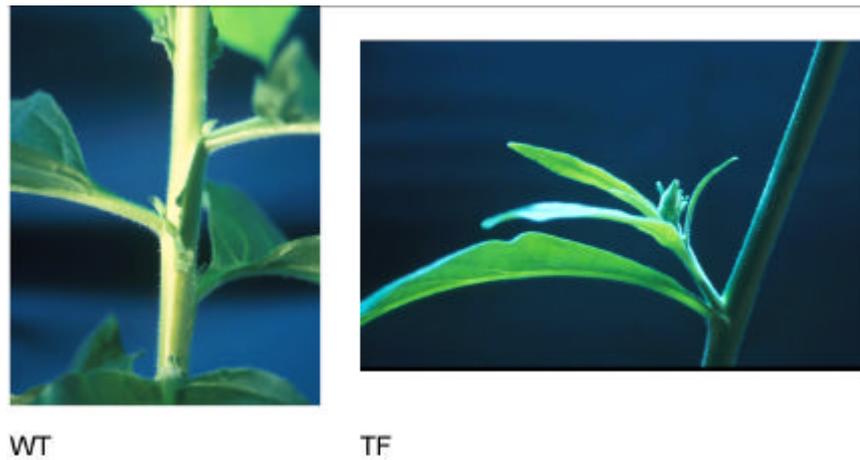


Abb. 14: Vergleich zwischen den Blattachsen von Wildtyp (rechts) und Transformante mit ausgetriebenen Seitenspross (links)

Ein weiterer Unterschied zwischen Wildtyp und Transformanten besteht bei den Axillärknospen. In Abbildung 14 erkennt man eine Axillärknospe, oder Achselknospe, beim Wildtyp. Im Gegensatz dazu entsteht bei den Transformanten aus dieser Axillärknospe ein Seitentrieb mit Blüte.

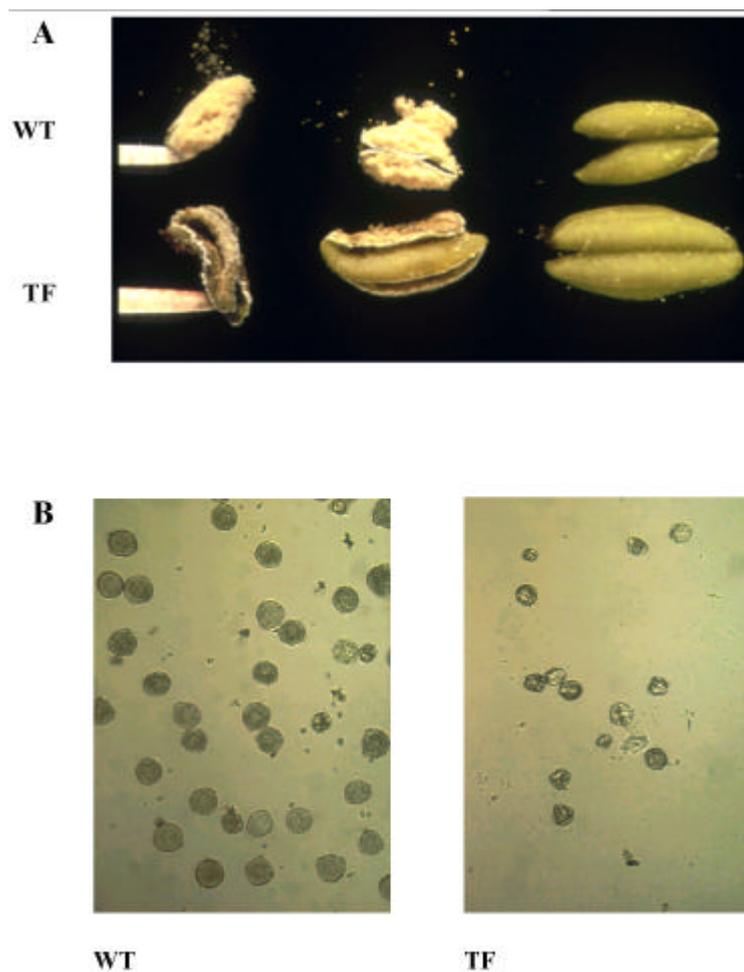


Abb. 15: Vergleich von Antheren (A) und Pollen (B) von Wildtyp und Transformanten. Die Antheren und Pollen wurden im Lichtmikroskop untersucht.

Bei der Blütenentwicklung zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformante. Die Blütenfärbung und die Form der Corolle unterschieden sich nicht, aber bei den Transformanten bildeten sich weniger Blüten pro Blütenstand als bei den Wildtyppflanzen. Bei den Transformanten zeigte sich zudem eine Vergrößerung der Antheren (Abb. 15 A). Die Reifung der Antheren war nicht koordiniert, d.h. sie öffneten sich nicht gleichzeitig. Die Pollen aus diesen vergrößerten Antheren waren missgebildet und die Pollenmenge war deutlich reduziert (Abb. 15 B).

Die Folgen der Missbildungen bei Antheren und Pollen zeigten sich in der Samenbildung. Die Samenmenge war, wie Tabelle 11 zeigt, bei den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp um bis zu 75 % reduziert. Lediglich die Kontrollpflanzen pF-aadI und -II bilden ähnlich viel Samen wie der Wildtyp. Daher mussten die Transformanten zur Saatgutgewinnung teilweise mit Wildtyppollen bestäubt werden. Dies hatte aber für die gesetzten Mutationen keine Folgen, da es sich um Plastidenmutanten handelte, deren Vererbung maternell erfolgt.

Tab. 11: Übersicht über die Reduktion der gebildeten Samenmenge. Zur Ermittlung der Samenmenge wurden 6 - 8 Pflanzen ausgewertet, von denen jeweils die Hauptblüte zur Samenbildung gebracht wurde. Die Samenmenge des Wildtyps wurde gleich 100% gesetzt.

Mutante	% Verlust im Vergleich zum WT	Mutante	% Verlust im Vergleich zum WT
pndhC-H-I	28	pndhE-BX-I	18
pndhC-H-II	21	pndhE-BX-II	54
pndhCKJ-HN-I	49	pndhI-XE-I	38
pndhCKJ-HN-II	13	pndhI-XE-II	25
pndhHAI-RV-I	50	pndhA-NA-I	55
pndhJ-N-I	75	pndhA-NA-II	26
pndhD-NN-I	34	pndhA-N-I	21
		pndhA-N-II	33
pIGE-aadI	24	pndhG-EM-I	28
pIGE-aadII	23	pndhG-EM-II	50
pF-aadI	6	pndhH-N-I	53
pF-aadII	9	pndhH-N-II	34
pUC19-rpoB	27	pndhH-SN-I	33

3. Stärkegehalt in Mutanten und Wildtyp

Um die Auswirkungen der Mutagenese des NDH-Komplexes auf den Stärkegehalt zu untersuchen, wurden Blattproben am Ende der Belichtungsphase (0 h) und nach einer Verdunklungsphase von 12, 24 und 48 Stunden entnommen. Aus diesen Blattproben wurde die Stärke isoliert und zu Glucose abgebaut. Der Glucosegehalt wurde durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen (II.2.5) und dient somit als indirekte Quantifizierung der Stärke.

Die Pflanzen der Serie A (III.1.1 Tab. 8 A.) wurden im Frühjahr und im Sommer im Gewächshaus angezogen, während die Pflanzen der Serie B (III.1.1 Tab. 8 B) nur im Frühjahr im Gewächshaus angezogen.

In Tabelle 12 erkennt man, dass die Transformanten bis auf pndhI-XE-I, pndhA-N-I und pndhCKJ-HN-II am Ende der Belichtungsphase weniger Stärke, pro entnommene Blattscheibe enthielten als der Wildtyp. Nur die Transformanten pndhI-XE-I, pndhA-N-I und pndhCKJ-HN-II enthielten mehr Stärke als der Wildtyp.

Tab. 12: Übersicht über die Stärkemenge am Ende der Belichtungsphase (0 h; µg Stärke / Blattscheibe). Die Proben wurden sofort in 80 %-igem Ethanol eingefroren, daher wird die Stärkemenge pro Blattscheibe (1 cm Durchmesser) angegeben.

Serie A	Frühjahr µg Stärke/ Blattscheibe	Sommer µg Stärke/ Blattscheibe		Serie B	Frühjahr µg Stärke/ Blattscheibe
Wildtyp	82	84		Wildtyp	165
pndhC-H-I	70	70		pndhE-BX-I	20
pndhCKJ-HN-I	54	60		pndhE-BX-II	28
pndhHAI-RV-I	69	72		pndhI-XE-I	187
pndhJ-N-I	47	35		pndhI-XE-II	57
pndhD-NN-I	61	46		pndhG-EM-I	101
pIGE-aadI	57	62		pndhG-EM-II	153
pIGE-aadII	25	-		pndhA-NA-I	22
pFaadI	42	76		pndhA-NA-II	123
pFaadII	46	66		pndhA-N-I	226
				pndhA-N-II	160
				pndhH-N-I	32
				pndhH-N-II	23
				pndhH-SN-I	34
				pndhCKJ-HN-II	259
				pndhC-H-II	51
				pUC19rpoB	36

Bei den Anzuchten der Serie A im Frühjahr und im Sommer bildete der Wildtyp nur ungefähr 50 % der Stärke, die er in der Frühjahrsanzucht der Serie B bildete. Die Transformanten der Serie A bildeten bis zu 57% weniger Stärke als der Wildtyp, während die Transformanten der Serie B bis zu 88% weniger Stärke bildeten. Auch die Kontrollkonstrukte bildeten deutlich weniger Stärke als der Wildtyp, wobei besonders die Mutante pIGE-aadII mit einer Reduktion um 70% auffiel.

Da die Transformanten und der Wildtyp am Ende der Belichtungszeit verschiedene Stärkemengen beinhalteten, wurde die Stärkemenge nach 48 h Verdunkelung bestimmt und das Verhältnis zur Ausgangsmenge berechnet (Tab. 13).

Tab. 13: Übersicht über die prozentuale Menge Reststärke nach 48 h Verdunkelung. Die Stärkemenge am Ende der Belichtungsphase (0 h) wurde gleich 100 % gesetzt.

Serie A	Frühjahr % Reststärke/ Blattscheibe	Sommer % Reststärke/ Blattscheibe		Serie B	Frühjahr % Reststärke/ Blattscheibe
Wildtyp	6	7		WT	17
pndhC-H-I	4	37		pndhE-BX-I	10
pndhCKJ-HN-I	6	17		pndhE-BX-II	11
pndhHAI-RV-I	6	11		pndhI-XE-I	2
pndhJ-N-I	6	6		pndhI-XE-II	4
pndhD-NN-I	5	73		pndhG-EM-I	2
pIGE-aadI	4	7		pndhG-EM-II	2
pIGE-aadII	8	13		pndhA-NA-I	11
pFaadI	7	45		pndhA-NA-II	2
pFaadII	7	47		pndhA-N-I	21
				pndhA-N-II	2
				pndhH-N-I	6
				pndhH-N-II	2
				pndhH-SN-I	6
				pndhCKJ-HN-II	16
				pndhC-H-II	4
				pUC19-rpoB	6

In Tabelle 13 erkennt man, dass die Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht die Stärke genauso weit abbauten wie der Wildtyp. In der Sommeranzucht bauen nur die Transformanten pndhJ-N-I und pIGE-aadI die Stärke im gleichen Maße ab wie der Wildtyp. Die übrigen Transformanten beinhalten nach 48 h Dunkelheit im Vergleich zur Ausgangsmenge deutlich mehr Stärke als der Wildtyp. Besonders fällt die Transformante pndhD-NN-I auf, die nur ungefähr ein Viertel ihrer Stärke abgebaut hat.

Von den Kontrollpflanzen baut, wie oben beschrieben, nur pIGE-aadI die Stärke soweit ab wie der Wildtyp. Alle anderen Kontrollpflanzen haben nach 48 h deutlich mehr Stärke als der Wildtyp.

Die Pflanzen der Serie B zeigten in der Frühjahrsanzucht ein anderes Bild als die Pflanzen der Serie A. Der Wildtyp baute die Stärke nicht soweit ab wie in der Anzucht mit der Serie A. Die Transformanten hatten, mit Ausnahme der Transformante pndhA-N-I, nach 48 h deutlich weniger Stärke als der Wildtyp.

Im Folgenden werden die Kinetiken des Stärkeabbaus untersucht. Dazu wurde der Stärkegehalt der Pflanzen nach 12, 24 und 48 h Verdunkelung über die Glucosemenge bestimmt.

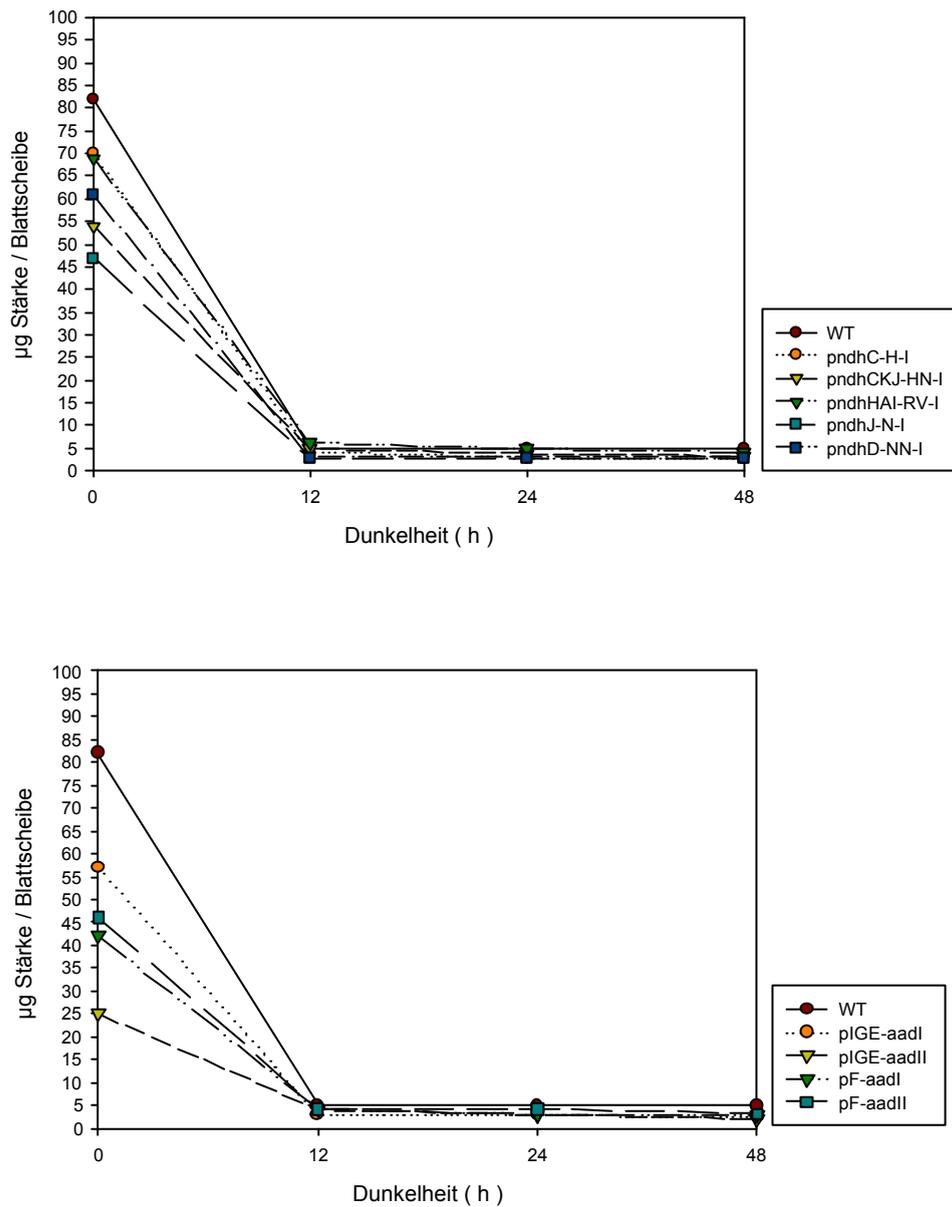


Abb. 16: Abnahme des Stärkegehalts in der Dunkelphase bei Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht. Das obere Diagramm zeigt die Stärkeabnahme bei NDH-Mutanten, das untere Diagramm die Kontrollkonstrukte. Die Stärkemenge wird pro Blattscheibe angegeben.

In der Abbildung 16 erkennt man, dass der Wildtyp und die Mutanten aus der Frühjahrsanzucht bereits nach 12 Stunden fast stärkefrei waren. Der einzige Unterschied zwischen Mutanten und Wildtyp bestand, wie bereits oben beschrieben, in der akkumulierten Stärkemenge nach der Belichtungsphase.

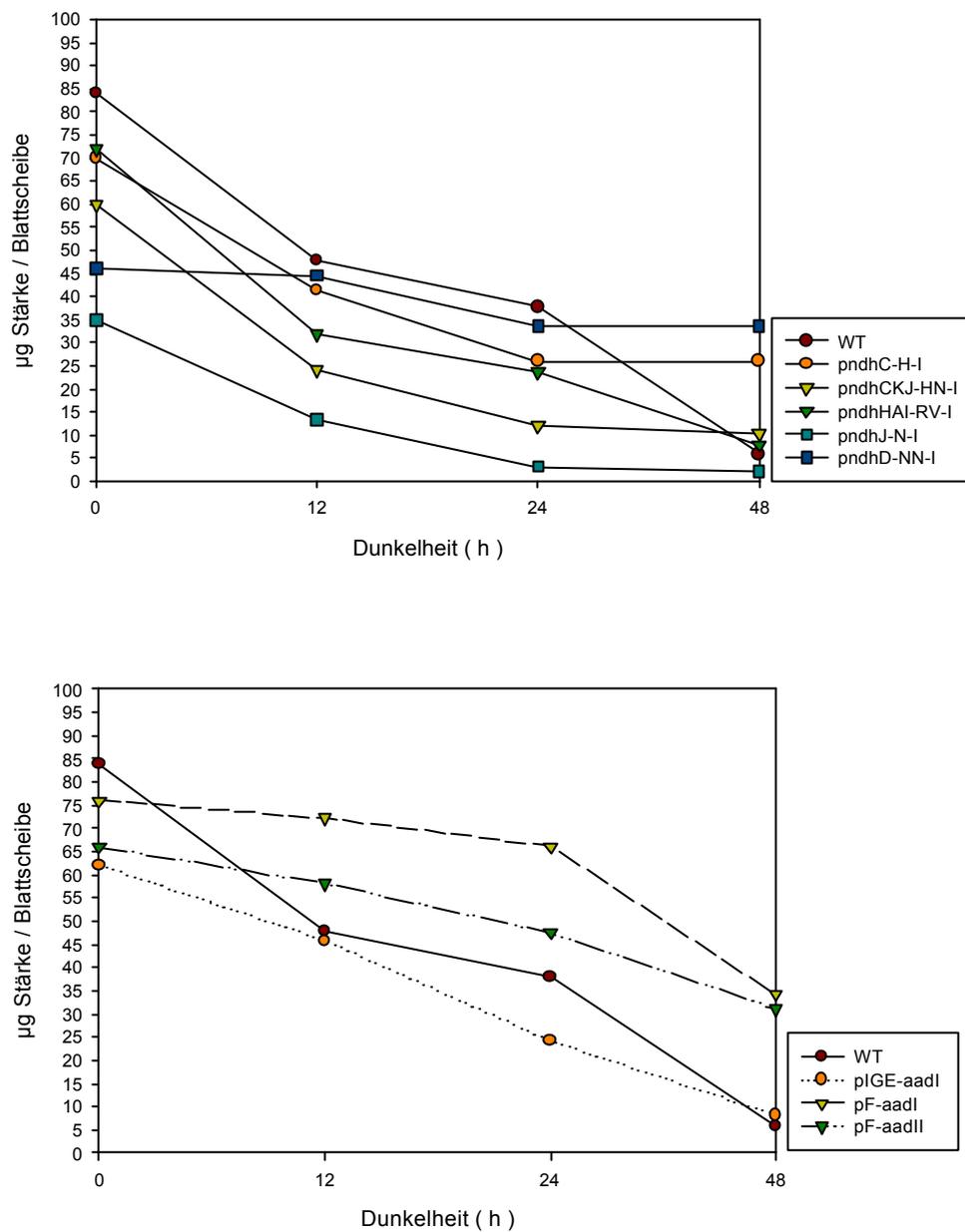


Abb. 17: Abnahme des Stärkegehalts in der Dunkelphase bei Pflanzen der Serie A aus der Sommeranzucht. Das obere Diagramm zeigt die Stärkeabnahme bei NDH-Mutanten, das untere Diagramm die Kontrollkonstrukte. Die Stärkeemenge wird auf die Blattscheibe bezogen.

In der Sommeranzucht der Serie A zeigte sich ein völlig anderes Bild als in der Frühjahrsanzucht (Abb. 17). Obwohl der Wildtyp ähnliche Mengen an Stärke bildete, verlief der Abbau sehr viel langsamer. Die Transformante pndhD-NN-I zeigte den langsamsten Stärkeabbau.

Vergleicht man den Stärkeabbau bei Wildtyp und Kontrolllinien, so erkennt man das nur die Mutante pIGE-aadI einen ähnlichen Verlauf zeigte wie der Wildtyp. Für die Mutante pIGE-aadII liegen keine Werte für die Sommeranzucht vor. Die Transformanten pFaadI und -aadII zeigte einen deutlich langsameren Stärkeabbau.

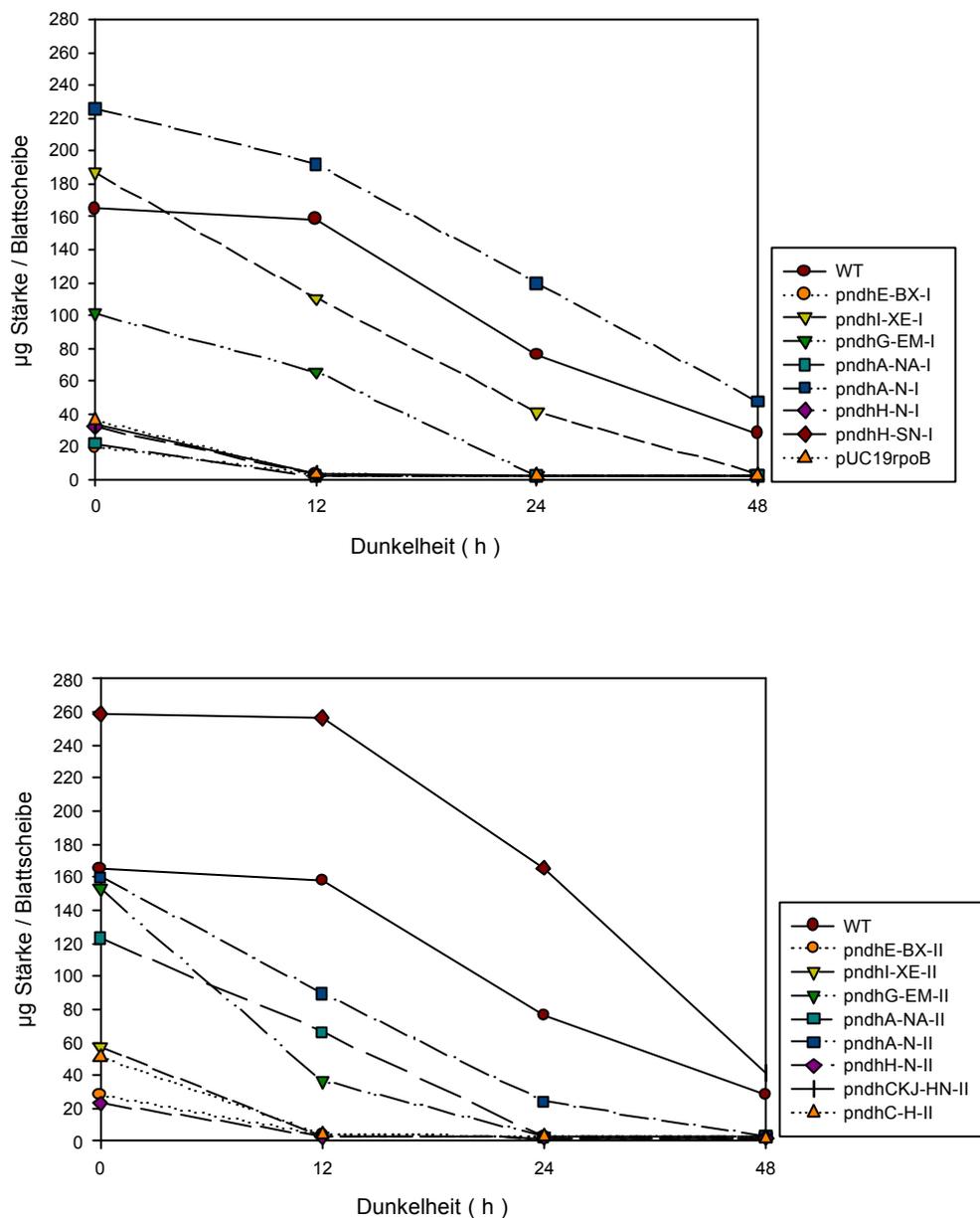


Abb. 18: Abnahme des Stärkegehalts in der Dunkelphase bei Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht. Das obere Diagramm zeigt die Stärkeabnahme bei NDH-Mutanten bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Die Stärkemenge wird pro Blattscheibe angegeben.

Bei einem Vergleich der Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht erkennt man, dass die Transformanten pndhI-XE-I und pndhA-N-I mehr Stärke akkumuliert haben als der Wildtyp (Abb. 18). Doch nur pndhI-XE-I hat nach 48 Stunden die Stärke weitestgehend abgebaut, während im Wildtyp und in der Mutante pndhA-N-I nach der gleichen Zeitdauer noch deutlich Stärke nachweisbar war. Deutlich weniger Stärke bildete die Transformanten pndhA-NA-I, pndhH-N-I, pndhH-SN-I und die Kontrolltransformante pUC19rpoB. Diese Mutante haben bereits nach 12 Stunden die Stärke abgebaut.

Auch nach 48 Stunden ist in der Transformante pndhCKJ-HN-II und im Wildtyp noch Stärke nachweisbar. Die anderen Mutanten sind, bis auf die Transformante pndhA-N-II, nach 24 Stunden annähernd stärkefrei.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich für die Mutanten hinsichtlich des Stärkeabbaus kein einheitliches Bild abzeichnet. Die Vermutung, dass in den Mutanten der Stärkeabbau generell gehemmt ist, konnte nicht bestätigt werden. Bis auf die Transformanten pndhD-NN-I, pndhA-N-I und pndhCKJ-HN-II bauen die Mutanten die Stärke mindestens so effektiv ab wie der Wildtyp.

4. Aktivität der Photosysteme I und II und der physiologische Zustand der Elektronentransportkette

Als mögliche Funktion des NDH-Komplexes wird die Beteiligung am photosynthetischen Elektronentransport diskutiert. Bei der Mutagenese des NDH-Komplexes sind Auswirkungen auf den Elektronentransport zu erwarten. Daher wurde die Funktionsfähigkeit der Photosysteme und der physiologische Zustand der Elektronentransportkette näher untersucht. Da es einen direkten Zusammenhang zwischen der Chlorophyllfluoreszenzänderung und der photosynthetischen Aktivität gibt (Kautsky *et al.*, 1931; Krause & Weis, 1991), eignet sich die Analyse der Chlorophyllfluoreszenz als eine nichtinvasive Methode, um die Vorgänge im photosynthetischen Elektronentransport zu verfolgen.

Dazu wurden Wildtyppflanzen und Transformanten der Serie A vergleichsweise im Frühjahr und Sommer unter Gewächshausbedingungen angezogen (II.2.1.1). Die Mutanten pndhC-H-I, pndhCKJ-HN-I und pndhHAI-RV-I wurden, zusammen mit dem Wildtyp, zum Vergleich unter optimalen konstanten Bedingungen in der Klimakammer angezogen (II.2.1.2).

Die Pflanzen der Serie B wurden nur im Frühjahr im Gewächshaus angezogen und untersucht. Zur Untersuchung wurden vier verschiedene Lichtintensitäten (20, 130, 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) verwendet.

4.1 Funktionsfähigkeit des Photosystems II

Das Photosystem II ist der erste Komplex der photosynthetischen Elektronentransportkette. Um die Funktionsfähigkeit des Photosystems II zu untersuchen, wurden die Anregungseffizienz F_{exc} und die photochemische Effizienz F_{II} bestimmt.

4.1.1 Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II

Die Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II beschreibt die Effizienz, mit der die Energie zu den Reaktionszentren des Photosystems II weitergeleitet wird und somit die Effizienz der Q_A -Reduktion im Photosystem II. Sie drückt sich im Verhältnis der variablen Fluoreszenz F_v zur maximalen Fluoreszenz F_m aus ($= F_v/F_m$). Björkmann & Demmings (1987) fanden für dunkeladaptierte Blätter verschiedener Spezies ein konstantes F_v/F_m -Verhältnis von $0,832 \pm 0,004$, d.h. es werden 0.84 Elektronen pro absorbiertem Quantum angeregt. Ein deutlich niedrigerer Wert als 0,832 wird als Inhibition des Photosystems II gewertet. Die Anregungseffizienz wurde für Wildtyp und Transformanten ermittelt und verglichen.

A.

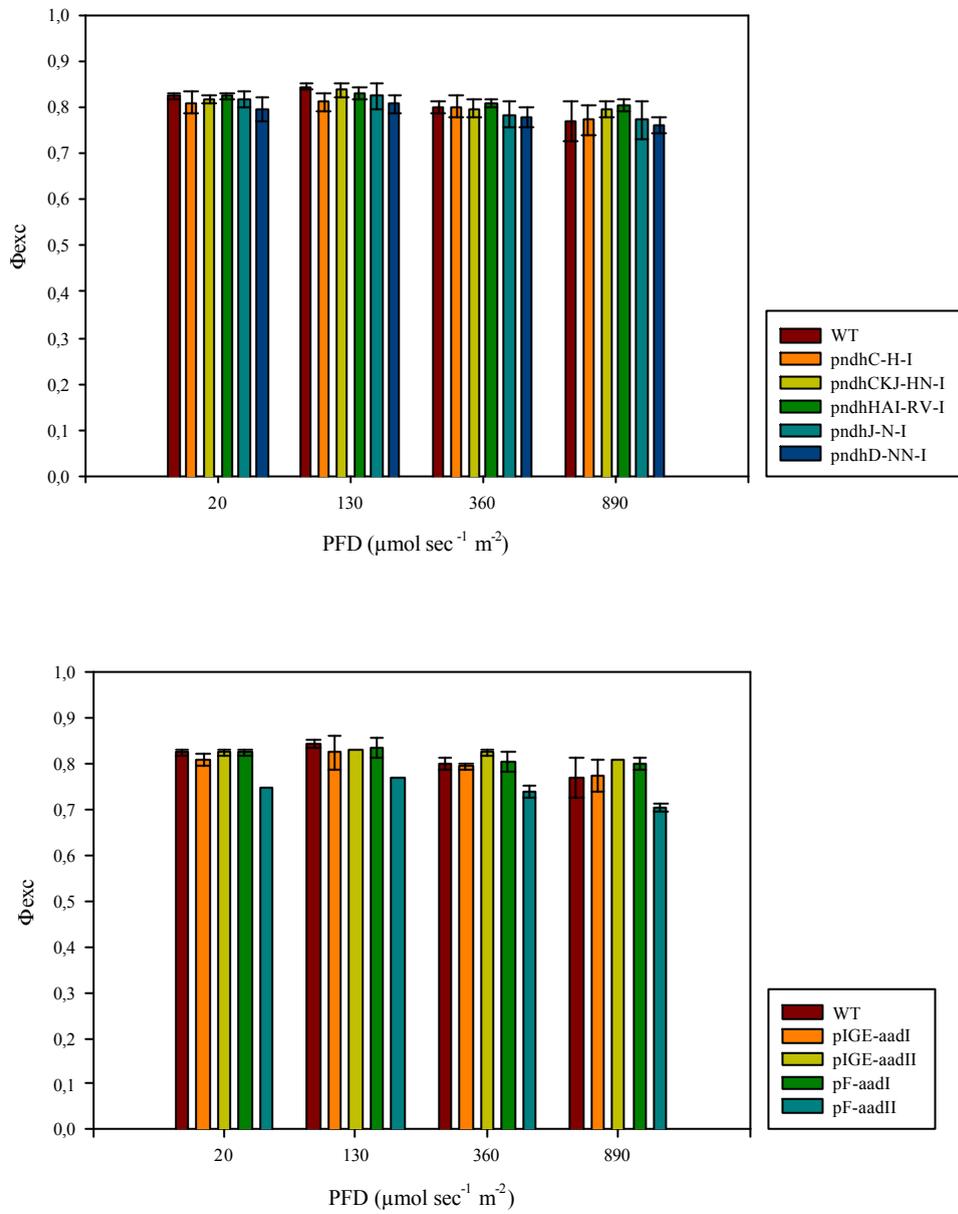


Abb. 19 A

B.

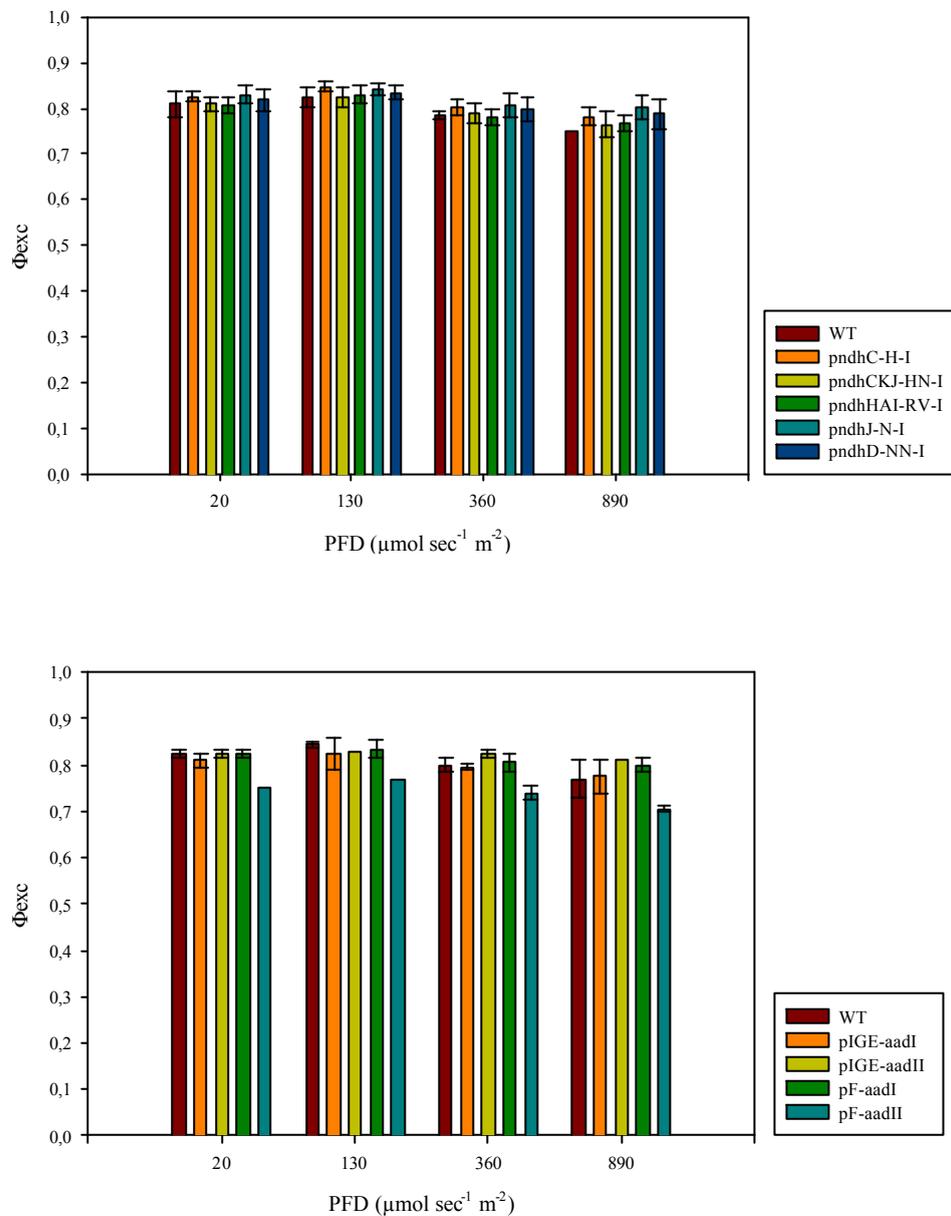


Abb. 19: Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II für Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht (A) und aus der Sommeranzucht (B) im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt das F_v/F_m -Verhältnis für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 19 A zeigten sowohl die NDH-Mutanten als auch die meisten Kontrollkonstrukte der Serie A in der Frühjahrsanzucht die gleiche Anregungseffizienz für das Photosystem II wie der Wildtyp. Dies gilt sowohl für die Messungen bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, als auch für die Messungen bei der höchsten verwendeten Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$. Einzig die Kontrollpflanze pF-aadII zeigte eine leichte Abnahme im F_v/F_m -Verhältnis gegenüber dem Wildtyp.

Für die Messungen der Anregungseffizienz der Sommeranzucht (Abb. 19 B) gelten die gleichen Beobachtungen wie für die Frühjahrsanzucht (Abb. 19 A). Die Mutante pF-aadII zeigte bei dieser Anzucht keinen deutlichen Unterschied im F_v/F_m -Verhältnis zu den anderen Kontrollen.

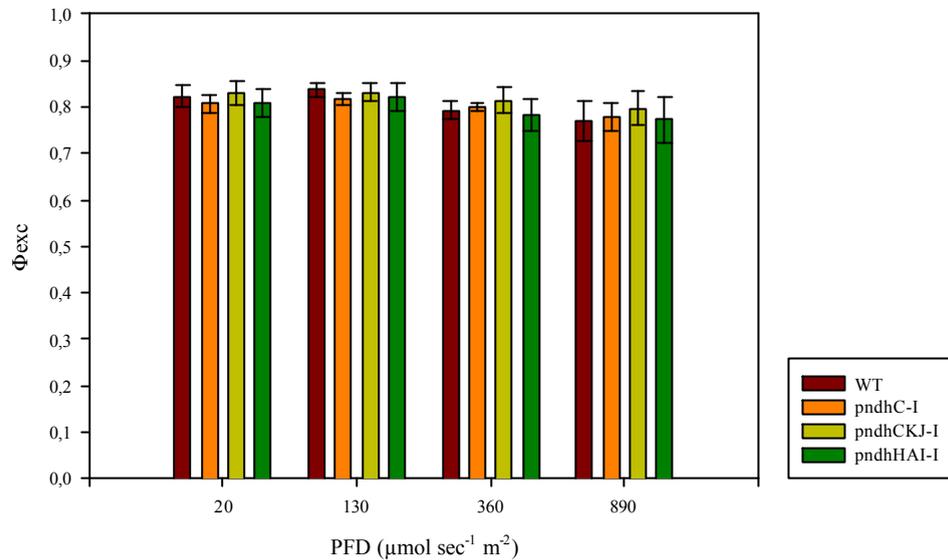


Abb. 20: Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II für Pflanzen der Serie A aus der Anzucht in der Klimakammer. Das Diagramm zeigt das F_v/F_m -Verhältnis für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Bei den Mutanten pndhC-H-I, pndhCKJ-HN-I und pndhHAI-RV-I, die unter optimalen konstanten Bedingungen in der Klimakammer angezogen wurden, waren für das F_v/F_m -Verhältnis ebenfalls keine Unterschiede zum Wildtyp erkennbar (Abb. 20).

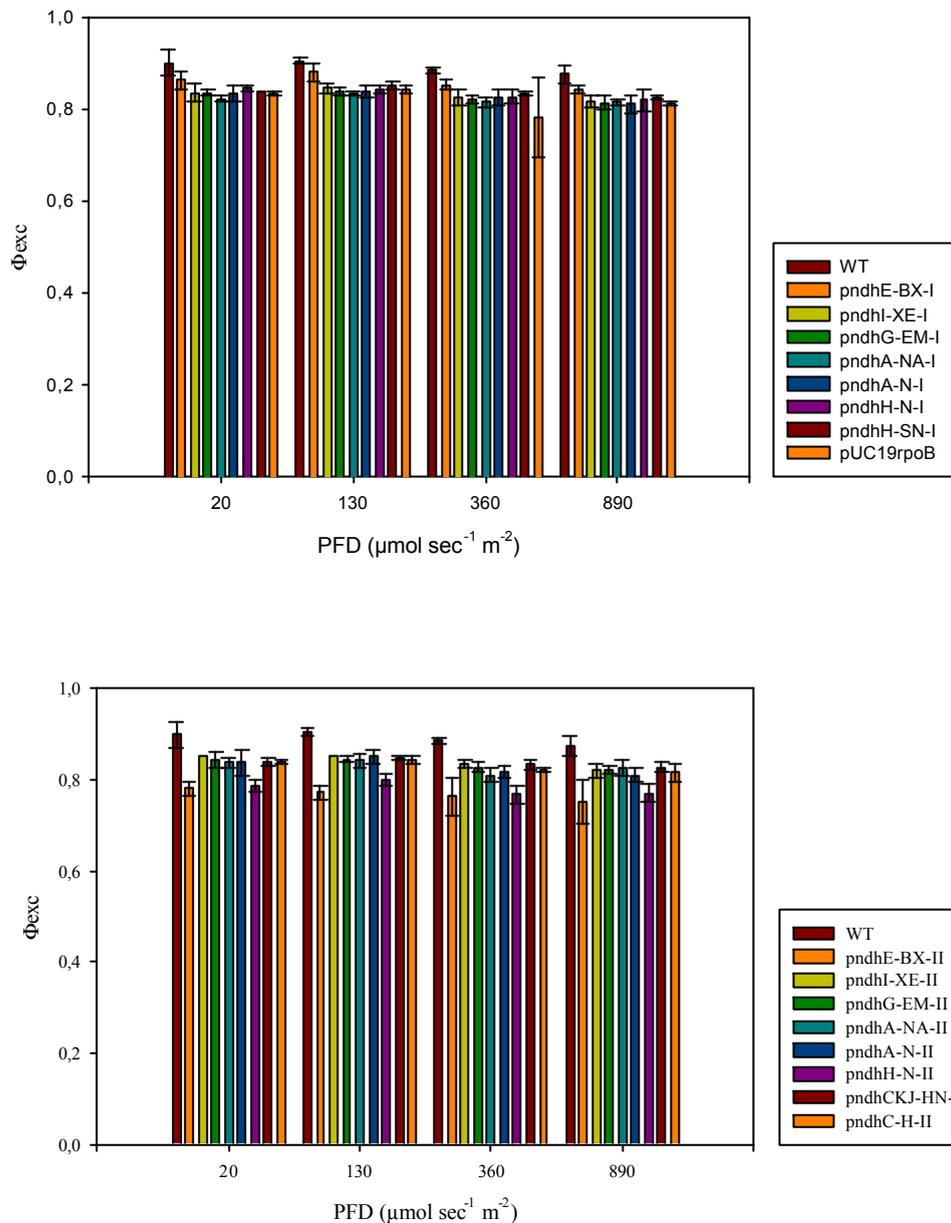


Abb. 21: Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II für Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt das F_v/F_m -Verhältnis für die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp.

Bei der Frühjahrsanzucht von Pflanzen der Serie B zeigte sich im Vergleich zur Frühjahrsanzucht der Serie A je nach Lichtintensität beim Wildtyp eine leichte Erhöhung des F_v/F_m -Verhältnisses von 0,77 bis 0,82 auf Werte zwischen 0,87 bis 0,90 (Abb. 21).

Die Mutanten mit der Resistenzkassette in Leserichtung der *ndh*-Gene zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Abnahme des F_v/F_m -Verhältnisses. Dabei war die geringste Abnahme bei der Mutante pndhE-BX-I zu erkennen. Die Kontrollpflanze pUC19rpoB verhielt sich genauso wie die NDH-Mutanten.

Auch bei den Mutanten mit der gegen die Leserichtung inserierten Resistenzkassette lagen die F_v/F_m -Werte niedriger als beim Wildtyp. Besonders fielen die Konstrukte pndhE-BX-II und

pndhH-N-II auf, die noch niedriger lagen als die anderen Mutanten. Diese Mutanten zeigten eine hellere Pigmentierung

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II der Mutanten in der Regel etwas niedriger war als beim Wildtyp. Aufgrund der nur geringfügigen Unterschiede kann man aber davon ausgehen, dass das Photosystem II weiterhin funktionsfähig ist und die photosynthetische Elektronentransportkette nicht inhibiert ist.

4.1.2 Photochemische Effizienz F_{II} von Photosystem II

Die photochemische Effizienz oder effektive Quantenausbeute F_{II} beschreibt die tatsächliche Effizienz des Photosystems II, mit der Elektronen pro absorbiertem Lichtquant in die Elektronentransportkette eingespeist werden. Neben der Anregungseffizienz F_{exc} gehen in diesen Wert diejenigen Photosystem II-Reaktionszentren ein, die an der photochemischen Reaktion beteiligt sind (Genty *et al.*, 1989). Während die Anregungseffizienz F_{exc} die Vorgänge von der Lichtabsorption bis zur Reduktion des Primärakzeptors Q_A beschreibt, werden durch die photochemische Effizienz F_{II} die Vorgänge der Energieweiterleitung in die Elektronentransportkette, d.h. die Reoxidation von Photosystem II, beschrieben.

A.

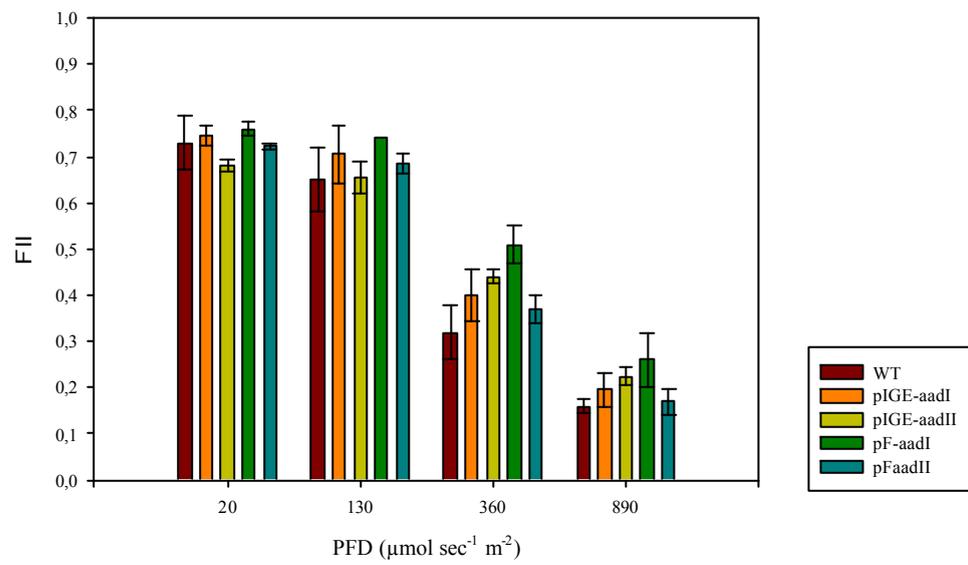
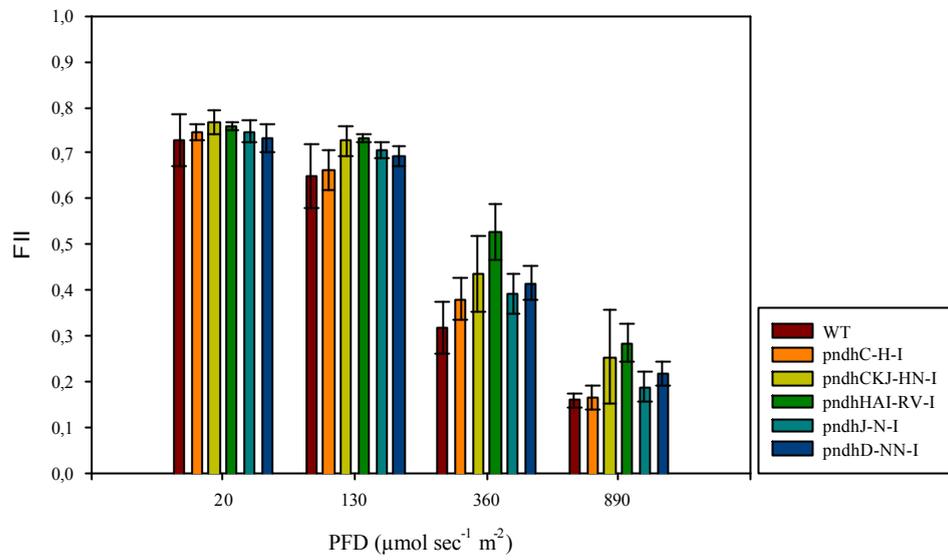


Abb. 22 A

B.

