



Identifizierung und Charakterisierung verschiedener nicht-photochemischer Löschungskomponenten in *Arabidopsis thaliana*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Manuela Nilkens

aus Straelen

Düsseldorf, Dezember 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: Prof. Dr. P. Jahns
Koreferent: Prof. Dr. A.R. Holzwarth

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Ort der Photosynthese	8
1.2	Die photosynthetische Elektronentransportkette	9
1.3	Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe	10
1.3.1	Aufbau der Photosysteme I und II und Antennenorganisation	10
1.3.2	Lichtsammelkomplexe	11
1.4	Photooxidativer Stress und Schutzmechanismen	13
1.4.1	Nicht photochemische Löschung (NPQ) der Anregungsenergie	14
	pH-abhängiger Mechanismus (qE)	15
	state transition (qT)	16
	Photoinhibition (qI)	17
1.4.2	Der Xanthophyllzyklus	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien	21
2.2	Pflanzenmaterial und Anzuchsbedingungen	21
2.3	Pigmentanalysen	21
2.3.1	Aufbereitung der Pigmentproben	22
2.3.2	Chromatographische Auftrennung der Pigmente	22
2.4	Proteinanalyse über Western Blot	24
2.4.1	Antiseren	24
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentrationen	24
2.4.3	Detektion über SDS-PAGE und Western-Blot	25
2.4.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.4.3.2	Coomassie Färbung von Proteingelen	26
2.4.3.3	Western Blot Analyse	26
2.4.3.4	Immunologischer Nachweis	27
2.5	Isolation von LHCII-Komplexen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
2.5.1	Thylakoidisolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	27

2.5.2	Chlorophyllbestimmung	28
2.5.3	Solubilisierung der Thylakoidmembran	28
2.5.4	Dichtegradientenzentrifugation	28
2.6	Charakterisierung der LHC II-Komplexe	29
2.6.1	Pigmentanalyse	29
2.6.2	Proteinanalyse	29
2.7	Transiente EPR Spektroskopie	29
2.8	Fluoreszenzspektroskopie	30
2.8.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	30
2.8.1.1	Vorbereitung der Messküvette	30
2.8.1.2	Zeitaufgelöste Spektroskopie an Blättern	31
2.8.1.3	Analyse der Daten der zeitaufgelösten Spektroskopie	32
2.8.2	Fluoreszenzmessungen mit dem PAM-Fluorometer	34
2.8.3	Wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie	37
2.9	Vakuuminfiltration mit Nigericin	37
2.10	Bestimmung der Xanthophyllumwandlung während und nach der Belichtung	38
2.10.1	Zeitverlauf der Zeaxanthinbildung	38
2.10.2	Zeitverlauf des Zeaxanthinabbaus	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Die Rolle der Carotinoide bei der Triplettlöschung	39
3.1.1	Isolation der LHC II-Trimere aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
3.1.2	Charakterisierung der LHC II-Trimere	40
3.1.2.1	Western-Blot-Analyse der LHC II-Trimere	40
3.1.2.2	Pigmentanalyse der LHC II-Trimere	41
3.1.3	EPR-Spektren verschiedener <i>A. thaliana</i> LHCII-Trimere	43
3.2	Charakterisierung der NPQ-Prozesse	44
3.2.1	Verwendete Pflanzen	45
3.2.2	Bestimmung der Pigment- und Proteinzusammensetzung in den verschiedenen Mutanten	46
3.2.2.1	Pigmentzusammensetzung	46
3.2.2.2	Proteinzusammensetzungen der verschiedenen Mutanten	47
3.2.3	Fluoreszenzlöschungskinetiken gemessen mit dem PAM Fluorometer	48

3.3	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	50
3.3.1	Fluoreszenzabklinkkurven	50
3.3.2	Decay Associated Emission Spectra (DAS)	52
3.4	Wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie	59
3.5	Untersuchungen zur Dynamik der NPQ Prozesse mittels PAM Fluorometrie	65
3.5.1	NPQ Induktion	65
3.5.2	NPQ Relaxation	69
3.6	Dynamik der Bildung und Epoxidation von Zx	74
3.7	Dynamik des NPQ bei verschiedenen Belichtungsintensitäten	77
3.8	Erweitertes NPQ-Modell	79
4	Diskussion	81
4.1	EPR Spektroskopische Untersuchungen an isolierten LHC II Komplexen	81
4.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zum NPQ	83
4.2.1	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie	84
4.2.2	Wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie	85
4.2.3	PAM Fluorometrie	86
4.2.3.1	Die qE Komponente des NPQ	87
4.2.3.2	Die qZ Komponente des NPQ	88
4.2.3.3	Die qI Komponente des NPQ	91
4.2.3.4	Modell für die NPQ Prozesse in PS II	91
5	Zusammenfassung	94
5	Summary	96
6	Literatur	98
7	Anhang	111
7.1	Abkürzungsverzeichnis	111
7.2	Danksagung	113
7.3	Eidesstattliche Erklärung	114

1 Einleitung

Pflanzen sind auf das Sonnenlicht als essentielle Energiequelle angewiesen. An ihren festen Standorten sind sie jedoch häufig extremen Schwankungen der Lichtintensität, der Temperatur, sowie der Wasser- und Nährstoffversorgung ausgesetzt. Insbesondere Änderungen der Lichtintensität stellen ein großes Problem für Pflanzen dar, da sie einerseits eine ausreichende Menge an Lichtenergie benötigen, um eine effiziente Photosynthese betreiben zu können, andererseits aber, bei zu starker Lichteinstrahlung, durch die lichtinduzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)(= photo-oxidativer Stress) Schaden nehmen können. Photo-oxidativer Stress tritt jedoch nicht nur unter Starklichtbedingungen auf, sondern kann auch schon bei niedrigen Lichtintensitäten von Bedeutung sein, wenn die Photosynthese durch weitere abiotische Stressfaktoren, wie z.B. Kälte oder Trockenheit limitiert ist (Demmig-Adams und Adams, 1992). Die beiden Photosysteme (PS I und PS II) sind in Pflanzen für die lichtgetriebene Umwandlung von Sonnenenergie in chemische Energie verantwortlich. Da die Größe der Antennensysteme von PS I und PS II nicht kurzfristig geändert werden kann, verfügen Pflanzen über eine Anzahl effizienter Regulations- und Schutzmechanismen, die der schnellen Anpassung, an variable Lichtbedingungen, dienen. So kann z.B. die Bildung von ROS durch Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie vermindert werden (Niyogi, 1999) oder bereits gebildete ROS durch Antioxidantien, wie α -Tocopherol (Fryer, 1992) oder Carotinoide wie Lutein (Lut) oder β -Carotin (β -Car), entgiftet werden.

1.1 Ort der Photosynthese

Die pflanzliche Photosynthese findet in speziellen Organellen, den Chloroplasten, statt (Abb. 1.1). Eine doppelte Hüllmembran trennt die Chloroplasten vom Cytosol der Zellen. Der Innenraum der Chloroplasten, das Stroma, wird von einem weiteren Membransystem, der Thylakoidmembran, durchzogen. Diese liegt in Form von gestapelten Grana- bzw. ungestapelten Stromathylakoiden vor. Die Thylakoidmembran grenzt einen abgeschlossenen Innenraum, das Thylakoidlumen, vom Stroma der Chloroplasten ab. In der Thylakoidmembran sind alle, am photosynthetischen Elektronentransport beteiligten Proteinkomplexe (PS I, PS II, der Cytochrom b_6f -Komplex und die ATP-Synthase) lokalisiert.

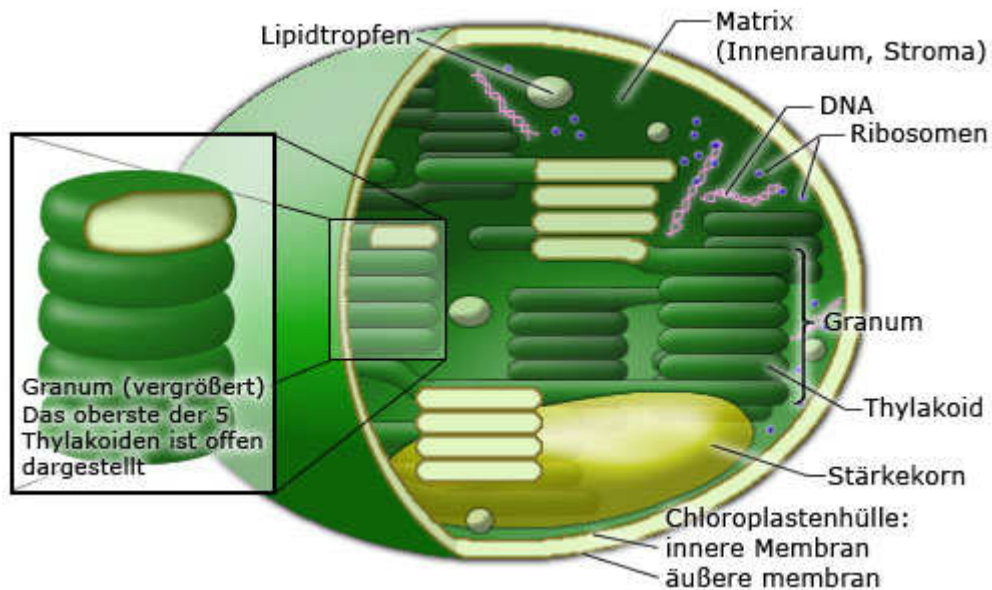


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Chloroplasten im Querschnitt. Das Stroma erfüllt den Innenraum des Chloroplasten und die Thylakoide liegen als Granastapel geschichtet oder frei im Stroma vor (Aus: Lukopolis, Biologie 2008).

1.2 Die photosynthetische Elektronentransportkette

Der lichtgetriebene Elektronentransport wird von den beiden Photosystemen (PS I, PS II) und dem Cytochrom b_6/f (Cyt b_6/f) Komplex geleistet (Abb. 1.2). Diese integralen Proteinkomplexe sind durch die mobilen Elektronencarrier Plastochinon (PQ) und Plastocyanin (PC) verbunden. Der Elektronentransport wird durch die Lichtreaktion in den beiden Photosystemen angetrieben. Die Anregung des P680 im PS II bzw. des P700 im PS I induziert eine Ladungstrennung, was einen Elektronentransfer auf die sekundären Akzeptoren (Q_A im PS II und $NADP^+$ am PS I) ermöglicht. Das entstandene $P680^+$ im Reaktionszentrum des PS II wird in Folgereaktionen durch Elektronen aus der Wasseroxidation wieder reduziert, wohingegen im PS I eine Reduktion des $P700^+$ durch den linearen Elektronentransport erreicht wird. An den Elektronentransport gekoppelt ist ein Protonentransport. Dabei werden Protonen, die aus der Oxidation des Wassers am PS II und der Oxidation des Plastochinols (PQH_2) am Cyt b_6/f -Komplex entstehen, in das Thylakoidlumen freigesetzt. Dies führt zu einer Ansäuerung des Lumens. Zusammen mit der gleichzeitigen Alkalisierung des Stromas durch die Reduktion von PQ und $NADP^+$ an der Akzeptorseite der beiden Photosysteme, wird so ein transmembraner Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut. Die damit verbundene protonenmotorische Kraft wird von einem weiteren Membranprotein, der CF_0/CF_1 -ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt (Abbildung 1.2).

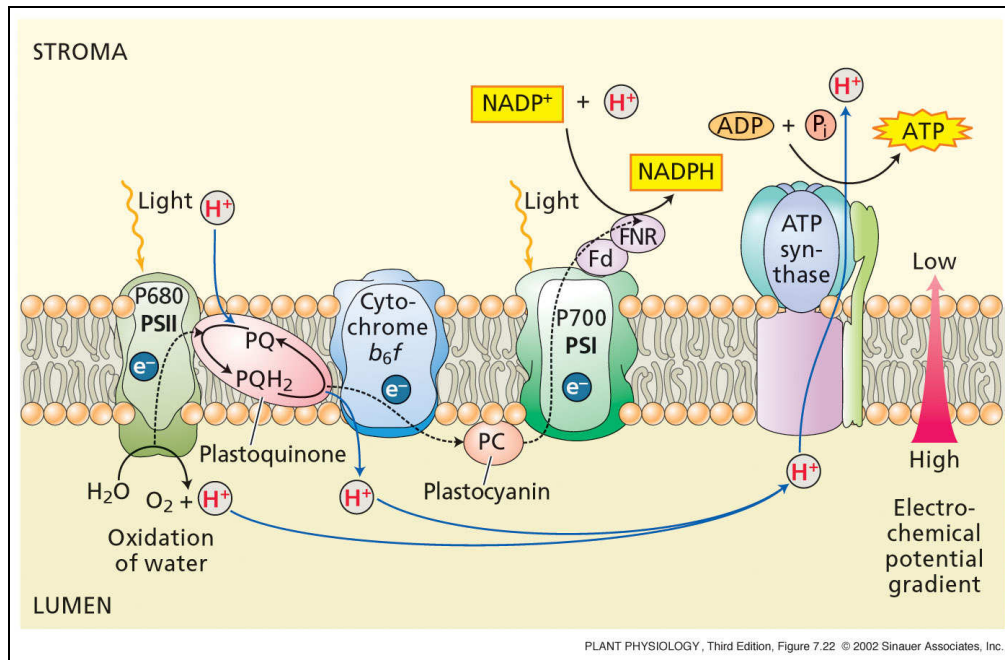


Abbildung 1.2: Die photosynthetische Elektronentransportkette. (Aus: Taiz und Zeiger, 2002). Dargestellt sind die in der Thylakoidmembran lokalisierten Proteinkomplexe, sowie der Weg der Elektronen vom PS II zum Endakzeptor NADP^+ und die Protonentransfer-Reaktionen zur Synthese von ATP. Das PS II befindet sich hauptsächlich in den Granathylakoiden und ist somit von dem überwiegend in den Stromathylakoiden vorkommenden PS I lateral getrennt.

Neben der Nutzung für die ATP-Synthese hat der transmembrane Protonengradient eine essentielle Bedeutung für die Regulation der Photosynthese. So vermittelt der Protonengradient zum einen (über die pH-Abhängigkeit der PQH_2 -Oxidation am Cyt b_6/f -Komplex) die photosynthetische Kontrolle des Elektronentransportes. Darüber hinaus spielt der Protonengradient jedoch auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Löschung überschüssiger Anregungsenergie in PS II (vgl. Kapitel 1.4).

1.3 Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe

1.3.1 Aufbau der Photosysteme I und II und Antennenorganisation

PS II ist ein Multiproteinkomplex, der in der Membran als Dimer vorliegt und aus mindestens 25 Untereinheiten besteht (Hankamer et al., 1997; Yakushevskaya et al., 2003). Den Kernkomplex des PS II bilden die Reaktionszentrumsproteine D1 und D2, sowie die innere Antenne, die von den beiden Proteinen CP43 und CP47 gebildet wird. Dieser Kernkomplex ist umgeben von peripheren Chl a/b -bindenden Antennenproteinen, welche als Lhcb-Proteine (Lhcb1-6) bezeichnet werden (Jansson et al., 1999; Morosinotto et al., 2003; vgl. Abbildung 1.3).

Das PS I liegt in der Thylakoidmembran als Monomer vor und besteht aus mindestens 14 verschiedenen Untereinheiten (Ben-Shem et al., 2003). Ähnlich wie im PS II ist auch im PS I das Reaktionszentrum, bestehend aus den beiden Proteinen PsaA und PsaB, von einer peripheren Antenne umgeben. Es handelt sich dabei um einen membranassoziierten Antennenkomplex, der aus 5 unterschiedlichen monomeren Antennenproteinen, Lhca1 bis Lhca5 besteht (Ganeteg et al., 2004).

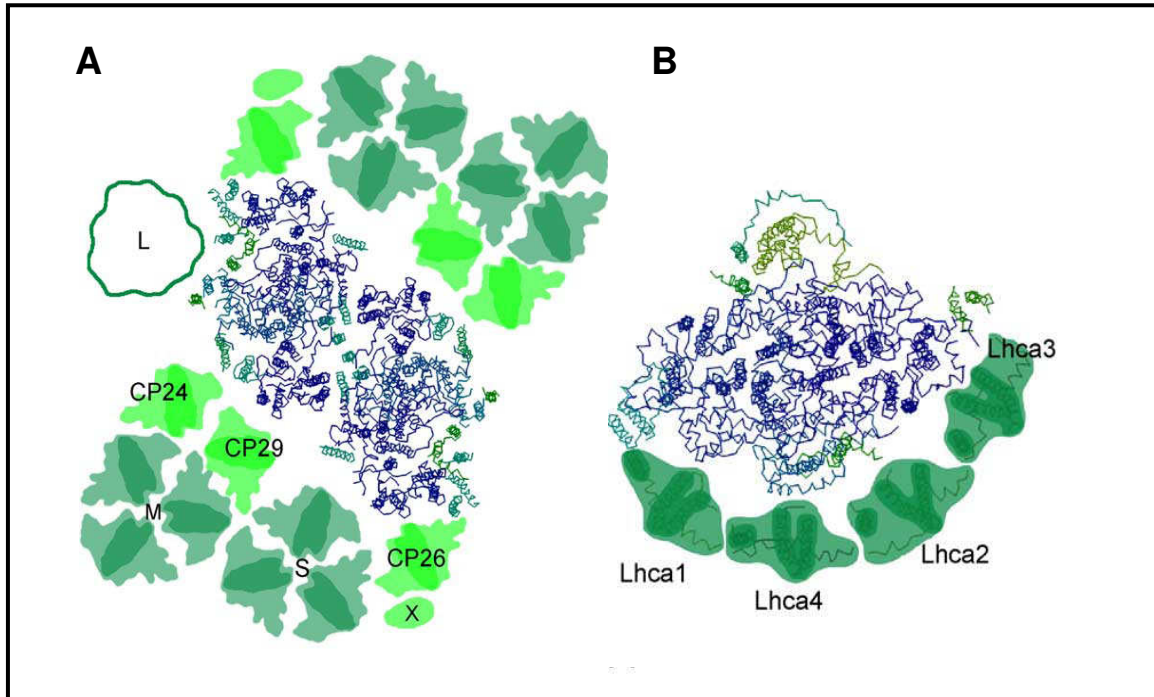


Abbildung 1.3: Strukturen des PS II-LHC II Superkomplexes (A) und des PS I (B) in Aufsicht (Dekker und Boekema, 2005). Dargestellt sind jeweils die Proteingerüste der Kerne des PS I und des PS II, sowie die umgebenden Antennen. **A:** Die minoren Antennepoteine Lhcb4 (CP29), Lhcb5 (CP26) und Lhcb6 (CP24) sowie die LHC II-Komplexe, welche stark (S) oder moderat (M) gebunden oder in Spinat zusätzlich vorliegen (L) sind farblich hervorgehoben. **B:** Ebenfalls farblich unterlegt sind die PS I-Antennenproteine Lhca1 bis Lhca4.

1.3.2 Lichtsammelkomplexe

Neben den Lhca- und Lhcb-Proteinen, die in ihrer Gesamtheit als LHC Proteine bezeichnet werden, gehören auch ELIPs und in Cyanobakterien HLIPs (*early light* und *high light induced proteins*), sowie das PsbS-Protein (Jansson, 1999) zu der sogenannten Lichtsammelkomplex-Superfamilie (Jansson, 1999). Die ELIPs und HLIPs nehmen wahrscheinlich eine photoprotektive Funktion ein (Hutin et al., 2003). Für das PsbS-Protein werden verschiedene Funktionen vermutet, die aber bislang nicht eindeutig geklärt werden konnten. Es ist unumstritten, dass das PsbS-Protein eine essentielle Rolle bei der Löschung überschüssiger Anregungsenergie spielt (Li et al., 2000) und zwei Glutaminsäure-Reste (E122 und E226) dabei als Sensor für den pH im Thylakoidlumen fungieren (Li et al., 2004). Jedoch konnte die Vermutung, dass das PsbS-Protein den Ort

der nicht-photochemischen Löschung darstellt (Li et al., 2000) oder Pigmente bindet (Funk et al., 1995) nicht bestätigt werden. Die Verwandtschaft der bisher bekannten LHC-Proteine ist in Abb. 1.4 dargestellt. Die LHC-Proteine bilden eine Familie homologer Proteine, die alle kerncodiert sind und Molekulargewichte von 20-30 kDa aufweisen (Jansson, 1999).

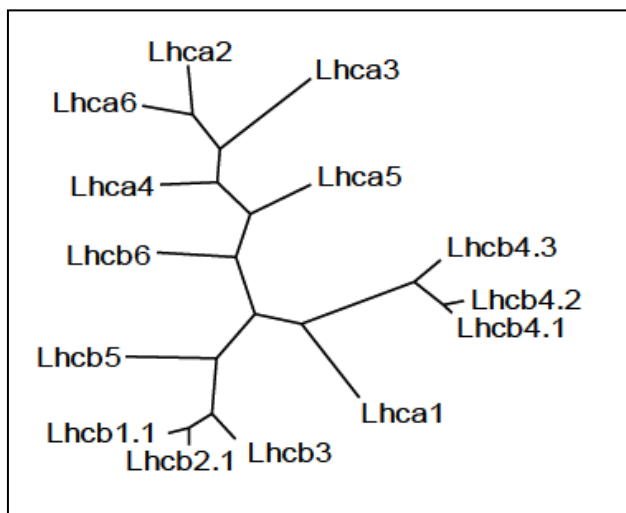


Abbildung 1.4: Die Verwandtschaft innerhalb der LHC-Proteine. Berücksichtigt wurden ebenfalls einige Genkopien, die das gleiche Protein codieren (*Lhcb4. 1-3*), sowie das *Lhca6*-Gen, dessen Aufgabe noch unbekannt ist (Abbildung leicht verändert nach Jansson, 1999).

