



Untersuchungen zur Regulation der Zeaxanthin Epoxidation in höheren Pflanzen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sylvia Niczyporuk
aus Essen

Düsseldorf, Mai 2009

aus dem Institut für Biochemie der Pflanzen
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Apl. Prof. Dr. Peter Jahns
Koreferent: Univ. Prof. Dr. Margarete Baier

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2009

1 Einleitung	6
1.1 Die Grundlagen der Photosynthese	6
1.2 Aufbau des Photosystem II	8
1.3 Aufbau des Photosystem I	9
1.4 Lichtsammelkomplexe	10
1.5 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	11
1.6 Schutzmechanismen vor photooxidativer Schädigung	12
1.6.1 <i>state transitions</i> (qT)	13
1.6.2 Energie- oder Δ pH-abhängige Löschung (qE)	14
1.6.3 Photoinhibition (qI)	14
1.6.4 Photoprotektive Funktion der Carotinoide	15
1.7 Carotinoid- und Abscisinsäure-Biosynthese	16
1.8 Funktion der Abscisinsäure	17
1.9 Regulation und Funktion des Xanthophyllzyklus	18
1.10 Die Zeaxanthin Epoxidase	19
1.11 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Enzyme	23
2.1.3 Nährmedien und Platten	23
2.1.4 Bakterienstämme	24
2.1.5 Plasmide	24
2.1.6 Oligonukleotide	25
2.1.7 Pflanzenmaterial	26
2.1.8 Computeranalysen	26
2.2 Anzuchtbedingungen für <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
2.3 Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA	27
2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA	27
2.3.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase (Erststrangsynthese)	27
2.3.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	28
2.3.6 Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel	28
2.3.7 Gerichtete TOPO - Klonierung	28
2.3.8 LR-Rekombinationsreaktion	28
2.3.9 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	28

2.3.10 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmiden	28
2.3.10.1 Transformation über Hitzeschock	29
2.3.10.2 Transformation über Elektroporation	29
2.3.11 Isolierung von Plasmid-DNA	29
2.3.11.1 Plasmid-Mini-Präparation mit dem NucleoSpin-Plasmid	29
2.3.11.2 Plasmid-Midi-Präparation mit dem QIAGEN-Plasmid Midi Kit	29
2.3.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.3.12.1 Konzentrationsbestimmung über photometrische Messung	29
2.3.12.2 Konzentrationsbestimmung auf einem Agarose-Gel	29
2.3.13 Herstellung elektrokompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen (DH5 α)	30
2.3.14 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien (GV3101)	30
2.3.16 Southern Blot – Analyse mittels DIG-Sonden-Hybridisierung	30
2.3.17 Quantitative Real – Time PCR	31
2.4 Biochemische Methoden	34
2.4.1 Isolation von Thylakoiden aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.4.2 Isolation intakter Chloroplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
2.4.3 Chlorophyll-Bestimmung (nach Arnon, 1949)	34
2.4.4 Epoxidation	35
2.4.5 Isolation der VDE aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.4.6 De-epoxidation	36
2.4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	36
2.4.8 Heterologe Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	38
2.4.9 Isolierung von Gesamtprotein aus <i>Arabidopsis</i>	38
2.4.10 Isolierung von Membranprotein aus <i>Arabidopsis</i>	39
2.4.11 Proteinbestimmung mit dem Standard Assay von BioRad	39
2.4.12 Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	40
2.4.13 HA (Hämagglutinin)-Affinitätschromatographie	40
2.4.14 Solubilisierung von Proteinaggregaten (<i>Inclusion Bodies</i>)	41
2.4.15 Protein-Rückfaltung mittels Verdünnungen	41
2.4.16 Dialyse	41
2.4.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.4.12 Western-Blot-Analyse	43
2.5 Pflanzenphysiologische Methoden	44
2.5.1 Bestimmung der Fluoreszenzlöschungskoeffizienten	44
2.5.2 Messung der Photoinhibition anhand des FV/FM-Verhältnisses	46
3 Ergebnisse	48

3.1 Heterologe Überexpression der <i>ZE</i> in <i>Escherichia coli</i>	48
3.2 Herstellung von <i>AtZEP</i> -Überexpressionskonstrukten für <i>Arabidopsis</i>	50
3.3 <i>In planta</i> Transformation und Selektion transgener <i>35S::AtZE</i> -Pflanzen	53
3.4 Pigmentanalyse der transformierten <i>npq2</i> - und WT Col-0-Pflanzen in der T ₂ -Generation	54 54
3.5 Molekulare und genetische Charakterisierung der transgenen <i>Arabidopsis</i> - Linien <i>48</i> , <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	56 56
3.6 Wachstum und Morphologie der transgenen Linien <i>48</i> , <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	59
3.7 Nachweis der T-DNA-Integration in das <i>VDE</i> -Gen der Linie <i>48</i>	60
3.8 Aufreinigung der <i>AtZE1</i> mittels Affinitätschromatographie	61
3.9 Untersuchung unterschiedlicher Pigmentphänotypen der Linie <i>16</i>	63
3.10 Untersuchung der <i>in vivo</i> -De-epoxidation in den transgenen Linien <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	66
3.11 Analyse der <i>in vivo</i> -Epoxidation der transgenen Linien <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	68
3.12 Fluoreszenzlöschung in den transgenen Pflanzen	70
3.13 Lichtabhängige Regulation der Zeaxanthin Epoxidation	74
3.14 Lichtabhängige Regulation der Zx-Epoxidation in den transgenen Linien <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	75 75
3.15 Photoinhibition und Erholung der transgenen Linien <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	77
3.16 Lichtinduzierte Regulierung des <i>AtZE</i> -Gehaltes	79
3.17 <i>AtZEP</i> -Expressionsanalyse unter Starklichteinfluß	80
4.1 <i>In vitro</i> -Epoxidationsstudien heterolog überexprimierter <i>NpZE</i>	84
4.2 Homologe <i>AtZEP</i> -Überexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
4.3 Assoziierung der <i>AtZE1</i> -Isoform mit der Thylakoidmembran	89
4.4 Die <i>AtZE1</i> -Isoform ist essentiell für die Epoxidation	89
4.5 Wachstum und Morphologie der transgenen Linien <i>48</i> , <i>16/3</i> und <i>19/9</i>	90
4.6 Beeinflussung der De-epoxidation und Epoxidation mittels erhöhter <i>AtZE</i> -Mengen	92
4.7 Fluoreszenzlöschung	94
4.8 Lichtabhängige Regulation der <i>AtZE</i>	95
4.9 Lichtinduzierte Expression der <i>AtZE2</i> -Isoform	97
4.10 Ausblick	99
6 Literatur	105
7 Anhang	121
7.1 Abkürzungsverzeichnis	121
7.2 <i>AtZE</i> -Sequenzen	124
Danksagung	127

1 Einleitung

Pflanzen sind photoautotrophe Organismen und nutzen demnach das Licht als Energiequelle für die Synthese von Kohlenhydraten, Lipiden, Proteinen und anderen organischen Substanzen. Die Umsetzung der Lichtenergie in chemische Energie (ATP und NADPH) in den Lichtreaktionen und die Synthese von Kohlenhydraten aus Kohlendioxid (CO₂) im Calvin-Zyklus wird unter dem Begriff Photosynthese zusammengefasst. Generell finden die photosynthetischen Reaktionen in den Chloroplasten statt.

1.1 Die Grundlagen der Photosynthese

Die beiden an der Lichtreaktion beteiligten Photosysteme (PSII und PSI) sind räumlich voneinander getrennt in der Thylakoidmembran lokalisiert (s.Abb.1). Dabei ist das PSII vorwiegend in der Membran der Granalamellen zu finden (Allen und Forsberg, 2001), während das PSI (damit assoziierte Antennenpigmente, Elektronentransferproteine) sowie die ATP-Synthase (CF₀/CF₁-ATPase) ausschließlich in der Membran der Stromalamellen und den Rändern der Granalamellen lokalisiert sind. Der Cytochrom b₆/f-Komplex der Elektronentransportkette durch den beide Photosysteme miteinander verbunden sind, ist gleichmäßig auf den Stroma- und Granabereichen der Membran verteilt (Nelson und Ben-Shem, 2004). Die räumliche Trennung der beiden Photosysteme impliziert einen oder mehrere diffusionsfähige Elektronenüberträger, die zwischen beiden Photosystemen funktionieren. Diese Elektronenüberträger sind Plastochinon (PQ) und Plastocyanin (PC).

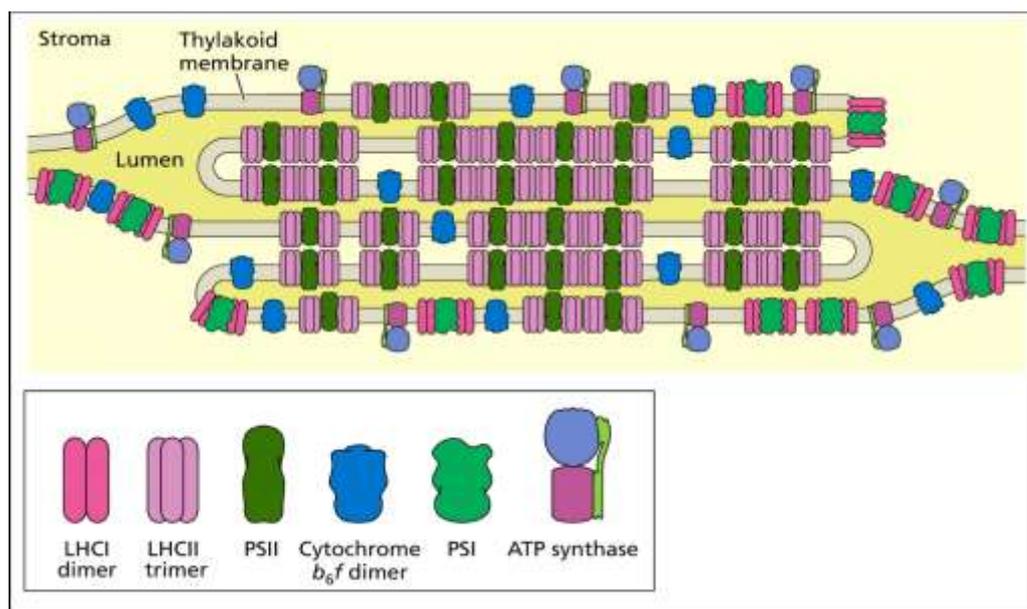


Abb.1: Organisation der in der Thylakoidmembran vorkommenden hauptsächlich Proteinkomplexe (Taiz und Zeiger, 2006). PSII (grün) ist vorwiegend in den gestapelten Granabereichen lokalisiert, während PSI (hellgrün) und die ATP-Synthase (lila, pink und hellgrün) in den ungestapelten Stroma-bereichen vorliegen. Der Cytochrom b₆f-Komplex (blau) ist gleichmäßig auf beide Bereiche verteilt.

Die Reaktionszentren beider PS (s.Abb.2) enthalten jeweils ein spezielles Chlorophyll(Chl)-a-Dimer und einen primären Elektronenakzeptor und leisten den linearen Elektronentransport von H_2O auf NADP^+ . Anregungsenergie, die über Lichtsammelkomplexe eingefangen und an die Photosystem-Reaktionszentren weitergeleitet wird, induziert zunächst eine Ladungstrennung der speziellen Chl-a-Dimere (P680 im PSII und P700 im PSI). Im PSII wird dadurch ein Elektronentransfer über Phaeophytin und ein festgebundenes Plastochinon (Q_A) auf ein locker gebundenes Plastochinon (Q_B) ausgelöst (Okamura *et al.*, 2000). Reduziertes Q_B nimmt Protonen aus dem Stroma auf, die zur Bildung von Plastohydrochinon (PQH_2) führen. Dieses dissoziiert vom PSII-Reaktionszentrum und diffundiert zum Cytochrom b_6/f -Komplex. Dort erfolgt ein Elektronentransfer über den Cytochrom b_6/f -Komplex auf Plastocyanin und schließlich auf P700 im PSI-Reaktionszentrum. Mit der Reduktion des PSI-Reaktionszentrums ist die NADPH-Synthese gekoppelt.

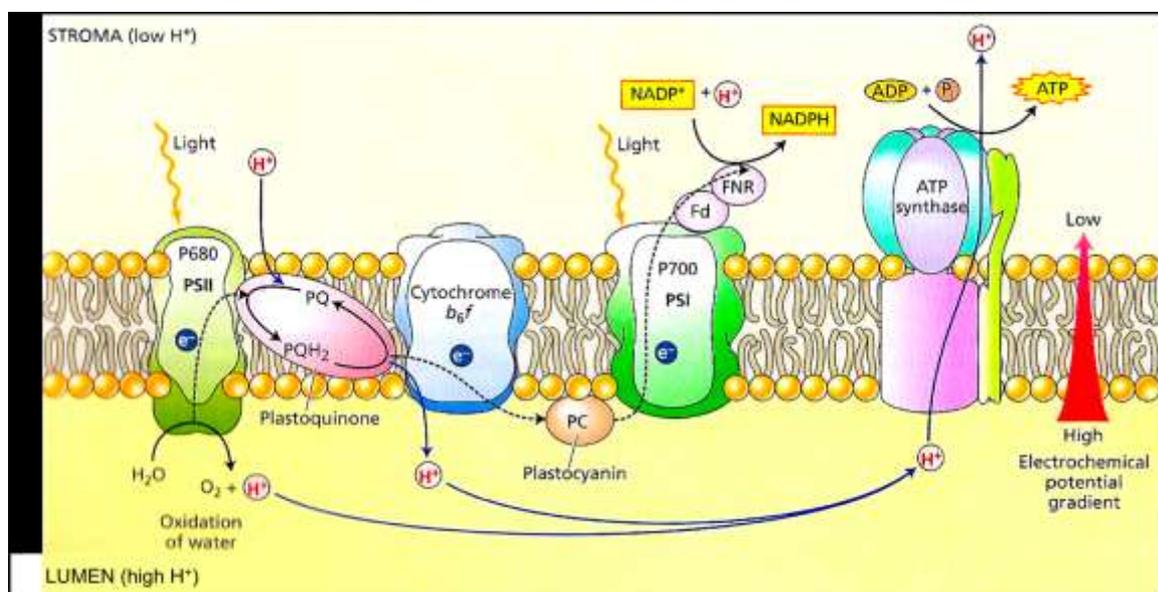


Abb. 2: Modell des Photosynthese-Apparates in höheren Pflanzen (Taiz und Zeiger, 2006). Dargestellt sind die vier Photosynthese-Komplexe (PSII, Cytochrom- b_6/f -Komplex, PSI und die ATPase). Außerdem ist sowohl der lineare, als auch der zyklische Elektronentransport über den PSI-Komplex gezeigt. Relevante Abkürzungen sind im Text erläutert.

Die im PSII-Reaktionszentrum (P680^+) entstandene Elektronenlücke wird durch Elektronen aus der Wasseroxidation ausgeglichen, während P700^+ über die lineare Elektronentransportkette durch Elektronen des PSII reduziert wird.

Die protonenmotorische Kraft zur ATP-Synthese durch eine CF_0/CF_1 -ATPase (Boyer, 1999) wird über den Aufbau eines transmembranen Protonengradienten (ΔpH) erzeugt. Dieser entsteht durch die Ansäuerung des Thylakoidlumens aufgrund freigesetzter Protonen (H^+) aus der Wasseroxidation am PSII und des Plastohydrochinols (PQH_2) am Cytochrom b_6/f -Komplex. Zusätzlich kann ein zyklischer Elektronentransport zum Aufbau des ΔpH s und damit zur ATP-Synthese unter bestimmten Bedingungen beitragen. Dieser erfolgt ausgehend von reduziertem P700 im PSI-Reaktionszentrum über Plastohydrochinon, den Cytochrom

b_6/f -Komplex zurück auf P700 und ist gekoppelt mit der Translokation von Protonen über die Thylakoidmembran.

Das synthetisierte ATP und NADPH wird im lichtunabhängigen Calvin-Zyklus zur Synthese von Kohlenhydraten genutzt.

1.2 Aufbau des Photosystem II

Das PSII ist ein Multi-Protein-Superkomplex (Barber et al., 1999) und besteht in höheren Pflanzen aus zwei vollständigen Reaktionszentren und einigen Antennenkomplexen. Den Kern des Reaktionszentrums bildet ein Heterodimer (s.Abb. 3 A) bestehend aus den zwei integralen Membranproteinen D1 und D2. Mit diesem D1/D2-Heterodimer sind sechs Chl-a-Moleküle (inklusive P680), zwei Phaeophytine, zwei Plastchinone und ein bis zwei β -Carotine assoziiert (Zouni et al., 2001; Kamiya und Shen, 2003). Der bei der Elektronenübertragung vom Wasser auf $P680^+$ beteiligte Mangan-Cluster wird wahrscheinlich vom D1/D2-Heterodimer unter Beteiligung des Mangan-stabilisierenden-Proteins (MSP) gebunden. Die beiden Untereinheiten des Cyt- b_{559} (α - und β -Untereinheit) sind wahrscheinlich nicht direkt am Elektronentransport beteiligt, besitzen aber möglicherweise eine photoprotektive Funktion für den PSII-Komplex. Die beiden Chlorophyll-Proteine CP43 und CP47 binden jeweils 15 Chlorophyll(Chl-)Moleküle und bilden die sogenannte „core-Antenne“. Sie flankieren beide Seiten des D1/D2-Komplexes und können die peripheren Lichtsammelantennen binden (Kamiya und Shen, 2003). Es gibt mindestens 10 weitere Proteinuntereinheiten im PSII, deren Funktion weitgehend unklar sind.

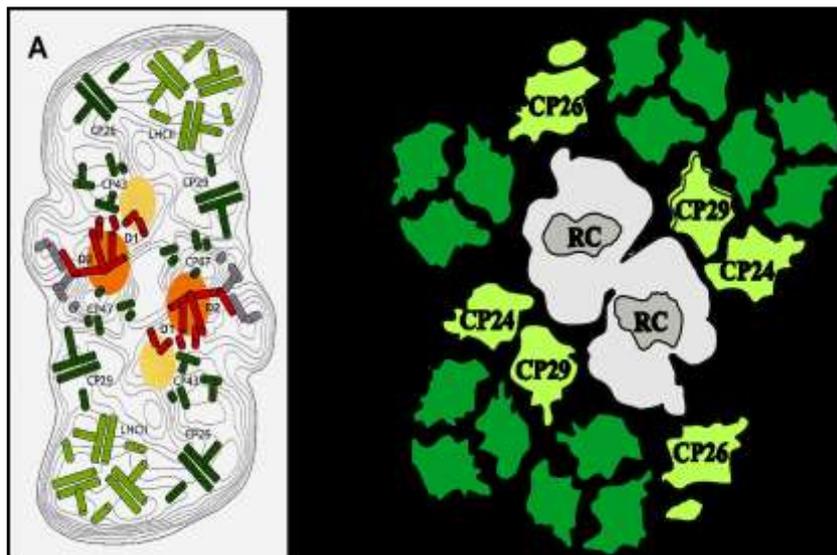


Abb. 3: Modell des PSII-Antennen-Superkomplexes.

A: Aufsicht von der luminalen Seite der Thylakoidmembran. Die Abkürzungen der dargestellten Proteine sind im Text näher erläutert. Das D1/D2-Heterodimer ist rot dargestellt, während die Chl-Proteine CP43 und CP47, sowie die minoren Antennen (CP29, CP26 und CP24) dunkelgrün gekennzeichnet sind. Die LHCII-Komplexe sind hellgrün dargestellt. Orange und Gelb ist der extrinsische Sauerstoffbildende Komplex gekennzeichnet. **B:** Organisation der Antennen um die PSII-Reaktionszentren (Dekker und Boekema, 2005)

Mit jeweils einem Antennenkernkomplex des PSII (CP43 und CP47) sind die drei minoren Antennenproteine CP24 (Lhcb6), CP26 (Lhcb5) und CP29 (Lhcb4) assoziiert (Yakushevskaya et al., 2001; Dekker und Boekema, 2005). Damit können die peripheren trimeren LHCII-

Komplexe assoziieren, die aus den drei Proteinuntereinheiten Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 bestehen (Kühlbrand *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2000).

1.3 Aufbau des Photosystem I

Das PSI-Reaktionszentrum (s.Abb. 4) ist ebenfalls ein großer Multi-Proteinkomplex (Jordan *et al.*, 2001; Ben-Shem *et al.*, 2003). Im Gegensatz zum PSII-Reaktionszentrum ist hier die „Core-Antenne“ aber ein integraler Bestandteil des Reaktionszentrums, das über 100 Chl-Moleküle bindet. Die zentrale Antenne und das P700-Chl-a-Dimer sind mit zwei Proteinen assoziiert, die als PsaA und PsaB bezeichnet werden (Brettel, 1997; Chitnis, 2001). Diese sind mit 11 anderen minoren Psa-Proteinuntereinheiten (PsaC bis PsaN) assoziiert (Buchanan *et al.*, 2000). Die für den Elektronentransport benötigten Co-Faktoren im PSI-Reaktionszentrum sind jeweils an eines der drei Proteine PsaA, PsaB und PsaC gebunden und von Kernantennenpigmenten umgeben. Bei den Co-Faktoren handelt es sich jeweils um ein Chl-Molekül, ein Phyllochinon (Vitamin K₁) und drei membran-assoziierte Eisen-Schwefel-Proteine (FeS_X, FeS_A und FeS_B).

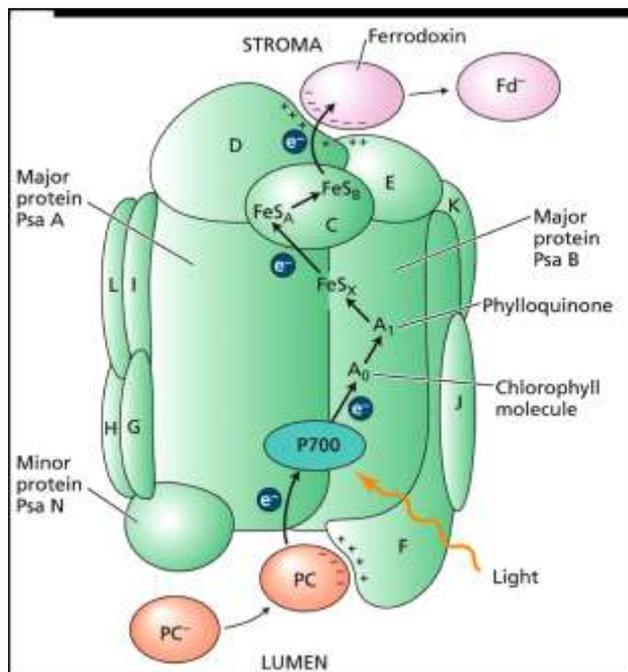


Abb. 4: Struktur des PSI-Reaktionszentrums in höheren Pflanzen.

Die minoren Proteine PsaC bis PsaN sind mit den Buchstaben C bis N gekennzeichnet. Elektronen werden vom Plastocyanin (PC) auf P700 übertragen und dann über ein Chl-Molekül (A₀), ein Phyllochinon (A₁), die Eisen-Schwefel-Zentren FeS_X, FeS_A und FeS_B letztlich auf Ferredoxin (Fd) übertragen.

In *Pisum sativum* wurden zusätzlich vier, das PSI-Reaktionszentrum sichelförmig umgebende, LHCI-Antennenkomplexe nachgewiesen (Ben-Shem *et al.*, 2003).

1.4 Lichtsammelkomplexe

Die Lichtsammelkomplexe (LHC) bilden eine Gruppe kernkodierter Thylakoid-Proteine (Jansson, 1999). Im Gegensatz zu den „core-Antennen“ der Reaktionszentren (PSII: CP43 und CP47; PSI: PsaA und PsaB) binden sie sowohl Chl-a, als auch Chl-b (Peter und Thornber, 1991; Paulsen, 1995; Jansson, 1999). Neben den Chl binden die LHCs auch die Xanthophylle Lutein (Lut), Neoxanthin (Nx), Violaxanthin (Vx), Antheraxanthin (Ax) und Zeaxanthin (Zx) (Ruban *et al.*, 2000; Morosinotto *et al.*, 2003). Zum einen besitzen die Xanthophylle LHC-strukturstabilisierende Eigenschaften (Kühlbrandt *et al.*, 1994) und absorbieren Licht in einem die Chl-Absorption ergänzenden Bereich (Frank und Brudvig, 2004). Zum anderen haben sie eine photoprotektive Funktion bei überschüssiger Anregungsenergie (Horton *et al.*, 1996).

Die LHC-Supergenfamilie umfasst in höheren Pflanzen 11 verschiedene Antennenproteine beider Photosysteme (Jansson, 1994; Ganeteg *et al.*, 2004; Storf *et al.*, 2004). Dabei assoziieren die Proteine Lhca1-5 hauptsächlich mit dem PSI und Lhcb1-6 vorwiegend mit dem PSII.

Aus den Lhcb1-, Lhcb2- und Lhcb3-Proteinen sind die trimeren LHCII-Antennenkomplexe aufgebaut (Standfuss und Kühlbrandt, 2004), welche die Hauptkomponente der PSII-Antennen bilden. Die hauptsächliche Aufgabe des LHCII-Komplexes besteht im Transfer absorbierter Lichtenergie über die minoren Antennenproteine Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6 (auch als CP29, CP26 und CP24 bezeichnet) zum PSII-Reaktionszentrum (Simpson und Knoetzel, 1996). Eine zusätzliche wichtige Funktion dieses Komplexes liegt in der Ausbalancierung der Anregungsenergie zwischen PSI und PSII. Bei überproportionalem Lichtenergie-Transfer auf das PSII phosphoryliert eine redox-kontrollierte Kinase einen Threoninrest am N-Terminus des LHCII-Komplexes. Dadurch können sich die äußeren LHCII-Komplexe vom PSII/LHCII-Superkomplex lösen und den Energietransfer auf das PSII minimieren (qT-Mechanismus; Benett, 1991).

Generell besitzen alle LHC-Proteine drei die Thylakoidmembran durchspannende Helices (s.Abb.5 Helix A, B und C), von denen die Helix A und B homolog zueinander sind (Jansson,1999). Trotz ihrer hohen Strukturähnlichkeit unterscheiden sich die Antennenproteine untereinander in Bezug auf ihre Xanthophyll-Bindungseigenschaften. Die Anzahl der Xanthophylle kann zwischen zwei (in den meisten Antennenproteinen) bis zu vier (in trimeren LHCII) variieren (Morosinotto *et al.*, 2003). Mittels Analysen trimerer LHCII-Komplexe in Spinat (Liu *et al.*, 2004) und Erbse (Standfuss *et al.*, 2005) wurden vier unterschiedliche Xanthophyll-Bindungsstellen in diesen Proteinen nachgewiesen(s.Abb. 5).

Zwei Luteine sind an den zentralen L1- und L2-Bindestellen gebunden, die mit den beiden zentralen transmembranen Helices A und C assoziiert sind. Dagegen bindet Nx an

die N1-Bindestelle in der mehr peripheren Helix B und ragt in die Lipidphase hinein. Vx ist an der peripheren V1-Bindestelle an der monomeren Schnittstelle lokalisiert (Standfuss *et al.*, 2005). Nur die Besetzung der L1-Bindestelle mit Lut ist obligat in allen LHC-Proteinen, wohingegen die anderen Bindestellen in jedem der Antennen-Subkomplexe variabel besetzt sein können. Die Xanthophyllzyklus-Pigmente (Vx, Ax und Zx) binden entweder alle an die V1-Bindestelle (in Lhcb1-3 und Lhca3) oder an die L2-Bindestelle (in den LHC-Proteinen Lhcb4-6, Lhca1, Lhca2 und Lhca4). Jedes LHC-Monomer kann bis zu ein Xanthophyllzyklus-Pigment gebunden haben (Morosinotto *et al.*, 2003).

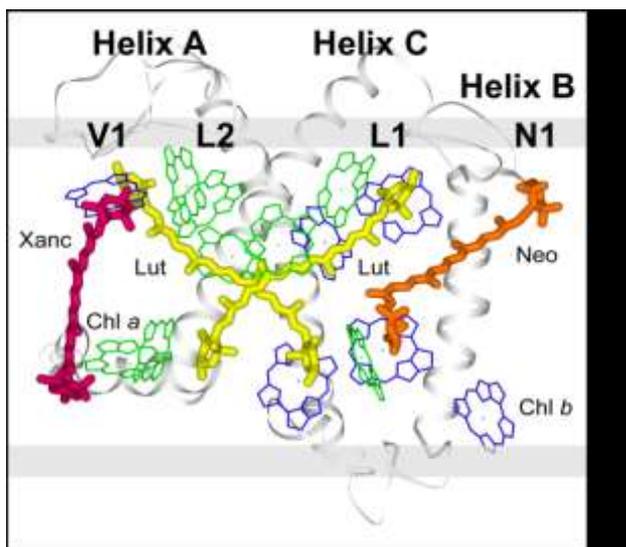


Abb. 5: Modell für die Anordnung der Pigmente im LHCII-Monomer (nach Liu *et al.*, 2004). Für die beiden Chlorophylle (Chl a = grün; Chl b = blau) sind nur die Tetrapyrrolringe dargestellt. Die vier gebundenen Xanthophylle (Lutein (Lut) = gelb; Neoxanthin (Nx) = orange; Violaxanthin (Xanc) = pink) wurden in der Struktur identifiziert. Im Hintergrund sind die drei transmembranen Helices A, B und C (grau) dargestellt.

Neben den genannten LHC-Antennenproteinen werden noch weitere Membranproteine zur Familie der sogenannten CAB-Proteine gezählt. Hierbei handelt es sich um stress-induzierte Proteine, sog. ELIPs (= early light induced proteins), HLIPs (= highlight induced proteins) und OHPs (= one helix protein) (Adamska *et al.*, 2001, Demmig-Adams *et al.*, 2006). Ebenfalls zu den CAB-Proteinen rechnet man das PsbS-Protein, ein 22 kDa großes, intrinsisches Membranprotein. In Analysen zur Anpassung immergrüner Pflanzen an Winterbedingungen wurden eine Hochregulierung der PsbS-, ELIPs-, HLIPs- und OHPs-Level nachgewiesen (Demmig-Adams *et al.*, 2006; Zarter *et al.*, 2006a; Zarter *et al.*, 2006b). Allerdings ist die Funktion dieser Proteine noch nicht vollständig geklärt.

1.5 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Ausstattung des PSII mit Antennenkomplexen erlaubt die effiziente Absorption von Lichtenergie und deren Weiterleitung an die Reaktionszentren auch bei niedrigen Lichtintensitäten. Bei Absorption überschüssiger Anregungsenergie (d.h. Energie die absorbiert, aber nicht für die Photosynthese genutzt werden kann) kann es insbesondere unter Starklichtbedingungen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (s.Abb.6; ROS = *reactive*

oxygen species), wie z.B. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$), Superoxidradikalanionen ($\bullet\text{O}_2^-$), Wasserstoff-peroxid (H_2O_2) und Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) kommen und dadurch zur Lichtschädigung (Horton *et al.*, 1996; Asada, 1999; Baroli und Niyogi, 2000; Müller *et al.*, 2001).

Ausgangspunkt sind langlebige Triplett-Zustände ($^3\text{Chl}^*$), die ihre Anregungsenergie leicht auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen können und dadurch die Bildung des gefährlichen Singulett-Sauerstoffs ($^1\text{O}_2^*$) verursachen (Foyer *et al.*, 1994). Der Singulett-Sauerstoff ist hochreaktiv und kann zur Schädigung von Proteinen und Lipidmembranen führen und so zur Photoinhibition des PSII beitragen (Barber und Anderson, 1992; Aro *et al.*, 1993; Niyogi, 1999). Die Bildung des Singulett-Sauerstoff kann sowohl in den photosynthetischen Reaktionszentren, als auch in den Antennen beider Photosysteme erfolgen (Niyogi, 1999; Trebst, 2003).

Die Bildung eines Superoxidradikals ($\bullet\text{O}_2^-$) kann bei einem hohen Reduktionsgrad des Ferredoxins am PSI entstehen. Dabei werden Elektronen in der sogenannten Mehler-Reaktion von PSI auf Sauerstoff übertragen (Mehler, 1951; Halliwell, 1991; Asada, 1994). Durch das entstandene Superoxidradikal können vorhandene Metall-Ionen (z.B. Fe^{3+} , Cu^{2+}) reduziert werden. Um dies zu verhindern kommt es mittels Superoxid-Dismutase zur schnellen Disproportionierung des $\bullet\text{O}_2^-$ zu H_2O_2 und O_2 unter Aufnahme zweier Protonen. Aber auch Wasserstoffperoxid hat eine schädigende Wirkung auf viele Enzyme und kann mit den durch das $\bullet\text{O}_2^-$ reduzierten Metall-Ionen das weitaus aggressivere Hydroxylradikal bilden (Halliwell, 1991). Das $\bullet\text{OH}$ schädigt durch seine oxidative Wirkung Enzyme sowie bevorzugt ungesättigte Fettsäuren in Lipidmembranen (Lipidperoxidation) und die Pflanzenzelle besitzt keinen protektiven Mechanismus zur Entfernung dieses Radikals. Um die Bildung des $\bullet\text{OH}$ zu minimieren, wird zum einen die Reduktion der Metall-Ionen über die Superoxid-Dismutase unterdrückt. Zum anderen wird H_2O_2 über die Ascorbat-Peroxidase eliminiert, wobei Ascorbat zum radikalischen Monodehydroascorbat oxidiert wird. Dieses kann spontan über reduziertes Ferredoxin wieder zu Ascorbat oder über eine zweistufige Reaktion unter Beteiligung von Glutathion als Reduktionsmittel vollständig zu Ascorbat umgesetzt werden.

1.6 Schutzmechanismen vor photooxidativer Schädigung

Um eine photooxidative Schädigung mittels reaktiver Sauerstoffspezies zu verhindern, haben Pflanzen mehrere Anpassungsstrategien entwickelt (s. Abb. 6). Diese umfassen Energielöschungsprozesse (z.B. durch Carotinoide), Blattbewegungen, Chloroplasten-translokationen, Änderungen der Pigment-Protein-Verteilung in der Thylakoidmembran,

Chlorophyll-Konzentrationsänderungen und den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies durch Antioxidantien (z.B. α -Tocopherol) und Enzyme.

Bei der Energielöschung wird zwischen der photochemischen (qP) und der nicht-photochemischen Energielöschung (NPQ = *non-photochemical quenching*) unterschieden. qP ist abhängig vom Redoxzustand des Q_A und steht in direktem Zusammenhang mit dem linearen Elektronentransport unter Umwandlung der absorbierten Energie in chemische Energie. Dagegen erfolgt mittels NPQ die Löschung überschüssiger Energie hauptsächlich durch Umwandlung in Wärme. Diese beiden Formen der Energielöschung stellen die schnellsten adaptiven und protektiven Mechanismen unter Lichtstressbedingungen dar. Anhand des NPQs kann überschüssige Energie auf der Ebene des $^1\text{Chl}^*$ (angeregtes Singulett-Chlorophyll) als Wärme abgeleitet werden und somit die Bildung des schädigenden $^1\text{O}_2^*$ minimieren. Zudem wird dadurch die Einspeisung von Elektronen in die Elektronentransferkette reduziert, was auch die Bildung von ROS an der Akzeptorseite des PSI reduziert.

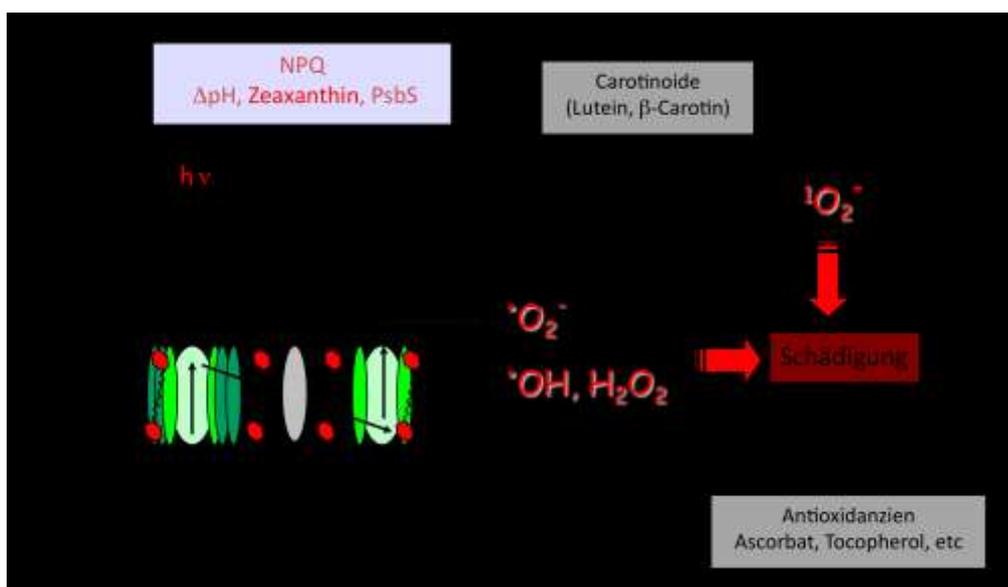


Abb. 6: Schematische Darstellung der Entstehung von ROS (reaktiver Sauerstoffspezies) und einiger protektiver Mechanismen in höheren Pflanzen.

Das NPQ setzt sich aus drei Komponenten zusammen: die *state transitions* (qT; Allen, 1992), die Energie- bzw. ΔpH -abhängige Löschung (qE; Horton *et al.*, 1996) und die Photoinhibition (qI; Aro *et al.*, 1993).

1.6.1 *state transitions* (qT)

Die (qT) *state transitions* sind schnelle Antworten des photosynthetischen Systems, um die Anregungsenergie gleichmäßig auf die Photosysteme zu verteilen (Allen, 2003) und sind in höheren Pflanzen nur unter nicht-sättigenden Lichtbedingungen von Bedeutung (Haldrup *et al.*, 2001). Dabei kommt es zur reversiblen Phosphorylierung der Lhcb1- und Lhcb2-

Proteine im LHCII-Komplex am N-terminalen Threonin über eine Thylakoid-assoziierte Kinase (Depege *et al.*, 2003; Bonardi *et al.*, 2005). Die Phosphorylierung ist abhängig vom Redox-Zustand der Elektronentransportkette und ermöglicht die Trennung der LHCII-Komplexe vom LHCII/PSII-Superkomplex (Allen, 1992; Allen und Forsberg, 2001). Dieser mobile LHCII-Pool unterliegt lateraler Diffusion und vergrößert über Assoziation mit dem PSI die PSI-Antennengröße (Zhang und Scheller, 2004). Dieser Zustand wird als Zustand 2 (*state 2*) bezeichnet, wohingegen eine Assoziation aller LHCII-Komplexe mit dem PSII, als Zustand 1 (*state 1*) bezeichnet wird (Allen, 2003).

1.6.2 Energie- oder ΔpH -abhängige Löschung (qE)

Unter sättigenden Lichtintensitäten ist die ΔpH -abhängige Löschung (qE) ein effizienter Mechanismus um über Wärmedissipationsprozesse in den PSII-Antennen den Elektronendruck auf die photosynthetische Elektronentransportkette zu reduzieren. qE ist abhängig vom Zusammenwirken drei Faktoren: 1. dem ΔpH , 2. dem Xanthophyll-Zyklus und 3. von Konformationsänderungen in den PSII-Antennen (Horton *et al.*, 2000). Dabei ist für den qE ein pH-Wert unter 6 im Thylakoidlumen, de-poxidierter Xanthophyll (Zx, Lut) und das PsbS-Protein essentiell.

Nach neusten Erkenntnissen wurden zwei verschiedene Modell-Mechanismen vorgeschlagen, um qE zu erklären (Holt *et al.*, 2005; Ruban *et al.*, 2007). Ruban *et al.* (2007) vermuten, dass das qE in den peripheren, trimeren PSII-Antennen (LHCII) lokalisiert ist (Liu *et al.*, 2004) und ein Energietransfer vom Chl-a auf ein in den LHCII-Antennen lokalisiertes Carotinoid (Lutein1) erfolgt (Ruban *et al.*, 2007). Der zweite Mechanismus basiert auf der Annahme eines Ladungstransfers (Holt *et al.*, 2005; Dreuw *et al.*, 2003; Avenson *et al.*, 2008). Nach diesem Modell erfolgt ein Energietransfer von den Chl, die an den PSII-LHCII-Superkomplex gebunden sind, auf ein spezielles Chl-Zx-Heterodimer in den Antennen wobei ein $(\cdot\text{Chl}^-)(\cdot\text{Zx}^+)$ -Radikalpaar gebildet wird. Diese $\cdot\text{Zx}$ -Radikalbildung ist von allen drei qE-vermittelnden Komponenten abhängig, konnte aber nur in den minoren Antennen (CP29, CP26 und CP24) nachgewiesen werden (Ahn *et al.*, 2008). Da das Radikal in den trimeren LHCII-Antennen nicht detektiert werden konnte (Avenson *et al.*, 2008) wurde vermutet, dass die unterschiedlichen qE-Mechanismen in verschiedenen Teilen der PSII-Antennen stattfinden (Ahn *et al.*, 2008).

1.6.3 Photoinhibition (qI)

Unter langanhaltendem Starklicht wird das qE von der qI-Komponente abgelöst (Krause, 1988). Der Übergang von der ΔpH -abhängigen Löschung (qE) zur photoinhibitorischen Löschung (qI) scheint dabei fließend zu sein (Öquist *et al.*, 1992; van Wijk und van Hasselt,

1993). Wie das qE ist auch das qI noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass das qI zum Teil durch die Inaktivierung des D1-Proteins im PSII-Reaktionszentrum verursacht wird (Aro *et al.*, 1993). Allerdings scheint auch die Zx-Bildung eine Rolle bei der qI-Bildung zu spielen (Jahns und Miele, 1996; Thiele *et al.*, 1996). Im Vergleich zum qE (innerhalb von 10 min) ist die qI-Komponente sehr viel langsamer reversibel (30 min bis zu einigen Stunden) und erfordert den Abbau und die Neusynthese des D1-Proteins sowie die Zx-Epoxidation. Analysen immergrüner Pflanzen während des Winters zeigten eine dauerhafte Akkumulierung von Zx, die mit einer anhaltenden Inaktivierung des PSII einherging (Demmig-Adams und Adams, 2006). Diese Zx-Akkumulierung scheint unter ungünstigen Umweltbedingungen einer effizienten Photoprotektion des photosynthetischen Systems zu dienen. Obwohl die genauen Mechanismen der Zx-abhängigen Photoinhibition unbekannt sind, wurde gezeigt, dass Δ pH-abhängige und Δ pH-unabhängige Formen der aufrechterhaltenden Energiedissipation existieren (Demmig-Adams *et al.*, 2006), welche die Dissipation in den PSII-Reaktionszentren mit einbeziehen (Sveshnikov *et al.*, 2006).

1.6.4 Photoprotektive Funktion der Carotinoide

Die photoprotektive Funktion der Carotinoide besteht in der Umwandlung und Dissipation überschüssiger Anregungsenergie in Form von Wärme. Dadurch können Carotinoide den gefährlichen $^3\text{Chl}^*$ -Zustand durch einen Triplett-Triplett-Energietransfer in den Grundzustand überführen und die überschüssige Anregungsenergie in Form von Wärme ableiten (Baroli und Niyogi, 2000). Außerdem ist durch einen analogen Prozeß auch die Deaktivierung von $^1\text{O}_2^*$ durch Carotinoide (z.B. β -Carotin) möglich.

Neben β -Carotin (in den Reaktionszentren) sind vor allem Lutein (Lut) und das im Xanthophyllzyklus gebildete Zeaxanthin (Zx) von essentieller Bedeutung.

Zx hat unterschiedliche grundlegende photoprotektive Funktionen: Es ist essentiell für die Wärmedissipation überschüssiger Lichtenergie (NPQ) in den PSII-Antennen (sog. qE-Löschung) und zusätzlich dient es auch als Antioxidans in der Lipidphase der Thylakoidmembran (Niyogi *et al.*, 1998; Havaux und Niyogi, 1999). Darüber hinaus wird eine Beteiligung des Zx an photoinhibitorischen Prozessen (qI-Löschung) im PSII-Reaktionszentrum vermutet (Verhoeven *et al.*, 1998; Jahns und Miele, 1996). In immergrünen Pflanzen wurde eine Beteiligung von Zx (und Ax) in der permanenten Herunterregulierung der PSII-Aktivität im Winter beobachtet (Ebbert *et al.*, 2005; Demmig-Adams und Adams, 2006; Zarter *et al.*, 2006a). Die unterschiedlichen Funktionen des Zx sind wahrscheinlich abhängig von unterschiedlichen Xanthophyllzyklus-Pigmentpools (VAZ-Pools) in der Thylakoidmembran. Die meisten VAZ-Pigmente sind an die LHC-Antennen beider Photosysteme gebunden, aber es gibt auch Hinweise auf eine Fraktion des VAZ-

Pools, der frei in der Lipidphase der Membran vorkommt (Havaux, 1998; Macko *et al.*, 2002). Es wurde auch vermutet, dass ein Teil der VAZ-Pigmente an ELIPs gebunden sein kann, was jedoch durch Analysen an ELIP-knock-out-Mutanten in Frage gestellt wurde (Rossini *et al.* 2006). Möglicherweise bieten andere PsbS-verwandten Proteine, wie z.B. HLIPs oder OHPs zusätzliche Xanthophyll-Bindungsstellen (Demmig-Adams und Adams, 2006; Demmig-Adams *et al.*, 2006){Standfuss, van Scheltinga, *et al.* 2005 5191 /id}.

Es ist unbekannt, welche Fraktion des VAZ-Pools (gebunden an PSII oder PSI-Antennenproteine oder nicht-Protein-gebundener Pool) in die antioxidative Funktion des Zx involviert ist. Der nicht Protein-gebundene Zx-Pool würde die Freisetzung Proteingebundener Xanthophylle in die Lipidphase erfordern oder die direkte Umwandlung eines nicht Protein-gebundenen VAZ-Pools in der Membran.

1.7 Carotinoid- und Abscisinsäure-Biosynthese

In höheren Pflanzen werden die Carotinoide und die Abscisinsäure (ABA) über den Isoprenoidsyntheseweg gebildet. Dabei gibt es zwei verschiedene Isoprenoid-Synthesewege, wovon einer im Cytosol (Azetat-Mevalonat-Weg) und einer in den Plastiden (1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat(DOXP)-Synthase-Weg) lokalisiert ist. Der plastidäre Isoprenoid-Syntheseweg dient der Carotinoid- und ABA-Synthese ausgehend vom Geranylgeranylpyrophosphat.