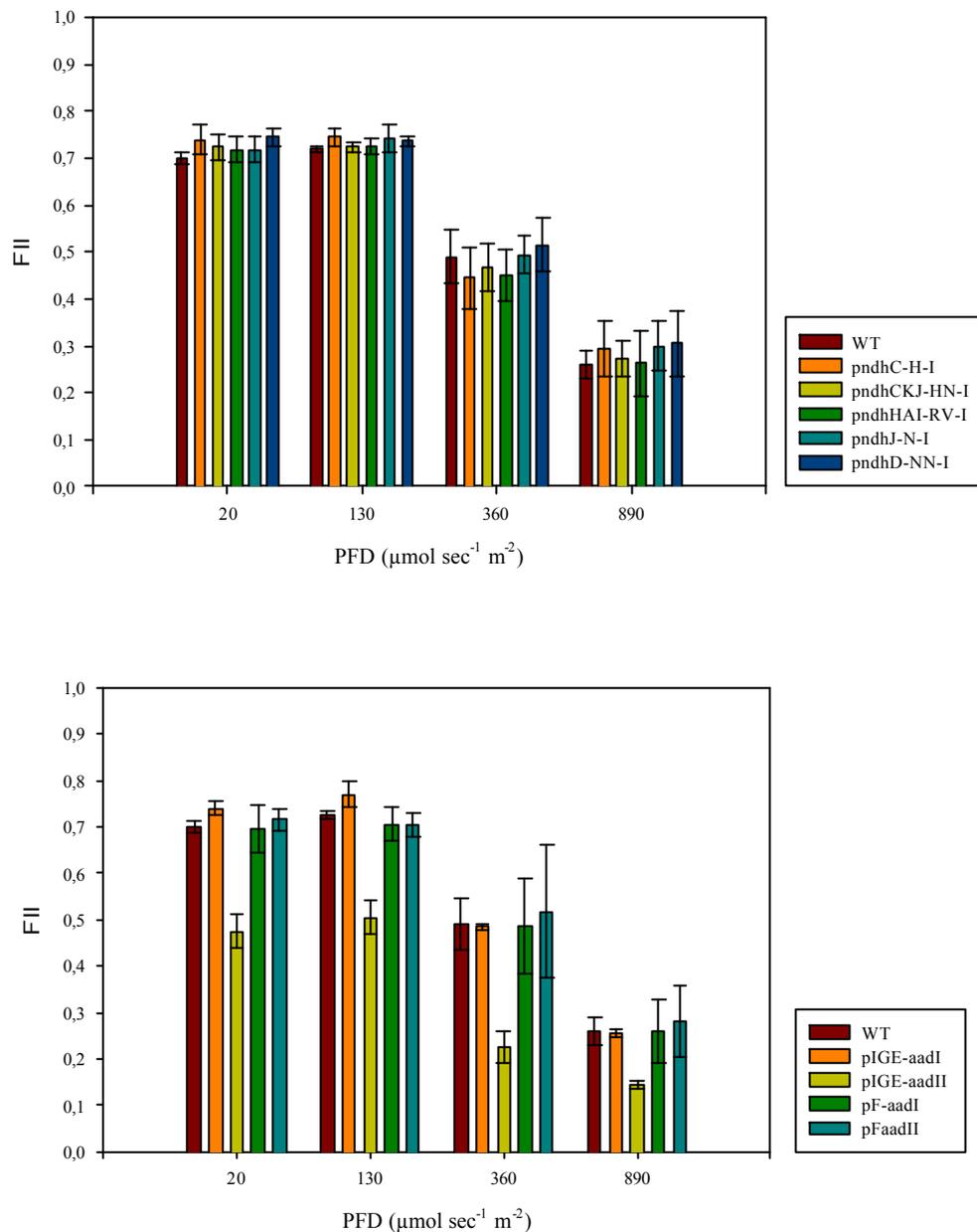


Abb. 22: Photochemische Effizienz F_{II} des Photosystems II von Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht (A) und aus der Sommeranzucht (B) im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt F_{II} für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollkonstrukte im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 22 A kann man bei der Frühjahrsanzucht der Pflanzen der Serie A erkennen, dass im Mittel die photochemische Effizienz der Mutanten höher war als die des Wildtyps. Während bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ der Unterschied noch gering war, vergrößerte sich der Unterschied mit zunehmender Lichtintensität. D.h. unter den Anzuchtbedingungen im Frühjahr flossen in den Mutanten mehr Elektronen pro absorbiertem Quantum in die Elektronentransportkette als im Wildtyp.

Auch die Kontrollpflanzen zeigten in der Regel eine höhere photochemische Effizienz als der Wildtyp. Nur die heller pigmentierte Kontrollpflanze pIGE-aadII zeigte bei 20 und

$130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ eine geringere, bzw. gleich große, photochemische Effizienz wie der Wildtyp. Bei höheren Lichtintensitäten war die Effizienz dieser Mutante wieder vergleichbar zu der der anderen Mutanten.

Bei einem Vergleich der photochemischen Effizienz unter den Anzuchtbedingungen im Sommer (Abb. 22 B) wurden die Unterschiede zwischen den NDH-Mutanten und dem Wildtyp geringer im Vergleich zur Frühjahrsanzucht, bzw. liegen innerhalb der Standardabweichungen.

Beim Vergleich des Wildtyp mit den Kontrollen erkennt man, dass auch hier die Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten nicht mehr erkennbar waren. Eine Ausnahme bildete wiederum die hell pigmentierte Transformante pIGE-aadII, die im Gegensatz zur Frühjahrsanzucht bei allen gemessenen Lichtintensitäten eine deutliche Reduktion der photochemischen Effizienz des Photosystems II aufwies.

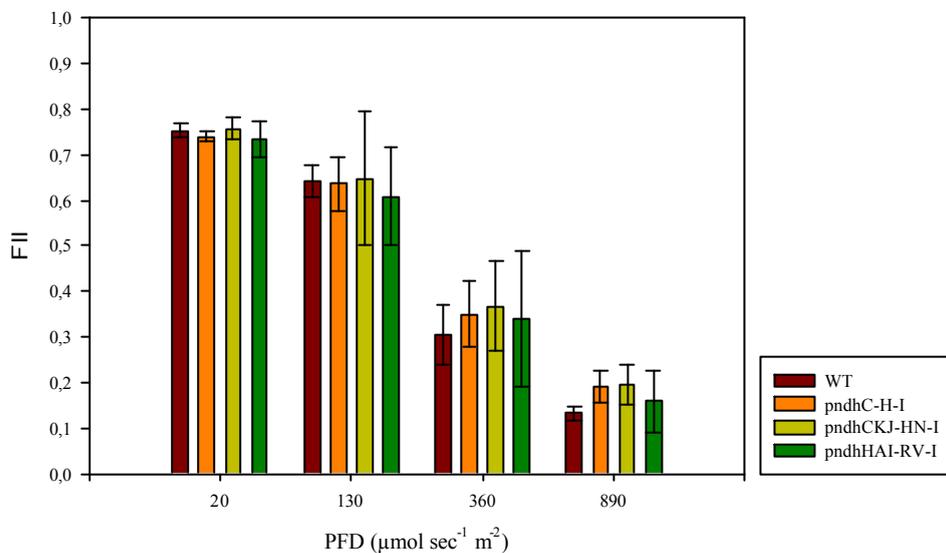


Abb. 23: Photochemische Effizienz F_{II} des Photosystems II von Pflanzen der Serie A aus der Anzucht in der Klimakammer. Das Diagramm zeigt F_{II} für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Anzucht unter optimalen Bedingungen in der Klimakammer zeigte, dass es bei Lichtintensitäten von 20 und $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten gab. Erst bei höheren Lichtintensitäten war die photochemische Effizienz der Mutanten gegenüber dem Wildtyp leicht erhöht (Abb. 23).

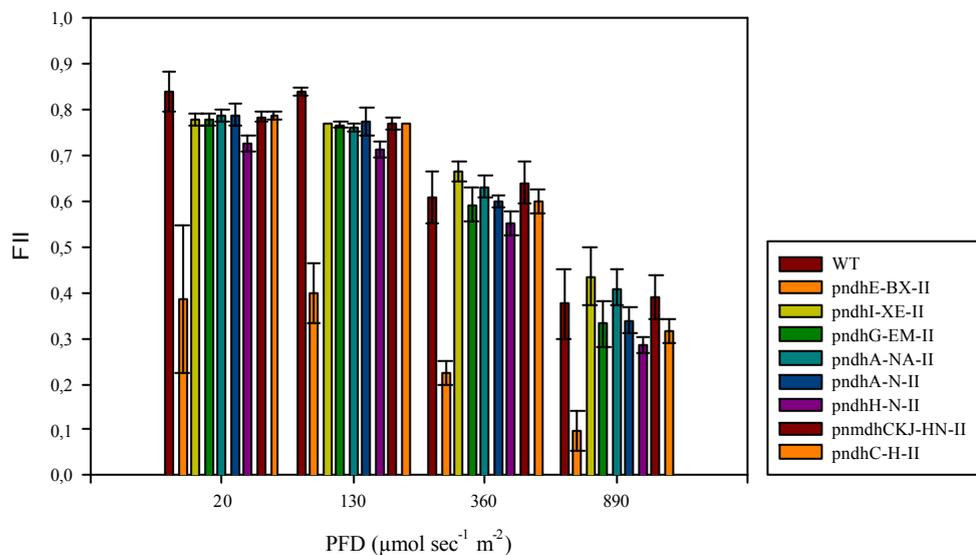
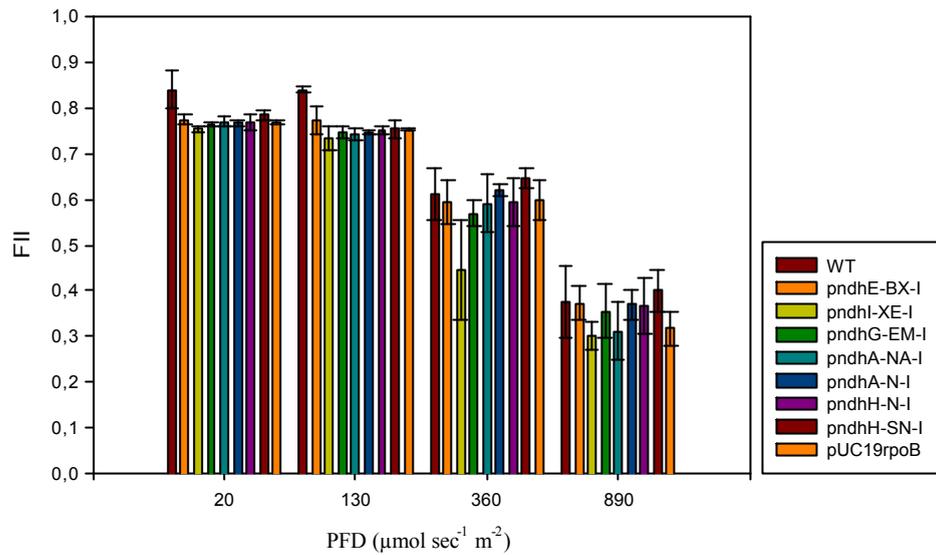


Abb. 24: Photochemische Effizienz F_{II} des Photosystems II von Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt F_{II} für die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 24 erkennt man für die Transformanten der Serie B bei beiden Orientierung der Resistenzkassetten in der Frühjahrsanzucht eine leichte Reduktion der photochemischen Effizienz gegenüber dem Wildtyp. Im Vergleich zur Frühjahrsanzucht der Pflanzen der Serie A erkennt man, dass es sich bei der Differenz zwischen Wildtyp und Transformanten nicht um eine Reduktion bei den Transformanten handelte, sondern vielmehr um einen Anstieg der photochemischen Effizienz beim Wildtyp von 0,73 in der Frühjahrsanzucht mit

der Serie A (Abb. 22 A) auf 0,84 in der Frühjahrsanzucht mit der Serie B (Abb. 24). Die Reduktion bei der Mutante pndhI-XE-I verstärkte sich mit zunehmender Lichtintensität mehr als bei den anderen Mutanten.

Bei den helleren Mutanten pndhE-BX-II und pndhH-N-II zeigte sich vor allem bei Ersterer eine deutliche Reduktion der photochemischen Effizienz.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei gemäßigten Bedingungen, wie sie bei der Frühjahrsanzucht und in der Klimakammer anzutreffen sind, die Mutanten der Serie A eine höhere photochemische Effizienz als der Wildtyp zeigten. D.h. es flossen mehr Elektronen pro absorbiertem Quant in die Elektronentransportkette. Diese Differenz war bei sommerlichen Bedingungen, mit höheren Temperaturen, längeren Lichtphasen und höheren Lichtintensitäten, und damit höherer Photosyntheserate, nicht mehr zu beobachten.

Die Pflanzen der Serie B lagen bei Betrachtung der Werte im gleichen Bereich wie die Pflanzen der Serie A. Im direkten Vergleich zum Wildtyp aus der gleichen Anzucht lag jedoch die photochemische Effizienz der Mutanten relativ gesehen niedriger.

4.1.3 Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A

Der Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A , auch als Elektronendruck im Photosystem II bezeichnet, zeigt das Gleichgewicht zwischen Energieangebot und Nutzung im Photosystem II an. Der Primärakzeptor Q_A wird über das Photosystem II reduziert, die Reoxidation erfolgt über die nachgeschaltete Elektronentransportkette. Steigt der Wert, so wird Q_A nicht in gleichem Maß reoxidiert, wie es reduziert wurde. Somit dient der Wert als Indikator für den Redoxzustand des Photosystems II und die Funktionsfähigkeit der Elektronentransportkette.

A.

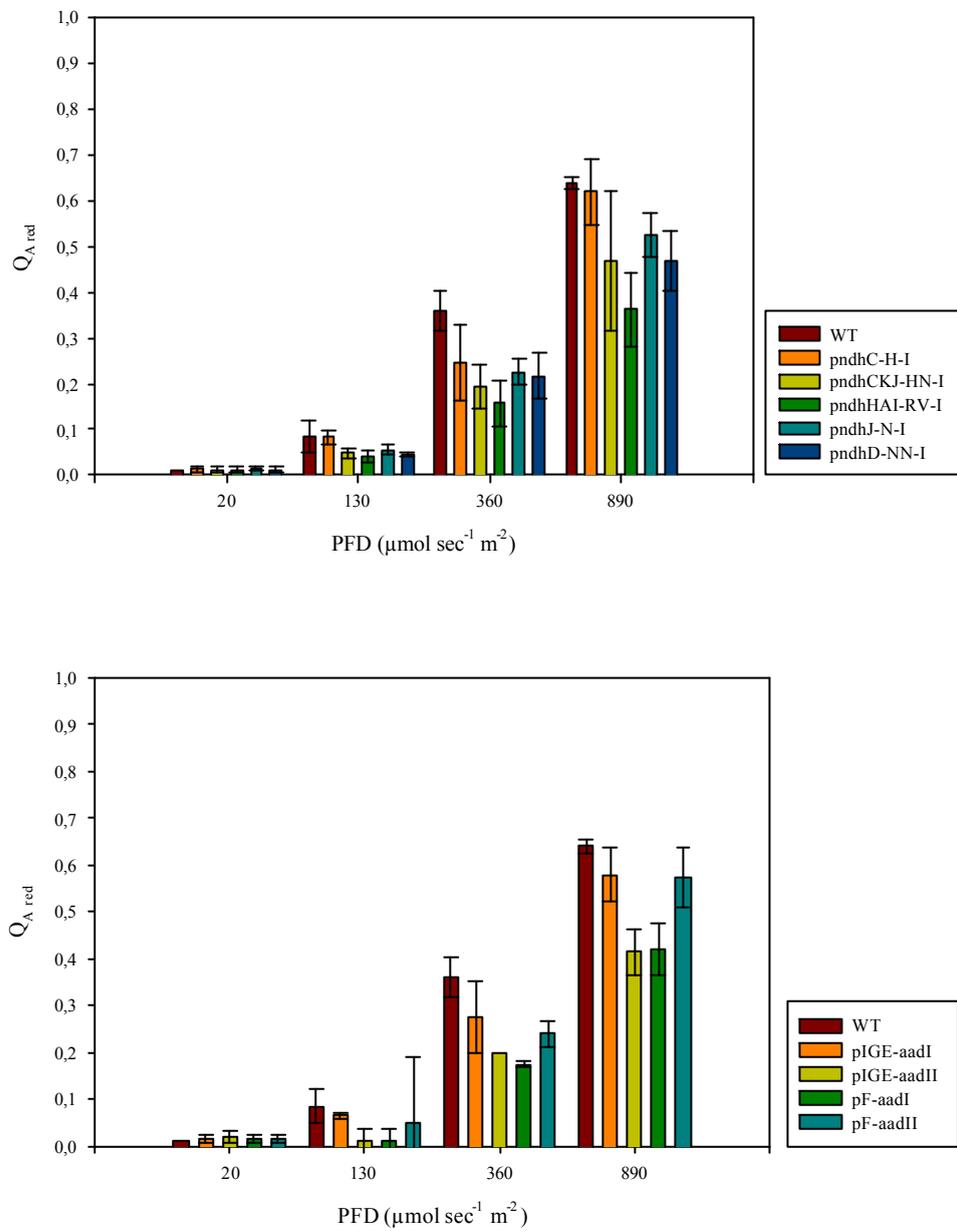


Abb. 25 A

B.

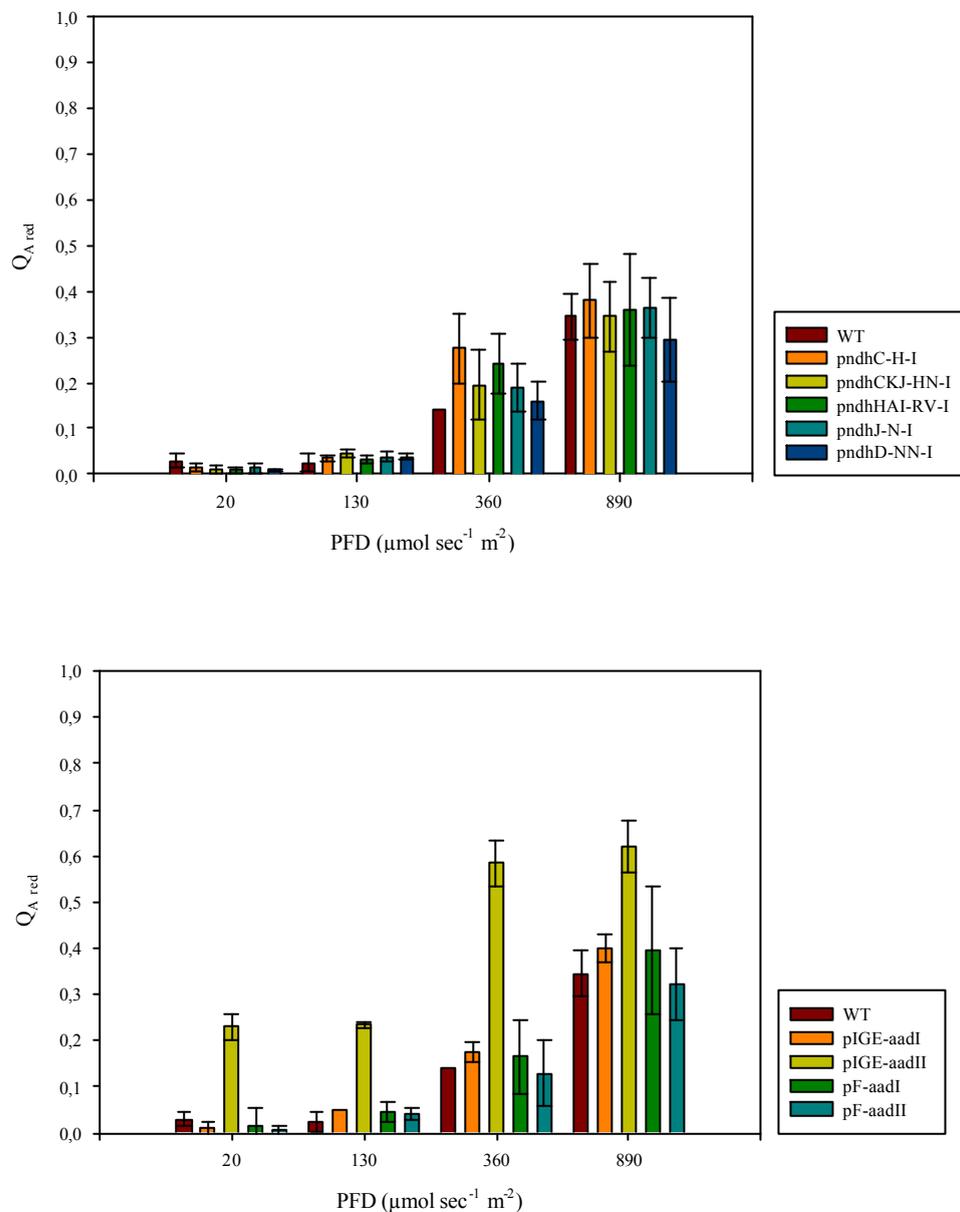


Abb. 25: Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A von Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht (A) und aus der Sommeranzucht (B) im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt $Q_{A,red}$ für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 25 A erkennt man, dass der Primärakzeptor Q_A der Transformanten aus der Serie A bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ im gleichen Maße reduziert vorlag wie im Wildtyp. Mit steigender Lichtintensität lag Q_A im Wildtyp stärker reduziert vor als in den Mutanten. Dasselbe Verhältnis zeigte sich beim Vergleich zwischen Wildtyp und Kontrollpflanzen.

Vergleicht man den Redoxzustand von Q_A der Mutanten untereinander, so erkennt man, dass die Mutante pndhCKJ-HN-I am stärksten oxidiert vorlag.

In den Pflanzen aus der Sommeranzucht (Abb. 25 B) lag im Wildtyp Q_A bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ stärker reduziert vor als in den Mutanten. Bei zunehmender Lichtintensität wurde Q_A in den Mutanten stärker reduziert als im Wildtyp. Dieser Unterschied war bei der höchsten gemessenen Lichtstärke nicht mehr so deutlich ausgeprägt. Vergleicht man zwischen Wildtyp und Kontrollen, so erkennt man, dass auch hier der Wildtyp bei Lichtintensitäten über $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ stärker oxidiert vorlag als die Kontrollpflanze, obwohl der Unterschied nicht so stark war, wie bei den NDH-Mutanten. Die hell gefärbte Transformante pIGE-aadII bildete eine Ausnahme, da bei ihr Q_A bei allen Lichtintensitäten deutlich stärker reduziert vorlag als bei den anderen Pflanzen.

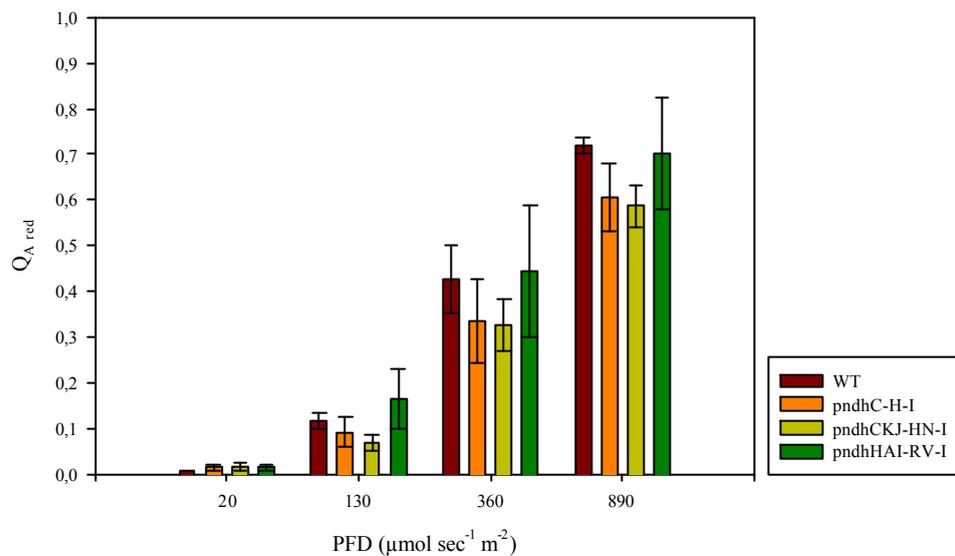


Abb. 26: Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A von Pflanzen der Serie A aus der Anzucht in der Klimakammer. Das Diagramm zeigt Q_{Ared} für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Pflanzen der Serie A, die unter optimalen Bedingungen in der Klimakammer angezogen wurden, zeigten in Abbildung 26, dass es im Schwachlicht bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ keine Unterschiede zum Wildtyp gab. Die Mutanten pndhC-H-I und pndhCKJ-HN-I zeigten bei ansteigenden Lichtintensitäten eine geringere Reduktion des Primärakzeptors Q_A , während die Mutante pndhHAI-RV-I genauso stark reduziert wurde wie der Wildtyp.

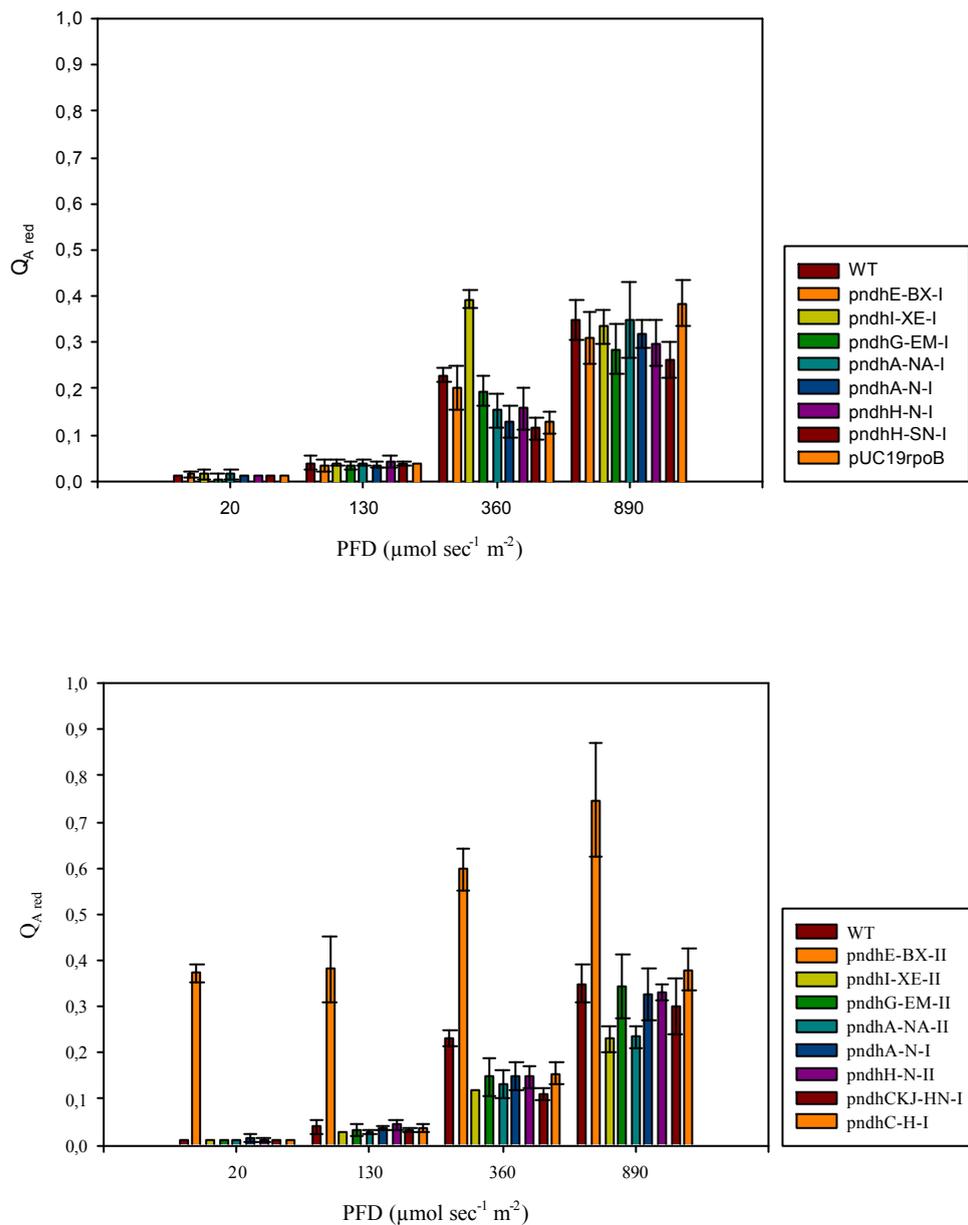


Abb. 27: Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A von Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt $Q_{A,red}$ für die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp.

Bei Lichtintensitäten von 20 und 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigen sich in Abbildung 27 keine deutlichen Unterschiede im Redoxzustand von Q_A von Wildtyp und NDH-Mutanten. Erst bei höheren Lichtintensitäten lag das Q_A des Wildtyps etwas stärker reduziert vor als in den Transformanten. Ausnahmen bildeten die Mutanten pndhI-XE-I bei der Lichtintensität von 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ und die heller gefärbte Mutante pndhE-BX-II bei allen Lichtintensitäten. In diesen Mutanten lag Q_A deutlich stärker reduziert vor. Die Kontrolllinie pUC19rpoB verhielt sich, außer bei der Lichtintensität von 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, wie der Wildtyp.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass bei mäßigen Temperaturen, wie bei den Frühjahrsanzuchten und in der Klimakammer, der Primärakzeptor Q_A im Wildtyp geringer reduziert vorlag als in den Mutanten. Bei höheren Temperaturen, wie in der Sommeranzucht, drehte sich das Verhältnis um, d.h. die NDH-Mutanten lagen stärker reduziert vor als der Wildtyp.

4.2 Transienter Dunkelanstieg der Chlorophyllfluoreszenz

Der transiente Dunkelanstieg der Chlorophyllfluoreszenz, der sich kurz nach Abschalten des aktinischen Lichtes bildet (II.2.7.1), wird als Einspeisung von Reduktionsäquivalenten aus der Lichtphase in den Plastochinonpool interpretiert, was zu einer kurzzeitigen Energetisierung der Elektronentransportkette führt. Diese kurzzeitige Energetisierung führt zu einem Wiederanstieg der Chlorophyllfluoreszenz, die aber innerhalb von 1 - 2 Minuten wieder abnimmt. Bei Belichtung mit Dunkelrotlicht (720 nm), das vor allem das Photosystem I anregt, wird der transiente Dunkelanstieg durch den sofortigen Abzug der Elektronen aus dem Plastochinonpool über das Photosystem I gelöscht.

Der transiente Dunkelanstieg der Chlorophyllfluoreszenz, der sich kurz nach Abschalten des aktinischen Lichtes bildet (II.2.7.1), wird als Einspeisung von Reduktionsäquivalenten aus der Lichtphase in den Plastochinonpool interpretiert, was zu einer kurzzeitigen Energetisierung der Elektronentransportkette führt. Diese kurzzeitige Energetisierung führt zu einem Wiederanstieg der Chlorophyllfluoreszenz, die aber innerhalb von 1 - 2 Minuten wieder abnimmt. Bei Belichtung mit Dunkelrotlicht (720 nm), das vor allem das Photosystem I anregt, wird der transiente Dunkelanstieg durch den sofortigen Abzug der Elektronen aus dem Plastochinonpool über das Photosystem I gelöscht.

A.

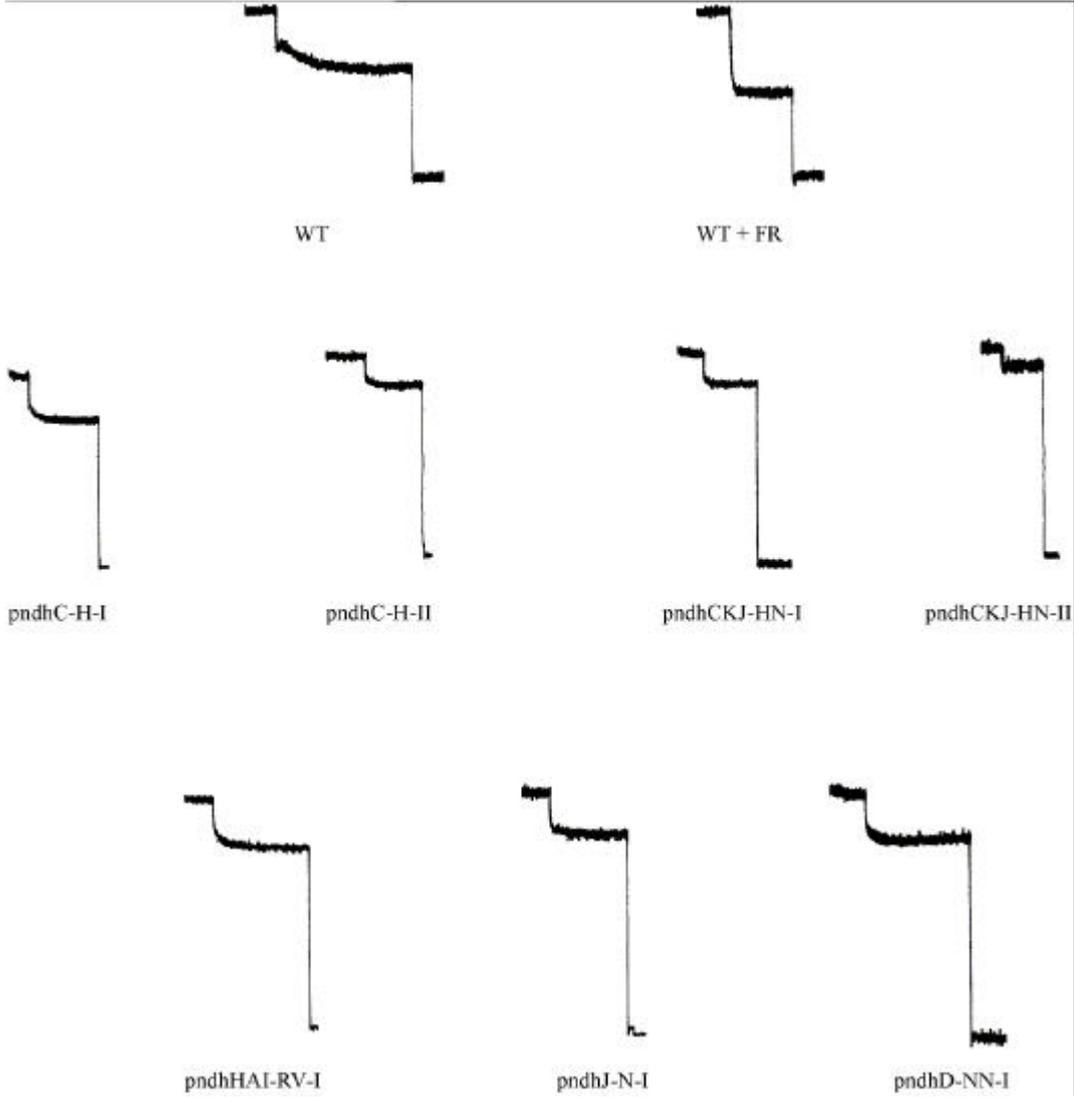
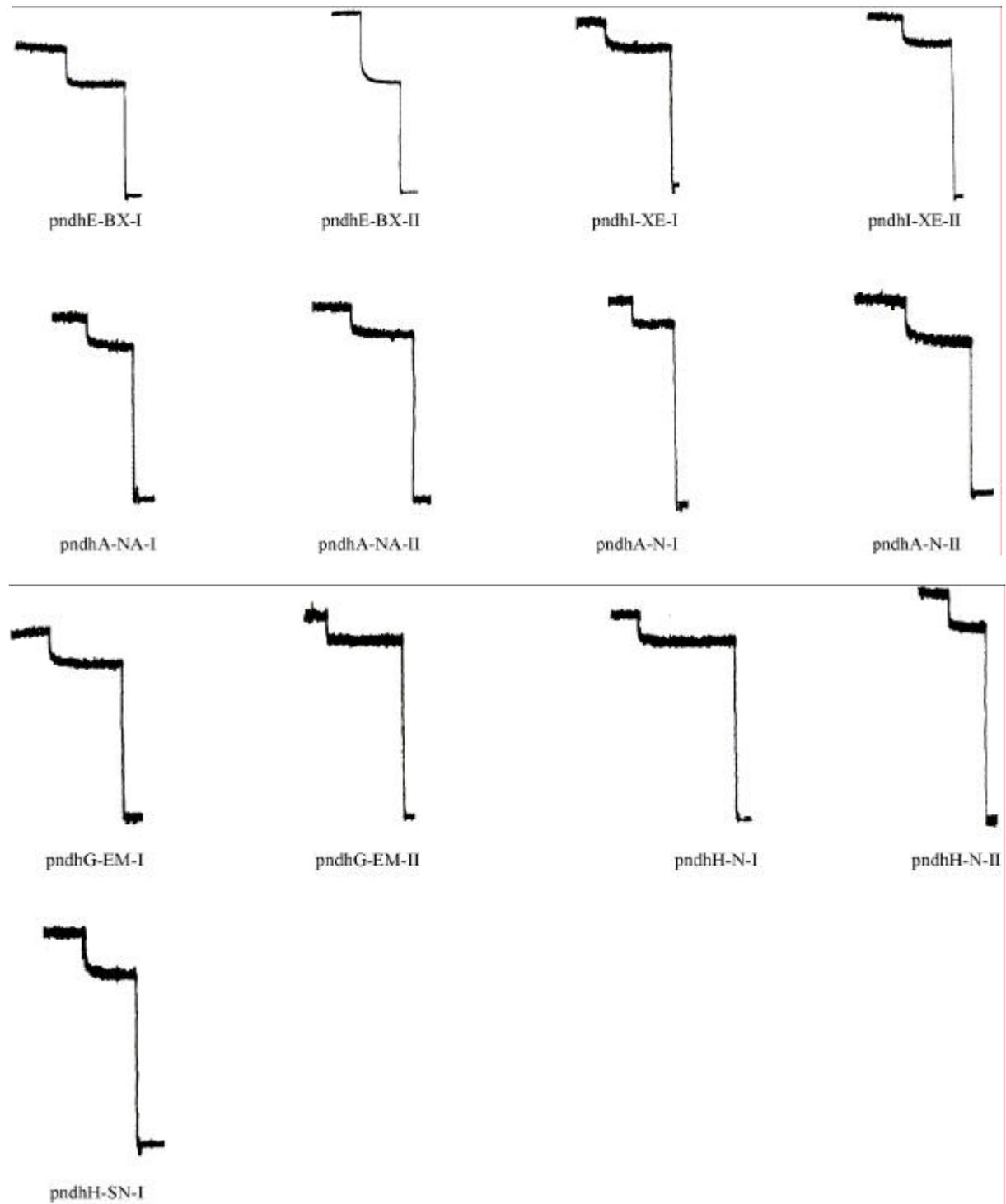


Abb. 28 A

B.**Abb. 28 B**

C.

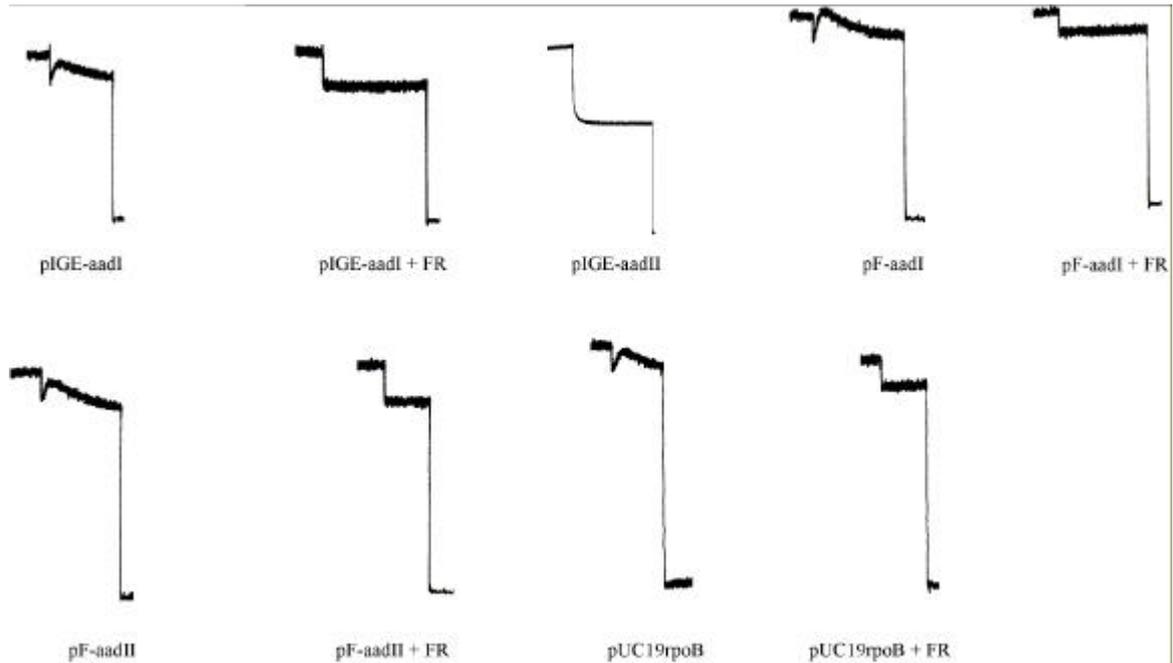


Abb. 28: Transienter Dunkelanstieg der Pflanzen der Serie A (A) und der Serie B (B), sowie der Kontrollpflanzen (C) aus der Gewächshausanzucht.

+FR: Belichtung mit Dunkelrotlicht („*far red*“)

In Abbildung 28 erkennt man beim Wildtyp deutlich den transienten Dunkelanstieg, der sich durch Belichtung mit Dunkelrotlicht löschen ließ. Bei den Wildtyppflanzen aus der Gewebekultur war der transiente Dunkelanstieg noch deutlicher zu erkennen (Kofer *et al.*, 1998). Bei allen Transformanten fehlte dieser transiente Dunkelanstieg vollständig. Auch durch Belichtung mit Dunkelrotlicht änderte sich der Kurvenverlauf bei den Transformanten nicht (ohne Abbildung).

Bei den Kontrollpflanzen konnte man einen transienten Dunkelanstieg beobachten, der sich durch Belichtung mit Dunkelrotlicht löschen ließ. Lediglich bei pIGE-aadII, das die Resistenzkassette gegen die Leserichtung der *ndh*-Gene inseriert hat, fehlte der transiente Dunkelanstieg.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass allen Transformanten, mit Ausnahme der Mutante pIGE-aadII, wie erwartet der transiente Dunkelanstieg der Chlorophyllfluoreszenz fehlte.

5. Untersuchungen zum photosynthetischen Elektronentransport

5.1 Relative Elektronentransportrate

Die relative Elektronentransportrate (rel. ETR) dient als Maß für die Ladungstrennung im Photosystem II (Schreiber *et al.*, 1994). Je höher die Lichtstärke ist, desto höher ist die potentielle Rate, mit der das Photosystem II Elektronen in die Elektronentransportkette leitet. Sehr hohe Lichtstärken wirken jedoch wieder limitierend auf die relative Elektronentransportrate.

A.

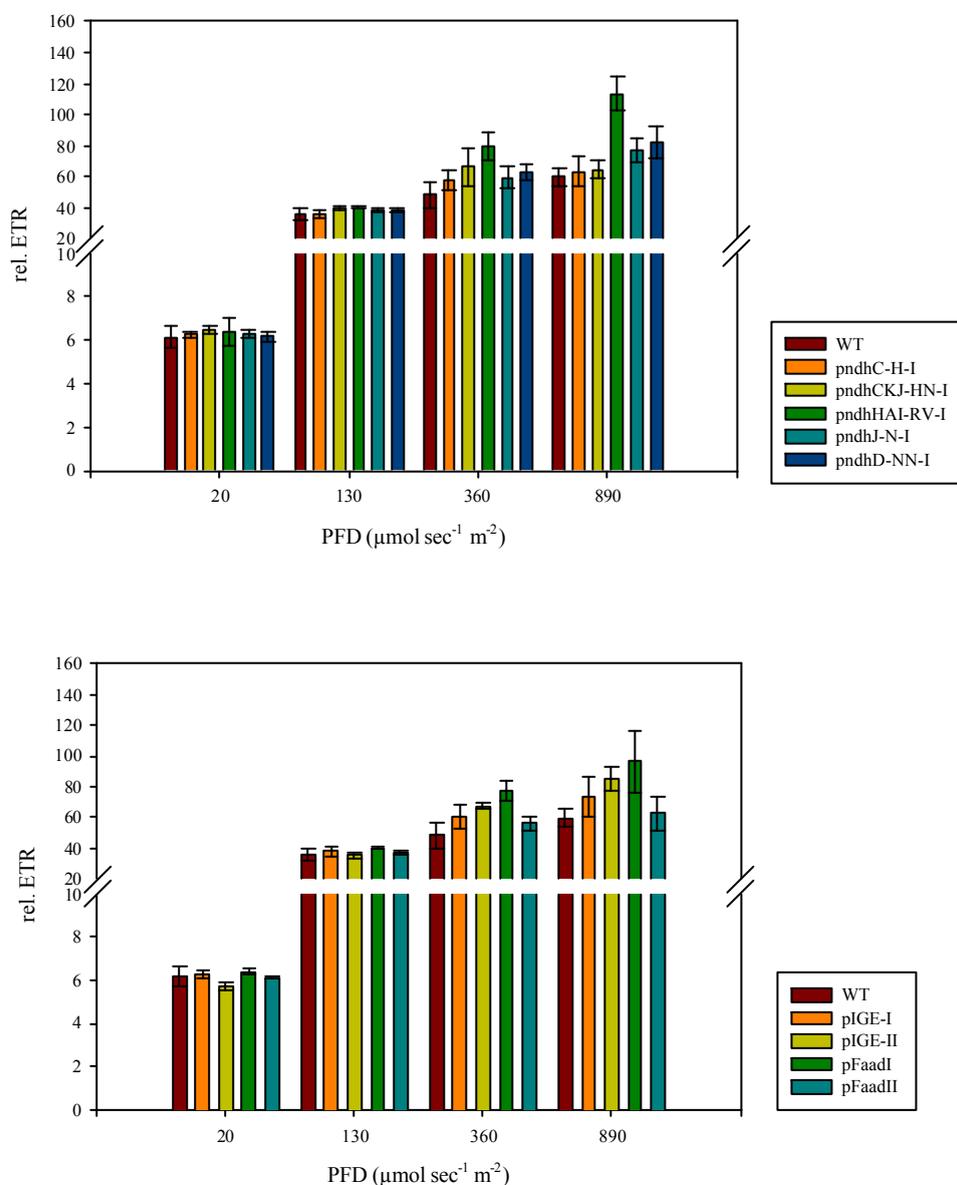


Abb. 29 A

B.