Die Antenne des PS I besteht aus 5 monomeren Proteinen, die Lhca1 bis Lhca5 genannt werden. Dabei bilden Lhca1 mit Lhca4 und Lhca2 mit Lhca3 Heterodimere, die halbkreisförmig um das PS I-Reaktionszentrum angeordnet sind (Ben-Shem et al., 2003) (Abb. 1.3). Die Rolle des Lhca5-Proteins ist noch nicht geklärt, ebenso wie unklar ist, ob Lhca6 nicht möglicherweise ein modifiziertes Lhca2-Protein darstellt (Jansson et al., 1999; Ganeteg et al., 2004; Storf et al., 2004). Die Antenne des PS II besteht aus 6 Lichtsammelkomplexen, den sogenannten Lhcb-Proteinen, die in 2 Gruppen unterteilt werden. Zum einen gibt es den trimeren LHC II-Komplex und zum anderen die minoren Antennenproteine Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6. Bei dem LHC II-Komplex handelt es sich um Homo- und Heterotrimere bestehend aus den Proteinen Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 (Jansson, 1999; vgl. auch Abb. 1.3). Die Lhcb1 Homotrimere und die Lhcb1/Lhcb2 Heterotrimere können als Antenne für beide Photosysteme fungieren, wo hingegen Trimere, die Lhcb3 beinhalten vermutlich nur mit PS II assoziiert sind (Larsson et al., 1987). Lhcb1 wird in *A. thaliana* von fünf verschiedenen Genen codiert, Lhcb2 von vier verschiedenen Genen und Lhcb3 dagegen nur von einem einzelnen Gen (Leutweiler et al., 1986; McGrath et al., 1992; Jansson 1999). Die trimeren LHC II-Komplexe, deren dreidimensionale Struktur (Abb. 1.5) mit einer Auflösung von bis zu 2,5Å aufgeklärt worden ist (Liu et al., 2004; Standfuß et al., 2005), binden mehr als 50% des gesamten Chlorophylls und stellen die Hauptkomponente der Lichtsammelkomplexe dar.

Bei den minoren Antennen Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6, welche auch häufig noch mit den früheren Synonymen CP29, CP26 und CP24 (Bassi et al., 1993) bezeichnet werden,

handelt es sich um monomere Chl a/b-bindende Proteine (Jansson et al., 1999). Nicht zuletzt aufgrund ihrer Lokalisation zwischen den peripher angeordneten LHC II-Trimeren und dem Reaktionszentrum wurde den minoren Antennenproteinen eine besondere Funktion für die strukturelle Organisation der PS II-Antenne und die optimale Quantenausbeute des PS II zugeschrieben (Yakushevskaya et al., 2003).

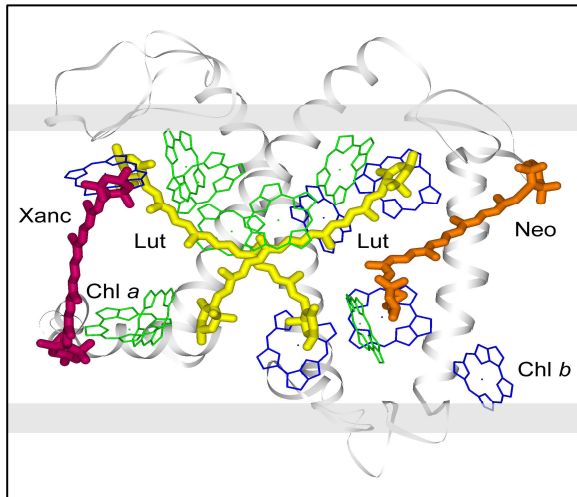


Abbildung 1.5: Struktur des LHC II-Komplex (nach Liu et al., 2004). Das Proteingrundgerüst ist in grau angedeutet und die gebundenen Pigmente sind farblich hervorgehoben.

8 Chl a (grün); 2 Luteine (gelb)
1 Xanthophyllzykluspigment (rot)
6 Chl b (blau); 1 Neoxanthin (orange)

Alle LHC-Proteine haben neben Chl a und Chl b zusätzlich bis zu vier Carotinoide gebunden, welche im Wesentlichen strukturelle und photoprotektive Funktionen besitzen. Obgleich die Carotinoidausstattung der einzelnen LHC-Proteine unterschiedlich ist, befinden sich in allen LHC-Proteinen 2, 3 oder 4 Carotinoid-Bindestellen (Morosinotto et al., 2003). Alle LHCs haben gemeinsam, dass sie mindestens 1 Lut und 1 Violaxanthin (Vx) gebunden haben. In einigen LHC-Typen ist zusätzlich ein weiteres Lut und/oder Neoxanthin (Nx) gebunden (Morosinotto et al., 2003). Von den Carotinoiden besitzt das Vx eine besondere Funktion, da es im sogenannten Xanthophyllzyklus (Eskling et al., 1997; Jahns et al., 2009) in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen zu Zeaxanthin (Zx) umgewandelt werden kann (vgl. Abschnitt 1.4.2). Für das Zx wurde eine essentielle Rolle bei der pH-regulierten Energiedissipation (siehe Abschnitt 1.4.1) nachgewiesen und über eine besondere Funktion der minoren Antennenproteine Lhcb4 bis Lhcb6 in diesen Prozessen spekuliert (Yamamoto & Bassi, 1996; Bassi & Caffari, 2000).

trimer

1.4 Photo-oxidativer Stress und Schutzmechanismen

Photo-oxidativer Stress entsteht dann, wenn mehr Lichtenergie von den Antennen absorbiert wird, als im photosynthetischen Elektronentransport genutzt werden kann. Unter diesen Bedingungen erhöht sich die Lebensdauer eines angeregten Singulett-

Chlorophylls ($^1\text{Chl}^*$) und damit die Wahrscheinlichkeit, dass es durch sogenanntes „intersystem crossing“ zur Bildung von Triplett-Chlorophyll ($^3\text{Chl}^*$) kommt (Niyogi, 1999). Das $^3\text{Chl}^*$ ist langlebiger, als das $^1\text{Chl}^*$ und reagiert sehr leicht mit Sauerstoff (O_2), was zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) führt. $^1\text{O}_2$ ist sehr reaktiv und kann Proteine, Pigmente und Lipide in schneller Zeit irreversibel zerstören. Zum anderen kann es bei der sogenannten Mehler-Reaktion (Mehler, 1951) zur Bildung eines Superoxidradikals ($\cdot\text{O}_2^-$) kommen, wenn Elektronen vom PS I auf O_2 übertragen werden. Durch dieses Radikal werden in der Zelle vorkommende Ionen wie Fe^{3+} oder Cu^{2+} reduziert. Das Enzym Superoxid-Dismutase setzt $\cdot\text{O}_2^-$ unter Aufnahme von zwei Protonen in O_2 und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) um. Bereits H_2O_2 wirkt durch seine relativ lange Halbwertszeit und ein hohes Oxidationspotential schädigend. Jedoch kann auf zwei verschiedenen Reaktionswegen das weitaus gefährlichere Hydroxyl-Radikal gebildet werden, welches sich durch eine ganz besonders hohe Reaktivität auszeichnet. Die erste Möglichkeit ist die Reduktion von H_2O_2 durch in Spuren auftretende, katalytisch wirksame, zweiwertige Metallionen (Me^{2+}), wobei hier in einer Fenton-Typ-Reaktion $\cdot\text{OH}$ und das oxidierte Metallion (Me^{3+}) entstehen. Eine zweite Möglichkeit besteht in der gemeinsamen Redoxreaktion von H_2O_2 und $\cdot\text{O}_2^-$, welche auch Haber-Weiss-Reaktion genannt wird (Haber und Weiss 1934). Die Produkte $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ werden als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst. ROS besitzen ein hohes Schädigungspotential für Lipide, Proteine, Pigmente sowie Nukleinsäuren und müssen daher effizient entfernt werden (Triantaphyllides und Havaux, 2008). Bereits entstandene ROS können mit Hilfe von Antioxidantien, wie Ascorbat und Glutathion (Foyer et al., 1994) oder α -Tocopherol (Fryer, 1992) unter Beteiligung einer Vielzahl von Enzymen wie Ascorbat-Peroxidase (Asada, 1994), Superoxid-dismutase (Bowler et al., 1994), sowie Dehydroascorbatreduktase und Glutathionreduktase (Polle, 1997) beseitigt werden. Eine zweite, sehr wichtige pflanzliche Schutzstrategie zur Vermeidung photo-oxidativer Schädigung ist die Verminderung der Bildung von ROS durch Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie in PS II, auch nicht-photochemische Löschung (NPQ) der Anregungsenergie genannt. Da Untersuchungen zum NPQ im Zentrum dieser Arbeit stehen, sind die wichtigsten Grundlagen zu den daran beteiligten Schutzmechanismen im Folgenden, etwas detaillierter zusammengefasst.

1.4.1 Nicht photochemische Löschung (NPQ) der Anregungsenergie

Das NPQ spielt eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Photoprotektion. Mindestens drei verschiedene Prozesse tragen zum NPQ bei (Krause und Jahns, 2004): (i) qE, der pH-regulierte Lösungsmechanismus in der Antenne des PS II (Krause et al., 1982), (ii) qT,

der „state transition“ Mechanismus (Benett et al., 1980) und (iii) qI, der als Photoinhibition bezeichnete Prozess (Krause, 1988). Die Unterscheidung dieser drei Komponenten wurde ursprünglich anhand von Messungen der Chlorophyllfluoreszenzlöschung vorgenommen, wobei insbesondere die Relaxationskinetik der Fluoreszenzlöschung, die unter sättigenden Lichtbedingungen induzierbar war, als wesentliches Unterscheidungskriterium zugrunde gelegt wurde (Quick und Stitt, 1989). Dabei wurde eine schnelle Phase ($\tau_{1/2} = 1-2$ min) dem qE Mechanismus zugeschrieben, eine mittlere Phase ($\tau_{1/2} = 5-10$ min) dem qT Prozess und eine langsame Phase ($\tau_{1/2} = >60$ min) dem qI zugeordnet. Spätere Analysen zur Lichtabhängigkeit der verschiedenen Phasen zeigten jedoch, dass die nach Vorbelichtung unter sättigenden Lichtbedingungen beobachtete mittlere Phase der Fluoreszenzrelaxation eher nicht dem qT zugeordnet werden kann, da qT nur bei niedrigen Lichtintensitäten einen wesentlichen Beitrag zum NPQ liefert, die mittlere Phase der NPQ Relaxation jedoch unter hohen Lichtbedingungen besonders ausgeprägt war (Walters & Horton, 1991). Es wurde daher spekuliert, dass die mittlere Phase der NPQ Relaxation möglicherweise eine zweite qE Komponente darstellen könnte (Walters & Horton, 1991) oder alternativ photoinhibitorischen Prozessen (Krause & Jahns, 2003) zugeordnet werden kann.

pH-abhängiger Mechanismus (qE)

Der pH-abhängige qE Mechanismus des NPQ stellt selbst bei kurzen Belichtungszeiten (bis zu 30 min) und sättigenden Lichtintensitäten die Hauptkomponente der nicht-photochemischen Löschung dar. Es ist zwar schon lange bekannt, dass qE strikt durch den transmembranen pH-Gradienten (und damit der Energetisierung der Thylakoidmembran) reguliert wird (Briantais et al., 1979), der genaue molekulare Mechanismus des qE ist allerdings bis heute noch unklar. Eine Vielzahl von Studien haben belegt, dass die qE Komponente auf einer synergistischen Wirkung des luminalen pH, des PsbS-Proteins und des Xanthophylls Zx beruht (in Übersicht dargestellt in Krause und Jahns, 2003). Die Ausbildung des qE ist essentiell abhängig vom luminalen pH und dem PsbS-Protein. In Abwesenheit von PsbS (Li et al., 2000) ist qE vollständig unterdrückt, während die Überexpression von PsbS (Li et al., 2004) eine Erhöhung des qE bewirkt. Die zentrale Rolle des PsbS-Proteins wird so verstanden, dass zwei Glutaminsäurereste (E122 und E226) des Proteins als Sensor für den luminalen pH fungieren (Li et al., 2002) und Konformationsänderungen in der Antenne von PS II induzieren, die zur Ausbildung von qE führen. Die maximale Ausbildung des qE benötigt jedoch nicht nur einen hohen pH-Gradienten über der Thylakoidmembran und die Anwesenheit von PsbS, sondern wird zudem auch durch die Umwandlung von Vx in Zx moduliert (Demmig-Adams, 1990;

Niyogi et al., 1998). Sowohl das Ausmaß als auch die Kinetik der Bildung und Relaxation des qE wird dabei durch die Menge des verfügbaren Zx beeinflusst (Niyogi et al., 1998, Johnson et al., 2009). Es wurde vorgeschlagen, dass qE sich aus einer Zx-abhängigen und einer Zx-unabhängigen Komponente zusammensetzt, wobei jedoch unklar ist, ob diese beiden qE-Komponenten auf verschiedenen Mechanismen zurückzuführen sind. Trotz intensiver Untersuchungen des qE Mechanismus seit mehr als 20 Jahren, sind die zentralen Fragen zum qE (Lokalisation, Mechanismus, Rolle des Zx) bis heute ungeklärt. So wird immer noch diskutiert, ob möglicherweise auch Prozesse im Reaktionszentrum zu qE beitragen (Finazzi et al., 2004; Ivanov et al., 2008), obgleich die überwiegende Zahl der Studien eine Lokalisation in der PS II-Antenne favorisieren (Übersicht: Horton, 1996; Niyogi, 1999; Krause und Jahns, 2003). Innerhalb der PS II-Antenne wurden sowohl die majoren LHC II-Trimere (Horton et al., 2005; Ruban et al., 2007) als auch die minoren Antennenproteine Lhcb4 bis Lhcb6 (Bassi et al., 1993, Crofts & Yerkes, 1994; Gilmore et al., 1996, Avenson et al., 2008) als Löschungsort vorgeschlagen. Unter allen bisher untersuchten Knockout-Mutanten für die einzelnen Antennenproteine, konnte bislang jedoch nur für CP24 eine essentielle Rolle für das qE nachgewiesen werden (de Bianchi et al., 2008), was eine besondere Rolle von CP24 bei der Bildung des qE nahelegt. Der molekulare Mechanismus der qE Löschung ist ebenfalls noch ungeklärt. So wird ein Energietransfer von Chl auf Zx (Holt et al., 2005) ebenso vermutet, wie ein Energietransfer auf Lut (Ruban et al., 2007) oder die Bildung eines Chl-Chl „Charge-transfer“-Zustandes (Miloslavina et al., 2008). Schließlich wird auch noch die Rolle des Xanthophylls Zx im Hinblick auf eine direkte (Holt et al., 2005) oder indirekte (Horton et al., 2005) Funktion bei der Energielöschung, im qE kontrovers diskutiert. Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen an Diatomeen (Miloslavina et al., 2009) lieferten kürzlich jedoch erste Hinweise darauf, dass möglicherweise zwei unterschiedliche Mechanismen mit unterschiedlicher Lokalisation am qE beteiligt sein könnten. Zum einen ein Löschungsort, welcher in PS II-Antennenkomplexen, die unter Belichtung vom PS II abgelöst werden, lokalisiert ist, sowie ein Zx-abhängiger Löschungsort, der in den am PS II gebundenen Antennenkomplexen lokalisiert sein könnte. Die Existenz von zwei parallel arbeitenden Löschungsorten könnte eine Erklärung für die widersprüchlichen Modelle zur Lokalisation, zum Mechanismus und zur Rolle des Zx liefern.

state transition (qT)

Der qT Mechanismus scheint im Vergleich mit qE und qI bei Pflanzen eine untergeordnete Rolle zu spielen (Niyogi, 1999). Nur bei niedrigen, nicht sättigenden Lichtintensitäten ist qT in signifikantem Maße an der Löschung der Fluoreszenz beteiligt. Die Löschung nach

diesem Mechanismus geht auf die reversible Verkleinerung der PS II-Antenne durch eine reversible Ablösung von LHC II-Proteinen zurück (Bennett et al., 1980). Die Ablösung der LHC II-Proteine wird durch Phosphorylierung (innerhalb von 5-15 min) induziert.

Diese assoziieren mit dem PS I, um dort als lichtsammelnde Antenne zu dienen (Nilsson et al., 1997; Lunde et al., 2000; Pesaresi et al., 2002). Im Dunkeln oder im Schwachlicht ist dieser Prozess nach Dephosphorylierung ebenfalls in etwa 5-15 min reversibel unter Rückbindung des LHC II an das PS II. Die beteiligte Kinase wird dabei über den Redoxzustand des Plastochinonpools reguliert (Pfannschmidt et al., 1997).

Photoinhibition (ql)

Die Löschung der Fluoreszenz nach dem ql-Mechanismus basiert auf Prozessen, die allgemein als Photoinhibition bezeichnet werden. Photoinhibition ist definiert als eine nur langsam (im Bereich von Stunden) reversible, Inhibition der Photosynthese, welche jedoch nicht nur schädigende, sondern auch regulatorische und schützende Prozesse umfasst (Osmond, 1994). Das primäre Ziel der Photoinhibition ist PS II. Die Inhibition von PS II tritt in der Regel erst nach langanhaltender Starklichteinwirkung in bedeutendem Maße auf. In Kombination mit anderen Stressfaktoren wie Frost, Hitze und Trockenheit, kann ql aber auch schon in kürzeren Zeiträumen einen erheblichen Anteil am NPQ ausmachen. Auch der ql-Mechanismus ist noch nicht verstanden, jedoch geht die Photoinhibition mit einer Donor-seitigen oder Akzeptor-seitigen Schädigung des D1-Proteins einher (Übersichtsartikel: Krause & Jahns, 2004). Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung von Zx am ql diskutiert, wobei ein möglicher Zx-abhängiger Teil des ql im Anschluss an Lichtstress parallel zur Umwandlung von Zx zu Vx schnell (10-30 min) reversibel ist, während ein sehr langsam relaxierender Anteil (bis zu mehreren Stunden) der Reparatur des D1-Proteins zugeschrieben wurde (Leitsch et al., 1994).

1.4.2 Der Xanthophyllzyklus

Der Xanthophyllzyklus (Abb 1.6) beschreibt die lichtabhängige und reversible Umwandlung von Vx in Zx über das Intermediat Antheraxanthin (Ax) (Yamamoto et al., 1962). Die beiden Reaktionen (De-epoxidation und Epoxidation) werden von zwei Enzymen katalysiert, die auf den gegenüberliegenden Seiten der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Übersichtsartikel: Pfündel und Bilger, 1994, Eskling et al., 1997; Jahns et al., 2009). Beide Enzyme, die im Thylakoidlumen lokalisierte Vx-De-epoxidase (VDE) und die im Chloroplastenstroma lokalisierte Zx Epoxidase (ZE), sind lösliche Enzyme und gehören zu der Familie der Lipocalin-Proteine (Hieber et al., 2000). Die Bildung von Zx aus Vx wird von der VDE katalysiert und strikt über den pH-Wert im Thylakoidlumen

reguliert. Während die VDE bei einem pH > 6,5 inaktiv ist, wird das Enzym in einem sehr engen pH-Bereich zwischen 6,5 und 5,8 vollständig aktiviert. Über diese pH-Regulation wird sicher gestellt, dass Zx nur unter sättigenden Lichtbedingungen in größeren Mengen synthetisiert wird. Die Umwandlung von Vx zu Zx erfolgt unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen im Zeitbereich von 10-30 min (Siefermann-Harms, 1977). Typischerweise ist ein Teil des Xanthophyllzykluspigment-Pools (VAZ-Pool) von etwa 10-30 % nicht für die Umwandlung zu Zx zugänglich, was auf die Bindung von Vx an spezifische Carotinoid-Bindestellen in den Antennenproteinen beider Photosysteme zurückgeführt worden ist (Jahns et al., 2001; Wehner et al., 2004; Wehner et al., 2006). Im Gegensatz dazu verläuft die Rückumwandlung des Zx zu Vx durch die ZE im Dunkeln oder unter Schwachlicht deutlich langsamer (30-90 min). Die ZE-Aktivität wird durch den pH-Gradienten über der Thylakoidmembran nicht inhibiert (Siefermann und Yamamoto, 1975a) und unter *in vivo* Bedingungen auch nicht über den pH-Wert im Stroma reguliert (Siefermann und Yamamoto, 1975b). Es ist allerdings bekannt, dass die ZE-Aktivität in Abhängigkeit von Lichtstress herunterreguliert wird (Jahns, 1995; Jahns und Miede, 1996; Verhoeven et al., 1996; Reinhold et al., 2008). Unter extremen Lichtstress-Bedingungen, wie z.B. in immergrünen Pflanzen im Winter, kann die ZE auch vollkommen inaktiviert werden, was mit einer dauerhaften Akkumulation von Zx und einer permanenten Inaktivierung von PS II einhergeht (Öquist und Huner, 2003).