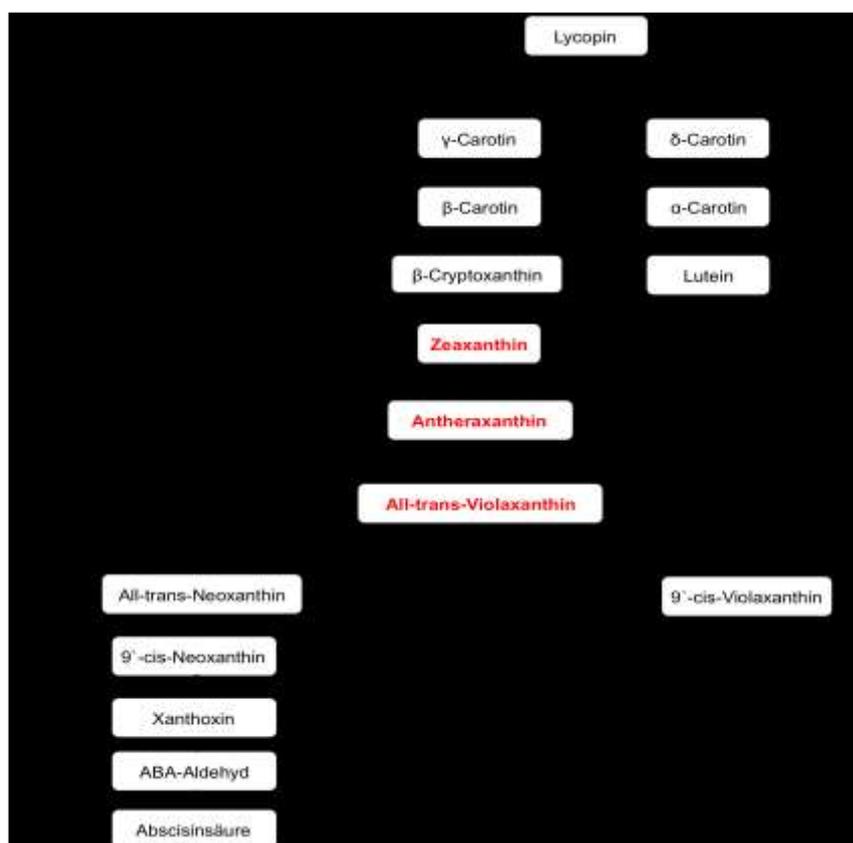


Abb. 7: Ausschnitt aus dem plastidären ABA-Biosyntheseweg in höheren Pflanzen.

Für die Carotinoidsynthese sind zwei Geranylgeranylpyrophosphat-Moleküle erforderlich, die zur Bildung des C₄₀-Carotinoid-Vorläufers Phytoen führen. Daraus erfolgt durch zwei unterschiedliche Desaturasen die Umwandlung zum Lycopin (Abb. 7). Über eine Cyclisierung des Lycopins bildet sich je nach Enzym β -Carotin (Provitamin A) oder α -Carotin. β -Carotin dient im Menschen als Ausgangssubstanz für die Synthese des Sehpigmentes Rhodopsin und in höheren Pflanzen zur Synthese des Xanthophylls Zx. Die anschließende Zx-Epoxidation über das Zwischenprodukt Ax zu Vx wird auch als erster Schritt des spezifischen ABA-Biosyntheseweges bezeichnet. Dieser Schritt wird von der Zeaxanthin Epoxidase (ZE) katalysiert, deren molekulare Identität erstmals in *Nicotiana plumbiginifolia* gezeigt wurde (Marin *et al.*, 1996). In einem Folgeschritt wird aus Vx das Xanthophyll Nx synthetisiert, wohingegen das Xanthophyllpigment Lut aus α -Carotin gebildet wird.

Im ABA-Biosyntheseweg über die Zx-Epoxidation in höheren Pflanzen wird ABA zuletzt in einer Zwei-Schritt-Konversion über das Xanthoxin-Intermediat synthetisiert (Taylor *et al.*, 2000; Finkelstein and Rock, 2002; Seo and Koshiba, 2002; Schwartz *et al.*, 2003).

1.8 Funktion der Abszisinsäure

Das Pflanzenhormon Abszisinsäure (ABA) ist vor allem bekannt für die Rolle in der Erhaltung der Samen- und Knospenruhe, sowie als Regulator der pflanzlichen Stressantwort insbesondere bei Trockenstress. Zusätzlich beeinflusst ABA durch Interaktion mit anderen Pflanzenhormonen, wie Auxin, Cytokinin, Gibberellin, Ethylen und Brassinosteroiden viele andere Aspekte der Pflanzenentwicklung.

In Bezug auf den Xanthophyll-Zyklus wurde in Mutanten mit inaktiver ZE ein ABA-Mangel nachgewiesen, der sich in einer erhöhten Sensitivität auf Trockenstress zeigte. Zu diesen Mutanten zählen unter anderem *aba1*, *los6* und *npq2* aus *Arabidopsis* (Koorneef, *et al.*, 1982; Xiong *et al.*, 2002; Niyogi *et al.*, 1998). In den *aba1*- und *los6*-Funktionsverlustmutanten konnte das verzögerte vegetative Wachstum mittels ABA-Zugabe aufgehoben werden und die Pflanzen erreichten normale Größen wobei sich der hohe Zx-Gehalt nicht veränderte (Tardy und Havaux, 1996; Xiong *et al.*, 2002).

Barrero *et al.* (2005) lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von ABA als Wachstumsförderer in der vegetativen Entwicklung bei *Arabidopsis thaliana*. Auch andere Autoren schlugen ABA als Wachstumsförderer unter physiologischen Bedingungen und als Inhibitor unter Stressbedingungen vor (Cheng *et al.*, 2002; Sharp und LeNoble, 2002). Xiong *et al.* (2002) zeigten eine positive Feedback-Regulierung der ZE-Expression durch ABA.

1.9 Regulation und Funktion des Xanthophyllzyklus

Der Xanthophyllzyklus (Pfündel und Bilger, 1994; Jahns *et al.*, 2009) beschreibt die reversible Umwandlung von Vx zu Zx über das Zwischenprodukt Ax. Hin- und Rückreaktion werden durch zwei unterschiedliche Enzyme, die Violaxanthin-De-epoxidase (VDE) und die Zeaxanthin Epoxidase (ZE), katalysiert. Beide Enzyme (VDE und ZE) des Xanthophyllzyklus unterliegen einer strengen Kontrolle, um einerseits eine unerwünschte Energielöschung unter nicht sättigenden Lichtbedingungen durch das Zx zu verhindern und andererseits die schnelle Bildung des Zx für die Photoprotektion unter sättigenden Lichtbedingungen zu gewährleisten. Die Zx-Bildung wird dabei strikt über den pH-Wert im Thylakoidlumen reguliert, der ein zuverlässiger Indikator für den Sättigungsgrad der photosynthetischen Elektronentransportkette ist.

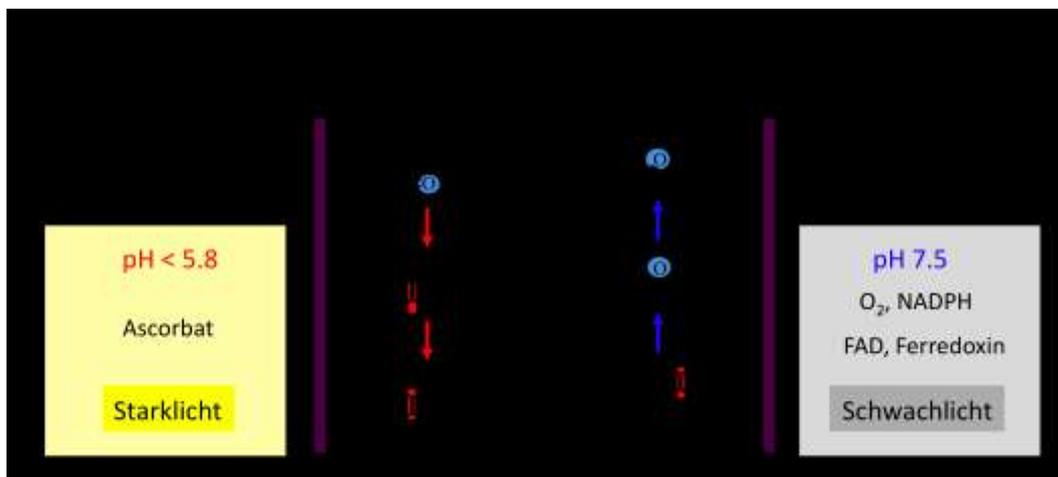


Abb. 8: Schema der De-epoxidation und Epoxidation des Xanthophyllzyklus.

Bei der Hinreaktion wird Vx durch die schrittweise Entfernung zweier Epoxidgruppen unter gleichzeitiger Ausbildung von C-C-Doppelbindungen zu Zx de-epoxidiert. Diese Reaktion wird durch die VDE katalysiert, die im Thylakoidlumen lokalisiert ist. Die VDE-Aktivität wird über den luminalen pH-Wert reguliert, wobei eine Ansäuerung des Thylakoidlumens unter einen pH-Wert von 6,2 zu einer Aktivierung der VDE bzw. Induzierung der De-epoxidation führt (Pfündel und Dilley, 1993; Hager und Holocher, 1994). Dadurch wird gewährleistet, dass Zx nur unter sättigenden Lichtbedingungen in den Pflanzen gebildet wird. Außerdem ist das in der Thylakoidmembran am häufigsten vorkommende Lipid Monogalaktosyldiacylglycerid (MGDG) essentiell für die VDE-Aktivität (Siefermann und Yamamoto, 1975; Jahns *et al.*, 2009). Zusätzlich benötigt die VDE Ascorbat als Co-Faktor für die Reaktion (Hager, 1969). Die Geschwindigkeit und das Ausmaß der De-epoxidation sind abhängig von der Verfügbarkeit des Vx für die VDE. Dabei wird die Vx-Verfügbarkeit durch die Bindung des Xanthophylls an die Antennenproteine begrenzt. Analysen an

Antennen-defizienten Erbsenpflanzen zeigten, dass in Abwesenheit der LHC-Proteine der komplette Vx-Pool mit einer schnellen Kinetik (ca. 10-20 min) zu Zx umgesetzt werden kann (Jahns, 1995; Härtel *et al.*, 1996). Dagegen war die Kinetik in Anwesenheit der LHC-Proteine deutlich langsamer und die Vx- zu Zx-Konversion auf 60-70% des gesamten Xanthophyllzyklus-Pigmentpools begrenzt. Detaillierte Analysen an rekombinanten Antennenproteinen zeigten, dass die Vx-Konversion differentiell durch die spezifischen Bindungsaffinitäten des Xanthophylls an unterschiedliche Bindungsstellen in verschiedenen Antennenproteinen begrenzt wird (Jahns *et al.*, 2001; Wehner *et al.*, 2004; Wehner *et al.*, 2006). Daraus wurde geschlossen, dass sowohl das Ausmaß, wie auch die Kinetik der Zx-Bildung durch die unterschiedlichen Pigment-Bindungseigenschaften an die Antennenproteine beeinflusst wird.

Die Rückreaktion bzw. Epoxidation erfolgt unter Schwachlichtbedingungen oder in der Dunkelheit. Dabei wird unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff (O₂), NADPH und reduziertem Ferredoxin (Bouvier *et al.*, 1996) Zx zurück zu Vx umgewandelt. Die Epoxidation wird von der ZE katalysiert, die auf der Stromaseite der Thylakoidmembran lokalisiert ist. Die ZE wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.10 Die Zeaxanthin Epoxidase

Die ersten Mutanten mit einer inaktiven ZE wurden aufgrund ihres Phänotyps als ABA-defiziente Mutante identifiziert. Dabei handelt es sich vor allem um die *aba1*-Mutante aus *Arabidopsis thaliana* (Koorneef *et al.*, 1982) und die *aba2*-Mutante aus *Nicotiana plumbiginifolia* (Marin *et al.*, 1996). Zunächst wurde hier die Rolle der ZE in der ABA-Biosynthese (Marin *et al.*, 1996; Audran *et al.*, 1998) und auch hinsichtlich der Beziehung zur Photosynthese untersucht (Tardy und Havaux, 1996). Mit *npq2* wurde durch Niyogi *et al.* (1998) eine weitere wichtige ZE-Funktionsverlust-Mutante charakterisiert, die hinsichtlich der photoprotektiven Funktion des Xanthophyll-Zyklus im NPQ und qP untersucht wurde. Diese Mutante zeigte im Gegensatz zu den *aba1*-/*aba2*-Mutanten nur einen geringen Phänotyp in Bezug auf die ABA-Defizienz (Niyogi *et al.*, 1998). Die ersten und einzigen Analysen einer *in vitro*-Epoxidation mittels in *Escherichia coli* überexprimierter ZE aus Paprika (*Capsicum annuum*) wurden von Bouvier *et al.* (1996) veröffentlicht.

Die ZE gehört, wie auch die VDE, zur Familie der Lipocaline (Bugos *et al.*, 1998) und besitzt Monooxygenase-Aktivität (Büch *et al.*, 1995). Dabei ist die ZE ein nukleär kodiertes Protein, das über ein N-terminales Transitpeptid in den Chloroplasten importiert wird (Marin *et al.*, 1996). Das ZE-Präprotein hat ein Molekulargewicht von 73 kDa, während das reife Protein ein Molekulargewicht von 67 kDa aufweist. Für die ZE-Aktivität sind O₂ und reduzierende Äquivalente als Co-Faktoren essentiell (Büch *et al.*, 1995; Marin *et al.*, 1996;

Bouvier *et al.*, 1996) und das pH-Optimum liegt zwischen pH 7 und 8 (Siefermann und Yamamoto, 1975). Aufgrund dieses pH-Optimums und dem Bedarf von NADPH, welches die Thylakoidmembran nicht passieren kann, wurde eine Lokalisation der ZE im Chloroplastenstroma vermutet (Hager, 1975). Im Gegensatz zur VDE scheint die ZE Protein-gebundene Xanthophylle zu bevorzugen (Jahns, 1995; Färber und Jahns, 1998). Zudem gibt Hinweise auf einen schnellen ZE-Abbau in Pflanzen, da mehrere potentielle PEST-Regionen in der ZE-Sequenz gefunden wurden (Bouvier *et al.*, 1996).

Über die Regulation der Epoxidation ist nur wenig bekannt. Hager (1967) beschrieb die ZE unter physiologischen Bedingungen als konstitutiv aktiv, allerdings mit niedrigen Umsatzraten (Hager, 1967).

Ein auffallendes Merkmal der Epoxidation ist die Herunterregulierung der ZE-Aktivität bei photooxidativem Stress. So wurde eine kinetische Korrelation zwischen der Zx-Epoxidation und der Relaxation der qI-Komponente des NPQ beschrieben (Jahns und Miede, 1996; Verhoeven *et al.*, 1996). Eine solche Korrelation kann als direkte oder indirekte Involvierung des Zx in Energiedissipationsprozessen, die im PSII-Reaktionszentrum lokalisiert sind, verstanden werden. Im Gegensatz zum qE, ist diese Zx-abhängige qI-Löschung unabhängig von transmembranen pH-Gradienten (Verhoeven *et al.*, 1998; Gilmore und Ball, 2000). In überwinternden immergrünen Pflanzen wurde während der Winterphasen eine permanente und hohe Zx-Akkumulierung nachgewiesen, die mit der Aufrechterhaltung der PSII-Herunterregulierung einherging (Adams *et al.*, 2002; Öquist und Huner 2003). Offensichtlich liefert die permanente Zx-Akkumulierung eine effiziente Photoprotektion des photosynthetischen Apparates unter ungünstigen Umweltbedingungen Demmig-Adams und Adams *et al.*, 2006).

Es gibt Hinweise, dass möglicherweise Phosphorylierungsreaktionen an der anhaltenden Herunterregulierung der ZE-Aktivität (Xu *et al.*, 1999), sowie der PSII-Aktivität (Ebbert *et al.*, 2005) beteiligt sind. Ebbert *et al.* (2005) beobachteten eine Korrelation der ZE- Inaktivierung mit der Phosphorylierung des D1-Proteins im Reaktionszentrum des Photosystems II (PSII) und mit der Hochregulierung des im Thylakoidlumen lokalisierten Phosphatase-Inhibitors TLP40. TLP40 ist ein Thylakoid-Lumen-Protein, das an der Regulation einer Thylakoidmembran-lokalisierten Phosphatase beteiligt ist. Diese Phosphatase ist verantwortlich für die Dephosphorylierung der PSII-Kernproteine (Rokka *et al.*, 2000).

Es wurde auch eine mögliche Rolle von Aminozuckern in der anhaltenden Herunterregulierung der Zx-Epoxidation *in vivo* diskutiert, weil Aminozucker sich in Wasserlinsen (*Lemna trisulca*) als effektive Inhibitoren der Zx-Epoxidation herausstellten (Latowski *et al.*, 2007). Außerdem wurde während der Winteranpassung immergrüner Pflanzen auch eine Hochregulierung des PsbS-Proteins und PsbS-verwandter Proteine wie ELIPs, HLIPs und OHPs gezeigt (Demmig-Adams *et al.*, 2006; Zarter *et al.*, 2006a; Zarter *et*

al., 2006b). Inwiefern diese Proteine möglicherweise an der Regulation einer permanenten Energiedissipation beteiligt sind, ist jedoch nicht bekannt.

Im Gegensatz zum Xanthophyll-Zyklus höherer Pflanzen beinhaltet der Diadinoxanthin (Ddx)-Zyklus der Kieselalgen (Bacillariophyceen), Chrysophyceen, Xanthophyceen und Dinophyceen nur zwei an Stelle der drei Xanthophyll-Pigmente, so dass dort kein Intermediat analog zum Ax existiert (Hager und Stransky, 1970, Olaizola und Yamamoto, 1994). Allerdings sind die Enzyme des Ddx-Zyklus, die jeweils die De-epoxidation bzw. Epoxidation katalysieren, ortholog zu denen im Xanthophyll-Zyklus höherer Pflanzen und benötigen auch die gleichen Co-Faktoren für ihre Aktivität (Hager, 1980). Im Gegensatz zur Zx-Epoxidation scheint die Dtx-Epoxidation aber sehr viel schneller zu verlaufen und über den ΔpH reguliert zu sein (Goss *et al.*, 2006). Auch die Energiedissipation unterliegt in Kieselalgen einer anderen Regulation und scheint nur abhängig von der Dtx-Konzentration und unabhängig vom ΔpH (Goss *et al.*, 2006). Für einige Spezies höherer Pflanzen wurde ein weiterer Xanthophyll-Zyklus ohne Intermediat beschrieben. Dabei handelt es sich um den Lutein-Epoxid (Lx)-Zyklus, in dem Lut zu Lx umgewandelt wird (Bungard *et al.*, 1999; Garcia-Plazaola *et al.*, 2002; Matsubara *et al.* 2003; Matsubara *et al.* 2004). Es wird vermutet, dass die Lut-Epoxidation möglicherweise von der ZE katalysiert wird.

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der ZE. Dazu sollte das Enzym, das in Pflanzen nur in geringen Mengen vorkommt, überexprimiert werden um biochemische Eigenschaften und die Regulation der ZE näher untersuchen zu können.

Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt, über welche die mit spezifischen Proteinanhängen versehene ZE sowohl heterolog (in *E. coli*) als auch homolog (in *Arabidopsis*) überexprimiert wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Für diese Doktorarbeit wurden Chemikalien der Firmen Roche Biochemicals (Mannheim), Fluka Chemie AG (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), GE-Healthcare, Calbiochem (Bad Soden), und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) verwendet.

2.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden bei der Firma New England Bio Lab (Frankfurt am Main) bestellt. Es wurden folgende Enzyme verwendet:

AscI (Puffer 4), *EcoRI* (Puffer U^{dd}), *NruI* (Puffer U), *NotI* (Puffer 3 + BSA), *SacI* (Puffer 4), *SspI* (Puffer U), *XhoI* (Puffer 2 + BSA)

→ Für die Restriktion genomischer DNA wurde das Enzym *EcoRI* (20U/μl) der Fa. New England Biolabs mit dem dazugehörigen Puffer U^{dd} verwendet.

Alle weiteren aufgeführten Enzyme wurden für die RNA und DNA – Modifikation, sowie für die DNA – Amplifikation und cDNA - Synthese verwendet:

RNase (DNase-frei, Qiagen), Taq-DNA-Polymerase recombinant (Invitrogen), TAKARA Taq-DNA-Polymerase (TAKARA), High-Phusion Taq-DNA-Polymerase (FinnZymes), LR-Clonase-Mix (Invitrogen), Proteinase K (Invitrogen), DNase I (RNase-frei, Fermentas), Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

2.1.3 Nährmedien und Platten

Alle für die Herstellung der Medien verwendeten Lösungen wurden mit ddH₂O angesetzt. Vor Gebrauch wurden alle Medien autoklaviert und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

Festmedien wurden durch Zugabe 1,5 % Bacto-Agar hergestellt.

LB-Medium: 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt

SOC-Medium: 0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 20 mM Glucose

YEB-Medium: 5 g/l Beef extract, 5 g/l Trypton, 1 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Saccharose, 2 ml 1 M MgSO₄

2.1.4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Klonierung des pENTR™ / D-Topo® -Vektors	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Klonierung der pAUL - Vektoren	Hanahan, 1983
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	Koncz & Schell, 1986
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) gold	Für die heterologe Überexpression der ZE im pET21a-Vektor	Novagen
<i>Escherichia coli</i> M15[pREP4]	Für die heterologe Überexpression der ZE im pQE30-Vektor	Qiagen

2.1.5 Plasmide

Plasmid	Grösse	Resistenz	Besonderheiten	Referenz
pAUL 1	11,308 Kb	Kan ^r BASTA ^r	attR1- und attR2 – Sequenz für die Gateway® Technologie, 2x CaMV-Promoter, HA-tag	Dagmar Lyska, AG Prof.Westhoff
pAUL 2	11,398 Kb	Kan ^r BASTA ^r	attR1- und attR2 – Sequenz für die Gateway® Technologie, 2x CaMV-Promoter, HA – tag, Strep III - tag	Dagmar Lyska, AG Prof.Westhoff
pAUL 3	11,839 Kb	Kan ^r BASTA ^r	attR1- und attR2-Sequenz für die Gateway® Technologie, 2x CaMV-Promoter, HA-tag, Strep III-tag, IgG-BD-tag	Dagmar Lyska, AG Prof.Westhoff
pENTR™ /D-Topo®	2,58 Kb	Kan ^r	attL1- und attL2-Sequenz für die Gateway® Technologie, <i>rrnB</i> Transkriptions-Terminierungs-Sequenz, pUC-Ursprung	Invitrogen
pCR®2.1-TOPO®	3,9 Kb	Amp ^r , Kan ^r	T7-Promotor, pUC-Ursprung	Invitrogen
pET21a	5,44 Kb	Amp ^r	T7-lac-Promotor, C-terminaler His-tag,	Novagen
pQE30	3,4 Kb	Amp ^r	T5-lac-Promotor, N-terminaler His-tag,	Qiagen

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Martiensried) synthetisiert.

Name des Primers	Sequenz	Verwendung
ZEOSP	5'-AAGGGATTCAAAGTCAAAGGTGTAGTA-3'	<i>NpZEP</i> -Sequenz (pET21a-Vektor) für die heterologe Überexpression
ZER2	5'-TCACTCGAGAGCTGCCCCCACTGCTTGACG-3'	
pQE	5'-TTCGTCGACTCAAGCTGCCCCCACTGCTTG-3'	<i>NpZEP</i> -Sequenz (pQE30-Vektor) für die heterologe Überexpression
ZER3	5'-TTCCTCGAGTCAAGCTGCCCCCACTGCTTG-3'	
ZAtF	5'- <u>CACC</u> -ATG-GGT-TCA-ACT-CCG-TTT-TGC-TAC-TC-3'	Amplifikation der <i>AtZEP</i> -Sequenz für die homologe Überexpression
ZAtR	5'-TCG-GTC-ACA-TAG-GTT-CCG-TGT-TCG-CTT-CGA-3'	
M13 F	5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-G-3'	Sequenzierung
M13 R	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3'	
TLP40F	5'-CAA-TCC-CAA-CAT-CGA-GGA-CTG-3'	Nachweis der homozygoten T-DNA-Insertion bei <i>tlp40</i>
TLP40R	5'-ACC-GGA-GAC-AAC-TTG-AAT-GG-3'	
LBb1	5'-GCG-TGG-ACC-GCT-TGC-TGC-AAC-T-3'	
Anchored Oligo-dT	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN -3'	cDNA – Synthese
RTpcrSpl1 F	5'-TTC-GTC-TCA-GGT-TTC-GAA-GAT-3'	Quantitative Real-Time PCR
RTpcrSpl2 F	5'-TAT-AAA-CTG -TAT-GCA-TGC-TCG-3'	
RTpcrSpl1 +Spl2R	5'-TTA-TCG-GTC-ACA-TAG-GTT-CCG-3'	
nBLACK-F	5'-GTG-AAA-ACT-GTT-GGA-GAG-AAG-CAA-3'	
nBLACK-R	5'-TCA-ACT-GGA-TAC-CCT-TTC-GCA-3'	
Act7 F	5'-TTC-AAT-GTC-CCT-GCC-ATG-TA-3'	Nachweis von genomischer DNA in cDNA-Proben
Act7 R	5'-TGA-ACA-ATC-GAT-GGA-CCT-GA-3'	
VDE 2 F	5'-ATG-GCA-GTA-GCT-ACA-CAT-TGT-T-3'	Nachweis einer <i>ZE</i> -T-DNA-Insertion im VDE-Gen
VDE 2 R	5'-CTA-CCT-GAC-CTT-CCT-GAT-TGG-C-3'	

→ Der rote unterstrichene Sequenzteil ist die eingefügte Überhangsequenz für die gerichtete Klonierung des Zeaxanthin Epoxidase Gens in den pENTR™ /D-Topo® Vektor

2.1.7 Pflanzenmaterial

Wildtyp: *Arabidopsis thaliana*; Ökotyp: Columbia-0

Die analysierten Mutanten wurden von den folgenden Stellen bezogen NASC = Nottingham Arabidopsis Stock Center, Nottingham, UK und SALK Institute for Biological Studies, San Diego, USA (Joseph R. Ecker).

Der Literaturhinweis bezieht sich auf die, das mutante Allel beschreibende, Veröffentlichung. *npq1*- und *npq2*-Mutanten (Hintergrund beider Mutanten: Col-0) wurden von NASC zur Verfügung gestellt.

Genotyp	Bezugsquelle	Literaturhinweis
<i>npq1-2</i>	N3771 (NASC)	Niyogi <i>et al.</i> , 1998
<i>npq2 (aba1-6)</i>	N3772 (NASC)	Niyogi <i>et al.</i> , 1998
<i>t1p40</i>	N529448 (SALK_029448)	Joseph R. Ecker
<i>t1p40</i>	N536618 (SALK_036618)	Joseph R. Ecker

2.1.8 Computeranalysen

Die annotierten ZE-Sequenzanalysen wurden mit Gensequenzen der TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*) Gen-Datenbank durchgeführt. Fehleranalysen sequenzierter ZE-Gene erfolgten mit Hilfe des *BLAST*-Programms des *National Centers for Biotechnology Information (NCBI)*. Das Programm ermittelt Sequenzverwandtschaften unter Zuhilfenahme aller Gen-Datenbanken außer *EST*, *STS*, etc.

DNA-Alignments wurden mit dem *EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms* (s. Abb. 7.3) erstellt. Das vorhergesagte Chloroplasten-Transitpeptid wurde mit dem ChloroP 1.1 Server ermittelt.

Sämtliche in dieser Arbeit veröffentlichten Abbildungen wurden mit dem Programm *Adobe Photoshop* Version 6.0 und erstellt.

2.2 Anzuchsbedingungen für *Arabidopsis thaliana*

Zur Kultivierung wurden die Samen auf Floraton-Erde (Floragard, Oldenburg) ausgesät, die mit einem Langzeitdünger versetzt wurde. Vor der Aussaat erfolgt eine 48-stündige Inkubation der Samen in 0,1%iger Agarose bei 4°C im Kühlschrank, um eine gleichmäßige Keimung zu erreichen. Anschließend werden die Samen in geeigneten Abständen auf die feuchte Erde ausgesät.

Die Pflanzenanzucht erfolgt in einer Klimakammer bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 8 zu 16 h, wobei die Tagestemperatur 24 °C und die Nachttemperatur 20 °C betrug. Auf Höhe der Blattrosetten beträgt die normale durchschnittliche Belichtungsstärke 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-2}$. Die Belichtungsexperimente wurden mit 5-6 Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung genomischer Pflanzen-DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen wurden 200mg junge Blätter in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial zu einem hellgrünen Pulver gemörsert und mit 600 μl Extraktionspuffer (200 mM Tris (pH 8); 20 mM EDTA; 800 mM NaCl; 5% SDS; 0,8% CTAB versetzt. Das Gemisch wurde mit einem Mikropistill homogenisiert und mit 2 μl RNase (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 40 μl 10%iges SDS versetzt. Nach vorsichtigem Schwenken wurden 200 μl 5 M Kaliumazetat dazupipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 68°C für 15 min. Anschließend wurde das Gemisch 20 min auf Eis inkubiert und danach mit 500 μl eiskaltem Chloroform versetzt. Die DNA-Fällung erfolgte mit 0.6 Vol. Isopropanol und die genomische DNA wurde abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach der Lufttrocknung in 20 μl TE pH 7 resuspendiert.

2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* Col-0 und die Behandlung mit DNase I erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.3 cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase (Erststrangsynthese)

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der Superscript^{II} reversen Transkriptase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der PCR-Ansatz wurde für die verwendeten Taq - Polymerasen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Für die Elektrophorese wird zunächst Agarose in TBE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung auf unter 70°C erfolgt die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/µl). Anschließend wird der Ansatz in einen Gelträger mit aufgesetztem Gelkamm gegossen. Nachdem das Gel fest geworden ist, kann der Gelkamm entfernen und das Gel mitsamt Träger in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt werden. Vor dem Beladen der Geltaschen werden die DNA-Proben mit 0,1 Vol. Blau-Marker versetzt. Der Gellauf erfolgt bei einer Spannung von 5V/cm. Die Detektion der elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente erfolgt unter UV-Licht.

2.3.6 Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel

Zur Extraktion der DNA wurde das NucleoSpin Extract II Kit verwendet und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.7 Gerichtete TOPO - Klonierung

Die Subklonierung eines PCR-Produktes in den Topoisomerase-Vektor ist eine schnelle und hocheffiziente Methode. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt.

2.3.8 LR-Rekombinationsreaktion

Für die LR-Reaktion wurde der Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) verwendet und der Ansatz nach Angaben der Herstellers durchgeführt.

2.3.9 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Ein Standardreaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

- 1 µg DNA / Volumen
- 1 × enzymspezifischen Reaktionspuffers (10x Puffer)
- auf 10-200 µl mit ddH₂O auffüllen
- 3-4 U Enzym pro µg DNA

Wichtig: Enzym zuletzt zugeben, um eine eventuelle Denaturierung zu verhindern
Inkubation für 1 - 2 h bei dem Enzym-spezifischen Temperatur-Optimum (meist 37°C)
Gelelektrophorese und Analyse der Spaltung unter UV-Licht

2.3.10 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmiden

Als Transformation bezeichnet man die Einschleusung von DNA-Molekülen in Zellen. Für die Transformation mit Plasmiden erweisen sich Bakterienzellen wie *E. coli* als geeignet. Nach erfolgreicher Transformation wird, während jedem mitotischen Zyklus, die Fremd-DNA im Bakterium redupliziert und auf die Tochterzelle übertragen. Somit erreicht man eine effiziente Vervielfachung des transformierten Plasmids, welches anschließend aus den Bakterien

zurückgewonnen werden kann. Die Transformation über Hitzeschock und die Elektroporation stellen Standard-Techniken dar.

2.3.10.1 Transformation über Hitzeschock

Dafür wurden 50 µl chemisch-kompetenter Zellen ca.10min auf Eis aufgetaut und mit 0.1-10ng Plasmid versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und für den Hitzeschock für 30 s bei 42°C (Wasserbad) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zurück auf Eis gestellt. Es wurden 200 µl vorgewärmtes SOC-Medium in die Bakteriensuspension pipettiert und für 30 min auf einem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Antibiotika-Selektionsmedium (Agarplatte) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.10.2 Transformation über Elektroporation

Dafür wurden 50µl elektrokompeter Zellen ca.10min auf Eis aufgetaut und mit 5-10 ng Plasmid versetzt. Die DNA-Bakterienlösung wurde möglichst blasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporationsküvette wurde an die Elektrode des *Gene Pulser™*(Biorad) eingesetzt und der Stromfluß mit einer Spannung von 1.8 kV gestartet. Es wurden 200µl vorgewärmtes SOC-Medium in die Bakteriensuspension pipettiert und für 30 min auf einem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Antibiotika-Selektionsmedium (Agarplatte) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.11 Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.11.1 Plasmid-Mini-Präparation mit dem NucleoSpin-Plasmid

Zur sehr schnellen Isolierung von Plasmid-DNA wird das NucleoSpin-Plasmid Kit verwendet. Die isolierte Plasmid-DNA kann sofort sequenziert werden. Das Protokoll wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.11.2 Plasmid-Midi-Präparation mit dem QIAGEN-Plasmid Midi Kit

Für die Präparation von größeren Plasmid-Mengen wurde das QIAGEN-Plasmid Midi Kit eingesetzt. Die Reinigung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.3.12.1 Konzentrationsbestimmung über photometrische Messung

Die DNA und RNA Konzentrationsbestimmungen erfolgten am NanoDrop-Spectrophotometer ND-1000 (peqLab Biotechnologie GmbH).

2.3.12.2 Konzentrationsbestimmung auf einem Agarose-Gel

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration einer Probe kann auf einem Agarose-Gel abgeschätzt werden, indem die zu messende Probe zusammen mit Mengen-Markern bekannter Konzentration aufgetragen und die Intensität der jeweiligen Banden unter UV-Licht miteinander verglichen wird. Die Konzentrationsbestimmung auf einem Agarose-Gel ist oftmals genauer da bei der photometrischen Messung evtl. Kontaminationen mit anderen bei

260nm absorbierenden Substanzen (z.B. Phenol), in die Konzentrationsangabe mit einfließen.

2.3.13 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* -Zellen (DH5)

Alle verwendeten Materialien und Lösungen werden zuvor autoklaviert. Das bidestillierte Wasser und das Glycerol werden zusätzlich sterilfiltriert. Für die Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium (s. Material 2.1.3) mit 1 Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden 2 L LB-Medium mit 20 ml Vorkultur angeimpft und ca. 4 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert (OD₆₀₀ 0,5-1,0). Danach wurde die Bakteriensuspension 15 min bei 4°C und 5000rpm zentrifugiert und die Pellets in 2 L eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde anschließend wiederholt und die Pellets in 1 L eiskaltem ddH₂O resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation (s.o.) wurden die Pellets in 60 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und auf Corex-Gläser überführt. Die folgende Zentrifugation wurde für 15 min bei 4°C und 4000rpm durchgeführt und die Pellets in 6 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.3.14 Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien (GV3101)

Zunächst wurde eine Glycerinkultur auf YEB/Rif+/Gent+-Agarplatten ausgestrichen und 2 Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden 40 ml YEB-Medium mit einer vereinzelt Kolonie angeimpft und 2 Tage bei 28°C auf Schüttler inkubiert. Danach wurden 800 ml YEB/Rif+/Gent+-Medium mit der Vorkultur versetzt und bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 – 0,5 (ca. 4 h) inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 2°C und 3000 rpm, wurde der Überstand verworfen und die Pellets in insgesamt 240 ml 1 mM Hepes (sterilfiltriert, eiskalt) vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis und eine erneute Zentrifugation (s.o.). Der Waschschrift mit 1mM Hepes wurde noch zweimal wiederholt und das Pellet in insgesamt 80ml 1 mM Hepes mit 10% Glycerol (sterilfiltriert, eiskalt) resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (s.o.) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 Volumen 1mM Hepes mit 10 % Glycerol vorsichtig auf Eis resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.3.16 Southern Blot-Analyse mittels DIG-Sonden-Hybridisierung

Zum Nachweis der Integration bestimmter DNA-Sequenzen in das pflanzliche Genom wurden 30 µg genomischer DNA mit der Restriktionsendonuklease *Eco RI* geschnitten. Anschließend wurde die DNA in einem 0,8%igem Agarosegel ohne Ethidiumbromid bei einer Spannung von 70 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Vorbereitung auf die Übertragung der DNA auf die Blotmembran, wurde die Transfereffizienz längerer DNA-Fragmente zunächst

durch eine Depurinierung erhöht. Dafür wurde das Gel 10-15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in der entsprechenden Depurinierungslösung inkubiert. Dies wurde durch eine Farbänderung des Blaumarkers sichtbar. Danach wurde das Gel 1 x in ddH₂O gewaschen. Es folgte eine 45-minütige Inkubation des Gels in Denaturierungslösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wurde es wieder 1 x in ddH₂O gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Neutralisierungslösung gewaschen. Dabei änderte der Blaumarker seine Farbe zurück in den ursprünglichen Zustand. Das Gel wurde kurz in 20 x SSC-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde der Southern Blot (Southern, 1975) für den DNA-Transfer auf die Hybond/N+ Membran (Roche) aufgebaut. Mittels Kapillartransfer in 20 x SSC, wurde die aufgetrennte DNA über Nacht auf die Membran transferiert. Am nächsten Tag wurde die *Blot*-Apparatur abgebaut und die Höhe der Gel-Slots auf der Rückseite des Filters mit Kugelschreiber markiert. Durch UV-crosslinken (20 s bei 30000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$) wurde die DNA auf der Membran fixiert. Nach einem kurzen Waschen in ddH₂O, kann die Membran prähybridisiert werden. Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgten mit dem DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) nach Angaben des Herstellers.

Herstellung DIG markierter Sonden

Die Herstellung der DIG markierten *bar*-Sonde erfolgte mit dem DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) nach Angaben des Herstellers.

2.3.17 Quantitative Real – Time PCR

Die Real-Time PCR wurde am DNA Engine Opticon[®] System (Biorad) durchgeführt.

Quantifizierung der Real – Time PCR Produkte

Bei der Analyse und dem Vergleich der Real-Time PCR-Ergebnisse gibt es einige unkontrollierbare Variablen, die zu einer fehlerhaften Interpretation führen können. Zu diesen zählen beispielsweise die Menge des Startmaterials, Enzymeffizienzen, Unterschiede zwischen Gewebearten und individuelle oder experimentelle Bedingungen. Dadurch ist es notwendig die Werte zunächst zu normalisieren, um einen guten Vergleich der Ergebnisse zu erzielen. Es gibt verschiedene Wege für eine Normalisierung. Die üblichsten sind eine Normalisierung auf die originale Anzahl an Zellen, eine Normalisierung auf die Masse an Gesamt-RNA, eine Normalisierung auf ein oder mehrere Haushaltsgene und eine Normalisierung auf einen internen oder externen Kalibrator. Die Normalisierung auf ein Haushaltsgen bietet den Vorteil, dass eine Variation durch unterschiedliche RNA-Mengen ausgeschlossen werden kann. Allerdings sollte ein Gen verwendet werden, das während

des Experiments und zwischen den Proben konstant in gleichen Mengen exprimiert wird (Cook, N.L., *et al.*, 2008).

Die zwei Hauptmethoden der Normalisierung sind zum einen die absolute und zum anderen die relative Quantifizierung (Sellars, M.J., *et al.*, 2007). Bei der absoluten Quantifizierung wird die exakte Anzahl der Kopien des Zielgens kalkuliert, während in der relativen Quantifizierung die Genprobe relativ zu einem anderen Referenzgen exprimiert wird.

Die relative Quantifizierung ist die gebräuchlichste Technik. Hierbei werden die Genexpressionslevel durch das Verhältnis zwischen der Menge an Zielgen und einem endogenen Referenzgen ermittelt. Zunächst müssen die Ct-Werte der Reaktionen bestimmt werden. Dieser ist definiert als der Zyklus, in dem es zu einem signifikanten Anstieg des Reportersignales über den Schwellenwert kommt. Der Schwellenwert ist die Menge an Fluoreszenz oberhalb der Basislinie, bei der das Signal über die Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt.

Einen direkten Vergleich zwischen den Ct-Werten des Ziel- und Referenzgens bietet die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Allerdings sollte die PCR-Effizienz beider Gene nah bei 100% liegen und untereinander nicht mehr als 10% differieren. Nur das Anfangsexperiment erfordert eine Standardkurve, um die PCR-Effizienzen des Ziel- und Referenzgens vergleichen zu können (Schmittgen, T.D., *et al.*, 2008). Zusätzlich ist eine weitere Probe notwendig, die als Kallibrationsprobe bezeichnet wird (Livak, K.J. und Schmittgen, T.D., 2008). Hierbei handelt es sich um eine Referenzprobe (z.B. unbehandelte Widtypprobe), deren Expressionslevel mit der unbekanntem Zielgenprobe verglichen werden können.

Zunächst wird der ΔCt zwischen dem Ziel- und dem Referenzgen für jede Probe berechnet:

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen(MT)}} = \text{Ct}_{\text{(Zielgen)}} / \text{Ct}_{\text{(Referenzgen)}}$$

Die gleiche Berechnung erfolgt zwischen der Kallibrationsprobe und dem Referenzgen:

2 Material und Methoden

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Referenzprobe(WT)}} = \text{Ct}_{\text{(Zielgen)}} - \text{Ct}_{\text{(Referenzgen)}}$$

Danach wird die Differenz zwischen dem ΔCt der unbekanntem Zielgenprobe und dem ΔCt der Kallibrationsprobe kalkuliert:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Referenzprobe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Zielgen}}$$

Anschließend wird die relative Expression berechnet:

$$2^{\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{Normalisiertes Expressionsverhältnis}$$

Dieser Wert kann für den Vergleich von Expressionsleveln in Proben verwendet werden.

Durchführung:

Die Real-Time PCR wurde in 2 Schritten durchgeführt (two-step quantitative Real-time-RT-PCR). Zunächst erfolgte die RNA-Isolierung und die cDNA-Synthese, wie im Methodenteil 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben. Anschließend wurde zunächst eine Real Time-PCR angesetzt,

um die Amplifizierungseffizienz zu ermitteln.

Dafür wurde die cDNA in einer Verdünnungsreihe exponentiell um den Faktor 4 verdünnt.

Folgende Verdünnungen wurden erstellt: 1:10, 1:40, 1:160, 1:640

Es wurden 3 unterschiedliche Primer-Paare eingesetzt. Diese liegen jeweils auf Exon-Exon-Grenzen, um ein verfälschtes Ergebnis durch Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern. Die Primer-Paare sind im Materialteil unter 2.1.6 aufgeführt. Bei nBlackF und nBlackR handelt es sich um die Referenzgenprimer. Das Primerpaar RTpcrSpl1F und RTpcrSpl1R amplifiziert nur die Spleißvariante 1 der Zeaxanthin Epoxidase, während das Primerpaar RTpcrF und RTpcrR beide Spleißvarianten amplifiziert.

Die Amplifizierungseffizienz wurde für jede Verdünnung mit jedem Primerpaar in einer Dreifachbestimmung getestet.

Probe	Genomische DNA-Kontrolle	Negative Kontrolle (NTC=No-template-control)
5 µl cDNA-Verdünnung	5 µl genomische DNA	5 µl ddH ₂ O
Reaktionsmix: 10 µl 2 x Reaktionspuffer 2 µl Primerpaar-Mischung (1µM) 3 µl ddH ₂ O Der Reaktionsmix wird zu den vorgelegten DNA-Proben pipettiert.		

PCR Programm:

- 95°C, 2 Min.
- 95°C, 30s (Denaturierung)
- 60°C, 1 Min. (*Primer*-Hybridisierung)
- 72°C, 1 Min./1kB (Elongation)
- Gehe zu Schritt 2, 30x (Wiederholung des Zyklus)

Nachdem die Verdünnung mit der besten Amplifizierungseffizienz und dem niedrigsten Schwellenwert ermittelt worden ist, wird der eigentliche Real Time-PCR Ansatz erstellt. Dafür wird zunächst die geeignete Verdünnung von allen cDNA-Proben erstellt. Für jede cDNA-Probe wird mit jedem Primerpaar eine Dreifachbestimmung angesetzt. Das Pipettierschema und PCR-Programm ist wie oben bereits angegeben.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Isolation von Thylakoiden aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von Thylakoiden aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen und Materialien wurden vorgekühlt. Anschließend wurde sofort der Chlorophyll-Gehalt photometrisch bestimmt. In dieser Zeit wurden die Thylakoide für die nachfolgenden Analysen (Epoxidation, Western Blot) dunkel und auf Eis aufbewahrt. Langfristige Lagerungen erfolgten bei -20°C. Für die Isolierung wurden Blätter von 3-4 Pflanzen (ca. 6 Wochen alt) in 50 ml Isolationsmedium (330 mM Sorbitol; 20 mM Tricine (pH 7,6 (KOH)); 5 mM EGTA; 5 mM EDTA; 10 mM Na₂CO₃) im kleinen Waring-Blender-Aufsatz für max. 10 s homogenisiert und durch eine Nylongaze (20 µm Porengröße) gepresst. Das Filtrat wurde 5 min bei 2000 x g (Hettich) in Falconröhrchen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 1 ml Resuspensionsmedium (300 mM Sorbitol; 20 mM HEPES pH 7,6 (KOH); 5 mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA) aufgenommen.

2.4.2 Isolation intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Isolation intakter Chloroplasten wurde nach Crouchman *et al.* (2006) durchgeführt. Es wurde Blattmaterial 6-8 Wochen alter *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden in eiskaltem Isolationsmedium (0.33 M Sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaPO (pH 6.5), 2 mM Ascorbat (frisch zusetzen!!)) für 3-5 s im Waring Blendor gemixt und zunächst durch 4 Lagen Mull und anschließend durch 2 Lagen Mull und Nylongaze filtriert. Der folgende Zentrifugationsschritt erfolgte bei 5000 x g für 30 s. Das Pellet wurde in Waschpuffer 0.33 M (Sorbitol, 10 mM MES (pH 6.5)) resuspendiert und erneut zentrifugiert (5000 x g, 1 min). Das resultierende Pellet wurde in Aufbewahrungsmedium (0.33 M Sorbitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM HEPES (pH 7.6)) aufgenommen und die Suspension dann auf ein wenige cm dickes 50% Percoll-Kissen (gelöst in Aufbewahrungsmedium) aufgetragen. Dieses wurde dann für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Die intakten Chloroplasten befinden sich im Pellet das mit wenig Aufbewahrungsmedium resuspendiert wird.