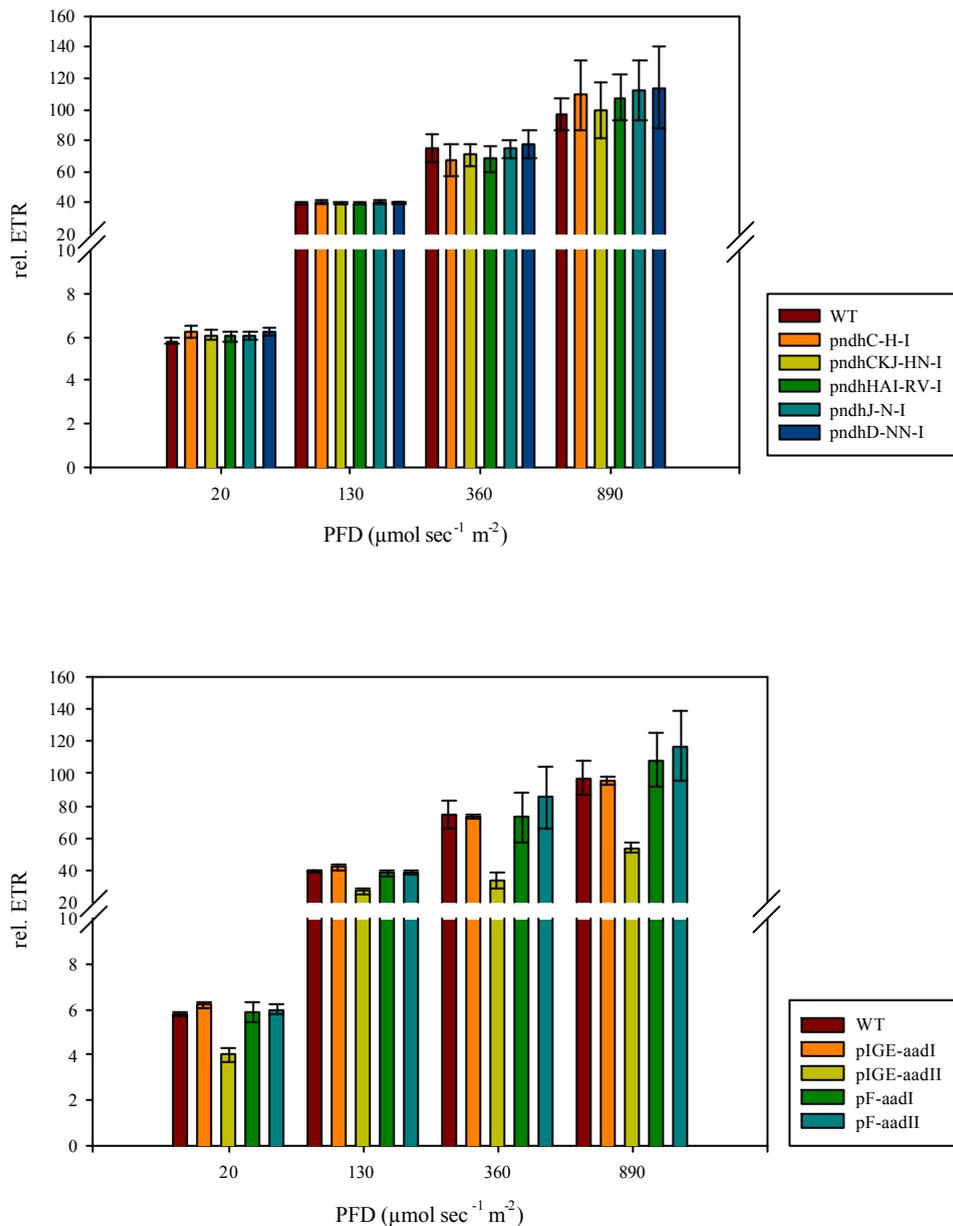


Abb. 29: Relative Elektronentransportraten von Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht (A) und aus der Sommeranzucht (B) im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die Elektronentransportrate für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp.

Die relative Elektronentransportrate der Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht zeigten, wie in Abbildungen 29 A erkennbar, bei geringen Lichtintensitäten von 20 und 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ keinen Unterschied zum Wildtyp. Bei ansteigenden Lichtintensitäten kam es bei den NDH-Mutanten im Mittel zu einem leichten Anstieg. Dasselbe Bild bot sich bei den Kontrollpflanzen.

Auch bei der Sommeranzucht (Abb. 29 B) konnte man bei geringeren Lichtintensitäten von 20 und 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ bei den relativen Elektronentransportraten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten beobachten. Bei der höchsten gemessenen

Lichtintensität konnte man, wie in der Frühjahrsanzucht, einen leichten Anstieg der Elektronentransportrate bei den NDH-Mutanten erkennen. Insgesamt ließ sich, sowohl beim Wildtyp als auch bei den NDH-Mutanten, eine Erhöhung der relative Elektronentransportrate gegenüber der Frühjahrsanzucht feststellen. Die relativen Elektronentransportraten der Kontrollen zeigten das gleiche Verhältnis zum Wildtyp wie die übrigen Transformanten. Die Ausnahme bildete wieder die hell pigmentierte Mutante pIGE-aadII, bei der die Elektronentransportrate deutlich geringer als in den übrigen Pflanzen war.

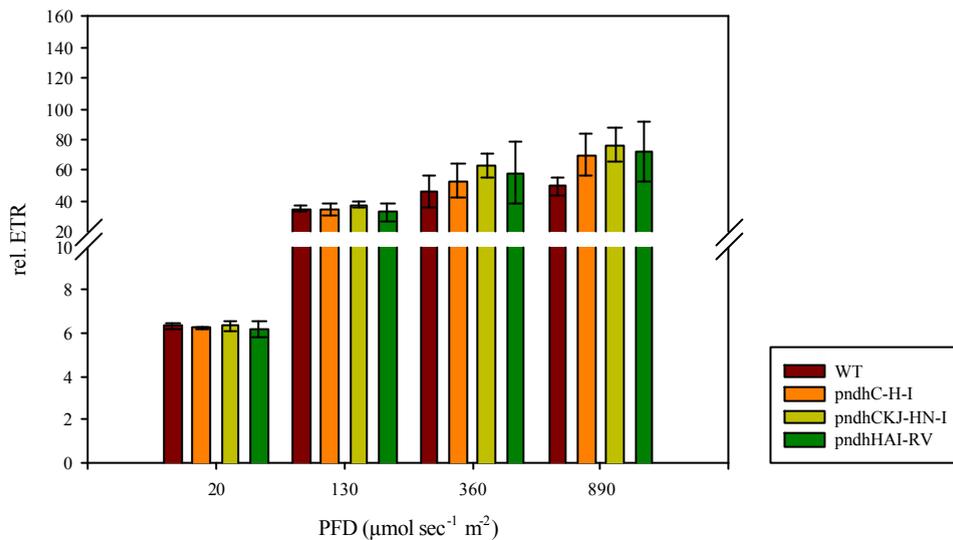


Abb. 30: Relative Elektronentransportrate von Pflanzen der Serie A aus der Anzucht in der Klimakammer. Das Diagramm zeigt die Elektronentransportrate für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.

Die Elektronentransportraten der Pflanzen aus der Anzucht in der Klimakammer lagen bei Lichtintensitäten von 20 und 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ im Wertebereich des Wildtyps. Erst bei Lichtintensitäten von 360 und 890 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lag die Elektronentransportrate der NDH-Mutanten im Mittel höher als die des Wildtyps (Abb. 30).

A.

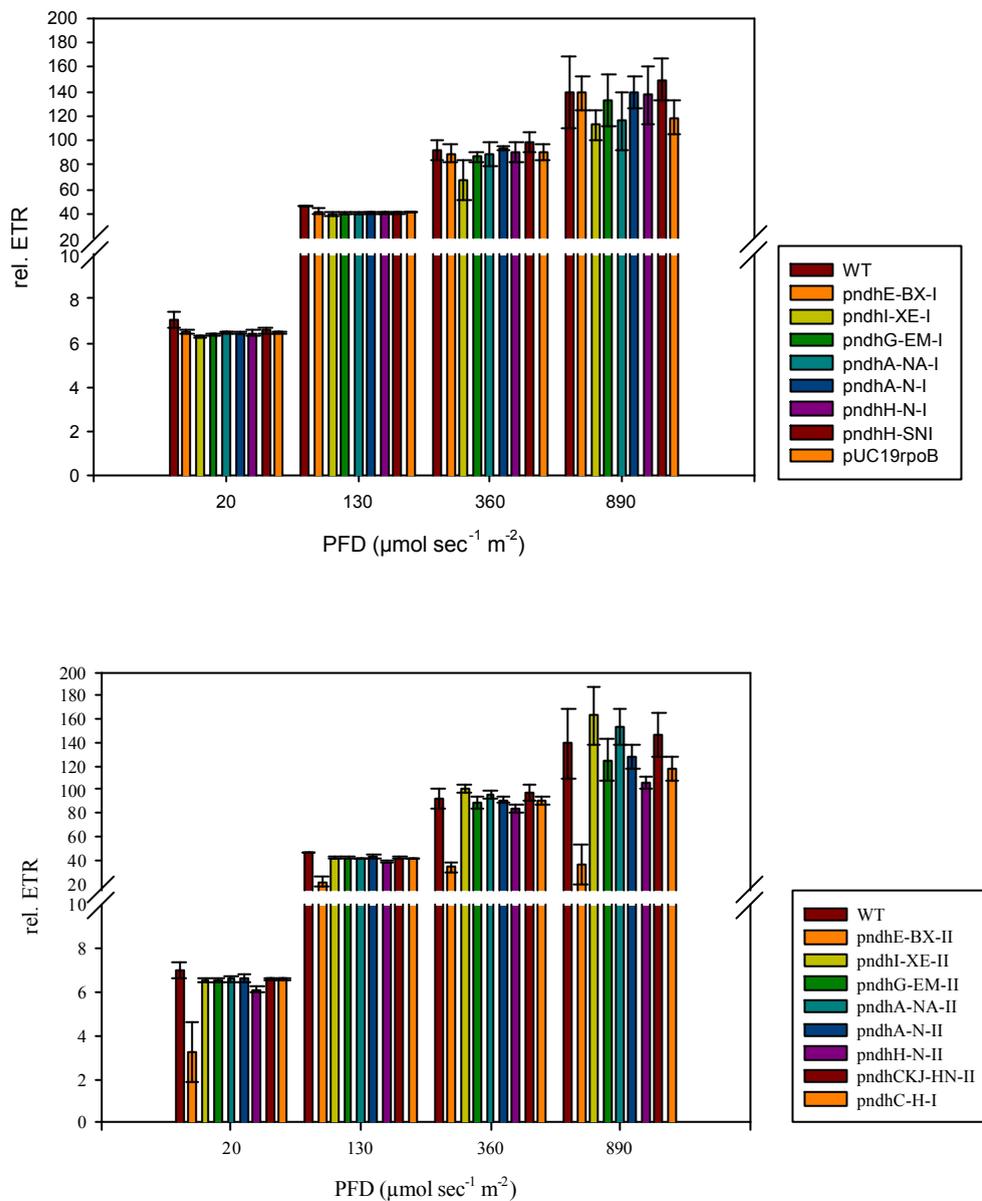


Abb. 31: Relative Elektronentransportrate von Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die Elektronentransportrate für die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp.

In Abbildung 31 erkennt man, dass die relativen Elektronentransportraten der Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht bei niedrigen Lichtintensitäten kleiner waren als die des Wildtyps. Bei ansteigenden Lichtintensitäten glichen sich Wildtyp und Transformanten in ihren Elektronentransportraten immer mehr an. Innerhalb der Transformanten fielen die Elektronentransportraten der Transformanten pndhI-XE-I, pndhA-NA-I und pUC19rpoB bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ unter die des Wildtyps. Die Mutante pndhI-XE-I lag bei einer Lichtintensität von $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ im Mittel deutlich unterhalb der anderen gemessenen Pflanzen. Ebenso zeigte die hell gefärbte Mutante pndhE-BX-II bei allen

Lichtintensitäten eine deutlich geringere Elektronentransportrate als die übrigen Transformanten.

Betrachtet man die verschiedenen Anzuchten, erkennt man keine deutlichen Unterschiede in der relativen Elektronentransportrate zwischen Wildtyp und Transformanten. Lediglich Transformanten mit einem helleren Phänotyp, wie pIGE-aadII und pndhE-BX-II, zeigten eine Verminderung der relativen Elektronentransportrate. Nur in der Frühjahrsanzucht der Serie A und in der Klimakammeranzucht stieg die Elektronentransportrate bei den Transformanten gegenüber dem Wildtyp leicht an.

5.2 Photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung (qP & qN)

Der Verlauf der Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve wird durch den Grad der photochemischen und der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung qP und qN bestimmt.

Die photochemische Fluoreszenzlöschung qP beruht auf der Weiterleitung der Elektronen in die photosynthetische Elektronentransportkette. Je höher der Wert für qP ist, umso stärker ist die Fluoreszenzlöschung auf photochemische Mechanismen zurückzuführen und desto mehr Energie wird durch die Elektronentransportkette geleitet.

Die Hauptkomponente der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung qN besteht in der Energetisierung der Thylakoidmembran in Form eines ΔpH -Gradienten über der Membran. Je höher der Wert für qN liegt, umso höher ist Beteiligung der energieabhängigen Mechanismen an der Fluoreszenzlöschung und desto stärker ist die Thylakoidmembran energetisiert.

Mit Hilfe der Sättigungspulsmethode (Schreiber & Bilger, 1987) lässt sich die Entwicklung der photochemischen und energieabhängigen Fluoreszenzlöschung im Zeitverlauf beobachten. Anhand der Fluoreszenzlöschungskurven kann man die Aktivierung der photosynthetischen Elektronentransportkette und die Energetisierung der Thylakoidmembran verfolgen.

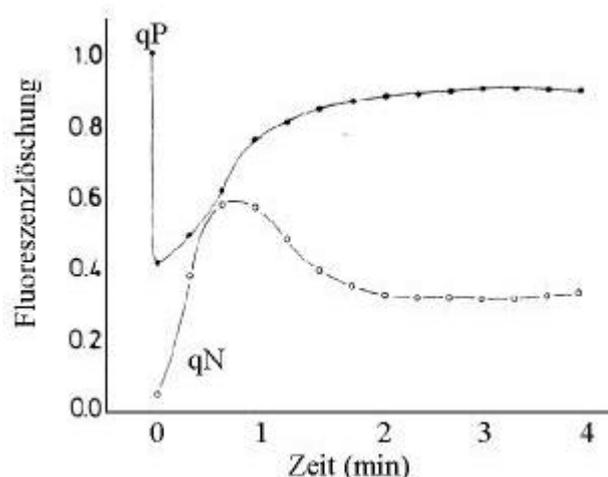


Abb. 32: Charakteristischer Verlauf von photosynthetischer und energieabhängiger Fluoreszenzlöschung qP und qN im Zeitverlauf. Die Kurven wurden für Spinat bei $200 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ und 22°C aufgenommen. (nach Schreiber & Bilger, 1987)

In Abbildung 32 erkennt man die charakteristischen Verläufe der photochemischen und energieabhängigen Fluoreszenzlöschungskurven. Die Kurve für die photochemische Fluoreszenzlöschung qP zeigt zu Anfang einen starken Abfall, bevor sie sich nach 1 bis 2 Minuten wieder einem höheren und konstanten Niveau nähert.

Dieser Kurvenverlauf spiegelt die Aktivierung der Photosynthese wider. Die Kurve beginnt bei einem hohen qP -Wert, d.h. bei einer hohen photochemischen Fluoreszenzlöschung, da zu Beginn der Belichtung die absorbierte Energie zur Reduktion des Photosystems II, bzw. dessen völlig oxidierten Primärakzeptor Q_A , verwendet und so nur ein sehr kleiner Teil als Fluoreszenz abgestrahlt wird. Nach der vollständigen Reduktion von Q_A können die Elektronen jedoch nicht sofort abfließen, da die Enzyme des nachgeschalteten Benson-Calvin-Zyklus noch nicht über das Thioedoxinsystem aktiviert sind und das Q_A schneller reduziert als reoxidiert wird. Die Elektronen können nicht weitergeleitet werden und es kommt zu einer Verstärkung der Fluoreszenz, was sich in einem niedrigen qP -Wert ausdrückt. Wenn die Photosynthese im Fließgleichgewicht ist, stellt sich die photochemische Fluoreszenzlöschung auf ein konstantes Niveau ein.

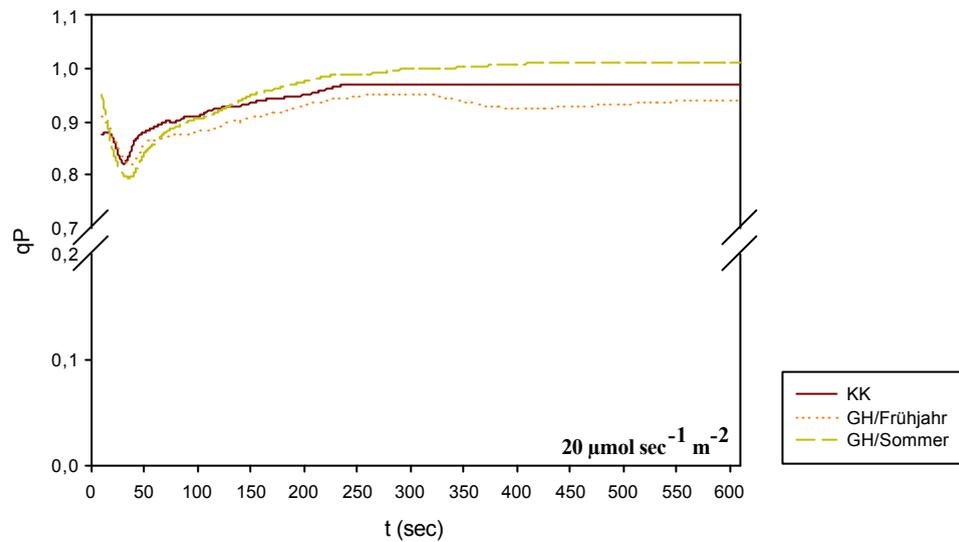
Nach der Dunkeladaption der Pflanzen (II.2.7.2) ist die Thylakoidmembran nicht mehr energetisiert. Durch die Aktivierung der photosynthetischen Elektronentransportkette kommt es zu einer Protonentranslokation über die Membran und zum Aufbau eines Protonengradienten, der den Großteil der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung qN ausmacht. Die energieabhängige Fluoreszenzlöschung qN steigt zunächst an, weil die Thylakoidmembran schneller energetisiert wird, als die Enzyme des Benson-Calvin-Zyklus aktiviert werden. Nach der Aktivierung aller Enzyme kommt es durch den Abbau des Protonengradienten zu einem Abfall in der Löschungskurve, bis sie ein konstantes Niveau erreicht.

Im Folgenden sollten die Fluoreszenzlöschung qP und qN im Zeitverlauf für die Transformanten im Vergleich zum Wildtyp unter verschiedenen Lichtintensitäten und Anzuchtbedingungen ermittelt werden. Die qP - und qN -Werte wurden für die vier Lichtintensitäten 20, 130, 360 und 890 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ über eine Zeitspanne von 10 Minuten ermittelt.

5.2.1 Photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung bei Wildtyppflanzen

Um die Auswirkung der unterschiedlichen Anzuchtbedingungen auf die photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung zu untersuchen, wurden zunächst Wildtyppflanzen aus den drei verschiedenen Anzuchtbedingungen bei unterschiedlichen Lichtintensitäten verglichen.

A.



B.

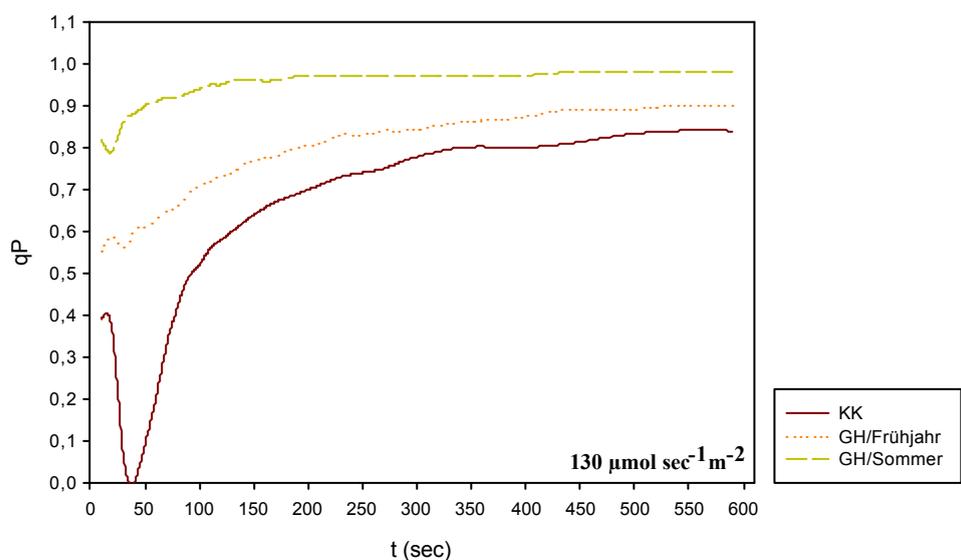
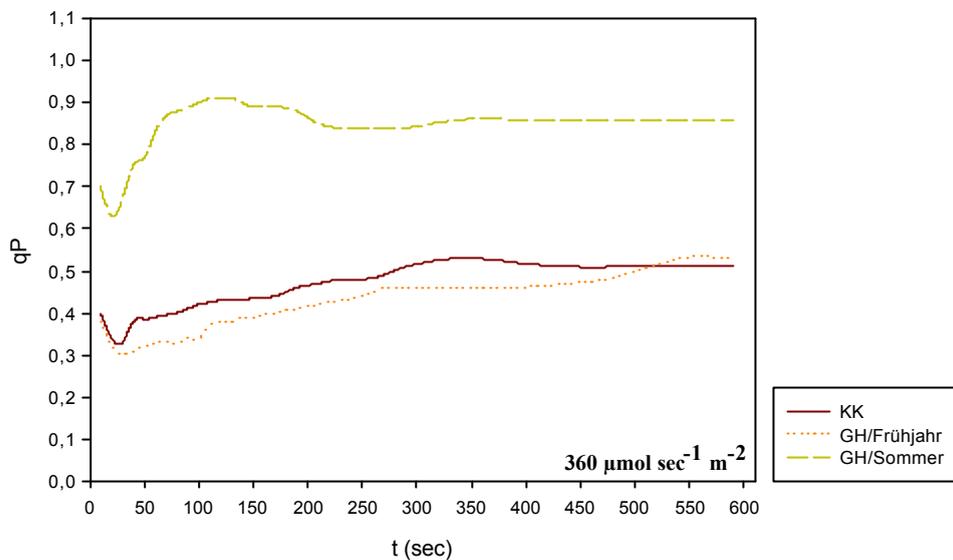


Abb. 33 A und B

C.



D.

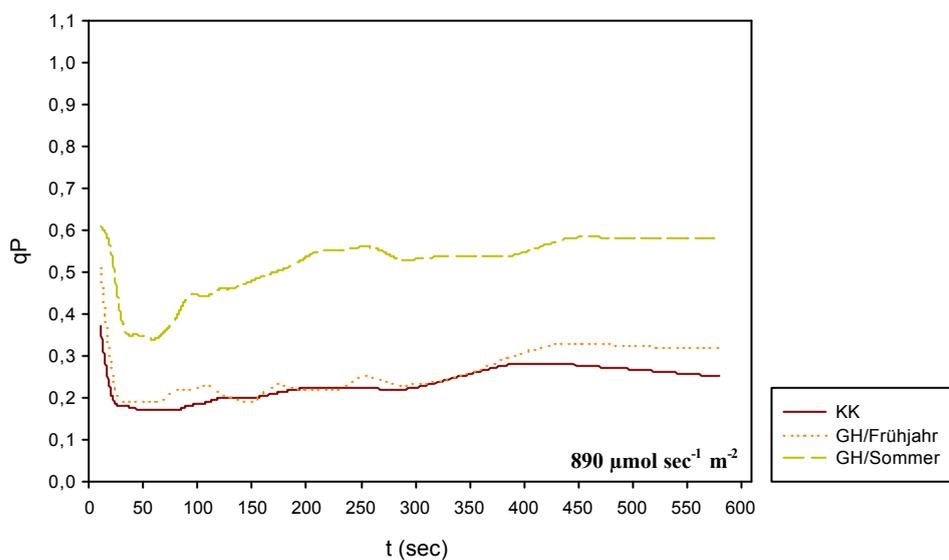


Abb. 33: Verlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei Wildtyppflanzen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) 890 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$. KK: Anzucht in der Klimakammer; GH: Anzucht im Gewächshaus im Frühjahr und im Sommer.

Bei einer schwachen Lichtintensität von 20 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten die Wildtyppflanzen bei allen drei Anzuchtbedingungen einen ganz ähnlichen Kurvenverlauf für qP (Abb. 33 A). Der charakteristische Kurvenabfall zu Beginn der Kurve war nur schwach ausgebildet und die Kurven erreichten schnell ein konstantes Niveau. Im photosynthetischen Fließgleichgewicht erreichten die Pflanzen bei allen Anzuchtbedingungen einen ähnlich hohen qP -Wert zwischen

0,90 und 0,98. Die geringe Lichtintensität führte anscheinend dazu, dass das Gleichgewicht zwischen Reduktion und Reoxidation schneller erreicht wurde.

Bei der Lichtintensität von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigte sich in Abbildung 33 B ein völlig anderes Bild. Die Wildtyppflanzen aus der Anzucht in der Klimakammer zeigten einen Kurvenverlauf für qP, der mit dem Verlauf in Abbildung 32 vergleichbar ist. Unterschiede bestanden im Wert für das Kurvenminimum, der bei den Wildtyppflanzen bei Null lag, und in der Geschwindigkeit, mit der das Minimum erreicht wurde. Die qP-Werte der Wildtyppflanzen erreichten das Minimum nach 40 Sekunden. Danach stieg die Kurve wieder gleichmäßig an und erreichte nach ungefähr 540 Sekunden das photosynthetische Fließgleichgewicht.

Bei den Gewächshausanzuchten lag das Kurvenminimum bei ungefähr 0,55 im Frühjahr und ungefähr 0,79 im Sommer. Die Minima wurden in den Gewächshausanzuchten schneller erreicht. Die qP-Kurve der Frühjahrsanzucht erreichte das Kurvenminimum nach 30 Sekunden und die Sommeranzucht nach 20 Sekunden. Das photosynthetische Fließgleichgewicht stellte sich in der Frühjahrsanzucht nach circa 540 Sekunden und in der Sommeranzucht bereits nach 450 Sekunden ein.

Durch die Veränderung der exogenen Faktoren, wie sie zwischen den Anzuchten auftraten, und durch die Adaptation der Pflanzen an ihre Anzuchtbedingungen, kam es im Sommer vermutlich zu einer Erhöhung der Photosyntheserate. Die Verschiebung der Kurvenminima und das schnellere Erreichen derselben dürften sich auf eine schnellere Reoxidation von Q_A zurückführen lassen.

Die Adaptation an die veränderten Anzuchtbedingungen zeigte sich auch besonders bei den Messungen mit den höheren Lichtintensitäten von 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$. Die Wildtyppflanzen der Sommeranzucht zeigten bei $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ einen annähernd charakteristischen Kurvenverlauf (vgl. Abb. 32), während die Pflanzen aus den gemäßigeren Anzuchten nach Erreichen ihres Kurvenminimums nur einen geringen Wiederanstieg und ein niedriges konstantes Niveau zeigten. Dieser Effekt verstärkte sich bei der höheren Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abb. 33 D).

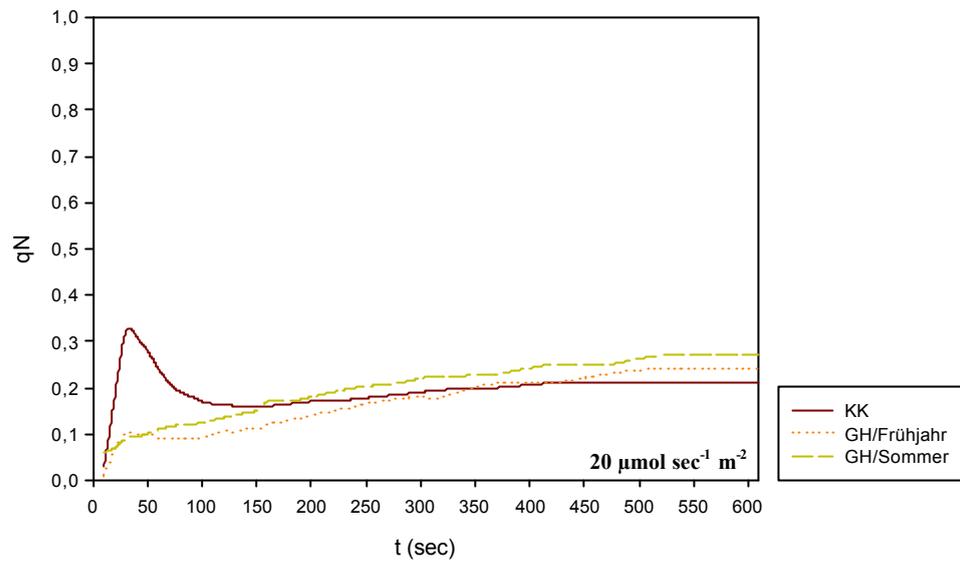
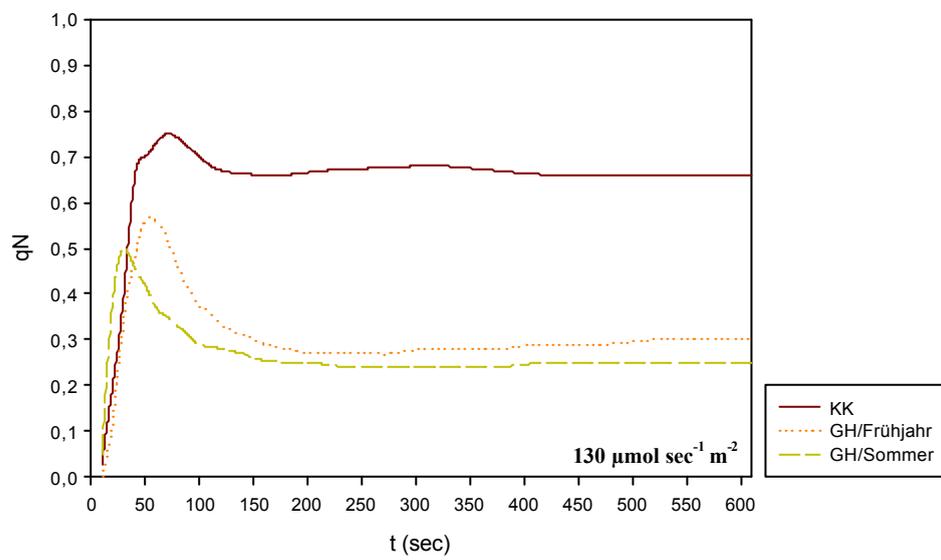
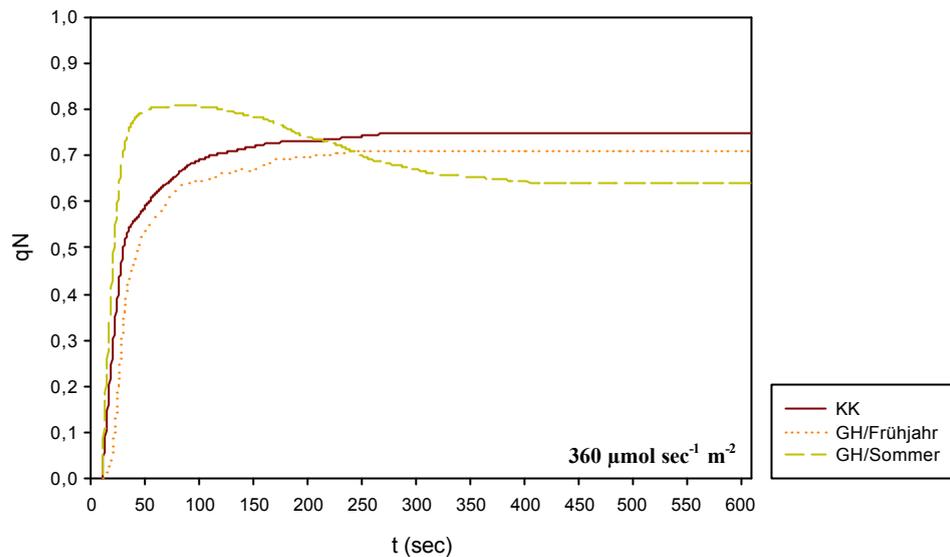
A.**B.**

Abb. 34 A und B

C.



D.

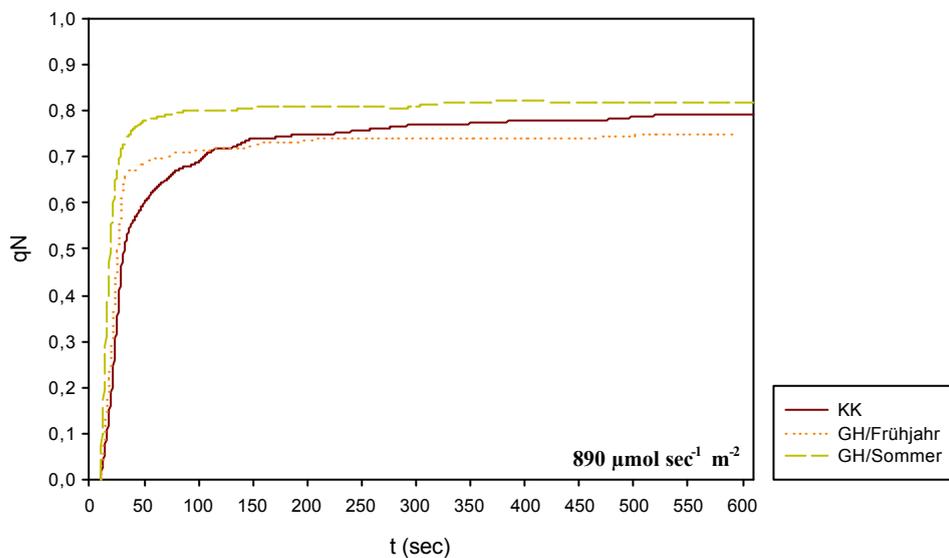


Abb. 34: Verlauf der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_N bei Wildtyppflanzen unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$. KK: Anzucht in der Klimakammer; GH: Anzucht im Gewächshaus (im Frühjahr und im Sommer).

Verfolgt man die energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N für den Wildtyp (Abb. 34 A), so erkennt man, dass bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ nur die Pflanzen aus der Klimakammer den charakteristischen Kurvenverlauf für q_N zeigten (vgl. Abb. 32). Der Kurvenverlauf zeigte einen Anstieg auf ein Maximum von circa 0,32 und einen Abfall der Kurve auf ein konstantes Niveau von circa 0,19. Den Wildtyppflanzen aus den beiden verschiedenen Gewächshausanzuchten fehlte der Anstieg zu Beginn der Belichtungsphase

und das konstante Niveau der Kurve lag leicht oberhalb dem der Pflanzen aus der Klimakammer. Beim Vergleich der Pflanzen aus den verschiedenen Anzuchten bei einer Lichtintensität von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten alle gemessenen Pflanzen den charakteristischen Anstieg zu Beginn der Kurve (Abb. 34 B). Dabei erkennt man, dass die Maxima der Kurven aber zeitlich verschoben und verschieden hoch waren. Die Pflanzen aus der Sommeranzucht zeigten den geringsten und schnellsten Anstieg, gefolgt von den Pflanzen aus der Frühjahrs- und der Klimakammeranzucht.

Bei der höheren Lichtintensität von $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigte der Kurvenverlauf der Pflanzen aus der Sommeranzucht kein so deutliches Maximum wie bei den Messungen bei $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abb. 34 C). Die Klimakammer- und Frühjahrsanzucht hingegen zeigten kein Maximum, sondern einen Anstieg auf ein konstantes Niveau. Der konstante Wert für q_N war bei diesen Pflanzen höher als bei den Pflanzen aus der Sommeranzucht. Auch die Kurvenverläufe aus den Messungen bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten einen Anstieg auf ein konstantes Niveau (Abb. 34 D).

Der Protonengradient wurde, nach den Daten zu urteilen, vermutlich schlechter abgebaut, wodurch die energieabhängige Fluoreszenzlöschung auf einer konstanten Höhe blieb.

Zusammenfassend kann man bei den Wildtyppflanzen erkennen, dass sich die Pflanzen durch einen schnelleren Elektronentransport an höhere Lichtintensitäten anpassen. Dabei waren die Pflanzen aus der Sommeranzucht im Vorteil, da sie bereits an die höheren Lichtintensitäten adaptiert waren.

5.2.2 Photochemische und energieabhängige Fluoreszenzlöschung bei den NDH-Transformanten

Da eine Beteiligung des NDH-Komplexes am photosynthetischen Elektronentransport, speziell am zyklischen Elektronentransport, diskutiert wird, ist nach einer Mutagenese des NDH-Komplexes ein Effekt bei der photochemischen und der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung zu erwarten.

Es wurden Wildtyppflanzen und Transformanten der Serie A vergleichsweise im Frühjahr und Sommer unter Gewächshausbedingungen angezogen (II.2.1.1). Die Mutanten pndhC-H-I, pndhCKJ-HN-I und pndhHAI-RV-I wurden, zusammen mit dem Wildtyp, zum Vergleich unter optimalen konstanten Bedingungen in der Klimakammer angezogen (II.2.1.2).

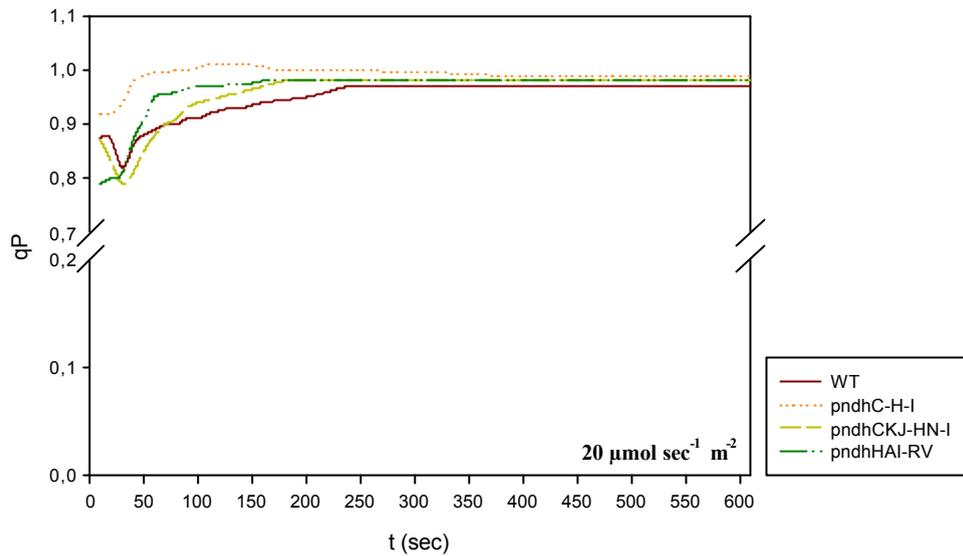
Die Pflanzen der Serie B wurden nur im Frühjahr im Gewächshaus angezogen und untersucht. Zur Untersuchung wurden vier verschiedene Lichtintensitäten (20 , 130 , 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$) verwendet.

Zunächst wurden die photochemische Fluoreszenzlöschung q_P und die energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im Zeitverlauf über 10 Minuten (600 Sekunden) betrachtet. Im zweiten Schritt wurden q_P und q_N im photosynthetischen Fließgleichgewicht nach einem Zeitraum von 10 Minuten (600 Sekunden) miteinander verglichen.

Die Analyse der Fluoreszenzlöschung im Zeitverlauf wurde nur für die NDH-Mutanten mit der Resistenzkassette in Leserichtung dargestellt, während der Vergleich der Fluoreszenzlöschung q_P und q_N im Fließgleichgewicht für alle Transformanten abgebildet wurde.

5.2.2.1 Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus der Klimakammer

A.



B.

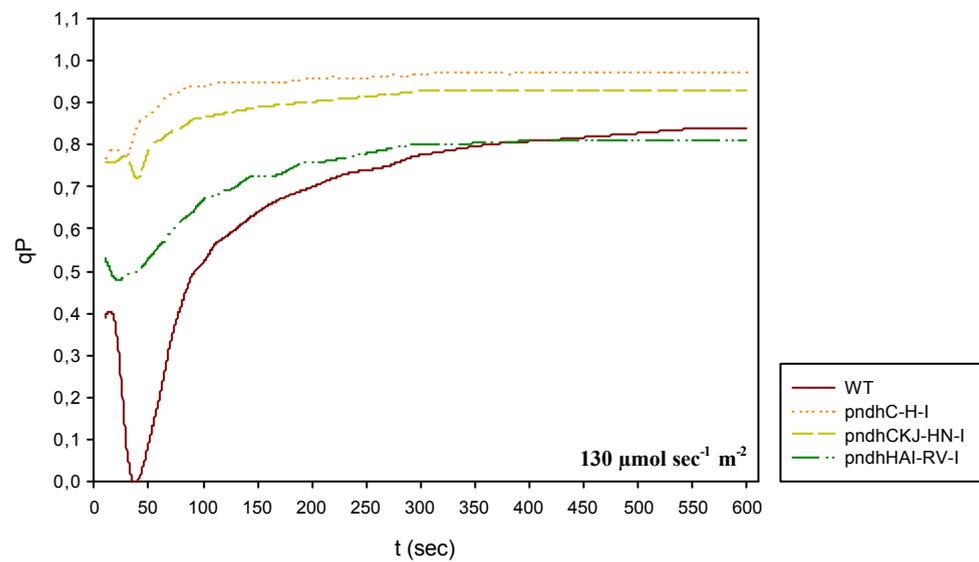
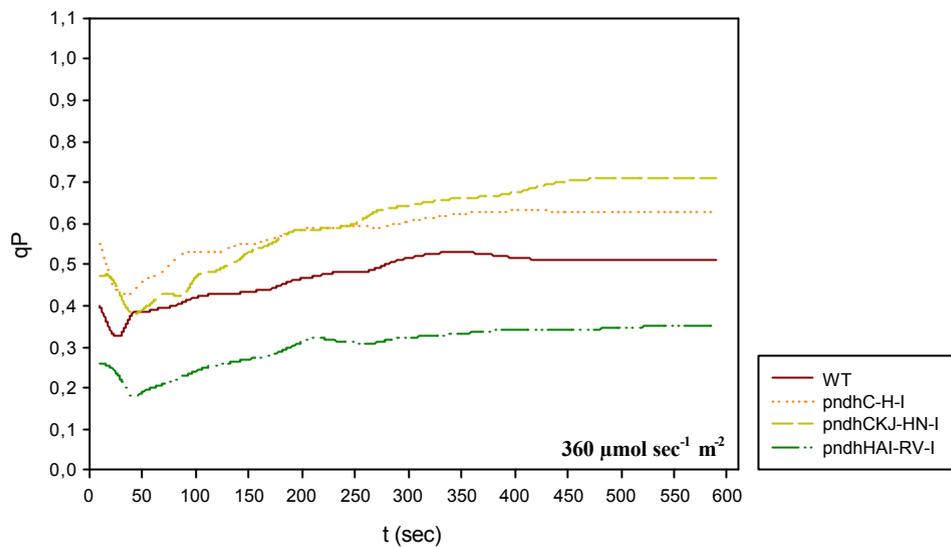


Abb. 35 A und B

C.



D.

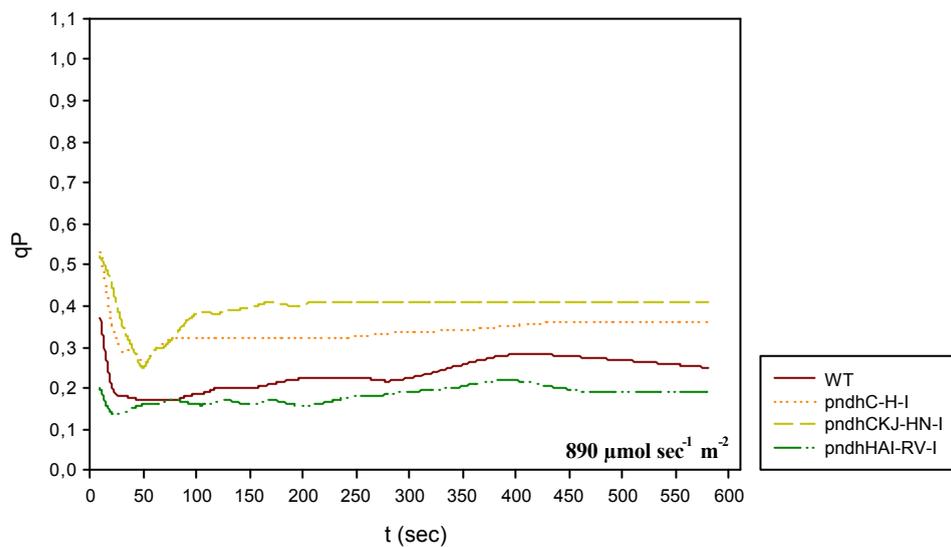


Abb. 35: Verlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei Pflanzen der Serie A aus der Klimakammeranzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) 890 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Vergleicht man wie in Abbildung 35 A die Kurvenverläufe für die photochemische Fluoreszenzlöschung qP der Pflanzen aus der Klimakammeranzucht, zeigten Wildtyp und Transformaten bei einer Lichtintensität von 20 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf. Der Kurvenabfall zu Beginn der Belichtung war stark reduziert, aber im Fließgleichgewicht erreichten alle Pflanzen einen Wert von 0.97 - 0.98.

Die Messungen bei 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten deutliche Unterschiede (Abb. 35 B). Der Wildtyp zeigte die charakteristische Kurve für die photochemische Fluoreszenzlöschung qP (vgl. 5.2 Abb. 32). Die Transformaten zeigten einen deutlich geringeren Kurvenabfall als

der Wildtyp. Das konstante Niveau der Fluoreszenzlöschung lag bei den Mutanten pndhC-H-I und pndhCKJ-HN-I deutlich höher als beim Wildtyp. Die Mutante pndhHAI-RV-I erreichte annähernd das konstante Niveau wie der Wildtyp.