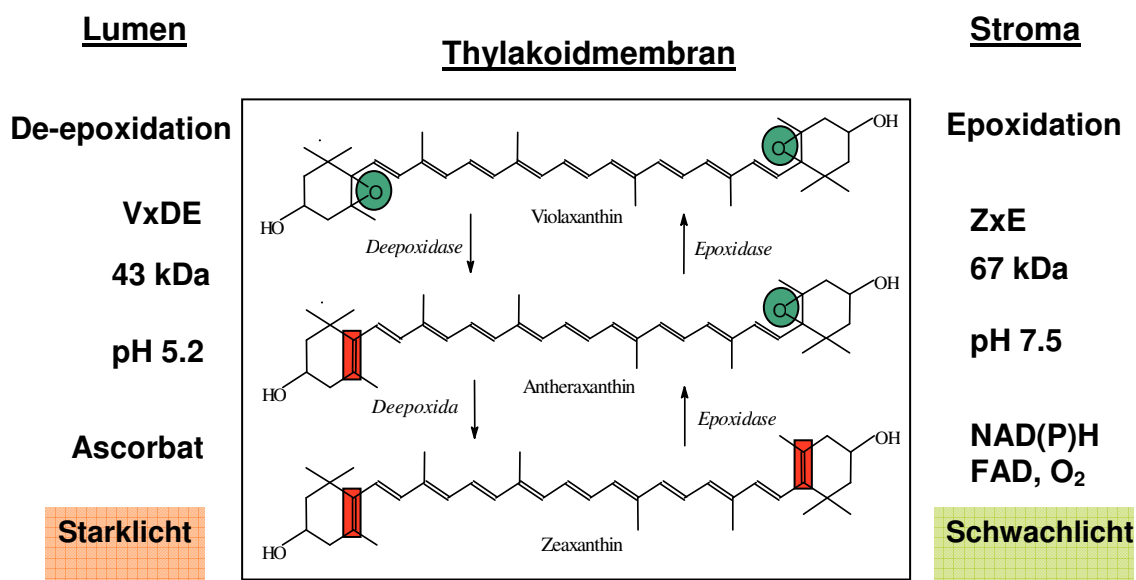


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Xanthophyllzyklus höherer Pflanzen. Durch die De-epoxidation erhöht sich die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen von 9 auf 11, während die Polarität der Pigmente abnimmt. Im Gegensatz zu Vx und Ax besitzt Zx eine völlig planare Molekülstruktur.

Der Xanthophyllzyklus dient im Allgemeinen dem Schutz des Photosyntheseapparates vor photo-oxidativer Schädigung. Da im dunkeladaptierten Zustand beinahe der gesamte Pool an Xanthophyllzykluspigmenten (VAZ-Pool) in Form von Vx vorliegt und die Umwandlung zu Zx nur unter Belichtung stattfindet, wurde dem Produkt Zx schon früh eine solche Schutzfunktion zugeschrieben (Demmig et al., 1987). Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* Mutanten, mit Defekten im Xanthophyllzyklus unterstrichen die essentielle Funktion des Zx für die thermische Energiedissipation im PS II (Niyogi et al., 1998). Neben dieser gut charakterisierten Funktion in der Energielöschung scheint das Zx aber auch eine zusätzliche Funktion als Antioxidanz in der Membran zu besitzen entweder in ungebundener Form in der Lipidphase der Thylakoidmembran oder in sehr leicht austauschbarer Form an der Protein/Lipid-Grenzschicht (Havaux & Niyogi, 1999; Johnson et al., 2007).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten pflanzliche Mechanismen der Photoprotektion charakterisiert werden. Als Modellorganismus dienten dabei *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Neben Wildtyp (WT) Pflanzen sollten dazu insbesondere spezifische Mutanten mit Defekten in den NPQ-Prozessen (*npq1*, *npq2*, *npq4*, *L17* und *stn7*) sowie der Carotinoid-Biosynthese (*npq1*, *npq2* sowie *lut2/npq1* und *lut2/npq2*) untersucht werden.

Dabei sollten zwei verschiedene Ansätze verfolgt werden, um Schutzmechanismen zu charakterisieren, die der Bildung von ROS entgegenwirken. In einem ersten Ansatz sollte die Rolle der Carotinoide bei der Löschung von Triplettchlorophyllen (^3Chl) mittels EPR Spektroskopie untersucht werden. Dazu sollten vergleichende Messungen an isolierten LHC II-Komplexen aus *Arabidopsis* Mutanten mit veränderter Carotinoid-Zusammensetzung (WT, *npq1*, *npq2*, *lut2/npq1* und *lut2/npq2*) durchgeführt werden, um die Rolle spezifischer Carotinoide bei der ^3Chl -Löschung zu charakterisieren.

In einem zweiten Ansatz sollte die Deaktivierung von ^1Chl in den NPQ Prozessen unter *in vivo* Bedingungen mittels verschiedener Methoden zur Analyse der Chl-Fluoreszenz genauer charakterisiert werden. Dazu sollte ein Mess-System etabliert werden, das es erlaubt, zeitaufgelöste (fs/ps-Bereich) Messungen der Fluoreszenzabklingkinetik an intakten Blättern und damit unter *in vivo* Bedingungen durchzuführen, um Informationen zur Charakteristik und Lokalisation der NPQ Prozesse in der PS II-Antenne zu erhalten. Ergänzt werden sollte dieser Ansatz durch etablierte Fluoreszenz-Messverfahren (wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie, PAM-Fluorometrie) zur detaillierten kinetische Analyse der NPQ-Prozesse, sowie durch HPLC-Analysen der lichtabhängigen Pigment-Umwandlung zur Untersuchung der Dynamik des Xanthophyllzyklus

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Novagene-Calbiochem (Madison USA), Riedel-deHaën (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Sie hatten, wenn nicht gesondert angegeben, p.a. Qualität.

2.2 Pflanzenmaterial und Anzuchsbedingungen

Alle Experimente wurden mit Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Columbia-0) durchgeführt. Neben Wildtyp-Pflanzen (WT) wurden folgende Mutanten verwendet:

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Pflanzen

Genotyp	Bezugsquelle	Referenz
<i>npq1-2</i>	N3771 (NASC)	Niyogi et al., 1998
<i>npq2 (aba 1-6)</i>	N3772 (NASC)	Niyogi et al., 1998
<i>npq4 (psbs-1.3)</i>	D. Leister (MPI Köln)	Graßes et al., 2002
<i>L17</i>	K.K. Niyogy	Li et al., 2002
<i>stn7</i>	SALK 073254 (SALK)	Bellafiore et al., 2005
<i>lut2/npq1</i>	eigene Kreuzung	Niyogi et al., 2001
<i>lut2/npq2</i>	eigene Kreuzung	Niyogi et al., 2001

Die Pflanzen wurden bei einer Lichtintensität von $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ unter Kurztagbedingungen (10 h Licht / 14 h Dunkel) und bei 20°C angezogen. Zur Synchronisation der Keimung wurden die Samen vor der Aussaat einer 48stündigen Kältebehandlung bei 4°C unterzogen. Im Anschluss an die Kältebehandlung wurden die Pflanzen auf Komposterde (Floraton, Floragrad, Oldenburg) ausgesät. Alle Versuche wurden mit 5 Wochen alten Pflanzen durchgeführt.

2.3 Pigmentanalysen

Zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung wurde das HPLC-Analyse-Verfahren verwendet. Die HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) arbeitet mit hohem Druck und benötigt nur relativ kleine Trägermaterialien. Die Pigmente wurden mit einer

reversed-phase Säule (Gilmore und Yamamoto, 1991; Färber et al., 1997) getrennt und mit abnehmender Polarität von der Säule eluiert.

2.3.1 Aufbereitung der Pigmentproben

Das in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefrorene Blattmaterial (jeweils ca. 0,1 g pro Eppendorf-Gefäß) wurde mit 500 µl Aceton versetzt und mit einem motorbetriebenen Pistill (Heidolph RZR 2051control, ca. 700 rpm) homogenisiert. Anschließend wurden weitere 500 µl Aceton hinzugefügt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation des Aceton-Extraktes bei 10000 g (Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Überstand filtriert (Anotop^R 10-Einmalfilter; 0,2 µm, Merck) und für die HPLC-Analyse verwendet.

2.3.2 Chromatographische Auftrennung der Pigmente

Das HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des HPLC-Systems für die Pigmenttrennung

Komponenten	Hersteller
Interface Modul D-700	Hitachi/ Merck
Autosampler L-7200	Hitachi/ Merck
Pumpe A L-7100	Hitachi/ Merck
UV/VIS-Detektor Wellenlängenmonitor L-7420	Hitachi/ Merck
Injektionsventil 7125 mit 100 µl Probenschleife	Cotati, CA, USA
Peltier Sample Cooler für L-7200	Peltier/ Merck
Lösungsmittelentgaser Gastor 104	Schambeck
Säule LiChroCART 250-4	Merck
Vorsäule LiChroCART 4-4	Merck

Als Trennmaterial für die Vorsäule und die Hauptsäule wurde LiChrospher 100 RP-18 verwendet. Die Partikelgröße betrug 5 µm. Es wurden jeweils 20 µl Probe injiziert und die Pigmente unter Verwendung von zwei Laufmitteln (Tabelle 2.3) eluiert:

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der HPLC-Laufmittel. Alle Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität. Der Tris-Puffer wurde vor Gebrauch filtriert (0,2 µm Porengröße).

Laufmittel A		Laufmittel B	
87 % (v/v)	Acetonitril	80 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Methanol	20 % (v/v)	n-Hexan
3 % (v/v)	Tris/HCl pH 8		

Die Trennung und Elution der einzelnen Pigmente erfolgte nach folgendem Gradienten bei einer Flussrate von 2 ml/min.

Tabelle 2.4: Elutionsprogramm der HPLC

Zeit	Laufmittel
0-9 min	100 % Lösungsmittel A
9-12,5 min	linearer Gradient zu 100 % Lösungsmittel B
12,5-18 min	100 % Lösungsmittel B
18-19 min	linearer Gradient zu 100 % Lösungsmittel A
19- 23 min	100 % Lösungsmittel A

Die Pigmente wurden entsprechend ihrer Polarität zu unterschiedlichen Retentionszeiten eluiert und photometrisch bei 440 nm detektiert. Die Quantifizierung der Pigmentmengen erfolgte anhand einer Eichreihe mit reinen Pigmenten. Anhand der integrierten Peakflächen und der bestimmten Umrechnungsfaktoren (Tabelle 2.5) konnten so die jeweiligen Pigmentmengen in den einzelnen Proben bestimmt werden.

Tabelle 2.5: Retentionszeiten und Umrechnungsfaktoren. Die Retentionszeiten schwankten um bis zu 1 min um den angegebenen Wert.

Pigment	Retentionszeit [min]	Umrechnungsfaktoren
Neoxanthin	3,2	3434
Violaxanthin	4,2	3832
Antheraxanthin	6,3	3045
Lutein	9,3	3167
Zeaxanthin	10,3	2764
Chlorophyll <i>b</i>	13,3	1227
Chlorophyll <i>a</i>	13,9	1389
β-Carotin	16,8	2852

2.4 Proteinanalyse über Western- Blot

Die Analyse der Mengen spezifischer Proteine (Antennenproteine und Reaktionszentren) in den verwendeten Präparationen und Mutanten erfolgte mittels Western-Blot-Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper.

2.4.1 Antiseren

Tabelle 2.6: Übersicht über die verwendeten Antiseren

Antigen	Masse* in [kDa]	Gewonnen aus	Verdünnung (TBS+5 %Milchpulver)
Lhca1	22	Kaninchen	1:1000
Lhca2	23	Kaninchen	1:1000
Lhca3	25	Kaninchen	1:1000
Lhca4	22	Kaninchen	1:1000
Lhcb1	25	Kaninchen	1:1000
Lhcb2	25	Kaninchen	1:1000
Lhcb3	24	Kaninchen	1:1000
Lhcb4	29	Kaninchen	1:1000
Lhcb5	26	Kaninchen	1:1000
Lhcb6	24	Kaninchen	1:1000
PsbS	22	Kaninchen	1:1000
D1	32	Kaninchen	1:1000
Psa A/B	70	Kaninchen	1:1000
Psa D	25	Kaninchen	1:1000

*angenommene Masse nach Jansson (1993)

Als sekundärer Antikörper wurde das anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat der Firma Sigma-Aldrich (München) in der Verdünnung 1:10 000 verwendet.

Um die molekulare Masse der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurde in jedem Gel ein Proteinstandard (Marker Sigma Dalton Mark VII, Sigma-Aldrich, München) mit aufgetragen.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben erfolgte mit dem „BioRad DC Protein Assay“ (Bio Rad, München) nach Angaben des Herstellers. Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0,2 bis 4 mg/ml diente als Standard. Die Proteinkonzentrationen wurden spektralphotometrisch bei 750 nm ermittelt (DU 640 Spektralphotometer, Beckmann).

2.4.3 Detektion über SDS-PAGE und Western-Blot

Der qualitative Nachweis der isolierten Proteine erfolgte über SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mittels der in Tabelle 2.6 aufgeführten Antikörper.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Acrylamidgele.

Trenngel		Sammelgel	
11,6 ml	Acrylamid (Acrylamid 37,5 : Bisacrylamid 1)	2,12 ml	Acrylamid
3,1 ml	Trenngelpuffer (3 M Tris/HCl pH 8,8)	3,24 ml	Sammelpuffer (0,5 M Tris/HCl pH 6,8)
10,3 ml	ddH ₂ O	6,52 ml	ddH ₂ O
250 µl	10% Natriumdodecylsulfat (SDS)	120 µl	10% SDS
190 µl	10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)	120 µl	APS
19 µl	TEMED	12 µl	TEMED
		120 µl	Bromphenolblau

2.4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit diskontinuierlichen Gelen (Laemmli, 1970) erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Die SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus einem 13,5 %igen Trenngel und einem 5,6 %igen Sammelgel (bezogen auf den Polyacrylamidgehalt). Zum Gießen der Gele und für die spätere Elektrophorese wurde das Mighty Small System (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) genutzt. Die aufgeführten Mengenangaben in Tab 2.7 gelten für 4 Mini-Gele.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Gelelektrophorese.

Probenpuffer (5fach)		Elektrodenpuffer	
1,6 % (w/v)	SDS	30 g/l	Harnstoff
1 M	Harnstoff	3 g/l	Tris
1 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	14,4 g/l	Glycin
50 mM	Tris/HCl pH 7,6	10 ml/l	10 % SDS
12,5 % (w/v)	Glycerin		
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau		

Pro Geltasche wurden 10 µg Protein aufgetragen. Zum Größenvergleich wurden 10 µg des Proteinstandards VII mit aufgetrennt. Der Gellauf wurde mit 60 Volt gestartet und nach ca. 30 Minuten bei 120 Volt fortgesetzt.

2.4.3.2 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Proteingele wurden über Nacht, für mindestens jedoch eine Stunde in der Färbelösung inkubiert. Der Hintergrund wurde durch eine etwa 1stündige Inkubation in Entfärbelösung reduziert.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Färbe- und Entfärbelösung.

Färbelösung		Entfärbelösung	
0.1 % (w/v)	Coomassie	5 % (v/v)	Essigsäure
50 % (v/v)	Ethanol	25 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure		

2.4.3.3 Western-Blot-Analyse

Die Proteine wurden mit Hilfe des Semi-Dry-Blot-Verfahren aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dazu wurden Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran mit Blotpuffer benetzt und der Blotstapel in folgender Weise luftblasenfrei aufgebaut:

Anode, 3 x Filterpapier, 1 x Nitrocellulosemembran, Gel, 3 x Filterpapier, Kathode. Für den Proteintransfer aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde für 50 Minuten ein Strom von 0,8 mA/cm² Gel angelegt.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des Blotpuffers

Blot-Puffer	
0.84 g/l	NaHCO ₃
0.32 g/l	Na ₂ CO ₃
20 % (v/v)	Methanol

Im Anschluss an das Blotten wurde die Nitrocellulosemembran für 5 Minuten in Ponceaulösung gefärbt und überschüssige Färbelösung mit H₂O demin. ausgewaschen. Die Banden des Proteinmarkers wurden markiert um später eine Zuordnung der Antikörpersignale zur molekularen Masse der Proteinmarkerbanden zu ermöglichen.

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Ponceau-Färbelösung.

Ponceau-Lösung	
0.5 % (w/v)	Ponceau
1 % (v/v)	Essigsäure

2.4.3.4 Immunologischer Nachweis

Die freien Bindestellen der Nitrocellulosemembran wurden mit 5 % Magermilchpulver-TBS-Lösung 1-2 Stunden abgesättigt. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-T Lösung gewaschen. Die nachfolgende Primärantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten mit TBS-T Lösung gewaschen und anschließend der Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Nicht gebundene Sekundärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBS-T-Lösung ausgewaschen. Die Detektion der Antikörper erfolgte mit Hilfe des ECL-Chemolumineszens-Kits-Plus (Perkin Elmer, Boston, USA) nach Herstellerangaben.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Waschpuffer (TBS und TBS-T)

TBS (Tris buffered saline)		TBS-T	
10 mM	Tris/HCl pH 7.5	99,75 % (v/v)	TBS
150 mM	NaCl	0,2 % (v/v)	Triton X-100
		0,05 % (v/v)	Tween 20

2.5 Isolation von LHC II-Komplexen aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation von LHC II-Komplexen erfolgte in Anlehnung an das von Caffarri et al. (2001) beschriebene Verfahren. Dazu wurden zunächst Thylakoide isoliert, die Membranen mit Detergenz solubilisiert und die dadurch getrennten Proteinkomplexe mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt.

2.5.1 Thylakoidisolierung aus *Arabidopsis thaliana*

Die Präparation intakter Thylakoidmembranen erfolgte nach dem Protokoll von Jahns et al. (2002). Alle Isolationsschritte wurden, unter Verwendung von vorgekühlten Medien und

Geräten, bei 4 °C durchgeführt. Nach Bestimmung des Chl-Gehaltes der erhaltenen Thylakoidsuspension (2.6.2) wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt oder bei -20 °C gelagert.

Tabellen 2.13: Medien zur Thylakoidisolation aus *Arabidopsis thaliana*

Isolationsmedium (pH 8,0)		Resuspensionsmedium (pH 8,0)	
5 mM	MgCl ₂	5 mM	MgCl ₂
10 mM	NaCl	10 mM	NaCl
5 mM	EDTA	330 mM	Sorbitol
5 mM	EGTA	10 mM	MES
300 mM	Sorbitol		
20 mM	HEPES		

2.5.2 Chlorophyllbestimmung

Der Chlorophyllgehalt wurde nach Arnon (1949) bestimmt. Ein Aliquot (10 µl) der zu untersuchenden Suspension wurde in 1 ml 80 %igem Aceton aufgenommen und bei 10 000 g für 2 min zentrifugiert. Die Extinktion des Überstandes wurde in einem Spektralphotometer bei 645 nm und 663 nm bestimmt. Der Chl-Gehalt errechnete sich nach der Formel:

$$c_{\text{Chl}} [\text{mg/ml}] = [(E_{645\text{nm}} \times 20,2 + E_{663\text{nm}} \times 8,02) / 1000] \times \text{Volumen}_{\text{Gesamt}} / \text{Volumen}_{\text{Probe}}$$

2.5.3 Solubilisierung der Thylakoidmembran

Die Solubilisierung der Thylakoidmembran erfolgte mit dem Detergenz α -Dodecylmaltoside (α -DM). Die Thylakoidsuspension wurde mit Resuspensionsmedium auf 0,5 mg/ml Chl verdünnt und die Detergenzkonzentration auf 0,6 % α -DM eingestellt. Nach kurzem Vortexen wurde die Suspension bei 10 000 g für 15 min zentrifugiert, um nicht vollständig solubilisierte Membranfragment abzutrennen. Der Überstand wurde zur Trennung der verschiedenen Pigment-Protein-Komplexe auf einen Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen

2.5.4 Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Ausbildung des Gradienten wurde die Gradientenlösung in die später verwendeten Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei -20 °C eingefroren. Die Ausbildung des Gradienten

erfolgte während des langsamen Auftauens bei 4 °C. Nach Auftragen der solubilisierten Thylakoidmembranen wurden die Proben für 24 h bei 285 000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Lauf konnten die einzelnen Banden mit einer Spritze von oben aus dem Gradienten entnommen werden.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der Saccharosegradientenlösung.

Gradientenlösung (pH 7,6)	
600 mM	Saccharose
5 mM	Tricin
0.06 %	α -DM

2.6 Charakterisierung der LHC II-Komplexe

Die im Anschluss an die Dichtegradienten-Zentrifugation entnommenen Banden wurden hinsichtlich ihrer Pigment- und Proteinzusammensetzung charakterisiert.

2.6.1 Pigmentanalyse

Die Pigmentanalyse erfolgte wie in 2.4 beschrieben mittels HPLC. Die entnommenen Banden wurden mit dem 4-fachen Volumen 100 % Aceton p.A. versetzt und gründlich gemischt. Im Anschluss wurden die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 000 g in einer Eppifuge (Zentrifuge 5410, Eppendorf) abzentrifugiert, der Überstand filtriert (AnotropR 10-Einmalfilter, 0,2 μ m, Merck) und direkt für die HPLC-Analyse verwendet

2.6.2 Proteinanalyse

Die Proteinzusammensetzung wurde mittels Western-Blot-Analyse (s. 2.5) charakterisiert. Die aus den Saccharose-Dichtegradienten entnommenen Fraktionen wurden anhand spezifischer Antikörper auf den Gehalt an Antennenproteinen (Lhca1 bis Lhca4 und Lhcb1 bis Lhcb6) und Reaktionszentren (Psa A/B und D1) beider Photosysteme getestet.