2.4.3 Chlorophyll-Bestimmung (nach Arnon, 1949)

Der Chlorophyll-Gehalt jeder Probe wurde anhand einer Dreifachbestimmung verifiziert. Dabei wurde 1 ml 80%iges Aceton mit 10 µl Thylakoid-Suspension versetzt und 2 min bei 10000 x g (Zentrifuge 5410, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Mikrofilter mit der Porengröße 0,2µm gefiltert und danach wurden 100 µl des Filtrats in 900µl Aceton p.a. aufgenommen. Die Extinktion wurde bei 645 nm und 663 nm gegen Aceton p.a. (Leerwert) gemessen.

Errechnung des Chl – Gehaltes: $c_{chl} [\text{mg Chl/ml}] = E_{645} \times 20,2 + E_{663} \times 8,02$

2.4.4 Epoxidation

Die Epoxidationsreaktion wurde *in vivo* an ausgestanzten Blattscheiben mit einem Durchmesser $\square = 8\text{mm}$ mittels HPLC analysiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Blattscheiben in wassergefüllten Petrischalen für 30 min mit $2000\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bestrahlt, um möglichst hohe Ausbeuten an Zeaxanthin während der Deepoxidation zu erhalten. Die Kühlung wurde während der Belichtung auf 20°C eingestellt und zusätzlich wurden die Blattscheiben über einen Ventilator belüftet. Für die Epoxidation wurden die Petrischalen unter Licht von ca. $30\ \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blattscheiben wurden zu bestimmten Zeitpunkten für die Analyse entnommen und bis zur Weiterverarbeitung zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die *in vitro* Epoxidation wurden zunächst ganze Blätter, wie oben bereits beschrieben, belichtet. Aus diesen wurden anschließend Thylakoide isoliert. Die Thylakoide wurden in der Konzentration $100\ \mu\text{g Chl/ml}$ mit Epoxidationsmedium ($400\ \text{mM Sorbitol}$, $50\ \text{mM HEPES pH}7,5$ (NaOH), $5\ \text{mM MgCl}_2$, frisch zugeben: $0,3\ \text{mg/ml BSA}$, $30\ \text{mM Natrium-Ascorbat}$, $1\ \mu\text{M FAD}$, $0,5\ \text{mM NADH}$) versetzt und die Reaktion wurde durch die Zugabe von NADH gestartet. Die Licht- und Temperaturverhältnisse entsprechen denen der *in vivo* Epoxidation. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ der Epoxidationsreaktion in $900\ \mu\text{l}$ Aceton (p.a.) gestoppt. Die Weiterverarbeitung und Analyse sind im Methodenteil 2.2. beschrieben.

2.4.5 Isolation der VDE aus *Arabidopsis thaliana*

Zunächst wurden aus 24 Pflanzen der Überexpressionsmutante *pAUL1/48* Thylakoide isoliert. Allerdings wird das Resuspensionsmedium über Zentrifugation entfernt und das Pellet anschließend in $6\ \text{ml } 0,1\ \text{M Citratpuffer/NaOH pH } 5,2$ gelöst. Danach erfolgt eine Chlorophyll-Bestimmung und die Suspension wird mit dem Citratpuffer auf einen Chl-Gehalt von $1\ \text{mg Chl/ml}$ eingestellt. Die isolierten Thylakoidmembranen werden $2 \times 1\ \text{min}$ mittels Ultraschall (Pulsdauer 50%, Intensität Stufe 2 am Sonifier 250, Fa. Branson) aufgebrochen. Dabei wird die Suspension in einem zweiten Becherglas mit Eiswasser gekühlt. Nach der Beschallung wird die Suspension für 30 min bei $17500\ \text{rpm}$ (Beckmann, Kühlzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in $50\ \text{ml Puffer 2}$ ($330\ \text{mM Sorbitol}$, $40\ \text{mM HEPES/NaOH pH } 7,2$, $5\ \text{mM NaCl}$, $1\ \text{mM KH}_2\text{PO}_4$, $50\ \text{ml gesättigte Ammoniumsulfatlösung } [(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$) resuspendiert. Die Suspension wird noch einmal beschallt (s.o.). Durch den hohen pH – Wert des Puffers 2 wird die VDE dabei von der Thylakoidmembran abgelöst. Der Überstand wird bei -70°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgt die Proteinfällung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Dafür wird unter Rühren und Kühlen tropfenweise die $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ der Suspension auf 40% eingestellt. Anschließend wird 20min weitergerührt und danach 20 min bei $37000 \times g$ ($17117\ \text{rpm Beckmann}$, Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation wie oben auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 80% eingestellt

und 3h unter Kühlung im Eiswasserbad weitergerührt. Es folgt eine Zentrifugation für 1 h bei 100000 x g (28141 rpm Beckmann, Kühlzentrifuge). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in sehr wenig dH₂O bei RT unter Schwenken aufgelöst. Der so erhaltene VDE-Rohextrakt wird in 500 µl Fraktionen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für die De-epoxidationsreaktion wurden 75µl VDE-Rohextrakt zu 1 ml DE-Medium (0,1 M Citrat /NaOH pH5,3, 28 µM MGDG, 1 µM Vx) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl 1 M Natrium-Ascorbat gestartet. Nach 0 min und 30 min wurden der Reaktion je 100 µl entnommen und zu 900 µl Aceton (p.a.) pipettiert. Es folgte eine Analyse der Proben mittels HPLC.

2.4.6 De-epoxidation

Die De-epoxidationsreaktion wurde *in vivo* an ausgestanzten Blattscheiben mit einem Durchmesser $\square = 8\text{mm}$ mittels HPLC analysiert. Die Blattscheiben wurden in wasser-gefüllten Petrischalen mit bestimmten Lichtintensitäten (500, 1000, 2000 µmol Photonen $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) bestrahlt. Die Kühlung wurde während der Belichtung auf 20°C eingestellt und zusätzlich wurden die Blattscheiben über einen Ventilator belüftet. Die Blattscheiben wurden zu bestimmten Zeitpunkten für die Analyse entnommen und bis zur Weiterverarbeitung zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die *in vitro* Reaktion in Thylakoidmembranen wird die pH-Abhängigkeit der Deepoxidation ausgenutzt. Zunächst werden die Thylakoide isoliert. Nach der photometrischen Chlorophyll-Bestimmung wurden die Thylakoide in der Konzentration 50 µg Chl/ml mit DE1-Medium (330 mM Sorbitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 40 mM MES/NaOH pH 5,5) versetzt. Dem Reaktionsansatz wurden jeweils nach 0 min und nach 30 min 100 µl entnommen und zu 900 µl Aceton (p.a.) pipettiert. Die Probenaufarbeitung für die HPLC-Analyse ist im Methodenteil (2.2.) beschrieben.

2.4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Aufbereitung der Proben:

1. Blattscheiben

Die Blattscheiben ($\square 8\text{mm}$) werden in 1,5ml Eppendorff-Gefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und am Hidolph pulverisiert. Anschließend werden die gemörserten Proben mit 1 ml Aceton (p.a.) versetzt und für 2 min bei max. Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wird durch einen Mikrofilter mit der Porengröße 0,2 µm filtriert. Das Filtrat kann mittels HPLC analysiert werden.

2. Proben aus *in vitro* Epoxidation

Die Epoxidationsreaktion wird in Aceton (p.a.) gestoppt. Damit die Proben mittels HPLC analysiert werden können, müssen sie zentrifugiert und filtriert (s.o.) werden.

HPLC- (High Pressure Liquid Chromatography) Analyse

Bei dem hier verwendeten Verfahren wurden die Pigmente über eine „reversed phase“-Säule (Gilmore & Yamamoto, 1991; Färber et al., 1997) getrennt. Die Elution erfolgte dabei mit abnehmender Polarität des Laufmittels, s. Elutionsprogramm.

Das computergesteuerte HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

Autoamplifier L-7200	Hitachi/Merck
Sample Cooler for L-7200	Peltier/Merck
Pumpe L-7100	Hitachi/Merck
UV/VIS-Detektor L7420	Hitachi/Merck
Interface D-7000	Hitachi/Merck
Lösungsmittelentgaser Gastorr 104	Schambeck
Trennmaterial	LiChrospher 100 RP-18 5 µm
Säule	LiChroCART 250-4 (Merck)
Vorsäule	LiChroCART 4-4 (Merck)

Elutionsprogramm	Zeit [min]
100 % A	0-9
linearer Gradient auf B	9-12.5
100 % B	12.5-18
Linearer Gradient auf A	18-19
100 % A	19-23
Flussrate	2 ml/min

Lösungsmittel A: Acetonitril: Methanol: Tris* (87:10:3)

Lösungsmittel B: Methanol: n-Hexan (4:1)

*Tris-Puffer: 0.1 M Tris /HCl pH 8.0 (filtriert, Filter 0.2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell)

Die aufgetrennten Pigmente werden bei einer Wellenlänge von 440 nm detektiert und anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert. Die relativen Pigmentkonzentrationen werden aus den ermittelten Peakflächen mit Hilfe der durch eine Eichung der HPLC erhaltenen Umrechnungsfaktoren berechnet.

Pigmente	Retentionszeiten* [min]	Umrechnungsfaktoren Fläche/pmol Pigment
Neoxanthin	3.2	3434
Violaxanthin	4.2	3832
Antheraxanthin	6.3	3045
Lutein	9.3	3167
Zeaxanthin	10.3	2764
Chlorophyll a	13.3	1227
Chlorophyll b	13.9	1389
β -Carotin	16.8	2852

*Bei den Retentionszeiten handelt es sich um Richtwerte, die bis zu einer Minute um den angegebenen Wert schwanken können.

2.4.8 Heterologe Proteinexpression in *Escherichia coli*

Zunächst wurden 50 ml LB-Medium (s. Material 2.1.3; für pQE30-Expression modifiziert durch Zusatz von 20 mM Sorbitol und 5 mM Betain) mit dem transformierten E.coli- Stamm BL21(DE3) gold (für pET21a) bzw. M15 [pRep4] (für pQE30) und über Nacht bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 400 ml LB-Medium (für pQE30 mit Sorbitol und Betain) mit 20ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die heterologe Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration: 0,2 mM) induziert. Die darauffolgende Inkubation betrug ca. 4 h bei 20°C auf dem Schüttler und anschließend erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 10000g. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Danach wurde das Zellpellet in jeweils 20 ml Lysepuffer und einem Protease-Inhibitor-Cocktail vorsichtig gelöst. Der Zellaufschluß erfolgte (auf Eis gekühlt) 3 x mit der French Press bei 1200 bar. Anschließend wurde das heterolog exprimierte Protein (hier: NpZE) anhand des Histidin (His)-Proteinanhangs mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

2.4.9 Isolierung von Gesamtprotein aus *Arabidopsis*

Für die Gesamtproteinisolierung wird zunächst ca. 100 mg Blattmaterial von *Arabidopsis* in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend werden die Blätter in einem Mörser pulverisiert und in ein Eppendorff-Gefäß überführt. Es werden 1 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6; 1 M Harnstoff; 1,6 % SDS) hinzupipettiert, die Probe gevortext und schließlich 20 min auf 60-80°C erhitzt. Danach wird die Probe bei max. Umdrehungszahl

zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorff-Gefäß überführt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

2.4.10 Isolierung von Membranprotein aus *Arabidopsis*

Es wird zunächst 1000 mg Blattmaterial von *Arabidopsis* (4-6 Wochen alt) in 10 ml Lysispuffer (10 mM Hepes/KOH pH 7,8; 10mM MgCl₂; 25 mM KCl) im Waring-Blender homogenisiert. Anschließend wird das Homogenisat über 2 Lagen Miracloth in einen GSA-Zentrifugenbecher filtriert und im GSA-Rotor bei 4°C kurz bis zum Erreichen von 6000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wird im Lysispuffer mit Protease-Inhibitoren aufgenommen und eine Chlorophyll-Bestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Solubilisierung mit 1 % Digitonin bei einer Chlorophyll-Konzentration von 1 mg/ml. Es folgt eine Inkubation von 30-40 min bei 4°C und danach eine 30minütige Zentrifugation bei 4°C und 15000 x g. Der Überstand wird in ein frisches Gefäß überführt und weiterverwertet. Dabei sollten für die weitere Proteinaufreinigung mittels eines Proteinanhangs alle nachfolgenden Puffer Protease-Inhibitoren, 0,1 % Digitonin und 0,5 % n-Dodecyl-β-D-Maltosid enthalten. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

2.4.11 Proteinbestimmung mit dem Standard Assay von BioRad

Die Proteinbestimmung nach Lowry (Biuret Reaktion), modifiziert durch BioRad, wurde mit Hilfe des „DC Protein Assays“ (BioRad Nr. 500-0116, München) durchgeführt. Es handelt sich um ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem Cu²⁺-Ionen mit Proteinen und der im Reaktionskit enthaltenen Folin-Ciocalteu-Reagenz in alkalischer Lösung einen Komplex bilden. Die Stärke der Blaufärbung dieses Komplexes ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Probe. Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Reagenz A (BioRad Nr. 500-0113): Folin-Reagenz

Reagenz B (BioRad Nr. 500-0114): Lösung zur Herabsetzung der Oberflächenspannung, die kurz vor dem Einsatz als „Working Reagenz A“ zu Reagenz A im Verhältnis 1:50 zugesetzt wurde.

Reagenz S (BioRad Nr. 500-0115): alkalische Kupfertatratlösung

Zuerst wurde eine BSA-Standardkurve anhand einer photometrischen Messung von BSA-Eichlösungen bekannter Konzentration erstellt. Folgende BSA-Konzentrationen wurden gemessen: 0.2; 0.5; 1; 1.5; 2.4 mg/ml Protein. Anschließend wurde die Absorption der *Arabidopsis* Proteinproben gemessen (jeweils Dreifachbestimmung). Für die photometrische Bestimmung wurden Einmalküvetten verwendet und die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm im Spektrofotometer (LKB Ultraspec Plus, Pharmacia) gemessen.

Folgendes Pipettierschema wurde angewandt:

	Referenz [µl]	Eichung [µl]	Probe [µl]
Probe	-	20	20
Proteinstandardverdünnung	-	20	-
ddH ₂ O	20	-	20
Extraktionsmedium	20	20	-
Working Reagenz A	100	100	100
Reagenz B	800	800	800

Die Proben wurden mittels eines Plastikspatels gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Danach konnten die Proben photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Vergleichswerte der Eichgerade nach folgender Formel bestimmt werden.

$$x \text{ mg/ml Protein (Probe)} = \frac{x \text{ mg/ml Protein (Eichreihe)} \times \text{Absorption A (Probe)}}{\text{Absorption A (Eichreihe)}}$$

Um den Einsatz definierter Proteinkonzentrationen für die SDS-Gelelektrophorese zu erleichtern, wurden die verschiedenen Proben mit Hilfe des Probenpuffers auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt.

2.4.12 Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Das Zell-Lysat nach Aufschluß der *E.coli*-Zellen wurde 30 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand in die equilibrierten Profinity IMAC Ni²⁺-charged-Säule (Biorad) pipettiert. Die Säulen wurden verschlossen und 45 min bei 4°C auf dem Schüttler im Kühlraum inkubiert, Danach wurde der Säulendurchfluß in drei 15 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurde 3 x mit 8ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄/NaOH pH 8; 300 mM NaCl und 10 mM Imidazol) gewaschen und der Durchfluß wurde wieder aufgefangen. Die Proteinelution erfolgte 5 x mit 1000 µl Elutionspuffer (50mM NaH₂PO₄/NaOH pH 8; 300mM NaCl und 250mM Imidazol).

2.4.13 HA (Hämagglutinin)-Affinitätschromatographie

Anti-HA Affinity Matrix (Roche) wird einige Male vorsichtig invertiert und in eine kleine Säule pipettiert. Das Volumen wird so angepasst, dass am Ende ca. 200 µl Säulenmatrix vorhanden sind. Nachdem der Säulenlagerungspuffer (20 mM Tris pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,09 % Natriumazid) abgetropft ist, werden sofort 10 Matrixvolumina (200 µl = 2 ml) Equilibrationspuffer (20 mM Tris pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EDTA) zugegeben. Nach der Equilibrierung wird die Säule mit Gesamtproteinextrakt beladen. Die Menge an

Gesamtprotein ist abhängig vom Expressionslevel des getaggtten Proteins und variiert zwischen 1-5 mg. Der Durchfluß wird in einem sauberen Eppendorfgesäß aufgefangen und bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgt das Waschen (20 mM Tris pH 7,5; 0,1 M NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,05 % Tween 20) der Säule mit 20 Matrixvolumina (4 x je 1 ml). Die Waschfraktionen werden jeweils in einem sauberen Eppendorfgesäß aufgefangen und auch bei 4°C gelagert. Danach wird das gebundene, getaggte Protein eluiert. Dazu wird 20 µl Elutionspuffer (1 mg/ml HA-Peptid in Equilibrationspuffer lösen und bei – 20°C lagern) auf die Säulenmatrix pipettiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Elutionsfraktion in einem sauberen Eppendorfgesäß aufgefangen. Die Elution sollte noch 2 x wiederholt werden und am Ende die OD₂₈₀ gemessen werden.

2.4.14 Solubilisierung von Proteinaggregaten (*Inclusion Bodies*)

Die Proteinaggregate wurden in 8 M Harnstoff (frisch angesetzt bzw. nur wenige Tage alt) und 8-10 mM DTT oder β-Mercaptoethanol durch etwa 10-15 min Inkubation bei 50°C oder bei 37°C auf dem Schüttler gelöst. Alternativ können zur Solubilisierung der Proteinaggregate 6 M GdnHCl oder 10 % SDS in Verbindung mit Reduktionsmitteln eingesetzt werden. GdnHCl-Proben werden ebenfalls schonend auf 50°C erhitzt, SDS-Proben werden zur Denaturierung 3 min im Wasserbad gekocht. Ungelöste Restbestandteile werden anschließend durch 3minütige Zentrifugation bei RT und 13000 rpm präzipitiert und aus der Lösung entfernt.

2.4.15 Protein-Rückfaltung mittels Verdünnungen

Für die Faltungsversuche mit Rückfaltungspuffern nach AthenaES™ (Refolding Kit: Applications Manual (v1.0)) wurde das solubilierte NpZE-Protein in einem Puffer verdünnt und inkubiert, der die Rückfaltung des Proteins begünstigen sollte. Um Aggregationen zu vermeiden, wurden in der Regel deutlich geringere Proteinkonzentrationen (50-100 µg/ml) verwendet als in der Affinitätschromatographie, wo intermolekulare Wechselwirkungen der Proteine durch die Bindung an die Säulenmatrix verhindert werden. Die Verdünnungsversuche wurden in Gesamtvolumina zwischen 100 µl und 1 ml in Eppendorfgesäß durchgeföhrt. Die Inkubationen erfolgten über einen Zeitraum zwischen 1 – 24 Std. bei RT oder 4°C.

2.4.16 Dialyse

Die hier durchgeföhrt Dialyse dient entweder der Proteinfaltung über einen langsamen Austausch des Denaturierungspuffers oder zur Entfernung von Substanzen aus dem Probenpuffer, die einen Aktivitätstest beeinflussen könnten.

Dialyse im Eppendorfgesäß

Größere Probenvolumina (200-500 µl) werden in Eppendorfgesäß (Sarstedt, Nürnberg) dialysiert. In den Poren des Dialyseschlauches (Visking Dialysis Tubing,

Medicell International Ltd., London, GB) sind aus dem Herstellungsprozess noch Metallrückstände enthalten, die durch Erhitzen entfernt werden müssen. Zu diesem Zweck wird der Schlauch in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 und 50 mM EDTA autoklaviert und anschließend in 70 % Ethanol bei 4°C gelagert. Zur Verwendung wird der Dialyseschlauch in ca. 3 cm lange Stücke geschnitten, für mehrere Stunden unter mehrfachem Wasserwechsel in ddH₂O equilibriert und mit Hilfe eines Gummirings faltenfrei über das Proben-Reaktionsgefäß gespannt. Die überstehenden Membranenden werden mit Parafilm umwickelt und die Reaktionsgefäße so in einem passenden Ständer fixiert. Ein 1 Liter Becherglas wird mit etwa 1 L Dialysepuffer befüllt und der Ständer (mit maximal 15 Proben à 500 µl, mehr als 100facher Pufferüberschuss) so auf das Glas aufgesetzt, dass die Membran auf der Flüssigkeitsoberfläche aufliegt bzw. minimal in den Puffer eintaucht. Die Dialyse erfolgt bei RT oder 4°C unter leichtem Rühren für mindestens 6 Std., meist jedoch über Nacht.

2.4.11 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der Proteine mit diskontinuierlichen Gelen nach Laemmli (1970). Es wurden 13,5%ige Trenn- und 5,6%ige Sammelgele (bezogen auf den Polyacrylamidgehalt) hergestellt. Das Sammelgel diente zur Fokussierung der Probe in einer scharfen Bande. Die eigentliche Auftrennung fand im Trenngel statt. Die Gele wurden in einer Gelgießkammer für 4 Minigele (Multiple Gel Caster, Hoefer Scientific Instruments, USA) gegossen. Die Gelgröße des Trenngels betrug 6 cm x 8 cm und die Geldicke 0,75 mm. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Mighty Small SE250 Elektrophoreseapparatur (Hoefer, USA). Die SDS-Polyacrylamidgele hatten folgende Zusammensetzung (für 4 Gele) :

Trenngel	Volumen [ml]	Sammelgel	Volumen [ml]
Polyacrylamid(30%) [□]	13,5	Polyacrylamid(30%) [□]	1,7
3M Tris/HCl pH8,8	7,5	0,5M Tris/HCl pH6,8	2,5
ddH ₂ O	12,1	ddH ₂ O	5,6
SDS (10%)	0,3	SDS (10%)	0,1
APS	0,2	APS	0,2
TEMED ^{□ □}	0,01	TEMED ^{□ □}	0,008
		2,5% Bromphenolblau	0,01

- Rotiphorese Gel(Roth) Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8
 □ □Gebrauchsfertige Lösung (Merck)

Zuerst wurden die 4 Trenngele gegossen und mit je 500 µl 2-Butanol überschichtet um eine gerade Lauffront zu erhalten und mögliche Luftblasen zu entfernen. Nach dem

Polymerisieren (ca. 2 h 30) wurde das 2-Butanol entfernt. Danach wurden die Sammelgel in die Kammern pipettiert und Käbme für die Probetaschen (slots) hineingesteckt. Nach 30min Inkubation konnten die Gele für die Elektrophorese in die entsprechenden Apparaturen (Mighty Small SE250, Hoefer, USA) gespannt werden und diese mit 1 x Laemmli-Laufpuffer (15 g/l Tris, 72 g/l Glycin, 50 ml/l 10 % SDS) befüllt werden. In die Probetaschen der Gele wurden je 10 µl Probe pipettiert und die Proteinkonzentration betrug vorwiegend 1 µg/µl. Als Proteinstandardmarker wurde der PageRuler[®] (Prestained Protein Ladder, Fermentas) verwendet. Um einen auftretenden smiling-Effekt während der Laufphase durch leere und gefüllte Spuren zu verhindern, wurden alle Taschen mit Proben oder Probenpuffer gefüllt. Die Elektrophorese wurde zunächst für 30 min bei einer Spannung von 50 V gestartet, um die Proteine ins Sammelgel einlaufen zu lassen. Anschließend wurde die Spannung auf 100 V erhöht und die Elektrophorese unmittelbar vor Erreichen des Trenngelrandes gestoppt.

2.4.12 Western-Blot-Analyse

Für den Transfer der Proteine wurde überwiegend das Semi-Dry-Blot Verfahren verwendet. Bei dieser Methode wurden das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran mit Transferpuffer angefeuchtet und der Blotstapel folgendermaßen luftblasenfrei aufgebaut: Anode, 3 x Filterpapier, 1 x Nitrocellulosemembran-Gel, 3 x Filterpapier-Kathode. Der Transfer auf die Membran dauert bei einer Stromstärke von 0.8 mA / cm² Gel ungefähr 1 h. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran (Schleicher&Schuell) erfolgte mit dem „Owl Bandit™ VEP-3 tank style electroblotting system“ (Owl Separation Systems). Die Membran wird vor dem Transfer vorbehandelt werden. Dafür wird sie zunächst für 2-3 s in Methanol (p.a.) geschwenkt und anschließend mit den anderen Blotkomponenten in Transferpuffer eingeweicht. Der Blotaufbau erfolgt auch hier luftblasenfrei und nach dem Protokoll des „Owl Separation Systems“.

Die Blot-Kammer wird mit 3 L 1 x Transferpuffer gefüllt und die Blot-Kassette vorsichtig in die Kammer eingesetzt. Durch mehrmaliges Eintauchen der Kassette können entstandene Luftblasen entfernt werden. Der Transfer auf die Membran dauert bei einer Stromstärke von 400 mA ungefähr 1 h. Aufgrund der Verwendung eines vorgefärbten Proteinmarkers (PageRuler[®] Prestained Protein Ladder, Fermentas) musste die Nitrocellulosemembran im Anschluss an den Western-Blot nicht in Ponceaulösung gefärbt werden.

Immunologischer Nachweis:

Die freien Bindestellen der Nitrocellulosemembran wurden mit 5% Milchpulver -TBS-Lösung abgesättigt. Die Inkubation betrug 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-Tween/Triton-Lösung gewaschen. Die nachfolgende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem

Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran wieder dreimal für 10 min mit TBS-Tween/Triton-Lösung gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Zum Abschluss wurde die Membran viermal mit TBS-Tween/Triton-Lösung gewaschen. Die Detektion der Immunopräzipitation erfolgte mit Hilfe des Western Lightning⁺ Plus-ECL-Kit (Perkin Elmer, Boston, USA) nach Herstellerangaben.

Verwendete Primärantikörper:

Antigen	Antikörper-Bezeichnung	gewonnen aus	Verdünnung	Referenz
ZE1-Isoform	Anti-ZE1	Kaninchen	1:1000	Dr. J. Pineda, Ak- Service
ZE1-und ZE2-Isoform	Anti-ZE2	Kaninchen	1:1000	Dr. J. Pineda, Ak- Service
HA-Proteinanhang	Anti-HA-Peroxidase	Ratte	50 mU	Roche
His-Proteinanhang	Anti-Tetra-His	Maus	1:2000	Qiagen

Als Sekundärantikörper wurde anti-Kaninchen-IgG- bzw. anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugate (Promega, Madison) in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Für die Anti-HA-Peroxidase wurde kein Sekundärantikörper benötigt.

2.5 Pflanzenphysiologische Methoden

2.5.1 Bestimmung der Fluoreszenzlöschungskoeffizienten

Die Messung der Chlorophyll (Chl) a-Fluoreszenz bei Raumtemperatur (RT) beruht im wesentlichen auf der Fluoreszenzemission des Photosystem II (PS II). Die drei gemessenen Größen, welche Rückschlüsse auf den Zustand des PS II, des Elektronen- und Protonentransport erlauben, sind die Grundfluoreszenz F_0 , die maximale Fluoreszenz F_M und die variable Fluoreszenz F_V . Bei sehr schwachen Lichtbedingungen (Photonen Fluss Dichte $PFD < 1 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wird F_0 messbar.

Alle Reaktionszentren (RZ) des PS II liegen hierbei im offenen Zustand vor, d.h. der erste Elektronenakzeptor der Elektronentransportkette (ETK) Q_A ist vollständig oxidiert. Durch einen sättigenden Lichtpuls ($PFD > 4000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) lässt sich Q_A reduzieren und die maximale Fluoreszenz F_M messen. F_V ist die Differenz von F_M und F_0 (Krause und Jahns, 2003). Die Fluoreszenzlöschungskoeffizienten wurden mit dem PAM-Fluorimeter bestimmt, welches nach dem Prinzip der Puls-Amplituden-Modulation arbeitet (Schreiber, 1986). Das Messlicht wird dabei von einer Diode sehr schwach und gepulst auf die Probe gegeben. Hierbei beträgt die Wellenlänge $\lambda < 680\text{nm}$, die Pulszeit $1 \mu\text{s}$, die Frequenz $1,6 \text{ kHz}$

und die PFD $0,1 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Das Messlicht induziert nur die Chl-Fluoreszenz, welche bei einer Wellenlänge von $\lambda > 710 \text{ nm}$ detektiert wird. Die Amplitude und die Frequenz des Messlichts sind schwach genug, um das PS II im dunkeladaptierten Zustand zu halten. Von der Photodiode der Detektoreinheit wird nur die modulierte Fluoreszenz der Probe aufgenommen, weil spezielle Filter störende Lichtwellenlängen $\lambda < 700 \text{ nm}$, z.B. vom aktinischen Licht und den sättigenden Lichtblitzen, vorher herausfiltern (Krause und Jahns, 2003). Die Fluoreszenzkurve wurde während der Messung mit einem Schreiber aufgenommen.

Die Geräteeinheiten des PAM-Messsystems sind im folgenden aufgeführt:

Kontrolleinheit	PAM 101 (Walz)
Blitzlichttriggereinheit	PAM 103 (Walz)
Emitter/Detektor	ED 800 T (Walz)
Sättigungspulslichtlampe	FL 103 (Walz)
Kaltlichtquelle für aktinisches L.	FL 101 (Walz)
Fiberoptik	101 F/S (Walz)
Blattscheibenküvette	LSC-2 ADC Ltd.
Umwälz-Thermostat	mgw Lauda R6 (Lauda)
Schreiber	SE 120 BBC Metrawatt (Goerz)

Grundeinstellungen des PAM 101:

Lichtintensität 5; Gain: 6; Damping: 8 ;
Schreiber: 5 mm/min; 500 mV

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit intaktem Blattmaterial des WT und der Mutanten *t1p40*, *npq1*, Linie 48, Linie 16/3 und Linie 19/9 durchgeführt. Zuvor wurden die Blätter dunkel adaptiert (> 4h) und während der Messung bei konstanten 20°C mit einem schwachen Luftstrom begast. Die Grundlinie wurde mit dem Schreiber aufgenommen und durch Einschalten des Messlichtes ($1,6\text{kHz}$, PFD $0,1\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wurde anschließend F_0 registriert. Durch einen sättigenden Lichtpuls (Dauer: 1 ms, PFD > $4000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) wurde F_M bestimmt. Unmittelbar nach dem Sättigungspuls wurde das aktinische Licht mit einer bestimmten Lichtintensität zugeschaltet und die Fluoreszenzkurve für 15 min im Licht aufgezeichnet. Danach wurde das aktinische Licht ausgeschaltet und die Erholungsphase für weitere 10 min im Dunkeln mit dem Schreiber registriert.

Es erfolgten während der gesamten Messung in Zeitabständen von 100 sec. Sättigungspulse. Dabei wurden PFD von 30, 100, 300, 600, 900 und $1200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ für das aktinische Licht verwendet. Aus den aufgezeichneten Fluoreszenzkurven konnten die Parameter qP , qE , qI und NPQ nach Stern-Volmer (SV) (Thiele et al., 1997; Krause und Jahns, 2003) berechnet werden.

$$\begin{aligned}
 qP \quad (\text{photochemisches Quenching}) &= F_{ST}/F_{VS} \\
 qE_{SV} \quad (\Delta\text{pH-abh\u00e4ngiges Quenching}) &= (F_M/F_{MS}) - (F_M/F_M') \\
 qI_{SV} \quad (\text{photoinhibitorisches Quenching}) &= (F_M/F_M') - 1 \\
 \text{NPQ} \quad (\text{nicht photochemisches Quenching}) &= (F_M/F_{MS}) - 1 \\
 \text{und es gilt: } \text{NPQ} &= qE_{SV} + qI_{SV}
 \end{aligned}$$

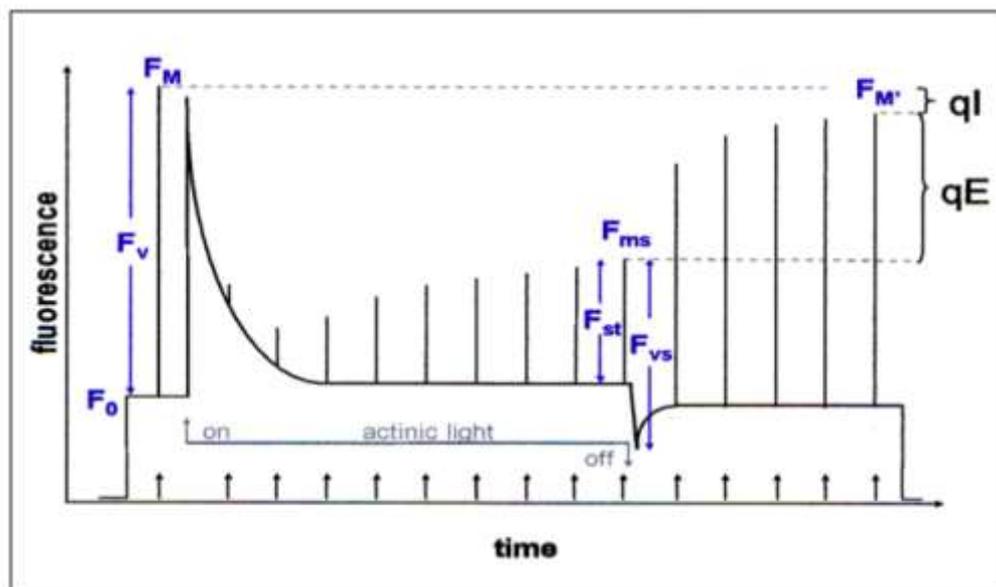


Abbildung 2.1: Graphische Bestimmung der Löschkoeffizienten aus einer Fluoreszenzkurve (idealisiert). F_{VS} = variable Fluoreszenz, F_{MS} = maximale Fluoreszenz im station\u00e4ren Zustand. F_{ST} berechnet sich aus der Differenz von F_{MS} und der Grundfluoreszenz im aktinischen Licht. Nach Quick & Stitt (1989) ver\u00e4ndert von T. Gra\u00dfes (2005)

2.5.2 Messung der Photoinhibition anhand des F_v/F_M -Verh\u00e4ltnisses

Mit dem PAM-2000 System l\u00e4sst sich die Photoinhibition auf vereinfachte Weise bestimmen. Prinzipiell wird dabei die qI -Komponente des nicht photochemischen Quenchings (NPQ) \u00fcber das F_v/F_M -Verh\u00e4ltnis bestimmt und damit die Sch\u00e4digung des PS II, genauer gesagt des D1-Proteins im PS II. Dem Starklicht ausgesetzte Pflanzen zeigen im Starklicht zeigen ein kleineres F_v/F_M -Verh\u00e4ltnis als Pflanzen, die keinem Starklicht ausgesetzt waren (Krause und Weis, 1991). Das Blattmaterial des WT und der Mutanten *t1p40*, *npq1*, Linie 48, Linie 16/3 und Linie 19/9 wurde \u00fcber 4 h bei einer konstanten Temperatur von 20\u00b0C einer Lichtintensit\u00e4t von 2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt. Dabei wurde die Photoinhibition des PS II zu bestimmten Zeitpunkten gemessen.

Die Komponenten der Messanordnung bestanden aus der Belichtungsapparatur (Eigenbau, Mechanikerwerkstatt Heinrich-Heine-Universit\u00e4t D\u00fcsseldorf), einer temperierbaren Schale mit angeschlossenen Kryostaten (Colora/Lorch), einem handels\u00fcbliehen Ventilator und dem PAM-2000 Fluorimeter (Walz).

Komponenten der Messapparatur

Halogenlampe	HS 200 Deep 600 Watt (Bahrs Technik, Brüggen-Bracht)
Kryostat	(Colora Lorch)
Ventilator	Typ PT 200-TK (Helios)
Fluorimeter	PAM 2000 (portable), (Walz)
Trafo	2020 L (Walz)
Lichtleiter	Model 2010-F (Walz)
Palmtop	200LX (Hewlett Packard)
Küvetten	DCL-8 leafclips (Walz)

Grundeinstellungen des PAM-2000

Light Meas	Far Red	Sat. Pulse
1 Int 3 bis 5	3 Int 8	4 Int 3
5 600 Hz/20kHz	7 0,1s 8	8 s 3/30
Gain 3	CK m 2	Run 1
Damping 5	Pulse seq	Kinetic Screen

Das F_V/F_M -Verhältnis wurde an intakte Blätter zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min bestimmt. Dafür wurden Proben entnommen und in den Leafclip-Küvetten 7 min dunkeladaptiert. Dies diente zur Relaxierung der qE Komponente im Blattmaterial. Nach der Dunkeladaptation wurden die F_V/F_M -Verhältnisse mit dem PAM-2000 Fluorimeter bestimmt.

3 Ergebnisse

Das im Xanthophyll-Zyklus gebildete Carotinoid Zx spielt eine zentrale Rolle für die Photoprotektion im Chloroplasten.

Die Epoxidation ist die zweite Teilreaktion des Xanthophyllzyklus und wird durch die im Stroma lokalisierte Zeaxanthin-Epoxidase (ZE) katalysiert. Dabei erfolgt die Rückumwandlung des Zx über Ax zu Vx. Beide Enzyme (VDE und ZE) des Xanthophyllzyklus unterliegen einer strengen Kontrolle, um einerseits eine unerwünschte Energieauslöschung unter nicht sättigenden Lichtbedingungen durch das Zx zu verhindern und andererseits eine schnelle Bildung des Zx unter sättigenden Lichtbedingungen zu gewährleisten. Zur genaueren *in vitro* und *in vivo* Untersuchung der ZE-Regulation und ihrer biochemischen Eigenschaften wurde eine rekombinante ZE sowohl in *E. coli*-Zellen heterolog als auch in *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia-0) und *npq2*-mutanten Pflanzen homolog überexprimiert.

3.1 Heterologe Überexpression der ZE in *Escherichia coli*

Zunächst sollte die cDNA des *ABA-deficient2*-Gens (*ABA2*), das die ZE aus *Nicotiana plumbaginifolia* (*NpZEP*) kodiert, mit einem Histidin-Anhang in einem heterologen System überexprimiert werden. Die Verwendung dieser *NpZEP*-cDNA erschien für die bakterielle Überexpression vorteilhaft, weil nur eine *NpZE*-Spleißvariante in *Nicotiana plumbaginifolia* vorhergesagt wurde und die cDNA für homologe Expressionsstudien schon erfolgreich verwendet worden war (Audran *et al.*, 1998).

Das Histidin-Fusionsprotein sollte mittels Affinitätschromatographie aus *E. coli*-Zellen aufgereinigt werden und eine Untersuchung der *NpZE*-Regulation unter *in vitro*-Bedingungen ermöglichen. Dafür wurde die *NpZEP*-cDNA jeweils mit und ohne Signalpeptidsequenz in zwei verschiedene bakterielle Überexpressionsvektoren ligiert. Zunächst erfolgte die Ligation in den pET21a-Vektor (Novagen) mit einem starken bakteriellen Überexpressionspromotor (T7) und einer 6x C-terminalen Histidinsequenz. Die *NpZEP*-Überexpression in *E. coli* wurde über das *lac*-Operon des Vektors reguliert und konnte über Isopropyl- β -thiogalactosid (IPTG) induziert werden.

Zwar konnte in diesem Überexpressionssystem das *NpZE*-Protein mittels Immunoblotanalysen (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden, aber das Protein aggregierte in Form von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*). Dadurch konnte die Aufreinigung nur unter stark denaturierenden Bedingungen erfolgen. Nach der Renaturierung der rekombinanten *NpZE* konnte jedoch keine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

Aufgrund dessen wurden beide *NpZEP*-cDNA-Varianten in den pQE30-Vektor (Qiagen) ligiert. Dieser enthält einen schwächeren bakteriellen Überexpressionspromotor (T5) und eine 6x N-terminale Histidinsequenz. Um eine IPTG-induzierbare *NpZEP*-Überexpression zu erhalten, wurde der *E. coli*-Stamm M15 [pREP4] mit dem Plasmid transformiert, welcher das *lac*-Repressorgen auf dem pREP4-Vektor beinhaltet. Die Proteinaufreinigung konnte hier unter nativen Bedingungen erfolgen.

Aufgrund von Hinweisen auf mehrere potentielle PEST-Regionen (Bouvier *et al.*, 1996) innerhalb der *NpZE*-Sequenz und somit auf einen schnellen *NpZE*-Abbau, wurde während der Aufreinigung ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Promega) verwendet. Trotzdem unterlag die *NpZE* vermutlich einer starken Degradation aufgrund bakterieller Proteasen (s. Abb. 3.1). Der Protease-Inhibitor-Cocktail enthielt wegen des Histidin-Anhangs der überexprimierten *NpZE* keine Metalloprotease-Hemmer (z.B. EDTA). Es handelt sich bei diesen inhibitorischen Substanzen um Chelatoren divalenter Kationen, welche während der Proteinaufreinigung die Bindung des His-Fusionsproteins an die Ni^{2+} -NTA-Säule verhindern würden. Dadurch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise Metalloproteasen für den Abbau der *NpZE* verantwortlich waren.

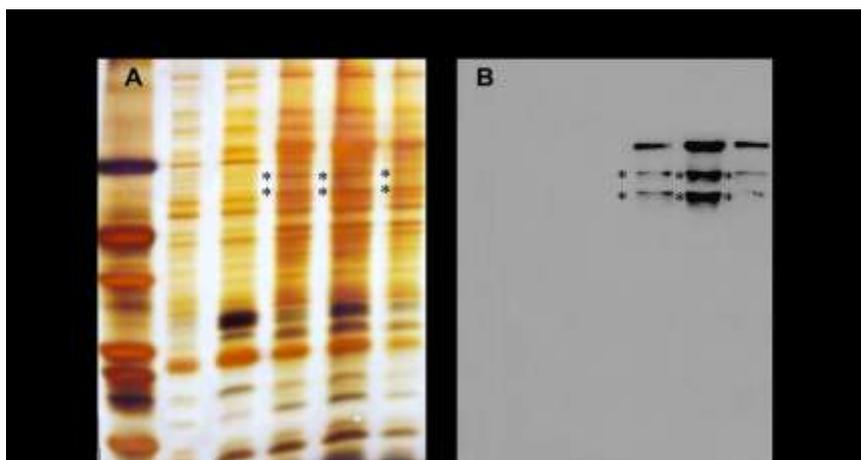


Abb. 3.1: Überprüfung der *NpZE*-Proteinaufreinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie anhand des Histidin-Anhangs.

A: Denaturierende SDS-PAGE nach Silberfärbung. Überprüfung der *NpZE*-Abbauprodukte und des Reinheitsgrads der Elutionsfraktionen. **B: Western Blot-Analyse der Elutionsfraktionen.** Der Nachweis der rekombinanten ABA2 erfolgte mit dem Erstantikörper **Anti-Tetra-His** (1:2000; Qiagen) gegen den Histidin-Anhang. **M:** Proteinmarker VII (Sigma); **1-2 u. 6-7:** negative Kontrolle; Elutions-fraktionen mit leerem pQE30-Vektor transformierter M15 [pREP4] *E. coli*-Zellen; **3-5 u. 8-10:** Elutionsfraktionen mit pQE30/*NpZEP* transformierter *E. coli*-Zellen. Auf das PAA-Gel wurden die je 8 μl Elutionsfraktionen der *NpZE*-Aufreinigung aufgetragen.

Nach Optimierung der Überexpression durch Variation der Wachstumsbedingungen von *E. coli*, konnte die *NpZE* nativ aufgereinigt werden, obgleich die Proteindegradation nicht vollständig unterdrückt werden konnte.

Die Enzymaktivität mittels eines *in vitro*-Epoxidationsprotokolls nach Bouvier *et al.* (1996) konnte anhand von HPLC-Analysen für keine aufgereinigte *NpZE* nachgewiesen werden.

Deshalb wurde die Epoxidation mit der aufgereinigten NpZE zusätzlich an *npq2*-Thylakoiden, in denen Zx konstitutiv akkumuliert, durchgeführt. Allerdings konnte auch hier keine Zx-Konversion zu Ax und Vx mittels HPLC detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies führte zu der Vermutung, dass im prokaryotischen System Faktoren fehlen, welche für die NpZE-Aktivität essentiell sind.

Aus diesem Grund wurde die heterologe Expression nicht weiter verfolgt, sondern stattdessen *AtZEP* aus *Arabidopsis thaliana* (Col-0) homolog als Fusionsprotein in *Arabidopsis*-Pflanzen unter der Kontrolle eines zweifachen 35S-Promotors überexprimiert.

3.2 Herstellung von *AtZEP*-Überexpressionskonstrukten für *Arabidopsis*

Das Gen der *AtZEP* in *Arabidopsis thaliana* ist auf Chromosom 5 (AT5G67030) lokalisiert. In der TAIR-Datenbank („The *Arabidopsis* Information Resource“) sind zwei unterschiedliche Spleißvarianten annotiert. Die erste Spleißvariante (AT5G67030.1: Niyogi *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2002; Leon *et al.*, 2003; Froehlich *et al.*, 2003; Jakab *et al.*, 2005; Larkindale *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2007; Zybailov *et al.*, 2008) bzw. das resultierende Protein (AtZE1) mit Transitpeptid (Präprotein) umfasst 667 Aminosäuren. Es hat ein Molekulargewicht von 73 kDa. Die zweite Spleißvariante (AT5G67030.2: Froehlich *et al.*, 2003; Zybailov *et al.*, 2008) bzw. deren Präprotein (AtZE2) beinhaltet 610 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa.

Das putative Transitpeptid für den Chloroplasten-Import wurde anhand des ChloroP 1.1 Servers (Technische Universität Dänemark: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) ermittelt und umfasst 59 Aminosäuren. Demnach ergab sich für das reife ZE1-Protein ein Molekulargewicht von 67 kDa und für das reife AtZE2-Protein ein Molekulargewicht von 61 kDa.



Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung der Exonsequenzen des OLR (Offenes Leseraster) beider Spleißvarianten der *ZEAXANTHIN EPOXIDASE* in *Arabidopsis thaliana*. Die sich unterscheidenden C-terminalen Exonsequenzen wurden orange gekennzeichnet. Durch das alternative Spleißen in AT5G67030.2 (*AtZEP2*) kamen 13 Nukleotide am 3'-Ende des Exon 13 dazu und 9 Nukleotide wurden 5' am Exon 14 deletiert. Desweiteren besitzt AT5G67030.2 anstelle von Exon 15 und 16 von AT5G67030.1 (*AtZEP1*), ein kleines 15. Exon. Dabei handelt es sich nur um die drei Nukleotide TAA, die aufgrund der Leserasterverschiebung das frühzeitige Stopcodon in AT5G67030.2 bilden.

Beide Spleißvarianten unterscheiden sich C-terminal aufgrund alternativen Spleißens des Introns 13 in AT5G67030.2 (s. Abb. 3.2.1). Dadurch kommt es in AT5G67030.2 im Vergleich zu AT5G67030.1 zu einer Leserasterverschiebung, so dass beide Proteine nur in den ersten 580 Aminosäuren übereinstimmen. Außerdem entsteht durch die Leserasterverschiebung in der zweiten Spleißvariante ein frühzeitiges Stopcodon (TAA). Aufgrund dessen umfasst die daraus resultierende zweite Isoform der AtZE (AtZE2) nur 610 Aminosäuren.