Während beim Wildtyp das Q_A völlig durchreduziert wurde, blieb es bei den Transformanten unvollständig reduziert oder wurde schneller reoxidiert als im Wildtyp.

Ein ähnliches Bild zeigten die Messungen bei einer Lichtintensität von $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abb. 35 C). Der Kurvenabfall zu Beginn der Messung führte bei den Transformanten zu einem kleineren Minimum als beim Wildtyp. Während die Mutanten pndhC-H-I und pndhCKJ-HN-I auch bei dieser Lichtintensität ein höheren konstanten Wert als der Wildtyp erreichten, blieb die Transformante pndhHAI-RV-I deutlich unter dem Wildtyp. Bei $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ ergaben sich ganz ähnliche Kurvenverläufe (Abb. 35 D).

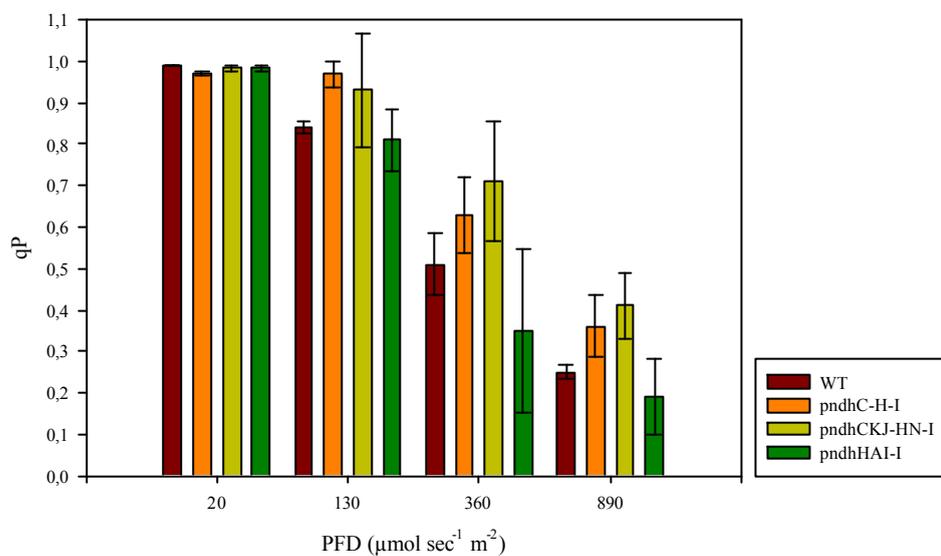
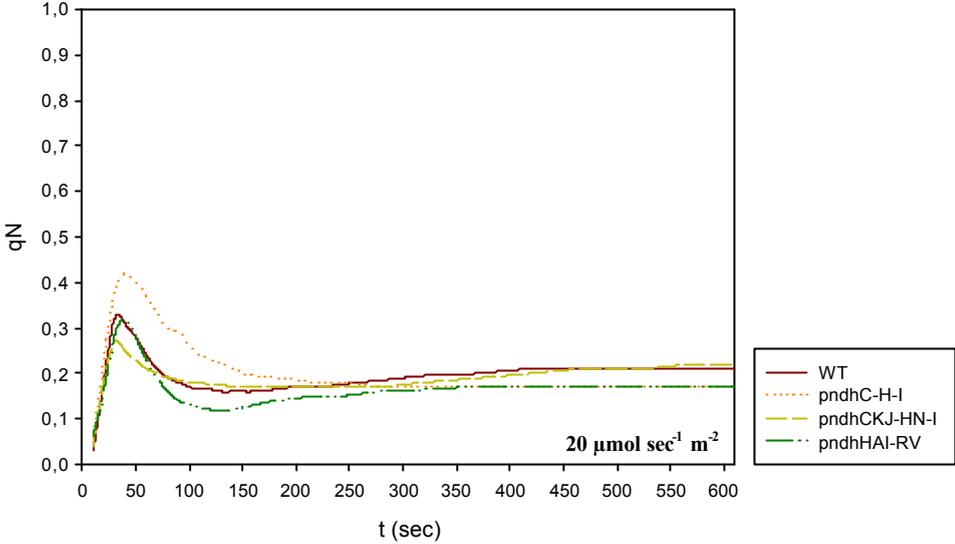


Abb. 36: Photosynthetische Fluoreszenzlöschung qP im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie A aus der Anzucht in der Klimakammer. Das Diagramm zeigt die photochemische Fluoreszenzlöschung qP für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Werte ergaben sich aus Messungen an verschiedenen Pflanzen jeweils einer Linie.

Bei einem direkten Vergleich der photochemischen Fluoreszenzlöschung im Fließgleichgewicht zwischen Wildtyp und Transformanten in Abbildung 36 erkennt man deutliche Unterschiede. Bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen die Werte für die photochemische Fluoreszenzlöschung aller Pflanzen im gleichen Größenbereich von 1. Bei diesem Wert erreichte die photochemische Fluoreszenzlöschung fast ihr Maximum, d.h. alle absorbierte Energie wurde in die Elektronentransportkette weitergeleitet. Mit zunehmender Lichtstärke nahm der qP -Wert der Pflanzen immer stärker ab, wobei die Transformanten einen höheren Wert für die photochemische Fluoreszenzlöschung zeigten, d.h. die photosynthetische Elektronentransportkette leitete bei den Transformanten mehr absorbierte Energie weiter.

A.



B.

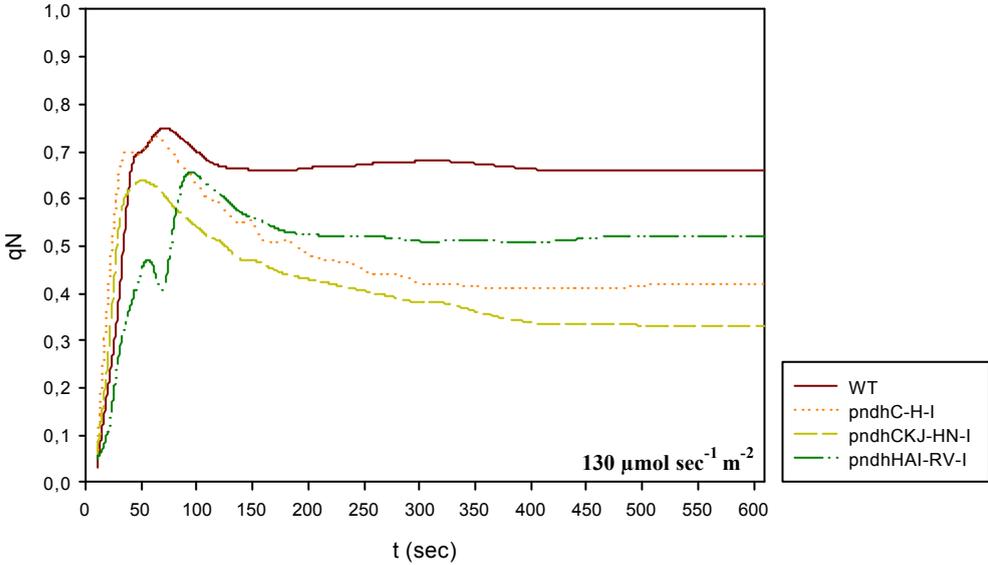
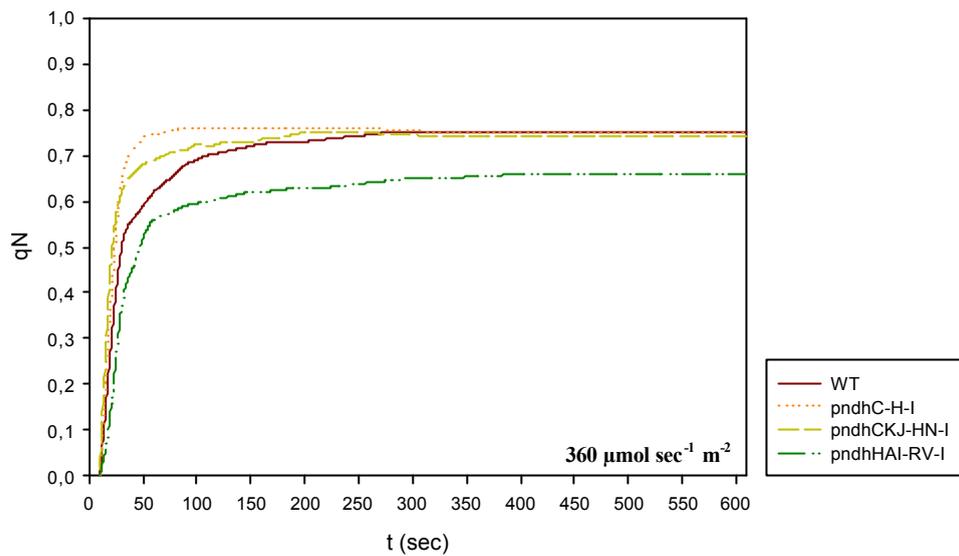


Abb. 37 A und B

C.



D.

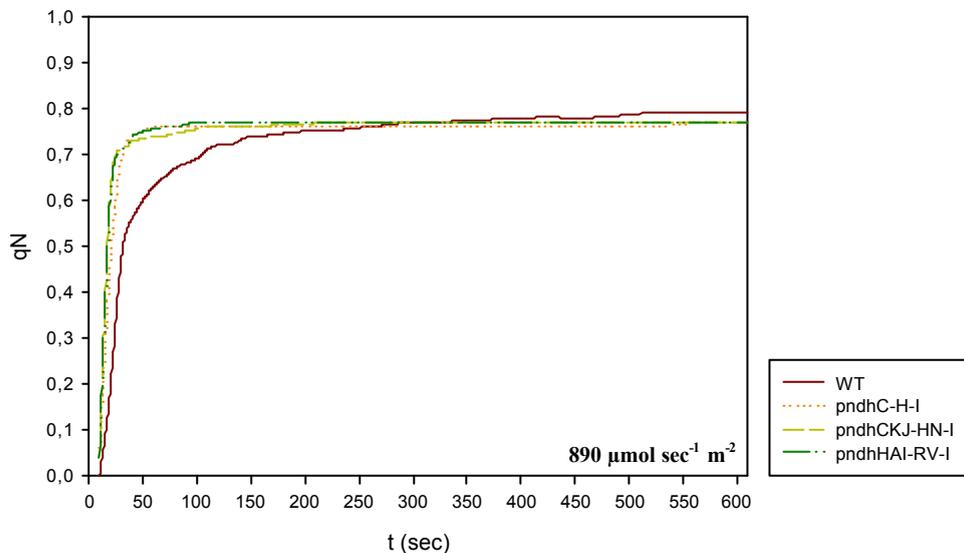


Abb. 37: Verlauf der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung qN für die Pflanzen der Serie A aus der Klimakammeranzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Bei einem Vergleich der Kurven für die energieabhängige Fluoreszenzlöschung qN zeigte sich bei allen Pflanzen unter Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ ein Kurvenanstieg zu Beginn der Messung und somit eine Energetisierung der Thylakoidmembran (Abb. 37 A). Bei der Mutante *pndhC-H-I* zeigte sich eine leichte Erhöhung des Kurvenmaximums gegenüber dem Wildtyp, während das Maximum der Transformante *pndhCKJ-HN-I* unterhalb dem des Wildtyps lag. Bei Schwachlicht wurde die Thylakoidmembran also energetisiert, wenn auch nur auf einem sehr geringen Niveau.

Bei den Messungen mit einer Lichtintensität von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten alle Pflanzen den charakteristischen Kurvenanstieg zu Beginn der Messung (Abb. 37 B). Alle Transformanten blieben, sowohl beim Kurvenmaximum als auch im Fließgleichgewicht, unterhalb des Wildtyps.

In den Abbildungen 37 C und D zeigten alle Pflanzen bei den höheren Lichtintensitäten von 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ einen Kurvenanstieg auf ein Maximum, aber die Kurven fielen nicht wieder ab, sondern blieben auf dem errichteten Niveau. Dabei zeigten die Mutanten das gleiche Energetisierungsniveau wie der Wildtyp. Lediglich die Mutante *pndhHAI-RV-I* lag bei $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ unterhalb dem Niveau der übrigen Pflanzen.

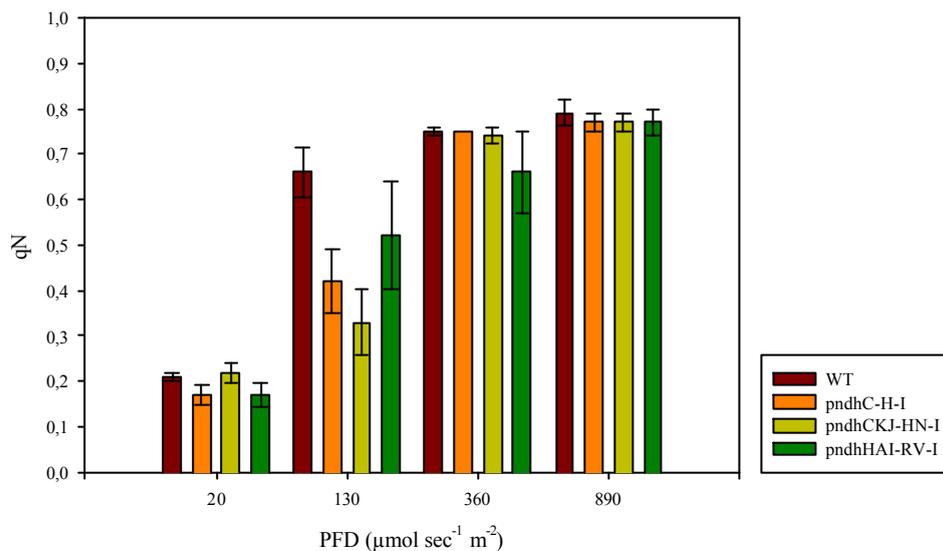


Abb. 38: Energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie A aus der Anzucht in der Klimakammer. Das Diagramm zeigt die energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Werte ergaben sich aus Messungen an verschiedenen Pflanzen jeweils einer Linie.

In Abbildung 38, in der die energieabhängige Fluoreszenzlöschung im Fließgleichgewicht bei verschiedenen Lichtintensitäten im Vergleich dargestellt ist, erkennt man, dass der Wildtyp in allen Fällen im Mittel einen höheren q_N -Wert aufwies als die Transformanten.

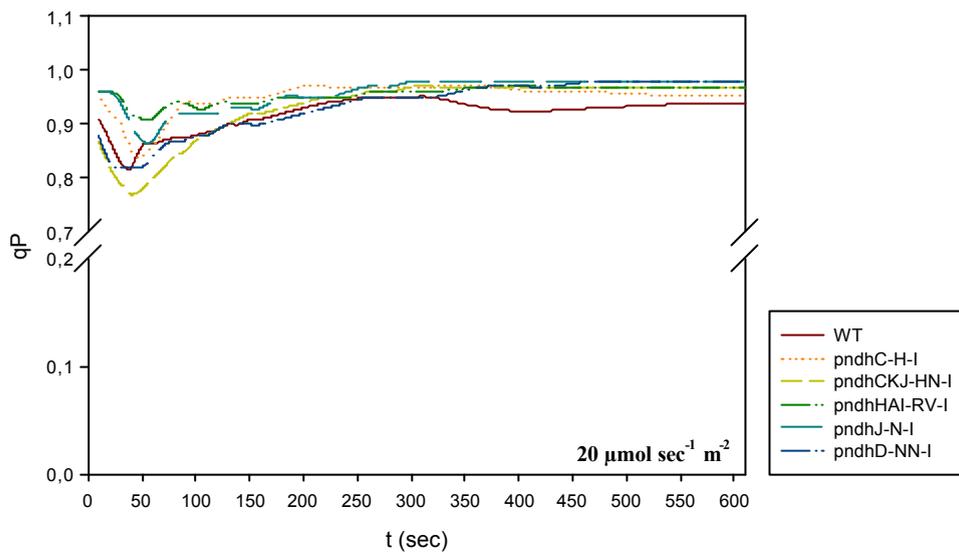
Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Transformanten unter den optimalen Anzuchtbedingungen in der Klimakammer im Vergleich zum Wildtyp zwar einen höheren Energiedurchsatz in der photosynthetischen Elektronentransportkette zeigten, aber die Energetisierung der Thylakoidmembran schwächer ausgeprägt war. Dies galt nicht nur im Fließgleichgewicht, sondern zeigte sich bereits im Kurvenverlauf der photochemischen und energieabhängigen Fluoreszenzlöschung.

5.2.2.2 Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus dem Gewächshaus

Um den Verlauf der Fluoreszenzlöschung auch unter natürlichen Bedingungen zu ermitteln, wurden Wildtyp und Mutanten im Frühjahr und im Sommer unter Gewächshausbedingungen angezogen und die entsprechenden Werte ermittelt.

I. Fluoreszenzlöschung qP und qN für Pflanzen aus der Frühjahrsanzucht

A.



B.

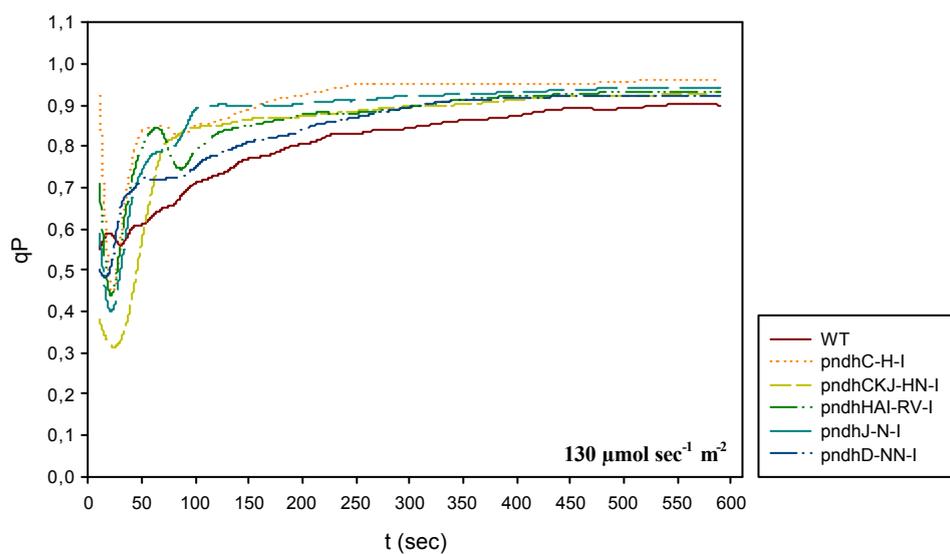
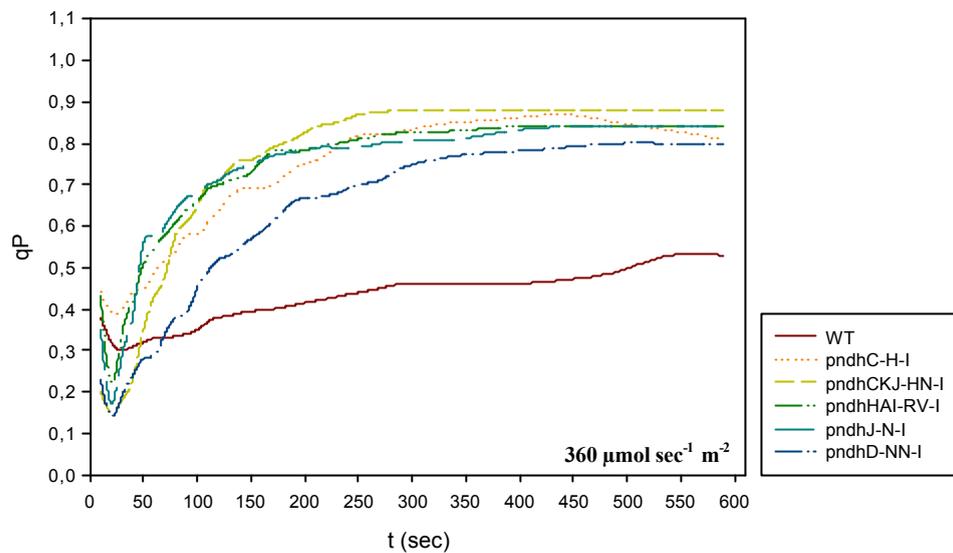


Abb. 39 A und B

C.



D.

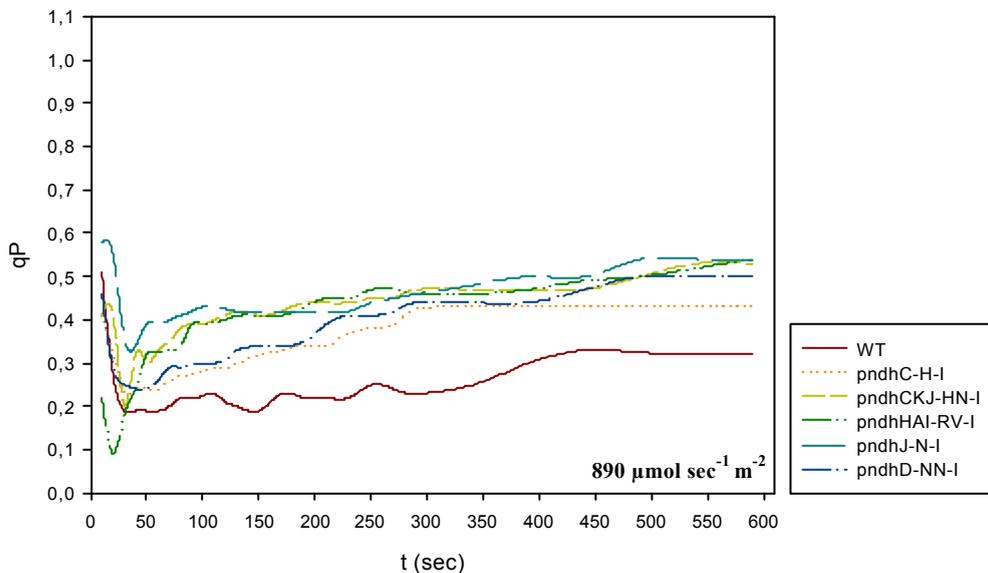


Abb. 39: Verlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Bei den Pflanzen aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus zeigten sich bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten (Abb. 39 A). Das Minimum der Mutanten pndhC-H-I, pndhHAI-RV-I und pndhJ-N-I lag höher als das des Wildtyps und das Minimum der Transformante pndhCKJ-HN-I lag darunter. Im Fließgleichgewicht lag der qN -Wert des Wildtyps etwas unterhalb den qN -Werten der Transformanten. Der Kurvenverlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei einer

Lichtintensität von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abbildung 39 B) unterschied sich deutlich vom Kurvenverlauf der Pflanzen aus der Anzucht in der Klimakammer (vgl. Abb. 35). Der Kurvenverlauf des Wildtyps zeigte nur einen Abfall auf ein Minimum von circa 0,57, während man bei den Transformanten einen deutlichen Abfall auf ein Wert unter 0,5, bei der Transformante pndhCKJ-HN-I bis auf circa 0,31, erkennen konnte. Zudem erreichten die Transformanten ihr Minimum schneller als der Wildtyp und sie wiesen im photosynthetischen Fließgleichgewicht einen höheren qP-Wert auf.

In Abbildung 39 C erkennt man, dass die Unterschiede im Kurvenverlauf zwischen Transformante und Wildtyp bei einer Lichtintensität von $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ noch deutlicher wurden als in Abbildung 38 B. Die Fluoreszenzlöschung des Wildtyps stieg nach dem Erreichen ihres Minimums nur sehr langsam an und blieb im Fließgleichgewicht deutlich unterhalb der Werte der Transformante. Die Minimalwerte waren bei diesen Messungen kleiner als bei $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$. Der Wildtyp erreichte einen Wert von circa 0,3 und die Transformanten erreichten Werte zwischen 0,15 und 2. Einzige Ausnahme bildete die Transformante pndhC-H-I, deren qP-Kurve ihr Minimum bereits bei 0,4 erreichte.

Bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abb. 39 D) zeigten auch die Kurvenverläufe der Transformanten nach dem Erreichen ihres Minimums einen langsameren Wiederanstieg. Die Minima der Kurven der Transformanten waren, mit Ausnahme der Transformante pndhHAI-RV-I, im Gegensatz zu den vorgehenden Messungen kleiner als das des Wildtyps. Die qP-Werte im Fließgleichgewicht blieben aber größer als der qP-Wert des Wildtyps

Verfolgt man die Entwicklung der Fluoreszenzlöschungskurven mit zunehmender Lichtintensität, so erkennt man, dass beim Wildtyp der Elektronentransport mit zunehmender Lichtintensität herunterreguliert wurde, während bei den Transformanten bei allen Lichtintensitäten mehr Energie an die Elektronentransportkette weitergeleitet wurde, was sich in der höheren photochemischen Fluoreszenzlöschung zeigte.

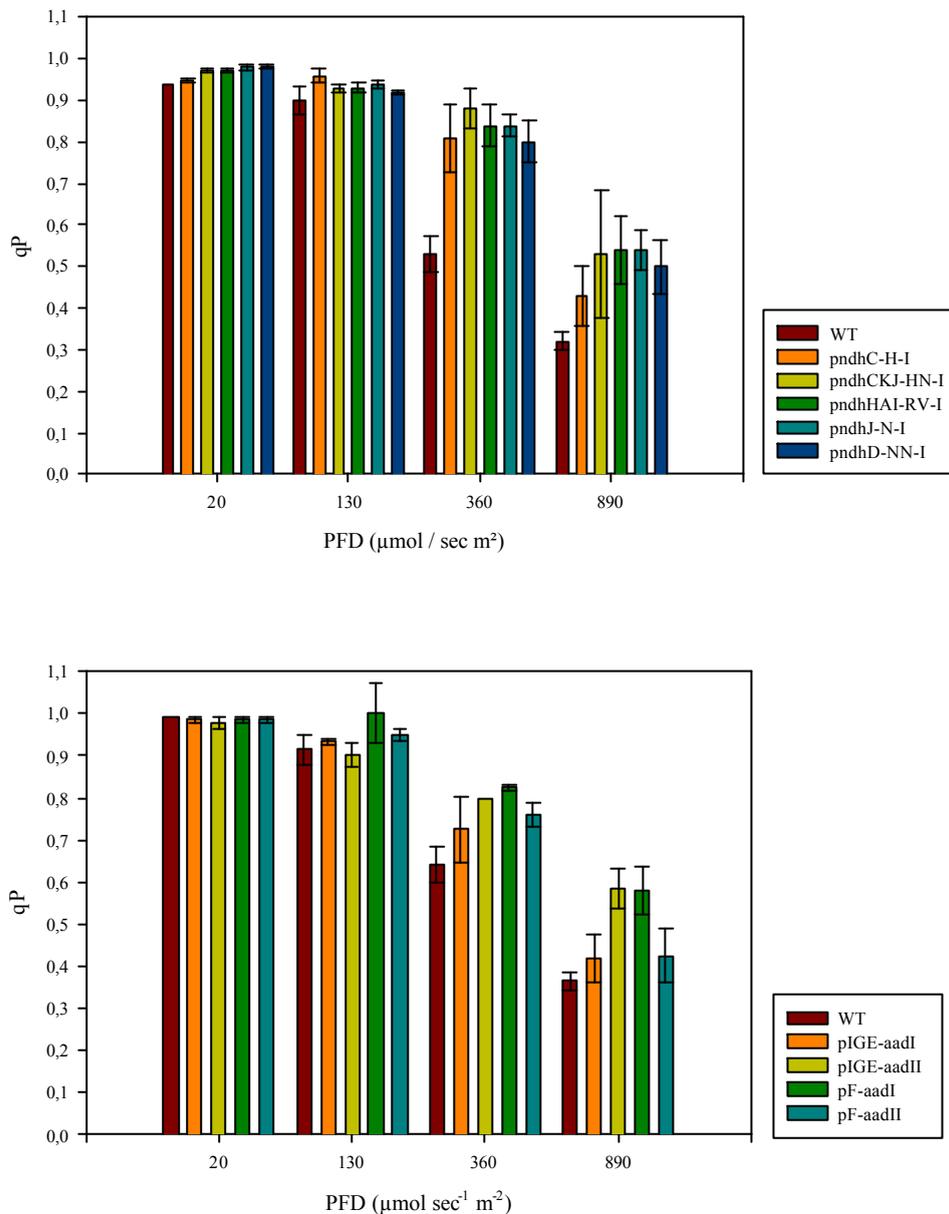
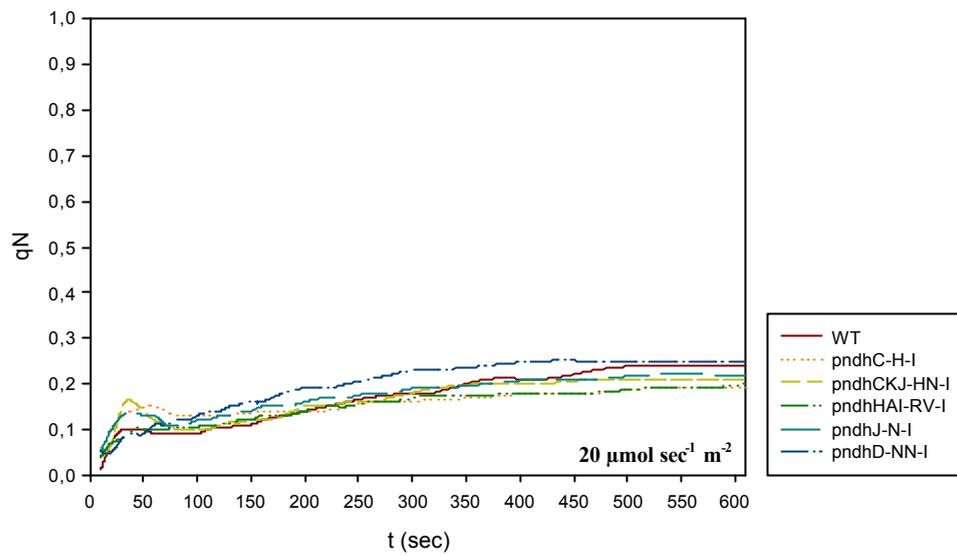


Abb. 40: Photosynthetische Fluoreszenzlöschung qP im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die Verteilung der qP-Werte für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp. Die Werte ergaben sich aus Messungen an verschiedenen Pflanzen jeweils einer Linie.

Bei einem direkten Vergleich der photochemischen Fluoreszenzlöschung bei verschiedenen Lichtintensitäten (Abb. 39) waren die gleichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten zu beobachten, wie bei der Anzucht in der Klimakammer. Bei steigenden Lichtintensitäten nahm die photochemische Fluoreszenzlöschung qP beim Wildtyp stärker ab als in den Transformanten. Die Kontrollpflanzen verhielten sich bei der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP wie die Transformanten, und nicht, wie erwartet, wie der Wildtyp.

A.



B.

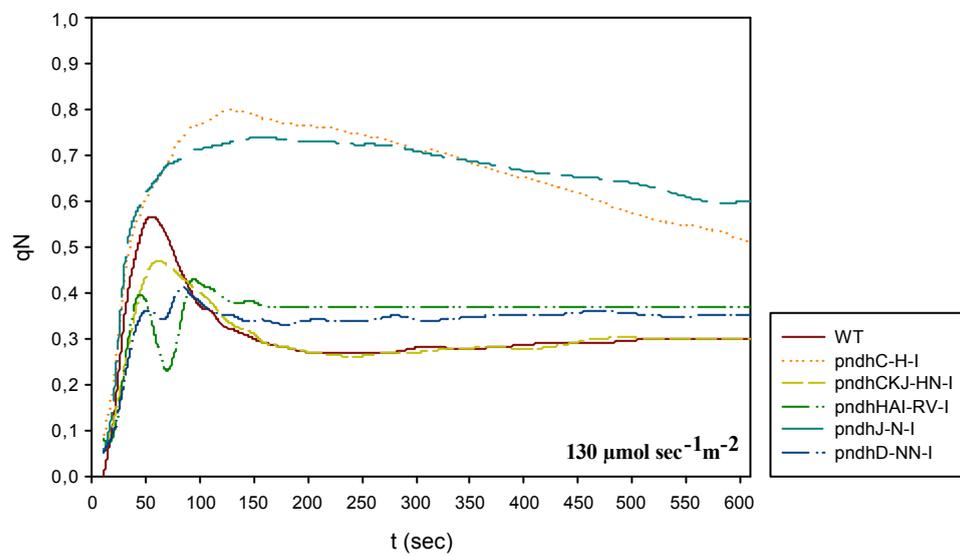
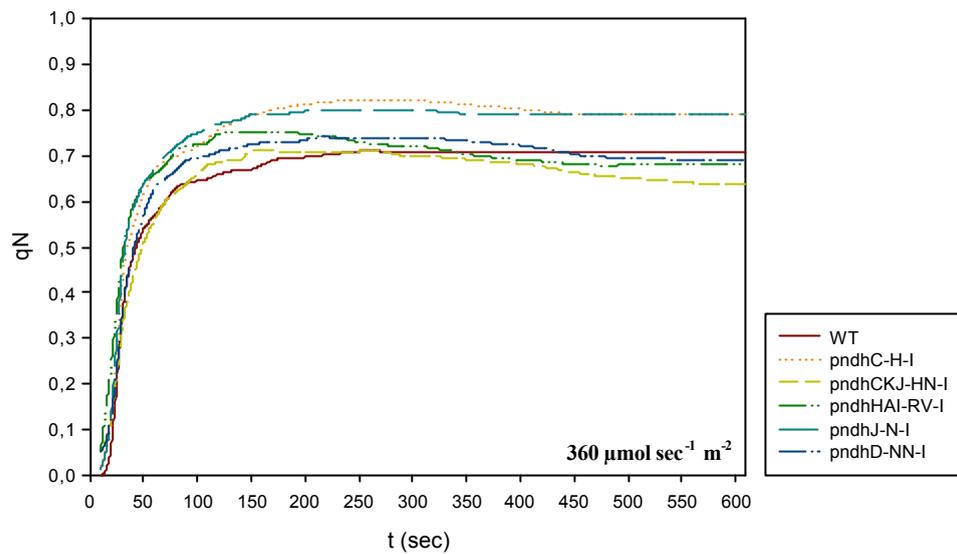


Abb. 41 A und B

C.



D.

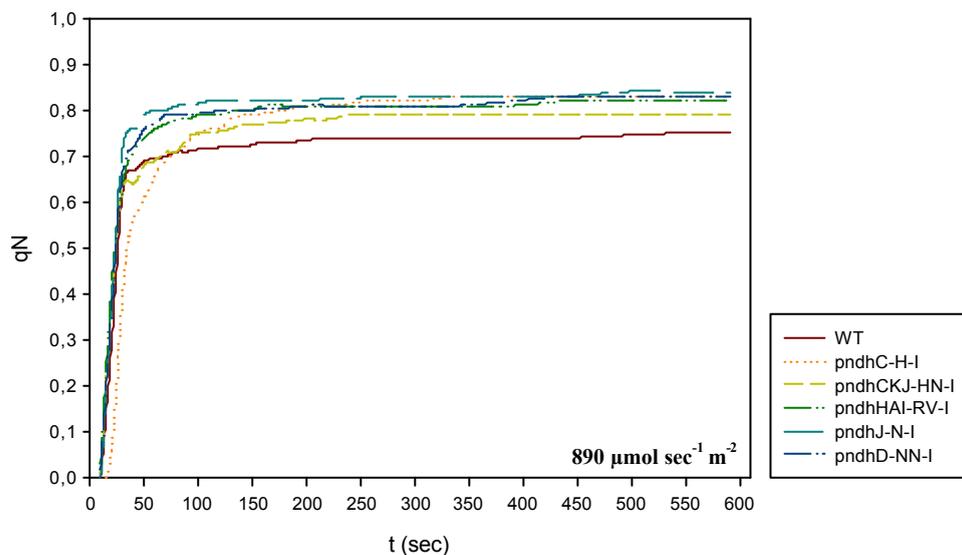


Abb. 41: Verlauf der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_N bei Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Die Transformanten *pndhC-H-I*, *pndhCKJ-HN-I* und *pndhD-NN-I* zeigten bei der energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im Schwachlicht bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ einen stärkeren Anstieg zu Beginn der Belichtung als der Wildtyp (Abb. 41 A). Die Transformanten *pndhHAI-RV-I* und *pndhJ-N-I* zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp. Im weiteren Kurvenverlauf und in ihrem konstanten Niveau unterschieden sich Transformanten und Wildtyp nicht wesentlich.

Die Messungen der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung bei $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten deutliche Unterschiede (Abb. 41 B). Der Wildtyp zeigte einen Kurvenverlauf für q_N , wie er in Abbildung 31 beschrieben wurde. Die Transformanten *pndhC-H-I* und *pndhJ-N-I* zeigten einen deutlichen Anstieg zu Beginn der Messung, aber die Kurven flachten nach dem Maximum sehr langsam ab. Die Werte für die energieabhängigen Fluoreszenzlöschung waren im Fließgleichgewicht deutlich höher als bei den anderen Mutanten und im Wildtyp.

Das Maximum der übrigen Transformanten lag unterhalb dem des Wildtyps. Die Mutanten *pndhHAI-RV-I* und *pndhD-NN-I* zeigten im Kurvenanstieg eine Doppelschulter.

Das konstante Niveau der Löschung q_N lag bei den Transformanten, außer bei der Mutante *pndhCKJ-HN-I*, höher als beim Wildtyp, wobei die Mutanten *pndhC-H-I* und *pndhJ-N-I* den höchsten q_N -Wert aufwiesen.

In den Abbildung 41 C und D erkennt man, dass die Kurven der Fluoreszenzlöschung nach Erreichen ihres Maximums kaum noch abflachten.

Die q_N -Werte im Fließgleichgewicht bei einer Lichtintensität von $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen bei den Transformanten *pndhC-H-I* und *pndhJ-N-I* höher als im Wildtyp, während sie in den übrigen Transformanten etwas niedriger lagen als im Wildtyp. Bei $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen die q_N -Werte aller Transformanten über denen des Wildtyps.

Bei allen Lichtintensitäten kam es zur Energetisierung der Thylakoidmembran. Das Abklingen der Energetisierung auf ein konstantes Niveau erfolgte jedoch unterschiedlich schnell, bzw. bei hohen Lichtintensitäten blieb der Energiezustand der Membran erhalten, was sich in einer hohen energieabhängigen Fluoreszenzlöschung äußerte. In den meisten Messungen lag der Energetisierungszustand der Transformanten höher als im Wildtyp.

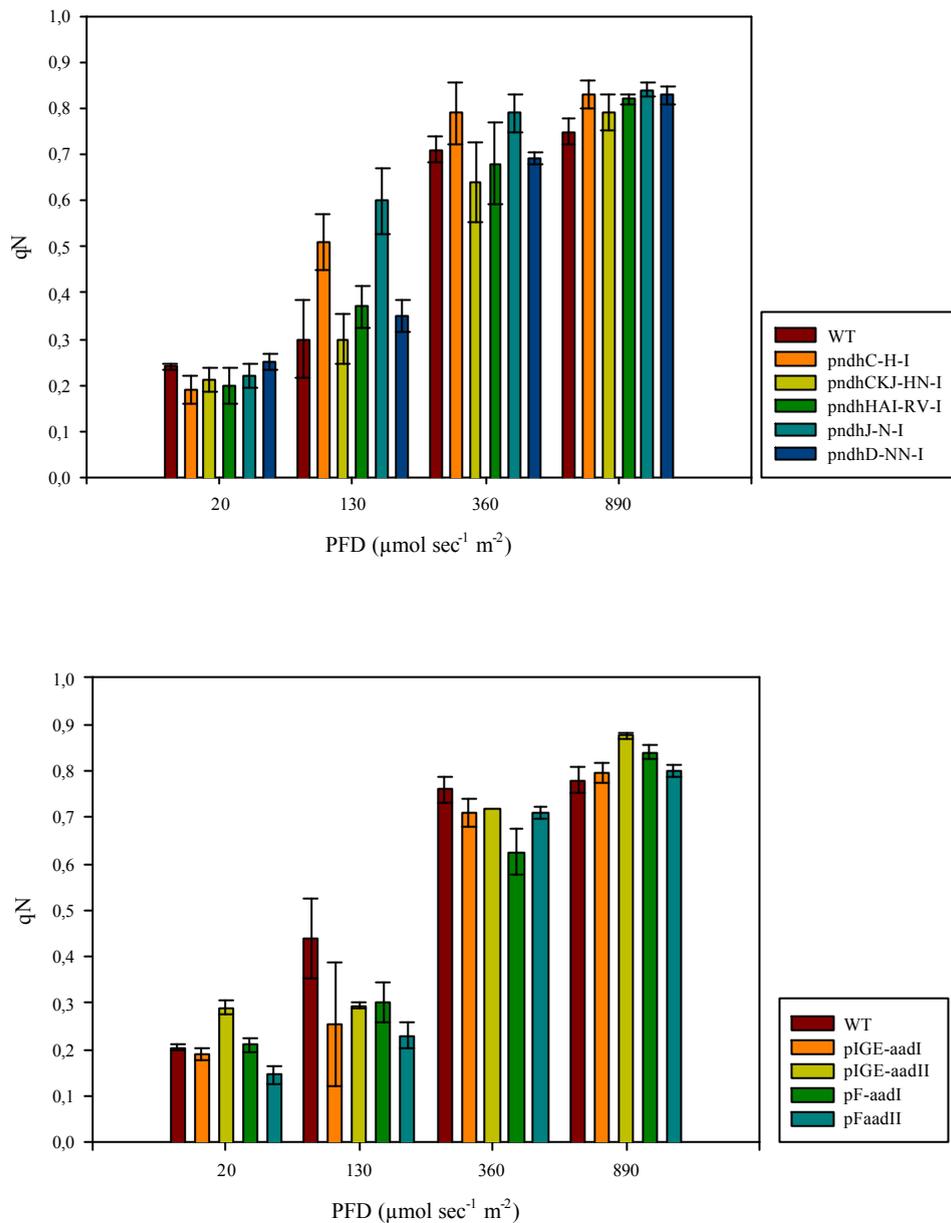
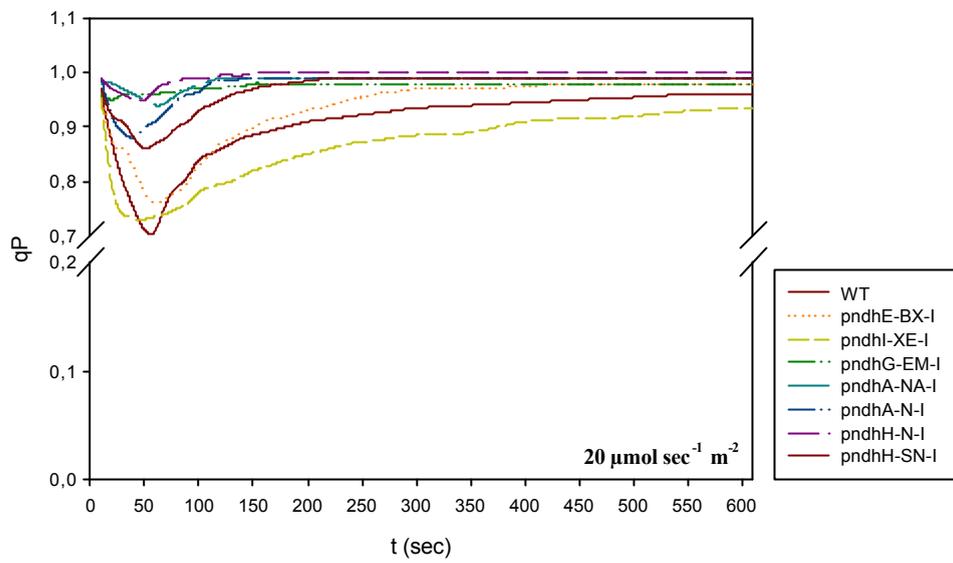


Abb. 42: Energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere Diagramm die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp. Die Werte ergaben sich aus Messungen an verschiedenen Pflanzen jeweils einer Linie.

In Abbildung 42 wird die energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im Fließgleichgewicht bei verschiedenen Lichtintensitäten verglichen. Dabei erkennt man, dass die q_N -Werte mit zunehmender Lichtintensität anstiegen, aber der Wildtyp nicht mehr höher lag als die Transformanten. Beim Vergleich der q_N -Werte der verschiedenen Mutanten untereinander zeichnete sich kein eindeutiges Bild ab. Dasselbe galt für einen Vergleich der q_N -Werte aus dem Fließgleichgewicht von Wildtyp und Kontrollpflanzen.

A.



B.

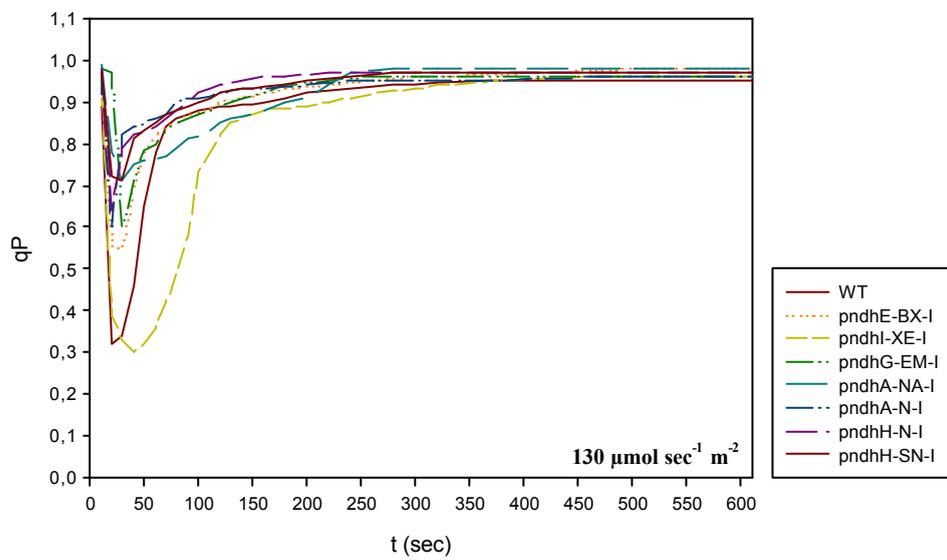
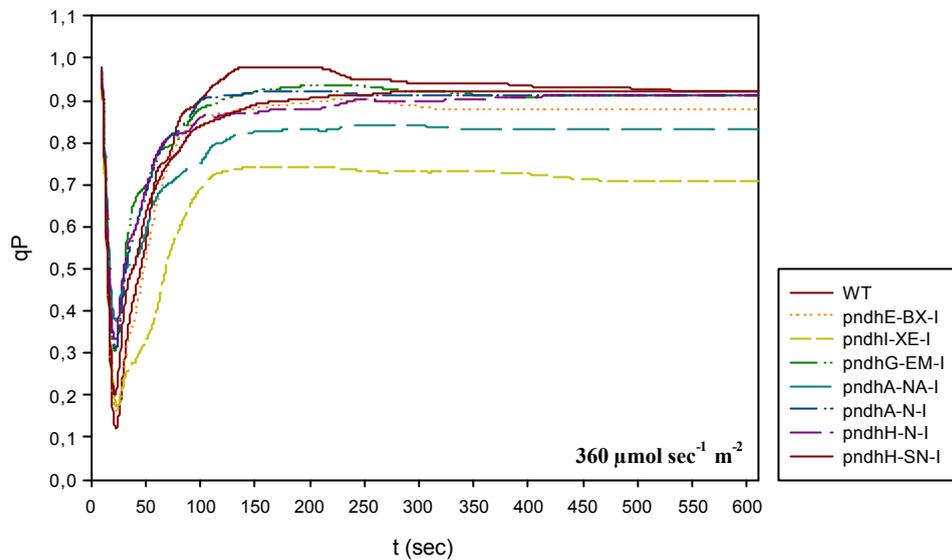


Abb. 43 A und B

C.