2.7 Transiente EPR Spektroskopie

Die EPR-Spektroskopie („electron paramagnetic resonance“) ist eine hochfrequenzspektroskopische Methode mit deren Hilfe sich paramagnetische Moleküle, also Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen nachweisen lassen. Es wurden

transiente EPR-Spektren verschiedener LHC II-Komplexe gemessen und mit Simulationen aus ^3Chl und ^3Car verglichen. Die EPR-Messungen wurden am MPI-Mülheim in Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Lubitz durchgeführt. Die Bildung von ^3Chl und ^3Car wurde in einem Bruker ER200D Spektrometer, ausgestattet mit einer X-Band MW Brücke (Bruker, ER042 MRH E), einem ER4118XMD-5-W1 dielektronischen Resonator und einem Oxford CF935 Durchflussskryostaten, unter Belichtung aufgenommen. Die EPR Signale wurden nach Laserpuls-Anregung von 0.29 T bis 0.40 T aufgenommen, wobei alle 20 ns ein Signal registriert wurde. Die Anregungswellenlänge war 532 nm (Nd:YAG Laser, Vibrant/Opotek gefittet mit OPO für variable Wellenlängenmessungen). Die Wiederholungsrate betrug 10 Hz bei 3-8 mJ einfallender Lichtenergie pro Puls am Resonator.

2.8 Fluoreszenzspektroskopie

2.8.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Zur Charakterisierung der NPQ-Prozesse unter *in vivo* Bedingungen mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Yuliya Miloslavina am MPI Mülheim durchgeführt. Die Analyse der Daten (s. 2.9.1.3) wurde dabei ausschließlich von Dr. Yuliya Miloslavina am MPI Mülheim durchgeführt.

Zunächst wurden die Messbedingungen hinsichtlich der Verwendung intakter Blätter und der Belichtungsbedingungen optimiert. Die im Folgenden dargestellten optimalen Messbedingungen erlaubten letztendlich an ein und derselben Probe eine Messzeit von insgesamt bis zu 2 Stunden unter sättigenden Lichtbedingungen, ohne dabei detektierbare Schädigungen zu induzieren.

2.8.1.1 Vorbereitung der Messküvette

Die Blätter wurden in einer Rotationsküvette, dicht aneinanderliegend aber nicht überlappend angeordnet (Abb. 2.1). Die Küvette wurde zum Schutz der Blätter und zur Herstellung einer natürlichen Umgebung mit 0,3 M Saccharoselösung gefüllt. Eine kleine Luftblase in der Küvette verhinderte bei der Rotation ein Platzen. Die Küvette wurde dicht verschlossen und in die Messapparatur eingespannt.



Abbildung 2.1 Rotationsküvette für die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie. Das Bild zeigt die, in die Küvette eingespannten Blätter in der Saccharoselösung.

2.8.1.2 Zeitaufgelöste Spektroskopie an Blättern

Es wurde unter drei verschiedenen Bedingungen gemessen:

- 1) F_0 -Bedingungen = dunkeladaptierte Blätter mit offenen RZ. F_0 wurde unter vollständiger Dunkelheit nach Vorverdunkelung der Pflanzen über Nacht gemessen. Die Laserfrequenz betrug 800 kHz und die Rotationsgeschwindigkeit 1800 rpm bei 78 seitlichen Ausschwingungen der Küvette pro Minute.
- 2) $F_{\max}$ -Bedingungen = dunkeladaptierte Blätter mit geschlossenen, ungelöschten RZ. Für die Messung von $F_{\max}$ wurden einzelne Blätter der Pflanzen abgetrennt und direkt mit dem Stielende für 14 h in eine 45 μM DCMU Lösung gelegt (Toth et al., 2005). Die Blätter wurden so positioniert, dass eine Luftversorgung der Blätter garantiert war. Um ein vollständiges Schließen der Reaktionszentren zu gewährleisten, wurde während der Messung eine blaue LED mit einer sehr geringen Intensität (ca. 50 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) direkt vor dem Messlaser positioniert. Die Laserfrequenz betrug 4 MHz und die Rotationsgeschwindigkeit 1800 rpm bei 78 seitlichen Ausschwingungen der Küvette pro Minute (s. auch Abb. 2.2).
- 3) F_{NPQ} -Bedingungen = Starklicht-adaptierte Blätter mit geschlossenen, gelöschten RZ. Die Messung von F_{NPQ} erfolgte unter Belichtung mit Starklichtdioden (rot und orange) einer Intensität von ca. 600 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Es stellte sich heraus, dass erst nach 30-40 min ein stabiler, lichtadaptierter Zustand erreicht war, sodass die Messungen erst nach einer Vorbelichtung von etwa 45 min gestartet wurden. Zusätzlich zu den Starklichtdioden wurde eine blaue Starklicht LED direkt vor dem Messlaser auf die Küvette positioniert, um zu gewährleisten, dass die PS II-Reaktionszentren geschlossen waren (Abb. 2.2 B). Die Messung erfolgte bei einer Laserfrequenz von 4 MHz und einer

Rotationsgeschwindigkeit von 1800 rpm sowie der zusätzlichen Ausschwingung der Küvette.

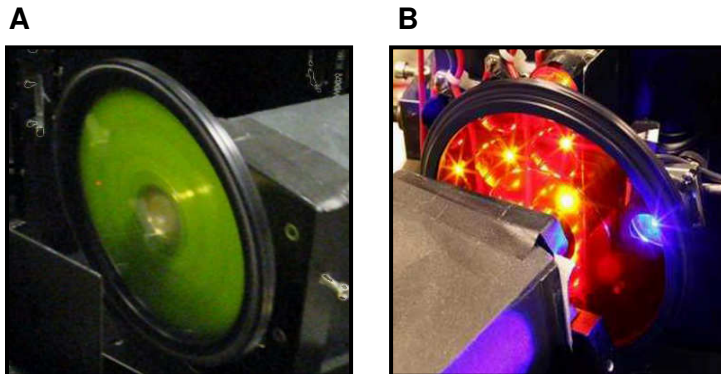


Abbildung 2.2: Messung der Fluoreszenz in der Rotationsküvette.

A: Unter F_M -Bedingungen ohne Belichtung.

B: Unter F_{NPQ} -Bedingungen mit LED-Belichtung einer Intensität von $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Für die Messung wurde die „Single photon timing“ Technik (SPT, auch zeitabhängiges „single photon counting“ genannt) genutzt. Die Methode erlaubt die sensitive Aufzeichnung geringer Lichtsignale in ps genauer Auflösung und extremer Präzision (Becker, 2005; O’Connor and Philips, 1984). Die Anregungswellenlänge lag bei 663 nm und die Detektionswellenlängen lagen zwischen 678 nm und 742 nm, wobei der Laser direkt an der Blattoberfläche reflektierte. Für jede Messung wurden frische Blätter in die Küvette eingespannt.

2.8.1.3 Analyse der Daten der zeitaufgelösten Spektroskopie

Zur Analyse der gemessenen Fluoreszenzabklingkinetiken wurden globale Target-Analysen durchgeführt, mit deren Hilfe die Amplituden, Lebenszeiten und spektralen Eigenschaften der verschiedenen, zum Fluoreszenzsignal beitragenden Komponenten abgeleitet wurden.

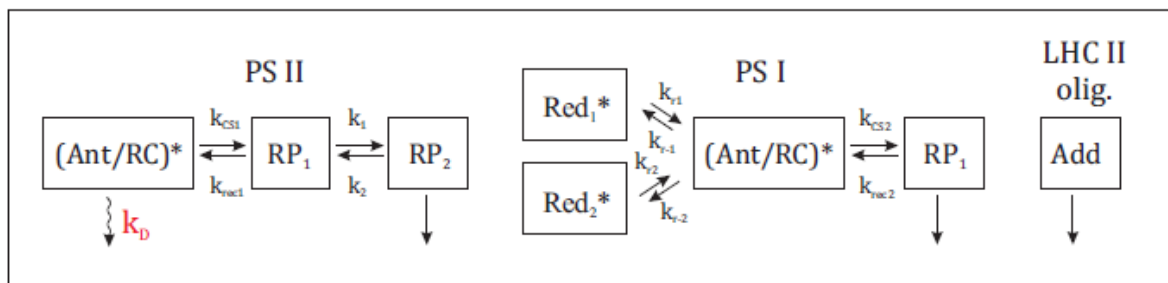


Abbildung 2.3 Schemata der Kinetiken für PS I und PS II und einer zusätzlichen Komponente (Add). Die gezeigten Schemata wurden für die Target-Analysen der Fluoreszenzabklingkinetiken verwendet. Falls für eine optimale Anpassung der Daten nötig, wurde die Zusatzkomponente (Add), die weder dem PS II noch dem PS I zugeordnet werden konnte, mit in die Analysen einbezogen. Ant: Antenne, RC: Reaktionszentrum, RP: Radikalpaar, k_{CS} : Ratenkonstante der Ladungstrennungsreaktion, $k_{r(rec)}$: Ratenkonstante der Ladungsrekombination, k_D : Ratenkonstante für die strahlungslose Deaktivierung der PS II-Antenne.

Die Target-Analysen der Fluoreszenzabklingkinetik intakter Blätter basierten im Wesentlichen auf den detaillierten Erkenntnissen aus früheren Untersuchungen der Kinetiken isolierter Antennen- und Reaktionszentrumskomplexe (Broess et al., 2006; Holzwarth et al., 2005; Holzwarth et al., 2006a; Holzwarth et al., 2006b; Holzwarth, 2008; Ihalainen et al., 2005b; Ihalainen et al., 2005a; Miloslavina et al., 2006; Slavov et al., 2008) und wurden anhand der aus den angegebenen Arbeiten resultierenden kinetischen Schemata für PS I und PS II (Abbildung 2.3) durchgeführt. Für den Fall, dass sich die Daten nicht optimal mit diesen bekannten Komponenten anpassen ließen, wurde eine weitere Komponente hinzugefügt (in Abb. 2.3 als „Add“ bezeichnet).

Die mathematischen Grundlagen der Datenanalyse sind im Folgenden kurz zusammengefasst:

Die gemessenen Abklingkurven $I(t)$ (Vgl. Abb. 3.7) zeigen eigentlich ein Gemisch aus der Fluoreszenzabklingkinetik der Probe $F(t)$ und der Wirkfunktion des Messinstrumentes $P(t')$ nach folgender Gleichung:

$$I(t) = \int_0^t P(t') \cdot F(t-t') dt' \quad (1)$$

Um diesem Problem Rechnung zu tragen, wurde eine stark streuende Substanz (hier: ultrahochoerhitzte Milch) unter den gleichen Bedingungen gemessen wie die Probe. Das gemessene Signal entspricht dabei der Wirkfunktion des Messinstrumentes (Grinvald und Steinberg, 1974; Holzwarth, 1995; Müller, 1992).

Die Abklingkinetiken von photosynthetisch aktiven Komplexen lassen sich als eine multiexponentielle Abklingfunktion $F(t)$ nach folgender Gleichung beschreiben:

$$F(t, \lambda_{em}) = \sum_{i=1}^n A_i (\lambda_{em}, \tau_i) \cdot \exp(-t/\tau_i) \quad (2)$$

Die Abklingfunktion über der Zeit t ist abhängig von der Emissionswellenlänge (λ_{em}) sowie den Amplituden (A_i , τ_i) und Lebenszeiten (τ_i) der einzelnen Komponenten.

Für die Analyse der Fluoreszenzabklingkinetiken werden die Lebenszeiten und Amplituden der einzelnen Komponenten ermittelt. Dazu wird eine theoretische Abklingfunktion $F(t, \lambda_{em})$ berechnet und mit der Wirkfunktion des Messinstrumentes $P(t')$ zu einem theoretischen Signal $G(t)$ zusammengefasst. Die Fit-Parameter (Amplituden und Lebenszeiten) werden variiert um die quadratische Abweichung χ^2 (Fit-Kriterium) zu minimieren.

$$\chi^2 = \frac{1}{n-p-1} \sum_{i=1}^n \frac{(I_i - G_i)^2}{I_i} \quad (3)$$

n steht dabei für die Gesamtanzahl der Datenpunkte und p für die Zahl der unabhängigen Parameter. Die Qualität des Fits kann mit folgender Gleichung berechnet werden (dabei gilt: je besser der Fit desto näher liegt der Wert für r_i bei 0):

$$r_i = \frac{I_i - G_i}{\sqrt{I_i}} \quad (4)$$

Bei der in dieser Arbeit angewandten globalen Target-Analyse wurden die Fluoreszenz-abklingdaten in Kombination auf der Grundlage des kinetischen Modells für PS I und PS II (Abb. 2.3) analysiert. In diesem Fall werden die Ratenkonstanten des kinetischen Modells bestimmt und daraus die Lebenszeiten rückberechnet. Anschließend werden die zu den Lebenszeiten optimalen Amplituden (A_i, τ_i) gefittet. Trägt man diese berechneten Amplituden (Gleichung 2) der Abklingkomponenten gegen die Emissionswellenlänge auf, so erhält man die sogenannten decay-associated spectra (DAS) (Holzwarth, 1996). Anhand der so ermittelten Ratenkonstanten, Amplituden, Lebenszeiten und der spektralen Charakteristik der unterschiedlichen Komponenten lassen sich lichtinduzierte Änderungen in der Fluoreszenzabklingkinetik interpretieren.

Aus diesen Daten können außerdem die mittleren Lebenszeiten τ_{av} bestimmt werden die zur stationären Fluoreszenz-Intensität proportional sind:

$$\tau_{av}(\lambda) = \frac{\sum_i A_i(\lambda) \tau_i}{\sum_i A_i(\lambda)} \sim I_{fl}(\lambda) \quad (5)$$

2.8.2 Fluoreszenzmessungen mit dem PAM-Fluorometer

In einem zweiten Ansatz wurde die Fluoreszenzlöschung mit Hilfe eines PAM-Fluorometers, das nach dem Prinzip der Puls-Amplituden-Modulation arbeitet (Schreiber, 1986), untersucht.

Bei dieser Methode wird das Messlicht gepulst (1,6 oder 100 kHz) auf das Untersuchungsobjekt gegeben, so dass die Fluoreszenzmessung nicht von der Stärke und Zusammensetzung des kontinuierlichen, aktinischen Lichts (zumeist 900 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Weißlicht) und des sättigenden Lichtpulses (1s, 4000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Weißlicht) beeinflusst wird.

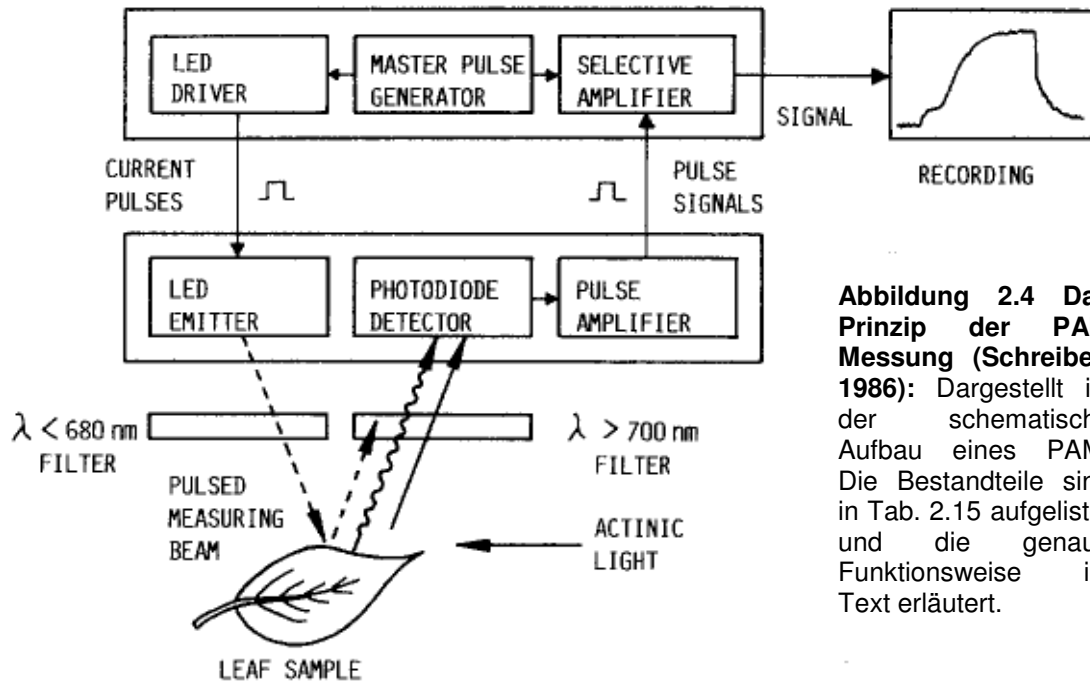


Abbildung 2.4 Das Prinzip der PAM Messung (Schreiber, 1986): Dargestellt ist der schematische Aufbau eines PAM. Die Bestandteile sind in Tab. 2.15 aufgelistet und die genaue Funktionsweise im Text erläutert.

Detektiert wird dabei die gesamte Fluoreszenzstrahlung im Wellenlängenbereich $> 700 \text{ nm}$. Die Fluoreszenzkurven wurden mit einem Schreiber aufgezeichnet. Das Messsystem bestand aus folgenden Komponenten:

Tabelle 2.15: Zusammensetzung der Messapparatur

Komponente	Hersteller
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: Lightintensity: 5; Gain: 6; Damping: 8

Schreiber: 5 mm/min; 500 mV

Die Messungen wurden an intakten, über Nacht dunkeladaptierten Blättern durchgeführt, die in einer Blatküvette positioniert wurden. Die Küvette wurde durch einen Kryostaten

konstant auf Raumtemperatur (ca. 20 °C) temperiert und mit einem schwachen Luftstrom begast. Nach der Registrierung von F_0 (Messlicht 1,6 kHz, 0,1 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurde durch einen sättigenden Lichtpuls (Dauer: 1 sec, 4000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) F_M bestimmt. Unmittelbar danach wurde aktinisches Weißlicht einer Intensität von 900 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für bis zu 90 min zugeschaltet. Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes wurde die Fluoreszenz für bis zu 90 min nur in Gegenwart des schwachen Messlichtes weiter detektiert. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Proben mit sättigenden Lichtpulsen im Abstand von 5 bis 500 Sekunden (wie in den jeweiligen Experimenten spezifiziert) belichtet. Anhand dieses Messprotokolls lassen sich die Fluoreszenzlöschungsparameter qP (photochemisches Quenching), NPQ (nicht photochemisches Quenching), qE_{SV} (ΔpH -abhängiges Quenching) und qI_{SV} (photoinhibitorisches Quenching) quantifizieren, wie in Abb 2.5. schematisch für eine Belichtung von 15 min mit anschließender Dunkel-Relaxation für 10 min dargestellt (für weitere Details s. Krause und Jahns, 2003).

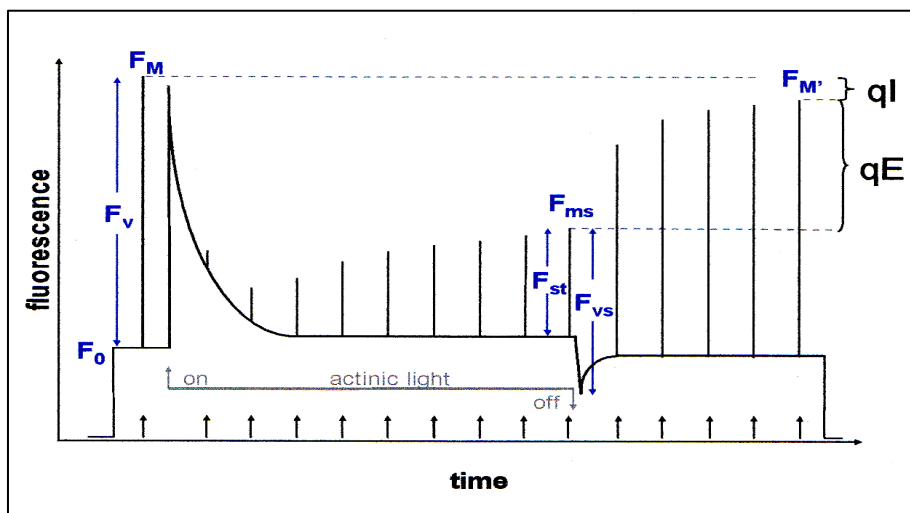


Abbildung 2.5: Idealisierte Fluoreszenzkurve zur Bestimmung der Löschungskoeffizienten nach Stern-Volmer. F_{VS} steht für die variable Fluoreszenz, F_{MS} für die maximale Fluoreszenz im stationären Zustand. F_{ST} berechnet sich aus der Differenz von F_{MS} und der Grundfluoreszenz im aktinischen Licht. Nach Quick & Stitt (1989) modifiziert von T. Graßes (2005).