Damit beide Spleißvarianten in *Arabidopsis* überexprimiert werden konnten, wurde für die Erzeugung der Überexpressionsplasmide zunächst genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* (Col-0) isoliert. Anschließend wurde der genomische Abschnitt zwischen ATG und Stopcodon des *AtZEP*-Gens mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde das unter Kapitel 2.1.6 (ZAtF und ZAtR) aufgeführte Primer-Paar verwendet. Die Größe der amplifizierten *AtZEP*-Sequenz betrug 3,346 Kb.

Nach erfolgter Klonierung der *AtZEP* in den pENTR™/D-Topo®-Vektor (Entry-Vektor, Invitrogen) wurden *E.coli*-Zellen (Stamm DH10B) mit dem Plasmid transformiert und positive Kolonien auf kanamycinhaltigem Medium selektiert. Anschließend wurde die Orientierung des PCR-Produktes in mehreren Klonen mittels Enzymrestriktion mit *XhoI* und *NotI* verifiziert.

Danach erfolgte die Sequenzierung der *AtZEP* im Entry-Klon durch die Firma Genterprise. Die nachfolgende Analyse auf Sequenzfehler wurde mit den Programmen Chromas 3.1 und nBLAST (NCBI) durchgeführt. Es wurden keine Fehler in der *AtZEP* Gen-Sequenz gefunden.

Mittels einer LR-Rekombinationsreaktion wurde die *AtZEP*-Sequenz vom Entry-Klon in drei geeignete Donorvektoren transferiert. Bei den Donor- bzw. Zielvektoren handelte es sich um pAUL1, pAUL2 und pAUL3 (Dagmar Lyska, AG Prof. Westhoff, H.-H.-Universität Düsseldorf), die in Abb. 3.2.2 dargestellt sind.

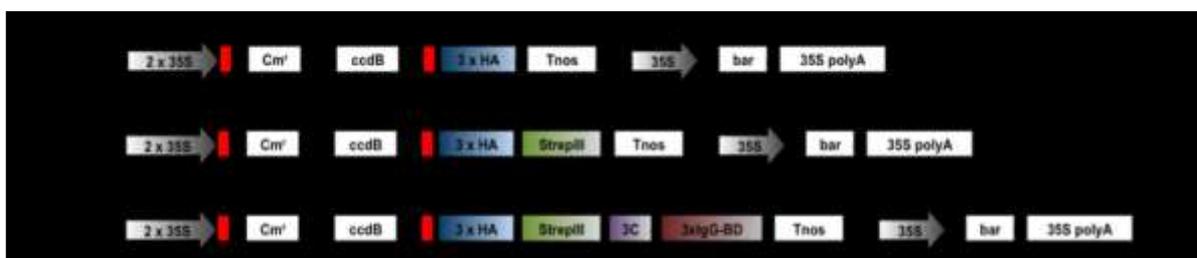


Abb 3.2.2: Schematische Darstellung der drei verwendeten Zielvektoren.

A. pAUL1-Vektor, **B.** pAUL2-Vektor, **C.** pAUL3-Vektor

RB: right border, 35S: 35S Cauliflower mosaic virus-Promotor, attR1 und attR2: Rekombinationsstellen für die LR-Reaktion, Cm^r: Chloramphenicol-Resistenzgen, ccdB-Gen (Helikase), 3 x HA: 3x Hämagglutinin-tag (blau), StrepIII: StreptavidinIII-tag (grün), 3 C: Protease C-Schnittstelle (lila), 3x IgG-BD: Immunglobulin-Bindedomänen-tag (braun), Tnos : Terminationssequenz, bar: BASTA-Resistenzgen, 35S polyA: 35S Cauliflower mosaic virus poly-Adenin-Anhang, LB: left border.

Aus der Abbildung geht hervor, dass sich die drei Zielvektoren in Bezug auf die Proteinüberexpression in Pflanzen in der Menge und der Art C-terminal eingefügter Anhänge

unterscheiden. Die Vielfalt der „tags“ sollte mehrere Formen der Proteinaufreinigung aus *Arabidopsis* ermöglichen, sowie den *in vivo*-Nachweis mittels Western Blot-Analyse. Um die AtZE mit den Anhängen in Pflanzen exprimieren zu können, wurde die *AtZEP*-Sequenz vor der Klonierung in den pENTR™/D-Topo®-Vektor ohne Stopcodon mittels PCR amplifiziert. Aufgrund der Verwendung des genomischen OLR für die homologe Überexpression konnte nur die Spleißvariante 1 (*AtZEP1*) mit C-terminalen Anhängen in Pflanzen exprimiert werden, während durch das alternative Spleißen in der zweiten Spleißvariante (*AtZEP2*) ein frühzeitiges Stopcodon entsteht (s. Abb. 3.2.1), so dass die Translation vor den „tags“ abgebrochen wird.

Durch die LR-Reaktion wurde das Chloramphenicol-Resistenzgen aus den Zielvektoren entfernt und sie enthielten für die Selektion, wie auch der pENTR™/D-Topo®-Vektor, nur noch das Kanamycin-Resistenzgen (s. Abb. 3.3 A). Um eine Selektion der pAUL-Vektoren mit *AtZEP*-Sequenz auf kanamycinhaltigem Medium zu ermöglichen wurde das Gemisch aus Entry- und Zielklon nach der LR-Reaktion mit dem Enzym *NruI* versetzt, welches nur im pENTR™/D-Topo®-Vektor schneidet.

Schließlich folgte auf den *NruI*-Verdau die Transformation der *E.coli*-Zellen (Stamm: DH5 α) und die Selektion positiver Klone auf kanamycinhaltigen LB-Platten. Der gelungene Einbau der *AtZEP*-Sequenzen in die pAUL-Vektoren wurde anhand einer Enzymrestriktion mit *AscI* überprüft (s. Abb. 3.3 A+B).

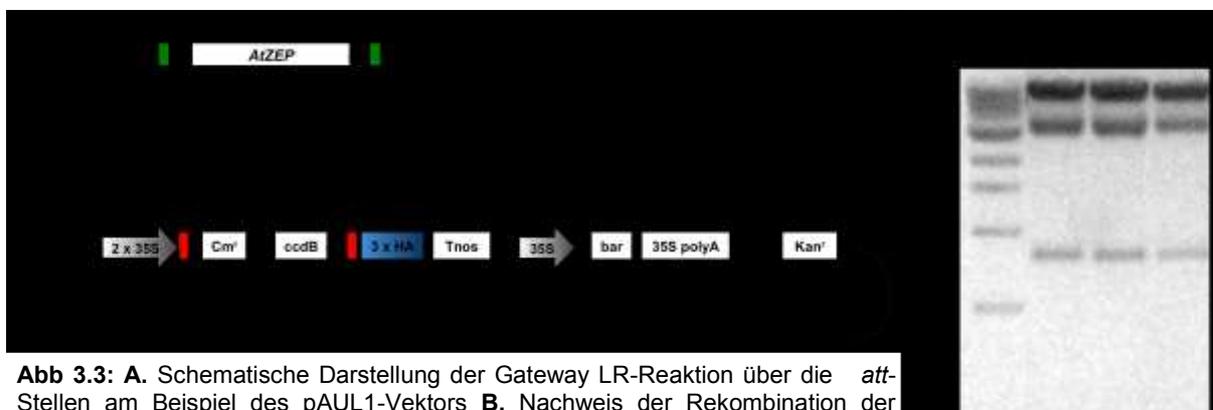


Abb 3.3: A. Schematische Darstellung der Gateway LR-Reaktion über die *att*-Stellen am Beispiel des pAUL1-Vektors B. Nachweis der Rekombination der *AtZEP*-Sequenz in die pAUL-Vektoren mittels *AscI*-Restriktion

Anhand von Abb. 3.3 A wird verdeutlicht, dass mit der *AtZEP*-Sequenz auch eine weitere *AscI*-Schnittstelle den pAUL-Vektoren hinzugefügt wurde. Dadurch entstanden nach Restriktion mit *AscI* drei DNA-Fragmente. Die jeweiligen Größen betragen für pAUL1/ *AtZEP*: 800 Bp, 3400 Bp und 9600 Bp, für pAUL2/ *AtZEP*: 800 Bp, 3400 Bp und 9690 Bp und für pAUL3/ *AtZEP* 800 Bp, 3400 Bp und 10040 Bp.

3.3 *In planta* Transformation und Selektion transgener 35S::AtZE-Pflanzen

Es wurden *A. tumefaciens*-Zellen (Stamm: GV3101) mit den entsprechenden Konstrukten transformiert. Die Transformation wurde mittels PCR überprüft und die genetisch veränderten Bakterien wurden anhand der „floral dip“-Methode in blühende *Arabidopsis thaliana* Col-0 und *npq2*-Pflanzen (Niyogi *et al.*, 1998) eingeschleust.

Die *npq2*-Mutante akkumuliert Zx konstitutiv und enthält keine detektierbaren Mengen an Nx, Vx und Ax. Dieser Phänotyp zeigt, dass eine Blockierung in der Epoxidationsreaktion vorliegt (Niyogi *et al.*, 1998). Dadurch kann bei erfolgreicher Überexpression der *AtZEP* in *npq2* die Funktionalität des Proteins leicht durch eine Pigmentanalyse mittels HPLC verifiziert werden.

Die transformierten T₀-Pflanzen reiften im Gewächshaus zunächst ab und anschließend wurden die T₁-Samen abgesammelt und ausgesät. Die Selektion erfolgreich transformierter T₁-Pflanzen erfolgte bei Keimlingen mit vollständig entwickelten Kotyledonen durch Besprühen mit BASTA®. Die überlebenden Pflanzen reiften ab und die T₂-Samen wurden abgesammelt und ausgesät. Es folgte eine Segregationsanalyse mittels BASTA® und nur solche Pflanzen, die sich annähernd 1:3 aufspalteten, wurden für die weiteren Analysen ausgewählt (s. Tabelle 1: Linie 16, 19 und 48). Gemäß der Mendelschen Regel für einen dominant- rezessiven Erbgang, in dem sich Organismen in nur einem Merkmal (BASTA-Sensitivität/-Resistenz) unterscheiden, würde dieses Spaltungsverhältnis (1:3) in der F₂-Generation bei einfacher T-DNA-Insertion auftreten. Allerdings kann es bei der T-DNA-Integration auch zu Doppel- oder Mehrfachinsertionen kommen. Beispielsweise spricht ein Verhältnis von 1:15 (BASTA^{sensitiv}: BASTA^{resistent}) für eine Doppelinsertion ohne Kopplung. Dieses Verhältnis kann sich aufgrund genetischer Kopplung in Richtung 1:3 verschieben. Kompliziertere Verhältnisse ergeben sich bei vielfachen T-DNA-Insertionen.

Die Hypothese der Einzelinsertion wurde mittels Chi²-Test auf signifikante Abweichungen überprüft (s. Tab. 1: χ^2). Der Chi²-Test vergleicht beobachtete mit theoretisch erwarteten Werten und ist somit ein Maß für die Abweichung zwischen Beobachtung und Hypothese. Aus dem Chi²-Wert kann die Irrtumswahrscheinlichkeit (s. Tab.1: p-Wert) berechnet werden und damit die Wahrscheinlichkeit der irrtümlichen Annahme einer Signifikanz (Fehler erster Art). Der Begriff Signifikanz wird definiert als Vereinbarung über die Grenzwahrscheinlichkeit. Dabei wurde für diesen Fall die Grenzwahrscheinlichkeit auf 5 % festgelegt.

Einige der mittels Segregationsanalyse getesteten transgenen Linien sind repräsentativ für alle insgesamt 48 überprüften Linien in Tabelle 1 aufgeführt. Dabei konnte in den meisten Fällen keine signifikante Abweichung gefunden werden (s. Tab. 1). In drei transgenen Pflanzenlinien wurde wie in Linie 15 (s. Tab. 1) eine signifikante Abweichung nach oben nachgewiesen. Das spricht möglicherweise für eine ungekoppelte Doppelinsertion. Allerdings

wurde diese Vermutung nicht weiter überprüft, weil diese Pflanzenlinien nicht für die weiteren Analysen verwendet wurden.

Tabelle 1: Segregationsanalyse in der T₂-Generation mittels BASTA®. **Transgene Linie:** getestete Pflanzenlinie; **Überexpressionsmutante:** pflanzlicher Hintergrund/Transgen; **BASTA^S:** BASTA-sensitive Pflanzen; **BASTA^R:** BASTA-resistente Pflanzen; **n:** Gesamtanzahl getesteter Pflanzen; **SR:** Segregationsrate; χ^2 : Chi-Wert; **p:** p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit). Grau markierte Pflanzenlinien wurden für die weiteren Analysen verwendet.

48	<i>npq2l</i> pAUL1 ZEP	18	84	102	1:4,7	0,91	0,23
16	<i>npq2l</i> pAUL2 ZEP	31	92	123	1:3	0,04	0,67
19	WT Col-0/ pAUL2 ZEP	29	99	128	1:3,4	0,46	0,54

Nach der Segregationsanalyse reiften die T₂-Pflanzen ab und alle nachfolgenden transgenen Pflanzengenerationen (T₃- und T₄-Pflanzen) wurden für den experimentellen Teil unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 8/16 h angezogen, wobei die Tagestemperatur 24 °C und die Nachttemperatur 20 °C betrug. Auf Höhe der Blattrosetten betrug die normale durchschnittliche Belichtungsstärke 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.4 Pigmentanalyse der transformierten *npq2*- und WT Col-0-Pflanzen in der T₂-Generation

Vier Wochen nach der Aussaat wurden Blätter von 48 mit den unterschiedlichen Konstrukten transformierten T₂-Pflanzen entnommen und mittels HPLC analysiert.

Die Pigmentzusammensetzungen einiger transgener Pflanzenlinien mit *npq2*- bzw. WT Col-0-Hintergrund sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Dabei wurden die Carotinoidwerte auf den Chlorophyllgehalt normiert.

In den transformierten *npq2*-Pflanzen konnte der wildtypische Pigmentgehalt durch die Überexpression der AtZE vollständig wiederhergestellt werden.

Im Vergleich zum Wildtyp, sind in den transgenen *npq2*- und WT Col-0-Linien nur geringfügige Unterschiede zu erkennen. Alle transgenen Linien zeigten einen etwas erhöhten Vx-Gehalt und damit auch einen geringfügig höheren VAZ-Pool. Außerdem war das Nx/Vx-Verhältnis etwas geringer (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Vergleich der Pigmentzusammensetzung aus Blättern verschiedener transgener *npq2*-Linien mit *Arabidopsis thaliana* Col-0 und *npq2*-Pflanzen.

Nx = Neoxanthin; Ax = Antheraxanthin; Lut = Lutein; β -Car = β -Caroten; VAZ = Summe der Xanthophylle Vx, Ax und Zx. Die grau markierten Pflanzenlinien wurden für die nachfolgenden Analysen verwendet.

<i>npq2</i> +pAUL1/ZEP # 48	33	35	2	115	0	220	780	72	38	3.55
<i>npq2</i> +pAUL2/ZEP # 16	32	40	2	123	0	226	774	68	42	3.43
WT Col-0+pAUL2/ZEP # 19	30	34	2	113	0	210	756	57	41	3.60

Um einen ersten Eindruck von der Epoxidase-Aktivität der transgenen Pflanzen zu gewinnen, wurden diese 30 min bei 2000 μ E vorbelichtet und anschließend nach verschiedenen Zeiten im Schwachlicht der Pigmentgehalt mittels HPLC analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass mit pAUL3/AtZEP transformierte *npq2*-Pflanzen eine viel langsamere Epoxidationsrate aufwiesen als der WT Col-0 (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich lag das an der Größe des Protein-anhangs, der ca. 21 kDa betrug. Aus diesem Grund wurden die mit diesem Konstrukt transformierten Pflanzen nicht für die weiteren Analysen verwendet.

Die einzige mit pAUL1/AtZEP transformierte Linie 48 (s. Tab. 2) zeigte in diesem Versuchsansatz überhaupt keine De-epoxidation und demnach auch keine Epoxidation. Im Vergleich zu den anderen transgenen Linien wurde die AtZE in der Linie 48 mit dem kleinsten Proteinanhang (ca. 3 kDa; s. Abb. 3.2.2 pAUL1) exprimiert. Dadurch ergab sich im Gegensatz zu den mit pAUL3/AtZEP transformierten Pflanzen kaum eine Beeinflussung der nativen Proteinfaltung und somit für die Proteinaktivität. Aufgrund dessen könnte sich das

Reaktionsgleichgewicht möglicherweise durch die konstitutiv erhöhten AtZE-Konzentrationen und die kaum beeinflusste AtZE-Aktivität in der Linie 48 vollständig zugunsten der Epoxidation verschoben haben. Deshalb wurde die Linie 48 (*npq2/pAUL1 AtZEP*) zunächst parallel zu zwei weiteren transgenen Pflanzenlinien ausgewählt und analysiert. Eine weitere Möglichkeit könnte eine Integration der T-DNA in das *VDE*-Gen sein, die zu einer *loss of function*-Mutation führt. Solche Integrationen sind meist rezessiv, d. h. heterozygote Pflanzen zeigen keine Defekte. Die inserierten Gene sind jedoch unter Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *CaMV35S*-Promotors meist dominant, d. h. heterozygote Pflanzen weisen den durch das Transgen hervorgerufenen Phänotyp auf.

Die Auswahl der Linien 16/3 (*npq2/pAUL2 AtZEP*) und 19/9 (WT Col-0/*pAUL2 AtZEP*) erfolgte aufgrund der im Vergleich zum WT Col-0 schnellen Epoxidationskinetik und des Spaltungsverhältnisses von ca. 1:3 in der Segregationsanalyse (s. Tab. 1). Im folgenden wurden die T₃- bzw. T₄-Pflanzen als Linie 48, 16/3 und 19/9 bezeichnet.

3.5 Molekulare und genetische Charakterisierung der transgenen *Arabidopsis*-Linien 48, 16/3 und 19/9

Die Integration der Überexpressionskonstrukte ins *Arabidopsis*-Genom wurde anhand eines Southern Blots und einer darauf folgenden Hybridisierung mit einer *bar*-DIG-Sonde nachgewiesen. Dabei wurde wildtypische genomische DNA als negative Kontrolle und das Konstrukt *pAUL2/ AtZEP* als positive Kontrolle verwendet (s. Abb.3.4).

Zunächst wurde genomische DNA aus Blüten isoliert und 30 µg wurden mit *EcoRI* (high conc.) geschnitten. Die mittels *bar*-DIG-Hybridisierung nachgewiesenen T-DNAs enthalten eine Restriktionsschnittstelle am Ende der Tnos-Region (s. Abb. 3.3 A). Dadurch wurde die Größe der DNA-Fragmente zum einen durch die *EcoRI*-Restriktionsstelle innerhalb der T-DNA und zum anderen durch die Restriktionsschnittstellen im pflanzlichen Genom begrenzt. Somit kann die Größe der nachzuweisenden Insertionen mit dem Integrationslocus der T-DNA im pflanzlichen Genom variieren.

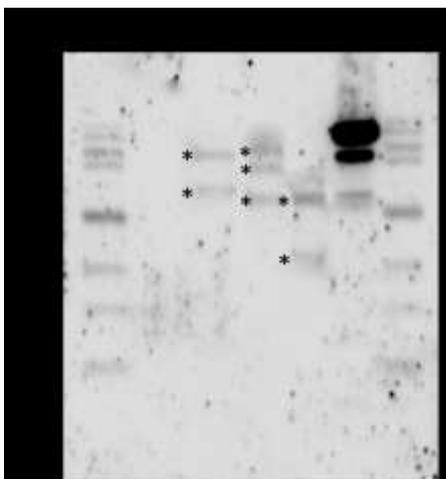


Abb. 3.4: Southern Blot-Hybridisierung mit einer *bar*-Sonde zum Nachweis der Integration der *pAUL1/AtZEP* und *pAUL2/AtZEP* in das Genom von *Arabidopsis thaliana* Col-0 und *npq2*.

- (1) 1 Kb-DNA-Leiter (NEB)
- (2) negative Kontrolle (genomische DNA von *Arabidopsis thaliana* Col-0)
- (3) Pflanzenlinie 19/9 (*Arabidopsis thaliana* Col-0 mit *pAUL2/AtZEP*; T₃-Generation)
- (4) Pflanzenlinie 16/3 (*npq2* mit *pAUL2/AtZEP*; T₃-Generation)
- (5) Pflanzenlinie 48 (*npq2* mit *pAUL1/AtZEP*; T₃-Generation)
- (6) Positive Kontrolle (*pAUL2/AtZEP* mit *AscI* geschnitten)
- (7) 1 Kb-DNA-Leiter (NEB)

* detektierte Banden der transgenen Pflanzen

Mit dem Antikörper gegen die Digoxigenin-Sonde (Anti-Digoxigenin-AP) konnte auch die 1 Kb-Leiter (s. Abb. 3.4) in der ersten und siebten Spur detektiert werden, da diese mit Digoxigenin markiert ist.

In der Spur 2 handelte es sich um die negative Kontrolle mit genomischer Wildtyp-DNA. Deshalb konnte dort keine Hybridisierung und dementsprechend kein Antikörper(Ak)-Nachweis erfolgen. In der Pflanzenlinie 19/9 (Spur 3) konnten zwei Insertionen (2,5 Kb und 3,5 Kb) nachgewiesen werden. Dagegen wurden drei Insertionen in der Pflanzenlinie 16/3 (Spur 4) detektiert. Die ungefähre Größe der Banden liegt bei 2,4 Kb, 2,9 Kb und 4 Kb. Die Spur 5 enthielt genomische DNA der Pflanzenlinie 48. Anhand der Hybridisierung mit der *bar*-DIG-Sonde konnten in dieser transgenen Linie drei Insertionen (2,4 Kb, 1,7Kb und 1,5 Kb) nachgewiesen werden. Die positive Kontrolle (pAUL2/*AtZEP*) in Spur 6 wurde mit dem Enzym *AscI* verdaut. Allerdings erfolgte die Restriktion unvollständig und das zirkuläre Konstrukt konnte mittels *bar*-DIG-Sonde in seinen drei unterschiedlichen DNA-Formen detektiert werden.

Anhand der Southern Blot-Analyse wurde sowohl die erfolgreiche Insertion der Überexpressionskonstrukte, als auch ihre Anzahl bestimmt. Um eine mögliche negative Regulation der *AtZEP*-Überexpression auf Transkriptions- bzw. Translationsebene in den transgenen Pflanzen auszuschließen, wurde die Proteinüberexpression anhand von Western Blot-Analysen mit zwei unterschiedlichen Antikörpern (Anti-HA und Anti-ZE1) überprüft (Abb. 3.5 A + B).

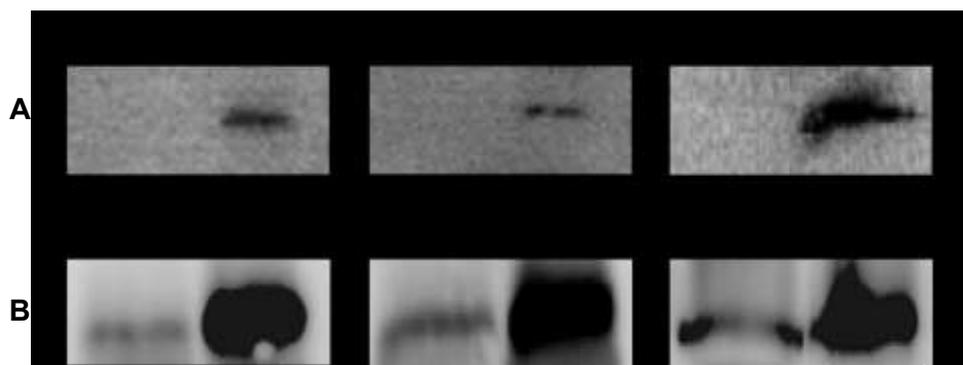


Abb. 3.5: Western Blot-Analyse der transgenen Überexpressionsmutanten im Vergleich zum WT Col-0. Auf das PAA-Gel wurden Thylakoide (1 µg/1 µl Gesamtprotein) der jeweiligen Linien aufgetragen. Der Proteintransfer mittels Western Blot erfolgte auf eine Nitrozellulose-Membran. **A.** Nachweis der Expression der *AtZE*-Isoform 1 mit HA-Anhang mittels **Anti-HA-Peroxidase** (50 mU/ml). negative Kontrolle: WT Col-0-Pflanzen. **B.** Nachweis der Überexpression der *AtZE*-Isoform 1 in den transgenen Linien 48 (npq2/pAUL1 *AtZEP*), 16/3 (npq2/pAUL2 *AtZEP*) und 19/9 (WT Col-0/pAUL2 *AtZEP*) im Vergleich zum WT Col-0 mittels **Anti-ZE1** (1:1000).

Mit der Anti-HA-Peroxidase wurde die Expression der längeren AtZE-Isoform 1 (AtZE1) mit HA-Anhang in den drei transgenen Linien detektiert. Dabei zeigte die WT Col-0-Kontrolle erwartungsgemäß keine Bande (s. Abb. 3.5 A).

Um die AtZE1-Level der transgenen Linien mit den wildtypischen vergleichen zu können wurden ZE-Antikörper hergestellt. Dafür wurde zunächst ein Oligopeptid (NH₂-CFHEEPAGGADAPNGMKKR-CONH₂; s. auch Abb. 7.1 und 7.2 im Anhang) synthetisiert, dessen Sequenz in beiden AtZE-Isoformen vorhanden ist. Mit dem Oligopeptid wurden mehrere Kaninchen immunisiert. Sowohl die Oligopeptidsynthese, als auch die Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma Pineda (Antikörperservice, Berlin) durchgeführt.

Die polyklonale Antiseren aus zwei Kaninchen (ZE1- und ZE2-Antikörper) wurden erfolgreich mittels Western Blot-Analysen getestet. Der ZE1-Antikörper reagierte nur mit der längeren AtZE1-Isoform, während mit dem ZE2-Antikörper (nur für die Linie 48 im Vergleich zum WT Col-0 überprüft und die Linie 16/3) der Nachweis beider AtZE-Isoformen möglich war. Da für die Immunisierung beider Kaninchen das gleiche Oligopeptid verwendet wurde (s. Abb. 7.1 und 7.2 im Anhang), könnten die beiden Antikörper jeweils unterschiedliche Abschnitte des Oligopeptids erkennen. Somit könnte der ZE1-Antikörper einen Bereich detektieren der in der AtZE2-Isoform nicht zugänglich ist, wogegen mit dem Anti-ZE2 ein zugänglicher Teil der Peptidsequenz detektiert werden kann.

Um einen direkten Vergleich zur Western Blot-Analyse mittels Anti-HA-Peroxidase zu erhalten (s. Abb. 3.5 A), wurden die AtZE1-Level der transgenen Pflanzen im Vergleich zur wildtypischen Expression mit dem ZE1-Antikörper (s. Abb. 3.5 B) untersucht.

Dabei konnte in den Linien 48 (npq2/pAUL1 AtZEP), 16/3 (npq2/pAUL2 AtZEP) und 19/9 (WT Col-0/pAUL2 AtZEP) eine vielfach höhere Expression der AtZE1, als im Wildtyp detektiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T-DNA in das Genom von *Arabidopsis thaliana* Col-0 und npq2 integriert wurde und die AtZE 1 mit HA-Anhang in den transgenen Linien überexprimiert wird.

3.6 Wachstum und Morphologie der transgenen Linien 48, 16/3 und 19/9

Die Auswirkung der *AtZEP*-Überexpression wurde zunächst in Bezug auf das Wachstum und die Morphologie der transgenen Pflanzen untersucht. Dabei wurden die Pflanzen jeweils nach 3 Wochen, 4 Wochen und 5 Wochen (s. Abb. 3.6) analysiert.

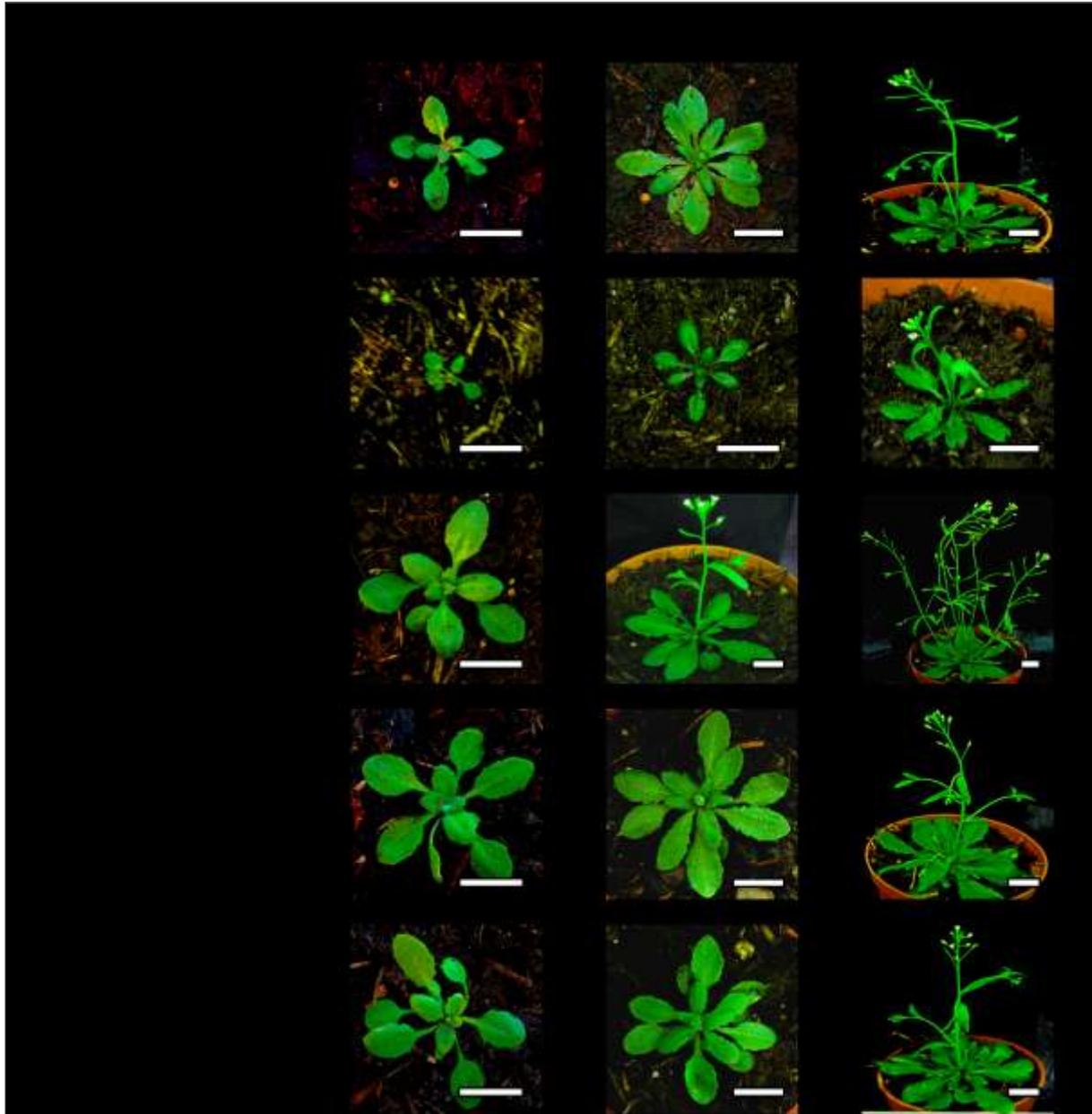


Abb 3.6: Wachstum und Morphologie der transgenen Linien 48 (*npq2/pAUL1 AtZEP*), 16/3 (*npq2/pAUL2 AtZEP*), 19/9 (WT Col-0/*pAUL2 AtZEP*). Die Pflanzenanzucht erfolgt in einer Klimakammer bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 8 zu 16 h, wobei die Tagestemperatur 24 °C und die Nachttemperatur 20 °C betrug. Auf Höhe der Blattrosetten beträgt die normale durchschnittliche Belichtungsstärke 125 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (Balken = 2 cm)

Der Überschuß an AtZE in den transgenen Linien führte im Vergleich zum WT Col-0 in der Pigmentierung und Morphologie der Pflanzen unter den gegebenen Wachstumsbedingungen zu keiner offensichtlichen Änderung. Allerdings waren die Blattrosetten der transgenen

Linien in den Wochen 3 und 4 gegenüber *Arabidopsis thaliana* Col-0 größer. Besonders auffällig war, dass die Pflanzen der Linie 48 bereits nach 4 Wochen blühten und nach 5 Wochen schon mehrere offene Blütenstände besaßen und mit der Schotenausbildung begannen.

3.7 Nachweis der T-DNA-Integration in das VDE-Gen der Linie 48

In einer vorläufigen De-epoxidationsanalyse der transgenen Pflanzen (s. Kapitel 3.4) konnte in der Linie 48 keine Vx-Umsetzung zu Ax und Zx nachgewiesen werden. Auch weitere De-epoxidationsuntersuchungen unter Starklichtexposition ($2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) mit T₃-Pflanzen der Linie 48 ergaben keine detektierbare Vx-Umsetzung. Damit zeigte die transgene Linie 48 wie die *npq1*-Mutante (inaktive VDE) keine De-epoxidation.

Um auszuschließen, dass es sich möglicherweise um eine vollständige Verlagerung des Xanthophyll-Zyklus-Gleichgewichts auf die Seite der Epoxidation aufgrund der AtZE-Überexpression handelte wurde die VDE aus der Linie 48 isoliert (s. Kapitel 2.4.5) und die De-epoxidation *in vitro* überprüft. Als positive Kontrolle diente die parallel isolierte VDE aus WT Col-0-Pflanzen. Im Gegensatz zum WT Col-0 konnte keine *in vitro*-De-epoxidation mit isolierter VDE der Linie 48 nachgewiesen werden, während im Kontrollansatz VDE-Aktivität detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der *npq1*-typischen De-epoxidation der Linie 48 und der nicht nachweisbaren *in vitro*-De-epoxidation mit isolierter VDE lag die Vermutung eines Gen-*knock outs* mittels T-DNA-Insertion in das VDE-Gen nahe. Daraufhin wurde mittels PCR getestet, ob eine Amplifikation der VDE möglich ist. Dafür wurde genomische DNA aus der Linie 48 isoliert und anhand der PCR mit VDE-spezifischen Primern analysiert. Aus dem WT Col-0 isolierte genomische DNA diente auch hier als positive Kontrolle. Es stellte sich heraus, dass eine Amplifizierung des VDE-Gens aus WT Col-0-Pflanzen möglich war, während die parallel durchgeführte PCR mit der genomischen DNA aus der Linie 48 kein Amplifikat hervorbrachte (s. Abb. 3.7).

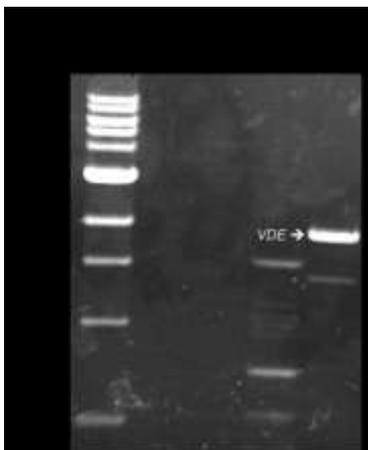


Abb. 3.7 : Nachweis einer möglichen T-DNA-Integration in das VDE-Gen der Überexpressionslinie 48.

Der Nachweis erfolgte mittels PCR mit einem Primerpaar (s. Kapitel 2.1.6) für die VDE. Für die folgende Analyse der DNA-Fragmente wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet. Die Sequenzlänge der genomischen VDE beträgt 1700 Bp.

48/1: genomische DNA der Linie 48/Pflanze 1; **48/2:** genomische DNA der Linie 48/Pflanze 2; **48/3:** genomische DNA der Linie 48/Pflanze 3; **WT Col-0:** genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* Col-0/ positive Kontrolle.

Somit konnte in der Linie 48 nachgewiesen werden, dass eine Integration der pAUL1/AtZEP T-DNA in das VDE-Gen erfolgt sein müsste und dies zu einem Gen-*knock out* führte. Deswegen konnte die Linie 48 im Hinblick auf Untersuchungen der Auswirkung der AtZE-Überexpression auf den Xanthophyll-Zyklus und damit verbunden auf die Photoprotektion nicht verwendet werden.

Allerdings wurde in Betracht gezogen, diese Linie aufgrund der relativ starken Überexpression der AtZE1 (s. Abb. 3.5 B) für die Aufreinigung der AtZE1 mittels Hämagglutinin-Anhang (HA-Anhang) zu verwenden. Vorteilhaft war dabei, dass die AtZE1 in der Linie 48 im Vergleich zu den Linien 16/3 und 19/9 mit dem kleinsten Protein-Anhang (nur HA-Anhang) exprimiert wurde.

Zunächst wurde die Aktivität der AtZE in der Linie 48 *in vivo* überprüft um die Aufreinigung einer *in vivo* nicht aktiven AtZE auszuschließen. Da ein einfacher AtZE-Aktivitätsnachweis mittels De-epoxidation unter Starklichtexposition und anschließender Epoxidation im Schwachlicht anhand von Blättern nicht möglich war, wurden zunächst Thylakoide der Linie 48 mit einem extrinsischem Zx-Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)-Gemisch mittels Ultraschall komplementiert. Die Epoxidation wurde durch Zugabe von Epoxidationsmedium gestartet und indirekt mittels HPLC analysiert. Als positive Kontrolle wurden *npq1*-Thylakoide verwendet, da die AtZE in *npq1* aktiv ist. Als negative Kontrolle dienten Thylakoide, die ohne Sonifikation mit Zx und MGDG versetzt wurden. Dabei konnte jeweils eine schwache Zx-Umsetzung von 5 % zu Ax und Vx (Daten nicht gezeigt) in den Thylakoiden der Linie 48 und der positiven Kontrolle beobachtet werden. In der negativen Kontrolle konnte dagegen keine Zx-Umsetzung nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in der Linie 48 mit dieser Methode *in vivo*-AtZE-Aktivität detektiert werden. Diese war mit der AtZE-Aktivität in *npq1* vergleichbar. Aufgrund dessen wurde die Linie 48 für die AtZE1-Aufreinigung mittels HA-Anhangs verwendet.

3.8 Aufreinigung der AtZE1 mittels Affinitätschromatographie

Die Isolierung der AtZE1 sollte die *in vitro*-Untersuchung der biochemischen Eigenschaften und möglicher die AtZE1-Aktivität regulierender Mechanismen ermöglichen. Außerdem stellte sich aufgrund der zweiten AtZE-Isoform (AtZE2) die Frage, inwieweit die Epoxidation allein durch die AtZE1-Isoform möglich ist. Dafür sollte die AtZE1 aus Pflanzen der Linie 48 mittels HA-Anhangs aufgereinigt werden und die katalytischen Eigenschaften in einer *in vitro*-Epoxidation mittels HPLC analysiert werden.

Zunächst wurden Thylakoide der Linie 48 und daraus Gesamtprotein isoliert (s. Kapitel 2.4.9). Mittels Affinitätschromatographie wurde die AtZE1 anhand des HA-Anhangs aus dem Gesamtproteinpool aufgereinigt (s. Kapitel 2.4.13). Anschließend folgte die Analyse der

aufgefangenen Durchflußfraktion, der drei Waschfraktionen und der drei Elutionsfraktionen anhand einer Immunoblot-Analyse. Dabei konnte die AtZE1 in keiner der analysierten Fraktionen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Im Hinblick auf eine mögliche AtZE-Lokalisierung im Chloroplasten-Stroma wurde überprüft, ob bei der Thylakoidisolierung die AtZE1 möglicherweise verloren geht. Dafür wurden parallel sowohl Chloroplasten (s. Kapitel 2.4.2), wie auch Thylakoide isoliert und mittels Immunblotanalyse auf das Vorhandensein der AtZE1 überprüft (s. Abb. 3.8.1). Hierbei wird deutlich, dass die AtZE1-Isoform in den Chloroplasten- wie auch in Thylakoid-Proben in ähnlichen Mengen vorkommt. Dadurch konnte ein AtZE1-Verlust über eine Thylakoidisolierung ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde eine mögliche Assoziation der AtZE1 an die stromale Seite der Thylakoidmembran aufgrund dieser Immunoblotanalyse vermutet.

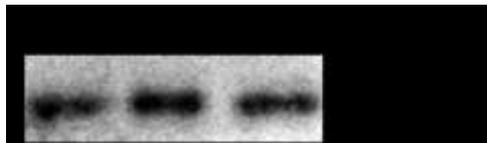


Abb. 3.8.1 : Immunoblot - Analyse der AtZE1-Assoziation an die Membran anhand des AtZE1-Gehaltes isolierter WT Col-0-Chloroplasten und -Thylakoide. Nachweis der AtZE1 mittels **Anti-ZE1** (1:1000). Jeweils 1 µg/µl Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose - Membran übertragen.
C: Chloroplasten, T: Thylakoide

Deswegen erfolgte eine erneute Gesamtproteinisolierung anhand eines Protokolls zur Aufreinigung von Membranproteinen aus Thylakoiden (s. Kapitel 2.4.10). Das Ergebnis der Immunoblotanalyse nach wiederholter HA-Affinitätschromatographie ist in Abb. 3.8.2 dargestellt. Dabei wurde die AtZE1 ohne Signalpeptid in der Elutionsfraktion 1 (EF1) bei ~70 kDa detektiert.

Aufgrund des Ausschlusses eines möglichen Verlusts der AtZE1-Isoform durch die Thylakoidisolierung (s. Abb. 3.8.1) und der AtZE1-Aufreinigung mittels eines Protokolls für Membranproteine kann für die AtZE1-Isoform eine feste Assoziation mit der Thylakoidmembran angenommen werden.

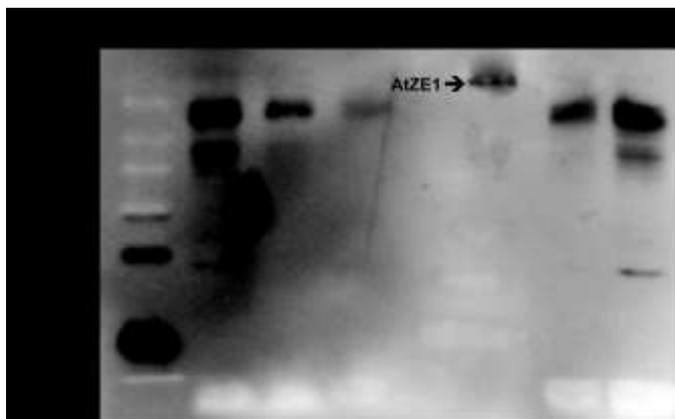


Abb. 3.8.2 : Immunoblot-Analyse der AtZE1-Aufreinigung mittels HA-Epitop-Affinitätschromatographie aus der Linie 48 (*npq2/pAUL1 AtZEP*). Nachweis der aufgereinigten AtZE-Isoform 1 mittels **Anti-ZE1** (1:1000). Jeweils 1 µg/µl Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.
M: Proteinmarker (prestained PageRuler; Fermentas), 1: Protein-Durchflußfraktion
2-4: Protein-Waschfraktionen, 5-7: Protein-elutionsfraktionen.

Im Anschluss an die Proteinaufreinigung erfolgte eine *in vitro*-Epoxidation mit der aufgereinigten AtZE1 nach dem Protokoll von Bouvier *et al.* (1996). Allerdings konnte keine AtZE-Aktivität anhand der Pigmentanalyse mittels HPLC nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund könnte das Fehlen eines entscheidenden Co-Faktors für die AtZE-Aktivität sein. Im Hinblick darauf könnte möglicherweise die AtZE2-Isoform in *Arabidopsis* für die Epoxidation eine essentielle Rolle spielen.

3.9 Untersuchung unterschiedlicher Pigmentphänotypen der Linie 16

Neben der VDE-Verlustmutation in der Linie 48 wurde in einigen T₂-Pflanzen der transgenen Linie 16 ein interessanter Pigment-Phänotyp beobachtet. Dieser zeigte sich vor allem in HPLC-Analysen anhand hoher Zx- und Ax-Mengen, sowie geringen Vx- und Nx-Konzentrationen (s. Abb. 3.9 A Pflanze 2 - 4).

Im Hinblick auf den Nachweis dieses Pigmentphänotyps in den T₂-Pflanzen der transgenen Linie 16 war der *npq2*-Hintergrund von essentieller Bedeutung, weil *npq2*-Pflanzen nicht nur hohe Mengen an Zx akkumulieren, sondern durch eine Blockierung der Epoxidationsreaktion auch die Xanthophyllpigmente Nx, Vx und Ax fehlen (s. Kapitel 3.4 Tabelle 2). Dadurch konnten auch unterschiedlich starke Ausprägungen dieses Pigmentphänotyps in T₂-Pflanzen der Linie 16 beobachtet werden (s. Abb. 3.9 A Pflanze 2 - 4). Demgegenüber konnten in der transgenen Linie 19 (WT Col-0/pAUL2 *AtZEP*) aufgrund des wildtypischen Hintergrunds keine mit den Pflanzen 2 bis 4 der Linie 16 (s. Abb. 3.9 A) vergleichbaren Unterschiede nachgewiesen werden.