D.

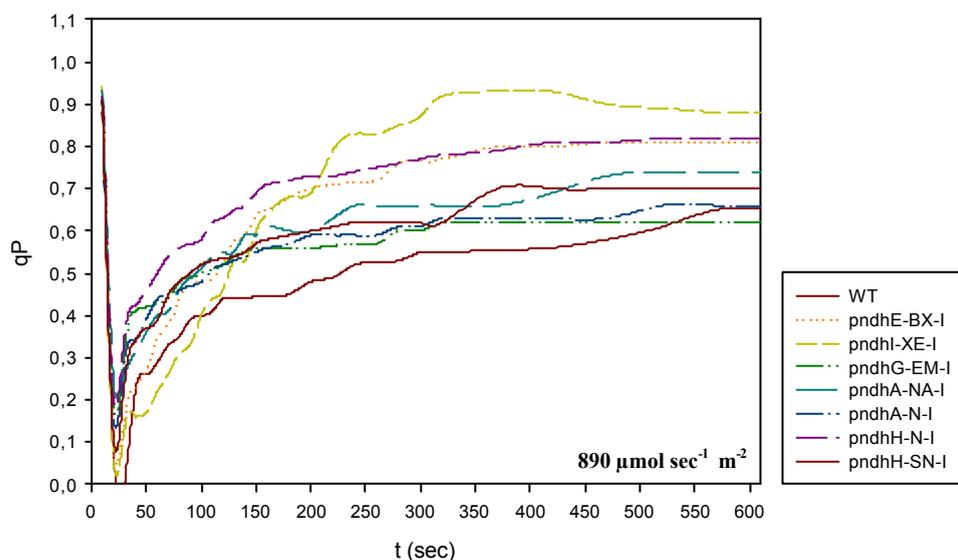


Abb. 43: Verlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Vergleicht man die Kurvenverläufe der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei den Transformanten der Serie B aus der Frühjahrsanzucht mit denen der Pflanzen der Serie A, zeigten sich keine deutlichen Unterschiede.

Die Abbildung 43 A zeigt, dass bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ die Kurven zu Beginn der Belichtung, außer bei den Transformanten *pndhE-BX-I* und *pndhI-XE-I*, nicht so weit abfielen wie der Wildtyp. Die Werte für die photochemische Fluoreszenzlöschung qP im Fließgleichgewicht lagen bei den Transformanten höher als beim Wildtyp. Die Mutante

pndhI-XE-I fiel bei dieser und bei allen folgenden Lichtintensitäten durch einen verlangsamten Kurvenabfall und -anstieg auf.

Bei einer Lichtintensität von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten die meisten Transformanten einen geringeren Kurvenabfall zu Beginn der Messung als der Wildtyp (Abb. 43 B). Nur die Transformante pndhI-XE-I erreichte das gleiche Minimum von 0,3. Im Fließgleichgewicht lagen alle Pflanzen im gleichen Wertebereich.

Bei $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ waren die Unterschiede im Kurvenabfall zwischen Transformanten und Wildtyp geringer (Abb. 43 C). Im Fließgleichgewicht lagen die qP-Werte der Transformanten pndhE-BX-I, pndhI-XE-I und pndhH-N-I unterhalb dem des Wildtyps, während die übrigen Mutanten im Bereich des Wildtyps lagen.

In Abbildung 43 D erkennt man, dass die Minimalwerte der Kurven sich erhöht haben. Danach stiegen die Kurven langsamer an als bei den Messungen mit den anderen Lichtintensitäten. Mit Ausnahme der Transformanten pndhH-SN-I, pndhG-EM-I und pndhA-N-I lagen die qP-Werte der Transformanten im Fließgleichgewicht höher als im Wildtyp.

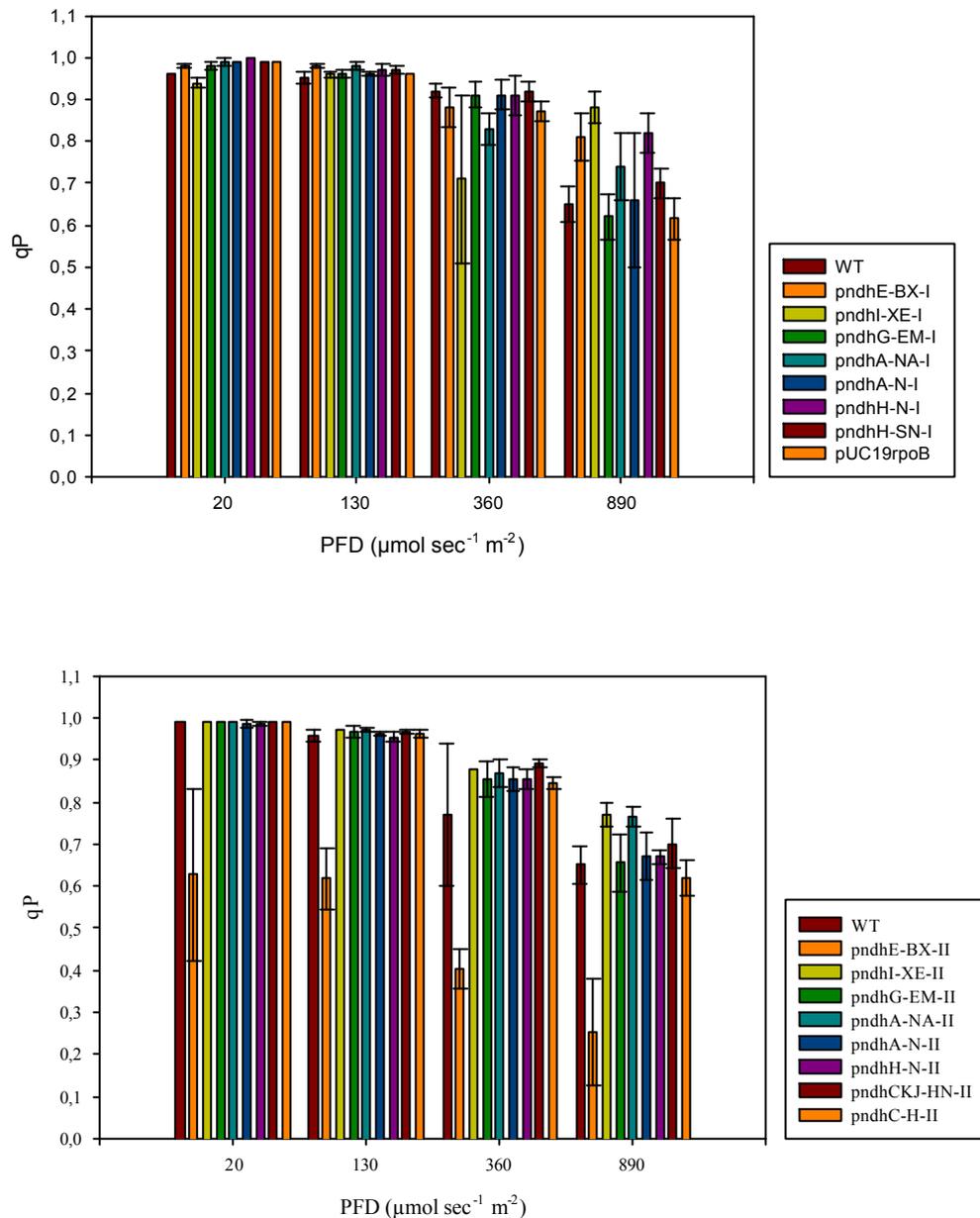


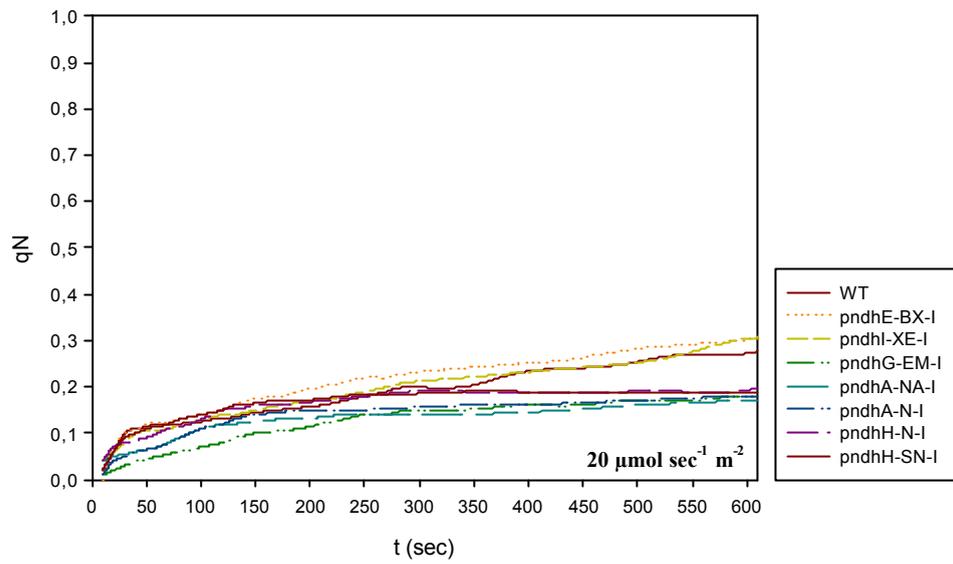
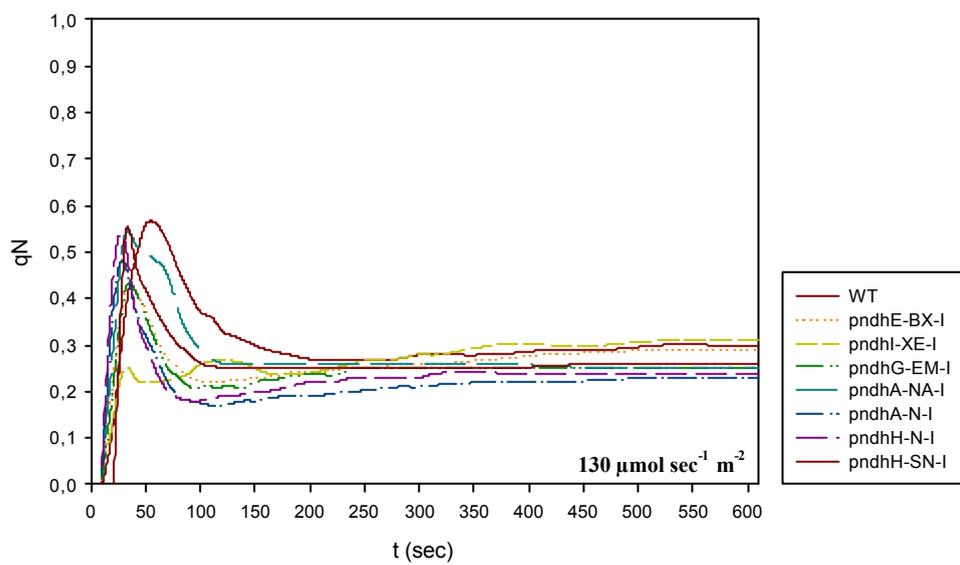
Abb. 44: Photosynthetische Fluoreszenzlöschung qP im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die qP -Werte für die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette in Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung inseriert ist, im Vergleich zum Wildtyp.

Im direkten Vergleich der Werte für die photochemische Fluoreszenzlöschung im Fließgleichgewicht erkannte man bei ansteigenden Lichtintensitäten einen Abfall der qP -Werte (Abb. 44). Die Transformanten der Serie B aus der Frühjahrsanzucht mit der in Leserichtung inserierten Resistenzkassette zeigten bei 20 und 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ nur sehr geringfügige Unterschiede zum Wildtyp. Die Mutante pndhI-XE-I zeigte bei 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ den stärksten Abfall des qP -Wertes. Bei der höchsten Lichtintensität von 890 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen die Werte für die photochemische Fluoreszenzlöschung bei der

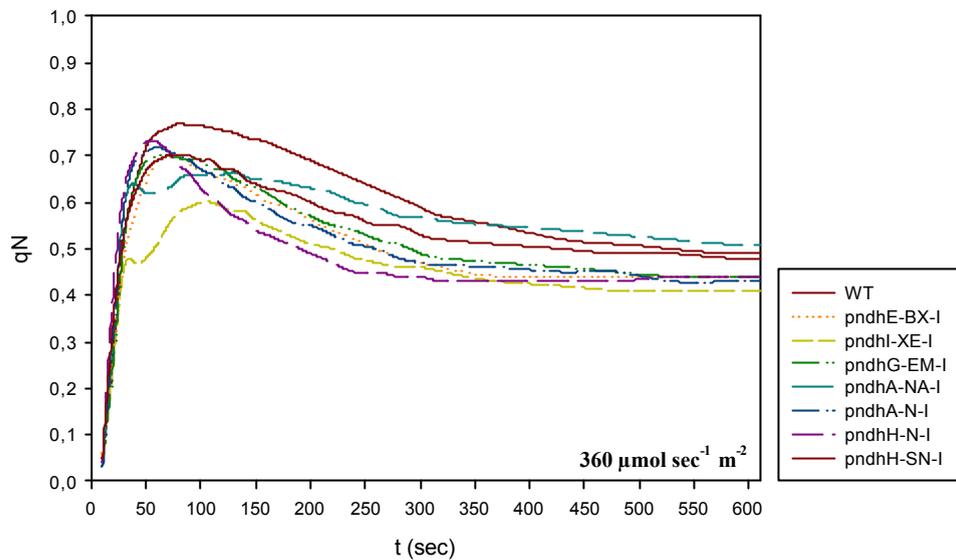
Transformanten pndhA-NA-I und pUC19rpoB im Größenbereich des Wildtyps. Die qP-Werte der übrigen Transformanten lagen über dem des Wildtyps.

Die Mutanten mit der Resistenzkassette gegen die Leserichtung zeigten bei allen Lichtintensitäten ein ähnliches Verhalten wie die bereits beschriebenen Transformanten. Einzig die hell gefärbte Mutante pndhE-BX-II zeigte eine sehr deutliche Abnahme der photochemischen Fluoreszenzlöschung bei allen gemessenen Lichtintensitäten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei gemäßigten Bedingungen in der Frühjahrsanzucht die Transformanten eine höhere photochemische Fluoreszenzlöschung zeigten als der Wildtyp. D.h. unter den Anzuchtbedingungen war die Elektronentransportkette in den Transformanten stärker aktiviert, bzw. wurde der Primärakzeptor Q_A schneller reoxidiert, als im Wildtyp.

A.**B.****Abb. 45 A und B**

C.



D.

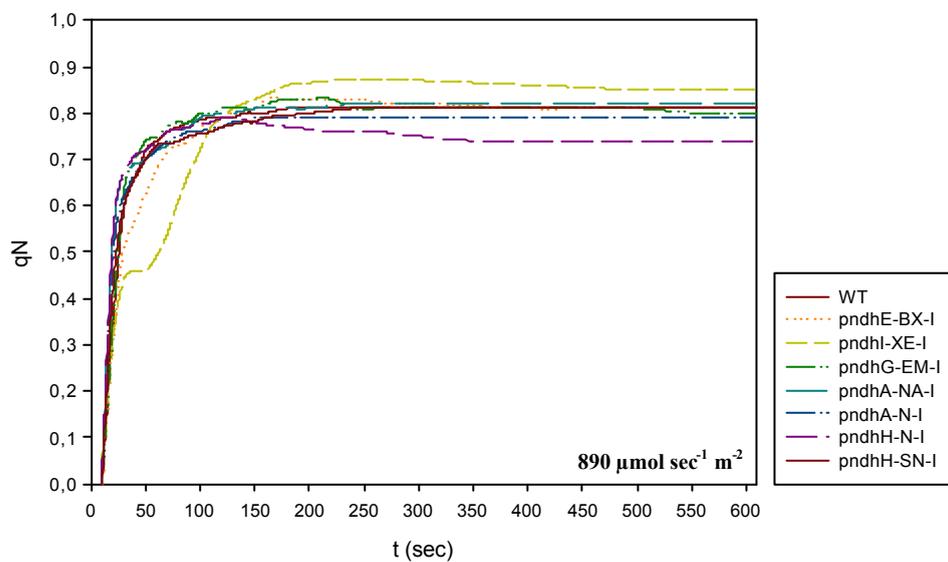


Abb. 45: Verlauf der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_N bei Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Ebenso wie die Kurvenverläufe der photochemischen Fluoreszenzlöschung unterschieden sich die Kurvenverläufe der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung bei Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht nicht wesentlich von denen der Pflanzen der Serie A aus der vergleichbaren Anzucht (Abb. 41).

Die Transformanten zeigten in Abbildung 45 bei allen gemessenen Lichtintensitäten einen dem Wildtyp vergleichbaren Kurvenverlauf. Nur die Transformante *pndhI-XE-I* erreichte nicht die Maxima der anderen Transformanten und der Kurvenabfall nach dem Maximum war flacher.

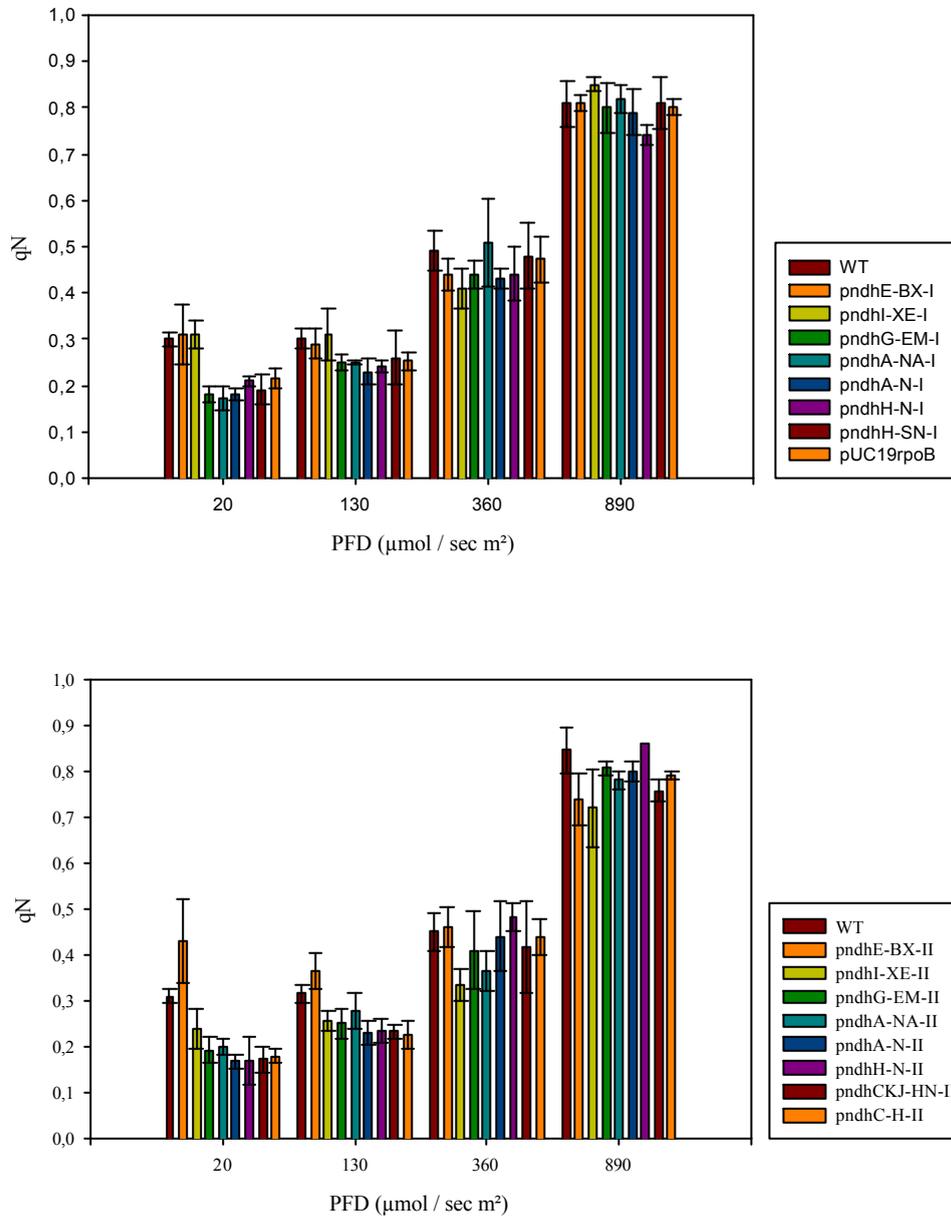


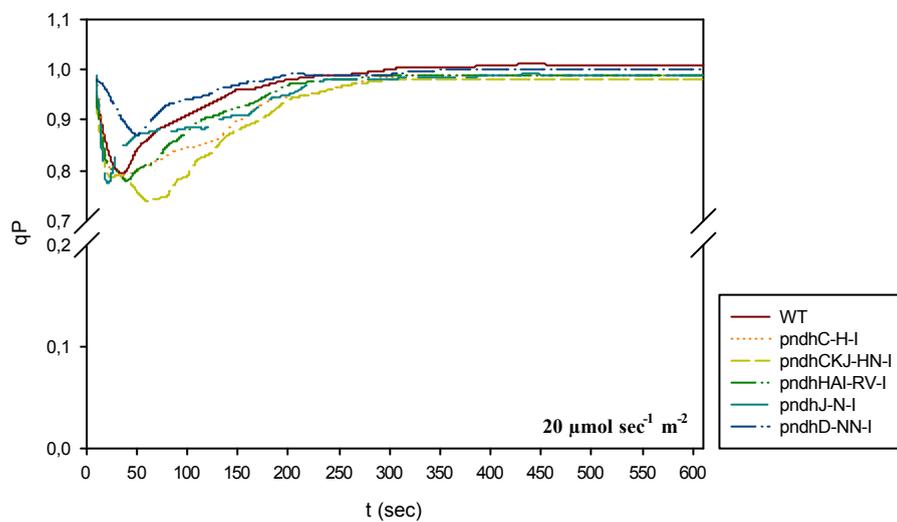
Abb. 46: Energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die q_N -Werte für die NDH-Mutanten mit der Resistenzkassette in Leserichtung, im Vergleich zum Wildtyp. Das untere Diagramm zeigt die NDH-Mutanten(,) mit der Resistenzkassette gegen die Leserichtung im Vergleich zum Wildtyp.

Bei einem direkten Vergleich der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_N für die Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht bei verschiedenen Lichtintensitäten erkennt man, dass die Werte erst ab einer Lichtintensität von $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ anstiegen (Abb. 46). Bei Lichtintensitäten von $20, 130$ und $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen die q_N -Werte der

Mutanten mit der Resistenzkassette in Leserichtung, bis auf die Mutanten *pndhE-BX-I*, *pndhA-N-I* und *pndhH-SN-I*, unterhalb des Wildtyps. Bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen die Werte für q_N der Transformanten unterhalb des Größenbereiches des Wildtyps. Alle Transformanten mit der Resistenzkassette gegen die Leserichtung wiesen im Mittel eine geringere energieabhängige Fluoreszenzlöschung auf als der Wildtyp. Die Ausnahme bildete auch hier die heller gefärbte Mutante *pndhE-BX-II*, die vor allem bei den geringeren Lichtintensitäten von 20 und $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ einen deutlich höheren q_N -Wert zeigte, als die übrigen Pflanzen.

II. Fluoreszenzlöschung q_P und q_N für Pflanzen aus der Sommeranzucht

A.



B.

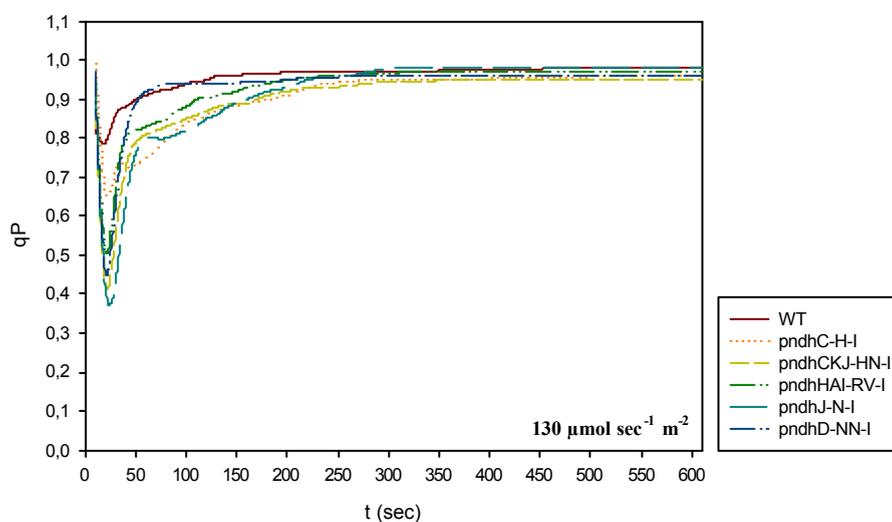
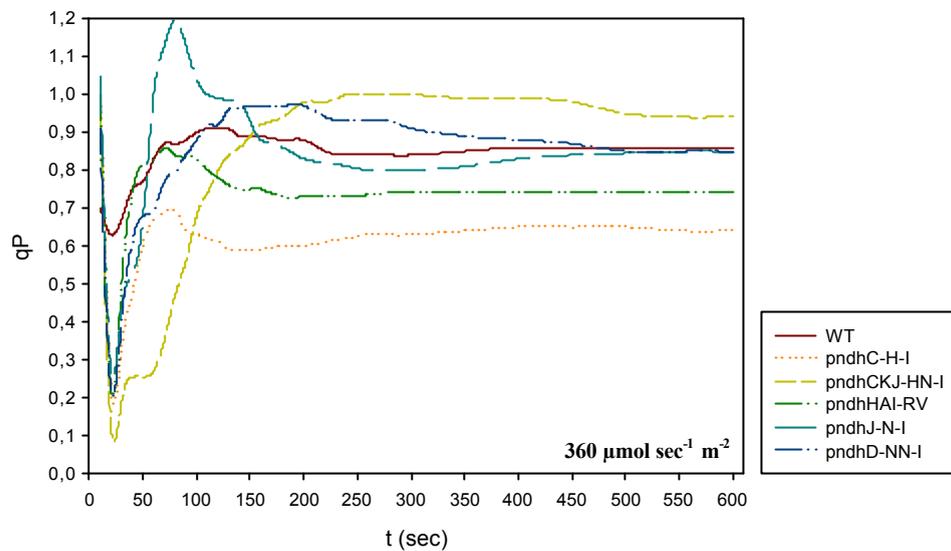


Abb. 47 A und B

C.



D.

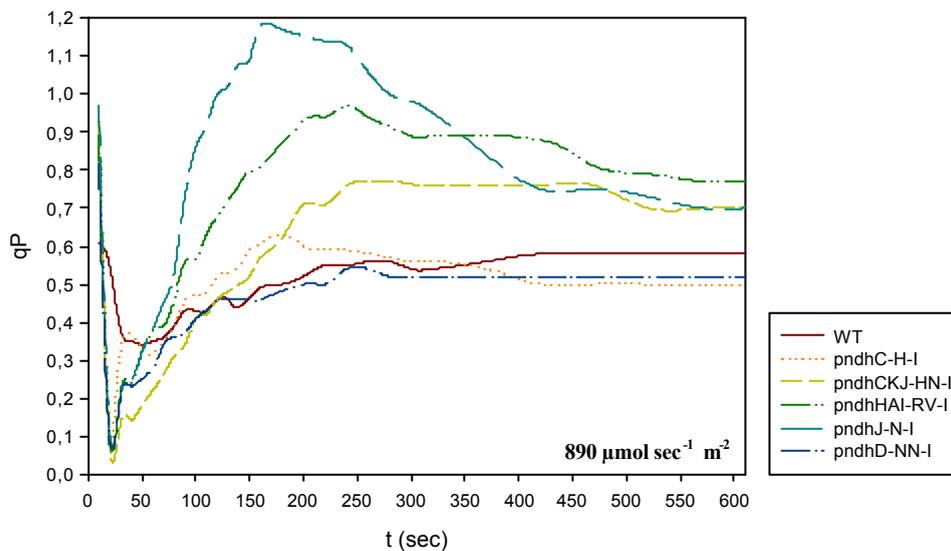


Abb. 47: Verlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschung qP bei Pflanzen der Serie A aus der Sommeranzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Die Pflanzen aus der Sommeranzucht zeigten für die photochemische Fluoreszenzlöschung qP bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zu Beginn der Messung einen Kurvenabfall (Abb. 47 A). Die Kurvenminima für die Mutanten *pndhD-NN-I* und *pndhCKJ-HN-I* wichen von den übrigen Transformanten und dem Wildtyp ab. Die Mutante *pndhD-NN-I* hatte ihr Kurvenminimum bei circa 0,88 und die Mutante *pndhCKJ-HN-I* bei circa 0,74. Die übrigen Transformanten erreichten ihren minimalen qP -Wert bei circa 0,8. Bezüglich ihrer qP -Werte im Fließgleichgewicht unterschieden sich der Wildtyp und die Transformanten kaum voneinander.

Bei $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigten die Mutanten zu Beginn der Messung einen deutlichen Kurvenabfall bis auf Werte von 0,37 bis 0,5, lediglich die Transformante pndhC-H-I erreichte nur einen Wert von 0,65 (Abb. 47 B). Der Kurvenabfall des Wildtyps war weniger deutlich und das Minimum lag bei 0,8. Die Kurvenabfälle der Transformanten und des Wildtyps erfolgten gleich schnell. Ebenso lagen die qP-Werte im Fließgleichgewicht im gleichen Größenbereich.

Bei den höheren Lichtintensitäten von 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ ergab sich für die Entwicklung der photochemische Fluoreszenzlöschung qP in den Transformanten ein uneinheitliches Bild (Abb. 47 C/D). Bei $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ fielen die Transformanten pndhJ-N-I und pndhCKJ-HN-I auf. Nach einem deutlichen, sehr schnellen Kurvenabfall zu Beginn der Messung zeigte die Mutante pndhJ-N-I einen schnellen und hohen Kurvenanstieg auf einen maximalen Wert von circa 1,2. Die Transformante pndhCKJ-HN-I zeigte nach dem Kurvenabfall einen deutlich verlangsamten Wiederanstieg bis auf ein konstantes Niveau. Der qP-Wert dieser Mutante im Fließgleichgewicht lag höher als der der übrigen Transformanten und des Wildtyps. Im Fließgleichgewicht erreichten die Transformanten pndhJ-N-I und pndhD-NN-I das gleiche Niveau wie der Wildtyp, während pndhHAI-RV-I und pndhC-H-I unterhalb des Wertes des Wildtyps blieben.

Bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abbildung 47 D) zeigten die Kurvenverläufe der Transformanten pndhJ-N-I und pndhHAI-RV-I nach dem Abfall zu Beginn der Belichtung einen schnellen Anstieg, während die anderen Transformanten und der Wildtyp langsamer anstiegen. Die Transformante pndhJ-N-I erreichte auch bei dieser Lichtintensität einen maximalen Wert von circa 1,2. Nach dem Erreichen des Maximums flachten die Kurven von pndhJ-N-I und pndhHAI-RV-I auf ein konstantes Niveau ab. Im Fließgleichgewicht war der qP-Wert der Transformanten pndhC-H-I und pndhD-NN-I kleiner als der des Wildtyps, während der Wert der Transformanten pndhCKJ-HN-I, pndhJ-N-I und pndhHAI-RV größer als der des Wildtyps war.

Im Vergleich zu der Frühjahrsanzucht war die photosynthetische Elektronentransportkette des Wildtyps in der Sommeranzucht auch bei höheren Lichtintensitäten aktiver, was sich in einer höheren photochemischen Fluoreszenzlöschung äußerte.

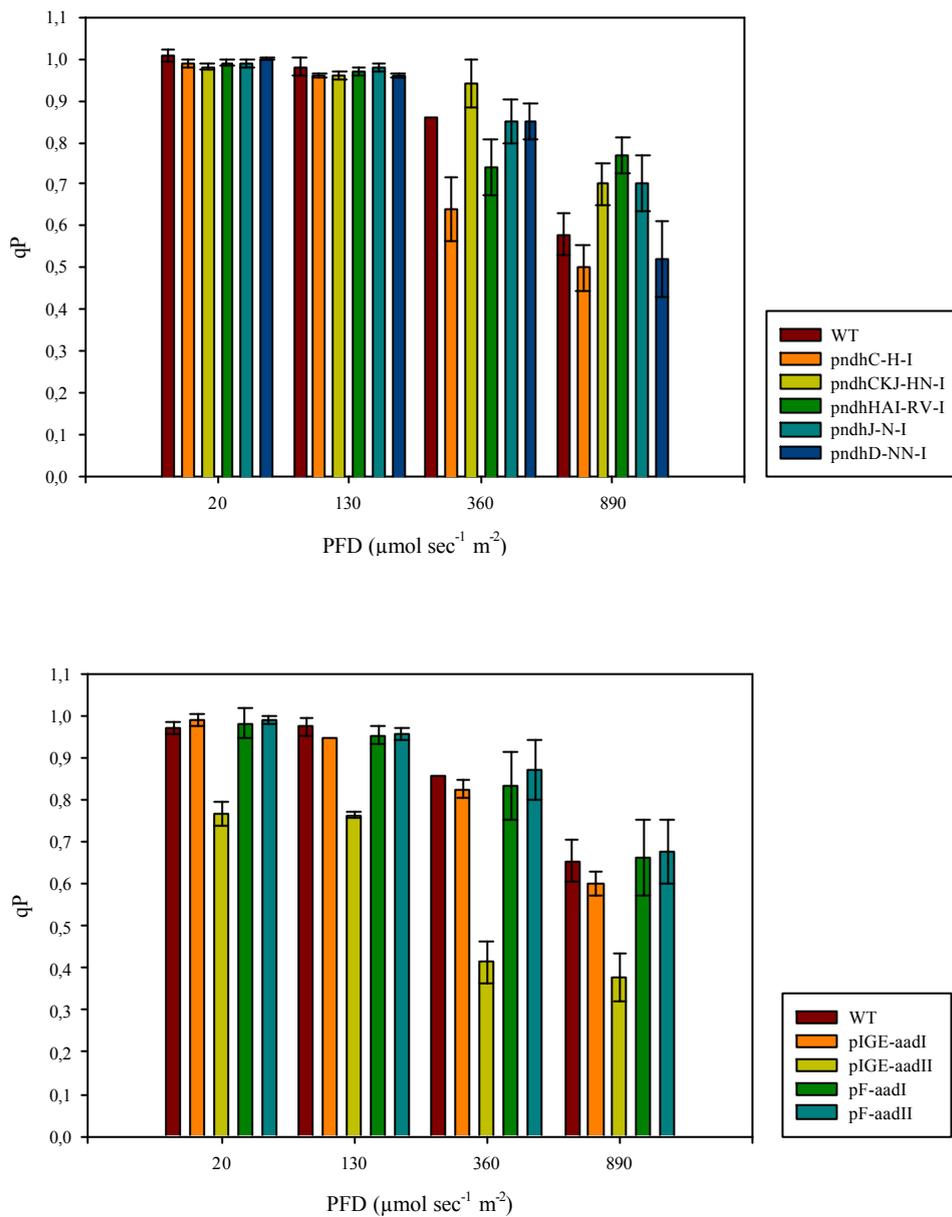
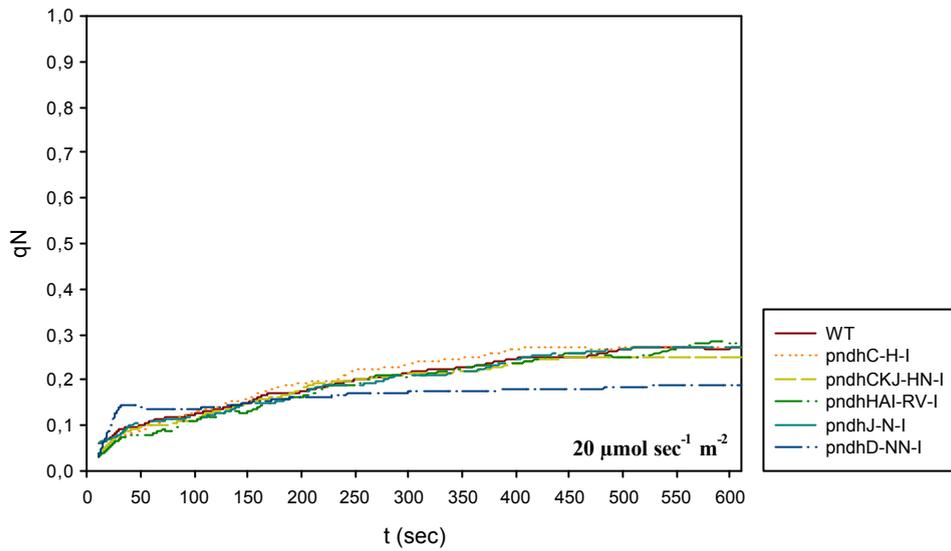


Abb. 48: Photosynthetische Fluoreszenzlöschung qP im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie A aus der Sommeranzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt qP für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp.

Beim Vergleich der photochemischen Fluoreszenzlöschung im photosynthetischen Fließgleichgewicht während der Sommeranzucht konnte man wiederum eine generelle Abnahme von qP bei zunehmender Lichtintensität erkennen (Abb. 48). Im Gegensatz zur Frühjahrsanzucht nahmen die Werte für qP beim Wildtyp nicht stärker ab als bei den Transformanten, sondern lagen bei den Lichtintensitäten von 130 und 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ im Mittel etwas über denen der Transformanten. Nur bei Schwachlicht von 20 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ waren die Werte etwas kleiner als bei den Transformanten.

Bei einem Vergleich der qP-Werte der Kontrollpflanzen mit denen des Wildtyps konnte man ein ähnliches Verhältnis der Werte zueinander beobachten. Die hell gefärbte Transformante pIGE-aadII fiel im Gegensatz zur Frühjahrsanzucht bei allen Lichtintensitäten durch ihre deutlich niedrigeren qP-Werte auf.

A.



B.

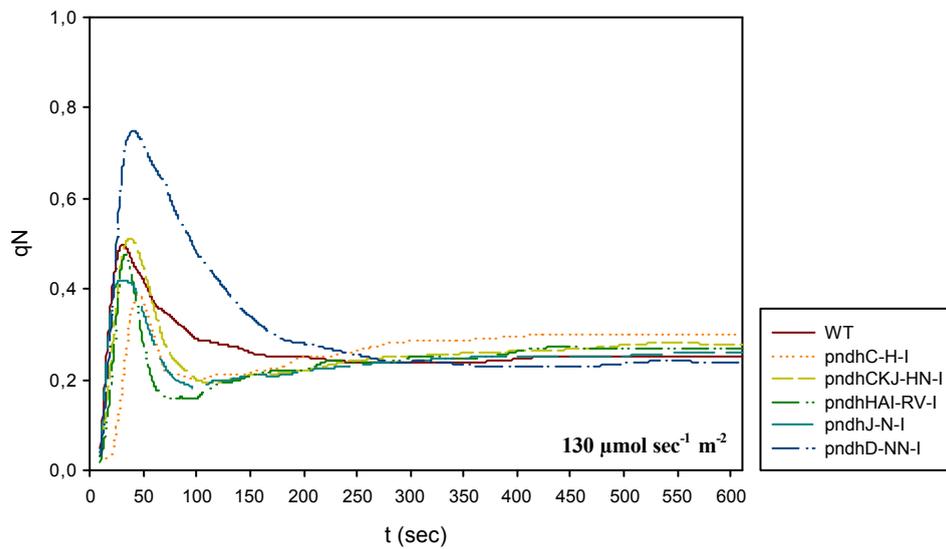
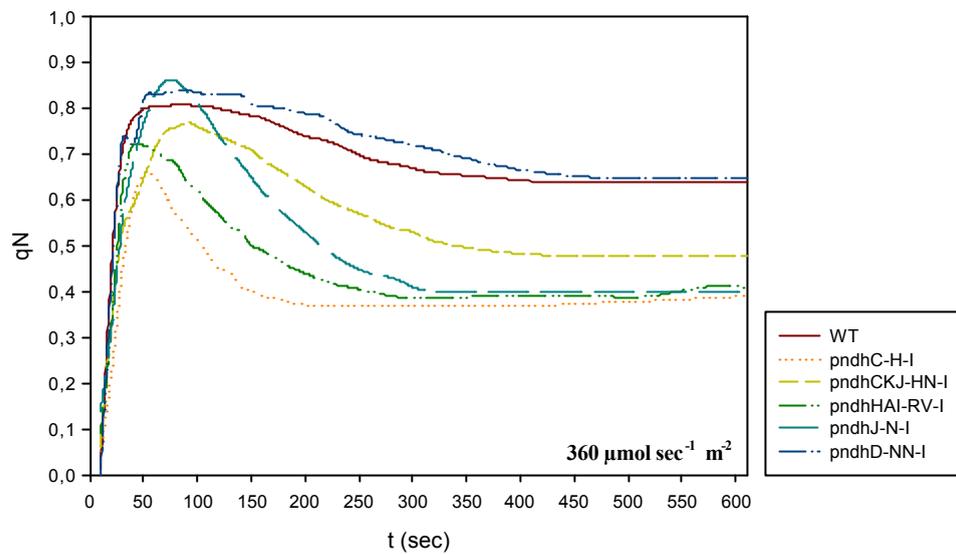


Abb. 49 A und B

C.



D.

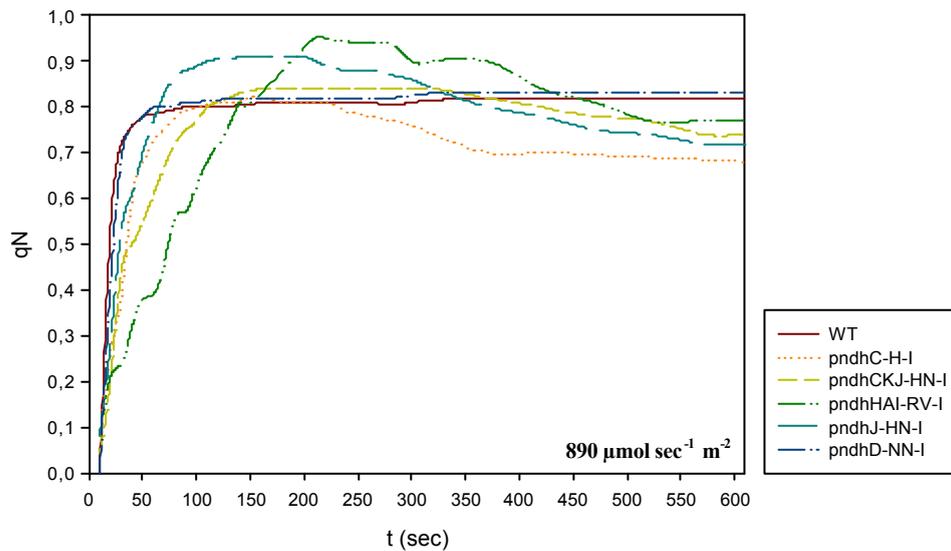


Abb. 49: Verlauf der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_N bei Pflanzen der Serie A aus der Sommeranzucht. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Löschungskurven bei einer Lichtintensität von (A) 20, (B) 130, (C) 360 und (D) 890 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Die energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N entwickelte sich bei 20 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ für Wildtyp und Transformanten gleich (Abb. 49 A). Die Pflanzen erreichten, ohne zum Beginn der Messung ein Maximum zu durchlaufen, einen niedrigen konstanten q_N -Wert. Lediglich die Mutante *pndhD-NN-I* zeigte zu Beginn einen kleinen Kurvenanstieg. Der q_N -Wert dieser Mutante war im Fließgleichgewicht kleiner als der der übrigen Pflanzen.

Bei einer Lichtintensität von $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ (Abbildung 49 B) zeigten alle Pflanzen den bereits oben beschriebenen Kurvenanstieg, dabei fiel die Mutante pndhD-NN-I mit einem besonders hohen Anstieg auf. Nach dem Kurvenabfall und dem Erreichen des konstanten Niveaus lagen alle Pflanzen im gleichen Größenbereich.

Bei höheren Lichtintensitäten zeigten auch die Kurven der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung, vor allem bei $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, ein sehr uneinheitliches Bild (Abb. 49 C/D). Bei $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ fielen die Löschungskurven der Transformanten pndhC-H-I, pndhCKJ-HN-I, pndhHAI-RV-I und pndhJ-N-I im Vergleich zum Wildtyp schneller ab (Abb. 49 C). Die qN-Werte der konstanten Phase dieser Transformanten lagen deutlich unter dem des Wildtyps. Die Mutante pndhD-NN-I wies einen dem Wildtyp ähnlichen Kurvenverlauf auf. Auch bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigte diese Mutante in ihrem Kurvenverlauf den geringsten Unterschied zum Wildtyp (Abb. 49 D). Die übrigen Transformanten wiesen bei der höchsten gemessenen Lichtintensität einen verlangsamten Kurvenanstieg auf. Nach dem Erreichen des Maximums flachten die Kurven langsam ab und erreichten ein konstantes Niveau, das unterhalb dem des Wildtyps lag.

Bei einem Vergleich der verschiedenen Lichtintensitäten ließ sich feststellen, dass bei allen Transformanten die Thylakoidmembran im gleichen Maße wie im Wildtyp energetisiert wurde. Erst bei höheren Lichtintensitäten nahm die Energetisierung in den Transformanten stärker ab als im Wildtyp.