Die Fluoreszenzlöschungsparameter berechnen sich dabei folgendermaßen:

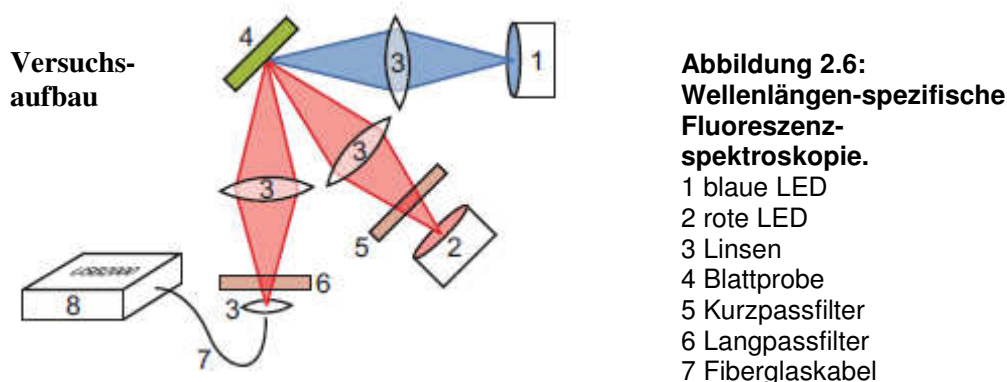
qP (photochemisches Quenching) =	F_{ST}/F_{VS}
NPQ (nicht photochemisches Quenching) =	$(F_M/F_{MS})-1$
qE_{SV} (ΔpH -abhängiges Quenching) =	$(F_M/F_{MS})-(F_M/F_{M'})$
qI_{SV} (photoinhibitorisches Quenching) =	$(F_M/F_{M'}) - 1$

und es gilt: $NPQ = qE_{SV} + qI_{SV}$

2.8.3 Wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie

In einem dritten Ansatz wurde ein Messaufbau etabliert, der es im Prinzip ermöglicht, wie bei der PAM-Fluorometrie (2.8.2) den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzinduktion und relaxation zu detektieren, aber im Gegensatz zum PAM-Fluorometer, die Detektion der Fluoreszenz bei spezifischen Wellenlängen erlaubt. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Petar Lambrev am MPI Mülheim durchgeführt, der den Versuchsaufbau etabliert hat und auch die Messungen durchführte.

Für alle Messungen wurden Blätter von 5 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen verwendet, welche vor der Messung für mindestens eine Stunde verdunkelt worden waren. Zur NPQ Induktion wurden einzelne Blätter für unterschiedliche Zeitspannen mit einer roten Starkstrom LED (Luxeon) bei Raumtemperatur mit Licht der Wellenlänge 620 nm und einer Intensität von $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Die Messung der Fluoreszenzspektren erfolgte simultan mit einem CCD Array Spektrometer (OceanOptics USB2000). Die Fluoreszenz wurde entweder mit einer blauen LED (470 nm) oder direkt mit aktinischem Rotlicht angeregt (vgl. Abb. 2.6). Für die Messungen bei 77 K wurden die Blätter in flüssigem N_2 eingefroren und in den Kryostaten eingespannt.



2.9 Vakuuminfiltration mit Nigericin

Um den Einfluss des ΔpH auf die Fluoreszenzlöschung zu untersuchen wurde eine Vakuuminfiltration mit Nigericin vorgenommen. Dazu wurden jeweils einzelne Blätter der verschiedenen *A. thaliana* Linien mit $50 \mu\text{M}$ Nigericin (in Resuspensionsmedium, s. 2.6.1) mit Hilfe einer Spritze vakuuminfiltriert. Um dabei möglichst blattschonend zu arbeiten, wurde die Infiltration nur durch zweimaliges Aufziehen der Spritze durchgeführt. Kontrollversuche mit Dithiothreitol (einem Inhibitor der Vx De-epoxidation) zeigten, dass diese Infiltrationsbedingungen für ein erfolgreiches Einbringen von Substanzen in den Chloroplasten ausreichend sind. Kontrollexperimente nach Infiltration der Blätter mit

reinem Resuspensionmedium (ohne Nigericin) belegten zudem, dass die Behandlung an sich keinen negativen Einfluss auf die Fluoreszenzinduktion und –relaxation hat.

2.10 Bestimmung der Xanthophyllumwandlung während und nach der Belichtung

Parallel zu den Messungen mit dem PAM Fluorometer (2.8.2) wurde der zeitliche Verlauf der Bildung bzw. des Abbaus des Zx während der NPQ Induktion bzw. Relaxation bestimmt.

2.10.1 Zeitverlauf der Zeaxanthinbildung

Die Induktion der Zx-Bildung wurde an Blättern von über Nacht vorverdunkelten, 5 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen unterschiedlicher Linien durchgeführt. Dazu wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von 8 mm ausgestanzt und in einer wassergefüllten Petrischale mit der Blattoberseite nach oben platziert. Vor der Belichtung wurden jeweils drei Blattscheiben als Dunkelkontrolle ($t=0$) entnommen. Anschließend wurden die Petrischalen auf einer temperierten Glasküvette analog zu den PAM Fluoreszenzmessungen mit einer Lichtintensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Weißlicht) belichtet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Blattscheiben entnommen, sofort in flüssigem N_2 eingefroren und die Pigmente für die späteren HPLC-Analysen extrahiert (2.4). Die Proben wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 180 min.

2.10.2 Zeitverlauf des Zeaxanthinabbaus

Die Rückumwandlung des Zx wurde durch Verdunkelung, vorbelichteter Blätter, erreicht. Dazu wurden analog zu den Fluoreszenzlöschungskinetiken (2.8.2) verschiedene Vorbelichtungszeiten gewählt (5, 30 und 90 min). Nach Abschalten des Lichtes wurden zu festgelegten Zeiten Blattproben entnommen, in flüssigem N_2 eingefroren und die Pigmente für die späteren HPLC-Analysen extrahiert (2.4). Die Proben wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240 min

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, um Schutzmechanismen höherer Pflanzen gegen photo-oxidative Schädigung genauer zu charakterisieren. Zum einen sollte die Rolle der Carotinoide bei der Löschung von Triplettchlorophyllen ($^3\text{Chl}^*$) mittels EPR Spektroskopie untersucht werden und zum anderen sollten die verschiedenen Komponenten der Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie genauer lokalisiert und charakterisiert werden.

3.1 Die Rolle der Carotinoide bei der Triplettlöschung

Die Löschung von $^3\text{Chl}^*$ durch Carotinoide wurde mittels EPR Spektroskopie an isolierten LHC II-Komplexen (LHC II-Trimere) untersucht. Unter Verwendung von LHC II-Trimeren, die aus unterschiedlichen Carotinoid-Mutanten (aus *Arabidopsis thaliana*) isoliert wurden sollten die Messungen Aufschluss darüber geben, welche der in den Pflanzen vorkommenden Carotinoide für die Löschung von $^3\text{Chl}^*$ entscheidend sind. Dazu wurden im Vergleich mit dem WT die Mutanten *npq1* (kein Zx), *npq2* (kein Vx und Nx), *lut2npq1* (kein Lut und Zx) sowie *lut2npq2* (kein Lut, Vx und Nx) verwendet, so dass die Messungen Aussagen über mögliche spezifische Funktionen von Lut, Zx, Nx und Vx bei der ^3Chl -Löschung erlauben sollten.

3.1.1 Isolation der LHC II-Trimere aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation erfolgte wie in 2.4 beschrieben, nach Caffarri et al. (2001).

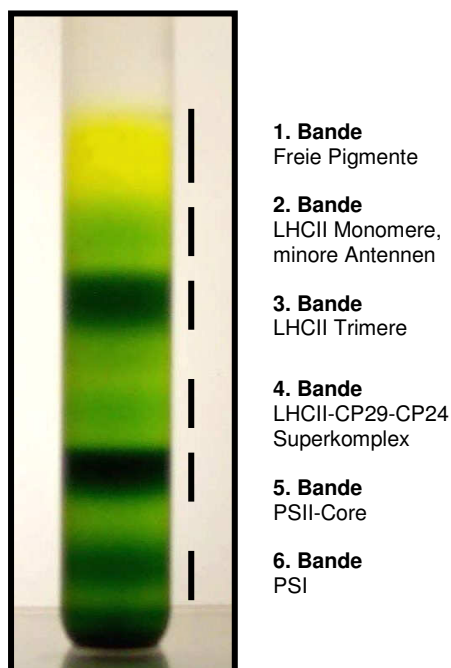


Abbildung 3.1 : Saccharosegradient nach Ultra-zentrifugation. Aufgetragen wurden, mit α -DM solubilisierte Thylakoide (Konz.: 0,5 mg/ml Chl). Nach einer Zentrifugation von 24 h bei 285 000 g konnten die aufgetrennten Fraktionen entnommen und charakterisiert werden. Die Zuordnung der einzelnen Banden erfolgte nach Caffarri et al., 2001.

Isolierte Thylakoide wurden dazu mit Detergenz (0.6 % α -DM) solubilisiert und die verschiedenen Pigment-Protein-Komplexe in einem Saccharose-Dichtegradienten mittels Ultrazentrifugation getrennt. Im Anschluss an die Ultrazentrifugation wurden die einzelnen Fraktionen aus dem Saccharosegradienten entnommen.

Die Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch die Auftrennung der Banden solubilisierter Thylakoide aus WT Pflanzen nach Ultrazentrifugation über einen etwa 0,1 - 1 M Saccharosegradienten. Die Bande 3 enthielt dabei die LHC II-Trimere. Die Isolation der LHC II-Trimere der verschiedenen Mutanten wurde analog durchgeführt. Für alle Mutanten konnte eine dem WT vergleichbare Auftrennung beobachtet werden. Die LHC II-Trimerfraktion (= Bande 3) wurde vor der EPR Messung mittels Western-Blot und Pigmentanalyse charakterisiert.

3.1.2 Charakterisierung der LHC II-Trimere

Die Charakterisierung erfolgte zum einen über Western-Blot-Analyse, zur Überprüfung der Proteinzusammensetzung der LHC II-Trimere und zum anderen über HPLC-Analysen zur Untersuchung der Pigmentzusammensetzung.

3.1.2.1 Western-Blot-Analyse der LHC II-Trimere

Die aus dem WT isolierte LHC II-Trimerprobe wurde jeweils neben isolierten Thylakoiden des WT aufgetragen und mit einigen spezifischen Antikörpern behandelt. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, inwieweit die LHC II-Trimere mit anderen Antennenproteinen verunreinigt sind.

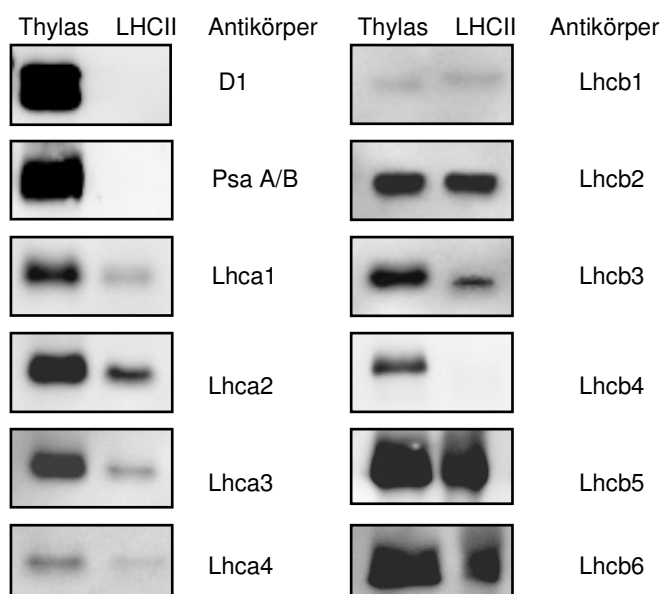


Abbildung 3.2: Western-Blots der LHC II-Trimere. Dargestellt sind die LHC II-Trimere des WT im Vergleich mit intakten Thylakoiden. Aufgetragen wurden jeweils 5 μ g Protein pro Spur.

Die LHC II-Probe konnte nicht vollständig rein aus den Saccharosegradienten (Abb. 3.1) isoliert werden. Vergleicht man die Spur der intakten Thylakoide mit der Spur der isolierten LHC II-Trimere (Abb. 3.2), so konnte mit dem anti-Psa A/B (RZ des PS I) und dem anti-D1 (RZ des PS II) Antikörper kein Signal in der LHC II-Trimerprobe detektiert werden. Die Probe enthielt also wahrscheinlich weder PS II noch PS I Kernproteine. Bei den zusätzlich verwendeten Antikörpern gegen die Antennenproteine des PS I (Lhca1-4) und des PS II (Lhcb1-6) konnten neben den erwarteten starken Signalen für die Proteine Lhcb1-3 auch für einige andere Proteine Signale in der Spur der isolierten LHC II-Trimere detektiert werden. Es ist demnach von einer Verunreinigung der Probe mit Antennenproteinen des PS II und des PS I auszugehen. Während die Verunreinigung der LHC II-Trimere mit PS I-Antennenproteinen (Lhca1-4) gering war, ließen sich deutliche Mengen an Lhcb5 (CP26) und Lhcb6 (CP24) nachweisen. Diese Verunreinigungen waren jedoch für die Fragestellung nicht relevant, da mögliche Unterschiede in der ^3Chl -Löschung in den Proben aus unterschiedlichen Carotinoid-Mutanten ähnliche Ergebnisse in allen Antennenproteinen des PS II liefern sollten, so dass diese Präparation für die EPR-Spektroskopie am Max-Planck-Institut in Mülheim verwendet werden konnte.

3.1.2.2 Pigmentanalyse der LHC II-Trimere

Die Pigmentzusammensetzung der LHC II-Trimere aus den verschiedenen Pflanzen wurde mittels HPLC-Analyse bestimmt. Abbildung 3.3 zeigt anhand der Struktur eines LHC II-Monomers (Abb. 3A) die in den verwendeten Mutanten erwartete Verteilung der Carotinoide auf die 4 Bindestellen (Abb. 3B).

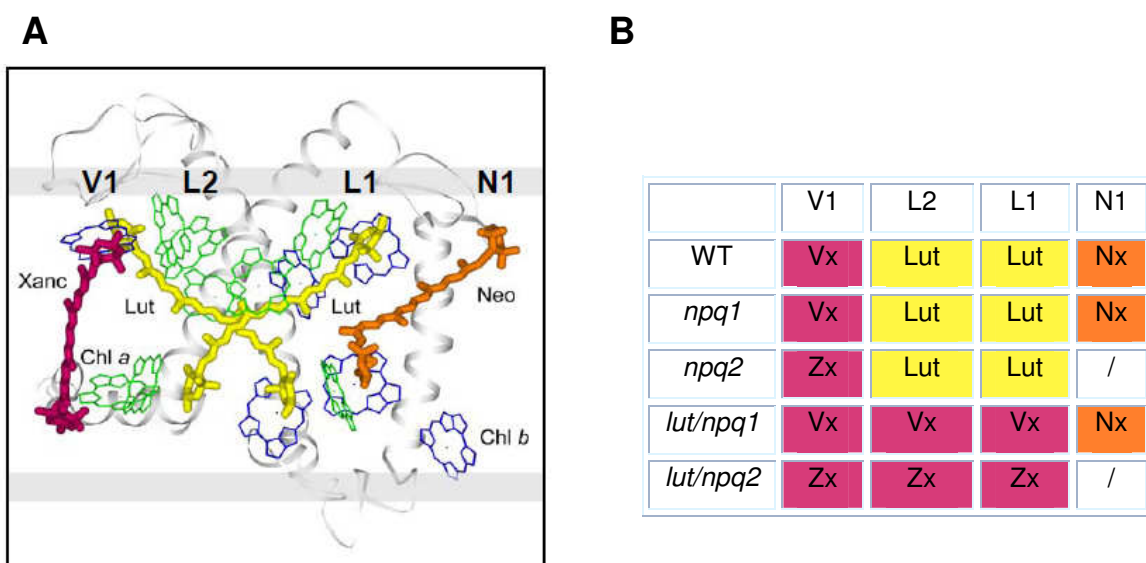


Abbildung 3.3 Carotinoid-Bindestellen im LHC II-Protein. A: Struktur des LHC II-Monomers (nach Liu et al., 2004). Das Proteingrundgerüst ist in grau angedeutet. Die gebundenen Pigmente sind hervorgehoben: 8 Chl a (grün), 2 Luteine (gelb), 6 Chl b (blau), 1 Xanthophyllzykluspigment (violett) und 1 Neoxanthin (orange). **B:** Anzunehmende Besetzung der vier Carotinoid-Bindestellen (V1, L2, L1 und N1) des LHC II in den verwendeten Mutanten.

Das schematisch dargestellte, wildtypische LHC II-Monomer (nach Liu et al., 2004) bindet insgesamt 14 Chl (8 Chl a und 6 Chl b), sowie 2 Lut, 1 Nx und 1 Xanthophyllzykluspigment. Untersuchungen am rekonstituierten Lhcb1 (rLhcb1) (Croce et al., 1999a+b, Hobe et al., 2000, Caffarri et al., 2001) und an nativen LHC II-Monomeren (Ruban et al., 1999) ergaben unterschiedliche Affinitäten der vier Carotinoid-Bindestellen (vgl. Abb. 3.3 B) für die einzelnen Pigmente. Entsprechend ihres Bindungsverhaltens werden sie als L1 (ausschließlich Lut), L2 (bevorzugt Lut), N1 (bevorzugt Nx) und V1 (bevorzugt Vx) bezeichnet. In der Tabelle (Abb. 3B) ist die anzunehmende Besetzung der vier Bindestellen in den verwendeten Mutanten zusammengefasst. Die V1 Bindestelle ist in LHC II-Trimeren jeweils an der Kontaktstelle zwischen 2 Monomeren lokalisiert. Unter Verwendung von Detergenzien kann das an dieser peripheren Bindestelle gebundene Pigment daher leicht ausgetauscht werden (Wehner et al., 2001). Die beiden Lut-Bindestellen L1 und L2 sind für die Struktur und Stabilität des LHC II essentiell. Da die Bindestelle N1 spezifisch für Nx ist, ist zu vermuten, dass sich die Carotinoide der Nx-defizienten Mutanten auf die Bindestellen L1, L2 und V1 verteilen und ansonsten ausschließlich Nx an die N1 Bindestelle bindet.

In der Tabelle 3.1 sind die Pigmentmengen der LHC II-Trimerproben des WT sowie einiger verwendeter Mutanten im Vergleich mit Literaturdaten dargestellt.

Tabelle 3.1 Pigmentzusammensetzung der LHC II-Trimerfraktionen einiger Pflanzen. Die Werte sind normiert auf 14 Chl (a+b). Gezeigt werden die Mittelwerte von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie. Für den WT sind neben den eigenen Daten vergleichende Literaturdaten mit aufgeführt, die ebenfalls auf 14 Chl (a+b) normiert wurden. WT^a: aus Caffarri et al., 2001; WT^b: aus Remelli et al., 1999.

Pflanze	Nx	Vx	Ax	Lut	Zx	Σ_{Chl}	Chl b	Chl a	Chl a/b	Σ_{Car}
WT	0,65	0,18	0,02	2,17	0,00	14	5,38	8,62	1,60	3,02
WT ^a	1,06	0,76	0,01	2,29	0,00	14	k.A.	k.A.	1,53	4,12
WT ^b	1,22	0,37	k.A.	1,96	k.A.	14	5,83	8,17	1,4	3,55
<i>npq1</i>	0,81	0,21	0,02	2,49	0,00	14	5,45	8,55	1,57	3,53
<i>lut2/npq2</i>	0,01	0,04	0,08	0,04	2,09	14	5,1	8,9	1,75	2,26
<i>lut2/npq1</i>	0,69	1,26	0,41	0,21	0,13	14	5,42	8,58	1,58	2,70

Vergleicht man die Pigmentzusammensetzung der LHC II-Trimerfraktion des WT mit den entsprechenden Literaturwerten, so fällt auf, dass das Chl a/b Verhältnis in der hier isolierten Probe leicht erhöht war. Dies lag wahrscheinlich an der Verunreinigung mit den minor Antennenproteinen Lhcb5 und Lhcb6 (vgl. Abb. 3.2). Auch der verringerte Nx-Gehalt der wildtypischen LHC II-Trimerprobe spricht für eine Verunreinigung mit anderen Antennenproteinen, da hauptsächlich die LHC II-Proteine Nx binden. Weiterhin ist

auffallend, dass in allen isolierten Proben weniger als 4 Carotinoide pro Monomer gebunden waren. Dieser Befund kann zumindest teilweise ebenfalls mit der Verunreinigung durch minore Antennenproteine erklärt werden. Aufgrund des sehr geringen Vx-Gehaltes der wildtypischen LHC II-Fraktion (nur 0,18 pro 14 Chl) kann allerdings vermutet werden, dass durch die Detergenzbehandlung das nur locker an der peripheren V1-Bindestelle gebundene Pigment (Vx oder Zx, Abb. 3B) verlorengegangen ist. Die EPR-Messung an den isolierten LHC II-Fraktionen können somit nur Rückschlüsse auf die Triplettlöschung an den Bindestellen N1, L1 und L2, nicht jedoch an der V1-Bindestelle erlauben.

3.1.3 EPR-Spektren verschiedener *A. thaliana* LHCII-Trimere

Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie lassen sich paramagnetische Moleküle, also Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen ($^3\text{Chl}^*$ oder $^3\text{Car}^*$) nachweisen. In Abbildung 3.4 sind die transienten EPR Spektren der isolierten LHC II-Trimerproben aus WT und den 4 Carotinoid-Mutanten im Vergleich mit einem simulierten Spektrum aus $^3\text{Chl}^*$ und $^3\text{Car}^*$ dargestellt. Die $^3\text{Chl}^*$ -Bildung wurde durch Belichtung der LHC II-Trimerprobe mit ca. $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induziert. In allen Spektren ist deutlich eine Mischung aus den beiden simulierten Spektren erkennbar. Es konnte bei den Messungen demnach sowohl das $^3\text{Chl}^*$ als auch das $^3\text{Car}^*$ detektiert werden.