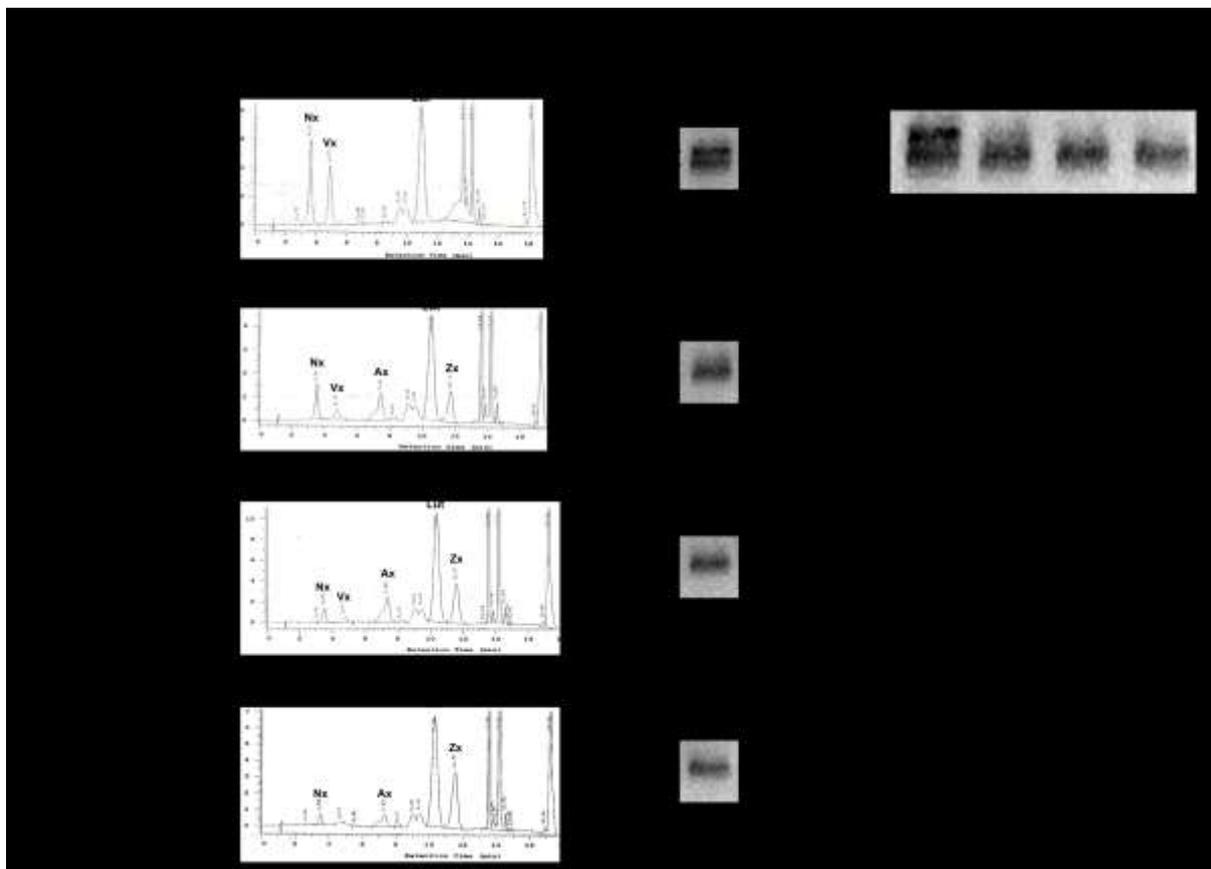
Repräsentativ für die unterschiedlich starken Ausprägungen des Xanthophyllpigmentphänotyp wurden drei T₂-Pflanzen ausgewählt, die in den Nx-, Vx-, Ax- und Zx-Mengen Unterschiede zeigten (s. Abb. 3.9 A Pflanzen 2-4). Dabei diente die T₂-Pflanze 1 der Linie 16 (s. Abb. 3.9 A) aufgrund der vollständigen Zx- Umsetzungen zu Vx und Nx als Vergleichspflanze. Auf Pigment- und Proteinebene ist die Pflanze 1 der Linie 16 mit den T₃-Pflanzen der Linie 16/3 mit vollständiger Zx-Umsetzung vergleichbar. Außerdem sind die nachgewiesenen Pigmentkonzentrationen der Pflanze 1 ähnlich den wildtypischen (s. Tab. 2 WT Col - 0 im Vergleich zu Linie 16).

In Abb. 3.9 A fällt zunächst auf, dass im Vergleich zur T₂-Pflanze 1 die Pflanzen 2 bis 4 hohe Zx-Mengen aufweisen. Hinzu kommt, dass sich bei den Pflanzen 2 bis 4 eine vergleichsweise hohe Akkumulation von Ax und eine geringe Bildung von Vx und Nx zeigte. Ausgehend von Pflanze 2 bis Pflanze 4 nahmen die Nx, Vx und Ax-Mengen ab, wobei in der Pflanze 4 Vx nicht mehr detektiert werden konnte. Anhand des Chromatogramms der Pflanze 4 (s. Abb. 3.9 A) wird durch das Fehlen von Vx deutlich, dass zunächst bei einer geringfügigen Zx-Umsetzung zu Ax und Vx eine fast vollständige Umsetzungen des Vx zu Nx

erfolgt. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei anfänglicher Synthese der Xanthophyllzykluspigmente, Vx bis zu einer gewissen Konzentration zunächst vollständig zu Nx weiter umgesetzt wird.

Eine mögliche Erklärung für die Veränderungen im Pigmentphänotyp einiger transgener Pflanzen der Linie 16 wäre, dass hier die Translation durch PTGS (*post transcriptional gene silencing*) unterbunden wurde. PTGS kann in der späteren Pflanzenentwicklung auftreten, ist positiv abhängig von der Transkriptmenge und muss nicht die ganze Pflanze bzw. alle Pflanzen einer Population betreffen (Vaucheret *et al.*, 1998).

Um festzustellen, ob möglicherweise eine Veränderung auf Proteinebene in einer oder beider AtZE-Isoformen für die Variation des Pigmentphänotyps verantwortlich ist, wurde eine Immunoblotanalyse durchgeführt. Hierbei wurde ein Antikörper (Anti-ZE2) zum Nachweis beider AtZE-Isoformen verwendet.



Die Immunoblotanalyse (s. Abb. 3.9 B) zeigte deutlich, dass in Pflanze 1 beide Proteinvarianten in ähnlichen Konzentrationen vorhanden waren, während in den Pflanzen 2 bis 4 nur noch die kürzer AtZE-Variante (AtZE2) deutlich nachweisbar war. Dagegen konnte die längere Variante (AtZE1) nicht detektiert werden. Im Zusammenhang mit der Zx-Umsetzung der Pflanzen 2 bis 4 wurde mit dem ausschließlichen Nachweis der AtZE2 nur wenig zu Ax, Vx und Nx umgewandelt (s. Abb. 3.9 A). Das spricht dafür, dass die AtZE1-

Isoform in *Arabidopsis* essentiell für die vollständige Umsetzung des Zx ist. Da in den Pflanzen 2 bis 4 nur sehr wenig Zx umgesetzt worden ist, könnte die AtZE1-Isoform hier in zu geringer Konzentration für eine vollständige Epoxidation und für eine Detektion mittels Immunoblotanalyse vorliegen. Andererseits könnte die AtZE2-Isoform möglicherweise eine geringfügige Epoxidase-Aktivität besitzen und die AtZE1-Proteinvariante mittels Interaktion bei der Epoxidation positiv regulieren. Ein Indiz für diese Hypothese könnte die graduelle Abnahme des AtZE2-Gehaltes sein, der in den Pflanzen 2 bis 4 (s. Abb. 3.9 C) mit der Abnahme an Nx, Vx und Ax korreliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AtZE1 essentiell für eine vollständige Zx-Umsetzung im *npq2*-Hintergrund ist (s. Pflanze 1 in Abb. 3.9).

In den, für die nachfolgenden Analysen, verwendeten T₃-Pflanzen der Linie 16/3 wurden nur noch wenige Pflanzen mit den in Abb. 3.9 A (Pflanzen 2-4) gezeigten Xanthophyllpigmentphänotypen detektiert. Trotzdem wurden die 16/3-Pflanzen vor jeder Analyse mittels HPLC getestet und nur Pflanzen mit dem in Abb. 3.9 A (Pflanze 1) gezeigten Pigmentphänotyp verwendet. Nach Selbstung von T₃-Pflanzen der Linie 16/3 mit vollständiger Zx-Umsetzung zu Nx und Vx waren auch in der T₄-Generation einige Pflanzen mit abweichendem Pigmentphänotyp nachweisbar.

3.10 Untersuchung der *in vivo*-De-epoxidation in den transgenen Linien 16/3 und 19/9

Die De-epoxidation wird durch die VDE katalysiert, deren Aktivität über den pH-Wert im Thylakoidlumen reguliert wird. Bereits bei einer Ansäuerung des Thylakoidlumens $\text{pH} < 6,2$ wird das Enzym aktiviert. Allerdings liegt das pH-Optimum bei $\text{pH} 5,2$ (Hager, 1966). Die Rückreaktion (Epoxidation) mittels ZE verläuft langsamer, so dass bei sättigenden Lichtbedingungen die De-epoxidation dominiert. Unter nicht sättigenden Lichtintensitäten (z.B. $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$), wird die Zx-Epoxidation zu Vx schon im Licht sichtbar. Das liegt daran, dass der luminaire pH-Wert $\text{pH} 6$ ist und damit das pH-Optimum der VDE nicht erreicht wird.

Um eine mögliche Beeinflussung des Xanthophyllzyklus aufgrund des AtZE-Überschusses in den transgenen Linien 48, 16/3 und 19/9 zu überprüfen wurde zunächst die De-epoxidation (Vx-Umsetzung zu Ax und Zx) untersucht. Dafür wurden Blattscheiben ($\varnothing 8\text{mm}$) sechs Wochen alter Pflanzen der Linien 48, 16/3, 19/9 und WT Col-0 zwei Stunden bei 20°C unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt. Die Pigmentzusammensetzungen wurden nach bestimmten Belichtungszeitpunkten mittels HPLC analysiert.

In Abbildung 3.10 sind die De-epoxidationsraten aus den unterschiedlichen Lichtintensitäten der Linien 16/3 und 19/9 zusammengefasst. Dabei wurden die Ax-Werte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

Unter nicht sättigenden Lichtbedingungen (s. Abb. 3.10 A) konnte sowohl in der transgenen Linie 16/3 eine kurzfristige De-epoxidation innerhalb der ersten 5 min als auch beim WT Col-0 beobachtet werden. Dabei wurde in der transgenen Linie ein Zx-Anstieg bzw. eine Vx-Abnahme um ca. 20 % nachgewiesen, während der WT Col-0 bis zu 30 % Vx zu Zx umsetzt. Nach weiteren 5 min wurde in der Linie 16/3 eine nahezu vollständige Zx-Rückumwandlung zu Vx detektiert. Dagegen wurde im WT Col-0 eine schwache, aber nicht vollständige Epoxidation nach 30 min beobachtet. Demnach zeigte sich im Bezug auf die AtZE-Überexpression in der transgenen Linie 16/3 unter nicht sättigenden Lichtbedingungen eine Verlagerung des Xanthophyllzyklus-Gleichgewichts auf die Seite der durch die ZE katalysierten Epoxidationsreaktion.

Dagegen zeigte sich in der transgenen Linie 19/9 unter nicht sättigenden Lichtbedingungen eine nahezu wildtypische De-epoxidation (s. Abb. 3.10 B). Dieser Unterschied in der De-epoxidation zwischen beiden transgenen Linien könnte möglicherweise durch posttranskriptionelles Silencing einiger Pflanzen der Linie 19/9, ähnlich dem einiger T_2 -Pflanzen der Linie 16 verursacht worden sein (s. Kapitel 3.9). Im Gegensatz zur Linie 16 lässt sich dieses Phänomen in der Linie 19/9 allerdings schwer aufgrund des wildtypischen Hintergrunds mittels HPLC-Analysen nachweisen. Allerdings könnte es die

nahezu wildtypische De-epoxidation der transgenen Linie 19/9 unter nicht sättigenden Lichtbedingungen erklären (s.Abb. 3.10 B), während sich die Linie 19/9 unter sättigenden Lichtbedingungen ähnlich der Linie 16/3 verhielt (s.Abb. 3.10 C-H).

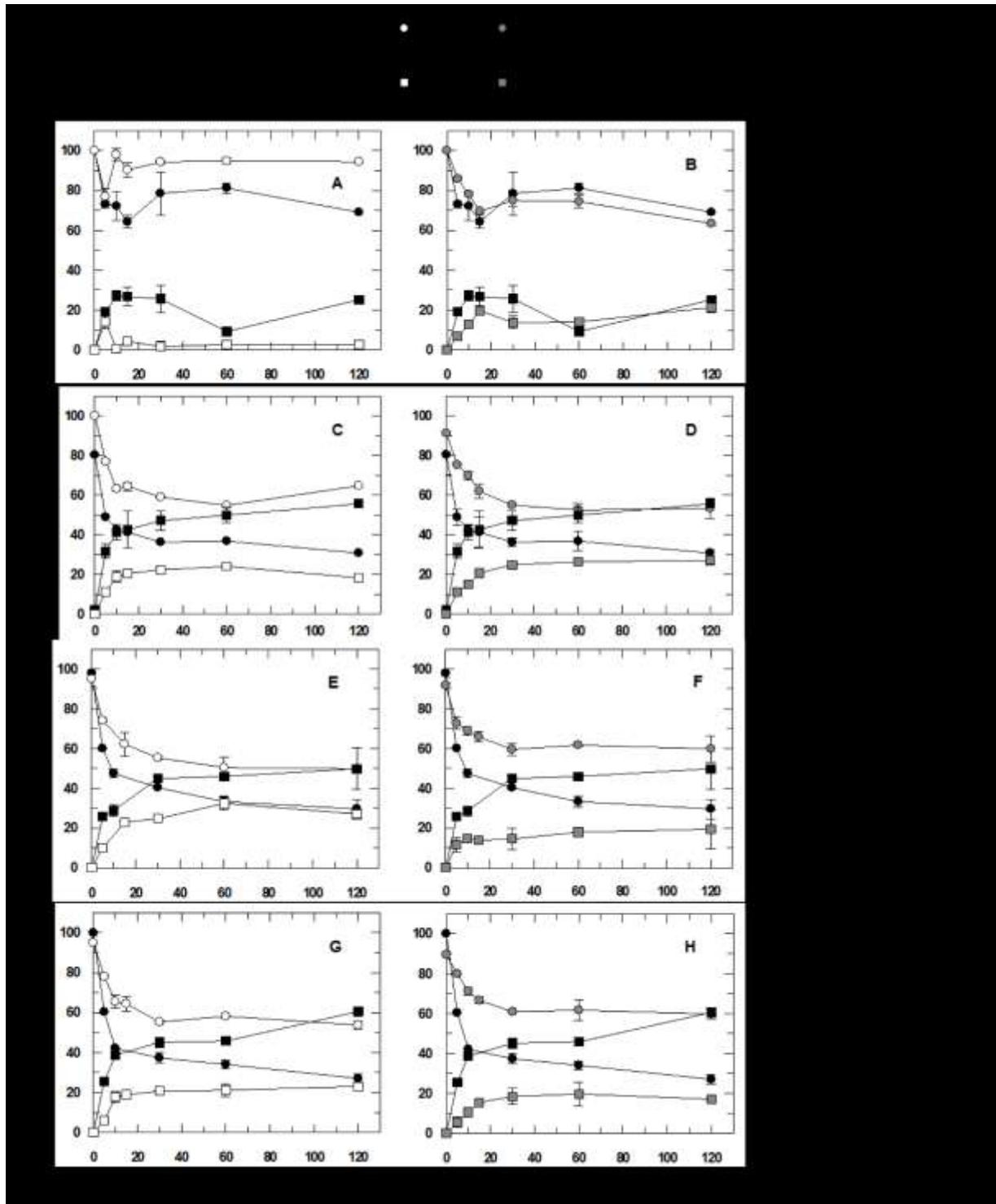


Abb. 3.10: Zeitlicher Verlauf der De-epoxidation der transgenen Linie 16/3 und 19/9 im Vergleich zum WT Col-0 innerhalb einer zweistündigen Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten. Für die Analyse wurden Blattscheiben ($\varnothing 8\text{mm}$) belichtet und der Pigmentgehalt zu bestimmten Zeitpunkten der Belichtung mittels HPLC analysiert. Dargestellt ist jeweils der Vx- und Zx-Gehalt in % des VAZ-Pools. **A, C, E und G:** De-epoxidation der Linie 16/3 (weiß) im Vergleich zum WT Col-0 (schwarz) bei unterschiedlichen Lichtintensitäten. **B, D, F und H:** De-epoxidation der Linie 19/9 (grau) im Vergleich zum WT Col-0 (schwarz) bei unterschiedlichen Lichtintensitäten. **A, B:** Lichtintensität von $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-2}$. **C, D:** $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-2}$. **E, F:** $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-2}$. **G, H:** $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-2}$.

Es werden Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen \pm SD gezeigt.

Unter sättigenden Lichtbedingungen (s. Abb. 3.10 C-H) erfolgt eine vollständige Aktivierung der VDE aufgrund der starken Ansäuerung des Thylakoidlumens ($\text{pH} < 6$). Dadurch konnte während der zweistündigen Belichtungsphase weder im WT Col-0 noch in den beiden transgenen Linien eine Epoxidation beobachtet werden. Allerdings war unter sättigenden Lichtbedingungen auffällig, dass in beiden transgenen Linien verglichen mit dem WT Col-0 im *steady-state* stets weniger Vx zu Zx de-epoxidiert wurde (s. Abb. 3.10 C - H). Das Erreichen des *steady-state* der De-epoxidation wurde nach jeweils 10 - 15 min in den beiden transgenen Linien 16/3 und 19/9 unter allen sättigenden Lichtbedingungen nachgewiesen. Dagegen wurde das *steady-state*-Level in WT Col-0-Pflanzen erst nach etwa 30 min erreicht.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Vx-De-epoxidation unter sättigenden Lichtbedingungen (s. Abb. 3.10) könnte dabei die stark erhöhte AtZE1-Konzentration sein (s. Abb. 3.5), welche die Zx-Rückumwandlung unter VDE aktivierenden verstärkt und für eine vollständige Zx-Umwandlung essentiell ist (s. Abb. 3.9). Jedoch werden beide Proteinvarianten in den transgenen Linien aufgrund der konstitutiven Expression des genomischen OLR (Offenen Leserasters) in ähnlichen Konzentrationen gebildet (s. Abb. 3.7 für Linie 16/3 Pflanze 1 gezeigt). Im Hinblick darauf könnte die Beeinflussung der Epoxidation in den transgenen Linien durch beide AtZE-Isoformen erfolgen.

Die Linie 48 zeigte bei allen getesteten Lichtintensitäten keine Konversion des Vx zu Zx (Daten nicht gezeigt), da die VDE in dieser Linie aufgrund der T-DNA-Insertion inaktiv ist (s. Abb. 3.7).

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass aufgrund der AtZE-Überexpression in den beiden transgenen Linien 16/3 und 19/9 die AtZE-Aktivität erhöht wird und dadurch der vollständig aktivierten VDE unter sättigenden Lichtbedingungen stärker entgegensteuern kann. Außerdem scheint die Epoxidation bei einem AtZE-Überschuß schneller zu verlaufen, da zum einen unter nicht sättigenden Lichtbedingungen eine nahezu vollständige Zx-Rückumwandlung innerhalb von 5 min in der Linie 16/3 verglichen mit dem WT Col-0 detektiert werden konnte (s. Abb. 3.10 A). Zum anderen wurde unter sättigenden Lichtbedingungen das *steady-state* der De-epoxidation in beiden transgenen Linien schneller erreicht als im WT Col-0 (s. Abb. 3.10 C-H).

3.11 Analyse der *in vivo*-Epoxidation der transgenen Linien 16/3 und 19/9

Im Anschluss an die Analyse der De-epoxidation wurde in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 auch die Auswirkung der AtZEP-Überexpression auf die Epoxidationsrate *in vivo* untersucht (s. Abb. 3.11). Dafür wurden Blattscheiben (\varnothing 8 mm) bei 20°C für 30 min mit 2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Diese Belichtungsbedingungen wurden aus den De-

epoxidationsdaten (s. Abb. 3.10) ausgewählt, um bei vollständiger VDE-Aktivierung die höchste Zx-Ausbeute unter Sättigung zu erhalten. Die Epoxidation erfolgte zwei Stunden unter Schwachlichtbedingungen und wurde zu bestimmten Zeitpunkten mittels HPLC analysiert.

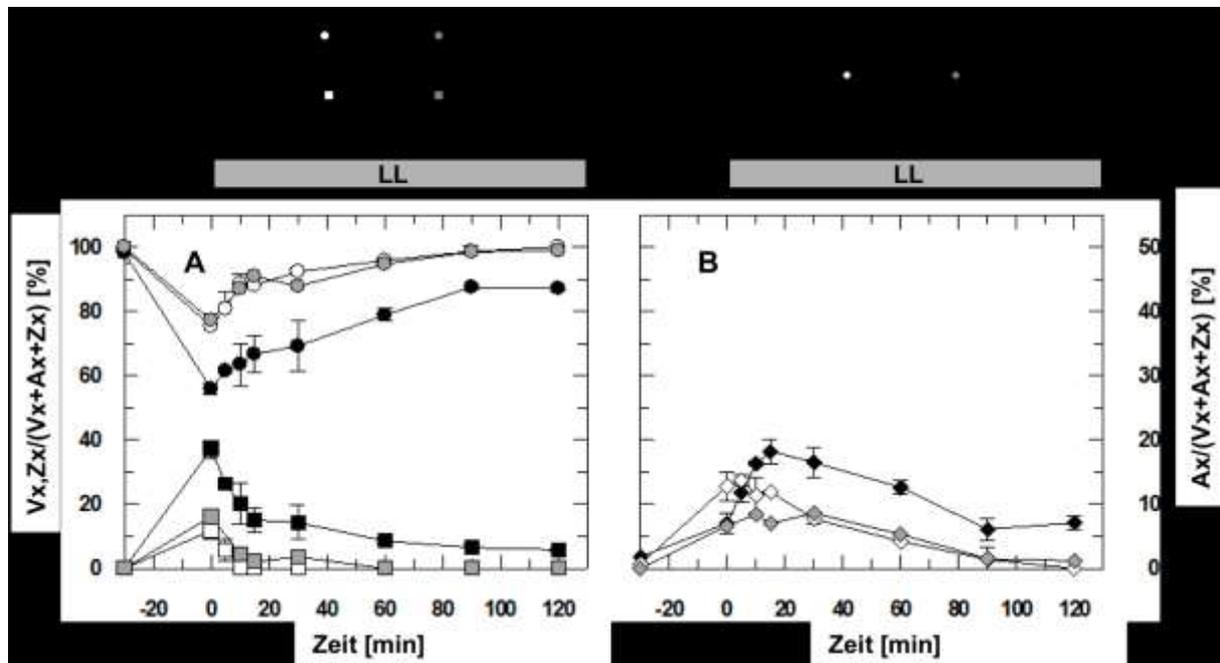


Abb. 3.11: Zeitlicher Verlauf der Epoxidation. Blattscheiben (\varnothing 8 mm) der Linien 16/3, 19/9 und des WT Col-0 wurden 30 min mit $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL) belichtet. Anschließend wurden sie für die Epoxidation 2 h in Schwachlicht (LL: $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) überführt. Zu bestimmten Epoxidationszeitpunkten wurden Blattscheiben entnommen und die Reaktion durch schockgefrieren in flüssigem N_2 gestoppt. Die Pigmentanalyse erfolgte mittels HPLC. **A.** Vx- und Zx-Gehalt in % des VAZ-Pools beider transgener Linien im Vergleich zum WT Col-0. **B.** Ax-Gehalt in % des VAZ-Pools beider transgenen Linien sind im Vergleich zum WT Col-0. Es werden Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung \pm SD gezeigt.

Die nahezu vollständige Konversion des Zx zu Ax in den Linien 16/3 und 19/9 erfolgte innerhalb von 15 min im Schwachlicht (s. Abb. 3.11 vgl. A und B). Dabei ist auffällig, dass sich die Ax-Mengen in diesem Zeitabschnitt in den transgenen Linien kaum veränderten bzw. leicht reduzierten, obwohl durch die schnelle Zx-Umsetzung in kurzer Zeit viel Ax gebildet worden ist (s. Abb. 3.11 B). Vermutlich erfolgte hier schon eine schnelle Weiterumwandlung des Ax zu Vx (s. Abb. 3.11 A, Vx-Werte). Dadurch erfolgte unter Schwachlicht eine nahezu vollständige Epoxidation innerhalb von ca. 15 min. Dagegen zeigte sich in den Ax-Werten des WT Col-0 verglichen mit den transgenen Linien in den ersten 15 min der Epoxidation ein um ca. 10 %iger Anstieg des Ax vom Ausgangswert am Ende der Belichtungsphase aufgrund der schnellen Phase der $\text{Zx} \rightarrow \text{Ax}$ -Umsetzung (s. Abb. 3.11 B). Nach dieser Zeit kam es auch im WT Col-0 zur Abnahme der Ax-Konzentration. Allgemein lässt sich daraus auf eine schnellere Zx-Epoxidation in den transgenen Linien im Vergleich zum WT Col-0 schließen.

Eine detaillierte Betrachtung beider Teilreaktionen der Epoxidation in Bezug auf die nahezu konstanten Ax-Werte in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 in den ersten 30 min

der Schwachlichtphase gegenüber dem Ax-Anstieg im WT Col-0 (s. Abb. 3.11 B, LL) zeigt für beide transgene Linien, dass innerhalb dieser Zeitspanne genauso viel Ax aus Zx gebildet, wie auch Ax zu Vx umgewandelt wurde. Damit ist in beiden transgenen Linien die Geschwindigkeit der ersten Teilreaktion der Epoxidation ($Zx \rightarrow Ax$) äquivalent zur Geschwindigkeit der zweiten Teilreaktion ($Ax \rightarrow Vx$), da sich die Umsatzraten des Ax in den ersten 15 min der Epoxidation nicht verändern. Im WT Col-0 zeigte sich dagegen im anfänglichen Anstieg der Ax-Werte innerhalb der Epoxidation, dass die zweite Teilreaktion langsamer verlief. Dies weist darauf hin, dass durch die Erhöhung der AtZE-Konzentrationen in den Überexpressionsmutanten 16/3 und 19/9 eine Steigerung der Epoxidationsrate erfolgt, die möglicherweise auf eine Beschleunigung insbesondere des zweiten Teilschritts ($Ax \rightarrow Vx$) der Epoxidation beruht.

3.12 Fluoreszenzlöschung in den transgenen Pflanzen

Mögliche Auswirkungen der geringen Vx-Umsetzung während der De-epoxidation und der schnelleren Zx-Epoxidation der transgenen Linien 16/3 und 19/9 im Vergleich zum WT Col-0 auf die Fluoreszenzlöschungskomponenten qP und NPQ wurden *in vivo* bei unterschiedlichen Lichtintensitäten mittels PAM-Messungen untersucht.

Es werden zwei Hauptkomponenten der Fluoreszenzlöschung, die photochemische (qP) und die nicht-photochemische Löschung (NPQ) unterschieden (Krause und Jahns, 2004). Die photochemische Löschung (qP) ist vom Redoxzustand des Q_A abhängig und reflektiert die Aktivität des linearen Elektronentransportes. Die nicht-photochemische Löschung (NPQ) ist vom Redoxzustand des Q_A unabhängig und steigt proportional zur Wärmedissipationsmenge der Anregungsenergie. Die Wärmedissipation ist ein photoprotektiver Mechanismus der zur Reduktion der Bildung von ROS (reaktive Sauerstoffspezies) beiträgt. Dadurch kann NPQ auch als Indikator für photooxidativen Stress verwendet werden kann.

Die Fluoreszenzlöschung wurde in den drei transgenen Linien 16/3, 19/9 und 48 untersucht. Als Vergleichspflanzen dienten WT Col-0 und *npq1*. In *npq1* ist die VDE nicht funktionsfähig und dadurch kann Vx in diesen Pflanzen nicht zu Zx umgewandelt werden. Aufgrund dieses Phänotyps ist *npq1* im Vergleich zum WT Col-0 unter kurzweiligem Starklichtstress viel sensitiver im Bezug auf Photoinhibition (qI) des PSII (Niyogi *et al.*, 1998; Havaux und Niyogi, 1999).

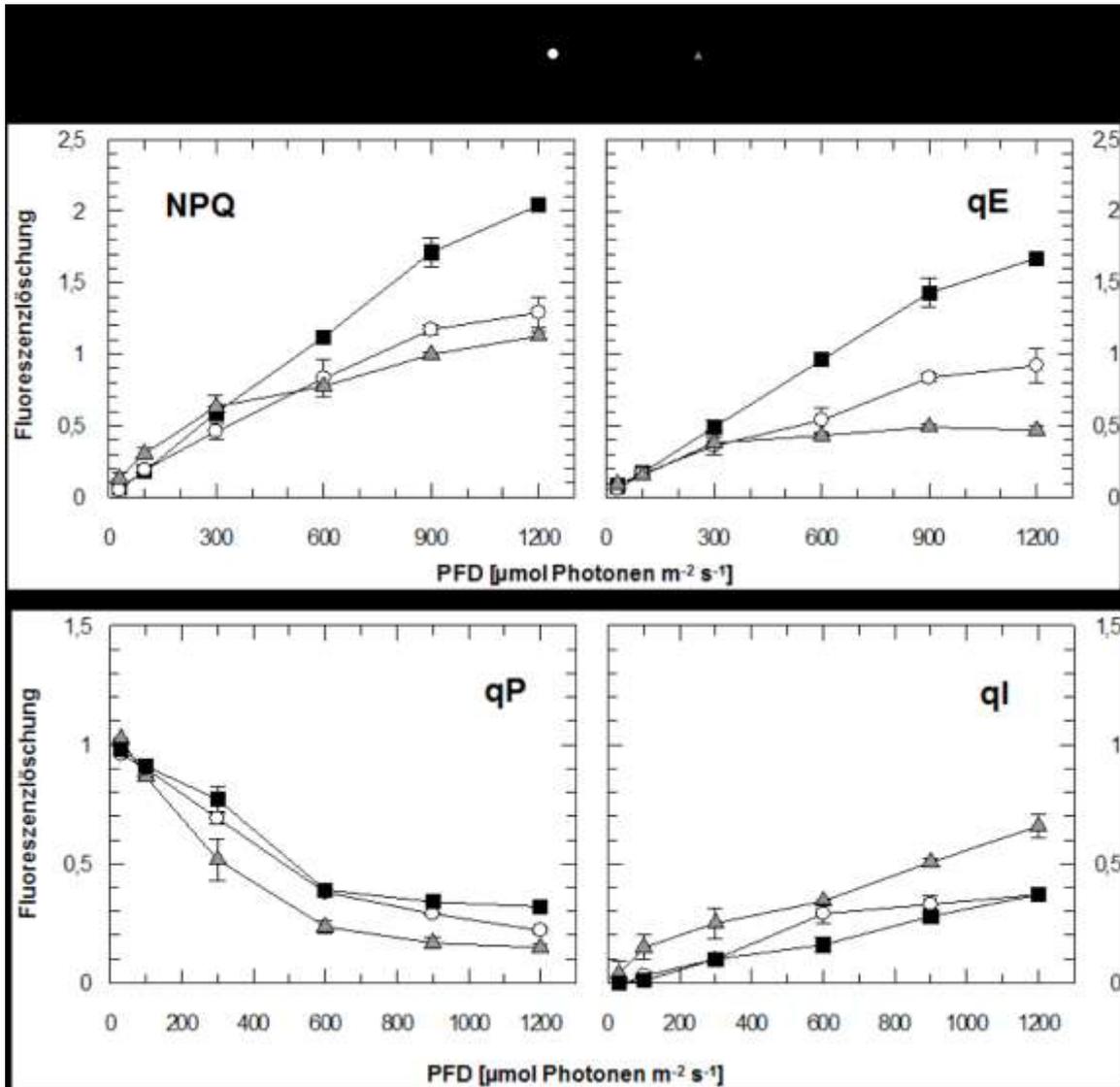


Abb. 3.12: Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Anregungslichtintensität in der Linie 16/3 im Vergleich zum WT Col-0 und *npq1*. Für die Analyse wurden Blätter sechs Wochen alter Pflanzen verwendet. Es wurde der Einfluß sechs unterschiedlicher Lichtintensitäten (30, 100, 300, 600, 900 und 1200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) untersucht. Die Belichtung erfolgte jeweils für 16 min. Das **qP** und **NPQ** wurden am Ende der aktinischen Belichtungsphase anhand der Fluoreszenz-änderung durch einen saturierenden Lichtblitz bestimmt. Die beiden Hauptkomponenten des NPQ sind die ΔpH -abhängige Löschung **qE** und die photoinhibitorische Löschung **qI**. Beide Komponenten und ihre Stern-Volmer-Koeffizienten wurden von der Dunkelrelaxation des Fv nach 16 minütiger Belichtungen für die jeweiligen PFD hergeleitet. Es werden Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung \pm SD gezeigt.

Die transgene Linie 48 zeigte aufgrund des *VDE-knock-outs* (s.Abb. 3.7) für alle untersuchten Fluoreszenzlöschungsparameter die gleichen Eigenschaften (Daten nicht gezeigt), wie die *npq1*-Mutante.

Im Vergleich zum WT Col-0 wurde in der *npq1*-Mutante ein niedriger qP-Wert nachgewiesen (s.Abb.3.12 und 3.13 qP). Dieser Wert zeigt an, dass der Elektronendruck auf das Q_A höher ist, wenn die qE-abhängige Ableitung von Anregungsenergie aufgrund des fehlenden Zx in *npq1* inaktiv ist (Kalituhu *et al.*, 2007).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Daten der beiden transgenen Linien 16/3 und 19/9 in zwei getrennten Abbildungen (s. Abb. 3.12 und 3.13) im Vergleich zum WT Col-0 und *npq1* dargestellt.

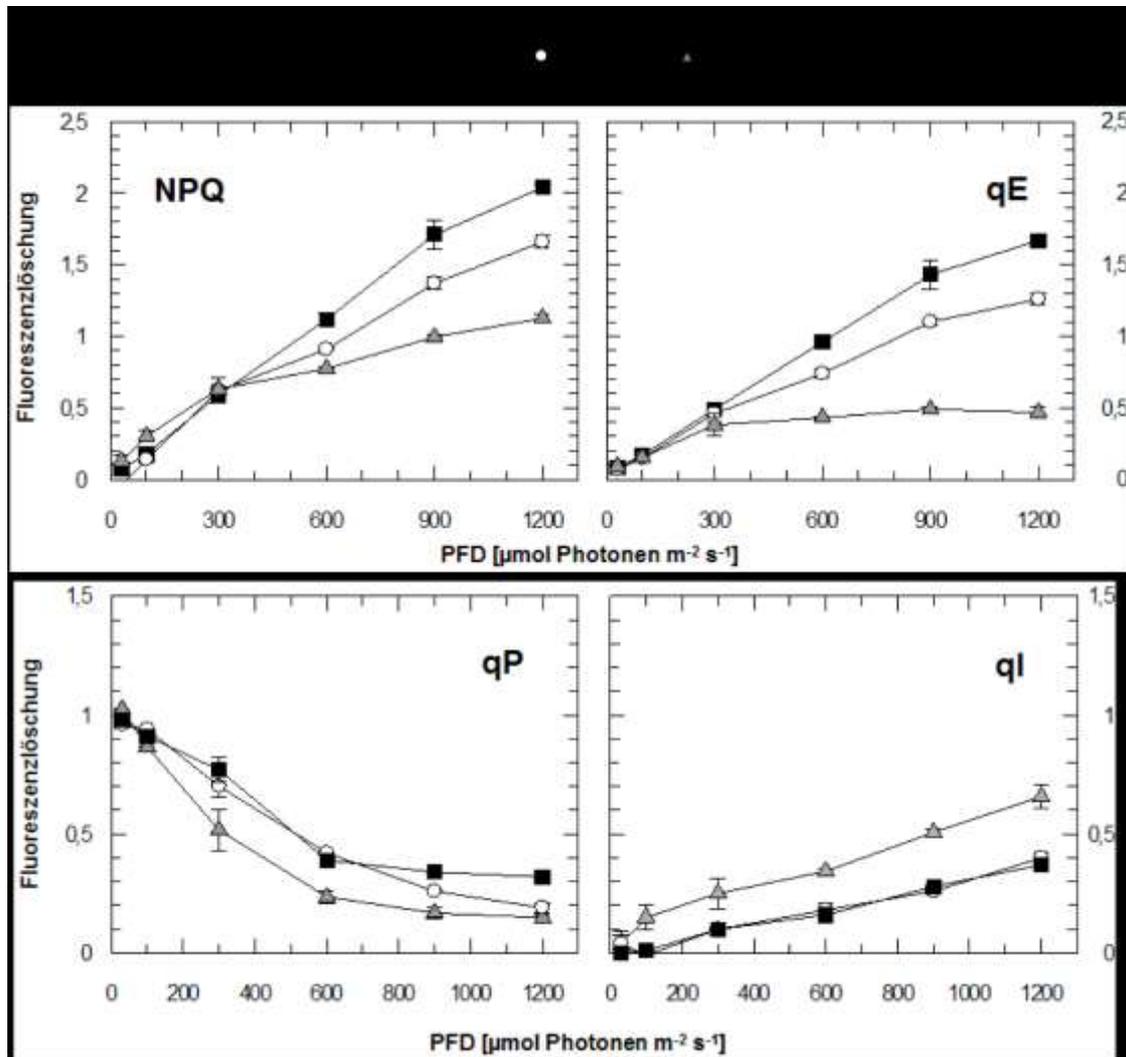


Abb. 3.13: Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Anregungslichtintensität in der Linie 19/9 im Vergleich zum WT Col-0 und *npq1*. Für die Analyse wurden Blätter sechs Wochen alter Pflanzen verwendet. Es wurde der Einfluß sechs unterschiedlicher Lichtintensitäten (30, 100, 300, 600, 900 und 1200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) untersucht. Die Belichtung erfolgte jeweils für 16 min. Das qP und NPQ wurden am Ende der aktinischen Belichtungsphase anhand der Fluoreszenzänderung durch einen saturierenden Lichtblitz bestimmt. Die beiden Hauptkomponenten des NPQ sind die ΔpH -abhängige Löschung qE und die photoinhibitorische Löschung qI. Beide Komponenten und ihre Stern-Volmer-Koeffizienten wurden von der Dunkelrelaxation des Fv nach 16 minütiger Belichtungen für die jeweiligen PFD hergeleitet. Es werden Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung \pm SD gezeigt

Der Vergleich zwischen der photochemischen Löschung qP beim WT Col-0 und jeweils der Linie 16/3 und 19/9 zeigte kaum Unterschiede (s. Abb. 3.12 u. 3.13). Allerdings war auffällig, dass bei den Lichtintensitäten 900 und 1200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die qP-Werte in beiden transgenen Linien niedriger als beim WT Col-0 waren. Bei 1200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ waren sie sogar mit den *npq1*-Daten annähernd gleich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die photosynthetische Nutzung der Lichtenergie in den untersuchten transgenen Linien bis zu einer Lichtintensität von 600 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit der wildtypischen vergleichbar war.

Bei höheren Lichtintensitäten nahm diese in beiden Linien ab. Vermutlich war die Zx-Menge unter diesen Lichtbedingungen (s. Abb. 3.10) in beiden transgenen Linien nicht ausreichend um die maximale Wärmedissipation zu induzieren.

Die Untersuchung der nicht-photochemischen Löschung (NPQ) in den Linien 16/3 und 19/9 zeigte größere Unterschiede im Vergleich zum WT Col-0 und *npq1*. In beiden Linien lagen die NPQ-Werte ca. 20 - 40 % unterhalb der wildtypischen und ca. 15 - 30 % oberhalb der *npq1*-Daten (s. Abb. 3.12 u. 3.13). Dieses Ergebnis deutet auf eine geringere Wärmedissipation im Vergleich zum WT Col-0 aufgrund der geringen Zx-Menge bei höheren Lichtintensitäten. Diese Vermutung wurde in den weiterführenden Untersuchungen der beiden Hauptkomponenten (qE und qI) des NPQ bestätigt, weil sich im Bezug auf das qE deutliche Unterschiede im Vergleich zum WT Col-0 und *npq1* zeigten. Die Abnahme der Δ pH-abhängigen thermischen Energiedissipation (qE) korrelierte mit der Reduktion des NPQ in den beiden transgenen Linien. Dabei waren die qE - Werte um 45 - 25 % geringer als im WT Col-0 und um 25 - 45 % höher als im *npq1*. Ausgehend von den qE-Werten von WT Col-0- und *npq1*-Pflanzen bedeutet dieses Ergebnis, dass in beiden transgenen Linien Zx und Ax zum qE beitragen. Allerdings kann aufgrund der geringeren Menge an gebildetem Zx (s. Abb. 3.11 Epoxidation) die Δ pH-abhängige thermische Energiedissipation nicht so ausgeprägt wie beim WT Col-0 erfolgen.

Bei längerem Einfluß von Starklichtstress wird das qE durch das qI abgelöst (Öquist *et al.*, 1992a; van Wijk und van Hasselt, 1993). Das qI ist eine langsame adaptive Reaktion des photosynthetischen Apparates auf langanhaltenden oder extremen Lichtstress. Dabei erfolgt eine langanhaltende Inaktivierung des PSII (Photoinhibition). Zx spielt bei der thermischen Energiedissipation eine wesentliche Rolle und scheint dadurch die Inaktivierung des D1-Proteins im PSII-Reaktionszentrum zu verhindern bzw. zu reduzieren (Krause und Jahns, 2004; Krause *et al.*, 1995; Thiele *et al.*, 1996, 1997).

In beiden transgenen Linien sind die qI-Werte mit den wildtypischen vergleichbar. Die transgenen Pflanzen zeigten demnach keine höhere Anfälligkeit für die Photoinhibition, als der WT Col-0. Daraus lässt sich schließen, dass das gebildete Zx für die Photoprotektion durch das qI ausreicht. In *npq1*-Pflanzen, die durch den Xanthophyllzyklus kein Zx bilden können, ist die Sensitivität um ca. 30 % gegenüber dem WT Col-0 und beiden transgenen Linien erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der geringeren Δ pH-abhängigen thermischen Energiedissipation in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 verglichen mit dem WT Col-0 der Zx(und Ax)-Gehalt in beiden transgenen Pflanzen ausreichend für einen wildtypischen Verlauf der Photoinhibition war.

3.13 Lichtabhängige Regulation der Zeaxanthin Epoxidation

In Kooperation mit Clemens Reinhold erfolgte eine Untersuchung der Auswirkungen von Starklichtstress und Temperaturstress auf die Zx-Epoxidation in WT Col-0-Pflanzen. Dabei wurde analysiert, inwieweit die Verlangsamung der Zx-Epoxidation im Schwachlicht vom Ausmaß des Lichtstresses und Temperaturstresses einer vorherigen Starklichtexposition abhängt. Für die Variation der Stressbedingungen wurden jeweils die Belichtungsdauer, die Lichtintensität und die Temperatur verändert. In Abb. 3.14 sind die normierten DEPS(De-epoxidationszustand)-Werte aus dieser publizierten Untersuchung zusammengefasst.

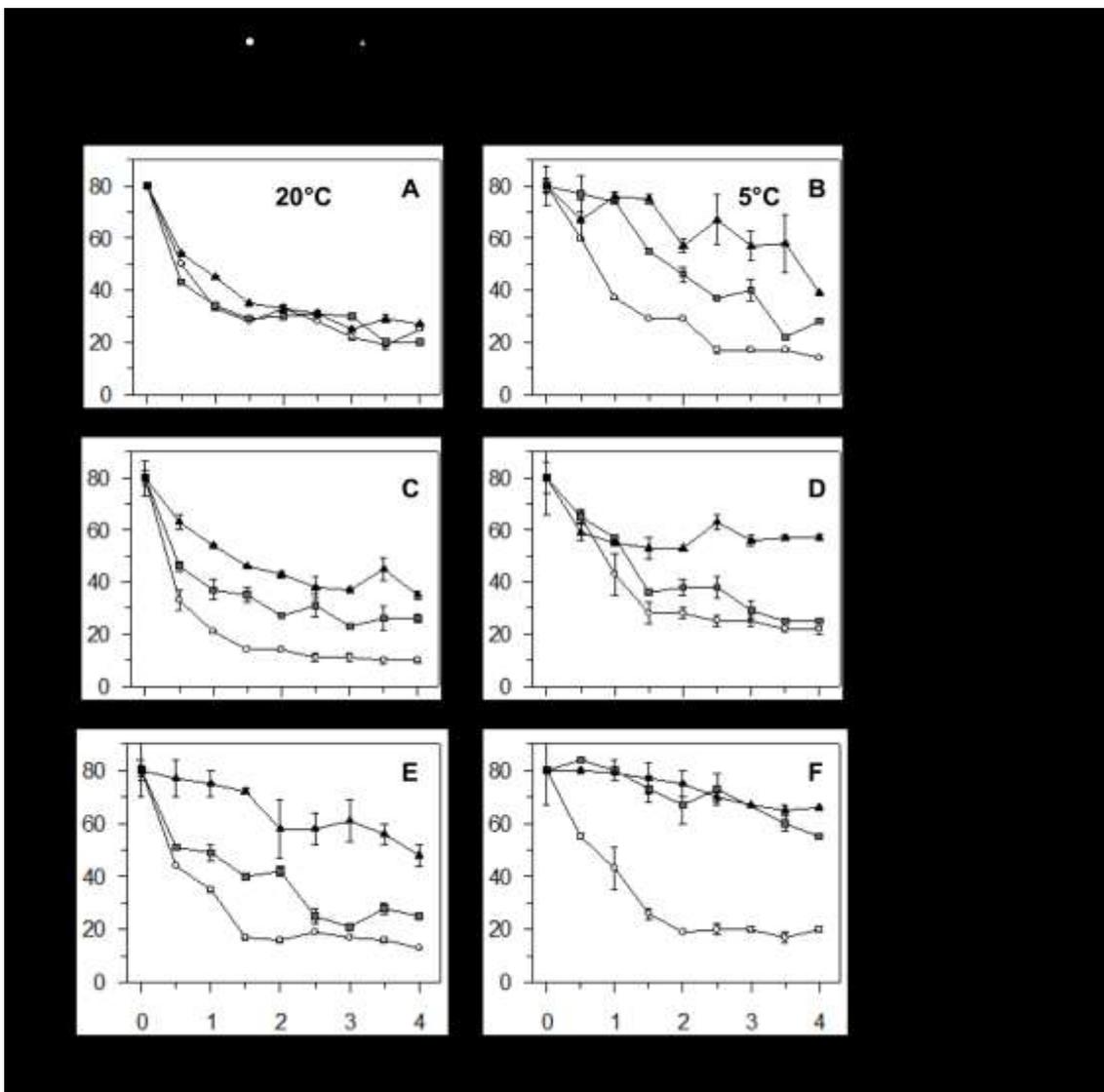


Abb. 3.14: Zeitlicher Verlauf der Zx Epoxidation im Anschluß an eine Vorbelichtung bei 20°C (A,C und E) und bei 5°C (B, D und F). Dargestellt sind die normierten De-epoxidationszustände von WT Col-0-Pflanzen während einer 240minütigen Relaxationsphase bei einer Belichtungstemperatur von 20°C bzw. 5°C. Dabei wurden die Werte des DEPS auf 80% bei t=0 normiert. Die Daten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Einzelmessungen.

A,B: Vorbelichtungsintensität der Blattscheiben (\varnothing 8 mm) betrug $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

C,D: Vorbelichtungsintensität der Blattscheiben (\varnothing 8 mm) betrug $1500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

E,F: Vorbelichtungsintensität der Blattscheiben (\varnothing 8 mm) betrug $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Epoxidation von allen drei veränderten Parametern. Mit zunehmender Belichtungszeit, zunehmender Lichtintensität und abnehmender Temperatur nahm die Verlangsamung der Zx-Umsetzung stark zu. Eine allmähliche Reduzierung der Epoxidationsrate bis zur fast vollständigen Inhibierung erfolgte mit zunehmendem Lichtstress. Auffällig ist insbesondere die sehr starke Verlangsamung der Epoxidationskinetik durch die niedrige Temperatur. Dabei wurde eine nahezu vollständige Inhibierung der Epoxidation unter niedrigen Temperaturbedingungen (5°C) schon nach zweistündiger Belichtung mit hohen Intensitäten erzielt.