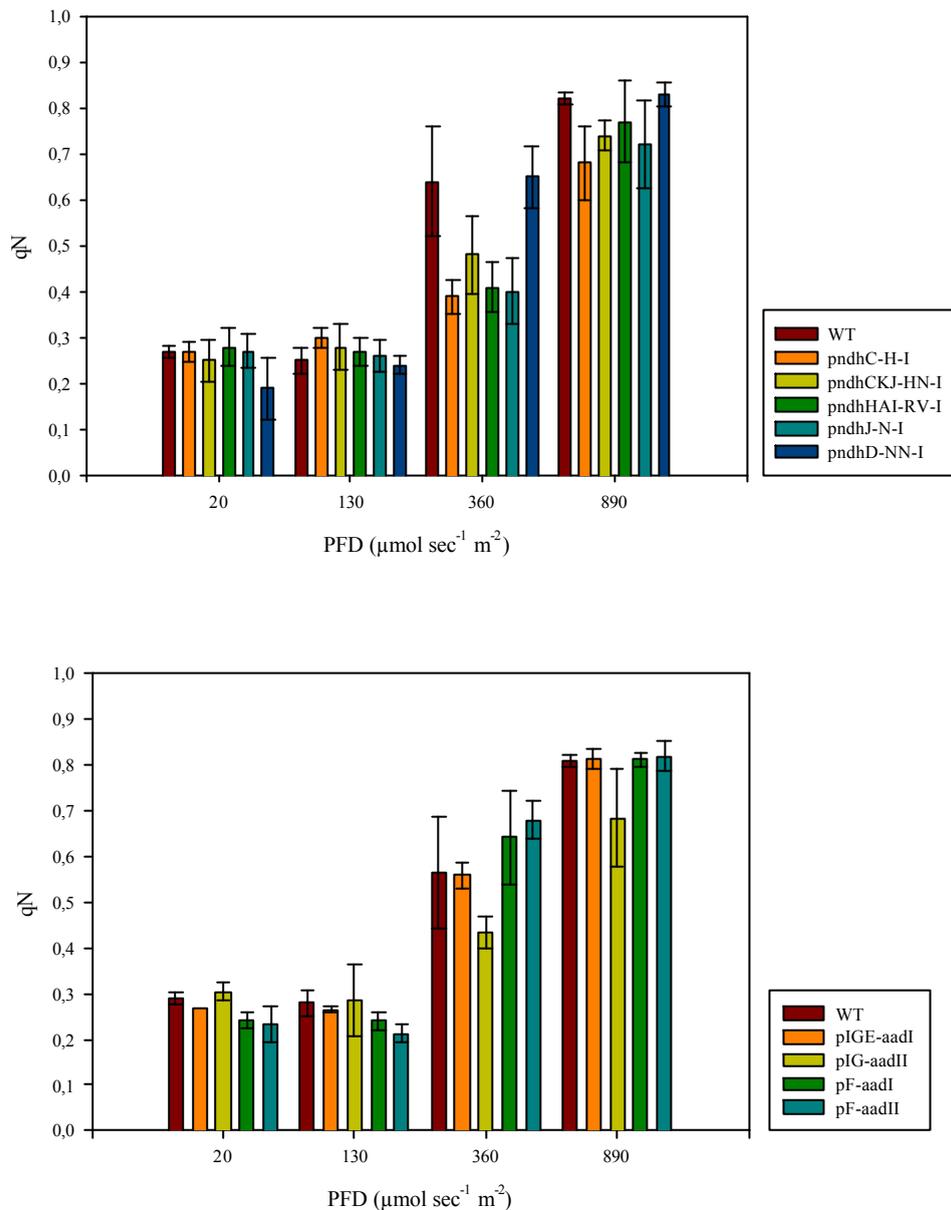


Abb. 50: Energieabhängige Fluoreszenzlöschung q_N im photosynthetischen Fließgleichgewicht von Pflanzen der Serie A aus der Sommeranzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt die Fluoreszenzlöschung q_N für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp.

Die Abbildung 50 zeigt, dass sich die Transformanten der Serie A in der Sommeranzucht bei den Lichtintensitäten von 20 und 130 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ nicht vom Wildtyp unterschieden. Erst bei der höheren Lichtintensität von 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigte der Wildtyp im Mittel eine leicht erhöhte energieabhängige Fluoreszenzlöschung gegenüber den Transformanten. Im Vergleich zu der Frühjahrsanzucht (Abb. 42) stieg der Wert für q_N erst bei 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ an. Bei einem Vergleich der Kontrollpflanzen mit dem Wildtyp waren bei niedrigen Lichtintensitäten keine eindeutigen Unterschiede festzustellen. Nur die hell pigmentierte Transformante pIGE-aadII zeigte bei höheren Lichtintensitäten einen deutlichen Abfall des q_N -Wertes gegenüber dem Wildtyp. Bei 360 $\mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ zeigte die Transformante

pIGE-aadI eine dem Wildtyp vergleichbare Fluoreszenzlöschung, während die Transformanten pF-aadI und -II höhere q_N -Werte im Fließgleichgewicht zeigten. Bei der höchsten gemessenen Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ verhielten sich die Kontrollen wie der Wildtyp.

Zusammenfassend konnten bei der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden. Meistens jedoch lag der q_N -Wert des Wildtyp bei den niedrigeren Lichtintensitäten über dem der Transformanten, und erst bei höheren Lichtintensitäten wurden die Unterschiede geringer. D.h., dass bei niedrigeren Lichtintensitäten der Wildtyp vermutlich eine höhere Energetisierung der Membran aufwies als die Transformanten. Die Transformanten benötigten laut der Messdaten höhere Lichtintensitäten, um den gleichen Energetisierungszustand der Thylakoidmembran zu erreichen wie der Wildtyp.

6. Redox-Kinetiken des Photosystems I

6.1 Redoxzustand des Photosystems I

Als mögliche Funktion des NDH-Komplexes wird eine Beteiligung am zyklischen Elektronentransport um das Photosystem I diskutiert. Da die Chlorophyllfluoreszenz des Photosystems I zu gering ist, um gemessen zu werden, wurde der Redoxzustand des Photosystems I bestimmt. Gemessen wurde die Absorptionsänderung des P700 bei einer Wellenlänge von 830 nm (II.2.8.), mittels derer sich der Reduktionsgrad des Photosystems I bestimmen ließ.

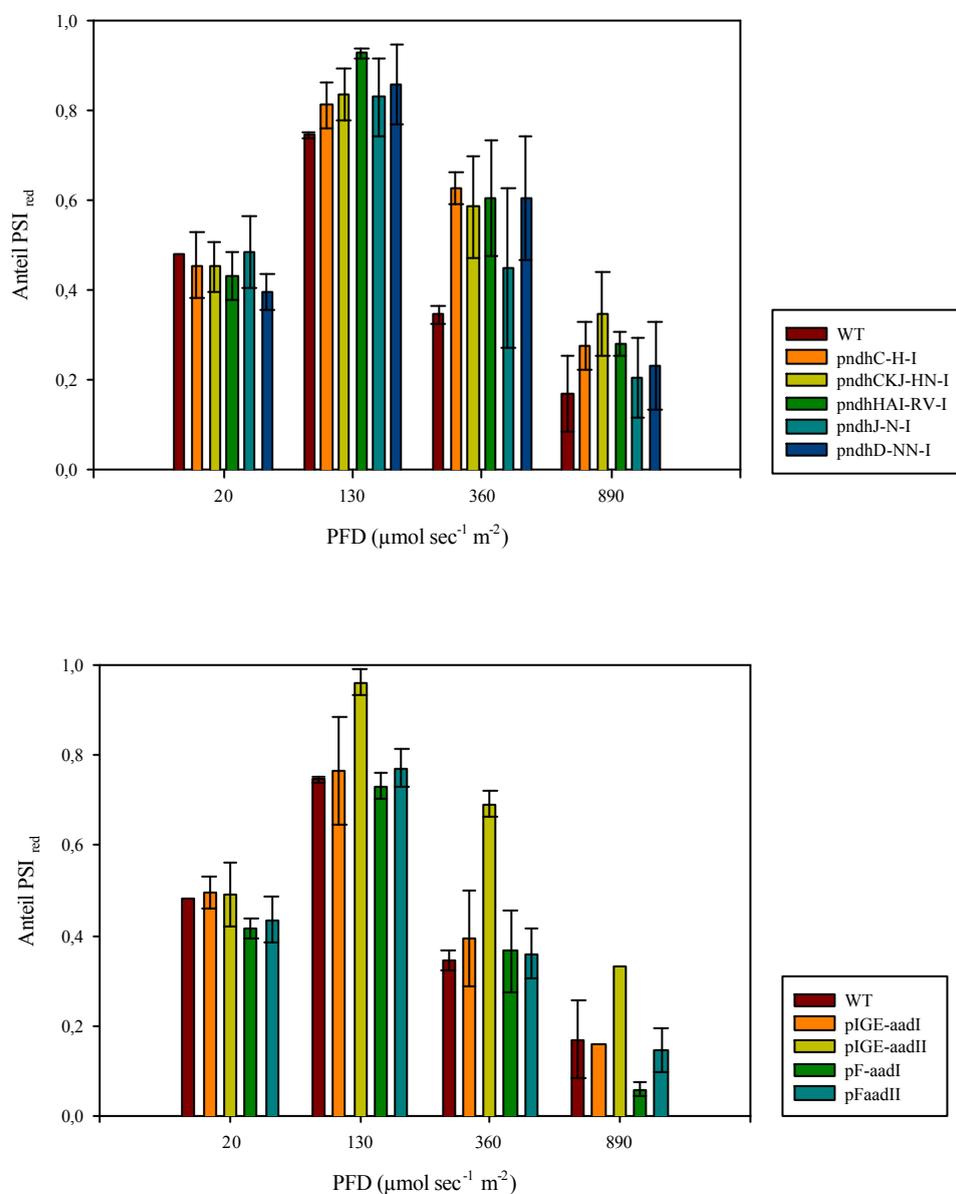


Abb. 51: Anteil an reduziertem Photosystem I von Pflanzen aus der Frühjahrsanzucht der Serie A im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt den Anteil an reduziertem Photosystem I für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp. Für die Aufnahme der Redox-Kinetiken wurden die gleichen Lichtintensitäten verwendet wie in den Chlorophyllfluoreszenzmessungen.

Vergleicht man in Abbildung 51 den Anteil des reduzierten Photosystems I der Pflanzen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht mit dem Wildtyp, so erkennt man, dass das Photosystem I bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ in den Transformanten im Mittel weniger stark reduziert vorlag als im Wildtyp. Bei ansteigenden Lichtintensitäten nahm der Anteil an reduziertem Photosystem I in den Mutanten zu und übertraf den Wildtyp deutlich um bis zu 40%, je nach Lichtintensität und Mutante. Die Mutante *pndhJ-N-I* zeigte bei den Lichtintensitäten über $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ den geringsten Unterschied zum Wildtyp. Die Kontrollpflanzen unterschieden sich bis auf die beiden Ausnahmen *pIGE-aadII* und *pF-aadI* nicht deutlich vom Wildtyp. In der heller gefärbten Transformante *pIGE-aadII* lag das Photosystem I bei den höheren Lichtintensitäten deutlich stärker reduziert vor als der Wildtyp, während das Photosystem I in der Transformante *pF-aadI* bei den Lichtintensitäten von 20 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ stärker oxidiert vorlag als im Wildtyp.

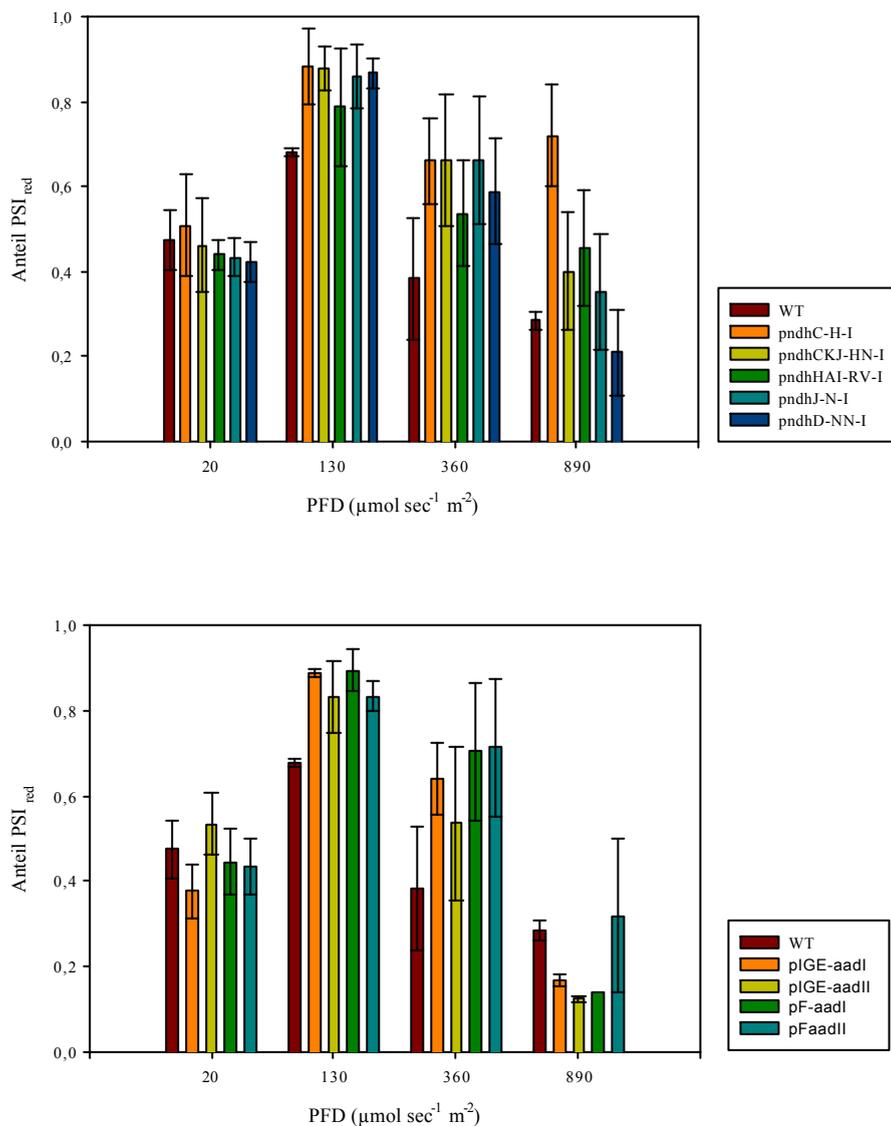


Abb. 52: Anteil an reduziertem Photosystem I von Pflanzen der Serie A aus der Sommeranzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt den Anteil an reduziertem Photosystem I für die NDH-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und das untere die Kontrollen im Vergleich zum Wildtyp. Für die Aufnahme der Redox-Kinetiken wurden die gleichen Lichtintensitäten verwendet wie in den Chlorophyllfluoreszenzmessungen.

Bei der Sommeranzucht der Pflanzen der Serie A erkennt man beim Vergleich mit dem Wildtyp, dass auch hier, außer bei Schwachlicht, das Photosystem I in den Transformanten stärker reduziert vorlag als im Wildtyp (Abb. 52). Bei einigen Mutanten, wie z.B. bei pndhC-H-I hatte sich der Anteil an reduziertem Photosystem I bei $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ von 81 % auf 89 % gegenüber der Frühjahrsanzucht erhöht. In anderen Mutanten, wie z.B. pndhCKJ-HN-I und pndhHAI-RV-I, lagen die Photosysteme I weniger stark reduziert, bzw. gleich stark reduziert vor. Den deutlichsten Unterschied zeigten die Mutanten pndhC-H-I und pndhD-NN-I bei der höchsten Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$. Lag das Photosystem I in der Transformante pndhC-H-I um circa 70 % stärker reduziert vor als im Wildtyp, so war es in der Transformante pndhD-NN-I um circa 10 % weniger reduziert als im Wildtyp. Bei der Sommeranzucht zeigte die Mutante pndhHAI-RV-I bei Lichtintensitäten von 130 und $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ den geringsten Unterschied zum Wildtyp.

Zeigten die Kontrollpflanzen in der Frühjahrsanzucht noch keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp, so lag ihr Photosystem I in der Sommeranzucht bei Lichtintensitäten von 130 und $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ deutlich stärker reduziert vor als im Wildtyp. Bei Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lag das Photosystem I in den Mutanten, außer in der heller gefärbten Transformante pIGE-aadII, schwächer reduziert vor als im Wildtyp. In der Transformante pIGE-aadII war der Anteil an reduziertem Photosystem I um circa 10 % höher als im Wildtyp. Das Photosystem I der Transformante pF-aadII war bei Starklicht von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ im Mittel etwas stärker reduziert als der Wildtyp, während die übrigen Mutanten im Photosystem I deutlich schwächer reduziert vorlagen.

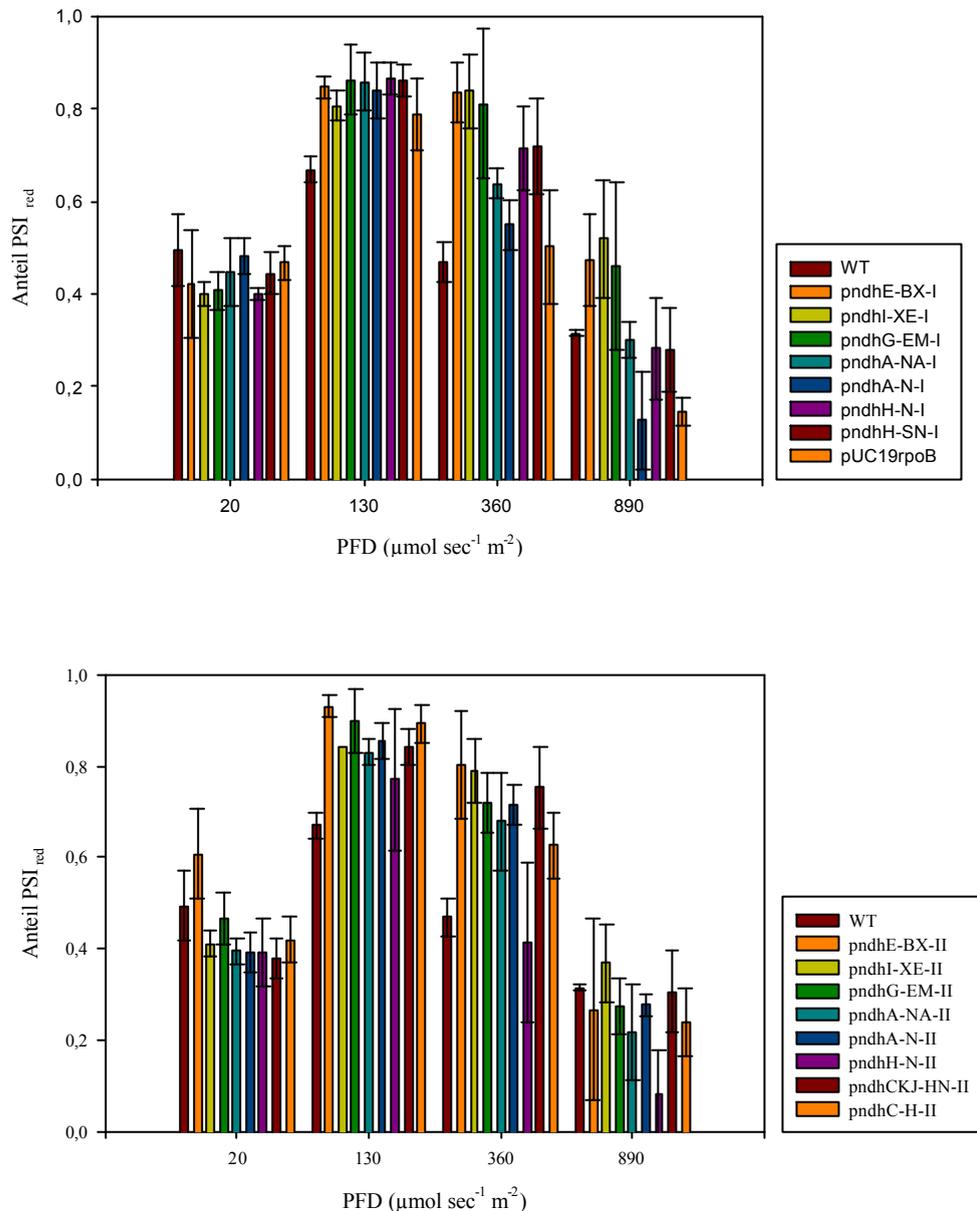


Abb. 53: Anteil an reduziertem Photosystem I von Pflanzen der Serie B aus der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus. Das obere Diagramm zeigt den Anteil an reduziertem Photosystem I für die NDH-Mutanten mit der Insertion der Resistenzkassette in Leserichtung im Vergleich zum Wildtyp und das untere Diagramm für die NDH-Mutanten mit der Resistenzkassette gegen die Leserichtung. Für die Aufnahme der Redox-Kinetiken wurden die gleichen Lichtintensitäten verwendet wie in den Chlorophyllfluoreszenzmessungen.

In der Frühjahrsanzucht der Serie B sind im Reduktionsgrad des Photosystems I deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Mutanten und dem Wildtyp zu erkennen (Abb. 53). Bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ war das Photosystem I der Mutanten mit der Resistenzkassette in Leserichtung geringer reduziert als der Wildtyp, während bei $130 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ die Photosysteme I aller Mutanten stärker reduziert vorlagen als der Wildtyp. Bei 360 und $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ traten deutliche Unterschiede auch unterhalb der Mutanten auf. Bei beiden Lichtintensitäten war der Anteil an reduziertem Photosystem I in den Transformanten pndhE-BX-I, pndhI-XE-I und pndhG-EM-I deutlich höher als im Wildtyp. Bei den Mutanten, in denen die Untereinheiten NDH-A und NDH-H betroffen sind, sowie in der Kontrollpflanze

pUC19rpoB, war der Anteil an reduziertem Photosystem I bei $360 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ höher, aber bei $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ deutlich geringer als im Wildtyp.

Bei den Transformanten mit der Resistenzkassette gegen die Leserichtung zeigte sich ein ganz ähnliches Bild. Lediglich die hell gefärbte Mutante pndhE-BX-II zeigte bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ eine stärkere Reduktion des Photosystems I als der Wildtyp. Bei allen Lichtintensitäten, außer bei $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$, zeigte die Transformante pndhH-N-II im Vergleich zum Wildtyp und anderen Mutanten den geringsten Anteil an reduziertem Photosystem I. Bei einer Lichtintensität von $890 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ lagen die Transformanten bis auf pndhI-XE-II stärker oxidiert vor als der Wildtyp.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass bei Lichtintensitäten über dem Schwachlicht von $20 \mu\text{mol sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ das Photosystem I der Transformanten, bis auf einige Ausnahmen, stärker reduziert vorlag als im Wildtyp. Diese Beobachtung wurde für alle Anzuchtbedingungen gemacht. Die stärkere Reduktion des Photosystems I in den Transformanten kann ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Elektronentransports im, bzw. nach dem Photosystem I sein, wie sie z.B. bei einer Schädigung des zyklischen Elektronentransports zu erwarten wäre.

6.2. Rereduktion des Photosystems I

Um die Auswirkung der Mutagenese der NDH-Untereinheiten auf den zyklischen Elektronentransport zu untersuchen, wurde nach Abschalten des Fernrotlichtes die Halbwertszeit bis zum Erreichen des reduzierten Zustands des Photosystems I ermittelt.

Tab. 14: Übersicht über die Halbwertszeit der Rereduktion von PSI nach Abschalten des Fernrotlichtes. Angegeben ist die Halbwertszeit der Rereduktion in Sekunden. In Klammern ist die Standardabweichung aufgeführt. Es wurden von jeder Linie mindestens 4 Pflanzen gemessen.

<u>Serie A</u>	Frühjahr	Sommer		<u>Serie B</u>	Frühjahr
	$t_{1/2}$ (sec)	$t_{1/2}$ (sec)			$t_{1/2}$ (sec)
WT	1,5 (0,2)	1,5 (0,6)		WT	1,8 (0,3)
pndhC-H-I	2,9 (1,2)	3,5 (1,3)		pndhE-BX-I	2,5 (0,1)
pndhCKJ-HN-I	2,1 (0,6)	3,1 (1,2)		pndhE-BX-II	3,4 (0,9)
pndhHAI-RV-I	3,2 (0,8)	4,1 (2,2)		pndhI-XE-I	3,8 (0,5)
pndhJ-N-I	3,8 (2,0)	3,5 (1,4)		pndhI-XE-II	5,4 (0,8)
pndhD-NN-I	3,1 (0,3)	4,7 (1,7)		pndhG-EM-I	3,2 (0,4)
pIGE-aadI	1,9 (0,7)	2,4 (2,4)		pndhG-EM-II	3,8 (0,8)
pIGE-aadII	1,8 (0,6)	3,3 (3,3)		pndhA-NA-I	3,6 (0,9)
pF-aadI	1,8 (0,9)	3,6 (2,0)		pndhA-NA-II	3,5 (0,4)
pF-aadII	2,0 (0,9)	2,4 (1,2)		pndhA-N-I	4,3 (1,6)
				pndhA-N-II	4,0 (0,7)
				pndhH-N-I	3,4 (0,5)
				pndhH-N-II	2,2 (0,4)
				pndhH-SN-I	4,2 (0,6)
				pndhCKJ-HN-II	3,4 (0,6)
				pndhC-H-II	3,8 (0,3)
				pUC19rpoB	3,5 (0,9)

Wie man in Tabelle 14 erkennt, war die Halbwertszeit bei allen Transformanten, sowohl aus der Serie A als auch aus der Serie B, deutlich höher als bei dem Wildtyp. Die Halbwertszeiten für die Kontrollen der Serie A aus der Frühjahrsanzucht lagen dabei nur geringfügig über der Halbwertszeit des Wildtyps, während sie in der Sommeranzucht deutlich höher lagen.

Die Halbwertszeit für die Reduktion des Photosystems I der Kontrollpflanze pUC19rpoB der Serie B lag im Bereich der übrigen Transformanten.

Der höhere Reduktionszustand des Photosystems I in den Transformanten, sowie die längere Halbwertszeit bei der Rereduktion zeigen, dass die Mutagenese des NDH-Komplexes Auswirkungen auf den photosynthetischen Elektronentransport im Bereich des Photosystem I hat.

7. Analyse der Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung der NDH-Mutanten

Die Carotinoidzusammensetzung, speziell die Carotinoide des Xanthophyll-Zyklus, spielen eine wichtige Rolle bei dem Schutz der Photosysteme, insbesondere des Photosystems II. Die Carotinoide tragen über Wärmedissipation und ihren Anteil an den Lichtsammelkomplexen (LHC: light harvesting complex) auch zur energieabhängigen Fluoreszenzlöschung bei. Da bei der Analyse der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung und des photosynthetischen Elektronentransportes Unterschiede zwischen Transformanten und Wildtyp festgestellt werden konnten, wurde die Pigmentzusammensetzung der Mutanten analysiert. Des Weiteren wurde das Chlorophyll a/Chlorophyll b- und das Carotinoid/Chlorophyll-Verhältnis bestimmt.

Die Pigmentanalyse über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ergab für Pflanzen der Serie A und Serie B die in Tabelle 15 A und 15 B dargestellten Werte.

Tab. 15: Pigmentzusammensetzung der Pflanzen der Serie A in pmol Carotinoid / μ mol Chlorophyll. In Klammern sind die jeweiligen Standardabweichungen aufgeführt. Für jede Linie wurden mindestens 5 Proben analysiert

A.

Serie A	Violaxanthin	Antheraxanthin	Zeaxanthin	Neoxanthin	Lutein
Wildtyp	60,0 (7,5)	3,8 (1,3)	1,3 (0,4)	46,9 (1,9)	161,1 (20,4)
pndhC-H-I	60,0 (8,5)	4,6 (3,2)	1,5 (0,9)	48,6 (2,2)	157,6 (16,5)
pndhCKJ-HN-I	63,7 (6,0)	5,2 (2,8)	1,9 (1,0)	47,4 (2,9)	154,1 (11,0)
pndhHAI-RV-I	66,0 (16,2)	4,1 (1,8)	1,5 (0,6)	47,6 (4,2)	160,4 (20,4)
pndhJ-N-I	64,0 (10,3)	3,0 (1,3)	0,9 (0,3)	45,0 (1,7)	161,6 (18,8)
pndhD-NN-I	63,0 (8,3)	4,2 (0,5)	0,6 (0,1)	45,5 (2,8)	170,3 (6,3)
pIGE-aadI	67,9 (9,6)	4,4 (1,1)	0,5 (0,1)	46,3 (0,9)	160,0 (16,2)
pIGE-aadII	66,0 (12,6)	43,7 (2,2)	10,4 (3,9)	48,3 (2,1)	143,8 (9,7)
pF-aadI	64,0 (7,4)	3,8 (1,2)	0,6 (0,1)	48,0 (2,4)	150,0 (12,0)
pF-aadII	61,2 (7,1)	2,9 (0,9)	0,6 (0,1)	47,9 (1,9)	161,2 (6,6)

B. (Fortsetzung Tabelle 15)

Serie B	Violaxanthin	Antheraxanthin	Zeaxanthin	Neoxanthin	Lutein
Wildtyp	58,9 (6,5)	0,7 (0,4)	0,2 (0,1)	46,7 (2,2)	140,3 (5,1)
pndhE-BX-I	66,2 (4,0)	1,4 (0,7)	0 (0)	46,5 (4,1)	171,9 (6,2)
pndhI-XE-I	62,4 (4,7)	0,9 (0,4)	0 (0)	45,4 (1,6)	154,6 (3,2)
pndhG-EM-I	61,3 (2,4)	0,6 (0,1)	0 (0)	41,9 (3,3)	170,8 (4,6)
pndhA-NA-I	62,6 (4,0)	1,1 (0,3)	0 (0)	40,5 (4,0)	175,6 (7,1)
pndhA-N-I	67,8 (6,1)	0,8 (0,2)	0 (0)	47,3 (1,4)	176,5 (7,7)
pndhH-N-I	63,5 (2,7)	1,0 (0,2)	0 (0)	47,5 (1,6)	173,4 (11,8)
pndhH-SN-I	67,2 (7,8)	1,6 (0,7)	0 (0)	46,9 (1,5)	181,8 (4,8)
pndhE-BX-II	50,4 (12,7)	33,0 (12,2)	23,6 (11,0)	47,8 (9,2)	172,0 (6,2)
pndhI-XE-II	61,3 (6,6)	0,5 (0,1)	0 (0)	43,1 (5,4)	167,2 (10,4)
pndhG-EM-II	69,7 (3,6)	1,0 (0,3)	0 (0)	47,1 (5,2)	182,0 (71,1)
pndhA-NA-II	72,5 (9,2)	0,8 (0,1)	0 (0)	44,4 (5,5)	172,2 (6,0)
pndhA-N-II	70,0 (6,7)	0,8 (0,5)	0 (0)	43,9 (3,5)	186,7 (10,2)
pndhH-N-II	87,3 (16,0)	3,4 (0,9)	0 (0)	33,5 (5,4)	168,6 (14,2)
pndhCKJ-HN-II	64,8 (4,8)	0,9 (0,5)	0 (0)	48,0 (1,3)	184,8 (14,8)
pndhC-H-II	61,0 (3,6)	1,0 (0,2)	0 (0)	49,8 (3,8)	163,5 (19,5)
pUC19-rpoB	64,4 (4,3)	1,2 (0,4)	0,2 (0,1)	46,9 (1,4)	151,5 (8,9)

Die Carotinoidzusammensetzung der Mutanten zeigte mit Ausnahme der Mutanten pIGE-aadII, pndhE-BX-II und pndhH-N-II keine relevanten Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Die Transformante pIGE-aadII hatte einen erhöhten Gehalt an Anthera- und Zeaxanthin, während pndhE-BX-II neben einem erhöhten Anthera- und Zeaxanthingehalt einen geringeren Violaxanthingehalt aufwies. Die Mutante pndhH-N-II zeigte dagegen einen erhöhten Violaxanthingehalt.

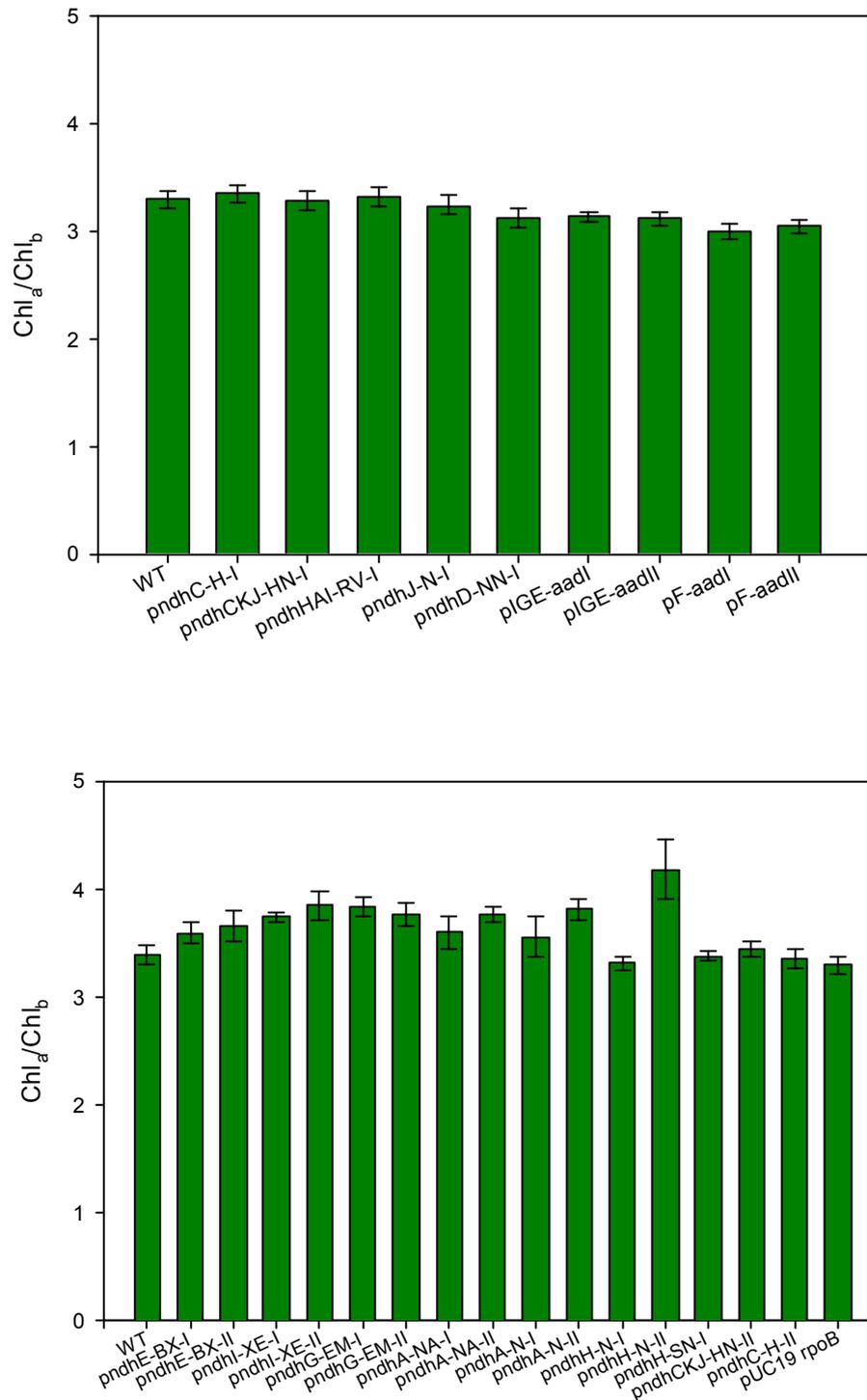


Abb. 54: Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnis. Das obere Diagramm zeigt die Mutanten der Serie A, das untere Diagramm die der Serie B. Für jede Transformantenlinie wurden mindestens 5 Proben analysiert.

Das Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnis der Mutanten der Serie A zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine deutlichen Unterschiede (Abb. 54). Das Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnis in der Serie B lag, außer in den Mutanten pndhH-N-I und pndhH-SN-I, pndhCKJ-HN-II, pndhC-H-II und pUC19rpoB, im Mittel etwas höher als im Wildtyp.

Von den beiden heller gefärbten Mutanten *pndhE-BX-II* und *pndhH-N-II* zeigte nur zweitere einen deutlichen Anstieg im Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnis. Der erhöhte Anteil an Chlorophyll a lässt auf eine Verkleinerung der Lichtsammelkomplexe schließen.

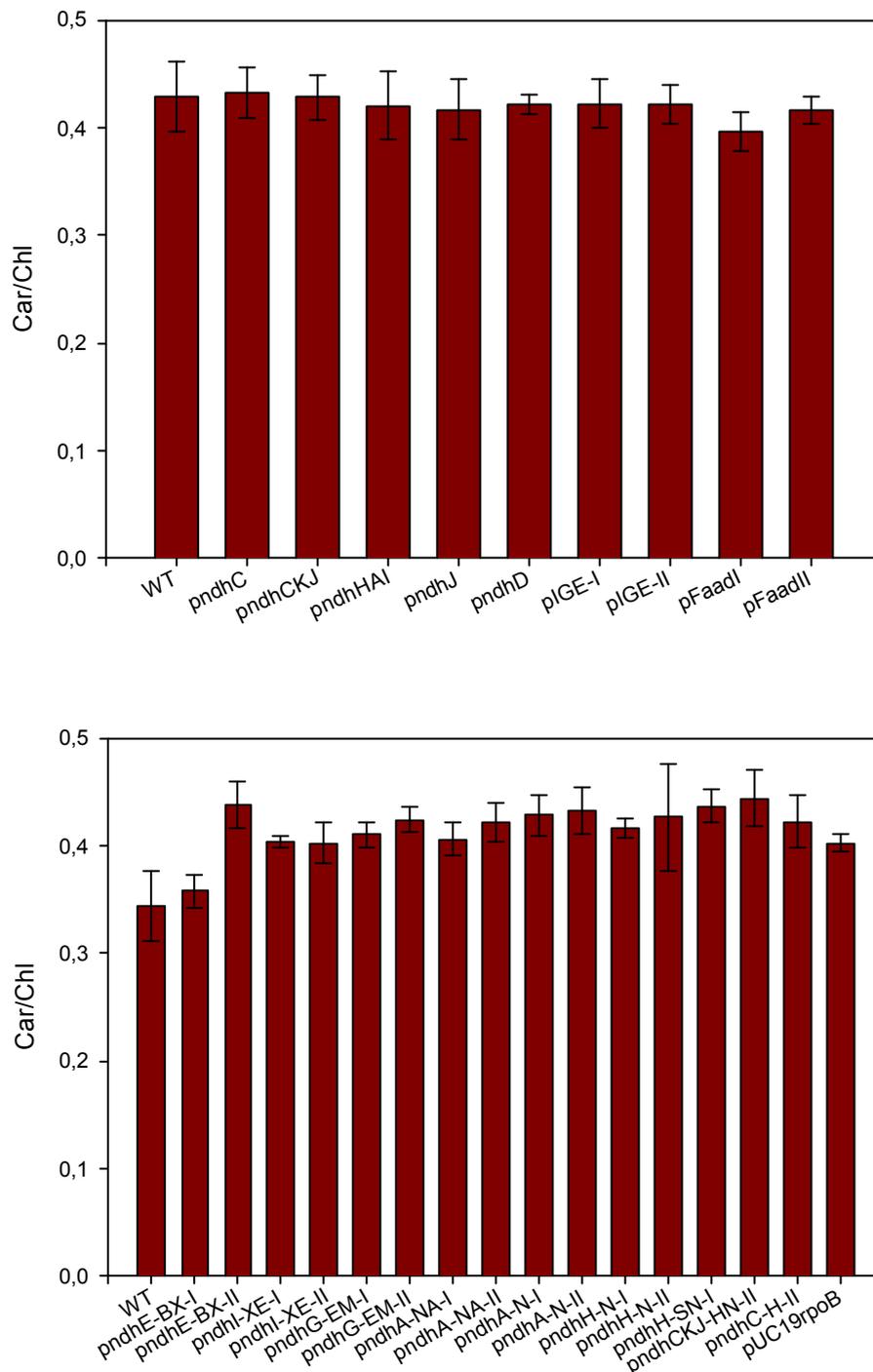


Abb. 55: Carotinoid/Chlorophyll-Verhältnis. Das obere Diagramm zeigt die Mutanten der Serie A, das untere Diagramm die der Serie B. Für jede Linie wurden mindestens 5 Proben analysiert .

Während sich die Werte für das Carotinoid/Chlorophyll-Verhältnis bei den Mutanten der Serie A im Bereich des Wildtyps bewegten, erkennt man bei den Pflanzen der Serie II im Mittel eine Erhöhung des Verhältnisses (Abb. 55).

Die größten Unterschiede zeigten auch hier die helleren Pflanzen der Mutagenesekonstrukte pndhE-BX-II und pndhH-N-II. Die ebenfalls hellere Mutante pIGE-aadII der Serie A hingegen zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp.

Die Erhöhung im Carotinoid/Chlorophyll-Verhältnis kann ihre Ursachen entweder in einem größeren V+A+Z-Pool, d.h. dem Gesamtgehalt an Viola-, Anthera- und Zeaxanthin, haben oder in einer Verringerung des Gesamtchlorophyllgehalts.

Ein Vergleich der V+A+Z-Pools der Mutanten und des Wildtyps sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16: Größe des V+A+Z-Pools (Gesamtmenge an Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin in pmol Carotinoid/ μ mol Chlorophyll). In Klammern sind die jeweiligen Standardabweichungen aufgeführt. Für jede Linie wurden mindestens 5 Proben analysiert :

<u>Serie A</u>	V+A+Z		<u>Serie B</u>	V+A+Z
WT	65 (6,6)		WT	60 (6,4)
pndhC-H-I	66 (8,2)		pndhE-BX-I	67 (4,0)
pndhCKJ-HN-I	71 (6,0)		pndhE-BX-II	107 (17,7)
pndhHAI-RV-I	71 (15,9)		pndhI-XE-I	63 (4,9)
pndhJ-N-I	68 (10,5)		pndhI-XE-II	62 (6,5)
pndhD-NN-I	68 (8,6)		pndhG-EM-I	62 (2,4)
pIGE-aadI	73 (9,1)		pndhG-EM-II	71 (3,3)
pIGE-aadII	120 (10,5)		pndhA-NA-I	63 (4,2)
pF-aadI	68 (7,9)		pndhA-NA-II	73 (9,2)
pF-aadII	65 (6,6)		pndhA-N-I	68 (6,1)
			pndhA-N-II	71 (7,1)
			pndhH-N-I	64 (2,7)
			pndhH-N-II	91 (16,5)
			pndhH-SN-I	69 (8,2)
			pndhCKJ-HN-II	66 (5,5)
			pndhC-H-II	63 (4,6)
			pUC19-rpoB	66 (4,3)

Bei einem Vergleich der Größe des V+A+Z-Pools erkennt man zwischen Wildtyp und Mutanten keine Unterschiede. Ausnahmen waren wiederum die heller pigmentierten Mutanten pIGE-aadII, pndhE-BX-II und pndhH-N-II, die einen deutlich höheren V+A+Z-Pool aufwiesen.

Aufgrund der Analyse des V+A+Z-Poolgröße kann man vermuten, dass die Verschiebung des Carotinoid/Chlorophyll-Verhältnisses bei den Pflanzen der Serie B, mit Ausnahme der Mutanten pndhE-BX-II und pndhH-N-II, mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Reduzierung des Gesamtchlorophyllgehalts zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann man für die Pigmentanalyse feststellen, dass sich der Gehalt der verschiedenen Carotinoide nicht verändert hat, wenn man von den heller gefärbten Ausnahmen absieht, bei denen die Resistenzkassette gegen die Leserichtung der *ndh*-Gene inseriert ist. Veränderungen in den Carotinoid/Chlorophyllverhältnis sind hier wahrscheinlich auf eine Reduktion des Gesamtchlorophyllgehalts zurückzuführen, wobei sich das Verhältnis zwischen Chlorophyll a und Chlorophyll b nicht wesentlich verändert hat.

IV. Diskussion

Über die Struktur und Funktionsweise des plastidären NDH-Komplexes ist bisher wenig bekannt, ebenso über seine physiologische Rolle in den Plastiden. Die Beteiligung am zyklischen Elektronentransport um das Photosystem I, an der Chlororespiration und am Schutzmechanismus gegen photooxidativen Stress wird diskutiert.

Um die physiologischen Funktionen des NDH-Komplexes näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Untereinheiten NDH-A/-E/-I/-G und -H aus *Nicotiana tabacum* jeweils durch Insertions- und Deletionsmutagenese mit Hilfe einer Spectinomycin-Resistenzkassette ausgeschaltet. Mit den in Kofer *et al.* (1998) beschriebenen Mutanten und den neu erzeugten Transformanten standen für alle Untereinheiten bis auf NDH-B, die bereits von anderen Gruppen untersucht wurde (Shikanai *et al.*, 1998; Endo *et al.*, 1998, 1999; Horváth *et al.*, 2000; Joet *et al.*, 2001), Transformanten zur Verfügung. Diese wurden unter Gewächshausbedingungen im Frühjahr und im Sommer angezogen und auf molekularbiologischer und physiologischer Ebene untersucht.

1. Die *ndh*-Mutanten sind homoplastomisch

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten und bereits beschriebenen Pflanzen der Serie A aus der Gewebekultur (Kofer *et al.*, 1998) und beinahe zeitgleich von Burrows *et al.* (1998) hergestellte Transformanten für die Gene *ndhI*, *-J* und *-K*, unterschieden sich hinsichtlich ihres plastomischen Zustandes und ihres Phänotyps deutlich.

Der kleinere Phänotyp der NDH-Mutanten von Kofer *et al.* (1998) wurde zum einen auf die PEG-vermittelte Transformationsmethode und die längere Regenerationszeit auf spectino- und streptomycinhaltigem Medium und zum anderen auf den Saccharosegehalt im Gewebekulturmedium zurückgeführt (Sager, 1962; Roldán, 1999). Daher wurden die von Kofer *et al.* (1998) beschriebenen Pflanzen auf Erde ausgesät und als Serie A in dieser Arbeit mituntersucht. Des weiteren wurden die Mutagenesekonstrukte *pndhC-H-I* und *pndhCKJ-HN-I* erneut über biolistische Transformation in Tabakplastiden gebracht und ebenfalls nach der Anzucht im Gewächshaus untersucht. In ihrem Phänotyp waren die Transformanten *pndhC-H-I* und *pndhCKJ-HN-I* aus der PEG-vermittelten und der biolistischen Transformation nicht zu unterscheiden. Die Pflanzen aus beiden Transformationsansätzen in Gewebekultur und in der Gewächshausanzucht stimmten sowohl in den Southern-Analysen als auch in den Immunoblot-Analysen überein (III./Abb. 11 / 12). Die Übereinstimmungen zwischen PEG-transformierten und biolistisch transformierten Pflanzen widerlegt die Vermutung, dass die unterschiedlichen Phänotypen in den Veröffentlichungen (Kofer *et al.*, 1998; Burrows *et al.*, 1998) mit der Transformationsmethode und der Anzucht in Gewebekultur zusammenhängen.

Die NDH-Transformanten von Burrows *et al.* (1998) waren im Gegensatz zu den Pflanzen von Kofer *et al.* (1998) homoplastomisch, d.h. alle Wildtypgene waren durch die entsprechenden Mutagenesekonstrukte ersetzt worden. Die Southern-Analysen in der Arbeit von Kofer *et al.* (1998) zeigten, dass 1–5 % der Wildtyp-Genkopien noch vorhanden waren und die Pflanzen somit heteroplastomisch zu sein schienen. In dieser Arbeit ließen sich die Wildtypsignale in den Southern-Analysen der Serie A und bei den Transformante *pndhA-N-I*, *pndhA-NA-II* und *pndhG-EM-II* der Serie B aus der Gewächshausanzucht nachweisen (III.1.2.1). Analysen mit DNA aus isolierten Plastiden deuten darauf hin, dass es sich bei diesen Signalen um Genkopien handeln muss, die im Kern lokalisiert sind (Dr. K. Steinmüller, persönliche Mitteilung). Bei dieser sogenannten promiskösen DNA handelt es sich um plastidäre DNA-Abschnitte, die während der Evolution in den Kern

gelangt sind. In Tabak soll es sich nach Abschätzungen um circa 30 Kopien pro Kern handeln, die mehrere Kilobasen lange fast identische Abschnitte beinhalten (Ayliffe & Timmis, 1992). Bei *Arabidopsis thaliana* und in Gymnospermen wurden plastidäre Sequenzen, die unter anderem Sequenzen von *ndhB* enthielten, auch im Chondriom nachgewiesen (Marienfeld *et al.*, 1999; Chandelier *et al.*, 1999). Daher können die Transformanten der Serie A und B trotz der leichten Wildtyp-Signale als homoplastomisch gelten.

Der homoplastomische Status der Pflanzen der Serie A und B und die Anzucht auf Erde zeigten, dass es sich bei dem NDH-Komplex um keinen essentiellen plastidären Komplex handelt. Wäre der NDH-Komplex ein essentieller Komplex, so lägen die Pflanzen in einem heteroplastomischen Zustand vor, d.h. sie würden Wildtyp-Genkopien beibehalten, um lebensfähig zu sein (Rochaix, 1997).