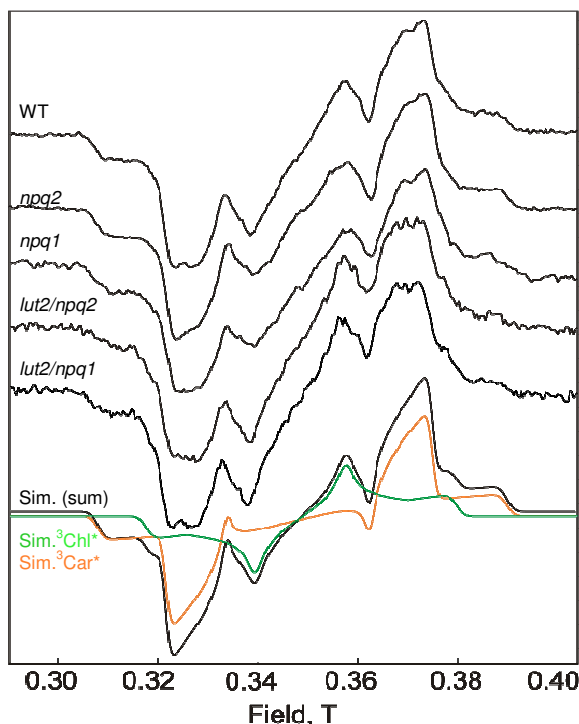


Abbildung 3.4: Transiente EPR-Spektren der LHC II-Komplexe des WT und verschiedener Mutanten. Die Spektren wurden nach Laseranregung bei 532 nm in einem Integrationsfenster von $1 \mu\text{s}$ aufgenommen. Die $^3\text{Chl}^*$ -Bildung wurde durch Belichtung der LHC II-Trimerprobe mit ca. $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induziert. Im unteren Teil sind Simulationen der Spektren von $^3\text{Chl}^*$ (grün) und $^3\text{Car}^*$ (rot) sowie deren Summe gezeigt.

Die transienten EPR-Spektren waren für alle gemessenen Proben sehr ähnlich. Zudem zeigten die gemessenen Spektren eine sehr große Ähnlichkeit zu dem simulierten Spektrum der Summe aus dem $^3\text{Car}^*$ -Spektrum und dem $^3\text{Chl}^*$ -Spektrum. Dies bedeutet, dass in allen Proben in vergleichbarer Weise sowohl $^3\text{Chl}^*$ als auch $^3\text{Car}^*$ gebildet wurden. Da die Mutanten *npq2* und *lut2/npq2*, welche kein Nx binden, ebenfalls ein den anderen Mutanten vergleichbares Spektrum zeigen, kann das Carotinoid Nx als möglicher Chlorophyll-Triplettlöcher bei der Photoprotektion ausgeschlossen werden. Aufgrund des gezeigten Experimentes erscheint es am wahrscheinlichsten, dass das Lutein für die Übernahme des Triplettzustandes im WT verantwortlich ist. Dafür spricht auch, dass die L1 und L2-Bindestellen beide einen besonders engen Kontakt zu den Chl a Molekülen besitzen. Überraschenderweise zeigten die LHC II-Trimere aus den beiden Luteindefizienten Pflanzen (*lut2npq1* und *lut2npq2*) aber ein im Vergleich zum WT unverändertes Spektrum. In den beiden Mutanten wird die L1 und L2-Bindestelle mit den Ersatzpigmenten Vx (in *lut2npq1*) bzw. Zx (in *lut2npq2*) besetzt. Anscheinend können beide Xanthophylle (Vx und Zx) das Lut an der L1 und L2-Bindestelle hinsichtlich der $^3\text{Chl}^*$ -Löschung funktionell ersetzen. Demnach wäre nicht das Carotinoid, sondern die Bindestelle für die Löschung von $^3\text{Chl}^*$ entscheidend. Da die Nx-defizienten Mutanten (*npq2* und *lut2/npq2*) ein dem WT vergleichbares Signal zeigen, scheint die N1-Bindestelle für die $^3\text{Chl}^*$ -Löschung entbehrlich.

3.2 Charakterisierung der NPQ-Prozesse

Neben der Deaktivierung von $^3\text{Chl}^*$ können Carotinoide zudem den $^1\text{Chl}^*$ -Zustand durch Wärmedissipation in den Grundzustand zurückführen. Bei diesem als nicht photochemische Löschung der Anregungsenergie (non-photochemical quenching = NPQ) bezeichneten Prozess, kann im Überschuss absorbierte Lichtenergie in Form von Wärme abgegeben werden, bevor ROS entstehen. Es ist bekannt, dass mindestens drei Prozesse, qT (state transition), qI (Photoinhibition) und qE (high energy state quenching oder feedback de-excitation quenching) zum NPQ beitragen (Übersicht: Krause und Jahns, 2004). Anhand der beobachteten Relaxationskinetiken des NPQ unter *in vivo* Bedingungen wurde die schnelle Phase der Relaxation (1-3 min) dem qE und die langsame Phase (> 20 min) dem qI zugeordnet (Quick und Stitt, 1989; Walters und Horton, 1991) während die Zuordnung der mittleren Phase (10-20 min) unklar blieb. Die ursprüngliche Zuordnung dieser Phase zum qT (Quick und Stitt, 1989) erwies sich als unwahrscheinlich (Walter und Horton, 1991) und es wurde spekuliert, dass es sich bei dieser Phase um die Relaxation eines alternativen qE (Walters & Horton, 1991) oder qI Prozesses (Leitsch et al., 1994) handeln könnte.

Insbesondere der seit etwa 20 Jahren intensiv untersuchte qE-Mechanismus ist immer noch nicht verstanden. Für das qE wurden bislang verschiedene und größtenteils widersprüchliche Modelle sowohl für den Löschungsort (LHC II vs minore Antennenproteine) als auch den zugrunde liegenden molekularen Mechanismen (Löschung durch Zx, Lut oder Chl) vorgeschlagen. Die Ursache dieser widersprüchlichen Vorstellungen liegen wahrscheinlich zum einen in der Komplexität des NPQ an sich und zum anderen in der Tatsache, dass die verschiedenen bisherigen Studien zumeist an isolierten Komplexen (Thylakoide, Antennenproteine) durchgeführt worden sind. Da die komplexen Prozesse des NPQ aber mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Intaktheit der Chloroplasten oder sogar des ganzen Blattes abhängen, wurden die NPQ Prozesse in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden unter nahezu identischen *in vivo* Bedingungen hinsichtlich der zugrunde liegenden Mechanismen grundlegend charakterisiert. Neben den methodisch etablierten Messungen mit dem PAM-Fluorometer wurden dazu in Zusammenarbeit mit dem MPI Mülheim zwei neue Methoden etabliert, welche die Messung der wellenlängenspezifischen Fluoreszenz und der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie an intakten Blättern von *Arabidopsis*-Pflanzen (WT und verschiedene spezifische Mutanten) erlaubten.

3.2.1 Verwendete Pflanzen

Die verwendeten Mutanten waren allesamt durch Veränderungen charakterisiert, die Auswirkungen auf das Ausmaß und die Kinetik der NPQ Bildung und Relaxation haben. Die Mutanten wiesen dabei entweder einen veränderten PsbS-Gehalt (*npq4*: PsbS-defizient; *L17*: erhöhter PsbS-Gehalt) oder Zx-Gehalt (*npq1*: Zx-defizient; *npq2*: Zx-akkumulierend) auf oder waren defizient in Bezug auf den qT-Mechanismus (*stn7*).



Abbildung 3.5: Phänotypen der verwendeten *Arabidopsis* Mutanten.

A: WT, B: *npq1*, C: *npq2*, D: *npq4*, E: *L17*, F: *stn7*. Die gezeigten Pflanzen sind 4 Wochen alt und wurden bei einer PFD von 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Kurztagbedingungen angezogen. Alle Pflanzen sind im gleichen Maßstab dargestellt.

Die verwendeten Pflanzen zeigen bis auf die *npq2* Mutante keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Wachstum (vgl. Abb. 3.5). Sowohl die Mutation der Vx De-epoxidase (VDE) in der *npq1* Mutante als auch der STN7-Kinase der *stn7* Mutante aber auch die veränderte Menge des PsbS-Proteins in der *npq4* und der *L17* Mutante haben demnach keinen Einfluss auf das Wachstum der Pflanzen unter den verwendeten Anzuchsbedingungen. Lediglich die permanente Akkumulation von Zx (bzw. das Fehlen des Vx) in der *npq2* Mutante ging mit einem verringerten Wachstum einher (Abb. 3.5). Dies ist wahrscheinlich im Wesentlichen auf die verminderte Synthese des Phytohormons Abscisinsäure (ABA) durch den Mangel an Vx zurückzuführen (Barrero et al., 2005) und in geringerem Ausmaß auf die permanente Dissipation von Anregungsenergie durch die Akkumulation von Zx (Kaltuho et al., 2007).

3.2.2 Bestimmung der Pigment- und Proteinzusammensetzung in den verschiedenen Mutanten.

Zur Charakterisierung der in den NPQ-Messungen verwendeten Mutanten (vgl. Abb. 3.5) wurden HPLC-Analysen zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung und Western-Blot-Analysen zur Quantifizierung der Antennenproteine durchgeführt, um neben den zu erwartenden Veränderungen durch die spezifischen Mutationen mögliche Nebeneffekte auf die Zusammensetzung der PS II-Antenne abschätzen bzw. ausschließen zu können.

3.2.2.1 Pigmentzusammensetzung

Mit Hilfe der HPLC-Analyse wurde die Pigmentzusammensetzung in Blättern der einzelnen Mutanten unter Dunkel- und Lichtadaptierten Bedingungen analysiert. Die Pflanzen wurden dazu entweder mindestens 10 h vorverdunkelt (= dunkeladaptiert) oder 1 h mit einer Lichtintensität von ca. $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vorbelichtet (= lichtadaptiert). Die gemittelten Werte aus 5 Analysen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Pigmentzusammensetzung ist in allen Pflanzen sehr ähnlich mit Ausnahme der *npq2* Mutante. Da diese Mutante eine Mutation in der Zx Epoxidase (ZE) trägt, kann kein Vx, Ax und Nx gebildet werden. Die Werte für Nx schwanken bei den übrigen Pflanzen zwischen 26 und 34 mmol Nx/mol Chl(a+b), wohingegen die *npq2* Mutante nur sehr geringe Mengen an Nx zeigt. Die Werte für Lut schwanken bei allen Pflanzen zwischen 85 und 125 mmol Lut/mol Chl (a+b). Die Chl a/b Werte lagen zwischen etwa 3,1 und 3,6. Der De-epoxidationszustand (DEPS) liegt für alle Pflanzen unter dunkeladaptierten Bedingungen zwischen 0,02 und 0,05 (Ausnahme: *npq2*) und steigt durch die Umwandlung von Vx in Zx unter Belichtung auf Werte zwischen 0,60 und 0,64 (Ausnahmen: *npq1* und *npq2*) an. Da in der *npq1* Mutante kein Zx gebildet werden kann,

steigt der Wert für den DEPS unter Belichtung nicht an. Bei der *npq2* Mutante hingegen ist der Wert für den DEPS bereits im dunkeladaptierten Zustand weitaus höher als bei den anderen Pflanzen. Er liegt bei 0,97 und verändert sich unter Belichtung nur unwesentlich.

Tabelle 3.2: Pigmentzusammensetzung von dunkeladaptierten und vorbelichteten Pflanzen. Die Pigmente sind angegeben in mmol pro mol Chl (a+b). Angegeben sind die Mittelwerte aus 5 Messungen und deren Standardabweichung. VAZ: Xanthophyllzykluspigmente ($Vx+Ax+Zx$), DEPS: Deepoxidationszustand der Xanthophyllzykluspigmente ($(Zx+0,5 Ax)/(VAZ)$).

	WT		<i>npq1</i>		<i>Npq4</i>	
	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht
Nx	33 ± 1	34 ± 1	34	32	33 ± 1	34 ± 1
VAZ	29 ± 2	31 ± 2	28 ± 1	28 ± 1	28 ± 2	30 ± 2
Lut	109 ± 6	115 ± 2	123	125	109 ± 4	117 ± 2
β-Car	79 ± 5	82 ± 1	95	93	81 ± 4	82 ± 4
Chl a/b	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1
DEPS	0,02 ± 0,01	0,64 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,64 ± 0,02

	<i>L17</i>		<i>npq2</i>		<i>Stn7</i>	
	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht
Nx	33 ± 1	33 ± 1	3 ± 1	2 ± 2	26 ± 5	30 ± 1
VAZ	23 ± 2	27 ± 1	85 ± 3	92 ± 1	22 ± 1	24 ± 7
Lut	113 ± 2	120 ± 2	85 ± 6	89 ± 6	90 ± 6	95 ± 2
β-Car	71 ± 4	73 ± 6	76 ± 10	81 ± 10	70 ± 8	72 ± 3
Chl a/b	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1
DEPS	0,02 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,97 ± 0,01	0,98 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,47 ± 0,02

Alle Pflanzen zeigen eine, für die entsprechenden Mutationen normale Pigmentzusammensetzung unter dunkeladaptierten Bedingungen sowie eine entsprechende Reaktion auf starke Belichtung.

3.2.2.2 Proteinzusammensetzungen der verschiedenen Mutanten

Western-Blot-Analysen der in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen wurden mit einigen spezifischen Antikörpern durchgeführt um mögliche Unterschiede in den Gehalten der Antennenproteine ermitteln zu können. Mit Hilfe der Analyse sollte geprüft werden, ob die Mutation in den Pflanzen zu Veränderungen insbesondere in den Antennenproteinen der Photosysteme führt. Es ist deutlich erkennbar, dass keine erheblichen Unterschiede in den Proteinmengen des D1 (RZ des PS II), und des Psa A/B (RZ des PS I) sowie den Antennenproteinen des PS I und des PS II in den verschiedenen Pflanzen vorliegen.

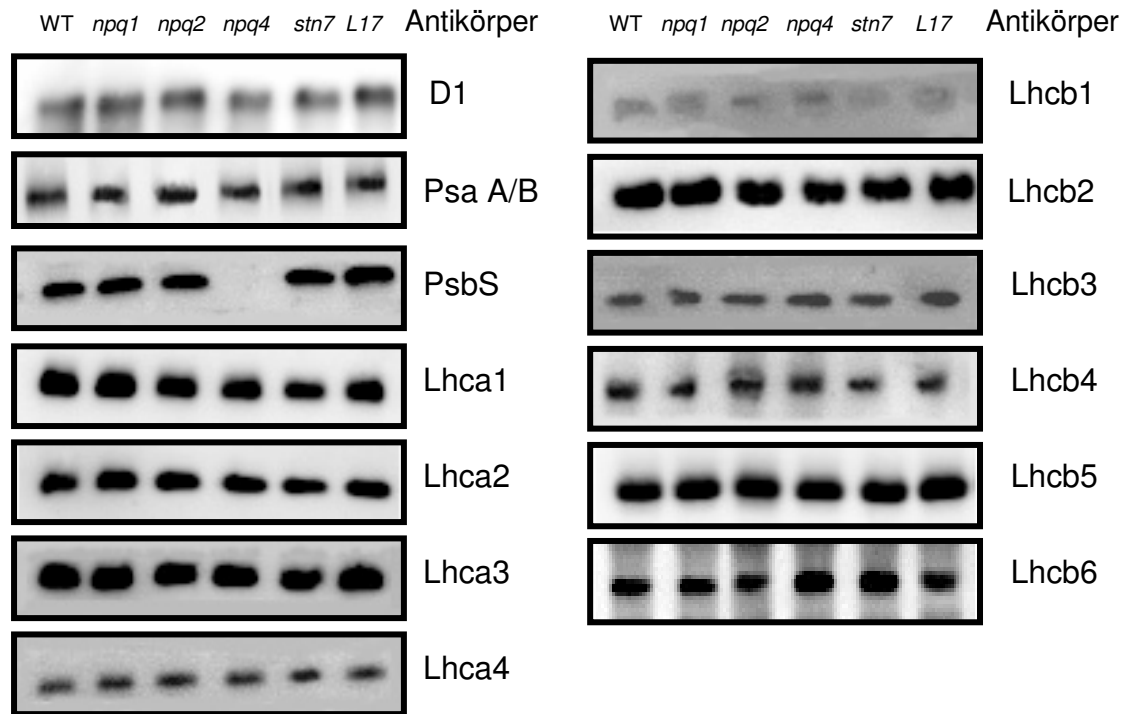


Abbildung 3.6 Western-Blot-Analysen der verschiedenen Pflanzen mit spezifischen Antikörpern. Aufgetragen wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein isoliert aus Blättern der jeweiligen Pflanze.

Einzig der Blot, mit dem Antikörper gegen das PsbS-Protein zeigte erwartungsgemäß kein Signal in der Spur der *npq4* Mutante und ein verstärktes Signal in der PsbS überexprimierenden Linie *L17*. Mit Ausnahme des PsbS-Proteins in der *npq4* und der *L17* Mutante konnten somit keine weiteren Änderungen für die verschiedenen Mutanten beobachtet werden.

3.2.3 Fluoreszenzlöschungskinetiken gemessen mit dem PAM Fluorometer

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten sind bereits in vielen Studien hinsichtlich der Bildung und Relaxation des NPQ charakterisiert worden. Allerdings wurden in allen vorherigen Studien nahezu ausschließlich die schnell (in 5-15 min) induzierbaren und schnell relaxierenden (5-10 min) NPQ Prozesse betrachtet, die jeweils dem qE-Mechanismus zugeordnet wurden. Abbildung 3.7 veranschaulicht die in einem typischen Experiment mit Hilfe der PAM-Fluorometrie detektierbaren, bekannten Unterschiede in den Mutanten während einer 15minütigen Belichtung mit $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer anschließenden 10minütigen Dunkelphase.

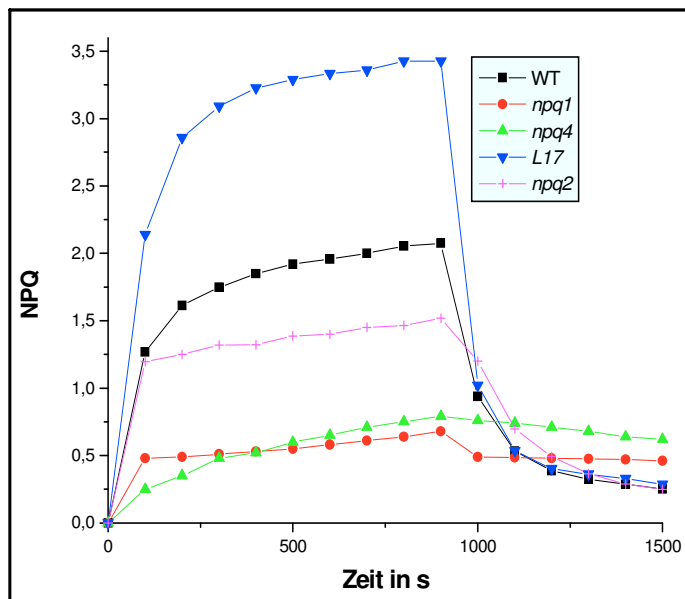


Abbildung 3.7 Fluoreszenzlöschung verschiedener Pflanzen. Die Pflanzen wurden 15 min mit einer Intensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend weitere 10 min verdunkelt. Während der gesamten Messzeit wurden alle 100 s sättigende Lichtpulse gegeben. Gezeigt werden die Mittelwerte von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

Wie in Abbildung 3.7 deutlich erkennbar ist, zeigt die *L17* Mutante die höchste Fluoreszenzlöschungskapazität. Gemessen an der Kapazität des WT (maximales NPQ von etwa 2.0) liegt der Wert für die *L17* Mutante ca. 40 % höher. Die beiden Mutanten *npq4* und *npq1* zeigen im Vergleich zum WT eine um ca. 75 %, die *npq2* Mutante eine um 35 % reduzierte Fluoreszenzlöschungskapazität. Betrachtet man die Kinetik der NPQ Bildung und Relaxation, so zeigte der WT unter diesen Bedingungen einen schnellen (innerhalb weniger Minuten) Anstieg des NPQ, der im Dunkeln ebenso schnell fast vollständig relaxierte. In Abwesenheit von PsbS (*npq4*) war der schnelle Anstieg nicht mehr erkennbar, während bei erhöhtem PsbS-Gehalt (*L17*) ein deutlich erhöhtes schnell induzierbares NPQ auftrat. In allen drei Fällen war jedoch ein zusätzlicher, langsamerer Anstieg des NPQ zu beobachten, der aber nach 15 min Belichtung noch nicht vollständig abgeschlossen war (Abb. 3.7). In allen früheren Untersuchungen (z.B. Li et al., 2002) wurde diese langsamere Phase des NPQ Anstiegs fast immer ignoriert und lediglich der schnell induzierbare Anteil des NPQ dem pH- und PsbS-abhängigen qE-Mechanismus des NPQ zugeordnet. In den beiden Xanthophyllzyklus-Mutanten *npq1* (kein Zx) und *npq2* (Zx-akkumulierend) konnte ausschließlich der schnelle Anstieg des NPQ beobachtet werden und kein deutlich ausgeprägter langsamer Anstieg, wobei in Abwesenheit von Zx (*npq1*) das NPQ im Vergleich mit dem WT deutlich verringert war. Aus diesen Befunden wurde aus früheren Studien abgeleitet, dass der qE-Mechanismus nicht nur pH- und PsbS-abhängig ist, sondern auch durch Zx beeinflusst wird (Niyogi et al., 1998; Johnson et al., 2009). Bekannt war zudem (wie auch in Abb. 3.7 zu erkennen), dass die Relaxation des NPQ in Gegenwart von großen Mengen an Zx (*npq2*) im Vergleich mit dem WT etwas

verlangsamt ist, während in Abwesenheit von Zx (*npq1*) zumindest ein Teil des NPQ schneller relaxiert als im WT (Johnson et al., 2009).