Diese Daten zeigen, dass die ZE-Aktivität in Abhängigkeit von den Lichtstressbedingungen sehr schnell (innerhalb einiger Stunden) herabreguliert werden kann.

3.14 Lichtabhängige Regulation der Zx-Epoxidation in den transgenen Linien

16/3 und 19/9

Unter gleichen Bedingungen wurde die Inhibierung der Epoxidation unter Licht- und Temperaturstress in den beiden transgenen Linien 16/3 und 19/9 untersucht. Dabei sollte vor allem überprüft werden, ob mit den gleichen Epoxidations-Inhibierungsparametern wie für WT Col-0-Pflanzen eine ähnliche starke Blockierung der Epoxidationsreaktion in den transgenen Pflanzen mit AtZE-Überschuß erreicht werden kann.

In Anlehnung an die Ergebnisse aus den lichtregulatorischen Untersuchungen von WT Col-0-Pflanzen (s. Abb. 3.14) wurden für die Photoinhibition eine vierstündige Belichtung bei $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und bei zwei unterschiedlichen Temperaturbedingungen (20 °C und 4°C) während der Vorbelichtung ausgewählt. Die darauffolgende Erholung erfolgte bis zu vier Stunden unter Schwachlicht ($20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) und für beide Experimente bei einer Temperatur von 20°C, um den Einfluß der niedrigen Temperatur (4°C) auf die AtZE-Aktivität zu vermeiden. Sowohl innerhalb der Vorbelichtungsphase, wie auch in der Schwachlichtphase wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blätter entnommen und schockgefroren. Die Analyse der Pigmentextrakte erfolgte mittels HPLC und ist für beide Temperaturen (während der Vorbelichtungsphase) in Abb. 3.15 dargestellt.

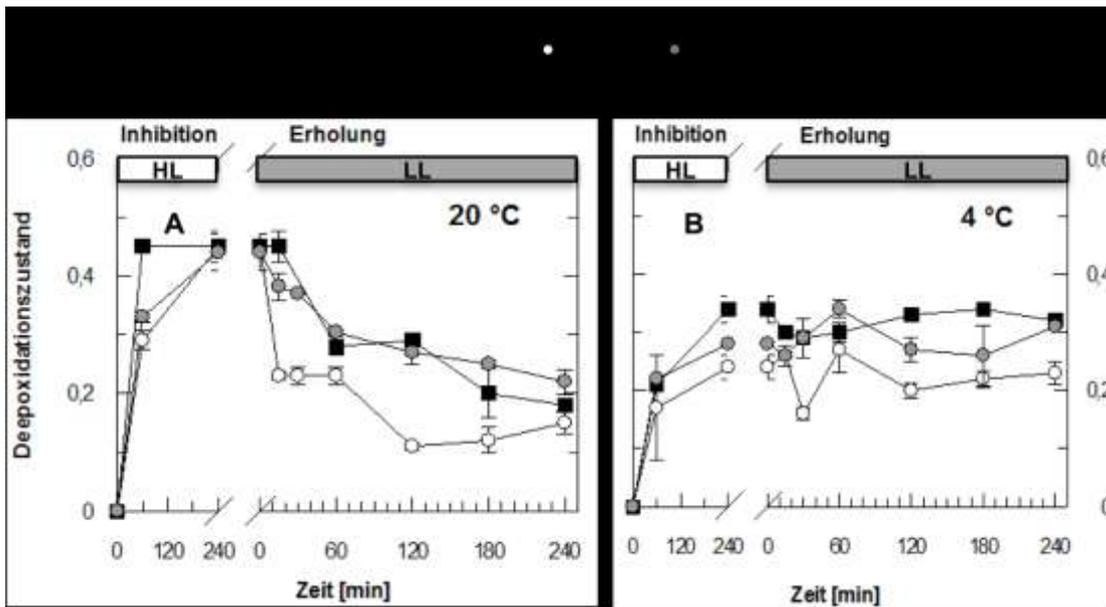


Abb. 3.15: Deepoxidationszustand (DEPS) während der Photoinhibition und Erholung bei 20°C und 4°C. Es wurden Blattscheiben (\varnothing 8mm) der Linien 16/3, 19/9 und vom WT Col-0 für jeweils 4 h mit einer PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL: Starklicht) belichtet. Anschließend wurden diese für 4 h unter Schwachlicht (LL (Schwachlicht): $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) inkubiert. Die Blattproben wurden zu bestimmten Zeitpunkten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Analyse des DEPS mittels HPLC.

A. Starklichtexposition (HL) bei 20°C; Erholung (LL) bei 20°C; **B.** Starklichtexposition (HL) bei 4°C; Erholung (LL) bei 20°C. Es werden Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung \pm SD gezeigt.

Auffällig ist, dass beide transgenen Linien nach einer Stunde Starklicht bei 20°C einen um 25 % geringeren DEPS besitzen als der WT Col-0 und erst nach vier Stunden der wildtypische DEPS erreicht wird (s. Abb. 3.15 HL 20°C). Der geringere DEPS entspricht den bereits in Kapitel 3.10 beschriebenen De-epoxidationsanalysen bei einer Belichtungsintensität von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in denen eine Beeinflussung der De-epoxidation aufgrund des AtZE-Überschusses in beiden transgenen Linien gegenüber dem WT Col-0 sichtbar wird. Dagegen scheint nach vierstündiger Starklichtexposition die AtZE-Aktivität in beiden transgenen Linien negativ beeinflusst zu sein, da hier ein wildtypischer DEPS erreicht wird (s. Abb. 3.15 HL 20°C).

Nach Vorbelichtung bei 20°C zeigte die Linie 19/9 einen ähnlichen Verlauf der Epoxidation wie der WT Col-0, während für die Linie 16/3 eine deutlich schnellere Zx-Umsetzung zu beobachten war (s. Abb. 3.15 A). Ursache dafür könnte möglicherweise ein höherer AtZE-Gehalt in der Linie 16/3 sein (s. Abb. 3.5 B). Nach vierstündiger Belichtung bei 4°C wurde in allen Genotypen ein niedrigerer DEPS detektiert als bei 20°C (s. Abb. 3.15 B), wobei in den beiden transgenen Linien ein etwas niedrigerer DEPS im Vergleich mit dem WT Col-0 vorlag. Allerdings zeigten beide transgenen Linien wie der WT Col-0, eine drastische Verlangsamung der Epoxidation in der anschließenden Schwachlichtphase. Demnach erfolgte die AtZE-Inaktivierung in beiden transgenen Linien bei 4°C wie im WT Col-0. Die schnellere Epoxidation der Linie 16/3 nach einer Starklichtexposition bei 20°C war somit

nach einer Starklichtexposition bei niedrigeren Temperaturbedingungen (4°C) nicht mehr zu beobachten.

Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass analog zu den Epoxidationsanalysen in WT Col-0-Pflanzen die AtZE-Inhibierung auch bei erhöhten AtZE-Gehalten durch extremen photooxidativen Stress induziert werden kann.

3.15 Photoinhibition und Erholung der transgenen Linien 16/3 und 19/9

Parallel zur Analyse des DEPS der transgenen Pflanzen unter extremen Stressbedingungen wurde in einem separaten Experiment auch das F_v/F_M -Verhältnis und damit das Ausmaß der Inhibition und Erholung der PSII-Aktivität zu bestimmten Zeitpunkten in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 bestimmt (s. Abb. 3.16). Dabei wurden die Blattscheiben unter den gleichen Bedingungen wie bereits in Kapitel 3.14 beschrieben, inkubiert. Als Kontrollpflanzen dienten WT Col-0, sowie die *npq1*-Mutante.

Beide Experimente (bei 20°C und 4°C) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Photoinhibition und der Erholung beider Überexpressionslinien im Vergleich zum WT Col-0 (s. Abb. 3.16).

Nach vierstündiger Vorbelichtung mit 2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ bei 20°C reduzierte sich die PSII-Aktivität in beiden Mutanten und im WT Col-0 um ca. 50 % und erreichte nach vierstündiger Erholung nahezu ihren Ausgangswert.

Auffällig ist hierbei, dass in beiden transgenen Linien, trotz eines geringeren DEPS im Vergleich zum WT Col-0 nach 60minütiger der Starklichtexposition (s. Abb. 3.15 HL 20°C), der Verlauf der Reduzierung der PSII-Aktivität in dieser Zeitspanne wildtypisch war (s. Abb. 3.16 HL 20°C). Selbst die PSII-Erholungsphase der Linie 16/3 verlief wildtypisch (s. Abb. 3.16 LL 20°C), obwohl eine schnellere Epoxidation in dieser transgenen Linie nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.15 LL 20°C). Eine mögliche Erklärung könnte eine für die *qi* vermittelte Photoprotektion ausreichende Menge an gebildetem Zx und Ax in beiden transgenen Linien sein.

Dagegen reduzierte sich in der Zx-Mangelmutante *npq1* die PSII-Aktivität zum Ende der Photoinhibitionsphase um nahezu 75 %. Zum Ende der Erholungsphase hatten sich in der *npq1*-Mutante nur ca. 50 % der inhibierten PSII-Zentren regeneriert. Dabei ist die stärkere Inhibierung der PSII-Aktivität in *npq1* im fehlenden Zx begründet und bestätigt die Daten aus früheren Arbeiten (Havaux und Nyiogi, 1999).

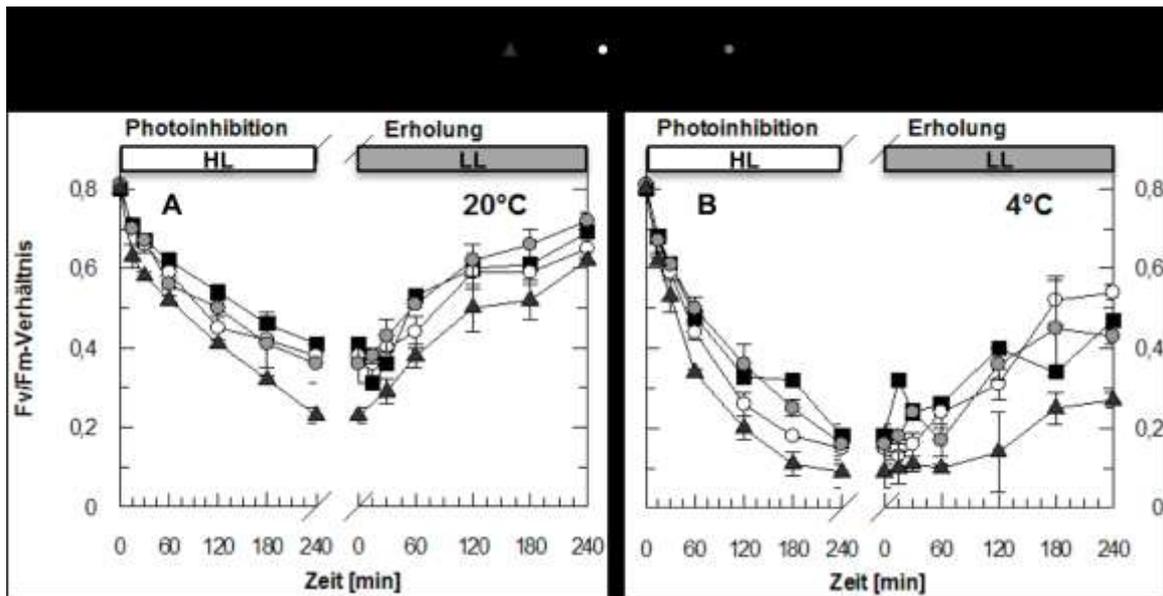


Abb. 3.16: Zeitlicher Verlauf der Photoinhibition und Erholung bei 20°C und 4°C. Es wurden Blattscheiben (\varnothing 8mm) der Linien 16/3, 19/9 und vom WT Col-0 für jeweils 4 h mit einer PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (HL: Starklicht) belichtet. Anschließend wurden diese für 4 h unter Schwachlicht (LL (Schwachlicht): $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) inkubiert. Der F_v/F_M -Quotient wurde zu bestimmten Messzeiten nach einer fünfminütigen Dunkeladaptation der Blattscheiben bestimmt, um eine Relaxation des qE zu ermöglichen.

A. Starklichtexposition (HL) bei 20°C; Erholung (LL) bei 20°C; **B.** Starklichtexposition (HL) bei 4°C; Erholung (LL) bei 20°C. Es werden Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung \pm SD gezeigt.

Nach Vorbelichtung bei 4°C erfolgte eine drastisch verstärkte Photoinhibition in allen drei Genotypen um nahezu 80 %. Trotz des geringeren DEPS beider transgenen Linien im Vergleich zum WT Col-0 (s. Abb. 3.15 B, HL), zeigte sich ein wildtypischer Verlauf der Reduzierung der PSII-Aktivität (s. Abb. 3.16 B, HL). Ebenso zeigte sich auch in der Erholungsphase ein ähnlicher Verlauf für den WT Col-0 und die beiden transgenen Linien 16/3 und 19/9 (s. Abb. 3.16 B, LL).

Entsprechend extremer war der Effekt der Photoinhibition auf die PSII-Aktivität in der *npq1*-Mutante. Es wurden nahezu 90 % der PSII-Zentren nach vierstündiger Belichtung inaktiviert und die Erholung war signifikant geringer als in den anderen Genotypen.

Daraus lässt sich schließen, dass beide Mutanten teilweise trotz eines geringeren DEPS keine erhöhte Sensitivität in Bezug auf die Photoinhibition und Erholung der PSII-Zentren haben, als der WT Col-0. Im Vergleich zur Zx-Mangelmutante *npq1* scheint die geringere Menge an gebildetem Zx und Ax ausreichend für einen wildtypischen Verlauf der Photoinhibition und Erholung.

3.16 Lichtinduzierte Regulierung des AtZE-Gehaltes

Im folgenden wurde geprüft, inwieweit die lichtabhängige Regulation der AtZE-Aktivität auf Veränderungen im AtZE-Gehalt zurückzuführen sein könnte.

Zunächst erfolgte der Nachweis einer möglichen Lichtregulation der AtZE1 und AtZE2 auf Proteinebene mittels Immunoblotanalyse. Dafür wurden Blätter von *Arabidopsis thaliana* Col-0 mit einer Intensität von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ belichtet. Die Proben wurden nach bestimmten Belichtungszeiten (s. Abb. 3.17) entnommen und die AtZE-Proteinlevel analysiert.

Die AtZE1 ist schon in der unbelichteten Probe vorhanden und wird nach 15 Minuten geringfügig hochreguliert. In den länger belichteten Proben konnte keine Steigerung des AtZE1-Levels mehr detektiert werden. Damit konnte eine reine lichtinduzierte Regulierung des AtZE1-Gehaltes ausgeschlossen werden.



Abb. 3.17: Immunoblot-Analyse der lichtinduzierten Veränderung des AtZE-Proteinlevels in *Arabidopsis thaliana* Col-0. Es wurden Blätter von WT Col-0 mit einer Lichtintensität von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Jeweils $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Nachweis beider Proteinvarianten wurde der Antikörper Anti-ZE2 (1:1000) verwendet.

Im Gegensatz zur AtZE1 konnte eine deutliche Hochregulierung der AtZE2 nach 15 min Belichtung nachgewiesen werden (s. Abb. 3.17). Damit steigt die Konzentration der AtZE2 während der Belichtungsphase an (s. Abb. 3.10). Das Erreichen des *steady-state* der Depoxidation korreliert mit der ersten deutlichen Detektion der AtZE2 und nach einer 45minütigen Belichtung konnte eine zur AtZE1-Konzentration vergleichbare AtZE2-Menge detektiert werden. Allerdings verläuft die AtZE2-Bildung im Hinblick auf das Erreichen des Zx-Sättigungsgrads verzögert. Unter der gegebenen Belichtungsintensität erreichte im WT Col-0 die Zx-Bildung nach 30 min ihre Sättigung, während die AtZE2-Konzentration erst nach 45 min ihr Maximum erreichte (s. Abb. 3.17 im Vergleich zum 60minütigen Proteinlevel).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Zx-Bildung unter Starklichteinfluß für die Photoprotektion von wesentlicher Bedeutung ist, könnte die AtZE2 eine negativ regulatorische Funktion im Bezug auf die AtZE1 besitzen und damit die Epoxidation inhibieren. In Bezug auf die Immunoblotanalyse der Überexpressionslinie 16 (s. Abb. 3.9

Pflanze 1) müssten dabei allerdings noch andere regulatorische Faktoren eine Rolle spielen, weil die Epoxidation in dieser Linie aufgrund der Überexpression beider Isoformen stark inhibiert sein müsste, was aber nicht zu beobachten war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AtZE2-Konzentration bei Starklichtexposition positiv reguliert wird. Im Gegensatz dazu hat das Starklicht nur geringfügige Auswirkungen auf die AtZE1-Menge.

3.17 *AtZEP*-Expressionsanalyse unter Starklichteinfluß

Im Anschluß an den Nachweis der lichtinduzierten Erhöhung beider AtZE-Proteinmengen wurde eine mögliche lichtinduzierte Genregulation auf Transkriptebene untersucht. Dafür wurde zunächst eine semiquantitative RT-PCR für beide Spleißvarianten durchgeführt und anschließend die sensitivere quantitative Real Time-PCR für die erste Spleißvariante. Anhand der Daten aus der Analyse der lichtinduzierten AtZE-Bildung (s. Abb. 3.17) wurden dafür zwei Belichtungszeiten ausgewählt. Da im vorherigen Experiment nach 15 min Belichtung ein erhöhter Proteingehalt beider Varianten detektiert worden war, wurden die Blätter zum einen für 15 min vorbelichtet. Zum anderen wurde die maximale Belichtungszeit des Vorexperiments von 60 min verwendet, um einen Eindruck über eine mögliche Änderung des *AtZEP*-mRNA-Levels bei maximal erreichtem Proteingehalt zu erhalten (s. Kapitel 3.17). Die Verifizierung der *AtZEP*-Transkriptmengenänderung wurde anhand des grundlegenden *AtZEP*-Transkriptlevels in unbelichteten WT Col-0-Blätter vorgenommen. Für die quantitative Real time-RT-PCR wurden die Daten aus den drei unterschiedlich behandelten Proben auf die Transkriptdaten des Kontrollgens Actin normalisiert. Actin wurde als konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen ausgewählt, weil es keine lichtinduzierte Änderung der Genexpression zeigt.

Aus den drei Proben wurde gesamt-RNA isoliert und mittels reverser Transkription mit Oligo-dT-Primern wurde cDNA synthetisiert. Eine mögliche Kontamination der cDNA- Proben mit genomischer DNA wurde durch eine PCR mittels Intron-übergreifender Primer für das Gen *ACTIN 7* (AT5g09810) überprüft (s. Abb. 3.9.1). Es ergab sich für das cDNA- Fragment eine Sequenzlänge von 734 Bp und für das genomische Fragment eine Sequenzlänge von 918 Bp. Wie aus Abb. 3.18.1 ersichtlich, konnte damit in allen drei Proben eine Kontamination ausgeschlossen werden.

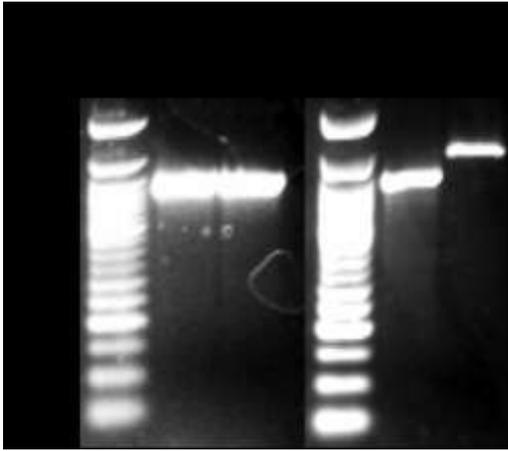


Abb. 3.18.1: Überprüfung einer möglichen Kontamination der cDNA-Proben mit genomischer DNA. Der Nachweis erfolgte mittels PCR mit einem Intron-übergreifenden Primerpaar (s. Kapitel 2.1.6) für *ACTIN 7* (AT5g09810). Für die folgende Analyse der DNA-Fragmente wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Die cDNA-Sequenzlänge beträgt 734 Bp und die genomische 981 Bp.

DP: cDNA-Dunkelprobe (WT Col-0); **15 min:** cDNA aus 15minütig belichteten WT Col-0 -Blättern; **60 min:** cDNA aus 60minütig belichteten WT Col-0-Blättern; **+K:** genomische DNA (WT Col-0).

In Abb. 3.18.2 sind die Daten aus der semiquantitativen Real Time-PCR zusammengefasst. Dabei wurden dem PCR-Reaktionsgemisch jeweils nach 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen 10 µl entnommen und die amplifizierten cDNA-Fragmente in einem 2%igem Agarosegel analysiert. Die ersten sehr schwach detektierbaren Banden wurden für beide Spleißvarianten schon im 25. Zyklus nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnten in diesem Zyklus aufgrund des schwachen Signals keine Unterschiede in der cDNA-Bandenstärke detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die Daten in Abb. 3.18.2 erst ab dem 30. PCR-Zyklus präsentiert.

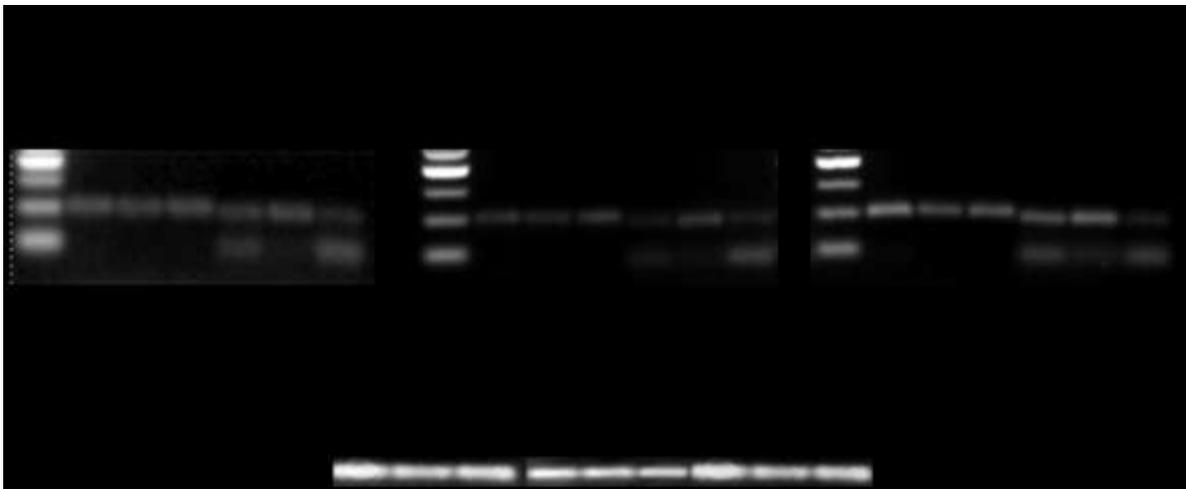


Abb. 3.18.2: Expressionsanalyse der *AtZEP1* und *AtZEP2* mittels semiquantitativer Real Time PCR. Es wurden jeweils 10µl PCR-Ansatz nach dem 30., 35. und 40. Zyklus mittels 2 %igem Agarosegel analysiert. Die PCR-Fragmentgröße betrug für die erste Spleißvariante (*AtZEP1*) 102 Bp und für die zweite Spleißvariante (*AtZEP2*) 93 Bp. **DP:** cDNA-Dunkelprobe (WT Col-0); **15 min:** cDNA aus 15minütig belichteten WT Col-0-Blättern; **60 min:** cDNA aus 60minütig belichteten WT Col-0 -Blättern

Die cDNA-Banden der Spleißvariante 1 (s. Abb. 3.18.2; *AtZEP1*) sehen in allen drei Proben für den 30. Und 35. Zyklus ähnlich aus und erst im 40. Zyklus wird deutlich, dass die Transkriptmenge in der unbelichteten Probe gegenüber den 15 und 60minütig belichteten

Proben etwas erhöht ist. Verglichen mit den AtZE1-Daten aus der Immunoblotanalyse (Abb. 3.17) scheint sowohl ein *AtZEP1 steady state*-Transkriptlevel, als auch ein konstantes Proteinlevel zu existieren. Bei starkem Lichtstress ($2000\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) scheint es einen Mehrbedarf an AtZE1 zu geben, der sich nach 15minütiger Belichtung in einer Erhöhung der AtZE1-Proteinmenge und der Abnahme der *AtZEP1*-Transkriptmenge zeigt. Dabei wird deutlich, dass die AtZE1-Aktivität nur bedingt über die Genexpression reguliert wird und eher andere Faktoren für die AtZE1-Aktivierung wichtig sind.

Dagegen zeigte sich für die zweite Spleißvariante eine Hochregulierung der Genexpression innerhalb der ersten 15 min, während die Transkriptmenge nach 60minütiger Belichtung stark abnahm (s. Abb. 3.18.2; *AtZEP2*). Dieses Ergebnis ist konform mit den Daten der AtZE2-Immunoblotanalyse (s. Abb. 3.17), da die Erhöhung der AtZE2 nach 15minütiger Belichtung nur ganz schwach detektierbar ist und erst nach 45minütiger und 60minütiger Belichtung ein hohes AtZE2-Level nachweisbar wird. Die Abnahme der *AtZEP2*-Transkriptmenge nach 60 min korreliert also mit der Zunahme der AtZE2-Proteinmenge. Neben der *AtZEP2*-cDNA-Bande in der richtigen Größe konnte eine weitere DNA-Bande (< 50 Bp) detektiert werden, die möglicherweise auf eine Primer-Dimerisierung zurückzuführen ist.

Die Transkriptmengen des Kontrollgens blieben in den drei untersuchten Zyklen für alle drei Proben konstant. Um die Daten aus der semiquantitativen PCR zu verifizieren wurde für die erste Spleißvariante eine quantitative Real time-PCR durchgeführt (s. Abb.3.18.3). Für die zweite Spleißvariante konnte diese aufgrund des parallel amplifizierten Nebenprodukts. Außerdem konnte aufgrund der begrenzten Auswahl möglicher Primerpaare für beide Spleißvarianten keine günstigere Alternative für die zweite Spleißvariante gefunden werden.

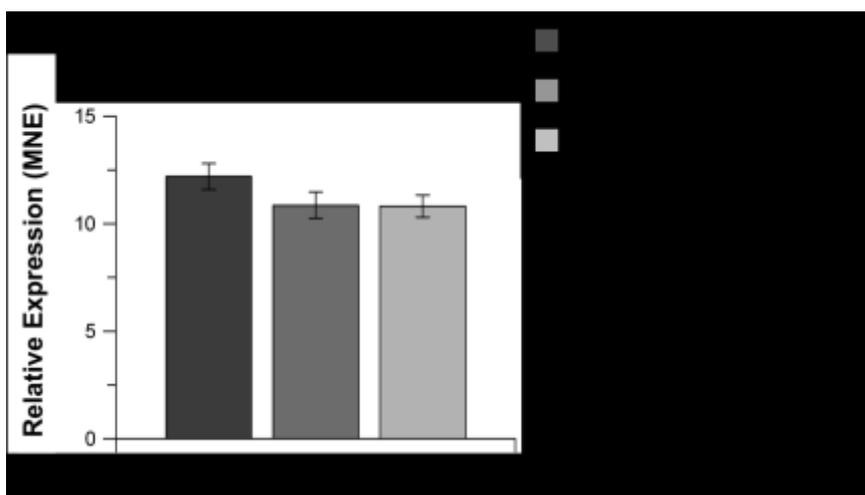


Abb. 3.18.3: Expressionsanalyse der *AtZEP1* mittels quantitativer Real Time

Die Transkriptlevel wurden auf die Expression des Haushaltgens Aktin normalisiert. Die Daten zeigen durchschnittliche Werte aus jeweils drei unabhängigen Dreifachbestimmungen. Fehlerbalken zeigen die durchschnittliche \pm SF aus diesen Bestimmungen. (MNE=*Mean normalized expression*)

Legende: cDNA aus unbelichtetem WT Col-0; **15 min:** cDNA aus 15minütiger Belichtung bei $2000\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ belichtetem WT Col-0; **60 min:** cDNA aus 60minütiger Belichtung bei $2000\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ belichtetem WT Col-0.

Das Ergebnis der quantitativen Real Time-RT-PCR für die *AtZEP1* unterscheidet sich nicht von den bereits oben beschriebenen *AtZEP1*-Ergebnissen aus der semiquantitativen Real

Time- PCR. Dabei zeigte sich in Abb. 3.18.3 nach 15minütiger Belichtung eine Abnahme der *AtZEP1*-Transkriptmenge, die mit der Zunahme der AtZE1-Proteinmenge (s. Abb. 3.17) im gleichen Zeitraum übereinstimmt.

4 Diskussion

Über die biochemischen Eigenschaften und die Regulation der ZE in höheren Pflanzen ist nur wenig bekannt (Xu *et al.*, 1999; Rokka *et al.*, 2000; Adams *et al.*, 2002; Ebbert *et al.*, 2005). Hager *et al.* (1967) beschrieb die ZE unter physiologischen Bedingungen als konstitutiv aktiv, im Vergleich zur VDE allerdings mit niedrigen Umsatzraten.

Unter extremen Stressbedingungen, wie beispielsweise bei immergrünen Pflanzen während des Winters, wurde die Epoxidation vollständig inhibiert (Adams *et al.*, 2002). Jedoch ist die molekulare Ursache dieser Inhibierung unklar. Erste Hinweise einer möglichen Beteiligung von Phosphorylierungsreaktionen an der Regulation wurden in Reis gefunden (Xu *et al.*, 1999). Dabei konnte eine direkte Inaktivierung der ZE-Aktivität durch Phosphatase-Inhibitoren nachgewiesen werden. Auch eine Korrelation der ZE- Inaktivierung mit der Phosphorylierung des D1-Proteins im Reaktionszentrum des Photosystems II (PSII) und mit der Hochregulierung des im Thylakoidlumen lokalisierten Phosphatase-Inhibitors TLP40 wurde gezeigt (Rokka *et al.*, 2000; Ebbert *et al.*, 2005).

In Kieselalgen gibt es Hinweise auf eine Inhibierung der zur ZE orthologen Dtx-Epoxidase im Starklicht (Mewes und Richter, 2002). Dabei scheint die Dtx-Epoxidase bei extremem ΔpH gehemmt zu werden (Jakob *et al.*, 2001).

Um genauere Hinweise auf die Regulation der Epoxidation durch die ZE in höheren Pflanzen zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die ZE in verschiedenen Organismen überexprimiert.

4.1 *In vitro*-Epoxidationsstudien heterolog überexprimierter NpZE

Bisher ist es nur Bouvier *et al.* (1996) gelungen die ZE (β -Cyclohexenyl-Epoxidase) aus Paprika (*Capsicum annuum*) nach heterologer Überexpression in *E. coli* in ihrer aktiven Form anhand eines His-Proteinanhangs aufzureinigen. Im Gegensatz dazu konnte die NpZE (ABA2) aus *Nicotiana plumbiginifolia* nach heterologer Expression in *E. coli* zwar in nativer Form aufgereinigt werden (s. Kapitel 3.1; Abb. 3.1), zeigte allerdings in der *in vitro*-Epoxidation nach Bouvier *et al.* (1996) keine Zx-Umsetzung zu Ax und Vx. Auch nach Komplementierung der aufgereinigten NpZE mit Thylakoiden der Zx-akkumulierenden *npq2*-Mutante konnte keine Zx-Epoxidation nachgewiesen werden.

Die Aufreinigung der NpZE erfolgte in der vorliegenden Arbeit zum einen über einen C-terminalen His-Anhang (s. Kapitel 3.1 pET21a). Dabei wurde die NpZE in *E. coli* (BL21 (DE3)) unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T₇-Promotor exprimiert. Zum anderen erfolgte

die NpZE-Aufreinigung über einen N-terminalen His-Anhang (s. Kapitel 3.1 pQE30) und wurde unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren T₅-Promotors exprimiert.

Nach einer Überexpression der NpZE mit C-terminalem Histidin-Anhang unter Kontrolle des sehr starken T₇-Promotors (Mitraki und King, 1989; Berne, et. al., 1999; Stevens, 2000) aggregierte die NpZE nur in Form von Einschlusskörpern. Da die Bildung dieser Proteinaggregate unter anderem ungünstig für die Proteinaufreinigung ist, wurde zunächst die Induktorkonzentration (IPTG), Inkubationszeit und Anzuchtstemperatur für die NpZE-Expression angepasst um einerseits die Bildung von Einschlusskörpern zu reduzieren und andererseits die Bildung des in nativer Faltung vorliegenden NpZE-Proteins zu fördern. Trotzdem wurden nur NpZE-Proteinaggregate gebildet, so dass nur die Möglichkeit der Auflösung dieser Einschlusskörper mittels Detergenzien blieb. Anschließend lag die NpZE denaturiert vor, so dass die geeigneten Bedingungen für eine korrekte NpZE-Rückfaltung gefunden werden mussten um das aktive Protein zu erhalten. Dabei sollte eine Aggregation der Proteine verhindert und gleichzeitig intramolekulare Wechselwirkungen zugelassen werden, weil die richtige Faltung in ständiger Konkurrenz zu Aggregation bzw. Fehlfaltungen stehen (Rudolph und Lilie, 1996; Tsumoto *et al.*, 2003). Allerdings konnte nach der Renaturierung keine Enzymaktivität im *in vitro*-Ansatz (Bouvier *et al.*, 1996) nachgewiesen werden. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Renaturierungsansätze nicht zur aktiven Form der NpZE führten.

Im Hinblick auf die Aufreinigung mittels N-terminalem His-Anhang (s. Kapitel 3.1 Abb.3.1) zeigte sich, dass die NpZE sehr instabil im Hinblick auf proteolytischen Abbau war. Die Instabilität eines Proteins kann in der N-Endregel begründet sein. In *E. coli* reduzieren die Aminosäuren Arg, Lys, Leu, Phe, Tyr und Trp N-terminal verstärkt die Halbwertszeit eines Proteins (Tobias *et al.*, 1991). In der N-terminalen NpZE-Aminosäuresequenz ([NP_201504](#)) sind einige Arginin- und Leucin-Moleküle (3 Arg und 2 Leu) vorhanden. Mit C-terminalem His-Anhang war das NpZE-Protein aufgrund der Bildung von Einschlusskörpern vor proteolytischem Abbau geschützt (Stevens, 2000), insbesondere in BL21(DE3)-Zellen aufgrund der *OmpT-knock-out* Mutation zu, da diese Protease die Fähigkeit besitzt, Proteine aus Einschlusskörpern auch unter stark denaturierenden Bedingungen abzubauen (White *et al.*, 1995). Dagegen unterlag die NpZE mit N-terminalem His-Anhang einer schnellen Degradation aufgrund der nativen NpZE-Bildung unter den gegebenen Expressionsbedingungen. Um diesem NpZE-Abbau entgegenzuwirken wurde zum einen die Temperatur nach IPTG-Induktion auf 20°C gesenkt. Dadurch wurde die Aktivität der Proteasen eingeschränkt und der proteolytische Abbau verlangsamt. Zum anderen wurde das Nährmedium (LB-Medium) für *E. coli* modifiziert. Dafür wurde das Medium mit den Protein-stabilisierenden Substanzen Sorbitol und Betain versetzt (Barth *et al.*, 2000). Sorbitol und das Ectoin Betain, können Proteine gegen Denaturierung und Proteasen stabilisieren (Rehm

et al. 2006). Außerdem wurde für die Proteinaufreinigung ein Protease-Inhibitor-Cocktail (Promega) verwendet. Dieser enthielt aufgrund der Aufreinigung mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie keine Metalloprotease-Inhibitoren. Bei diesen Substanzen (z.B. EDTA) handelt es sich um Chelatoren divalenter Kationen. Dadurch würde die Bindung des His-Fusionsproteins an die Säule verhindert werden. Trotz aller Modifikationen konnte noch immer ein geringfügiger Abbau der NpZE im silbergefärbten SDS-Gel und in der Western Blot-Analyse (s. Kapitel 3.1 Abb. 3.1) nachgewiesen werden. Das Fehlen von Metalloprotease-Inhibitoren im Protease-Inhibitor-Gemisch könnte auf einen NpZE-Abbau durch Metalloproteasen hinweisen. Zwar konnte hier die native NpZE aufgereinigt werden, allerdings zeigte das Protein keine *in vitro*-Aktivität.

Anscheinend fehlen im prokaryotischen System wichtige Hilfsfaktoren für die Aktivität der NpZE, obwohl in einem Vergleich der Aminosäuresequenz mit der orthologen Paprika-Epoxidase mit 88 % eine hohe Sequenzähnlichkeit nachgewiesen wurde (Marin *et al.*, 1996). Auch enthalten beide Sequenzen mit dem FAD-Bindungsmotif und dem Monooxygenase-Motif zwei essentielle Bestandteile für die ZE-Aktivität (Cunningham and Gantt, 1998). Eine generelle Inaktivität der überexprimierten NpZE wurde aufgrund der nachgewiesenen *in vivo*-Aktivität in homologen Expressionsstudien ausgeschlossen (Audran *et al.*, 1998)

Eine andere Möglichkeit für die Inaktivität des NpZE-Proteins könnte die Aufreinigung der NpZE über den His-Proteinanhang mittels Ni^{2+} -NTA-Säule sein. Hager *et al.* (1966) vermuteten, dass die ZE Kupfer enthalten müsse, da sie durch den Kupferchelator Salicylaldoxim gehemmt werden kann. In diesem Fall ist die Aufreinigung der NpZE mit His-Anhang anhand einer Metallaffinitätschromatographie nicht empfehlenswert, da das Metall durch die Matrix (z.B. NTA) absorbiert werden kann (Terpe K., 2003). Diese Möglichkeit kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, weil die ZE aus Paprika in aktiver Form mittels Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte (Bouvier *et al.*, 1996).

Um das Fehlen wichtiger Hilfsfaktoren ausschließen zu können wurde daher die ZE aus *Arabidopsis thaliana* homolog überexprimiert. Außerdem wurden andere Proteinanhänge (HA, StrepIII und IgG-BD) für die Detektion und Aufreinigung gewählt.

4.2 Homologe *AtZEP*-Überexpression in *Arabidopsis thaliana*

Für die homologe Überexpression in *Arabidopsis* wurde der genomische Abschnitt zwischen ATG und Stopcodon der *ZEAXANTHIN EPOXIDASE* (*AtZEP*) verwendet, um beide Spleißvarianten (*AtZEP1* und *AtZEP2*) zu exprimieren und mögliche positive Effekte der Introns auf den RNA-Metabolismus zu nutzen. Dabei kann die Entfernung der Introns mittels Spleißosom nahezu jeden Schritt des mRNA-Metabolismus verstärken (Le Hir *et al.*, 2003).

Mit den Überexpressionskonstrukten wurden sowohl *npq2*-, als auch WT Col-0-Pflanzen transformiert (s. Kapitel 3.4 Tab. 2 *npq2* und WT Col-0).

Um zum einen *AtZEP*-Überexpressionsmutanten mit Einzelinsertionen zu erhalten, da bei Mehrfachinsertion eine erhöhte Gefahr der Transgen-Inaktivierung besteht und zum anderen untereinander vergleichbare *AtZEP*-Überexpressionsmutanten (Linie 16/3 und Linie 19/9) für die Analysen zu erhalten wurden die transgenen Pflanzen zunächst auf mögliche Unterschiede in der Kopienanzahl des Transgens überprüft, die zu Unterschieden in der *AtZEP*-Expression führen können (Benfey *et al.*, 1989). Anhand einer BASTA-Segregationsanalyse wurden mittels des Spaltungsverhältnisses ($BASTA^{sensitive} : BASTA^{resistant}$) erste Unterschiede in der Kopienanzahl des Transgen ermittelt. Für die weiteren Untersuchungen wurden T_2 -Pflanzen mit einem Spaltungsverhältnis von nahezu 1:3 ($BASTA^{sensitive} : BASTA^{resistant}$) ausgewählt (s. Tab. 1 Linien 48, 16/3 und 19/9). Bei diesem Spaltungsverhältnis könnte es sich um eine einfache T-DNA-Insertion oder eine Mehrfachinsertion mit starker Kopplung handeln. Zusätzlich konnten durch den χ^2 -Test in diesen Linien keine signifikanten Abweichungen der Segregationsraten nachgewiesen werden. Trotzdem können gekoppelte Mehrfach-Insertionen mit dem χ^2 -Test nicht ausgeschlossen werden, weil sie ein ähnliches Segregationsverhältnis haben können. Infolge des Vergleichs mit der Southern Blot-Hybridisierung der transgenen Linien 48, 16/3 und 19/9 zeigte sich in den transgenen Linien 48 und 19/9 jeweils eine zweifache Insertion der T-DNA (s. Abb. 3.4 (3) und (5)). Dagegen wurden für die Linie 16/3 drei T-DNA Insertionen nachgewiesen (s. Abb. 3.4 (4)). Demnach scheint es sich aufgrund des Segregationsverhältnisses dieser transgenen Linien von ca. 1:3 ($BASTA^{sensitive} : BASTA^{resistant}$) um stark gekoppelte T-DNA-Insertionen zu handeln.

Um in der T_3 -Generation homozygote Pflanzen nachweisen zu können wurde durch eine weitere BASTA-Selektion homozygote Linien etabliert. Damit wurden Unterschiede in der konstitutiven Expression aufgrund der Anzahl der Allele (Benfey *et al.*, 1989) ausgeschlossen.

Ein negativer „Positionseffekt“ auf die Transgenexpression infolge nahegelegener cis-regulatorischer Elemente durch verschiedene T-DNA Integrationsstellen in das Chromosom (Odell *et al.*, 1985; Sanders *et al.*, 1987) konnte anhand einer Immunoblotanalyse der transgenen Linien 48, 16/3 und 19/9 im Vergleich zum WT Col-0 nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5 B). Dabei konnte in drei analysierten transgenen Linien eine weitaus höhere *AtZE*-Menge detektiert werden als im WT Col-0. Zusätzlich konnten kaum Unterschiede in der *AtZE*-Menge zwischen den drei transgenen Linien detektiert werden (s. Abb. 3.5). Zudem ähnelten sich auch die mittels HPLC analysierten Pigmentphänotypen der transgenen Linien (s. Tab. 2).

In Analysen der De-epoxidation und Epoxidation in verschiedenen *AtZEP*-überexprimierenden T₂-Pflanzen mit *npq2*-Hintergrund zeigte sich eine stark verlangsamte Epoxidationsrate in *npq2*-Pflanzen mit dem pAUL3/*AtZEP*-Plasmid im Vergleich zum WT Col-0 (s. Kapitel 3.4, Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich erfolgte in diesen transgenen Pflanzen eine Beeinflussung der AtZE-Aktivität aufgrund sterischer Hinderung der AtZE-Faltung durch den großen Proteinanhang (ca. 20 kDa; Proteinanhänge: 3 x HA; StrepIII und IgG-BD), da mit dem pAUL2/*AtZEP*-Plasmid transformierte Pflanzen eine schnellere Zx-Epoxidation im Vergleich zum WT Col-0 zeigten. Dabei war der Proteinanhang in diesen transgenen Pflanzen mit ca. 6 kDa wesentlich kleiner. Obgleich mit pAUL3/*AtZEP*-Pflanzen keine weiteren *in vivo*-Analyse durchgeführt wurden, können diese transgenen Pflanzen alternativ für die AtZE-Aufreinigung anhand des IgG-Bindedomäne-Anhangs verwendet werden, weil der Proteinanhang mittels Protease C-Verdau abgespalten werden kann.

Die De-epoxidationsanalyse der transgenen Linie 48 (pAUL1/*AtZEP*-Plasmid) in der T₂-Generation (s. Kapitel 3.4 Tab. 2 Linie 48) zeigte keine Vx-Umsetzung zu Ax und Zx. Hierbei konnte mittels PCR eine T-DNA-Insertion in das *VDE*-Gen nachgewiesen werden, die zu einem Funktionsverlust der VDE führte (s. Kapitel 3.7 Abb.3.7). Zum anderen zeigte sich der VDE-Funktionsverlust auch in De-epoxidationsanalysen mit aufgereinigter VDE (s. Kapitel 3.7, Daten nicht gezeigt) und in Analysen der Fluoreszenzlöschung. Dabei zeigte sich in den Fluoreszenzlöschung-Werten der Linie 48 ein ähnlicher Phänotyp wie in der VDE-defizienten *npq1*-Mutante (s. Abb. 3.12 und 3.13 *npq1*). Die T-DNA Integrationen sind unter Kontrolle des *CaMV35S*-Promotors meist dominant, so dass alle transgenen Pflanzen der Linie 48 den durch das Transgen hervorgerufenen Phänotyp aufwiesen. Aufgrund des kleinen HA-Proteinanhangs wurden die transgenen Pflanzen der Linie 48 für die Aufreinigung der AtZE1-Isoform verwendet. Eine *in vivo*-Aktivität der AtZE in der transgenen Linie 48 wurde zum einen mittels vollständiger Zx-Umsetzung im *npq2*-Hintergrund (s. Tab. 2 Linie 48) nachgewiesen. Außerdem wurde die AtZE-Aktivität an Thylakoiden der Linie 48 nach Komplementierung mit einem Zx-MGDG-Gemisch detektiert (s. Kapitel 3.7).

Die AtZE1-Isoform konnte anhand des HA-Proteinanhangs aus der Linie 48 aufgereinigt werden (s. Abb.3.8.2). Jedoch wurde keine AtZE1-Aktivität in den Epoxidationsversuchen nach Bouvier *et al.* (1996) *in vitro* nachgewiesen. Auch nach Komplementierung der isolierten AtZE1-Isoform mit *npq2*-Thylakoiden konnte keine Aktivität detektiert werden. Folglich liegt die Vermutung fehlender Faktoren für die Epoxidation nahe. Möglicherweise könnte der mangelnde Nachweis einer *in vitro*-Epoxidation mit der AtZE1-Isoform im Fehlen der AtZE2-Isoform begründet sein.

4.3 Assoziierung der AtZE1-Isoform mit der Thylakoidmembran

Im Verlauf der Proteinaufreinigung der AtZE1 anhand des HA-Anhangs aus Pflanzen der Linie 48 zeigte sich eine mögliche Assoziierung der AtZE1 mit der Thylakoidmembran von *Arabidopsis thaliana*. Bereits Gruszecki und Krupa (1993) vermuteten eine konstant an die Thylakoidmembran gebundene und mit den LHCII-Komplexen assoziierte ZE.