2. Die physiologischen Effekte der NDH-Mutation

Der physiologische Zustand der photosynthetischen Elektronentransportkette wurde mittels Chlorophyllfluoreszenzinduktionsmessungen untersucht. Der auffälligste Unterschied zwischen Wildtyp und NDH-Mutanten zeigte sich beim Abschalten des aktinischen Lichts. Bei Wildtyppflanzen und den Kontrollpflanzen kommt es zu einem kurzzeitigen Wiederanstieg und Abfall der Fluoreszenz. Dieser sogenannte transiente Dunkelanstieg kann durch Aktivierung des Photosystems I mittels Dunkelrotlicht gelöscht werden (II.2.7.1; III.4.2). Der transiente Dunkelanstieg wird als Einspeisung der Elektronen aus Reduktionsäquivalenten, die während der Lichtphase im Stroma akkumuliert werden, in den Plastochinonpool interpretiert (Mano *et al.*, 1995). Das Fehlen des transienten Dunkelanstiegs bei allen NDH-Mutanten ist ein Hinweis auf die Rolle des NDH-Komplexes bei der Einspeisung von Elektronen in den Plastochinonpool. Auch die Plastochinonbindestelle, die sich aus der Homologie zum mitochondriellen Komplex I ableiten lässt, und die Fähigkeit des NDH-Komplexes, Reduktionsäquivalente zu oxidieren, sprechen für eine Rolle als möglicher Einspeisungspunkt der Elektronen (Farineau *et al.*, 1999).

Nachdem mit dem Fehlen des transienten Dunkelanstiegs ein Hinweis für die Funktion des NDH-Komplexes als Einspeisungspunkt von Elektronen in den Plastochinonpool vorlag, wurden die einzelnen Abschnitte der photosynthetischen Elektronentransportkette auf Veränderungen durch die Mutagenese des NDH-Komplexes hin untersucht.

Die Funktionsfähigkeit des Photosystems II wurde mittels der Analyse der Anregungseffizienz F_{exc} des Photosystems II, sowie des Redoxzustands des Primärakzeptors Q_A (III.4.1) und der relativen Elektronentransportrate (III.5.1) untersucht.

Die Anregungseffizienz F_{exc} gibt Auskunft über die Funktionsfähigkeit des Photosystems II. Für dunkeladaptierte Blätter verschiedener Spezies und Ökotypen wurde ein konstanter Wert von 0,832 ermittelt (Björkmann & Demmings, 1987). Sinkt dieser Wert deutlich, so gilt dies als Indiz für eine Inhibition des Photosystems II.

Die NDH-Mutanten der Serie A und B zeigten entweder keine oder nur eine leichte Reduktion der Anregungseffizienz F_{exc} . Auch in der relativen Elektronentransportrate, die als Maß für die Ladungstrennung am Photosystem II gilt, zeigten die Mutanten keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp.

Die Funktionsfähigkeit des Photosystems II wird demnach durch die Mutagenese der Untereinheiten des NDH-Komplexes nicht beeinträchtigt.

Die Untersuchung der photochemischen Effizienz FII und des Reduktionszustands des Primärakzeptors Q_A geben Hinweise auf den physiologischen Zustand der Elektronentransportkette im photosynthetischen Fließgleichgewicht (III.4.1)

Die photochemische Effizienz FII beschreibt die Effizienz, mit der Elektronen pro absorbiertes Lichtquant in die Elektronentransportkette eingespeist werden. Der Wert gilt als Indikator für die CO_2 -Fixierung, die Photorespiration und andere sauerstoffabhängige Elektronentransportwege (Genty *et al.*, 1989). Die ermittelten Werte zeigten, dass unter optimalen und gemäßigten Bedingungen, wie sie in der Klimakammer und bei der Frühjahrsanzucht im Gewächshaus vorherrschten, die NDH-Transformanten im Vergleich zum Wildtyp mehr Elektronen pro Quant in die Elektronentransportkette einspeisten. Erst bei höheren Lichtintensitäten und Temperaturen während der Sommeranzucht im Gewächshaus erreichte der Wildtyp durch eine höhere Photosyntheserate die gleiche photochemische Effizienz FII wie die Transformanten, bzw. speiste mehr Elektronen in die Elektronentransportkette ein als im Frühjahr. Der Wildtyp lässt somit eine Anpassung der Photosynthese an die erhöhten Lichtintensitäten in der Sommeranzucht erkennen, die den Transformanten fehlt.

Die Folge einer höheren photochemischen Effizienz FII ist eine schnellere Reduktion des Primärakzeptors Q_A , der im gleichen Maß auch wieder reoxidiert werden muss, um einen konstanten Elektronentransport aufrecht zu erhalten. Der errechnete Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A verhält sich nicht linear zum absoluten Redoxzustand der Reaktionszentren im Photosystem II, aber er eignet sich gut, um Pflanzen miteinander zu vergleichen, die unter verschiedenen Bedingungen angezogen wurden. (Schreiber *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1995). Den Redoxzustand von Q_A kann man auf den Redoxzustand der gesamten Elektronentransportkette übertragen. (Huner *et al.*, 1996).

Die ermittelten Werte für den Redoxzustand von Q_A in den NDH-Mutanten und im Wildtyp bestätigten die Ergebnisse aus den Messungen für die photochemische Effizienz FII. Unter den gemäßigten Bedingungen der Frühjahrsanzucht lag das Q_A des Wildtyps stärker reduziert vor als in den Transformanten, die den Primärakzeptor Q_A im Vergleich schneller reoxidierten. Unter den Bedingungen der Sommeranzucht, d.h. bei erhöhter Photosyntheseleistung, kehrte sich das Verhältnis um und die Transformanten lagen stärker reduziert vor als der Wildtyp.

Eine genauere Untersuchung der Elektronentransportkette ist durch die Betrachtung der Fluoreszenzlöschung möglich.

Der Verlauf der Chlorophyllfluoreszenzinduktionskurve wird durch sog. Löschungsfaktoren bestimmt (III.5.2). Dabei unterscheidet man zwischen der photochemischen und der nicht-photochemischen oder energieabhängigen Fluoreszenzlöschung (Bradbury und Baker, 1983). Die Auflösung der Löschungsfaktoren qP und qN im Zeitverlauf durch die Sättigungspulsmethode liefert wichtige Informationen über die intersystemische Elektronentransportkette (Schreiber & Bilger, 1987).

Die photochemische Löschung qP hängt vom Redoxzustand des Primärakzeptors Q_A ab. Die Reoxidation von Q_A gilt als hauptsächlicher Löschungsfaktor. Je höher der Wert der photochemischen Löschung ist, desto mehr Energie, bzw. Elektronen, werden durch die Elektronentransportkette geleitet.

An der nicht-photochemischen oder energieabhängigen Fluoreszenzlöschung qN sind wahrscheinlich drei Hauptmechanismen beteiligt. Den Hauptanteil übernimmt die energieabhängige Löschung qE , die durch den Aufbau eines Protonengradienten über der Thylakoidmembran hervorgerufen wird (Briantais *et al.*, 1979). Des Weiteren sind die Löschung durch Phosphorylierung der Lichtsammelkomplexe qT (Briantais *et al.*, 1986) und

die photoinhibitorische Löschung q_I (Powles und Björkman, 1982) an der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung beteiligt.

Anhand der beiden Löschungsfaktoren q_P und q_N lassen sich die Aktivierung der photosynthetischen Elektronentransportkette und die Energetisierung der Thylakoidmembran verfolgen.

Beim Vergleich der Wildtyppflanzen aus den verschiedenen Anzuchten ließ sich über die photochemische Fluoreszenzlöschung q_P die Adaptation der Pflanzen aus der Sommeranzucht an die gestiegenen Lichtintensitäten beobachten. Die Pflanzen reagierten auf die Erhöhung der Lichtintensitäten und der Temperatur in der Sommeranzucht mit einer höheren photochemischen Löschung q_P , d.h. mit einem höheren Elektronenfluss durch die Elektronentransportkette, als in den Klimakammer- und in den Frühjahrsanzuchten.

Diese Adaptation fehlt den Transformanten. Sie zeigten bereits in der Klimakammer- und in der Frühjahrsanzucht einen ähnlichen Verlauf der photochemischen Fluoreszenzlöschungskurven wie der Wildtyp in der Sommeranzucht, d.h. bei gemäßigeren Temperaturen und Lichtintensitäten konnte man einen höheren Elektronenfluss als im Wildtyp beobachten.

Die Untersuchungen des Redoxzustands von Q_A und die Ergebnisse aus den Messungen für die photochemische Effizienz F_{II} spiegeln sich also auch in den Ergebnissen der photochemischen Fluoreszenzlöschung q_P wider.

Den Transformanten fehlt anscheinend ein Regulationsmechanismus, der den Elektronenfluss an die verschiedenen Lichtintensitäten anpasst.

Auf den mögliche Regulationsmechanismus soll an späterer Stelle näher eingegangen werden.

Als Hauptkomponente der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung q_N gilt der Aufbau eines Protonengradienten über der Thylakoidmembran. Zwischen der Größe des Protonengradienten und dem Wert für q_N gibt es keine lineare Beziehung (Rees *et al.*, 1992). Man kann also aus dem Kurvenverlauf keine Rückschlüsse auf die Größe des Gradienten ziehen, sondern nur auf seine Entwicklung. *In vivo* wurde der intrathylakoide Protonengradient bisher nicht gemessen und die Regulation desselben ist bisher noch nicht ganz verstanden. So wurden bisher neben dem allgemeinen pH-Wert in den Thylakoiden auch kleinere Domänen mit variierendem pH-Wert gefunden, z.B. um den Cytochrom b_6/f -Komplex oder am Photosystem II (Genty & Harbinson, 1993).

Bei einem Vergleich der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung der Transformante und des Wildtyps unterschied sich der Kurvenverlauf der Transformanten deutlich vom Wildtyp. Die Unterschiede fielen im photosynthetischen Fließgleichgewicht bei höheren Lichtintensitäten geringer aus. Die Unterschiede ließen sich jedoch nicht an bestimmten Transformante festmachen, sondern traten je nach Anzucht und gemessener Lichtintensität bei verschiedenen Transformanten auf.

Einige Mutanten, wie *pndhC-H-I* und *pndhJ-N-I*, zeigten in der Frühjahrsanzucht nach dem Erreichen eines hohen Kurvenmaximums einen langsameren Kurvenabfall, was auf einen verzögerten Aufbau des Protonengradienten und somit auf eine verzögerte Aktivierung des Calvinzyklus hindeutet. Andere Mutanten, wie *pndhA-N-I*, *pndhI-XE-I*, *pndhHAI-RV-I* und *pndhD-NN-I*, erreichten in der Frühjahrsanzucht kein deutliches Maximum mit anschließendem Kurvenabfall, sondern stiegen bis auf ein konstantes Niveau. Dabei könnte es sich um einen verlangsamten Protoneneinstrom handeln, so dass sich der Aufbau des Gradienten und die Aktivierung des Calvin-Benson-Zyklus ausgleichen und sich so kein Maximum in der Fluoreszenzlöschung q_N entwickeln kann. Die Mutanten *pndhD-NN-I* zeigte in der Sommeranzucht einen sehr schnellen Anstieg auf ein hohes Maximum, bevor sie auf ein konstantes Niveau wieder abfiel. Hierbei kann es sich um ein sehr schnelles Einströmen

von Protonen über die Thylakoidmembran handeln, wodurch es zu einem sprunghaften Anstieg des Protonengradienten kommt.

Die Veränderungen in den Kurvenverläufen der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung deuten auf eine Beeinträchtigung der Regulation bei der Energetisierung der Thylakoidmembran, bzw. beim Protonentransport hin.

Pflanzen mit einem veränderten Verhalten bei der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung qN sind auch aus *Arabidopsis thaliana* bekannt. So zeigte die Mutante *npq1* eine stark verminderte Fluoreszenzlöschung und akkumulierte das Carotinoid Violaxanthin. Die Mutante *npq2* war in der Zeaxanthinepoxidase, die eine wichtige Rolle im Schutzmechanismus bei photooxidativen Stress spielt, betroffen. Sie zeigte eine höhere Fluoreszenzlöschung als der Wildtyp und akkumulierte das Carotinoid Zeaxanthin (Niyogi *et al.*, 1998). Daher wurde die Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung der Transformanten analysiert. Sie zeigte bei den NDH-Mutanten mit der Resistenzkassette in Leserichtung keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten.

Peterson *et al.* (2000) beschrieben die Mutante *Lsr1* in *Arabidopsis thaliana*, die durch eine Reduzierung in der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung auffällt, aber eine normale Pigmentzusammensetzung aufweist. Die Untersuchung dieser Mutante ließ auf einen Defekt in der Regulation des transthylakoiden pH-Werts schließen.

Diese beschriebenen Mutanten sind ein weiterer Hinweis darauf, dass auch die NDH-Mutanten in der Regulation des Protonengradienten beeinträchtigt sein könnte, d.h. dass der NDH-Komplex eine Rolle bei der Regulation des Protonengradienten spielt. Aufgrund der Homologien zwischen dem bakteriellen Komplex I und dem NDH-Komplex könnte auch der NDH-Komplex Protonen über die Membran translozieren. Daher ist eine Mitwirkung am Aufbau und eventuell der Regulation des Protonengradienten denkbar.

Die Ergebnisse aus der Analyse der energieabhängigen Fluoreszenzlöschung stimmen auch mit dem Modell einer Beteiligung des NDH-Komplexes an der Chlororespiration überein. Als eine mögliche Funktion für die Chlororespiration wird die Aufrechterhaltung eines Protonengradienten über der Thylakoidmembran während der Dunkelphase diskutiert.

Den letzten Abschnitt der photosynthetischen Elektronentransportkette bildet das Photosystem I. Um die Effekte im Photosystem I zu untersuchen, wurde der Redoxzustand des Photosystems I in der Lichtphase und die Zeit für die Rereduktion in der Dunkelphase bestimmt (Maxwell & Biggins, 1976; Bendall & Manasse, 1995). Beide Parameter sollten Informationen über eine mögliche Beeinträchtigung des zyklischen Elektronentransports und den Abfluss der Elektronen aus der Elektronentransportkette liefern.

Sowohl in der Frühjahrs- als auch in der Sommeranzucht war das Photosystem I der Transformanten während der Lichtphase stärker reduziert als das Photosystem I des Wildtyps. Während das Photosystem I des Wildtyps sowohl im Frühjahr als auch im Sommer annähernd gleich stark reduziert vorlag, war das Photosystem I der NDH-Mutanten im Sommer noch stärker reduziert als im Frühjahr (III./Abb. 51-53). Die stärkere Reduktion des Photosystems I in den Transformanten ist ein Hinweis auf eine Beeinträchtigung des Elektronentransports im, bzw. nach dem Photosystem I, wie sie z.B. bei einer Schädigung des zyklischen Elektronentransports oder bei einem Mangel an Elektronenakzeptoren wie z.B. NADP zu erwarten ist.

Bei den untersuchten NDH-Mutanten wurde eine deutlich längere Zeitspanne für die Rereduktion des Photosystems I gemessen (III./Tab. 14). Die Zeiten für die Rereduktion des Wildtyps und der Transformanten korrelierten mit den von anderen Gruppen gemessenen Zeiten (Burrows *et al.*, 1998).

Auffallend sind zudem die deutlich variierenden Standardabweichungen, die sich durch Schwankungen an Akzeptor- und Donorseite des Photosystems I und Fließwiderständen in der Elektronentransportkette erklären lassen (Laisk 1991, Eichelmann *et al.*, 2000).

Der Redoxzustand und die verlängerte Rereduktionszeit des Photosystems I in den NDH-Mutanten kann somit als weiterer Beleg für die aktive Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport gelten.

3. Beobachtungen zur Chlororespiration und zum Stärkeabbau

Bei der Chlororespiration werden während der Dunkelphase Elektronen über den Plastochinonpool auf Sauerstoff übertragen. Die Elektronen stammen dabei aus der Oxidation von stromalen Reduktionsäquivalenten. Als Einspeisungspunkt der Elektronen in den Plastochinonpool wird dabei der NDH-Komplex diskutiert.

Als eine mögliche Funktion der Chlororespiration wird die Oxidation überschüssiger Reduktionsäquivalente angenommen, wie sie beim Stärkeabbau über den oxidativen Pentosephosphatweg in der Dunkelphase anfallen. Der oxidative Pentosephosphatweg wird über das NADP/NADPH-Verhältnis reguliert und ist nur bei einem niedrigen Verhältnis aktiv (Lendzian & Bassham, 1975).

Eine Mutation im NDH-Komplex könnte daher aufgrund einer NADPH-Akkumulation, und einem dadurch erhöhten NADP/NADPH-Verhältnis zu einer Beeinträchtigung des Stärkeabbaus in der Dunkelphase führen. Eine Beeinträchtigung im Stärkeabbau konnte aber nur bei der NDH-D-Mutante nachgewiesen werden, während die übrigen Mutanten die Stärke schneller, bzw. genauso schnell wie der Wildtyp abbauten (III./Abb.16,17 und 18).

Allerdings war bei einigen Mutanten der Stärkehaushalt am Ende der Belichtungsphase geringer als im Wildtyp (III./Tab. 12). Dies ließe sich dadurch erklären, dass eine Verschiebung des NADP/NADPH-Verhältnis neben Auswirkungen auf die Aktivität des oxidativen Pentosephosphatweges auch auf den übrigen Zuckerhaushalt und, über eine Veränderung des ATP/NADPH-Verhältnis, auf die Kohlenstofffixierung im Calvin-Zyklus.

Zudem wurde in *Chlamydomonas reinhardtii* beobachtet, dass es zu einem verstärkten Stärkeabbau kommt, wenn es bei Diskrepanzen im NADPH/NADP-Verhältnis, und somit im ATP/NADPH-Verhältnis, zu einer Verstärkung der Glycolyse im Cytosol kommt. Über eine verstärkte Glycolyse versuchen die Zellen, das fehlende ATP nachzuliefern, um das ATP/NADPH-Verhältnis wieder herzustellen (Gans & Rebeille 1990). Ähnliches ist auch für die Plastiden denkbar, so dass die Mutanten, bis auf die erwähnte NDH-D-Mutante, nicht die erwartete Hemmung im Stärkeabbau zeigen, sondern einen schnelleren Stärkeabbau als der Wildtyp.

Unter dem Gesichtspunkt des veränderten Stärkehaushaltes ließe sich auch der veränderte Habitus der *ndh*-Mutanten erklären.

Die untersuchten Pflanzen zeigten sowohl in der Klimakammer als auch im Gewächshaus einen einheitlichen Habitus. Bis zur sechsten Anzuchtwoche zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Transformanten. Ab der siebten Woche setzte bei den Transformanten ein verstärktes Internodienwachstum ein, es bildeten sich Seitensprosse aus den Axillärknospen, die Blattanzahl wurde reduziert und die Blütenbildung setzte verfrüht ein. Die Blüten zeigten veränderte Antheren und Pollen und die gebildete Samenmenge war gegenüber dem Wildtyp reduziert. Die geringste Samenreduktion zeigte die Kontrollpflanze *pndhF-aadI-II*, in der die Kasette zwischen *ndhD* und *ndhF* inseriert wurde. Eine Internodienverlängerung und eine Veränderung im Wachstum und bei der Blütenbildung sind aus Tabak- und Kartoffelmantanten, in denen der Zuckerhaushalt, insbesondere die Kompartimentierung der Zucker, verändert wurde, bekannt (Kehr *et al.*, 1998; Sheveleva *et al.*, 2000). Die beobachteten Pollendefekte und die damit verbundene Sterilität, die sich in

der reduzierten Samenmenge manifestierte, ist aus verschiedenen Tabakmutanten bekannt, in denen der Komplex I, die ATPase oder Komponenten des photosynthetischen Elektronentransports betroffen sind (Cook & Miles 1992; Price *et al.*, 1995; Rasmusson *et al.*, 1998; Brangeon *et al.*, 2000; Bergman *et al.*, 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass Störungen im Elektronentransport der Chloroplasten Auswirkungen auf die Transkription mitochondrieller Gene haben und so zu einem Phänotyp führen könnten, der Mitochondrien-Mutanten ähnlich ist. Mitochondrien-Mutanten zeichnen sich vor allem durch Pollendefekte und Wachstumsstörungen aus (Hedtke *et al.*, 1999). Unter Berücksichtigung der möglichen Beteiligung des NDH-Komplexes am Stärkeabbau, im Zusammenhang mit der Chlororespiration (I.6), und am photosynthetischen Elektronentransport (I.4/I.5) gibt der beobachtete Habitus Hinweise auf Einflüsse im Stärkehaushalt.

4. Die Effekte des Insertionsortes der Resistenzkassette

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte spezifisch für die Mutagenese des NDH-Komplexes sind, wurden Kontrollpflanzen analysiert, bei denen die Resistenzkassette an vermuteten genetisch inaktiven Orten des Plastoms inseriert wurde. Die Kassette wurde bei der Transformante pndhF-aad in den Bereich zwischen *ndhD* und *ndhF* inseriert (Koop *et al.*, 1996), bei der Transformante pIGE-aad zwischen *ndhE* und *psaC* (Kofer *et al.*, 1998) und bei der Transformante pUC19rpoB in den Bereich vor den Promoter des *rpoB*-Gens (Dr. W. Kofer, persönliche Mitteilung).

Mit Ausnahme des transienten Dunkelanstiegs verhielten sich diese Kontrollpflanzen in den physiologischen Messungen jedoch eher wie die NDH-Mutanten als wie der Wildtyp. Die geringsten Unterschiede zwischen Wildtyp und Kontrollkonstrukten zeigten sich bei der Analyse der Fluoreszenzlöschung qP und qN. Insgesamt unterschied sich das Kontrollkonstrukt pUC19rpoB, das von den *ndh*-Genen weiter entfernt lag, am wenigsten vom Wildtyp. Auch im Habitus zeigten die Pflanzen mit den Kontrollkonstrukten den gleichen Habitus wie die NDH-Mutanten, wobei auch hier die Unterschiede bei den Kontrollpflanzen pUC19rpoB etwas schwächer ausgeprägt waren als bei den übrigen Transformanten.

Diese Beobachtungen werfen somit die Frage auf, ob die in den NDH-Mutanten beobachteten Effekte im photosynthetischen Elektronentransport, beim Stärkeabbau und im Phänotyp aus der Mutagenese der *ndh*-Gene resultieren oder ob es unspezifische Effekte der Insertion der Resistenzkassette in genetisch wahrscheinlich inaktive Orte im Plastom sind.

Im SSC-Bereich (small-single-copy) des Tabakplastoms (I./Abb. 3) liegen sieben der elf *ndh*-Gene. Die Insertion einer Resistenzkassette in diesen Bereich könnte, aufgrund von Deletion anderer Gene oder Kontrollsequenzen oder aufgrund der Inaktivierung von RNA-Editierungs- und Splicingstellen zu Pflanzen führen, die nicht mehr mit dem Wildtyp vergleichbar sind. Des Weiteren wurde zwischen *ndhD* und *ndhF* das *sprA*-Gen nachgewiesen, für dessen Produkt eine mögliche Funktion in der Reifung der 16S rRNA diskutiert wird (Vera & Sugiura, 1994; Sugita *et al.*, 1997).

Die Transkriptionsmuster für die in einem Operon angeordneten Gene *ndhH*/*-A*/*-I*/*-G*/*-E*, *psaC* und *ndhD* sind noch nicht eindeutig geklärt (Matsubayashi *et al.*, 1987; Kanno & Hirai, 1993; Kubicki *et al.*, 1996). *PsaC* und *ndhD* scheinen getrennt von den übrigen *ndh*-Genen transkribiert zu werden und in dem Bereich zwischen *ndhE* und *psaC* finden wichtige Editierungs- und Splicingschritte für die erfolgreiche Transkription der Gene *psaC* und *ndhD* statt (Neckermann *et al.*, 1994; Hirose & Sugiura, 1997).

Bei der Transformante pUC19rpoB wurde die Resistenzkassette in den Bereich vor den Promotor des *rpoB*-Gens gesetzt. Ob durch die Insertion bisher nicht nachgewiesene Gene

oder regulatorische Sequenzen betroffen wurden, konnte nicht gezeigt werden. Alle aufgeführten Insertionsorte sind damit nicht eindeutig genetisch inaktiv. Daher ist es fraglich, ob bei der Verwendung einer Resistenzkassette Kontrollkonstrukte für eine Plastidentransformation herstellbar sind, die sich wie der Wildtyp verhalten. In keiner der bisher veröffentlichten Untersuchungen über NDH-Mutanten wurden Kontrollkonstrukte verwendet (Burrows *et al.*, 1998; Shikani *et al.*, 1998), sondern die Ergebnisse lediglich mit dem Wildtyp verglichen.

Einen anderen Weg wählten Horvath *et al.* (2000), die die Untereinheit NDH-B ausgeschaltet haben. Anstelle einer Resistenzkassette fügten sie Mutationen in *rrn16* und *rps12* ein und erreichten so durch Mutation der 16S rRNA eine Spectinomycin- und Streptomycin-Resistenz. Die Untereinheit NDH-B wurde durch das Einfügen eines Stopcodons ausgeschaltet. Transformanten aus der Gewächshausanzucht zeigten unter normalen Anzuchtbedingungen keine Unterschiede zum Wildtyp. Erst bei einer Verminderung der Luftfeuchtigkeit, was zu einem Verschluss der Stomata führte, wuchsen die NDH-B-Mutanten schlechter. Ein verminderter Gasaustausch führt aufgrund der Photorespiration zu einem höheren ATP-Verbrauch, der in der NDH-Mutante nicht kompensiert werden kann. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des ATP/NADPH-Verhältnisses. Diese Verschiebung ist ein Hinweis auf einen fehlenden zyklischen Elektronentransport. Die Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport konnten Joet *et al.* (2001) an der gleichen NDH-B-Mutante durch Inhibitorversuche untermauern.

Die beobachteten Effekte bei den NDH-Mutanten aus dieser Arbeit lassen sich durch die möglichen Funktionen des NDH-Komplexes erklären und stehen nicht im Widerspruch zu veröffentlichten Untersuchungen an NDH-Mutanten anderer Arbeitsgruppen. Die Ergebnisse der Kontrollpflanzen müssen vor dem Hintergrund der Problematik des Insertionsortes für Resistenzkassetten in das Plastom gesehen werden.

5. Mögliche Rolle des NDH-Komplexes in Plastiden

Eine effektive Kohlenstofffixierung im Calvin-Zyklus benötigt in C3-Pflanzen, wie dem Tabak, einen ATP/NADPH-Quotienten von 1,5. Wie bereits beschrieben, kann der lineare Elektronentransport diesen Quotienten nicht gewährleisten, da er aufgrund von Leckströmen der Thylakoidmembran nur einen Wert von circa 1,3 erreichen dürfte. Daher ist der lineare Elektronentransport auf die Mithilfe des zyklischen Elektronentransports angewiesen, der zusätzliches ATP bereitstellen kann.

Bei einer erhöhten Photosyntheserate durch höhere Lichtintensität und Temperatur, wie in der Sommeranzucht, oder bei einer Restriktion des CO₂-Angebots kommt es zu einer Akkumulation von Reduktionsäquivalenten im Stroma, so dass das ATP/NADPH-Verhältnis verschoben wird. Um dieses Verhältnis konstant zu halten, ist eine Verstärkung des zyklischen Elektronentransports nötig, um das zusätzliche ATP bereitzustellen (Buhkov *et al.*, 1999).

Während die Funktionsfähigkeit des Photosystems II in den Transformanten nicht beeinträchtigt ist, zeigt die Analyse der Elektronentransportkette, dass die Transformanten bei den gemäßigten Bedingungen der Frühjahrsanzucht einen Elektronenfluss aufweist, die der Wildtyp erst unter den Bedingungen der Sommeranzucht erreicht. Aber unter beiden Bedingungen, sowohl im Frühjahr als auch im Sommer, war das Photosystem I der Transformanten stärker reduziert als das des Wildtyps.

Ausgehend von dem Modell der Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport als Einspeisungspunkt der Elektronen in den Plastochinonpool, zeigen die NDH-Mutanten das zu erwartende Bild.

Durch das Fehlen des zyklischen Elektronentransports in den Mutanten würde es zu einer Akkumulation von Reduktionsäquivalente kommen, was zu einem Elektronenrückstau im Photosystem I und sukzessive zu einer Überreduktion der Elektronentransportkette führen würde. Als weitere Folge käme es zu einer Störung des ATP/NADPH-Verhältnisses und somit zu einer Beeinträchtigung der CO₂-Fixierung (Foyer *et al.*, 1990). Der fehlende Ausgleich des ATP/NADPH-Verhältnisses über den zyklischen Elektronentransport und die daraus resultierende Überreduktion der Elektronentransportkette wird auch von Endo *et al.*, (1999) für den Phänotyp der untersuchten NDH-B-Mutante verantwortlich gemacht. Die NDH-B-Mutante konnte sich im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr vor einer starken Belichtung schützen und zeigte bleibende chlorotische Flecken.

Die Überreduktion der Elektronentransportkette hat neben der Inhibition des Photosystems I auch die Bildung von Sauerstoffradikalen zur Folge (Harbinson & Hedley, 1989; Innoue, 1989). Die Sauerstoffradikale bilden sich, wenn für die auflaufenden Elektronen keine Akzeptoren in Form oxidierten Reduktionsäquivalente zur Verfügung stehen.

Die Chlororespiration, an der der NDH-Komplex möglicherweise beteiligt ist, trägt nach dem Modell von Casano *et al.* (2000) durch die Reduktion des Plastochinonpools über Wasserstoffperoxid mit Hilfe einer Chinol-Oxidase zur Eliminierung von Radikalen bei. Ein weiterer Beleg für eine Rolle des NDH-Komplexes bei photooxidativem Stress ist der Anstieg der Proteinspiegel von NDH-A (Martin *et al.*, 1996), NDH-B und NDH-F (Casano *et al.*, 2001) unter entsprechenden Bedingungen..

Durch eine Funktion als Einspeisungspunkt für Elektronen in den Plastochinonpool käme dem NDH-Komplex eine Rolle in der „Photosynthetischen Kontrolle“ zu. Die „Photosynthetische Kontrolle“ umfasst Prozesse, die dazu beitragen, die Reaktionen an der Thylakoidmembranen zu modulieren, um ATP und NADPH mit einer Rate zu synthetisieren, die für einen effektiven Einsatz in der Kohlenstofffixierung benötigt wird (Foyer *et al.*, 1990). Dabei spielt der Redoxzustand des Plastochinonpools eine zentrale Rolle, der bei einer Beteiligung des NDH-Komplexes am zyklischen Elektronentransport über diesen mitreguliert werden kann. So bleibt der Plastochinonpool in der Dunkelphase teilreduziert, um bei der Wiederbelichtung Elektronen bereitzustellen, damit die lineare Elektronentransportkette schneller aktiviert werden kann. Die dazu benötigten Reduktionsäquivalente stammen aus dem Stärkeabbau und den Mitochondrien. Des weiteren stellt der Plastochinonpool den Schnittpunkt zwischen zyklischen und linearen Elektronentransport und der Chlororespiration mit den bereits diskutierten Aspekten dar. Der Plastochinonpool ist aber nicht nur ein Elektronenüberträger zwischen dem Photosystem II und dem Cytochrom b₆/f - Komplex, sondern wirkt auch bei der Regulation der „state-transition“ mit (Williams & Allen, 1987; Allen, 1995). Dabei handelt es sich um die Verschiebung von Teilen der Lichtsammelkomplexe vom Photosystem II zum Photosystem I, um die absorbierte Energie besser auf beide Photosysteme zu verteilen und die Elektronentransportkette vor einer Überreduktion zu schützen. Des weiteren konnte für das Plastochinon eine wichtige Rolle in der Carotinoidbiosynthese (Norris *et al.*, 1995) und somit im Schutz vor photooxidativen Stress nachgewiesen werden.

Insgesamt lässt sich aus den Beobachtungen dieser und der zitierten Arbeiten das in Abbildung 56 dargestellte Modell ableiten.

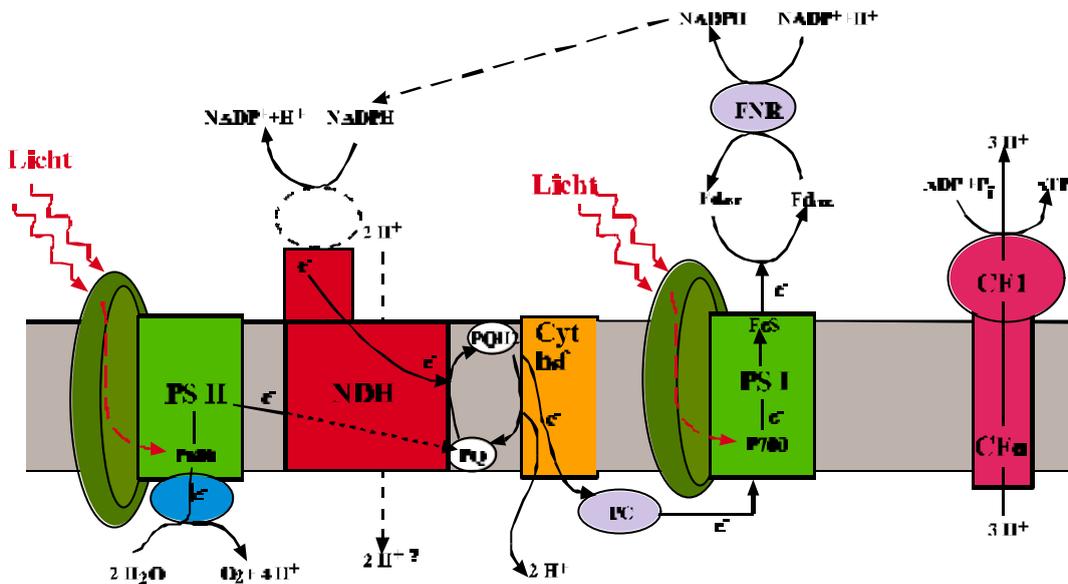


Abb. 56: Modell der Thylakoidmembran und des linearen und zyklischen Elektronentransports mit dem NDH-Komplex.

Dargestellt sind die Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette und die ATPase, sowie der Weg der Elektronen im linearen und zyklischen Elektronentransport.

PS II: Photosystem II, PS I: Photosystem I, Cyt b₆/f: Cytochrom b₆/f, PQ: Plastochinon, PQH: Plastohydrochinon, PC: Plastocyanin, P680 / P700: Reaktionszentren der Photosysteme, Fd_{red/oxd}: Ferredoxin reduziert / oxidiert, FNR: Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase, CF₀ / CF₁: Subkomplexe der ATPase; NDH: NDH-Komplex

6. Mögliche Ursachen für den geringen Anteil des NDH-Komplexes an den Thylakoidmembranproteinen, bzw. dem Fehlen des NDH-Komplexes

Der NDH-Komplex hat an den gesamten Thylakoidmembranproteinen nur einen Anteil von 0,1 % bis 0,2 % (Burrows *et al.*, 1998; Sazanov *et al.*, 1998), d.h. auf einen NDH-Komplex kommen 50-100 Photosysteme II. Die Interaktion zwischen dem NDH-Komplex und der photosynthetischen Elektronentransportkette, speziell dem Plastochinonpool, lässt sich durch das von Lavergne und Joliot (1991) postulierte Mikrodomänenmodell erklären. Aufgrund des Diffusionsverhaltens von Plastochinon in der Thylakoidmembran wird eine Organisation der Thylakoidmembranproteine in Mikrodomänen postuliert. In diesem Modell sind circa 70 % der Photosysteme II in kleinen Domänen organisiert, die von den übrigen Transmembrankomplexen umgeben sind. Die Mehrzahl der Domänen werden aus den kleinen Domänen mit nur 1 - 2 Photosystemen II gebildet. Pro Photosystem II werden 3-4 Plastochinone, d.h. 6-8 Elektronen, postuliert. Nur ein kleiner Anteil der Domänen besitzt mehr als 10 Photosysteme II. In jeder dieser Domäne kann sich das Plastochinon schnell genug bewegen, um die berechnete Elektronentransportgeschwindigkeit zu gewährleisten. Somit teilen sich mehrere Photosysteme II und Cytochrom b₆/f -Komplexe einen kleinen Plastochinonpool. Über eine mögliche Rolle der Mikrodomänen bei der Kontrolle des Elektronentransports wird diskutiert (Lavergne & Joliot, 1991; Joliot *et al.*, 1992; Kirchhoff *et al.*, 2000). Liegen die Proteine der Thylakoidmembran in diesen Domänen organisiert vor und mehrere Elektronentransportketten teilen sich einen Plastochinonpool, ließe sich auch die geringe Menge des NDH-Komplexes erklären.

In Algenplastomen, mit Ausnahme von *Nephroselmis olivacea*, in Plastomen parasitärer Pflanzen und bei *Pinus thunbergii* sind die *ndh*-Gene gar nicht oder nur als Pseudogene nachweisbar. Laut Wakasugi *et al.* (1997) könnten die Algen ihre *ndh*-Gene im Laufe der Evolution in den Kern verlagert haben, obwohl es dafür noch keine Hinweise gibt.

Im Falle der parasitären Pflanzen lässt sich das Fehlen des NDH-Komplexes durch das Fehlen der Photosynthese erklären, womit dies ein indirekter Beleg für die Beteiligung des NDH-Komplexes an der Photosynthese darstellt. In Algen und bei *Pinus thunbergii* müsste das Fehlen eines funktionsfähigen NDH-Komplexes, nach dem oben vorgestellten Modell, eine fehlende oder eingeschränkte Regulation der Elektronentransportkette bei wechselnden Lichtbedingungen zur Folge haben.

Eine mögliche Erklärungen, weshalb Algen und *Pinus thunbergii* ohne NDH-Komplex auskommen, wäre in anderen Anpassungen an wechselnde Lichtbedingungen zu suchen. So ist z.B. von vielen Algen bekannt, dass sie ihr Schwebeverhalten im Wasser beeinflussen können und bei höheren Lichtintensitäten tiefere Wasserschichten aufsuchen (Long & Humphries, 1994). Bei *Pinus thunbergii* wurde beobachtet, dass die Pflanze bei höheren Lichtintensitäten die Lichtsammelkomplexe des Photosystems II in der Art reorganisiert, dass sie überschüssige Lichtenergie wieder als Wärme abstrahlen (Ottander *et al.*, 1995). Außerdem kann *Pinus thunbergii* zum Schutz des Photosystems II verstärkt Anthocyane in die Epidermiszellen der Nadeln einlagern (Gould, 1996). Aufgrund dieser Anpassungen sind die Algen und *Pinus thunbergii* möglicherweise nicht mehr auf einen NDH-Komplex angewiesen und haben daher die entsprechenden Gene möglicherweise während der Evolution eliminiert.

Insgesamt konnte durch die Untersuchungen der NDH-Mutanten die Annahme erhärtet werden, dass der NDH-Komplex am zyklischen Elektronentransport um das Photosystem I beteiligt ist. Außerdem könnte der Komplex durch seine Fähigkeit, den Redoxzustand des Plastochinonpools zu beeinflussen, möglicherweise an der Chlororespiration und an Schutzmechanismen bei photooxidativem Stress beteiligt sein.

V. Zusammenfassung

Cyanobakterien und Plastiden höherer Pflanzen enthalten in ihrem Genom elf Gene (*ndhA-K*), welche die Untereinheiten des NDH-Komplexes kodieren. Dieser Enzymkomplex ist dem Komplex I aus der mitochondriellen Atmungskette homolog.

Für seine physiologische Funktion in den Plastiden werden zwei Modelle diskutiert. Zum einen wird die Beteiligung am zyklischen Elektronentransport um das Photosystem I diskutiert. Zum anderen wird eine Beteiligung an der Chlororespiration vermutet. In beiden Modellen dient der NDH-Komplex als Einschleusungspunkt von Elektronen in den Plastochinonpool.

Um den NDH-Komplex näher zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Gene *ndhA* / *-E* / *-G* / *-H* / *-I* mittels einer Spectinomycin-Resistenzkassette mutagenisiert. Zusammen mit den zur Verfügung gestellten Transformante aus Kofer *et al.* (1998) und Steinmüller *et al.* (1998) standen somit für alle *ndh*-Gene, bis auf *ndhB*, Tabaktransformanten zur Verfügung.

Im Habitus unterschieden sich die Transformanten deutlich vom Wildtyp. Sie zeichneten sich durch eine sehr frühe Blütenbildung, lange Internodien, Bildung langer Seitentriebe und einer reduzierten Fertilität aus. Am Ende ihrer Wachstumsphase waren sie deutlich kleiner als der Wildtyp zum Ende seiner Wachstumsphase, und wiesen eine stark reduzierte Blattanzahl auf.

Die physiologische Charakterisierung der photosynthetischen Elektronentransportkette erfolgte über die Messung der Chlorophyllfluoreszenz und der P700-Redoxkinetiken.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz zeigte deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten. Allen NDH-Mutanten fehlte der transiente Dunkelanstieg nach Abschalten des aktinischen Lichtes. Dieser Dunkelanstieg wird als Reduktion des Plastochinonpools durch Oxidation von Reduktionsäquivalenten aus der Lichtphase interpretiert. Das Fehlen des Dunkelanstiegs kann somit als Hinweis auf die Funktion des Komplexes als Einschleusungspunkt für Elektronen in den Plastochinonpool gelten.

Bei der Untersuchung der photosynthetischen Elektronentransportkette und der Photosysteme ergab sich keine Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit des Photosystems II. Bei den Mutanten konnte jedoch auch unter moderaten Anzuchtbedingungen eine schnellere Reoxidation des Primärakzeptors Q_A und ein verstärkter Elektronenfluss beobachtet werden. Außerdem zeigte die Energetisierung der Thylakoidmembran Unterschiede zwischen Wildtyp und NDH-Mutanten.

Die Redoxkinetiken des Photosystems I zeigten für die Transformanten in allen Anzuchten eine deutlich stärkere Reduktion des Photosystems I in der Lichtphase als im Wildtyp. Auch die Rereduktionszeit des P700 in der Dunkelphase war in den Transformanten deutlich länger als im Wildtyp. Die verlängerte Rereduktionszeit und der höhere Reduktionsgrad des Photosystems I lassen auf eine Beeinträchtigung des zyklischen Elektronentransports schließen.

Die Analyse des physiologischen Zustands der photosynthetischen Elektronentransportkette lieferte weitere Hinweise für die Fähigkeit des NDH-Komplexes, Elektronen in den Plastochinonpool einzuspeisen und für eine Beteiligung am zyklischen Elektronentransport. Durch die Möglichkeit, den Redoxzustand des Plastochinonpools zu beeinflussen, könnte der NDH-Komplex auch an der sogenannten photosynthetischen Kontrolle teilnehmen. Die photosynthetische Kontrolle umfasst Prozesse, die dazu beitragen, die Reaktionen an der Thylakoidmembranen so zu modulieren, dass ATP und NADPH mit einer Rate synthetisiert werden, die für einen effektiven Einsatz in der Kohlenstofffixierung benötigt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der NDH-Komplex nicht essentiell für die Pflanze ist, da sich alle elf Gene ausschalten lassen. Die beobachteten Veränderungen deuten aber darauf hin, dass der NDH-Komplex an der Feinregulation des photosynthetischen Elektronentransports teilnimmt.