Um die NPQ Prozesse in ihrer Gesamtheit und Komplexität verstehen zu können, wurden für diese Arbeit drei verschiedene Methoden (zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie, wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie und PAM-Fluorometrie) zur Messung des NPQ an intakten Blättern gewählt und die Messungen insbesondere auf einen längeren Belichtungszeitraum ausgedehnt, um den Gleichgewichtszustand des NPQ und damit sämtliche NPQ Prozesse verfolgen zu können.

3.3 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen wurden unter drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

- 1) F_0 -Bedingungen: Dunkeladaptierte Blätter mit offenen Reaktionszentren (RZ)
- 2) F_{Max} -Bedingungen: Dunkeladaptierte Blätter mit geschlossenen RZ
- 3) F_{NPQ} -Bedingungen: Lichtadaptierte Blätter mit geschlossenen RZ

Bei der Durchführung der Experimente unter F_{NPQ} -Bedingungen zeigte sich, dass zuverlässige und reproduzierbare Messungen erst nach einer Vorbelichtung von mindestens 30-40 Minuten erhalten wurden. Dies ließ darauf schließen, dass erst ab dieser Vorbelichtungszeit ein Gleichgewichtszustand bezüglich des NPQ erreicht war. Somit wurde mit den einzelnen Messungen der Fluoreszenzabklingkurven unter F_{NPQ} -Bedingungen in allen Experimenten erst nach einer Vorbelichtungszeit von 45 min begonnen

3.3.1 Fluoreszenzabklingkurven

Es wurden Fluoreszenzabklingkurven im Bereich von 676 nm bis 745 nm unter den drei Bedingungen gemessen. In Abb. 3.8 sind beispielhaft die gemessenen Fluoreszenzabklingkurven für den WT sowie die Mutanten *npq1*, *npq4* und *L17* bei 686 nm dargestellt. Die verschiedenen Pflanzen zeigen sehr ähnliche Abklingkurven unter Dunkelbedingungen (F_0 und F_{Max}). Die Situation unter F_{NPQ} -Bedingungen ist im Gegensatz dazu erheblich anders. Die schnellste Abklingkurve zeigt die *L17* Mutante, was mit der stärksten Löschung der Anregungsenergie (und damit mit dem höchsten NPQ, vgl. Abb. 3.7) gleichgesetzt werden kann. Der WT zeigt nur eine etwas langsamere Abklingkurve als die *L17* Mutante, wohingegen die beiden Mutanten *npq1* und *npq4* ein im Vergleich mit dem WT weiter verlangsamtes Abklingen der Fluoreszenz zeigten.

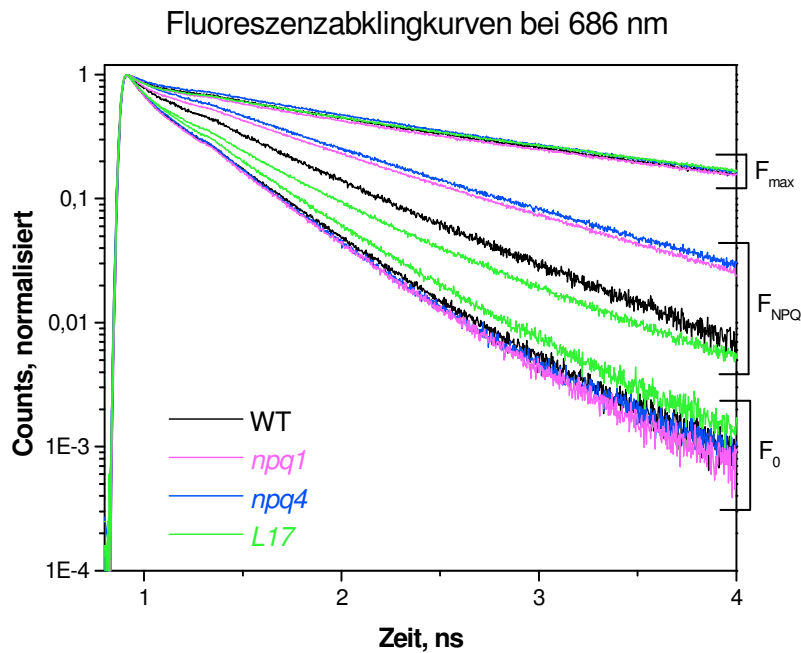


Abbildung 3.8: Fluoreszenzabklingkurven bei 686 nm. Die Kurven des WT und der Mutanten *npq1* (pink) *npq4* (blau) und *L17* (grün) sind unter F_0 , F_{npq} und $F_{\max}$ Bedingungen dargestellt. Die Höhe der Kurven wurde normalisiert (auf einer semilogarithmischen Skala).

In der Tabelle 3.3 sind die Lebenszeiten der Fluoreszenzabklingkurven unter den verschiedenen Bedingungen zusammengefasst. Sie quantifizieren die anhand der Abbildung 3.8 erkennbaren Unterschiede der Fluoreszenzabklingkurven. Aus den ermittelten Lebenszeiten konnten zudem die Werte für NPQ nach der Gleichung:

$$NPQ = F_M/F'_M - 1 = \tau_{av}/\tau'_{av} - 1$$

berechnet werden. Dabei entspricht τ_{av} dem Wert für die Lebenszeit unter F_M -Bedingungen und τ'_{av} dem Wert für die Lebenszeit unter F_{NPQ} -Bedingungen.

Tabelle 3.3: Mittlere Lebenszeiten τ_{av} (in ps) der Fluoreszenzabklingkurven bei 686 nm. Die Abweichungen lagen bei unter 10 %. Aus den ermittelten Lebenszeiten wurde das NPQ berechnet und mit den entsprechenden Werten aus den PAM-Messungen (durchgeführt unter ähnlichen Bedingungen, vgl. Abb. 3.7) verglichen.

	WT	<i>npq1</i>	<i>npq4</i>	<i>L17</i>
F_0 (τ_{av} , ps)	210	204	189	202
F_{NPQ} (τ_{av} , ps)	408	569	498	218
F_M (τ_{av} , ps)	1245	1072	1061	1132
NPQ ($\tau_{av}/\tau'_{av} - 1$)	2,0	0,9	1,1	4,2
NPQ (PAM)	2,1	1,0	1,2	3,5

Die anhand der Messung der Fluoreszenzabklingkurven errechneten Werte für NPQ stehen im Einklang mit den Ergebnissen der PAM Messungen. Um weitergehende Informationen über die beteiligten Komponenten zu erhalten, wurden die Fluoreszenzabklingkurven global analysiert.

3.3.2 Decay Associated Emission Spectra (DAS)

Mit Hilfe der globalen Target-Analyse können die, bei verschiedenen Wellenlängen (676 nm bis 745 nm) aufgenommenen Fluoreszenzabklingdaten in Kombination analysiert werden (Holzwarth et al., 1985). Dabei ist die globale Analyse meist auf die Identifikation von Lebenszeitkomponenten und Amplituden fokussiert. Die mathematischen Grundlagen dazu sind in 2.6.2 beschrieben. Die globalen Target-Analysen beruhen zum Großteil auf den detaillierten Erkenntnissen aus Untersuchungen zu den Kinetiken isolierter Antennen- und Reaktionszentrumskomplexen (Broess et al., 2006; Holzwarth et al., 2005; Holzwarth et al., 2006a; Holzwarth et al., 2006b; Holzwarth 2008; Ihalainen et al., 2005b; Ihalainen et al., 2005a; Miloslavina et al., 2006; Slavov et al., 2008). Die Target-Analysen konnten mittels der aus den angegebenen Arbeiten resultierenden kinetischen Schemata für PS I und PS II (vgl. Abb. 3.9) durchgeführt werden.

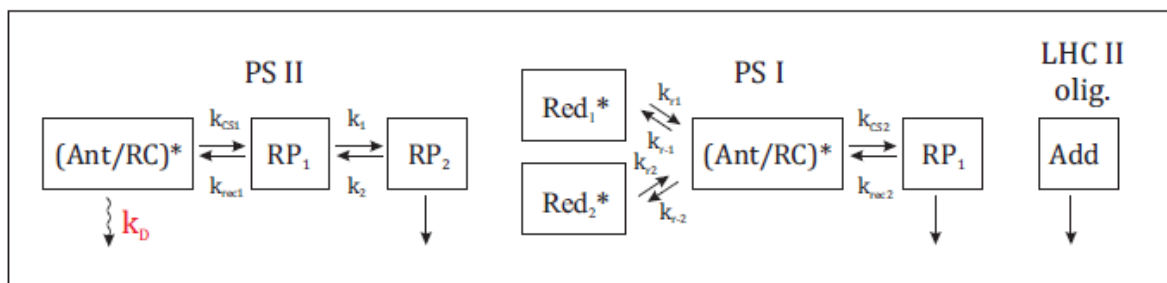


Abbildung 3.9: Schemata der Kinetiken für PS I und PS II und zusätzlicher (Add.) Komponenten, die weder PS I noch PS II zugeordnet werden können. Die Schemata wurden für die Target-Analysen der Fluoreszenzabklingkinetiken verwendet. Ant = Antenne, RC = Reaktionszentrum, RP = Radikalpaar, k_{CS} = Ratenkonstante der Ladungstrennungsreaktion, $k_{r(rec)}$ = Ratenkonstante der Ladungsrekombination, k_D = Ratenkonstante für die Energiedissipation in der PS II-Antenne.

Die ermittelten Amplituden der Lebenszeitkomponenten ergeben aufgetragen gegen die Wellenlängen die sogenannten ‚decay-associated spectra‘ [DAS] (Holzwarth et al. 1985). Meist zeigt ein DAS eine Kombination aus verschiedenen Spektren, die der Fluoreszenzlebenszeit zugeordnet werden müssen. Zusätzlich können aus den globalen Target-Analysen die mittleren Lebenszeiten der Komponenten ermittelt werden. Dies ist am Beispiel von dunkeladaptierten WT Pflanzen in Abb. 3.10 verdeutlicht. Die Abbildung zeigt in einem Diagramm mehrere Spektren, die aufgrund ihrer maximalen Amplitude

entweder dem PS I (≥ 690 nm) oder dem PS II (ca. 680 nm) zugeordnet werden konnten. Die vier Spektren, welche mit gestrichelten Linien dargestellt sind, konnten dabei eindeutig dem PS I zugeordnet werden. Die drei weiteren, mit durchgezogenen Linien dargestellten Spektren konnten eindeutig dem PS II zugeordnet werden.

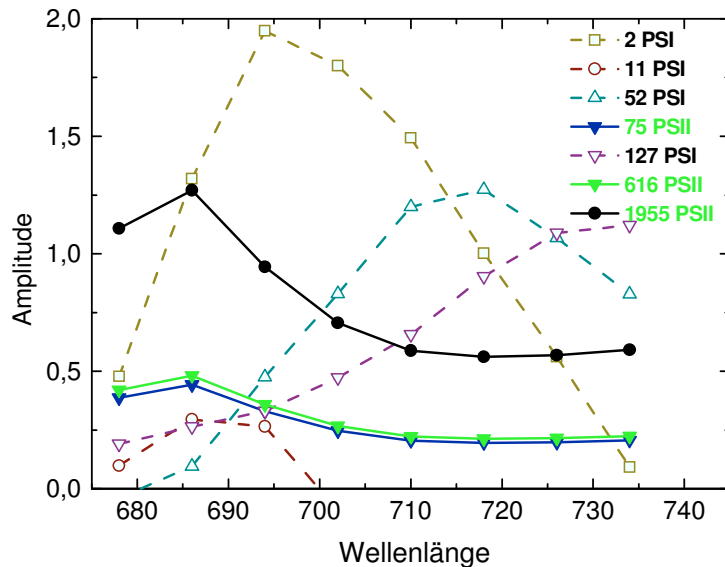


Abbildung 3.10: DAS des WT unter F_{Max} -Bedingungen. Mit Hilfe der globalen Target-Analysen konnten die DAS sowie die mittleren Lebenszeiten (in ps) aus den Fluoreszenzabklingkurven ermittelt werden.

Die ermittelten Lebenszeiten für die Komponenten des PS I liegen zwischen 2 ps und 127 ps, wohingegen die Lebenszeiten der PS II-Komponenten Werte zwischen 75 ps und 1955 ps erreichten. Vergleicht man die DAS der verschiedenen Mutanten unter F_{Max} -Bedingungen mit dem des WT (Abb. 3.11), so fällt auf, dass diese sehr ähnlich sind.

Alle Mutanten zeigen ebenfalls jeweils 4 Komponenten, die dem PS I zugeordnet werden konnten und 3 Komponenten, die dem PS II zugeordnet werden konnten. Die Amplituden der Komponenten sowie deren Lebenszeiten unterschieden sich im Vergleich mit dem WT kaum. Daraus lässt sich eindeutig ableiten, dass die Defekte in den einzelnen Mutanten im Dunkelzustand sowohl unter F_0 -Bedingungen (nicht gezeigt), als auch unter F_{Max} -Bedingungen keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich mit dem WT aufweisen.

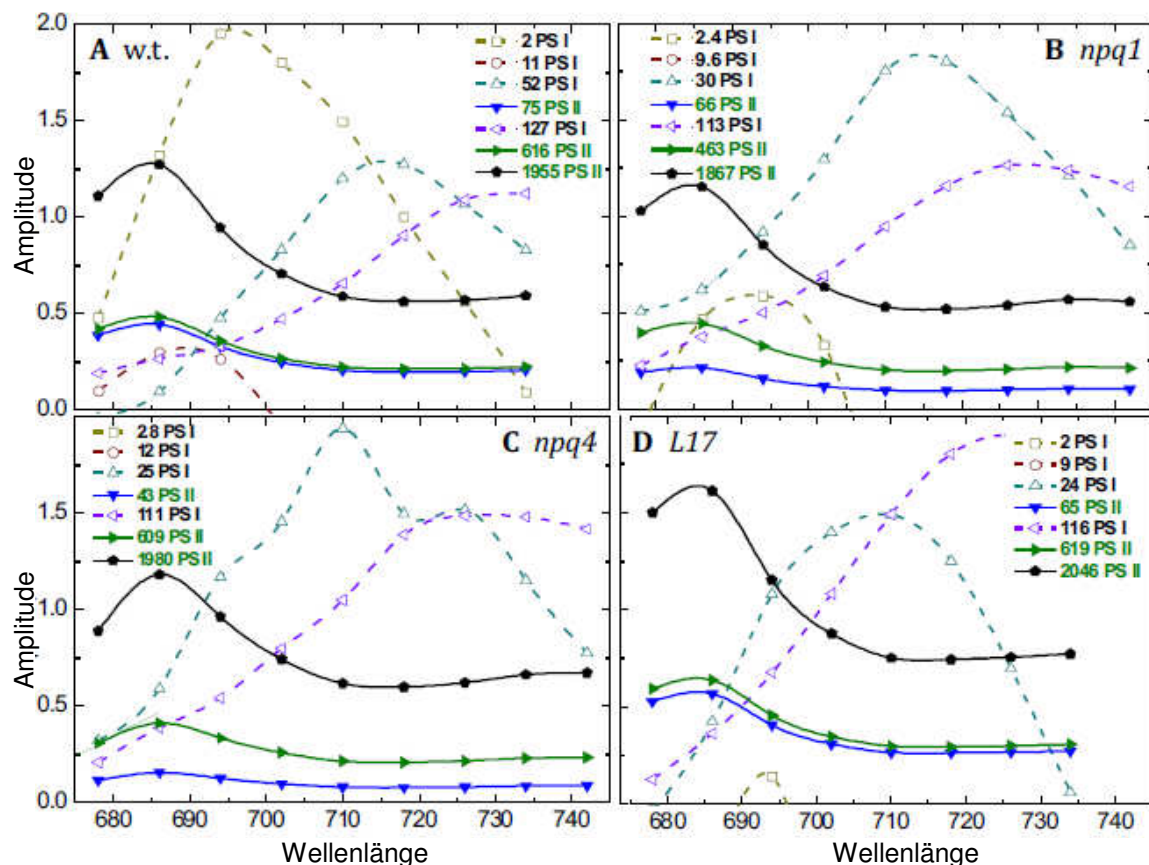


Abbildung 3.11: Komponenten der Fluoreszenzlebenszeiten verschiedener Pflanzen unter F_{Max} -Bedingungen. DAS (Decay Associated Emission Spectra) wurden durch die Target-Analysen der Fluoreszenzabklingkurven ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Komponenten inklusive der Lebenszeiten in ps. **A:** WT, **B:** *npq1*, **C:** *npq4*, **D:** *L17*. Grün dargestellt sind alle dem PS II zugeordneten Komponenten und schwarz markiert sind alle dem PS I zugeordneten Komponenten.

Ein gänzlich anderes Bild ergab sich aber anhand der Target-Analysen und der daraus abgeleiteten DAS für den lichtadaptierten Zustand unter F_{NPQ} -Bedingungen (vgl. Abb. 3.11 und 3.12). Da die Komponenten des PS I nicht essentiell für das NPQ sind, werden an dieser Stelle nur die PS II-Komponenten genauer betrachtet.

Vergleicht man zuerst die ermittelten Daten für den WT im dunkeladaptierten Zustand (F_{Max} -Bedingungen; Abb. 3.11A) und lichtadaptierten Zustand (F_{NPQ} -Bedingungen; Abb. 3.12 A), so werden folgende Unterschiede deutlich:

- 1) Die Lebenszeiten der PS II-Komponenten sind unter F_{NPQ} -Bedingungen erheblich verkürzt.
- 2) Die Amplituden der PS II-Komponenten sind unter F_{NPQ} -Bedingungen deutlich erniedrigt.
- 3) Unter F_{NPQ} -Bedingungen entsteht eine neue Komponente, die weder dem PS I noch dem PS II zugeordnet werden kann.

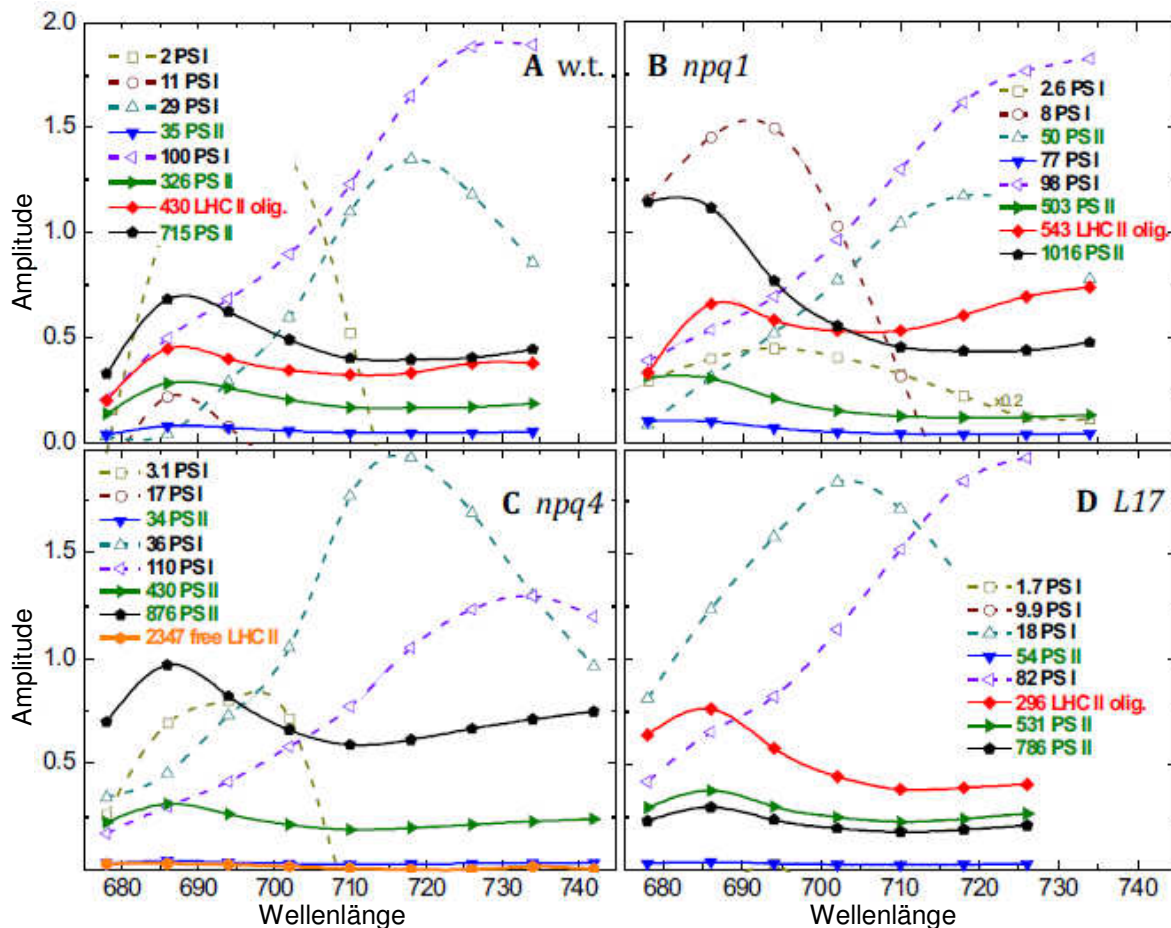


Abbildung 3.12: Komponenten der Fluoreszenzlebenszeiten verschiedener Pflanzen unter F_{NPQ} -Bedingungen. DAS (Decay Associated Emission Spectra) wurden durch die Target-Analysen der Fluoreszenzabklingkurven ermittelt. Dargestellt sind die einzelnen Komponenten inklusive ihrer Lebenszeiten in ps. **A:** WT, **B:** *npq1*, **C:** *npq4*, **D:** *L17*. Die Lebenszeiten der, dem PS II zugeordneten Komponenten sind in grün angegeben und die Lebenszeiten der, dem PS I zugeordneten Komponenten in schwarz. Eine erforderliche weitere Komponente wurde dem LHC II zugeordnet, der entweder als LHC II-Oligomer (rot) oder in freier Form (orange) vorlag. Weitere Details zur Zuordnung der einzelnen Komponenten im Text.