Die AtZE1-Isoform konnte nur unter Verwendung eines Isolierungsprotokolls für Membranproteine aus der Linie 48 mittels HA-Anhang aufgereinigt werden (s. Abb. 3.8.2). Einen weiteren Hinweis auf eine Assoziierung der AtZE1-Isoform mit der Thylakoidmembran lieferte ein Vergleich der AtZE1-Level in Chloroplasten und Thylakoiden des WT Col-0 (s. Abb. 3.8.1). Hierbei wird aus drei Gründen von einer Lokalisation der ZE auf der Chloroplastenstroma-Seite ausgegangen: 1. Das pH-Optimum der ZE liegt zwischen pH 7 und pH 8 (Siefertmann und Yamamoto, 1975); 2. als Co-Faktor wird NADPH für die Epoxidation durch die ZE benötigt, welches im Chloroplastenstroma gebildet wird und die Thylakoidmembran nicht passieren kann und 3. enthält die ZE kein Signalpeptid für den Import in das Thylakoidlumen. Dadurch kann aufgrund der Detektion ähnlicher AtZE1-Gehalte in beiden Fraktionen (s. Abb. 3.8.2; Chloroplasten und Thylakoide) eine Assoziierung mit der Thylakoidmembran auf der stromalen Seite angenommen werden. Bei einer nicht assoziierten im Chloroplastenstroma lokalisierten AtZE1-Isoform würde weniger Enzym nach der Thylakoid-Isolierung detektierbar sein, als in den isolierten Chloroplasten.

4.4 Die AtZE1-Isoform ist essentiell für die Epoxidation

Eine essentielle Bedeutung der AtZE1-Isoform für die Epoxidation konnte anhand einiger T₂-Pflanzen der transgenen Linie 16 (*npq2/pAUL2 AtZEP*) mit Unterschieden bezüglich des Pigmentphänotyps und des AtZE-Gehalts nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9). Dabei konnte bei schwacher Zx-Umsetzung zu Ax und Vx die AtZE1-Isoform mittels Immunoblotanalyse nicht mehr detektiert werden (s. Abb. 3.9 A und B Pflanze 2-Pflanze 4), was für eine essentielle Bedeutung der AtZE1-Isoform bei der vollständigen Zx-Umwandlung spricht. Eine mögliche Erklärung für die starke Verlangsamung der Zx-Epoxidation in den Pflanzen 2 bis 4 (s. Abb. 3.9) könnte in einer sehr geringen AtZE1-Konzentration begründet sein. Ausgehend von dieser Vermutung wird die AtZE1-Aktivität aufgrund einer sehr niedrigen Enzymkonzentration zwar noch in einer schwachen Zx-Umsetzung sichtbar, aber die AtZE1-Isoform kann nicht mehr in der Western Blot-Analyse detektiert werden. Andererseits zeigte sich aber auch mit abnehmender Zx-Epoxidation (s. Abb. 3.9 A von Pflanze 2 bis Pflanze 4) eine Abnahme der AtZE2-Isoform (s. Abb. 3.9 C von Pflanze 2 bis Pflanze 4), was für eine mögliche Beteiligung beider Isoformen an der Epoxidation spricht. Über die Rolle der AtZE2-

Isoform ist bisher nichts bekannt. Allerdings könnte die schwache Zx-Umsetzung in den untersuchten transgenen Pflanzen 2 bis 4 der Linie 16 mit nicht nachweisbarer AtZE1-Isoform (s. Abb. 3.9 A und B) ein möglicher Hinweis auf eine Beteiligung der AtZE2-Isoform an der Epoxidation sein.

Ein ähnlich unvollständiger Epoxidationsphänotyp wie für die T₂-Pflanzen 2 bis 4 der Linie 16 wurde in einer, nur die *AtZEP1*-überexprimierenden, *npq2*-Mutante (*MaZEP7*) detektiert (Nowicka *et al.*, 2009). Dabei könnte ein Nachweis der AtZE1-Isoform in der *MaZEP7*-Mutante mittels Immunoblotanalyse ein wichtiger Hinweis auf eine essentielle Bedeutung der AtZE2-Isoform für die Epoxidation sein, da im Gegensatz dazu in der vorliegenden Arbeit bei den T₂-Pflanzen 2 bis 4 der Linie 16 (s. Abb. 3.9) mit ähnlich unvollständigem Epoxidationsphänotyp keine AtZE1-Isoform nachgewiesen werden konnte.

Die unvollständige Zx-Umsetzung in einigen T₂-Pflanzen der Linie 16 könnte möglicherweise aufgrund post-transkriptionellen Gen-Silencings (PTGS) der AtZE1-Isoform verursacht werden. Dieses RNA-Silencing der Genexpression kann zum Abbau übermäßig exprimierter mRNA oder auch mittels Transgenexpression resultierender fremder mRNA führen. Beim PTGS werden doppelsträngige RNA-Moleküle mittels Dicer-ähnlichen Proteinen in kleinere RNA-Fragmente prozessiert und bilden sogenannte *short interfering RNAs* (siRNA; Hannon, 2002). Die siRNAs werden in Komplexen aufgenommen und führen dann zum Abbau der Ziel-mRNA.

Wie im Fall der T₂-Generation der Linie 16 betrifft das PTGS nicht alle Pflanzen. Dabei kann PTGS auch erst im fortgeschrittenem Alter auftreten. Zudem ist PTGS meiotisch reversibel, d. h. Keimlinge der nachfolgenden Generation müssen nicht unbedingt betroffen sein (Vaucheret *et al.*, 1998). Da in den Generationen T₃ und T₄ nur noch vereinzelt dieser Pigmentphänotyp auftrat, könnte diese Möglichkeit bei den *35S::AtZEP*-Pflanzen der Linie 16 zutreffen. In der Linie 19 konnte kein vergleichbarer Phänotyp detektiert werden. Hierbei wurde der Nachweis durch den WT Col-0 Hintergrund der transgenen Pflanzen erschwert. Die einzige relativ schnelle Nachweismethode einer möglichen Variation war die 30minütige Starklichtexposition dieser transgenen Pflanzen mit anschließender HPLC-Analyse. Von Vorteil erwies sich die geringere Menge an gebildetem Zx in der Linie 19 im Vergleich zum WT Col-0. Allerdings wurden kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen der T₃-Generation festgestellt.

4.5 Wachstum und Morphologie der transgenen Linien 48, 16/3 und 19/9

In den beiden untersuchten transgenen Linien 16/3 und 48 konnte das verzögerte vegetative Wachstum der AtZE-defizienten *npq2*-Mutante mittels *AtZEP*-Überexpression aufgehoben werden (s. Abb. 3.6 *npq2*, Linie 48 und 16/3). Da die ABA-Synthese über den Carotinoid-

Abbau erfolgen kann (Parry und Horgan 1992, Lee und Milborrow 1997, Cutler und Krochko 1999, Taylor *et al.*, 2000) und die mittels AtZE katalysierte Epoxidation als erster Schritt der ABA-Biosynthese angenommen wird (Duckham *et al.*, 1991; Rock und Zeevaart, 1991), kann davon ausgegangen werden, dass die Erhöhung der AtZE zu einem höheren Abscisinsäure (ABA)-Gehalt in den transgenen Linien geführt haben kann. Dabei zeigten Tardy und Havaux (1996) in den ZE-defizienten *aba1-Arabidopsis*-Mutanten (Koorneef *et al.*, 1982) eine Aufhebung des verzögerten vegetativen Wachstums mittels ABA-Zugabe. Die mutanten Pflanzen erreichten normale Größen wobei sich der hohe Zx-Gehalt nicht veränderte (Tardy und Havaux, 1996). Damit wurde gezeigt, dass die Veränderungen in Wachstum und Morphologie in *aba1* nicht auf die Abnahme der Photosynthese-Effizienz zurückzuführen sind, sondern hauptsächlich auf den ABA-Mangel. In den *Arabidopsis*-Mutanten *npq2* (Niyogi *et al.*, 1998) und *los6* (Xiong *et al.*, 2002) mit inaktiver ZE wurde auch ein Abscisinsäure(ABA)-Mangel nachgewiesen (North *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2002). Phänotypisch wirkt sich dieser in den *aba1*- und *los6*-Mutanten in einer kleineren Gestalt der mutanten Pflanzen, einer früheren Blühinduktion und einem typischen welkenden Phänotyp aus. Einen ähnlichen phänotypischen Effekt weisen auch die ABA-defizienten *npq2*-Mutanten auf mit dem Unterschied, dass sie keinen welkenden Phänotyp zeigen. Die Aufhebung dieses *npq2*-Phänotyps in den transgenen Überexpressionsmutanten *16/3* und *48* ist somit wahrscheinlich durch die Erhöhung des ABA-Gehalts zu erklären und nicht nur durch eine erhöhte Photosynthese-Effizienz aufgrund der vollständigen Zx-Umwandlung zu Vx.

Das leicht verstärkte vegetative Wachstum aufgrund größerer Blattrosetten in den Linien *16/3* und *19/9* könnte durch einen höheren Abscisinsäure(ABA)-Gehalt verglichen mit dem WT Col-0 hervorgerufen worden sein (s. Abb. 3.6). In *AtZEP*-überexprimierenden WT Col-0-Pflanzen wurde eine vierfach höhere ABA-Konzentrationen nachgewiesen, als im WT Col-0 (Park *et al.*, 2008). Allerdings wurden in dieser Veröffentlichung keine Veränderungen in Bezug auf Wachstum und Morphologie der transgenen Pflanzen beschrieben. Dagegen lieferte Barrero *et al.* (2005) Hinweise auf eine Beteiligung von ABA als Wachstumsförderer in der vegetativen Entwicklung bei *Arabidopsis thaliana*. Auch andere Autoren schlugen ABA als Wachstumsförderer unter physiologischen Bedingungen und als Inhibitor unter Stressbedingungen vor (Cheng *et al.*, 2002; Sharp und LeNoble, 2002). Xiong *et al.* (2002) vermutet sogar eine positive Feedback-Regulierung der *ZEP*-Expression durch ABA.

Das extrem erhöhte vegetative Wachstum der Linie *48* und auch die frühzeitige Blühinduktion und Schotenbildung (s. Abb. 3.6) im Vergleich zur *npq1*-Mutante, zum WT Col-0 und den anderen beiden transgenen Linien könnte möglicherweise mit einem vielfach höheren ABA-Gehalt erklärt werden. Sowohl in der Linie *48* als auch in der *npq1*-Mutante liegt eine VDE-Verlustmutation vor (s. Abb. 3.7), wobei die *npq1*-Mutante phänotypisch mit

dem WT Col-0 vergleichbar ist. Die Veränderungen im Phänotyp der Linie 48 im Vergleich zur *npq1*-Mutante könnten möglicherweise neben dem VDE-Funktionsverlusts auf einer positiven Beeinflussung der ABA-Biosynthese durch die *AtZEP*-Überexpression in der Linie 48 aufgetreten sein. Dabei könnte die VDE in der Regulation der ABA-Synthese eine antagonistische Funktion zur AtZE haben. Eine wahrscheinlichere Möglichkeit könnte die Insertion des Transgens in ein die ABA-Synthese negativ regulierendes Gen der Linie 48 sein. Dadurch würde die ABA-Synthese gefördert werden und zu sehr viel höheren ABA-Gehalten führen.

Um eindeutige Hinweise auf eine Wachstumsförderung in den transgenen Linien 16/3, 19/9 und 48 aufgrund erhöhter ABA-Konzentrationen zu erhalten müsste eine ABA-Konzentrationsbestimmung in den transgenen Linien im Vergleich zum WT Col-0 erfolgen.

4.6 Beeinflussung der De-epoxidation und Epoxidation mittels erhöhter AtZE-Mengen

Die Analyse der De-epoxidation der beiden transgenen *Arabidopsis*-Linien 16/3 und 19/9 zeigte verglichen mit dem WT Col-0 eine deutlich geringere Vx-Umsetzung zu Ax und Zx (s. Abb. 3.10). Ausgehend von der Annahme einer unter physiologischen Bedingungen konstitutiv aktiven ZE (Hager *et al.*, 1967; Müller *et al.*, 2001) könnten die beobachteten geringen De-epoxidationslevel auf die erhöhten AtZE-Konzentrationen (s. Abb. 3.5 B) in den transgenen Linien und bedingt dadurch auf eine verstärkte AtZE-Aktivität zurückzuführen sein. Die Beeinflussung des Xanthophyllzyklus-Gleichgewichts in Bezug auf eine verstärkte Epoxidation wird vor allem in der Linie 16/3 verglichen mit dem WT Col-0 unter nicht-sättigenden Lichtbedingungen durch die nahezu vollständige Zx-Epoxidation nach 10minütiger Belichtung deutlich (s. Abb. 3.10 $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-2}$). Dabei sinkt der pH-Wert im *steady-state* nicht unter pH 6 und erreicht damit nicht das pH-Optimum von 5,2 für die VDE-Aktivität (Hager, 1966). Daher überwiegt im Gleichgewichtszustand des WT Col-0 die Epoxidation relativ zur De-epoxidation. Das gleiche war prinzipiell in der Linie 16/3 zu beobachten. Allerdings erfolgte die vollständige Rückumwandlung des transient gebildeten Zx zu Vx wesentlich schneller als im WT Col-0, was vermutlich auf eine verstärkte AtZE-Aktivität aufgrund höherer AtZE-Konzentrationen in der transgenen Linie (s. Abb. 3.5 B Linie 16/3 versus WT Col-0) zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurde unter sättigenden Lichtbedingungen eine geringere Vx-Umsetzung zu Zx in beiden transgenen Linien verglichen mit dem WT Col-0 beobachtet (s. Abb. 3.10 $500\text{-}2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-2}$). Dabei scheinen die höheren AtZE-Level in den Überexpressions-mutanten auch unter Starklichtexposition bei vollständig aktiver VDE das Gleichgewicht des VAZ-Pools in Richtung Vx-Bildung zu verschieben. Demnach ist die

Epoxidase-Aktivität durch die ZE-Menge limitiert. Diese Annahme korreliert mit den Beobachtungen des De-epoxidationszustandes (DEPS) transgener Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In diesen transgenen Pflanzen wurde das zur ZE in *Arabidopsis* orthologe Zeaxanthin epoxidase-Gen in Tomaten (*LeZE*) homolog überexprimiert (Wang *et al.*, 2007). Aufgrund der *LeZE*-Überexpression zeigte sich unter Starklichtexposition eine Abnahme des De-epoxidationslevels und eine Beeinträchtigung des Epoxidationsstatus im Vergleich zu wildtypischen Tomatenpflanzen. Wang *et al.* (2007) begründeten dies mit der Erhöhung der ZE-Mengen in den transgenen Tomaten und der damit verbundenen Erhöhung der relativen ZE-Aktivität. Damit scheinen sich die Hinweise auf den Ablauf der Epoxidationsreaktion unter Starklichtbedingungen (Frommolt *et al.*, 2001, Siefermann und Yamamoto, 1975; Goss *et al.*, 2005) in den transgenen Überexpressionslinien zu bestätigen.

Aufgrund der verstärkten Zx-Epoxidation sowohl unter sättigenden als auch unter nicht sättigenden Lichtbedingungen lässt sich auf eine scheinbar ΔpH -unabhängige Aktivität der AtZE in *Arabidopsis thaliana* schließen im Gegensatz zu Kieselalgen (Goss *et al.*, 2006), in denen die ZE über den ΔpH reguliert wird.

Es wurde auch eine beschleunigte Epoxidation in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 im Vergleich zum WT Col-0 nachgewiesen (s. Abb. 3.11). Dabei scheinen in den transgenen Linien der erste (Zx \rightarrow Ax) und der zweite (Ax \rightarrow Vx) Epoxidationsschritt nahezu gleich schnell zu verlaufen. Im Gegensatz dazu beobachteten Härtel *et al.* (1996) unter physiologischen Bedingungen einen schnelleren Verlauf der Zx- zu Ax-Umsetzung, während die Ax- zu Vx-Umsetzung wesentlich langsamer verlief (wie auch im WT Col-0 bekannt). In den transgenen Linien würde dies die Annahme einer Erhöhung der relativen AtZE-Aktivität aufgrund relativ erhöhter AtZE-Mengen gegenüber den wildtypischen bestätigen. Das würde auch bedeuten, dass die Geschwindigkeit der zweiten Teilreaktion (Ax \rightarrow Vx) im Vergleich zur ersten (Zx \rightarrow Ax) durch die limitierte AtZE-Menge bedingt ist.

Ob für die erhöhte AtZE-Aktivität in den Überexpressionsmutanten beide AtZE-Isoformen notwendig sind, muss noch geklärt werden. Allerdings wurde in Kapitel 4.4 schon die Bedeutung der AtZE1-Isoform für die Epoxidation diskutiert und möglicherweise korreliert die erhöhte AtZE-Aktivität mit der erhöhten AtZE1-Konzentration (s. Abb. 3.5 B). Andererseits wurde in einer neu vorgestellten nur *AtZEP1*-überexprimierenden Mutante (*MaZEP7*) eine Arretierung der Epoxidation beobachtet (Nowicka *et al.*, 2009), die womöglich durch das Fehlen der AtZE2-Isoform verursacht wurde. Letzter Befund deckt sich auch mit der gefundenen Abnahme der Zx-Umsetzung bei Abnahme der AtZE2-Isoform in den T₂-Pflanzen der Linie 16 (s. Abb. 3.7 Pflanze 2-Pflanze 4). Da in den *AtZEP*-Überexpressionsmutanten generell beide AtZE-Isoformen vermehrt gebildet werden und es im *npq2*-Hintergrund zu einer vollständigen Zx-Epoxidation gekommen ist sind vermutlich

beide AtZE-Isoformen für eine erhöhte Epoxidationsrate und für eine vollständige Zx-Umsetzung essentiell.

Zusätzlich wurde im Zusammenhang mit der *MaZEP7*-Überexpressionsmutante im Zx-akkumulierenden *npq2*-Hintergrund eine mit den unterschiedlichen Pigmentphänotypen der transgenen Linie 16 vergleichbare unvollständige Zx-Umsetzung mit hohem Ax-Gehalt und geringen Vx- und Nx-Konzentrationen nachgewiesen. Daraus könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die AtZE2-Isoform gleichermaßen bedeutsam für die Zx-Umsetzung ist wie die AtZE1-Isoform. Vor allem scheinen beide AtZE-Proteinvarianten aufgrund der hohen Ax-Akkumulierung für die zweite Teilreaktion der Epoxidation ($Ax \rightarrow Vx$) in den transgenen Pflanzen essentiell zu sein.

4.7 Fluoreszenzlöschung

Anhand der transgenen Linien 16/3 und 19/9 wurden die Auswirkungen der *AtZEP*-Überexpression auf die beiden Fluoreszenzlöschungsparameter qP (photochemische Löschung) und NPQ (nicht-photochemische Löschung) *in vivo* bei unterschiedlichen Lichtintensitäten mittels PAM-Messungen untersucht (s. Kap.3.12).

Dabei zeigten die beiden transgenen Linien nur bei Lichtintensitäten $\geq 900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ein geringeres qP als der WT Col-0 während dies für die Zx-defiziente *npq1*-Mutante bei allen Lichtintensitäten zu beobachten war (s. Abb.3.12 und 3.13 qP). Offensichtlich ist die Anwesenheit ausreichender Zx-Mengen nötig, um den Elektronendruck auf das Q_A zu reduzieren. Ein Zusammenhang zwischen verminderten qP-Werten und verringerter qE-abhängiger Energiedissipation wurde anhand von Fluoreszenzlöschungsanalysen an den Zx-Mangelmutanten *npq1* und *lut2/npq1* beobachtet (Kalitaho *et al.*, 2007). Dementsprechend bewirkte die permanente Zx-Präsenz in der *npq2*-Mutante im Vergleich mit dem WT Col-0 ein erhöhtes qP insbesondere bei hoher Lichtintensität. Diese Ergebnisse lassen auf eine Reduzierung des Elektronendrucks auf das Q_A in Gegenwart von Zx schließen. Dieser Zusammenhang bestätigt sich durch den Befund einer verminderten ΔpH -abhängigen thermischen Energiedissipation (qE) aufgrund geringerer Zx-Mengen in den transgenen Linien und der Erhöhung des Elektronendrucks auf das Q_A , der in abnehmenden qP-Werten im Vergleich zu WT Col-0 bei höheren Lichtintensitäten ($\geq 900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$) sichtbar wird.

Die Untersuchung der nicht-photochemischen Löschung (NPQ) in den Linien 16/3 und 19/9 zeigte größere Unterschiede im Vergleich zum WT Col-0 und *npq1*. In beiden Linien lagen die NPQ-Daten ca. 20 - 40 % unterhalb der wildtypischen und ca. 15 - 30 % oberhalb der *npq1*-Daten (s. Abb. 3.12 u. 3.13). Die genauere Untersuchung der beiden Hauptkomponenten qE und qI zeigte, dass die Unterschiede in den NPQ-Werten der transgenen

Linien verglichen mit WT Col-0- und *npq1*-Werten in der Δ pH-abhängigen thermischen Energiedissipation (qE) begründet sind. Im Gegensatz zur Photoinhibition (qI), in der keine Veränderung zum WT Col-0 nachgewiesen werden konnten, zeigten die qE-Werte verglichen mit den wildtypischen eine Reduzierung der Δ pH-abhängigen thermischen Energiedissipation um 45 - 25 %. Außerdem waren die qE-Werte um 25 - 45 % höher als in der Zx-Mangelmutante *npq1*.

Bisher ist bekannt, dass die Energie-abhängige Löschung (qE) durch den Δ pH (Briantais *et al.*, 1979), Zx (Demmig-Adams *et al.*, 1990), Lutein (Pogson *et al.*, 1998; Pogson und Rissler, 2000) und das PsbS-Protein (Li *et al.*, 2000) vermittelt wird.

Da in den *AtZEP*-Überexpressionsmutanten eine Beeinflussung des Lutein-Gehalts, des Δ pHs und des PsbS-Proteins weitgehend ausgeschlossen werden kann wurden die Veränderungen des qE in den transgenen Pflanzen vor allem den geringen Zx-Mengen in der Belichtungsphase (s. Abb.3.10 De-epoxidation) zugeschrieben. Allerdings zeigte sich gegenüber den qE-Werten von *npq1* eine Erhöhung des qE in den transgenen Linien, die sich auf das Vorhandensein von Zx und Ax zurückführen ist (vgl. auch Gilmore, 1997).

Trotz der Beeinflussung des qP bei den beiden höchsten gemessenen Lichtintensitäten und der Veränderung der Δ pH-abhängigen thermischen Energiedissipation (qE) in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 zeigten diese Pflanzen keine höhere Anfälligkeit für die Photoinhibition (s. Abb. 3.12 u. 3.13 qI), als der WT Col-0. Daraus lässt sich schließen, dass das gebildete Zx für die Photoprotektion mittels qI ausreicht. In *npq1*-Pflanzen, die durch den Xanthophyllzyklus gar kein Zx bilden können, ist die Sensitivität um ca. 30 % gegenüber dem WT Col-0 und beiden transgenen Linien erhöht.

4.8 Lichtabhängige Regulation der AtZE

In Zusammenarbeit mit Clemens Reinhold wurde an WT Col-0-Pflanzen gezeigt, dass die AtZE-Aktivität bei starkem Licht- und Temperaturstress sehr schnell (innerhalb einiger Stunden) herabreguliert werden kann, bis hin zu einer nahezu vollständigen Inhibierung (Reinhold *et al.*, 2008).

Interessanterweise konnte die Abnahme der AtZE-Aktivität auch bei photoinhibitorischen Analysen der transgenen Überexpressionslinien 16/3 und 19/9 nachgewiesen werden, obwohl diese Pflanzen einen Überschuss an AtZE haben (s. Abb. 3.16 4°C) und damit auch eine erhöhte AtZE-Aktivität aufweisen. Dadurch konnte wie auch im WT Col-0 (Reinhold *et al.*, 2008) eine Inhibierung der AtZE-Aktivität unter Licht- und Temperaturstress nachgewiesen werden. Allerdings ist der Regulationsmechanismus dieser Inhibierung der AtZE-Aktivität noch unklar.

Einen möglichen molekularen Regulationsmechanismus für die ZE-Aktivität könnten lichtabhängige Phosphorylierungsreaktionen darstellen (Xu *et al.*, 1999; Rokka *et al.*, 2000; Ebbert *et al.*, 2005). Um den möglichen Zusammenhang einer Abnahme der AtZE-Aktivität mittels lichtabhängiger Phosphorylierung von Thylakoidproteinen in *Arabidopsis* zu überprüfen, wurde die Regulation der Epoxidation in der *stn7/stn8*-Doppelmutante und *tlp40*-Mutanten in Zusammenarbeit mit Reinhold *et al.* (2008) untersucht.

Bei STN7 und STN8 handelt es sich um zwei Thylakoidproteinkinasen. In der *stn7/stn8*-Doppelmutante ist die lichtabhängige Phosphorylierung von PSII-Kernproteinen und Antennenproteinen sowohl unter Schwachlicht-, als auch unter Starklichtbedingungen, inhibiert (Bonardi *et al.*, 2005). Die *stn7/stn8*-Doppelmutante zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Starklicht induzierte Inaktivierung der AtZE-Aktivität (s. Abb. 4.1 *stn7/stn8*). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die beiden Kinase STN7 und STN8 an der Regulation der AtZE-Aktivität beteiligt sind.

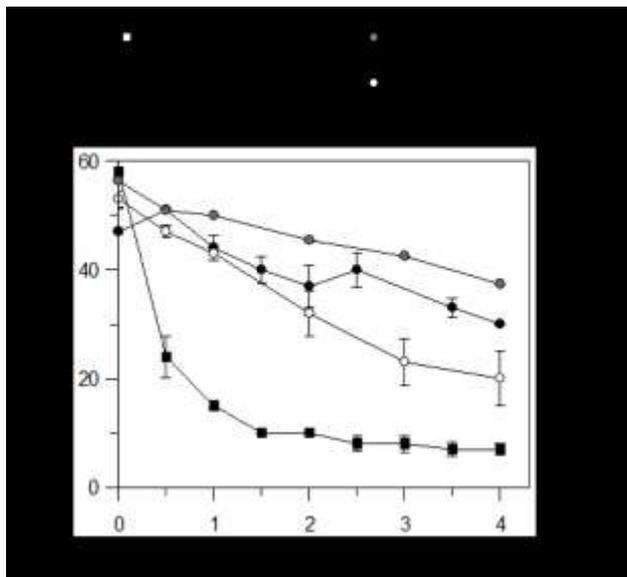


Abb. 4.1: Untersuchung der Zx-Epoxidation in WT Col-0, *stn7/stn8* mutanten Pflanzen und *tlp40* mutanten Pflanzen. Zeitlicher Verlauf der Epoxidation nach 30minütiger Vorbelichtung der Pflanzen mit einer Lichtintensität von $1500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 20°C . Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden hier nur die Daten der *stn7/stn8*- und der *tlp40*-Mutante (30 min, 20°C) nicht gezeigt, da diese den wildtypischen Verlauf (Quadrate) zeigen. Zeitlicher Verlauf der Epoxidation nach zweistündiger Vorbelichtung der Pflanzen mit einer Lichtintensität von $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und 5°C (Kreise). Fehlerbalken zeigen die $\pm\text{SD}$ aus drei unabhängigen Messungen (Reinhold *et al.*, 2008).

In *tlp40*-Mutanten fehlt das Thylakoid-Lumen-Protein 40 (TLP40). Dieses ist für die Inhibierung einer in der Thylakoidmembran lokalisierten Phosphatase verantwortlich. Ebbert *et al.* (2005) konnten in immergrünen Koniferen nachweisen, dass der D1-Proteinabbau mit der Hochregulierung von TLP40 korreliert. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Inhibierung der Epoxidation gezeigt. Die Epoxidationsanalyse homozygoter *tlp40-knockout*-Pflanzen sollte Aufschluss über eine mögliche Rolle dieses Proteins bei der Regulation der AtZE-Aktivität geben. Dazu wurden die Epoxidation unter AtZE-inhibierenden Licht- und Temperaturbedingungen im Vergleich zum WT Col-0 in *tlp40*-Pflanzen untersucht (s. Abb.4.1 *tlp40*). Auch diese Experimente ergaben keine signifikanten Unterschiede gegenüber der wildtypischen Epoxidation.

Ebenso konnten in Gegenwart von unterschiedlichen Phosphatase-Inhibitoren keine Änderung in der lichtinduzierten Inaktivierung der AtZE festgestellt werden (Reinhold, Diplomarbeit 2006).

Somit kann also eine Beteiligung der genannten Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsfaktoren an der lichtabhängigen Regulation der AtZE-Aktivität ausgeschlossen werden (Reinhold *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation könnte über den Redoxzustand erfolgen. Dies könnte auch erklären, warum die AtZE-Aktivität in den beiden transgenen Linien 16/3 und 19/9 ähnlich schnell wie im WT Col-0 herunterreguliert wird (s. Abb. 3.16, 4°C). Erste Hinweise auf eine Regulation der AtZE-Aktivität über Redoxmodulationen ergaben sich aus Experimenten mit Dithiothreitol (DTT). Dabei zeigte sich, dass die lichtinduzierte Verlangsamung der Epoxidation durch ausschließliche Infiltration von Blattscheiben mit DTT wieder aufgehoben werden kann (Beran *et al.*, unveröffentlichte Daten).

4.9 Lichtinduzierte Expression der AtZE2-Isoform

Da eine Steigerung der AtZE-Mengen mit der verstärkten AtZE-Aktivität in den transgenen Linien 16/3 und 19/9 korreliert, könnte auch eine Regulation der ZE- Aktivität anhand der Proteinkonzentration erfolgen. Diese könnte zum einen über eine Regulation der ZE-Expression erfolgen oder alternativ über eine Regulation des Proteinabbaus.

In *Arabidopsis thaliana* (Col-0) wurde unter Starklichtexposition (2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) die Änderung der Proteinmengen unter Berücksichtigung möglicher Änderungen auf der Transkriptionsebene untersucht. Dabei konnten erstmals die zwei AtZE-Proteinisoformen und beide *AtZEP*-Spleißvarianten detektiert werden.

Zunächst war auffällig, dass die AtZE1-Isoform bereits in der Dunkelprobe im Gegensatz zur AtZE2 hohe Proteinmengen zeigte. Unter Starklichteinfluß (2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nahm die AtZE1-Proteinmenge nur geringfügig nach 15minütiger Belichtung zu. Im Zusammenhang damit zeigten sich in der quantitativen Real-Time PCR relativ hohe *AtZEP1*-Transkriptmengen in der Dunkelprobe, die nach 15minütiger Belichtung abnahmen. Demnach scheint die *AtZEP1*-Expression kaum lichtabhängig zu sein und anders reguliert zu werden. Thomson *et al.* (2000) konnten anhand *LeZep1*-mRNA-Analysen in Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) Schwankungen in den Expressionsmustern nachweisen, die typisch für circadian exprimierte Gene sind. Auch mittels Mikroarray-Analysen konnten diese periodischen Veränderungen der *ZEP*-Expression nach einer circadianen Rhythmik bestätigt werden (Schaffer *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2002; Standard Microarray Database, <http://afgc.stanford.edu>). Diese Erkenntnisse schließen eine starklichtabhängige Regulation der *AtZEP1*-Expression nicht aus. Zum Messzeitpunkt könnte diese lichtabhängige *AtZEP1*-

Regulation von einer, über circadiane Rhythmik gesteuerten, Regulation der *AtZEP1*-Expression überlagert worden sein, da hier schon in der Dunkelprobe hohe Protein- und Transkriptmengen nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 3.17 und 3.18.3).

Dagegen konnte für die *AtZE2*-Isoform eine Starklicht-abhängige Zunahme der Proteinmenge nachgewiesen werden. So war auf Transkriptebene mittels semiquantitativer PCR eine Zunahme der *AtZEP2*-Transkriptmenge nach 15minütigem Starklichteinfluß detektierbar. Nach 60minütiger Belichtung wurde eine starke Abnahme der *ZEP2*-Transkriptmenge nachgewiesen, die aber auf Proteinebene noch zu keiner Änderung der *ZE2*-Proteinmenge führte. Eine Möglichkeit für die Abnahme der *AtZEP2*-Transkriptmenge könnte in der Regulation über den Redoxstatus des Plastochinon-Pools begründet sein (Woitsch und Römer, 2003). Eine solche Regulation wurde anhand von Ergebnissen aus Expressionsanalysen an Tabak-Keimlingen (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun) vermutet (Woitsch und Römer, 2003). Dabei zeigte sich eine Abnahme der *NpZEP*-Transkriptmenge unter Blockierung der Oxidation des Plastochinonpools mittels DBMIB und eine Erhöhung unter Inhibierung der Reduktion des Plastochinonpools mittels DCMU. Übertragen auf natürliche Lichtverhältnisse würde unter extremem Starklichteinfluß die *NpZEP*-Transkriptmenge abnehmen und unter Schwachlichteinfluß zunehmen. Dies würde auch mit den Ergebnissen der *Zx*-Arretierung unter extremem Licht- und Temperaturstress korrelieren (Reinhold *et al.*, 2008). Die spezifische Transkript-Kontrolle über den Redoxstatus des Plastochinonpools wurde auch für Chloroplasten-kodierte Gene in höheren Pflanzen bzw. Kern-kodierte Gene des PSII Lichtsammelsystem der Alge *Dunaliella terticolecta* gezeigt (Escoubas *et al.*, 1995; Pfannschmidt *et al.*, 1999).

Im Zusammenhang mit den Analysen der De-epoxidation und Epoxidation zeigte sich unter De-epoxidationsfördernden Bedingungen eine weitgehend konstante wildtypische *AtZE1*-Proteinmenge und ein paralleler Anstieg der wildtypischen *AtZE2*-Proteinmenge mit dem wildtypischen De-epoxidationsgrad (vgl. Abb. 3.10 $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-1}\text{s}^{-2}$ mit Abb. 3.14). Da das gebildete *Zx* wichtig für die Photoprotektion (Niyogi *et al.*, 2001; Müller-Moulé *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2007; Havaux *et al.*, 2007) und eine Rückumwandlung mittels Epoxidation nicht vorteilhaft ist, könnte durch den *ZE2*-Anstieg ein negativer *AtZE2*-Einfluß auf die für die Epoxidation essentielle *AtZE1*-Isoform (s. Abb. 3.7) vermutet werden. Andererseits scheinen beide Proteinisofomen in den konstitutiven Überexpressionsmutanten in gleichen Mengen vorzuliegen (s. Abb. 3.7 für Linie 16/Pflanze1 gezeigt). Das scheint einem negativen Einfluß der *AtZE2* auf die *ZE1*-Isoform zu widersprechen oder es müsste ein komplexerer Regulationsmechanismus in Betracht gezogen werden. Letzterer würde den Einfluß von Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsreaktionen (Xu *et al.*, 1999; Rokka *et al.*, 2000 ; Ebbert *et al.*, 2005) und/oder Licht- und Temperaturstress (Reinhold *et al.*, 2008) auf die *AtZE2*-Isoform mit

einbeziehen. Dadurch würde die AtZE2 mittels der genannten Regulationsmechanismen aktiviert werden und aufgrund dessen sich negativ auf die AtZE1-Aktivität auswirken.

Unter Betracht der lichtbedingten Veränderungen der *AtZEP2*-Transkriptmengen (s. Abb. 3.9.2) ergibt sich noch eine andere wahrscheinlichere Möglichkeit. Da nach 60minütiger Starklichtexposition eine Abnahme der *AtZEP2*-Transkriptmengen nachgewiesen werden konnte, scheint unter langandauerndem Lichtstress eine Abnahme der AtZE2-Menge möglich zu sein. In Zusammenhang mit der Inhibierung der Epoxidation unter extremem Licht- und Temperaturstress (Reinhold *et al.*, 2008) könnte durch die Abnahme der AtZE2-Proteinmenge bei langandauerndem Lichtstress eine Abnahme der AtZE-Aktivität erfolgen. Dadurch würde die AtZE-Aktivität mittels Interaktion beider AtZE-Isoformen gefördert werden. Unterstützend für diese Hypothese ist auch die gezeigte schnellere Epoxidation bei Überexpression beider AtZE-Isoformen in *Arabidopsis*, die vor allem im zweiten Epoxidationsschritt deutlich wird. Dagegen zeigte sich in der nur *AtZEP1*-überexprimierenden *MaZEP7*-Mutante (Nowicka *et al.*, 2009) eine starke Verlangsamung beider Epoxidationsschritte, wobei der zweite Schritt aufgrund der hohen Ax-Mengen stärker beeinflusst schien. In den T₂-Pflanzen der Linie 16 mit AtZE1-Mangel wurden ähnliche Pigmentphänotypen nachgewiesen (s. Abb. 3.7). Ausgehend von dieser Hypothese könnte die Geschwindigkeit der Epoxidationsschritte durch die unterschiedliche Regulation der Genexpression beider *AtZEP*-Spleißvarianten beeinflusst werden und bei konstitutiver Überexpression beider *AtZEP*-Spleißvarianten stark erhöht werden.

4.10 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben einige neue Fragen aufgeworfen. Besonders die spezielle Rolle der AtZE2-Isoform bei der Regulation der Epoxidation und eine mögliche Interaktion beider AtZE-Isoformen im Hinblick auf eine vollständige AtZE-Aktivität bedarf der Klärung. Die mögliche Interaktion der beiden AtZE-Isoformen könnte z.B. durch eine 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. In weiterführenden Experimenten könnte eine mögliche posttranslationale Modifikation der beiden AtZE-Isoformen mittels IR-MALDI-Massenspektrometrie analysiert werden.

Außerdem würde sich eine separate Überexpression beider *AtZEP*-Spleißvarianten als cDNA-Klone in Zx-akkumulierenden *npq2*-Pflanzen anbieten. Dabei wäre eine *AtZEP*-Überexpression beider Spleißvariante mit Proteinanhang sinnvoll um nach der Proteinaufreinigung die Bedeutung des Vorhandenseins beider AtZE-Isoformen für die *in vitro*-Epoxidation überprüfen zu können. Eine genauere Analyse der *MaZEP7*-Mutante (Nowicka *et al.*, 2009) auf Proteinebene könnte hierbei erste wichtige Hinweise liefern.

Zudem muss der genaue Regulationsmechanismus der Inhibierung der Zx-Epoxidation unter Starklicht- und Temperaturstress untersucht werden. Dies könnte zunächst durch weitere Expressionsanalysen und Analysen des AtZE-Levels unter photoinhibitorischem Stress und unter nicht sättigenden Lichtbedingungen untersucht werden. Außerdem würde sich die Suche nach Bindeproteinen, also nach potentiellen Rezeptorproteinen für die AtZE, entweder auf molekularbiologischer (two-hybrid-System) oder aber auch auf protein-biochemischer Ebene anbieten.

5 Zusammenfassung

Das im Xanthophyllzyklus gebildete Carotinoid Zeaxanthin (Zx) besitzt wichtige photoprotektive Funktionen im Chloroplasten und spielt eine zentrale Rolle bei der pH-abhängigen Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie im Photosystem II (PSII). Der Zx-Gehalt in der Thylakoidmembran unterliegt einer strengen Kontrolle, um eine unerwünschte Energiedissipation unter nicht sättigenden Lichtbedingungen zu vermeiden, andererseits aber eine effiziente Energielöschung unter Starklichtbedingungen zu gewährleisten. Während die pH-regulierte Bildung des Zx aus Violaxanthin (Vx) durch die im Thylakoidlumen lokalisierte Vx De-epoxidase gut verstanden ist, ist über die Regulation und die biochemischen Eigenschaften der Zx Epoxidase (ZE), die für die Rückumwandlung des Zx zu Vx verantwortlich ist, nur wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ZE anhand von *in vitro* Epoxidationsstudien an aufgereinigter ZE höherer Pflanzen und mittels *in vivo* Untersuchungen an homolog über-exprimierter AtZE in *Arabidopsis* charakterisiert. Dabei konnte über Antikörper gegen die ZE gezeigt werden, dass die AtZE in *Arabidopsis* in zwei Isoformen (AtZE1 und AtZE2) vorliegt und die ZE1-Isoform fest mit der Thylakoidmembran assoziiert ist. In biochemischen Untersuchungen zur Aktivität der heterolog in *E.coli* überexprimierten NpZE aus Tabak, sowie der homolog überexprimierten AtZE1-Isoform aus *Arabidopsis*, ließ sich keine Aktivität der aufgereinigten Enzyme unter *in vitro* Bedingungen nachweisen. Dies wurde hinsichtlich der NpZE aus dem prokaryotischen System auf das Fehlen wichtiger eukaryotischer Faktoren zurückgeführt, während für die AtZE1-Isoform aus *Arabidopsis* das Fehlen der AtZE2-Isoform als Ursache vermutet wurde. An der *AtZEP*-überexprimierenden *Arabidopsis*-Linie 16 konnte eine essentielle Bedeutung der AtZE1-Isoform für die Epoxidation nachgewiesen werden, während die Funktion der AtZE2-Isoform unklar blieb. *In vivo* Studien zur Lichtregulation der Zx-Epoxidation in *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen zeigten jedoch, dass die AtZE-Aktivität bei zunehmendem photo-oxidativen Stress sukzessive herunter reguliert wird und dabei die ZE2-Isoform verstärkt exprimiert wird. Diese Befunde lassen auf eine Beteiligung beider Isoformen an der Regulation der ZE-Aktivität schließen. Vergleichende *in vivo* Untersuchungen der Xanthophyllzyklus-Aktivität an zwei *AtZEP*-überexprimierenden Linien (16/3 und 19/9) und Wildtyp-Pflanzen zeigten, dass eine erhöhte AtZE-Aktivität zu einer verminderten Zx-Bildung im Schwach- und Starklicht führte und dadurch das Gleichgewicht des De-epoxidationszustandes der Xanthophylle zu niedrigeren Werten verschoben war. Dies lässt auf eine konstitutive ZE-Aktivität unter allen Lichtbedingungen schließen.

Der verminderte Zx-Gehalt bewirkte zwar eine Verminderung der pH-abhängigen Energiedissipation in den ZE-überexprimierenden Pflanzen, was aber nicht in einer signifikant erhöhten Photoinhibition des PSII resultierte. Die in Wildtyp-Pflanzen beobachtete

Inaktivierung der ZE nach extremem photo-oxidativen Stress konnte auch in den ZE-überexprimierenden Linien nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Regulation der Zx-Epoxidation lässt sich daraus schließen, dass die generelle Aktivität der ZE zwar grundsätzlich durch den Gehalt an ZE limitiert ist, die stress-induzierte Inaktivierung der ZE aber wahrscheinlich auf posttranslationaler Ebene erfolgt.

5 Summary

The carotenoid zeaxanthin (Zx), which is formed from violaxanthin (Vx) in the xanthophyll cycle, has essential functions in different photoprotective mechanisms in chloroplasts and plays a central role in the pH-dependent thermal dissipation of excess light energy in photosystem II (PSII). The Zx content in the thylakoid membrane has to be regulated very carefully to avoid undesirable annihilation of absorbed light energy at non-saturating light intensities on the one hand and to allow an efficient quenching of energy under highlight conditions on the other hand. While the pH-regulated formation of Zx from Vx by the lumen-localized Vx de-epoxidase is well understood, the regulation and biochemical properties of the Zx epoxidase (ZE), which catalyzes the reconversion of Zx to Vx, are only poorly characterized.

In this work the ZE was characterized by *in vitro*-studies of the epoxidation using purified ZE of higher plants and by *in vivo*-analysis after homologous over-expression of the AtZE in *Arabidopsis*. Using antibodies raised against the AtZE, it was shown, that two isoforms of the AtZE (ZE1 and ZE2) exist in *Arabidopsis* and that the AtZE1-isoform is tightly associated with the thylakoid membrane. In biochemical studies on the activity of the NpZE from tobacco (purified after heterologous over-expression in *E.coli*) and *Arabidopsis* (isolated after homologous over-expression in *Arabidopsis*) no enzyme activity was detectable under *in vitro* conditions. In case of the NpZE isolated from the prokaryotic system, the lack of eukaryotic factors was supposed to be responsible for the *in vitro*-inactivity of the enzyme, and in case of the AtZE1-isoform of *Arabidopsis* the lack of the AtZE2-isoform. An essential role of the AtZE1-isoform for the epoxidation was demonstrated in the AtZE over-expressing *Arabidopsis*-line 16, while the function of the AtZE2-isoform remained unclear. However, *in vivo* studies on the light-dependent regulation of Zx-epoxidation in *Arabidopsis* wild-type plants indicated that the AtZE-activity is gradually down-regulated in response to increasing photo-oxidative stress conditions concomitant with an increased expression of the AtZE2-isoform. These observations suggest a role of both isoforms in the regulation of the AtZE-activity. Comparative *in vivo* studies on the xanthophyll cycle activity in two AtZE-overexpression lines (16/3 and 19/9) and wild-type plants showed, that an increased AtZE activity leads to a decreased Zx formation under both low and high light conditions and thus shifts the steady state level of the xanthophyll de-epoxidation state towards lower values. This implies that the ZE is constitutively active under all light conditions.

Although the decreased Zx content resulted in decreased pH-dependent energy dissipation in AtZE-overexpressing plants, no significantly increased photoinhibition of PSII was detectable in comparison with wild-type plants. The observed inactivation of AtZE after extreme photo-oxidative stress in wild-type plants was also detectable in the AtZE-

overexpression lines. With respect to the regulation of Zx epoxidation it was concluded, that the AtZE-activity in wild-type plants is generally limited by the Zx content, but the stress-induced ZE inactivation is likely to occur on the posttranslational level.

6 Literatur

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

Adamska, I. (2001). The ELIP family of stress proteins in the thylakoid membranes of Pro- and
Eukaryota in Regulation of Photosynthesis. (Aro, E. M. Hrsg.) 8: 487-505, Kluwer Academic
Publishers, Dordrecht, NL.

**Ahn, T.K., Avenson, T.J., Ballottari, M., Cheng, Y.-C., Niyogi, K.K., Bassi, R. und Fleming, G.R.
(2008).** Architecture of charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein.
Science, 320: 794-796.

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

Allen, J.F. (2003). State transitions - a question of balance. *Science* 299, 1530-1532

Allen, J.F. (2005). A redox switch hypothesis for the origin of two light reactions in photosynthesis.
FEBS Lett. 579: 963-968.

Allen, J.F. und Forsberg, J. (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function.
Trends Plant Sci. 6: 317-326.

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

Asada, K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues: in: Foyer
CH, Mullineaux P Hrsg., Photooxidative stresses in plants: Causes and Amelioration. CRC
Press, Inc. Boca Raton 77-104

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.