VI. Literatur

Adams W, Hoehn A, Demming-Adams B (1995): Chilling temperatures and the xanthophyll cycle. A comparison of warmgrown and overwintering spinach. *Aust J Plant Physiol*, 22, 75-85

Albertsson PA (1995): The structure and function of the chloroplast photosynthetic membrane – a model for the domain organization. *Photosynthesis Res* 46, 141-149

Allen JF (1993): Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol*, 165, 609-631

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

Anderson JM (1986): Photoregulation of the composition, function and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 37, 93-136

Appel J, Schulz R (1996): Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex I). *Biochim Biophys Acta*, 1298, 141-147

Appel J, Schulz R (1998): Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising? *J Photochem Photobiol B: Biol*, 47, 1-11

Appel J, Phunpruch S, Steinmüller K, Schulz R (2000): The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol*, 173, 333-338

Arizmendi JM, Runswick MJ, Skehel JM, Walker JE (1992): NADH-ubiquinone-oxidoreductase from bovine heart mitochondria. A fourth nuclear encoded subunit with a homologue encoded in chloroplast genomes. *FEBS* 301, 237-242

Arnon DI (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*. 24, 1-15

Arnon DI, Allen MB, Whately FR (1954): Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature*, 174, 394-396

Asada K, Heber U, Schreiber U (1993): Pool size of electrons that can be donated to P700⁺, as determined in intact leaves: Donation to P700⁺ from stromal components via the intersystem chain. *Plant Cell Physiol.*, 33(7), 39-50, (1993)

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

Ayliffe MA, Timmis JN (1992): Plastid DNA sequence homologies in the tobacco nuclear genome. *Mol Gen Genet* 236, 105-112

Backhausen JE, Emmerlich A, Holtgreffe S, Horton P, Nast G, Rogers JJM, Müller-Röber B, Scheibe R (1998): Transgenic potato plants with altered expression levels of chloroplast NADP-malate dehydrogenase: interactions between photosynthetic electron transport and malate metabolism in leaves and in isolated intact chloroplasts. *Planta*, 207, 105-114

Backhausen JE, Scheibe R (1999): Adaptation of tobacco plants to elevated CO₂: influence of leaf age on changes in physiology, redox states and NADP-malate dehydrogenase activity. *J Exp Bot* 50(334), 665-675

Baier M, Dietz KJ (1999): Alkyl hydroperoxidase reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. *Trends Plant Sci*, 4, 166-168

Bakels RHA, van Walraven HS, Scholts MJC, Krab K, Kraayenhof R (1993): On the activation mechanism of the H(+)-ATP synthase and unusual thermodynamic properties in the alkaliphilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Eur J Biochem* 213, 957-964

- Bendall DS, Manasse R S (1995):** Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1229, 23-38
- Bendich AJ (1987):** Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays* 6, 279-282
- Bennoun P (1982):** Evidence for a respiratory chain in the chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4342-4356
- Bennoun P (1994):** Chlororespiration revisited: mitochondrial-plastid interactions in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* 1186, 59-66
- Berger S, Ellersiek U, Steinmüller K (1991):** Cyanobacteria contain a mitochondrial complex I-homologous NADH-dehydrogenase. *FEBS*, 286, 129-132
- Berger S (1992):** Charakterisierung einer Komplex I - homologen NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreduktase in Cyanobakterien und Plastiden. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Berger S, Ellersiek U, Kinzelt D, Steinmüller K (1993):** Immunopurification of a subcomplex of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreduktase from the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. *FEBS*, Vol. 326, 246-250
- Berger S, Ellersiek U, Westhoff P, Steinmüller K (1993):** Studies on the expression of NDH-H, a subunit of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreduktase of higher-plant chloroplasts. *Planta*, 190, 25-31
- Bergman P, Edqvist J, Farbos I, Glimelius (2000):** Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial *atp1* transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant Mol Biol*, 42, 531-544
- Berry J, Björkmann O (1980):** Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 31, 491-543
- Berry S, Rumberg B (1999):** Proton to electron stoichiometry in electron transport of spinach thylakoids. *Biochim Biophys Acta*, 1410, 248-261
- Berthesda Research Laboratories (1986):** BRL pUC host: E.coli DH5 α competent cells. *Focus*, 8:9
- Bilger W, Schreiber U (1986):** Energy dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth Res.* 10, 303-308
- Bilger W, Björkman O (1990):** Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth res* 25, 173-185
- Birnboim HC, Doly (1979):** A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1524
- Björkman O, Demming B (1987):** Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489-504
- Björkmann O, Demming-Adams B (1994): **Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion and dissipation in leaves of higher plants.** In: *Ecophysiology of Photosynthesis. Ecological Studies 100* Schulze ED, Caldwell MM (eds), 17-47, Springer, Berlin
- Böhm R, Sauter M, Böck A (1990):** Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol Microbiol*, 4, 231-243
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson AR, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988):** Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectils. *Science* 240, 1534-1538

Bradbury M und Baker NR (1983): Analysis of the induction of chlorophyll fluorescence in leaves and isolated thylakoids: contributions of photochemical and nonphotochemical quenching. Proc R Soc Lond B Sci 220, 251-264

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72, 248-254

Brangeon J, Sabar M, Gutierrez S, Combettes B, Bove J, Gendy C, Chétrit P, Colas des Francs-Small C, Pla M, Vedel F, De Paepe R (2000): Defective splicing of the first *nad4* intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS 1 nuclear mutant. Plant J, 21, 269-280

Braun M, Bungert S, Friedrich T (1998): Characterization of the overproduced NADH dehydrogenase fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. Biochemistry, 37, 1861-1867

Briantais JM, Vernotte C, Picaud M, Krause GH (1979): A quantitative study of the slow decline of chlorophylla fluorescence in isolated chloroplasts. Biochem Biophys Acta 548, 128-138

Briantais JM, Vernotte C, Krause GH, Weis E (1986): Chlorophyll a fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In: Light Emission by Plants and Bacteria. Govindjee, Ames J, Fork DC (eds.), 539-583, Academic Press, Orlando

Büchel C, Zsíros O, Garab G (1998): Alternative cyanide-sensitive oxidase interacting with photosynthesis in *Synechocystis PCC6803*. Ancestor of the terminal oxidase of chlororespiration? Photosynthetica, 35, 223-231

Bukhov NG, Wiese C, Neimanis S, Heber U (1999): Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: Leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. Photosynth Res, 59, 81-93

Burrows PA, Sazanov LA, Svab Z, Maliga P, Nixon PJ (1998): Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. EMBO J, 17, 868-876

Butler WL und Kitajima M (1975): Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. Biochim Biophys Acta 376, 116-125

Butler WL (1977): Chlorophyll fluorescence: A probe for electron transfer and energy transfer. In: Trebst A and Avron M (eds) Encyclopedia of Plant Physiology, Vol 5, 149-167, Springer Heidelberg

Campo del EM, Sabater B, Martin M (2000): Transcripts of the *ndhH-D* operon of barely plastids: possible role of unedited site III in splicing of the *ndhA* intron. Nucleic Acids Research, 28, 1092-1098

Canaani O, Schuster G, Ohad I (1989): Photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect on state transition, intersystem energy distribution and photosystem I cyclic electron flow. Photosynth Res, 20, 129-146

Canaani O (1990): The role of cyclic electron flow around photosystem I and excitation energy distribution between the photosystems upon acclimation to high ionic stress in *Dunaliella*. Photochem Photobiol, 52, 591-599

Casano LM, Martin M, Zapata JM, Sabater B (1999): Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. Plant Science, 149, 13-22

Casano LM, Zapata JM, Martin M, Sabater B (2000): Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. J Biol Chem, 275, 942-948

Casano LM, Martin M, Sabater B (2001): Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. Plant Physiol 125, 1450-1458

Chapmann KSR, Berry JA, Hatch MD (1980): Photosynthetic metabolism in bundle sheath cells of the C₄ species *Zea mays*: Sources of ATP and NADPH and the contribution of photosystem II. Arch Biochem Biophys, 202, 330-341

- Chandelier A, du Jardin P, Avril C, Paques M (1999):** Identification of mitochondrial plasmid-like DNAs in *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Rep*, 18, 841-847
- Church GM, Gilbert W (1984):** Genomic sequencing. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1994
- Clark MA, Baumann L, Baumann P (1997):** *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of aphids) contains nuoC(D) genes that encode subunits of NADH dehydrogenase. *Curr Microbiol*, 35, 122-123
- Cleland RE, Bendall DS (1992):** Photosystem I cyclic electron transport: measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity. *Photosyn. Res.*, 34, 409-418
- Congdon RW, Muth GW, Splittgerber AG (1993):** The binding interaction of Coomassie blue with proteins. *Anal. Biochem.* 213, 407-413
- Cook WB, Miles D (1992):** Nuclear mutations affecting plastoquinone accumulation in maize. *Photosynth Res*, 31, 99-111
- Corneille S, Cournac L, Guedeney G, Havaux M, Peltier G (1998):** Reduction of the plastoquinone pool by exogenous NADH and NADPH in higher plant chloroplasts. Characterization of a NAD(P)H-plastoquinone oxidoreductase activity. *Biochem Biophys Acta*, 1363, 59-69
- Cornic G, Bukhov NG, Wiese C, Bligny R, Heber U (2000):** Flexible coupling between light-dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plant. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta*, 210, 468-477
- Cournac L, Redding K, Ravenel J, Rumeau D, Josse EM, Kuntz M, Peltier G (2000):** Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem*, 275, 17256-17262
- Cramer WA, Furbacher PN, Szczepaniak A, Tae GS (1991):** Electron Transport between photosystem II and photosystem I. *Curr Top Bioenerg*, 16, 179-222
- Cramer WA, Soriano GM, Ponomarev M, Huang D, Zhang H, Martinez SE, Smith LJ (1996):** Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrom b₆/f complex of oxygenic photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 477-508
- Cuello J, Quiles MJ, Albacete ME, Sabater B (1995):** Properties of a large complex with NADH dehydrogenase activity from barely chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 36, 265-271
- Darrrouzet E, Issartel JP, Lunardi J, Dupuis A (1998):** The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Lett* 431, 34-38
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983):** A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 19-21
- Demel P (1995):** Transformation von Pflanzen durch Mikroprojekte: Methodische Gesichtspunkte und biologische Anwendungen. Inaugural-Dissertation Ludwig Maximilian Universität München
- Demming-Adams B, Adams WW (1996):** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21-26
- Douglas SE, Penny SL (1999):** The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: Complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol*, 48, 236-244
- Dupuis A, Skehel JM, Walker JE (1991):** A homologue of a nuclear-coded iron-sulfur protein subunit of bovine mitochondrial complex I is encoded in chloroplast genomes. *Biochemistry*, 30, 2954-296
- Dupuis A, Darrrouzet E, Duborjal H, Pierrad B, Chevallet M, von Belzen R, Albracht SPJ, Lunardi J (1998):** Distal genes of the *nuo* operon of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the mitochondrial ND subunits are all essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Mol Microbiol*, 28, 531-541

- Dzelzkalns VA, Obinger C, Regelsberger G, Niederhauser H, Kamensek M, Peschek GA, Bogorad L (1994):** Deletion of the structural gene for the NADH-dehydrogenase subunit 4 of *Synechocystis* 6803 alters respiratory properties. *Plant Physiol.*, 106, 1435-1442
- Eichelmann H, Price D, Badger M, Laisk A (2000):** Photosynthetic parameters of leaves of wild type and Cyt b_6/f deficient transgenic tobacco studied by CO₂ uptake and transmittance at 800nm. *Plant Cell Physiol*, 41, 432-439
- Elbethi A, Brasseur G, Lemesle-Meunier D (2000):** First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc₁ and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotropic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bact*, 182, 3602-3606
- Ellersiek U, Steinmüller K (1992):** Cloning and transcription analysis of the *ndh(A-I-G-E)* gene cluster and the *ndhD* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. *PCC 6803*. *Plant Mol Biol*, 20, 1097-1110
- Endo T, Mi H, Shikanai T, Asada K (1997):** Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 38 (11), 1272-1277
- Endo T, Shikanai T, Sato F, Asada K (1998):** NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 39 (11), 1226-1231
- Endo T, Shikanai T, Takabayashi A, Asada K, Sato Fumihiko (1999):** The role of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in photoprotection. *FEBS* 457, 5-8
- Farineau J (1999):** Study of the non-photochemical dark rise in chlorophyll fluorescence in pre-illuminated leaves of various C3 and C4 plants submitted to partial anaerobiosis. *Plant Physiol Biochem*, 37, 911-918
- Färber A (1997):** Regulation und Funktion des Xanthophyllzyklus höherer Pflanzen. Inaugural-Dissertation Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Färber A, Young AJ, Ruban AV, Horton P, Jahns P (1997):** Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. The relationship between zeaxanthin conversion and nonphotochemical fluorescence quenching. *Plant Physiol* 115, 1609-1618
- Färber A, Jahns P (1998):** The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization. *Biochem Biophys Acta* 1363, 47-58
- Fearnley IM, Runswick MJ, Walker JE (1989):** A homologue of the nuclear coded 49kd subunit of bovine mitochondrial NADH-ubiquinone reductase is coded in chloroplast DNA. *EMBO J.*, 8, 665-672
- Feild TS, Nedbal L, Ort DR (1998):** Nonphotochemical reduction of the plastoquinone pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant Physiol*, 116, 1209-1218
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983):** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13
- Finazzi G, Furia A, Barbagallo RP, Forti G (1999):** State transition, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1413, 117-129
- Finel M, Shekel JM, Albracht SPJ, Fearnley IM, Walker JE (1992):** Resolution of NADH-ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme. *Biochemistry*, 31, 11425-11434
- Finer JJ, Finer KR, Ponappa T (1999):** Particle Bombardment Mediated Transformation. In: *Plant Biotechnology: New Products and Applications, Current topics in Microbiology and Immunology* No. 240, Hammond J, McGarvey P, Yusibov V (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Fischer M, Funk E, Steinmüller K (1997):** The expression of subunits of the mitochondrial complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase during plastid development. *Z Naturforsch*, 52C, 481-486

- Foyer CH, Furbank R, Harbinson J, Horton P (1990):** The mechanisms contributing to photosynthetic control of electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynth Res*, 25, 83-100
- Fridlyand LE, Backhausen JE, Scheibe R (1998):** Flux control of the malate valve in leaf cells. *Arch Biochem Biophys Acta*, 349, 290-298
- Friedrich T, Steinmüller K, Weiss H (1995):** The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett*, 367, 107-111
- Friedrich T, Weiss H (1996):** Origin and evolution of the proton-pumping NADH-ubiquinone-oxidoreductase (complex I). In: *Origin and evolution of biological energy conversion*, K. Baltscheffsky (ed.), 205-220, VCH Publishers, New York
- Friedrich T, Scheide D (2000):** The respiratory complex I of bacteria, archae and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett*, 479, 1-5
- Funk E (1997):** Isolierung und Charakterisierung der plastidären NAD(P)H-Plastoquinon-Oxidoreduktase aus Mais. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Funk E, Schäfer E, Steinmüller K (1999):** Characterisation of the complex I-homologous NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase (NDH-complex) of maize chloroplasts. *J Plant Physiol*. 154, 16-23
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968):** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 49-56
- Gans P, Rebeille F (1990):** Control in the dark of the plastoquinone redox state by mitochondrial activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1015, 150-155
- Garab G, Lajko L, Mustardy L, Marton L (1989):** Respiratory control over photosynthetic electron transport in chloroplasts of higher-plant cells: evidence for chlororespiration. *Planta*, 179, 349-358
- Genty BE, Briantais JM, Baker NR (1989):** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta* 990, 87-92
- Genty BE, Harbinson J, Briantis J-M, Baker NR (1989a):** The relationship between non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and the rate of photosystem II photochemistry in leaves. *Photosynth. Res.* 25, 249-257
- Genty BE, Harbinson J (1996):** Regulation of light utilization for photosynthetic electron transport. In: *Photosynthesis and the Environment*. Baker NR (ed.), chapter 3, 67-99, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Gerst U, Schreiber U, Neimanis S, Heber U (1995):** Photosystem I-dependent cyclic electron flow contributes to the control of photosystem II in leaves when stomata close under water stress. In: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Mathis P (ed.), Vol II, 835-838, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Gilmore AM, Yamamoto HY (1991):** Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-encapped, lightly carbon-loaded C₁₈ high-performance liquid chromatographic column. *J. Chromatogr.* 543, 137-145
- Golds TJ, Maliga P, Koop HU (1993):** Stable plastid transformation in PEG treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology* 11, 95-97
- Goldschmidt-Clermont M (1991):** Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucl Acids Res* 19, 4083-4089
- Gould KS (1996):** Why leaves are sometimes red. *Nature*, 378, 241-242
- Govindjee (1995):** Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a fluorescence. *Aust J Plant Physiol* 22, 131-160

- Grigorieff N (1998):** Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J Mol Biol*, 277, 1033-1046
- Grohmann L, Rasmusson AG, Heiser V, Thieck O, Brennike A (1996):** The NADH-binding subunit of respiratory chain complex I is nuclear-encoded in plants and identified only in mitochondria. *Plant J*, 10, 793-803
- Groom QJ, Kramer DM, Crofts AR, Ort DR (1993):** The non-photochemical reduction of plastoquinone in leaves. *Photosynth Res*, 36, 205-215
- Gruissem W (1989):** Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on. *Cell* 56, 161-170
- Guedeney G, Corneille S, Cuiné S, Peltier G (1996):** Evidence für an association of *ndhB*, *ndhJ* gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett*, 378, 277-280
- Guénebaut V, Schlitt A, Weiss H, Leonard K, Friedrich T (1998):** Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol*, 276, 105-112
- Guéra A, Nova de PG, Sabater B (2000):** Identification of the Ndh (NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase) complex in etioplast membranes of barley: Changes during photomorphogenesis of chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 41, 49-59
- Haberhausen G, Valentin K, Zetsche K (1992):** Organization and sequence of photosynthetic genes from the plastid genome of the holoparasitic flowering plant *Cuscuta reflexa*. *Mol Gen Genet*, 232, 154-161
- Haisel D, Pospišilova J, Synková H, Èatský J, Wilhelmová N, Plzáková Š (1999):** Photosynthetic pigments and gas exchange of *in vitro* grown tobacco plants as affected by CO₂ supply. *Biologia Plantarum* 42 (3), 463-468
- Hallik RB (1989):** Proposals for the naming of chloroplast genes; II. update to the nomenclature of genes for thylakoid membrane polypeptides. *Plant Mol Biol Reporter*, 7, 266-275
- Hallik RB, Hong L, Drager RG, Favreau MR, Monfort A, Orsat B, Spielmann A, Stutz E (1993):** Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research*, 21, 3537-3544
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991):** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Meth. Enzymol.* 204, 63-113
- Hansen G, Wright MS (1999):** Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* 4 (6), 226-231
- Harbinson J, Woodward FI (1987):** The use of light-induced absorbance changes at 820 nm to monitor oxidation state of P700 in leaves. *Plant, Cell and Environment* 10, 131-140
- Harbinson J, Hedley CL (1989):** The kinetics of P-700⁺ reduction in leaves: in situ probe of thylakoid function. *Plant Cell Environ*, 9, 357-369
- Harris EH, Burkhardt BD, Gillham NW, Boynton JE (1989):** Antibiotic resistance mutations in the chloroplast 16S and 23S rRNA genes of *Chlamydomonas reinhardtii*: Correlation of genetic and physical maps of the chloroplast genome. *Genetics*, 123, 281-292
- Hatch MD (1987):** C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim Biophys Acta* 395, 81-106
- Hattersley PW, Watson L (1992):** Diversification of photosynthesis. In: *Grass evolution and domestication*. ed. , 38-116
- Havaux M (1996):** Short-term responses of photosystem I to heat stress. Induction of a photosystem II-independent electron transport through PS I fed by stromal components. *Photosynth Res*, 47, 85-97

- Havir EA, Tausta SL, Peterson RB (1997):** Purification and properties of violaxanthin de-epoxidase from spinach. *Plant Science* 123, 57-66
- Heber U, Walker D (1992):** Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.*, 100,1621-1626
- Heber U, Gerst U, Krieger A, Neimanis S, Kobayashi Y (1995):** Coupled cyclic electron transport in intact chloroplasts and leaves of C3 plants: Does it exist? If so, what is its function? *Photosynth Res*, 46, 269-275
- Hedtke B, Wagner I, Börner T, Hess WR (1999):** Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript level. *Plant J*, 19, 635-643
- Heiser W (1992):** Optimization of biolistic transformation using the helium-driven PDS-1000/He systems. *Bio-Rad Bulletin* # 1688
- Herter SM, Kortlüke CM, Drews G (1998):** Complex I of *Rhodobacter capsulatus* and its role in reverted electron transport. *Arch Microbiol*, 169, 98-105
- Hideg E, Kálai T, Hideg K, Vass I (1998):** Photoinhibition of photosynthesis *in vivo* results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry* 37, 11405-11411
- Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, Li YQ, Kanno A, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K, Sugiura M (1989):** The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastic DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet*, 217, 185-194
- Hirose T, Sugiura M (1997):** Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *EMBO J* 16, 6804-6811
- Hirose T, Kusumegi T, Tsudzuki T, Sugiura M (1999):** RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Mol Gen Genet*, 262, 462-467
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996):** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-684
- Horváth EM, Peter SO, Joet T, Rumeau D, Cournac L, Horváth GV, Kavanagh TA, Schafer C, Peltier G, Medgyesy P (2000):** Targeted inactivation of the plastid *ndhB* gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol*, 123, 1337-1349
- Hosler JP, Yocum CF (1987):** Regulation of cyclic photophosphorylation during ferredoxin-mediated electron transport. *Plant Physiol*, 83, 965-969
- Hundal T, Forsmark-Andrée P, Ernster L, Andersson B (1995):** Antioxidant activity of reduced plastoquinone in chloroplast thylakoid membranes. *Arch Biochem Biophys*, 324, 117-122
- Huner NPA, Maxwell DP, Gray GR, Savitch LV, Krol M, Ivanov G, Falk S (1996):** Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II. *Physiologica Plantarum* 98, 358-364
- Howe CJ, Beanland TJ, Larkum AWD, Lockhart PJ (1992):** Plastid origins. *TREE* 7, 378-383
- Inoue K, Fujii T, Yokoyama E, Matsuura K, Hiyama T, Sakurai H (1989):** The photoinhibition site of photosystem I in isolated chloroplasts under extremely reducing conditions. *Plant Cell Physiol*, 30, 65-71
- Ivanov B, Kobayashi Y, Bukhov NG, Heber U (1998):** Photosystem I-dependent cyclic electron flow in intact spinach chloroplasts: Occurrence, dependence on redox conditions and electron acceptors and inhibition by Antimycin A. *Photosynth Res*, 57, 61-70
- Joët T, Cournac L, Horvath EM, Medgyesy P, Peltier G (2001):** Increased sensitivity of photosynthesis to Antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiol* 125, 1919-1929

- Joliot P, Lavergne J, Béal D (1992):** Plastoquinone compartmentation in chloroplasts. I. Evidence for domains with different rates of photo-reduction. *Biochim Biophys Acta*, 1101, 1-12
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Malsuno A, Mauraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (1996):** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp. strain PCC6803*. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* 3, 185-209
- Kanno A, Hirai A (1993):** A transcription map of the chloroplast genome from rice (*Oryza sativa*). *Curr Genet*, 23, 166-174
- Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999):** systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in Arabidopsis. *Science*, 284, 654-657
- Kautsky H, Hirsch A (1931):** Neue Versuche zur Kohlensäurenassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964
- Kavanagh TA, Thanh ND, Lao ND, McGrath N, Peter OS, Horváth, Dix PJ, Medgyesy P (1999):** Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152, 1111-1122
- Kehr J, Hustiak F, Walz C, Willmitzer L, Fisahn J (1998):** Transgenic plants changed in carbon allocation pattern display a shift in diurnal growth pattern. *Plant J*, 16, 497-503
- Khandijan EW (1986):** UV crosslinking of RNA to nylon membranes enhances hybridization signals. *Molec. Biol. Rep.* 11, 107-115
- Kingston-Smith AH, Foyer CH (2000):** Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperature. *J Exp Bot*, 51, 123-130
- Kirchhoff H, Horstmann S, Weis E (2000):** Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion microdomains in thylakoids of higher plants. *Biochim Biophys Acta*, 1459, 148-168
- Klughammer C, Schreiber U (1994):** An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺ -absorbance changes at 830nm. *Planta* 192, 261-268
- Klughammer B, Sültemeyer D, Badger MR, Price GD (1999):** The involvement of NAD(P)H dehydrogenase subunits, NdhD3 and NdhF3, in high-affinity CO₂ uptake in *Synechococcus sp. PCC7002* gives evidence for multiple NDH-1 complexes with specific roles in cyanobacteria. *Mol Microbiol*, 32, 1305-1315
- Kobayashi Y, Kaiser W, Heber U (1995):** Bioenergetics of carbon assimilation in intact chloroplasts: Coupling of proton to electron transport at the ratio H⁺/e⁻=3 is incompatible with H⁺/ATP=3 in ATP synthesis. *Plant Cell Physiol*, 36, 1629-1637
- Kofer W, Eibl C, Steinmüller K, Koop HU (1998):** PEG-mediated plastid transformation in higher plants. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 34, 303-309
- Kofer W, Koop HU, Wanner G, Steinmüller K (1998):** Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J, and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plastome transformation. *Mol Gen Genet* 258, 166-173
- Koop HU, Kofer W (1995):** Plastid transformation by polyethylene glycol treatment of protoplasts and regeneration of transplastomic tobacco plants. In: Potrykus I, Spangenberg G (eds.) *Gene transfer to plants*, 75-82, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York
- Koop HU, Steinmüller K, Wagner H, Rössler C, Eibl C, Sacher L (1996):** Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* 199, 193-201
- Koop HU, Kofer W, Steinmüller K (1998):** Reply to „Judging the homoplastomic state of plastid transformants“ by P Maliga and P Nixon. *Trends Plant Sci.* 3, 376-377

- Kösling S (1996):** Untersuchungen zur Struktur und Funktion der NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreduktase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp PCC 6803*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Krause GH, Weis E (1984):** Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth Res* 5, 139-157
- Krause GH, Weis E (1991):** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42, 313-349
- Krieg P.R., Melton B.S. (1987):** In vitro RNA-synthesis with SP6 RNA polymerase. *Meth. Enzymol.* 155, 397-415
- Krömer S, Scheibe R (1996):** Function of the chloroplastic malate valve for respiration during photosynthesis. *Biochem Soc Trans*, 24, 761-766
- Kubicki A, Steinmüller K, Westhoff P (1994):** Differential transcription of plastome-encoded genes in the mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C₄ plants maize and *Sorghum*. *Plant Mol. Biol.* 25, 669-679
- Kubicki A, Funk E, Westhoff P, Steinmüller K (1996):** Differential expression of plastome-encoded *ndh* genes in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of the C₄ plant *Sorghum bicolor* indicates that the complex I-homologous NA(P)H-plastoquinone oxidoreductase is involved in cyclic electron transport. *Planta* 199, 276-281
- Kyhse-Andersen J (1984):** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209
- Laemmli UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-684
- Laisk A, Siebke K, Gerst U, Eichelmann H, Oja V, Heber U (1991):** Oscillations in photosynthesis are initiated and supported by imbalances in the supply of ATP and NADPH to the Calvin cycle. *Planta*, 185, 554-562
- Lazár D (1999):** Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochim Biophys Acta*, 1412, 1-28
- Lavergne J, Joliot P (1991):** Restricted diffusion in photosynthetic membranes. *TIBS*, 16, 129-134
- Lavergne J, Bouchard JP, Joliot P (1992):** Plastoquinone compartmentation in chloroplasts. II. Theoretical aspects. *Biochim Biophys Acta*, 1101, 13-22
- Leif H, Weidner U, Berger A, Spehr V, Braun M, Heek v. P, Friedrich T, Ohnishi T, Weiss H (1993):** *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I. *Bio Soc Trans*, 21, 998-1001
- Leif H, Sled VD, Ohnishi T, Weiss H, Friedrich T (1995):** Isolation and characterization of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 230, 538-548
- Lendzian K, Bassham JA (1975):** Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP⁺ ratios. *Biochim Biophys Acta*, 396, 260-275
- Löffelhardt W, Bohnert HJ (1994):** Structure and function of the cyanelle genome. *Int Rev Cytol* 151, 29-65
- Long SP, Hunphries S (1995):** Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 45, 633-662
- Lloyd JWB, Whelan WJ (1969):** An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. *Analyt. Biochem* 30, 467-470
- Maier RM, Hoch B, Zektz P, Kössel H (1992):** Internal editing of the maize chloroplast *ndhA* transcript restores codons for conserved amino acids. *The Plant Cell* 4, 609-616

- Maier RM, Nechermann K, Igloi GL, Kössel H (1995):** Complete sequence of the maize chloroplast genome: Gene content, hotspots of divergence, and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.* 251, 614-628
- Maliga P (1993):** Towards plastid transformation in flowering plants. *TIBTECH* 11, 101-107
- Maliga P, Nixon P (1998):** Judging the homoplasmic state of plastid transformants. *Trends Plant Sci*, 3, 376-377
- Malkin R, Chain RK (1980):** The relationship of the cyclic and non-cyclic electron transport pathways in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 591, 381-390
- Mano J, Miyake C, Schreiber U, Asada K (1995):** Photoactivation of the electron flow from NADPH to plastoquinone in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 36, 1589-1598
- Marienfeld J, Unseld M, Brennicke A (1999):** The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci*, 4, 495-502
- Martin M, Casano LM, Sabater B (1996):** Identification of the product of *ndhA* gene as a thylakoid protein synthesized in response to photooxidative treatment. *Plant Cell Physiol*, 37, 293-298
- Martin W, Herrmann RG (1998):** Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol*, 118, 9-17
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik K (1998):** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393, 162-165
- Matsubayashi T, Wakasugi T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Zaita N, Hidaka T, Meng BY, Ohto C, Tanaka M, Kato A, Maruyama T, Sugiura M (1987):** Six chloroplast genes (*ndhA-F*) homologous to human mitochondrial genes encoding components of the respiratory chain NADH dehydrogenase are actively expressed: determination of splice sites in *ndhA* and *ndhB* pre-mRNAs. *Mol Gen Genet*, 210, 385-393
- Matsuo M, Endo T, Asada K (1998):** Properties of the respiratory NAD(P)H dehydrogenase isolated from the cyanobacterium *Synechocystis PCC 6803*. *Plant Cell Physiol*, 39, 263-267
- Maxwell PC, Biggins J (1976):** Role of cyclic electron transport in photosynthesis as measured by the photoinduced turnover of P700 *in vivo*. *Biochemistry* 15, 3975-3981
- Maxwell K, Johnson GN (2000):** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J Exp Bot* 51 (345), 659-668
- Mehler AH (1957):** Studies on reactions of illuminated chloroplasts. 1. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys*, 33, 65-72
- Melis A (1999):** Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci*, 4, 130-135
- Mi H, Endo T, Schreiber U, Asada K (1992):** Donation of electrons from cytosolic components to the intersystem chain in the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 7002* as determined by the reduction of the P700⁺. *Plant Cell Physiol*, 33(8), 1099-1105
- Mi H, Endo T, Schreiber U, Ogawa T, Asada K (1992a):** Electron donation from cyclic and respiratory flows to the photosynthetic intersystem chain is mediated by pyridine nucleotide dehydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis PCC 6803*. *Plant Cell Physiol*, 33(8), 1233-1237
- Mi H, Endo T, Schreiber U, Ogawa T, Asada K (1994):** NAD(P)H-dehydrogenase-dependent cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis PCC 6803*: a study of dark-starved cells and spheroblasts. *Plant Cell Physiol*, 35(2), 163-173
- Mi H, Endo T, Ogawa T, Asada K (1995):** Thylakoid membrane-bound, NADPH-specific pyridine nucleotide dehydrogenase complex mediates cyclic electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. *Plant Cell Physiol.*, 36(4), 661-668

- Mitchell P (1961):** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-148.
- Monod C, Takahashi, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD (1994):** The chloroplast *ycf8* open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions. *EMBO J* 13(12), 2747-2754
- Morden CW, Wolfe KH, dePamphilis CW, Palmer JD (1991):** Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: Intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.* 10, 3281-3288
- Moss DA, Bendall DS (1984):** Cyclic electron transport in chloroplasts. The Q-cycle and the site of action of antimycin. *Biochim Biophys Acta*, 767, 389-395
- Murashige T, Skoog F (1962):** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497
- Neckermann K, Zeltz P, Igloi GL, Kössel H, Maier RM (1994):** The role of RNA-editing in conservation of start codons in chloroplast genomes. *Gene*, 146, 177-182
- Niyogi KK, Grossmann AR, Björkmann O (1998):** Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell*, 10, 1121-1134
- Niyogi KK (1999):** Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 333-359
- Niyogi KK (2000):** Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 455-460
- Nixon P, Kleoniki G, Coomber SA, Hunter CN, Dyer TA, Barber J (1989):** *psbG* is not a photosystem two but may be an *ndh* gene. *J. Biol. Chem.* 264, 14129-14135
- Noctor G, Rees D, Young A, Horton P (1991):** The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence and trans-thylakoid pH gradient in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 1157, 320-330
- Norris SR, Barrette TR, Della Penna D (1995):** Genetic dissection of carotenoid synthesis in Arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*, 7, 2139-2149
- Oczkowski M, Paszkiewicz J, Piatyszek M, Augustyniak H (1997):** Cloning and transcription analysis of the *ndhC-ndhK-ndhJ* genes of lupin plastid DNA. *Plant Science*, 127, 171-177
- Ogawa T (1991):** A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis sp. PCC 6803*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 4275-4279
- Ohkawa H, Price GD, Badger MR, Ogawa T (2000):** Mutation in *ndh* genes leads to inhibition of CO₂ uptake rather than HCO₃ uptake in *Synechocystis sp. Strain PCC 6803*. *J Bacteriol*, 182, 2591-2596
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H, Ozeki H (1986):** Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322, 572-574
- Ohyama K, Kochi T, Sano T, Yamada Y (1988):** Newly identified groups of genes in chloroplasts. *TIBS*, 13, 19-22
- Olmstead RG, Sweere JA, Wolfe KH (1993):** Ninety extra nucleotide in *ndhF* gene of tobacco chloroplast DNA: a summary of revision to the 1986 genome sequence. *Plant Mol Biol* 22, 1191-1193
- O'Neill C, Horváth GV, Horváth E, Dix PJ, Medygesy P (1993):** Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J* 3 (5), 729-738
- Ort DR, Melandri BA (1982):** Mechanism of ATP synthesis. In: *Photosynthetic Energy Conversion by Plants*. Govindji (ed.), Vol 1, 537-587, Academic Press, New York

- Ott T, Clarke J, Birks K, Johnson G (1999):** Regulation of the photosynthetic electron transport chain. *Planta*, 209, 250-258
- Ottander C, Campbell D, Öquist G (1995):** Seasonal changes in photosystem II organization and pigment composition in *Pinus sylvestris*. *Planta*, 197, 176-183
- Pearcy RW, Ehleringer J (1984):** Comparative ecophysiology of C3 and C4 plants. *Plant Cell Env.* 7, 1-13
- Peltier G, Ravenel J, Verméglio A (1987):** Inhibition of a respiratory activity by short saturating flashes in *Chlamydomonas*: evidence for a chlororespiration. *Biochim Biophys Acta*, 893, 83-90
- Peterson RB, Havie EA (2000):** A nonphotochemical-quenching-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* possessing normal pigment composition and xanthophyll-cycle activity. *planta* 210, 205-214
- Pilkington SJ, Skehel JM, Walker JE (1991):** The 30kilodalton subunit of bovine mitochondrial complex I is homologous to a protein coded in chloroplast DNA. *Biochemistry*, 30, 1901-1908
- Polle A (1996):** Mehler reaction: Friend or foe in photosynthesis? *Bot Acta*, 109, 84-89
- Powles SB, Björkman O (1982):** Photoinhibition of photosynthesis: effect on chlorophyll fluorescence at 77K in intact leaves and in chloroplast membranes of *Nerium oleander*. *Planta* 165, 97-107
- Price GD, Yu JW, v. Caemmerer S, Evans JR, Chow WS, Anderson JM, Hurry V, Badger MR (1995):** Chloroplast cytochrome b_6/f and ATP synthase and complexes in Tobacco: Transformation with antisense RNA against nuclear-encoded transcripts for the Rieske FeS and ATPd polypeptides. *Austr J Plant Physiol*, 22, 285-297
- Prentki P, Krish HM (1984):** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29, 303-313
- Prentki P, Binda A, Epstein A (1991):** Plasmid vectors for selecting IS1-promoted deletions in cloned DNA: sequence analysis of the Omega interposon. *Gene* 103, 17-23
- Quiles MJ, Albacete ME, Sabater B, Cuello J (1996):** Isolation and partial characterization of the NADH dehydrogenase complex from barely chloroplast thylakoids. *Plant Cell Physiol*, 37, 1134-1142
- Quiles MJ, Cuello J (1998):** Association of ferredoxin-NADP oxidoreductase with the chloroplastic pyridine nucleotide dehydrogenase complex in barely leaves. *Plant Physiol*, 117, 235-244
- Quiles MJ, Garcia A, Cuello J (1999):** Localisation of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex in stroma thylakoids from barely. *Plant Science*, 146, 17-25
- Randolph-Anderson B, Boynton JE, Dawson J, Dunder E, Eskes R, Gillham NW, Johnson A, Perlman PS, Suittie J, Heiser WC (1995):** Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. *Bio-Rad Bulletin # 2015*
- Rasmusson AG, Heiser V, Zabaleta E, Brennicke A, Grohmann L (1998):** Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1364, 101-111
- Ravenel J, Peltier G (1992):** Stimulation of the chlororespiratory electron flow by photosystem II activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1101, 57-63
- Rees D, Noctor GD, Ruban AV, Crofts J, Young AJ, Horton P (1992):** pH dependent chlorophyll fluorescence quenching in spinach thylakoids from light treated and dark adapted leaves. *Photosynth Res*, 31, 11-19
- Rochaix JD (1997):** Chloroplast reverse genetics: new insights into the function of plastid genes. *Trends Plant Sci.* 2 (11), 419-425
- Roldán M (1999):** Can chlororespiration in plants help to explain the controversial phenotype of *ndh* mutants? *Trends Plant Sci*, 4, 50-51

-
- Runswick MJ, Fearnley IM, Skehel JM, Walker JE (1991):** Presence of an acyl-carrier protein in NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett*, 286, 121-124
- Sager R (1962):** Streptomycin as amutagen for nonchromosomal genes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 48, 2018-2026
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sandford JC, Smith FD, Russell JA (1993):** Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth Enzymol* 217, 483-509
- Sazanov LA, Burrows P, Nixon PJ (1996):** Detection and characterization of a complex I-like NADH-specific dehydrogenase from pea thylakoids. *Biochem Soc Trans*, 24, 739-743
- Sazanov LA, Burrows PA, Nixon P (1998a):** The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: Isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 1319-1324
- Sazanov LA, Burrows PA, Nixon PJ (1998b):** The chloroplast Ndh complex mediates the dark reduction of the plastoquinone pool in response to heat stress in tobacco leaves. *FEBS Lett*, 429, 115-118
- Sazanov LA, Peak-Chew SY, Fearnley IM, Walker JE (2000):** Resolution of the membran domain of bovine complex I into subcomplexes: Implications for the structural organization of the enzym. *Biochemistry*, 39, 7229-7235
- Schantz R, Bogorad L (1988):** Maize chloroplast genes *ndhD*, *ndhE* and *psaC*. Sequences, transcripts and transcript pools. *Plant Mol Biol*, 11, 239-247
- Scheibe R (1990):** Light/dark modulation: regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Bot Acta*, 103, 327-334
- Scheibe (1991):** Redox-modulation of chloroplast enzy,es. *Plant Physiol*, 96, 1-3
- Scheller HV (1996):** In vitro cyclic electron transport in barely thylakoids follows two independent pathways. *Plant Physiol*, 110, 187-194
- Scherer S (1990):** Do photosynthetic and respiratory electron transport chains share redox proteins? *TIBS*, 15, 458-462
- Schleucher J, Vanderveer PJ, Sharkey TD (1998):** Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol*, 118, 1439-1445
- Schmitz O, Bothe H (1996):** The diaphorase subunit HoxU of the bidirectional hydrogenase as electron transferring protein in cyanobacterial respiration? *Naturwissenschaften*, 83, 525-527
- Schneider R, Brors B, Massow M, Weiss H (1997):** Fatty acid synthesis in mitochondria: a relic of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration. *FEBS Lett*. 407, 249-252
- Schreiber U (1983):** Chlorophyll fluorescence yield changes as a tool in plant physiology. I. The measuring system. *Photosynth Res* 4, 361-373
- Schreiber U (1986):** Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* 9, 261-272
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986):** Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10, 51-62
- Schreiber U, Bilger W (1987):** Rapid assesment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: *Plant response to stress*, Vol. G15, Tenhunen J.D. (ed.), 27-53, NATO ASI Series, Springer, Berlin, Heidelberg

- Schreiber U, Neubauer C, Klughammer C (1988):** New ways of assessing photosynthetic activity with a pulse modulation fluorometer. In: Applications of Chlorophyll Fluorescence. Lichtenthaler HK (ed.), 63-69
- Schreiber U, Klughammer C, Neubauer C (1988):** Measuring P700 absorbance changes around 800 nm with a new type of pulse modulation system. Z. Naturforsch. 43C, 686-698
- Schreiber U, Neubauer C (1990):** O₂-dependent electron flow, membrane energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. Photosynth Res, 25, 279-293
- Schreiber U, Bilger W (1993):** Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past ten years in retrospect. Progress in Botany 54, 151-173
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994):** Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis. In: Ecophysiology of Photosynthesis, Vol 100, Schulze ED, Caldwell MM, 49-70, Springer, Berlin
- Schreiber U, Endo T, Hualing M, Asada K (1995):** Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 36(5), 873-882
- Schulte U, Fieke W, Krüll C, Nehls U, Schmiede A, Schneider R, Ohnishi T, Weiss H (1994):** In vivo dissection of mitochondrial respiratory NADH-ubiquinone-oxidoreductase (complex I). Biochem. Biophys. Acta, 1187, 121-124
- Schulte U, Haupt V, Abelmann A, Fecke W, Brors B, Rasmussen T, Friedrich T, Weiss H (1998):** A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex. J Mol Biol, 292, 569-580
- Seaton GGR, Walker DA (1990):** Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. Proc R Soc Lond B 242, 29-35
- Shahak Y, Crowther D, Hind G (1981):** The involvement of ferredoxin-NADP⁺-reductase in cyclic electron transport in chloroplasts. Biochim Biophys Acta, 636, 234-243
- Sheveleva EV, Jensen RG, Bohnert HJ (2000):** Disturbance in the allocation of carbohydrates to regenerative organs in transgenic *Nicotiana tabacum* L.. J Exp Bot, 51, 115-122
- Shikanai T, Endo T, Hashimoto T, Yamada Y, Asada K, Yokota A (1998):** Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 95, 9705-9709
- Shimada H, Sugiura M (1991):** Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. Nucl Acids Res, 19, 983-995
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdo N, Shimada H, Sugiura M (1986):** The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organisation and expression. EMBO J. 5, 2043-2049
- Southern E (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517
- Spörlein B, Streubel M, Dahlfeld G, Westhoff P, Koop HU (1991):** PEG-mediated plastid transformation: a new system for transient gene expression assays in chloroplasts. Theor Appl Genet 82, 717-722
- Steinmüller K, Ley AC, Steinmetz AA, Sayre RT, Bogorad L (1989):** Characterization of the *ndhC-psbG-ORF157/159* operon of maize plastid DNA and of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Mol.Gen.Genet., 216, 60-69
- Steinmüller K, Ellersiek U, Bogorad L (1991):** Deletion of the *psbG1* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to the activation of the cryptic *psbG2* gene. Mol.Gen.Genet., 226, 107-112

- Steinmüller K (1992):** Nucleotide sequence and expression of the *ndhH* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Mol.Biol., 18, 135-137
- Steinmüller K (1992a):** Identifikation of a second *psaC* gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. Plant Mol Biol 20, 997-1001
- Steinmüller K, Kofer W, Koop H-U (1998):** Mutagenesis of genes encoding subunits of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco. In: Photosynthesis: Mechanisms and Effects, Garab G (ed.), Vol. III, 1963-1966, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Stiehl HH, Witt HT (1969):** Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis. Z Naturforsch, 246, 1588-1598
- Sugiura M (1992):** The chloroplast genome. Plant Mol. Biol. 19, 149-168
- Sugita M, Svab Z, Maliga P, Suigura M (1997):** Targeted deletion of *sprA* from the tobacco plastid genome indicates that the encoded small RNA is not essential for pre-16S rRNA maturation in plastids. Mol Gen Genet, 257, 23-27
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990):** Stable transformation of plastids in higher plants. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87, 8526-8530
- Svab Z, Harper EC, Jones JDG, Maliga P (1990a):** Aminoglycoside-3'-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology 14, 197-205
- Svab Z, Maliga P (1991):** Mutation proximal to the tRNA binding region of the Nicotiana plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin. Mol Gen Genet 228, 316-319
- Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, Soen SY, Franzén LG, Rochaix JD (1991):** Directed chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*: insertional inactivation of the *psaC* gene encoding the iron sulfur protein destabilizes photosystem I. EMBO J 10(8), 2033-2040
- Teicher B, Scheller HV (1998):** The NAD(P)H dehydrogenase in barley thylakoids is photoactivatable and uses NADPH as well as NADH. Plant Physiol, 117, 525-532
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 4350-4354
- Tran-Betcke A, Warnecke U, Böcker C, Zaborosch C, Friedrich B (1990):** Cloning a nucleotide sequence of the genes for the subunits of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. J Bacteriol, 172, 2920-2929
- Turmel M, Otis C, Lemieux C (1999):** The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: Insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 10248-10253
- Turpin DH, Bruce D (1990):** Regulation of photosynthetic light harvesting by nitrogen assimilation in the green alga *Selenastrum minutum*. FEBS Lett, 263, 99-103
- van Kooten O, Snel JFH (1990):** The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. Photosynth. Res. 25, 147-150
- van Thor J, Jeanjean R, Havaux M, Sjollem KA, Joset F, Hellingwerf KJ, Mathijs HCP (2000):** Salt shock-inducible photosystem I cyclic electron transfer in *Synechocystis* PCC 6803 relies on binding of ferredoxin:NADP⁺ reductase to the thylakoid membranes via its CpcD phycobilisome-linker homologous N-terminal domain. Biochim Biophys Acta, 1457, 129-144
- Vera A, Matsubayashi T, Sugiura M (1992):** Active transcription from a promoter positioned within the coding region of a divergently oriented gene: the tobacco chloroplast *rpl32* gene. Mol Gen Genet 233, 151-156
- Vera A, Suigura M (1994):** A novel RNA gene in the tobacco plastid genome: its possible role in the maturation of 16S rRNA. EMBO J, 13, 2211-2217

- Videira A, Tropschug M, Werner S (1991):** Primary structure and expression of a nuclear-encoded subunit of complex I homologous to proteins specified by the chloroplast genome. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 171, 1168-1174
- Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M (1994):** Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 9794-9798
- Wakasugi T, Nagai T, Kapoor M, Sugita M, Ito M, Ito S, Tsudzuki J, Nakashima K, Tsudzuki T, Suzuki Y, Hamada A, Ohta T, Inamura A, Yoshinaga K, Sugiura M (1997):** Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: The existence of genes possibly involved in chloroplast division. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 5967-5972
- Walker D (1992):** Excited leaves. *Transley Reviews No. 36. New Phytol* 121, 325-345
- Walker JE (1992):** The NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quart.Rev.Biophys.*, 25, 253-324
- Walker JE, Arizmendi JM, Dupuis A, Fearnley IA, Finel M, Medd SM, Pilkington SJ, Runswick MJ, Skehel JM (1992):** Sequences of 20 subunits of NADH-ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. *J.Mol.Biol.*, 266, .1051-1072
- Walters RG, Horton P (1991):** Resolution of components of nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* 27, 121-133
- Weis E, Berry J (1987):** Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem Biophys Acta* 894, 198-208
- Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D (1991):** The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, 197, 563-576
- Weiss H, Friedrich T (1991):** Redox-linked proton translocation by NADH-ubiquinone-reductase (complex I). *J. Bioenerget. Biomembr.*, 23, 743-754
- Wieckowski S, Bojko M (1997):** The NADPH-dependent electron flow in chloroplasts of the higher plants. *Photosynthetica*, 34, 481-496
- Williams WP & Allen JF (1987):** State 1/state 2 changes in higher plants and algae. *Photosynth Res*, 13, 19-45
- Wolfe KH, Morden CW, Palmer JD (1991):** Ins and outs of plastid genome evolution. *Curr Opin Gen Develop*, 1, 523-529
- Yagi T (1991):** Bacterial NADH-quinon oxidoreductases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 23, 211-225
- Yagi T (1993):** The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1141, 1-17
- Yin ZH, Siebke K, heber U (1991):** Light dependent pH changes in leaves of C3 plants. IV. Action spectra indicate indirect energetisation of proton transport into mesophyll vacuoles by cyclic phosphorylation. *Planta*, 185, 30-34
- Yokoi F, Vassileva A, Hayashida N, Torazawa K, Wakasugi T, Sugiura M (1990):** Chloroplast ribosomal protein L32 is encoded in the chloroplast genome. *FEBS* 276, 88-90
- Young AJ, Frank HA (1996):** Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *J Photochem Photobiol B*, 36, 3-11

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei

Herrn PD Dr. Klaus Steinmüller für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese interessante Themenstellung zu bearbeiten. Ferner für seine Diskussionsbereitschaft und den Freiraum, den er mir bei meiner Arbeit gelassen hat.

Herrn Prof. Dr. H. Weiss für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff, an dessen Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie diese Arbeit entstand, für sein Interesse an meiner Arbeit und die Gespräche auch abseits der Wissenschaft. Er konnte mir zwar die französischen Rotweine näherbringen, nicht aber die Apple-Computer.

Frau Dr. Waltraud Kofer von der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Transformation der Tabakpflanzen. Dabei nicht zu vergessen ihr Pendelverkehr zwischen Düsseldorf und München mit den Tragetaschen voller Pflanzen sowie die langen Gespräche rund um die Transformanten und das Leben in München.

den Mitgliedern des „Maislabor“ und des Schreibraums, insbesondere bei Susanne Paradies und Henning Plücken. Eure Herzlichkeit und die Anteilnahme an Höhen und Tiefen haben dazu beigetragen, dass ich mich in all der Zeit sehr wohl gefühlt habe.

den übrigen Mitgliedern der Botanik IV, vor allem des Hauptlabors, für die fachlichen und weniger fachlichen Gespräche, die das gemeinsame Arbeiten und Feiern im Institut so angenehm gemacht haben.

Thomas Graßes und Carina Barth aus dem Institut für Biochemie der Pflanzen für das Durchschleusen der vielen, vielen Proben durch die HPLC und die Zeit, um mit mir die Ergebnisse zu diskutieren.

Herrn Rogmann stellvertretend für alle Mitarbeiter des Gewächshauses für die liebevolle und zeitaufwendige Pflege meiner Tabakpflanzen vom Samen bis in den Autoklaven.

meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich stets durch ihr Interesse und ihre Anteilnahme unterstützt haben

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Dani, zuerst haben wir uns den Laboralltag geteilt, jetzt teilen wir unser Leben. Ihre Zuneigung und ihre Energie haben mir oft geholfen und mich immer wieder neu motiviert.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Duisburg, Juni 2001