Audran, C., Borel, C., Frey, A., Simonneau, T. und Marion-Poll, A. (1998). Expression studies of
the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana plumbiginifolia*. Plant Physiol. 118: 1021-1028.

-
- Avenson, T.J., Ahn, T.K., Zigmantas, D., Niyogi, K.K., Li, Z., Ballottari, M., Bassi, R., and Fleming, G.R. (2008).** Zeaxanthin Radical Cation Formation in Minor Light-harvesting Complexes of Higher Plant Antenna. *J. Biol. Chem.* 283 (6): 3550-3558
- Barber J. und Andersson, B. (1992).** Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17: 61-66
- Barber, J., Nield, N., Morris, E. P. und Hankamer, B. (1999).** Subunit positioning in photosystem II revisited. *Trends Biochem. Sci.* 24: 43-45.
- Baroli, I. und Niyogi, K.K. (2000).** Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plant. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 355: 1385-1394.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., Rodriguez, P. L., Ponce, M.R. und Micol, J.L. (2005).** A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany*, 56 (418): 2071–2083.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. und Engert, A. (2000).** Compatible-Solute-Supported Periplasmic Expression of Functional Recombinant Proteins under Stress Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1572–1579.
- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G. und Rochaix, J. D. (2005).** State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433: 892-895.
- Ben-Shem, A., Frolow, F. und Nelson, N. (2003).** Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, 426: 630-635.
- Benett, J. (1991).** Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu Rev Plant Physiol*, 42: 281–311.
- Benfey, P N., Ren, L., und Chua, N.-H. (1989).** The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* August; 8(8): 2195–2202.
- Bent, A. F., and Clough S. J.** „Agrobacterium germ-line transformation: Transformation of *Arabidopsis* without tissue culture.“ *Plant Molecular Biology Manual (Second Edition)*, S.B. Gelvin and R. A. Schilperoort eds (Kluwer Academic Pub., Dordrecht, The Netherlands)

-
- Berne, P.F., Double, S. und Carter, C.W., Jr. (1999).** Molecular biology for structural biology. In Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. (Ducruix, A.& Giege, R., eds), pp. 45-73, Oxford University Press, Oxford.
- Bertrand, M., Schoefs, B., Siffel, P., Rohacek, K. und Molnar I. (2001).** Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. FEBS Letters 508: 153-156.
- Bonardi, V. Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P. und Leister, D. (2005).** Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. Nature 437: 1179-1182.
- Bouvier, F., D'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A. und Camara, B. (1996)** Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstruction, and regulation of β -cyclohexanol carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annum*). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 91: 28861–28867.
- Boyer, P.D. (1997).** The ATP synthase: A splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 66: 717-749.
- Brettel, K. (1997).** Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. Biochim. Biophys. Acta. 1318: 322-378.
- Briantais J.-M., Verrotte, C., Picaud, M., Krause, G.H. (1979).** A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. Biochim Biophys Acta. 1979;548:128–138.
- Büch, K., Stransky, H. und Hager, A. (1995).** FAD is a further essential cofactor of the NAD(P)H and O₂-dependent zeaxanthin-epoxidase. FEBS Letters 376: 45-48.
- Buchanan, B. B., Grissem, W. und Jones, R. L. eds (2000).** Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Bugos, R.C., Hieber, A.D. und Yamamoto, H.Y. (1998).** Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. The Journal of Biological Chemistry, 273 (259): 15321-15324.
- Bungard, R.A., Ruban, A.V., Hibberd, J.M., Press, M.C., Horton, P. und Scholes, J.D. (1999).** Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. Proc Natl Acad Sci USA 96 (3): 1135-1139.

-
- Cheng, C., und Shuman, S. (2000).** Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of topoisomerase IB-induced double-strand breaks. *Mol.Cell.Biol.* 20: 8059-8068
- Cheng, W.H., Endo, A., Zhou, L., et al. (2002).** A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell* 14: 2723–2743.
- Chitnis, P.R. (2001).** Photosystem I: Function and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 593-626.
- Clough, S.J. und Bent, A.F. (1998).** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana, *Plant J.* 16: 735–743.
- Cook, N.L., Vink, R., Donkin, J.J. und van den Heuvel, C. (2008).** Validation of reference genes for normalization of real-time quantitative RT-PCR data in traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.*
- Cunningham, F.X. Jr. und Gantt, E. (1998).** Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Cutler A.J., Krochko J.E. (1999).** Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4: 472–478.
- Demmig-Adams, B. (1990).** Carotenoid and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020:1-24.
- Demmig-Adams, B. und Adams, W.W. III (2006).** Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal dissipation. *New Phytol* 172: 11-21.
- Demmig-Adams, B., Ebbert, V., Mellman, D.L., Mueh, K.E., Schaffer, L., Funk, C., Zarter, C.R., Adamska, I., Jansson, S. und Adams, W.W. III (2006).** Modulation of PsbS and flexible versus sustained energy dissipation by light environment in different species. *Physiol Plant* 127: 670-680.
- Depege, N., Bellafiore, S. und Rochaix, J. D. (2003).** Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in Chlamydomonas. *Science* 299, 1572—1575(2003).
- Dreuw, A., Fleming, G.R., Head-Gordon, M. (2003).** Chlorophyll fluorescence quenching by xanthophylls. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5: 3247-3256.

-
- Duckham, S.C., Linforth, R.S.T. und Taylor I.B. (1991).** Abscisic acid-deficient mutants at the aba gene locus of *Arabidopsis thaliana* are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. *Plant, Cell and Environment* 14:601–606.
- Ebbert, V., Adams III, W.W., Mattoo, A.K., Sokolenko, A. and Demmig-Adams, B.(2005).** Up-regulation of a photosystem II core protein phosphatase inhibitor and sustained D1 phosphorylation in zeaxanthin-retaining, photoinhibited needles of overwintering Douglas fir. *Plant, Cell & Environment* 28 (2): 232-240.
- Escoubas, J.-M., Lomas, M., LaRoche, J. und Falkowski, P.G. (1995).** Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10237-10241.
- Färber , A., Young, A.J., Ruban, A.V., Horton, P. und 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. und Jahns, P. (1998).** The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization *Biochim Biophys Acta* 1363: 47-58.
- Finazzi G., Johnson G.N., Dall'Osto L, Joliot P, Wollman F.A. und Bassi R. (2004).** A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Plant Biology*, 101 (33): 12375-12380.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L. und Rock, C.D. (2002).** Abscisic acid signaling in seeds and seedlings, *Plant Cell* 14: 15–45.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. und Kunert, D.J. (1994).** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92, 696-717.
- Frank, H.A. und Brudvig G.W. (2004).** Redox functions of carotenoids in photosynthesis. *Biochem.* 43: 8607-8715.
- Frommolt, R., Goss, R. und Wilhelm, C. (2001).** The de-epoxidase and epoxidase reactions of *Mantionella squamata* (Prasinophyceae) exhibit different substrate-specific reaction kinetics compared to spinach. *Planta.* 2001 Jul;213(3):446-56.
- Ganeteg, U., Kühlheim, C., Andersson, J. und Jansson, S. (2004).** Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness? *Plant Physiol.*, 134: 502-509.

-
- Gilmore, A.M. und Ball, M.C. (2000).** Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11098-11101.
- Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. (1991).** Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-
endcapped,lightly carbon-loaded C18 high-performance liquid chromatographic column. *J. Chromatogr.* 543: 137-145.
- Goss R., Lepetit B. und Wilhelm C. (2005).** Evidence for a rebinding of antheraxanthin to the light-harvesting complex during the epoxidation reaction of the violaxanthin cycle. *J Plant Physiol* 2005;163:585–90
- Graßes, T. (2005).** Untersuchungen zur Schutzfunktion von α -Tocopherol und Δ pH-abhängiger Energielöschung bei photooxidativem Stress in höheren Pflanzen. Doktorarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Green, R.M., Tingay, S., Wang, Z.-Y. und Tobin, E.M. (2002).** Circadian rhythms confer a higher level of fitness to Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 129:576-584.
- Gruszecki W.I. und Krupa Z. (1993).** LHCII, the major light-harvesting pigment-protein complex is a zeaxanthin epoxidase. *Biochim Biophys Acta* 1144:97–101.
- Hager, A. (1967).** Untersuchungen über die Rückreaktion im Xanthophyll-Cyclus bei Chlorella, Spinacia und Taxus. *Planta* 76: 138-148.
- Hager, A. (1969).** Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlungen; Beziehungen zur Photophosphorylierung, *Planta* 89: 224-243.
- Hager, A. (1975).** Die reversiblen lichtabhängigen Xanthophyll-Umwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88: 27-44.
- Hager, A. (1980).** The reversible light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. In: Czygan (Hrsg.) *Pigments in Plants*: 57-79, Stuttgart.
- Hager, A. und Holocher, K. (1994).** Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light dependent) pH decrease. *Planta* 192: 581–589.

-
- Hager, A. und Meyer-Bertenrath (1966).** Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden. *Planta* 69: 198-217.
- Hager, A. und Stransky, H. (1970).** Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllzyklus in verschiedenen Algenklassen. *Arch. Mikrobiol.* 73: 315-323.
- Haldrup A., Jensen P.E., Lunde C. und Scheller H.V. (2001).** Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci* 6: 301-305.
- Halliwell, B. (1991).** Oxygen radicals: their formation in plant tissues and their role in herbicide damage. In: *Herbicides*, Baker, N.R., und Percival, M.P. (Hrsg.), S. 87-129, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hannig G. und Makrides S.C. (1998).** Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 16(2): 54-60
- Hannon, G.J. (2002).** RNA interference. *Nature* 2002, 418:244-251.
- Härtel, H., Lokstein, H., Grimm, B. and Rank, B. (1996).** Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. Influence of antenna size and relations to nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Physiol.* 110: 471-482.
- Havaux, M. (1998).** Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3: 147-150.
- Havaux, M. und Niyogi, K.K. (1999).** The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (15): 8762-8767.
- Havaux, M., Dall'Osto, L. und Bassi, R. (2007).** Zeaxanthin Has Enhanced Antioxidant Capacity with Respect to All Other Xanthophylls in Arabidopsis Leaves and Functions Independent of Binding to PSII Antennae. *Plant Physiology* 145:1506-1520
- Holt, N.E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.P., Niyogi, K.K. und Fleming, G.R. (2005).** Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science* 307: 433-436.

-
- Horton, P., Ruban, A. V. und Walters, R. G. (1996).** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.
- Horton, P., Ruban, A.V. und Wentworth, M. (2000).** Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B.* 355: 1361-1370.
- Jahns, P. (1995).** The xanthophylls cycle in intermittent light grown pea plants. Possible functions of chlorophyll a/b binding proteins. *Plant Physiol.* 108: 149-156.
- Jahns, P. und Miede, B. (1996).** Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198: 202–210.
- Jahns, P., Latowski, D., und Strzalka, K. (2009).** Mechanism and Regulation of the Violaxanthin Cycle: The Role of Antenna Proteins and Membrane Lipids, *Biochim Biophys Acta* 1787, 3-14
- Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, H. und Hobe, S. (2001).** De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* 276 (25): 22154-22159.
- Jakob T., Goss R. und Wilhelm C. (2001).** Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diadinoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Plant Physiol.* 158: 383-390
- Jansson, S. (1994).** The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins. *Biochim. et Biophys. Acta* 1184: 1–19.
- Jansson, S. (1999).** A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 4, No. 6: 236-240.
- Johnson, M.P., Havaux, M., Triantaphylidis, C., Ksas, B., Pascal, A.A., Robert, B., Davison, P.A., Ruban, A.V., Horton, P. (2007).** Accumulation of zeaxanthin bound by oligomeric LHCII enhances resistance to photo-oxidative stress in *Arabidopsis* by a mechanism distinct from rapidly reversible non-photochemical quenching. *J. Biol. Chem.* 282 (31): 22605-22618.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Kuklas, O., Saenger, W., und Krauss, N. (2001).** Three dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 901-917.
- Kalituho, L., Rech, J. und Jahns, P. (2007).** The role of specific xanthophylls in light utilization. *Planta* 225: 423-439

-
- Kamiya, N. und Shen, J.R. (2003).** Crystal structure of oxygen-envolving photosystem II from *Thermosynechococcus valcanus* at 3,7Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 98-103.
- Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C. und Karszen, C.M. (1982).** The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Theor. Appl. Genet. 61: 385–393.
- Krause (1988).** Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. Physiol Plant. 74: 566-574.
- Krause und Jahns (2003).** Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis (B.R. Green and W.W. Parson, eds) Kluwer Academic Pub, The Netherlands, pp.373-399.
- Kühlbrandt, W, Wang, D. N. und Fujiyoshi, Y. (1994).** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature 367: 614-621.
- Latowski, D., Banaś, A.K., Strzałka, K. und Gabryś, H. (2007).** Amino sugars: new inhibitors of zeaxanthin epoxidase, a violaxanthin cycle enzyme. J Plant Physiol 164(3): 231-237.
- Le Hir H., Nott A., Moore M.J. (2003).** How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. Trends Biochem Sci. 28(4):215-20.
- Lee und Milborrow (1997).** Endogenous biosynthetic precursors of (+)-abscisic acid. VI. Carotenoids and ABA are formed by the 'non-mevalonate' triose-pyruvate pathway in chloroplasts. Australian Journal of Plant Physiology 25(5): 507 - 512.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K. K. (2000).** A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. Nature 403: 391-395.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, Z., Gui, L., An, X. und Chang, W. (2004).** Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. Nature, 428: 287-291.
- Macko, S., Wehner, A. und Jahns, P. (2002).** Comparison of violaxanthin de-epoxidation from the stroma and lumen sides of isolated thylakoid membranes from *Arabidopsis*: implications for the mechanism of de-epoxidation. Planta, 216: 309-314.

- Marin, E., Nussaume, L., Queseda, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Fey, A. und Marion-Poll, A. (1996).** Molecular identification of Zeaxanthin epoxidase of *Nicotina plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15: 2331-2342.
- Matsubara, S., Morosinotto, T., Bassi, R., Christian, A.L., Fischer-Schliebs, E., Luttge, U., Orthen, B., Franco, A.C., Scarano, F.R., Forster, B., Pogson, B.J. und Osmond, C.B. (2003).** Occurrence of the lutein-epoxide cycle in mistletoes of *Loranthaceae* and *Viscaceae*. *Planta* 217: 868-879.
- Matsubara, S., Naumann, M., Martin, R., Nichol, C., Rascher, U., Morosinotto, T., Bassi, R. und Osmond, B. (2004).** Slowly reversible de-epoxidation of lutein-epoxide in deep shade leaves of a tropical tree legume may 'lock-in' lutein-based photoprotection during acclimation to strong light. *J Exp Bot* 56: 461-468.
- Mehler, A.H. (1951).** Studies in the reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33: 65-77
- Mewes H. und Richter M. (2002).** Supplementary ultraviolet-B radiation induces a rapid reversible of the diadinoxanthin cycle in the strong light-exposed diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 130: 1527-1535.
- Mitraki, A. und King, J. (1989).** Protein folding intermediates and inclusion body formation. *BioTechnol.* 7: 690-697.
- Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L. und Bassi, R. (2003).** Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plantarum* 119: 347-354.
- Müller-Moulé, P., Havaux, M., Niyogi, K.K. (2003).** Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 748-760.
- Müller, P., Li, X.-P. und Niyogi, K.K. (2001).** Update on photosynthesis: Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558-1566.
- Nelson, N. und Ben-Shem, A. (2004).** The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 971-982.
- Niyogi, K. K., Grossman, A. R. und Björkman, O. (1998).** *Arabidopsis* Mutants Define a Central Role for the Xanthophyll Cycle in the Regulation of Photosynthetic Energy Conversion. *The Plant Cell*, 10 (7): 1121–1134, July 1998

-
- Niyogi, K.K. (1999).** Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.
- Niyogi, K.K., Shih, C., Chow, W.S., Pogson, B.J., DellaPenna, D. und Björkman, O. (2001).** Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth Res* 67: 139–145.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., Marion-Poll, A. (2007).** The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J.* 2007 Jun;50(5):810-24.
- Nowicka, B., Strzalka, W. und Strzalka, K. (2009).** New transgenic line of *Arabidopsis thaliana* with partly disabled zeaxanthin epoxidase activity displays changed carotenoid composition, xanthophyll cycle activity and non-photochemical quenching kinetics. *J Plant Physiol*
- Odell, J.T., Nagy, F. und Chua, N.-H. (1985).** Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810-812.
- Okamura, M.Y., Paddock, M.L., Graige, M.S. und Feher, G. (2000).** Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* 1458: 148-163.
- Olaizola, M. und Yamamoto, H.J. (1994).** Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* 41: 357-370.
- Öquist, G. und Huner, N.P.A. (2003).** Photosynthesis of overwintering evergreen plants. *Annu Rev Plant Biol* 54: 329-355
- Öquist, G., Anderson, J.M., McCaffery, S. und Chow, W.S. (1992).** Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 188: 422-431.
- Park H.-Y., Seok, H.-Y., Park B.-K., Kim S.-H., Goh C.-H., Lee, B.-h., Lee, C.-H. und Moon Y.-H. (2008).** Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375: 80–85.
- Parry, A.D. und Horgan, R. (1992).** Abscisic acid biosynthesis in roots. I. The identification of potential abscisic acid precursors, and other carotenoids. *Planta.* 187:185–191.
- Paulsen, H. (1995).** Chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Photochem. Photobiol.* 62: 367-382.
- Peter, G.F. und Thornber, J.P. (1991).** Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 16745-16754.

-
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A. und Allen J.F. (1999).** Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397:625-628.
- Pfündel, E. und Bilger, W. (1994).** Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth Res* 42: 89-109.
- Pfündel, E. und Dilley, R.A. (1993).** The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol* 101: 65-71.
- Pogson B.J., Niyogi K.K., Björkman O. und DellaPenna D. (1998).** Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13324–9.
- Pogson, B.J.und Rissler, H.M. (2000).** Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and photoprotection. *Phil Trans R. Soc. B: Biol. Sci.* 355: 1395-1403.
- Quick, W.P. , Stitt, M. (1989).** An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves.“ *Biochim.Biophys.Acta* 977: 287-296.
- Rehm, H. (2006).** Proteinbiochemie/Proteomics. *Der Experimentator*. 5. Auflage. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- Reinhold, C. (2006).** Untersuchungen zur Lichtregulation des Xanthophyllzyklus von *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit an der Heinrich-Heine-Universität, AG Prof. Jahns.
- Reinhold, C., Niczyporuk, S., Beran, K.C. und Jahns, P. (2008).** Short-term down-regulation of zeaxanthin epoxidation in *Arabidopsis thaliana* in response to photo-oxidative stress conditions. *Biochim Biophys Acta* 1777(5): 462-469.
- Rock, C.D. und Zeevaart, J.A.D. (1991).** The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 7496–7499.
- Rokka, A., Aro, E.M., Herrmann, R.G., Andersson, B. und Vener, A.V. (2000).** Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins in plant photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiol* 123 (4): 1525-1536.
- Rossini, S., Casazza, A.P., Engelmann, E.C.M., Havaux, M., Jennings, R.C. und Soave, C. (2006).** Suppression of both ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis* does not affect tolerance to photoinhibition and photooxidative stress. *Plant Physiol* 141: 1264-1273.

-
- Ruban, A.V., Berera, R., Iliaia, C., van Stokkum, I.H.M., Kennis, J.T.M. und Pascal, A.A. (2007).** Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*; 450: 575–578.
- Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J. und Horton, P. (1999).** Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light-harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* Vol. 274: 10458-10465.
- Rudolph, R. und Lilie, H. (1996).** In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10: 49-56.
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. und Fraley, R.T. (1987).** Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res.*, 4: 1543-1558.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M. und Wisman, E. (2001).** Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13:113-123.
- Schreiber, U. (1986).** Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated fluorometer. *Photosynth. Res.* 9: 261-272.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., McCarty, D.R., Welch, W. und Zeevaart, J.A. (2003).** Substrate specificity and kinetics for VP14, a carotenoid cleavage dioxygenase in the ABA biosynthetic pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1619: 9–14.
- Sharp, R.E. und LeNoble, M.E. (2002).** ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany* 53: 33–37.
- Shuman, S. (1991).** Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22):10104-8
- Shuman, S. (1994).** Novel Approach to Molecular cloning and Polynucleotide Synthesis using vaccinia DNA Topoisomerase. *J.Biol.Chem.* 269: 32678-32684.
- Siefermann, D. und Yamamoto, H.Y. (1975).** Light-induced deepoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. IV. The effects of electron-transport conditions on violaxanthin availability. *Biochim. Biophys. Acta* 387: 149-158.
- Simpson, D.J. und Knoetzel, J. (1996).** Light-harvesting complexes of plants and algae: introduction, survey and nomenclature. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Edited by D. R. Ort and C. F. Yocum), pp. 493–506. Kluwer Academic, Dordrecht.

- Standfuss, J., van Scheltinga, A.C.T., Lamborghini, M. und Kühlbrandt, W. (2005).** Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *Embo J.* 24: 919-928.
- Stevens, R.C. (2000).** Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, 8(9):177-185.
- Storf, S., Stauber, E. J., Hippler, M. und Schmid, V. H. R. (2004).** Proteomic Analysis of the Photosystem I Light-Harvesting Antenna in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biochemistry* 43: 9214–9224.
- Sveshnikov, D., Ensminger, I., Ivanov, A.G., Campbell, D., Lloyd, J., Funk, C., Huner, N.P.A. und Öquist, G. (2006).** Excitation energy partitioning and quenching during cold acclimation in Scots pine. *Tree Physiol* 26 (3): 325-336.
- Taiz, L. und Zeiger, E. (2006).** *Plant Physiology*. 4th Edition. Spektrum Akademischer Verlag.
- Tardy, F. und Havaux, M. (1996).** Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 34: 87–94.
- Taylor, I.B., Burbidge, A. und Thompson, A.J. (2000).** Control of abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany* 51: 1563–1574.
- Terpe, K. (2003).** Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*60: 523–533.
- Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K. und Krause, G.H. (1996).** Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Sci.* 115: 237-250.
- Thiele, A., Winter, K. und Krause, G.H. (1997).** Low inactivation of D1 protein of photosystem II in young canopy leaves of *Anacardium excelsum* under high-light stress. *J. Plant Physiol.* 151: 286-292.
- Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A. Morpeth, D.R., Burbidge, A. und Taylor, I.B. (2000).** Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Mol Biol* 42:833-845.

-
- Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G., und Varshavsky, A. (1991).** The N-end rule in bacteria. *Science* 254: 1374-1377.
- Trebst, A. (2003).** Function of beta-carotene and tocopherol in photosystem II. *Z. Naturforsch.* 58: 609-620.
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I. und Arakawa T. (2003).** Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 28 (1): 1-8.
- Van Wijk, K.J. und van Hasselt, P.R. (1993).** Photoinhibition of Photosystem II *in vivo* is preceded by down-regulation through light-induced acidification of the lumen: Consequences for the mechanism of Photoinhibition *in vivo*. *Planta* 189: 359-368.
- Vaucheret, H., Becli, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C. und Vernhettes, S. (1998).** Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant Journal*, 16(6):651-659.
- Verhoeven, A.S., Adams III, W.W., Demmig-Adams, B., Croce, R. und Bassi, R. (1998).** Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *Vinca major*. *Plant Physiology*, 120: 727-737.
- Verhoeven, A.S., Adams, W.W.I. und Demmig-Adams, B. (1996).** Close relationship between the state of the xanthophyll cycle pigments and photosystem II efficiency during recovery from winter stress. *Physiol Plant* 96: 567-576.
- Wang, N., Fang, W., Han, H., Sui, N., Li, B. und Meng, Q.W. (2008).** Overexpression of zeaxanthin epoxidase gene enhances the sensitivity of tomato PSII photoinhibition to high light and chilling stress. *Physiol Plant* 132 (3): 384-396.
- Waterhouse, P.M., Ming-Bo, W. und Lough, T. (2001).** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001, 411:834-842.
- Wehner, A., Grasses, T. und Jahns, P. (2006).** De-epoxidation of violaxanthin in the minor antenna proteins of photosystem II, LHCB4, LHCB5, and LHCB6. *J Biol Chem* 281: 21924-21933.
- Wehner, A., Storf, S., Jahns, P. und Schmid, V.H.R. (2004).** De-epoxidation of violaxanthin in light-harvesting complex I proteins. *J Biol Chem* 279: 26823-26829.
- White C.B., Chen Q., Kenyon G.L. und Babbitt P.C. (1995).** A novel activity of OmpT. Proteolysis under extreme denaturing conditions. *J. Biol. Chem.* 270 (22): 12990-12994.

-
- Woitsch, S. und Römer, S. (2003).** Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiology* 132:1508-1517.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M. und Zhu, J.K. (2002).** Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 8588–8596.
- Xu, C.C., Jeon, Y.A., Hwang, H.J. and Lee, C.H. (1999).** Suppression of zeaxanthin epoxidation by chloroplast phosphatase inhibitors in rice leaves. *Plant Science-Kidlington* 146(1): 27-34.
- Yakushevskaya, A.E., Jensen, P.E., Keegstra, W. van Roon, H. Scheller, H.V., Boekema, E.J. und Dekker, J.P., (2001).** Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 268: 6020-6028.
- Zarter, C.R., Adams, W.W., Ebbert, V., Adamska I., Jansson, S. und Demmig-Adams, B. (2006a).** Winter acclimation of PsbS and related proteins in the evergreen *Arctostaphylos uva-ursi* as influenced by altitude and light environment. *Plant Cell Environ* 29: 869-878.
- Zarter, C.R., Adams, W.W., Ebbert, V., Cuthbertson, D.J., Adamska, I., Demmig-Adams, B. (2006b).** Photosynthetic capacity and light harvesting efficiency during the winter-to-spring transition in subalpine conifers. *New Phytol* 172: 272-282.
- Zhang, S. und Scheller, H.V. (2004).** Light harvesting complex II binds to several small subunits of Photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 279: 3180-3187.
- Zhang, S. und Scheller, H.V. (2004).** Photoinhibition of Photosystem I at Chilling Temperature and Subsequent Recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 45: 1595-1602.
- Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W. und Orth, P. (2001).** Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8Å resolution. *Nature* 409: 739-743.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AtZE1	Zeaxanthin epoxidase-Isoform 1 in <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtZE2	Zeaxanthin epoxidase-Isoform 2 in <i>Arabidopsis thaliana</i>
AtZEP	Zeaxanthin epoxidase-mRNA
Ax	Antheraxanthin
BASTA®	Herbizid (Wirkstoff: Glufosinat-ammonium)
Bp	Basenpaare (Einheit für DNA Länge)
BSA	Rinder Serum Albumin
Ca35S (35S)	<i>Cauliflower mosaic virus</i> -Promotor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chl a / Chl b	Chlorophyll a/b
Col-0 WT	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0 Wildtyp
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DBMIB	Dibromothymoquinone
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser bzw. bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPS	De-epoxidationszustand $((Zx + 0,5Ax) / (Vx + Zx + Ax) \times 100)$
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide (ATP, GTP, CTP, TTP)
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELIP	<i>Early light-induced protein</i>
ET	Elektronentransport
EtBr	Ethidiumbromid
ETK	Elektronentransportkette
F ₀	Grundfluoreszenz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F _M	Maximalfluoreszenz
F _V	variable Fluoreszenz
HA	Hämagglutinin-Anhang
HEPES	Hydroxyethylpiperazineethansulfonsäure
HL	engl. <i>high light</i> (Starklicht)
HLIP	engl. <i>High light-induced protein</i>

HPLC	engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Ig	Immunglobulin
IgG-BD-Anhang	ImmunglobulinG-Bindedomänen-Anhang
kDA	Kilo-Dalton
LB	engl. <i>Left border</i> (linke Grenze)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LHC	engl. <i>Light harvesting complex</i> (Lichtsammelkomplex)
Lhca	engl. <i>Light harvesting complex protein</i> (Protein des Lichtsammelkomplexes des PS I)
Lhcb	engl. <i>Light harvesting complex protein</i> (Protein des Lichtsammelkomplexes des PS II)
LL	engl. <i>low light</i> (Schwachlicht)
Lut	Lutein
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerid
MNE	engl. <i>Mean normalized expression</i>
MS-Medium	Murashige und Skoog – Medium
NADPH	Reduziertes Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NPQ	engl. <i>Non-photochemical-qnching</i> (nicht photochemische Löschung)
NpZE	Zeaxanthin epoxidase in <i>Nicotiana plumbiginifolia</i>
Nx	Neoxanthin
OHP	engl. <i>One-helix protein</i>
PAM	Pulsamplituden-Modulationsprinzip
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
Q _A	festgebundenes Plastochinon
qE	Δ pH-abhängige thermische Energiedissipation
qI	Photoinhibition
qP	photochemische Löschung
RB	engl. <i>right border</i> (rechte Grenze)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RZ	Retentionszeit
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SF	Standardfehler
β-Car	β-Carotin

Strep III	Streptavidin-Anhang
T-DNA	Transfer-DNA
Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase (aus dem Bakterium <i>Thermus aquintus</i>)
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
Vx	Violaxanthin
WT Col-0	Wildtyp: <i>Arabidopsis thaliana</i> (Ökotyp: Columbia-0)
Zx	Zeaxanthin

7.2 AtZE-Sequenzen

Abb.7.1 Proteinkodierender Bereich der cDNA-Sequenz der ersten Spleißvariante (*AtZEP1*) und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode aus *Arabidopsis thaliana*. Das Präprotein (*AtZE1*) beinhaltet 667 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 73 kDa (reifes Protein: 67 kDa). Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen sind rechts angegeben. **Fett gedruckt:** verwendete Oligopeptidsequenz für die Antikörpersynthese (Anti-ZE1 und Anti-ZE2). **ATG:** Startcodon, **TGA:** Stopcodon. **Grau gekennzeichnet:** Unterschied zur Aminosäuresequenz der zweiten Spleißvariante (*AtZEP2*)

```

1 - ATGGGTTCAACTCCGTTTTGCTACTCTATCAATCCATCTCCATCAAAGCTTGATTTACG
  M G S T P F C Y S I N P S P S K L D F T - 20
61 - AGGACCCATGTGTTTAGTCCTGTTTCTAAACAGTTTTACTTAGATTTATCATCGTTTTCC
  R T H V F S P V S K Q F Y L D L S S F S - 40
121 - GGAAAACCCGGAGGAGTATCTGGGTTTAGGAGCCGTCGAGCTTTGCTCGGAGTAAAGGCG
  G K P G G V S G F R S R R A L L G V K A - 60
181 - GCGACGGCGTTAGTTGAGAAGGAGAGAAGAGAGAGGCGGTGACGGAGAAGAAGAAGAAA
  A T A L V E K E E K R E A V T E K K K K - 80
241 - TCGAGGGTTTTAGTTGCCGGAGGTGGAATCGGAGGATTGGTGTGTTGCTTTAGCGGCTAAG
  S R V L V A G G G I G G L V F A L A A K - 100
301 - AAGAAAGGATTCGATGTGTTAGTGTGTTGAGAAAGATTTGAGTGCTATAAGAGGAGAAGGA
  K K G F D V L V F E K D L S A I R G E G - 120
361 - AAATACAGAGGCCCGATTCAAATACAGAGCAACGCTTTAGCTGCTTTGGAAGCTATTGAT
  K Y R G P I Q I Q S N A L A A L E A I D - 140
421 - ATTGAAGTTGCTGAACAAGTTATGGAAGCTGGGTGTATCACTGGTGATCGGATTAACGGT
  I E V A E Q V M E A G C I T G D R I N G - 160
481 - CTCGTTGATGGTATCTCTGGTACTTGGTATGTAAAGTTTTGATACTTTCACTCCTGCGGCG
  L V D G I S G T W Y V K F D T F T P A A - 180
541 - TCACGGGGACTTCCTGTGACTAGAGTAATTAGTAGAATGACTCTGCAGCAGATTCTAGCA
  S R G L P V T R V I S R M T L Q Q I L A - 200
601 - CGTGCGGTTGGAGAAGATGTGATTAGAAACGAGTAATGTTGTTGATTTGAAGATTCT
  R A V G E D V I R N E S N V V D F E D S - 220
661 - GGAGATAAGGTTACTGTGGTACTCGAGAATGGTCAACGCTATGAAGGTGATCTGCTTG TG
  G D K V T V V L E N G Q R Y E G D L L V - 240
721 - GGTGCAGATGGCATTGTTGGTCTAAGGTGAGAAATAATTTGTTTGGCCGTAGTGAAGCTACT
  G A D G I W S K V R N N L F G R S E A T - 260
781 - TATTCAGGCTACACTTGTTACACGGGGATTGCAGATTTTATAACCAGCGGATATCGAGTCT
  Y S G Y T C Y T G I A D F I P A D I E S - 280
841 - GTTGGCTACCGGTTTTCTTGGGACACAAACAGTACTTTGTTTCTTCGGATGTTGGTGGT
  V G Y R V F L G H K Q Y F V S S D V G G - 300
901 - GGAAAATGCAATGGTATGCATTTACAGAGGAACCAGCTGGTGGGGCTGATGCTCCAAAT
  G K M Q W Y A F H E E P A G G A D A P N - 320
961 - GGTATGAAGAAAAGGTTGTTTTGAAATATTTGACGGTTGGTGCACAAATGTAICTGACTTG
  G M K K R L F E I F D G W C D N V L D L - 340
1021 - TTGCATGCGACTGAGGAGGAAGCCATTCTGAGAAGAGATATTTATGATAGAAGTCTGGT
  L H A T E E E A I L R R D I Y D R S P G - 360
1081 - TTTACTTGGGTAAGGGCGTGTTACGCTGCTCGGGGATTCTATCCATGCGATGCAGCCA
  F T W G K G R V T L L G D S I H A M Q P - 380
1121 - AATATGGGTCAAGGTGGATGCATGGCCATTGAGGATAGTTTTCAACTAGCATTGGAGCTT
  N M G Q G G C M A I E D S F Q L A L E L - 400
1181 - GATGAAGCATGGAAACAGAGTGTGAAACGACTACACCTGTTGATGTTGTTTCTCTTTG
  D E A W K Q S V E T T T P V D V V S S L - 420
1241 - AAAAGATATGAGGAATCTAGAAGACTGAGAGTCGCTATTATCCATGCAATGGCGAGGATG
  K R Y E E S R R L R V A I I H A M A R M - 440
1301 - GCTGCAATTATGGCTTCCACTTACAAAGCATACTTAGGTGTTGGGCTTGGTCTCTGTCT
  A A I M A S T Y K A Y L G V G L G P L S - 460
1361 - TTCTTGACAAAGTTTTAGAGTACCACATCCAGGAAGAGTTGGTGGTAGATTCTTCGTTGAC
  F L T K F R V P H P G R V G G R F F V D - 480
1441 - ATTGCTATGCCATCGATGCTTGACTGGGTCCTTGGAGGTAACAGTGAAAACTCCAAGGA
  I A M P S M L D W V L G G N S E K L Q G - 500
1501 - AGGCCACCTAGTTGCAGACTCACTGACAAAGCCGATGACCGGCTTCGAGAGTGGTTTTGAA
  R P P S C R L T D K A D D R L R E W F E - 520

```

1561 - GATGACGATGCTCTTGAACGTACTATAAAGGGGAGAATGGTATCTAATTCCACACGGCGAC
D D D A L E R T I K G E W Y L I P H G D - 540

1621 - GATTGTTGCGTTTTCGGAAACATTATGTCTAACCAAAGATGAAGATCAACCTTGCATCGTC
D C C V S E T L C L T K D E D Q P C I V - 560

1681 - GGAAGCGAACAGATCAAGATTTTCTGGAATGCGCATTGTGATCCCTTCGTCTCAGGTT
G S E P D Q D F P G M R I V I P S S Q V - 580

1741 - TCGAAGATGCATGCTCGTGTGATTTACAAAGACGGAGCTTTCTTCTTGATGGATCTTCGA
S K M H A R V I Y K D G A F F L M D L R - 600

1801 - AGCGAACACGGAACCTATGTGACCGATAACGAAGGAAGAAGATATAGAGCAACACCGAAT
S E H G T Y V T D N E G R R Y R A T P N - 620

1861 - TTTCCCGCGCGTTTTAGATCGTCCGACATCATCGAGTTTGGTTCAGATAAGAAGCGGCGC
F P A R F R S S D I I E F G S D K K A A - 640

1921 - TTTAGGGTGAAAGTAATCAGGAAAACCTCCGAAATCGACGAGGAAGAATGAGAGTAACAAC
F R V K V I R K T P K S T R K N E S N N - 660

1981 - GATAAATTACTTCAGACAGCT**TGA**
D K L L Q T A

Abb.7.2 Proteinkodierender Bereich der cDNA-Sequenz der zweiten Spleißvariante (*AtZEP2*) und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode aus *Arabidopsis thaliana*. Das Präprotein (*AtZE2*) beinhaltet 610 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa (reifes Protein: 61kDa). Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen sind rechts angegeben. **Fett gedruckt:** verwendete Oligopeptidsequenz für die Antikörpersynthese (*Anti-ZE1* und *Anti-ZE2*). **ATG:** Startcodon, **TAA:** Stopcodon. **Grau gekennzeichnet:** Unterschied zur Aminosäuresequenz der ersten Spleißvariante (*AtZEP1*)

1 - **ATG**GGTTCAACTCCGTTTTGCTACTCTATCAATCCATCTCCATCAAAGCTTGATTTACAG
M G S T P F C Y S I N P S P S K L D F T - 20

61 - AGGACCCATGTGTTTAGTCCTGTTTCTAAACAGTTTTACTTAGATTTATCATCGTTTTCC
R T H V F S P V S K Q F Y L D L S S F S - 40

121 - GGAAAACCCGGAGGAGTATCTGGGTTTAGGAGCCGTCGAGCTTTGCTCGGAGTAAAGCGG
G K P G G V S G F R S R R A L L G V K A - 60

181 - GCGACGGCGTTAGTTGAGAAGGAGGAGAAGAGAGAGGCGGTGACGGAGAAGAAGAAGAAA
A T A L V E K E E K R E A V T E K K K K - 80

241 - TCGAGGGTTTTAGTTGCCGGAGGTGGAATCGGAGGATTGGTGTGTTGCTTTAGCGGCTAAG
S R V L V A G G G I G G L V F A L A A K - 100

301 - AAGAAAGGATTCGATGTGTTAGTGTGTTGAGAAAGATTTGAGTGCTATAAGAGGAGAAGGA
K K G F D V L V F E K D L S A I R G E G - 120

361 - AAATACAGAGGCCCGATTCAAATACAGAGCAACGCTTTAGCTGCTTTGGAAGCTATTGAT
K Y R G P I Q I Q S N A L A A L E A I D - 140

421 - ATTGAAGTTGCTGAACAAGTTATGGAAGCTGGGTGTATCACTGGTGATCGGATTAACGGT
I E V A E Q V M E A G C I T G D R I N G - 160

481 - CTCGTTGATGGTATCTCTGGTACTTGGTATGTAAAGTTTTGATACTTTCACTCTCGCGCG
L V D G I S G T W Y V K F D T F T P A A - 180

541 - TCACGGGGACTTCCTGTGACTAGAGTAATTAGTAGAATGACTCTGCAGCAGATTCTAGCA
S R G L P V T R V I S R M T L Q Q I L A - 200

601 - CGTGCGGTTGGAGAAGATGTGATTAGAAACGAGAGTAATGTTGTTGATTTTGAAGATTCT
R A V G E D V I R N E S N V V D F E D S - 220

661 - GGAGATAAGGTTACTGTGGTACTCGAGAATGGTCAACGCTATGAAGGTGATCTGCTTGTG
G D K V T V V L E N G Q R Y E G D L L V - 240

721 - GGTGCAGATGGCATTGTTGGTCTAAGGTGAGAAATAATTTGTTTGGCCGTAGTGAAGCTACT
G A D G I W S K V R N N L F G R S E A T - 260

781 - TATTCAGGCTACACTTGTTACACGGGATTGCAGATTTTATACCAGCGGATATCGAGTCT
Y S G Y T C Y T G I A D F I P A D I E S - 280

841 - GTTGGCTACCGGTTTTCTTGGGACACAAACAGTACTTTGTTTCTTCGGATGTTGGTGGT
V G Y R V F L G H K Q Y F V S S D V G G - 300

901 - GGAAAATGCAATGGTATGCATTTACAGAGGAACCAGCTGGTGGGGCTGATGCTCCAAAT
G K M Q W Y A **F H E E P A G G A D A P N** - 320

961 - GGTATGAAGAAAAGGTTGTTTGAATATTTGACGGTGGTGCACAAATGTACTCGACTTG
G M K K R L F E I F D G W C D N V L D L - 340

1021 - TTGCATGCGACTGAGGAGGAAGCCATTCTGAGAAGAGATATTTATGATAGAAGTCTGGT
L H A T E E E A I L R R D I Y D R S P G - 360

1081 - TTTACTTGGGGTAAAGGGCGTGTACGCTGCTCGGGGATTCTATCCATGCGATGCAGCCA
F T W G K G R V T L L G D S I H A M Q P - 380

```

1121 - AATATGGGTCAAGGTGGATGCATGGCCATTGAGGATAGTTTTCAACTAGCATTGGAGCTT
      N M G Q G G C M A I E D S F Q L A L E L - 400
1181 - GATGAAGCATGGAAACAGAGTGTGAAACGACTACACCTGTTGATGTTGTTTTCCTCTTTG
      D E A W K Q S V E T T T P V D V V S S L - 420
1241 - AAAAGATATGAGGAATCTAGAAGACTGAGAGTCGCTATTATCCATGCAATGGCGAGGATG
      K R Y E E S R R L R V A I I H A M A R M - 440
1301 - GCTGCAATTATGGCTTCCACTTACAAAGCATACTTAGGTGTTGGGCTTGGTCTCTGTCT
      A A I M A S T Y K A Y L G V G L G P L S - 460
1361 - TTCTTGACAAAGTTTAGAGTACCACATCCAGGAAGAGTTGGTGGTAGATTCTTCGTTGAC
      F L T K F R V P H P G R V G G R F F V D - 480
1441 - ATTGCTATGCCATCGATGCTTGACTGGGTCTTGGAGGTAACAGTGAAAACTCCAAGGA
      I A M P S M L D W V L G G N S E K L Q G - 500
1501 - AGGCCACCTAGTTGCAGACTCACTGACAAAGCCGATGACCGGCTTCGAGAGTGGTTTGAA
      R P P S C R L T D K A D D R L R E W F E - 520
1561 - GATGACGATGCTCTTGAACGTACTATAAAGGGAGAATGGTATCTAATTCCACACGGCGAC
      D D D A L E R T I K G E W Y L I P H G D - 540
1621 - GATTGTTGCGTTTTCGGAAACATTATGTCTAACCAAAGATGAAGATCAACCTTCATCGTC
      D C C V S E T L C L T K D E D Q P C I V - 560
1681 - GGAAGCGAACAGATCAAGATTTTCTGGAATGCGCATTGTGATCCCTTCGTCTCAGGTA
      G S E P D Q D F P G M R I V I P S S Q V - 580
1741 - TATAAACTGTATGCATGCTCGTGTGATTTACAAAGACGGAGCTTTCTTCTTGATGGATCT
      Y K L Y A C S C D L Q R R S F L L D G S - 600
1801 - TCGAAGCGAACACGGAACCTATGTGACCGATAA
      S K R T R N L C D R

```

7.3 Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einem paarweisen Sequenzalignment beider *AtZEP*-Spleißvarianten (*AtZEP1* und *AtZEP2*) aus *Arabidopsis thaliana*. Das Alignment wurde mit EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html) nach dem Needleman-Wunsch-Algorithmus durchgeführt. In den ersten 1736 Bp beider Spleißvarianten wurden keine Sequenzunterschiede nachgewiesen. Links ist die Nukleotidposition und die jeweilige Spleißvariante angegeben. **Grau markiert:** Sequenzunterschiede zwischen beiden Spleißvarianten. **Stopcodon der *AtZEP2*** ist fett gedruckt und unterstrichen.
– Gaps (Lücken), • Nukleotidunterschiede

```

ZEP 1   1501 AGGCCACCTAGTTGCAGACTCACTGACAAAGCCGATGACCGGCTTCGAGA
      |
ZEP 2   1501 AGGCCACCTAGTTGCAGACTCACTGACAAAGCCGATGACCGGCTTCGAGA

ZEP 1   1551 GTGGTTTGAAGATGACGATGCTCTTGAACGTACTATAAAGGGAGAATGGT
      |
ZEP 2   1551 GTGGTTTGAAGATGACGATGCTCTTGAACGTACTATAAAGGGAGAATGGT

ZEP 1   1601 ATCTAATTCCACACGGCGACGATTGTTGCGTTTTCGGAAACATTATGTCTA
      |
ZEP 2   1601 ATCTAATTCCACACGGCGACGATTGTTGCGTTTTCGGAAACATTATGTCTA

ZEP 1   1651 ACCAAAGATGAAGATCAACCTTCATCGTCGGAAGCGAACCCAGATCAAGA
      |
ZEP 2   1651 ACCAAAGATGAAGATCAACCTTCATCGTCGGAAGCGAACCCAGATCAAGA

ZEP 1   1701 TTTTCCTGGAATGCGCATTGTGATCCCTTCGTCTCAGGTTTCGAAG----
      |
ZEP 2   1701 TTTTCCTGGAATGCGCATTGTGATCCCTTCGTCTCAGGTATATAAACTGT

ZEP 1   1747 ATGCATGCTCGTGTGATTTACAAAGACGGAGCTTTCTTCTTGATGGATCT
      |
ZEP 2   1751 ATGCATGCTCGTGTGATTTACAAAGACGGAGCTTTCTTCTTGATGGATCT

ZEP 1   1797 TCGAAGCGAACACGGAACCTATGTGACCGATAACGAAGGAAGAAGATATA
      |
ZEP 2   1801 TCGAAGCGAACACGGAACCTATGTGACCGATAA

```

Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. Jahns gilt mein besonderer Dank für die Bereitstellung des Themas und seine hilfreiche Unterstützung.

Frau Prof. Dr. M. Baier möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Pflanzen für die sehr freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken.

Insbesondere Ljudmila, Marc und Nicole Linka danke ich bei der Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung einiger Methoden.

Manu und Maria danke ich für die vielen Gespräche und Diskussionen in unserem Denkraum und für den besten Kaffee der Uni. Außerdem danke ich Maria, Dagmar und Christel für ihre hilfreiche Unterstützung.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich ganz besonders meinem Bruder Thomas, Ralf, Jenny, Ira und Nicole.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Freundin Agi, die mir mit ihrem „Doktor-Survival-Paket“ gut über die Runden geholfen hat. Außerdem danke ich meinem gesamten Freundeskreis für ihre Unterstützung.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während dieser Zeit tatkräftig unterstützt haben und meinem Sohn Samuel für den diesen Zeitraum nicht immer einfach war.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Essen, den 21. Mai 2009

Sylvia Niczyporuk