Die Verkürzung der Lebenszeiten der PS II-Komponenten unter F_{NPQ} -Bedingungen spiegelt dabei die Bildung von Lösungs-Prozessen in der mit PS II assoziierten Antenne wider und ist somit ein Indikator für die Induktion des NPQ im lichtadaptierten Zustand. Die Erniedrigung der Amplituden der PS II-Komponenten unter F_{NPQ} -Bedingungen kann als Verkleinerung der effektiven PS II-Antennengröße im lichtadaptierten Zustand verstanden werden. Die unter F_{NPQ} -Bedingungen neu entstandene Komponente zeigt einen im Vergleich zu den PS II-Komponenten auffällig hohen Anteil im fernroten Bereich und wurde deswegen der Bildung von LHC II-Oligomeren zugeschrieben, die nicht funktionell mit der PS II-Antenne assoziiert sind (s. unten Abb. 3.13). Aus dem Verhältnis der Amplitude dieser neuen Komponente zur Gesamtamplitude der drei PS II-Komponenten lässt sich die damit verbundene Verkleinerung der effektiven PS II-Antennen im lichtadaptierten Zustand abschätzen, die für den WT bei etwa 30 % lag (vgl.

Tabelle 3.4). Betrachtet man nun die Unterschiede der ermittelten DAS für den dunkel- und lichtadaptierten Zustand in den verschiedenen Mutanten im Vergleich mit dem WT, so lassen sich folgende Besonderheiten feststellen:

- 1) In Gegenwart eines erhöhten PsbS-Gehaltes (*L17* Mutante; Abb. 3.11 D und 3.12 D) traten die gleichen Veränderungen wie im WT auf, jedoch war die Amplitude der neuen Komponente deutlich größer und die der PS II-Komponenten deutlich kleiner. Dies lässt sich mit einer verstärkten Bildung von LHC II-Oligomeren und einer damit verbundenen stärkeren Abnahme der effektiven PS II-Antennengröße (um etwa 56 %, Tabelle 3.4) in *L17* erklären.
- 2) In Abwesenheit von PsbS (*npq4*) war dagegen weder eine Erniedrigung der Amplituden der PS II-Komponenten noch das Auftreten der neuen fernroten Komponente zu beobachten.
- 3) In Abwesenheit von Zx (*npq1*) war die fernrote Komponente mit ähnlichen Charakteristika zu beobachten wie im WT, jedoch waren die Lebenszeiten der PS II-Komponenten deutlich weniger verkürzt.

Daraus lässt sich ableiten, dass für die Bildung der neuen fernroten Komponente (= LHC II-Oligomere) das PsbS-Protein essentiell ist, wohingegen die Verkürzung der Lebenszeiten in der mit PS II assoziierten Antenne vom Zx abhängig ist. Grundsätzlich lassen diese Befunde somit auf die Bildung von zwei verschiedenen Orten der Energielöschung (im Folgenden Q1 und Q2 genannt) im lichtadaptierten Zustand schließen: Q1 wird durch die Ablösung von Teilen der PS II-Antenne unter Bildung von oligomeren LHC II-Komplexen gebildet und ist PsbS abhängig, wohingegen Q2 in der mit PS II assoziierten Antenne lokalisiert ist und von Zx abhängig ist.

Tabelle 3.4: Mittlere Lebenszeiten τ_{av} der PS II-Komponenten sowie der zusätzlichen Komponente. Die zusätzliche Komponente wird hier als gelöschte LHC II-Oligomere bezeichnet. Verglichen werden die Werte des WT mit den Werten der übrigen Mutanten *npq1*, *npq4* und *L17*.

	WT	<i>npq1</i>	<i>npq4</i>	<i>L17</i>
$k_D \text{ NPQ in ns}^{-1}$	1,7	0,8	1,3	1,6
$k_D \text{ Fmax in ns}^{-1}$	0,4	0,5	0,3	0,3
$\text{NPQ}_{\text{PS II}}$	1,3	0,5	1,0	1,2
$F_{\text{NPQ}} (\tau_{av}, \text{ps})$	559	852	746	615
$F_M (\tau_{av}, \text{ps})$	1282	1309	1484	1325
τ (ps) der abgelösten LHC II-Oligomere	430	543	-	300
Anteil des ungebundenen LHC II (in % der gesamten PS II-Antenne)	30	30	-	56

Diese Zusammenhänge sind in Tabelle 3.4 in quantitativer Form zusammengefasst. Q2 wird durch die Ratenkonstanten k_D charakterisiert. Dabei spiegelt k_D die strahlungslose,

nicht photochemische Deaktivierung der mit PS II assoziierten Antenne wider und kann damit als direktes Maß für das NPQ in der PS II-Antenne herangezogen werden (vgl. Abb. 3.9). Die k_D -Werte liegen bei dem ungelöschten PS II (F_{Max} -Bedingung) zwischen 0,3 und 0,5 ns⁻¹ und spiegeln die natürliche, strahlungslose Abklingrate der Chl-Fluoreszenz in der Antenne wider. Unter NPQ-Bedingungen ist die Ratenkonstante im WT und den Mutanten *L17* und *npq4* um das 4-5fache erhöht. Dieser durch nicht-photochemische Lösungsprozesse induzierte Anstieg ist bei der *npq1* Mutante deutlich kleiner (< 2). Daraus resultiert ebenfalls ein deutlich vermindertes NPQ_{PS II} (nur 0,5 im Vergleich zu Werten zwischen 1,0 und 1,3 in den anderen Genotypen). Da die *npq1* Mutante kein Zx bilden kann, ist Q2 somit abhängig von Zx. Ein zusätzlicher, Zx unabhängiger Mechanismus könnte für das noch zu beobachtende NPQ_{PS II} in dieser Mutante verantwortlich sein.

Q1 dagegen wird durch den relativen Anteil der nicht mit PS II assoziierten LHC II (in Tabelle 3.4 angegeben in % der gesamten PS II Antenne) aktiviert. Die Ablösung von LHC II konnte bei dem WT (30%), der *npq1* (30%) und der *L17* Mutante (56%), nicht jedoch aber bei der *npq4* Mutante beobachtet werden, was für die strikte Abhängigkeit dieser Komponente von PsbS spricht. Ein weiterer interessanter Aspekt ergibt sich bei Betrachtung der Lebenszeiten der neuen fernroten Komponente. Im Vergleich mit dem WT (430 ps) zeigt die Mutante *L17* (300 ps) eine deutliche Verkürzung der Lebenszeit, wohingegen die Lebenszeit dieser Komponente in der *npq1* Mutante (543 ps) erhöht war. Die längere Lebenszeit in *npq1* deutet darauf hin, dass die Effizienz der Energielöschung in Q1 möglicherweise ebenfalls durch Zx moduliert werden kann.

Die Zuordnung der neuen fernroten Komponente (Abb. 3.12) zur Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen unter F_{NPQ} -Bedingungen ergab sich aus der Tatsache, dass diese Komponente aufgrund der spektralen Eigenschaften einerseits weder dem PS I noch dem PS II eindeutig zugeordnet werden kann, andererseits aber sehr große Ähnlichkeiten mit den Fluoreszenzeigenschaften von oligomeren LHC II-Trimeren besitzt, wie sie unter *in vitro* Bedingungen beobachtet wurden (Miloslavina et al., 2008; Abb. 3.13). Des Weiteren wurde beim Auftreten dieser Komponente eine Abnahme der Amplituden der mit PS II assoziierten Komponenten beobachtet. Bei der beobachteten neuen Komponente (Abb. 3.12) handelt es sich jedoch nicht um ein typisches LHC II-Trimer Spektrum, sondern um ein stark im roten Bereich erhöhtes LHC II-Oligomer Spektrum (vgl. Abb. 3.13). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass diese unter F_{NPQ} -Bedingungen auftretende Komponente einem Teil der LHC II-Antenne zugeschrieben werden kann, der funktionell vom PS II abgelöst und gleichzeitig gelöscht ist.

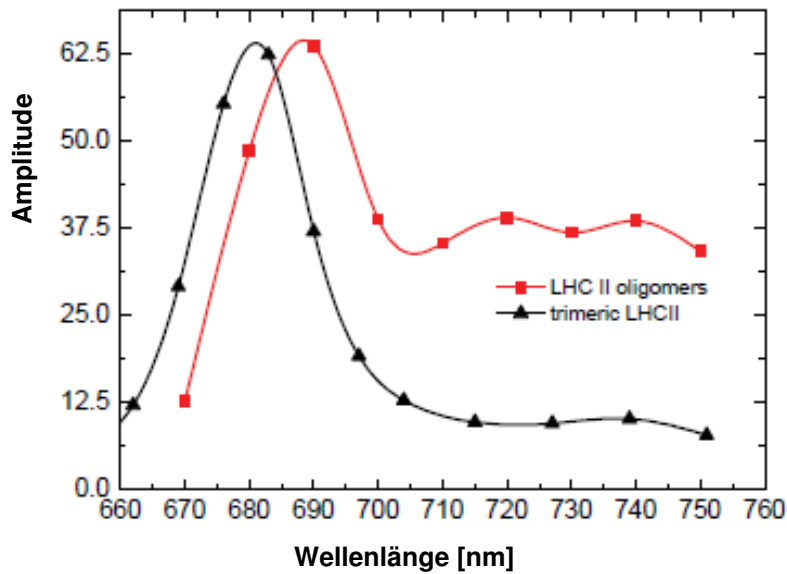


Abbildung 3.13: Fluoreszenzspektren von LHC II-Oligomeren und isolierten LHC II-Trimeren. Die Spektren sind auf das Maximum normalisiert. In den LHC II-Oligomeren ist eine stark erhöhte Fluoreszenzintensität im roten Bereich erkennbar.

Aufbauend auf die Ergebnisse der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie lässt sich ein neues Modell für das NPQ ableiten (Abb. 3.14).

A: Dunkeladaptierter Zustand

B: Lichtadaptierter Zustand

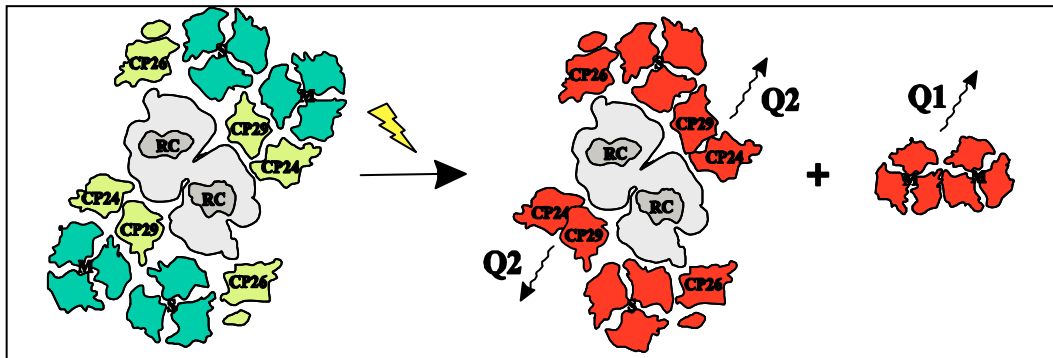


Abbildung 3.14: Modell für die Lokalisation von zwei unterschiedlichen Löschungsorten die am NPQ unter *in vivo* Bedingungen beteiligt sind. Beim Übergang vom dunkel- (A) in den lichtadaptierten Zustand (B) werden zwei Löschungsorte aktiviert. Der erste Löschungsort (Q1) wird durch die funktionelle Ablösung und Aggregation des majoren Antennenkomplexes des PS II aktiviert und ist essentiell abhängig vom PsbS-Protein. Der zweite Löschungsort (Q2) ist in der verbleibenden Antenne des PS II lokalisiert und im Wesentlichen von Zx abhängig.

Demnach werden unter sättigenden Lichtbedingungen zwei unabhängige Löschungsorte induziert. Zum einen der Löschungsort Q1, der durch die funktionelle Ablösung des majoren Antennenkomplexes des PS II aktiviert wird und vom PsbS-Protein abhängig ist. Q1 fehlt in der *npq4* Mutante und ist in der *L17* Mutante verstärkt. Ein zweiter Löschungsort, Q2 ist in der minoren Antenne des PS II lokalisiert und benötigt Zx. Q2 ist in Abwesenheit von Zx (*npq1*) stark vermindert. Das noch zu beobachtende Q2- quenching in der *npq1* Mutante könnte auf einen weiteren Zx-unabhängigen Prozess hinweisen, der am Q2 beteiligt ist. Die genaue Lokalisation von Q2 kann aus den

vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden, könnte jedoch in den minoren Antennenproteinen des PS II lokalisiert sein. Ebenso kann keine Aussage über den molekularen Mechanismus der Energielöschung gemacht werden.

Auch die Kinetik des Entstehens der beiden Löschungsorte kann, bedingt durch die Messmethodik, nicht beurteilt werden. Allerdings lässt sich vermuten, dass der Q1 Mechanismus aufgrund der PsbS-Abhängigkeit sehr schnell, mit dem Aufbau des ΔpH , aktiviert wird, wohingegen der Mechanismus Q2 aufgrund der Zx-Abhängigkeit langsamer aktiviert werden sollte. Da eine zeitabhängige Darstellung der beiden Prozesse mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie bislang noch nicht möglich war, wurde der kinetische Aspekt in weiteren Untersuchungen (i) der Wellenlängenabhängigkeit des NPQ und (ii) der Dynamik der NPQ-Prozesse mittels PAM-Fluorometrie bearbeitet.

3.4 Wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie

Die bei Raumtemperatur emittierte Chl-Fluoreszenz wurde im Wellenlängenbereich von 660-770 nm untersucht. Abbildung 3.15 zeigt typische (auf die Fluoreszenz bei 760 nm normierte) Emissionsspektren für den WT, die unter drei verschiedenen Bedingungen gemessen wurden: (i) Im dunkeladaptierten Zustand (D), (ii) nach 30 min Belichtung mit einer Intensität von $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (L), sowie (iii) nach einer erneuten Verdunkelung für 5 min (L+D). Für die Belichtung wurden dabei die gleichen Bedingungen gewählt wie bei den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen. Die zusätzliche Messung nach einer erneuten kurzen Verdunkelung der belichteten Probe (L+D) wurde gewählt, um schnell relaxierende NPQ Komponenten zu charakterisieren.

Das Emissionsspektrum des WT im Dunkelzustand (Abb. 3.15A) weist zwei Maxima auf, eines bei 685 nm, das dem PS II zuzuordnen ist und ein breites Plateau im Bereich von etwa 710-740 nm, das auf Fluoreszenzemission aus beiden Photosystemen zurückzuführen ist. Belichtung führte dazu, dass sich die Fluoreszenz bei 685 nm um ca. 20 % verringerte, wohingegen die Fluoreszenz bei etwa 720 nm leicht anstieg. Nach 5minütiger Verdunkelung relaxierte das Fluoreszenzsignal bei 685 nm geringfügig und das Signal bei 720 nm vollständig. Diese Beobachtung zeigt deutlich, dass es sich bei den beiden lichtinduzierten Veränderungen im WT, um zwei unabhängige bzw. nicht streng korrelierte Prozesse handeln muss. Diese Veränderungen sind anhand der entsprechenden Differenzspektren in Abb. 3.15 B noch einmal veranschaulicht. Das Spektrum L-D zeigt die durch die Belichtung induzierten Änderungen, das Spektrum L-(L+D) zeigt alle Veränderungen, die nach einer kurzen Verdunkelung noch nicht relaxiert sind und das Spektrum (L+D)-D zeigt alle Veränderungen, die innerhalb der 5minütigen Dunkelphase relaxierten. Die bei 720 nm durch Belichtung induzierten Änderungen sind demnach auf einen schnell ($< 5 \text{ min}$) relaxierenden Prozess zurückzuführen, da das L-

(L+D) Spektrum bei 740 nm auf der gleichen Höhe, wie das L-D Spektrum liegt. Das (L+D)-D Spektrum zeigt, dass nach einer 5minütigen Dunkelphase nur noch ein Unterschied bei 685 nm beobachtet werden kann. Somit können die lichtinduzierten Änderungen bei 685 nm zum größten Teil langsam (> 5 min) relaxierenden Prozessen zugeordnet werden. Stellt man diese Beobachtungen in Zusammenhang mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen (Abschnitt 3.3), so liegt die Vermutung nahe, dass die lichtinduzierten Veränderungen im fernroten Bereich um 720 nm (Abb. 3.15) die Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen und somit die Bildung des Lösungsortes Q1 (Abb. 3.14) widerspiegeln. Die Änderungen bei 685 nm könnten dementsprechend in Zusammenhang mit der Bildung von Q2 und demnach mit dem NPQ in der mit PS II assoziierten Antenne im Zusammenhang stehen.

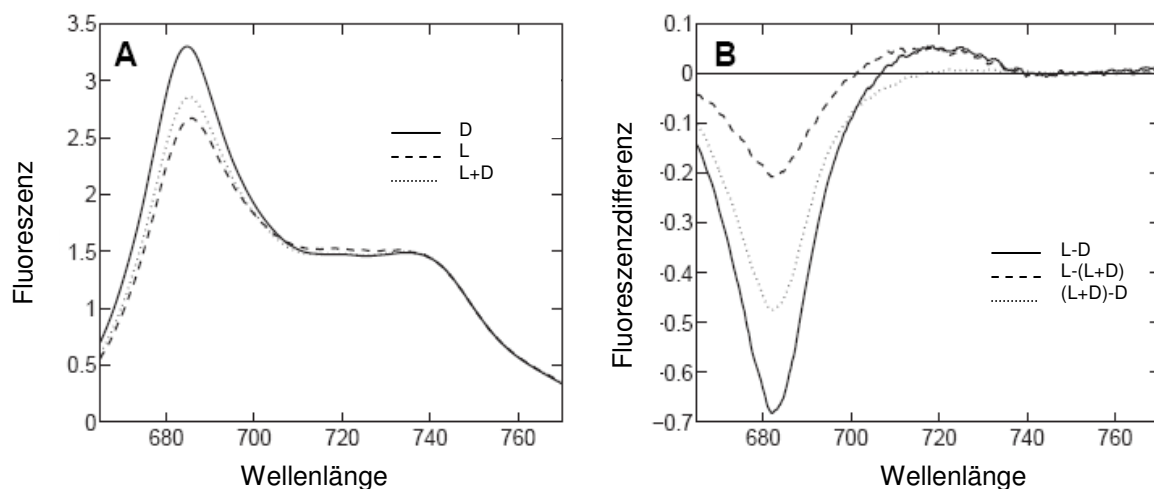


Abbildung 3.15 Fluoreszenzemissionsspektren des WT gemessen bei Raumtemperatur. A: Auf 750 nm normierte Spektren für den dunkeladaptierten Zustand (durchgezogene Linie), nach 30 min Belichtung ($600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (gestrichelte Linie) und nach erneuter Verdunkelung für 5 min im Anschluss an die Belichtung (gepunktete Linie). Zur Messung der Fluoreszenz wurde im Abstand von 60 s jeweils ein zusätzlicher Blaulichtpuls (465 nm , $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gegeben. **B:** Differenzspektren: Belichtet minus dunkeladaptiert (L-D) (durchgezogene Linie), Belichtet minus erneut verdunkelt (L-(L+D) (gestrichelte Linie) und erneut verdunkelt minus dunkeladaptiert ((L+D)-D) (gepunktete Linie).

Um diese Zuordnung zu prüfen, wurde die wellenlängenspezifische Fluoreszenzemission in der PsbS-defizienten *npq4* Mutante sowie der PsbS-überexprimierenden *L17* Mutante gemessen. Die Emissionsspektren der *npq4* sowie der *L17* Mutante unterschieden sich unter dunkeladaptierten Bedingungen nur geringfügig vom Spektrum des WT (Abb. 3.16 A). Deutliche Unterschiede ergaben sich jedoch für die lichtinduzierten Unterschiede, die anhand der Differenzspektren (L-D) in Abb. 3.16 B verdeutlicht sind. Die *npq4* Mutante zeigte dabei eine dem WT vergleichbare Fluoreszenzerniedrigung bei 682 nm, jedoch keinen Anstieg bei 720 nm. Die *L17* Mutante hingegen zeigt eine verstärkte Fluoreszenzerniedrigung bei 682 nm und eine erhöhte Fluoreszenzemission bei 720 nm.

Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass die lichtinduzierte Fluoreszenzemission bei 720 nm (Abb. 3.15 und 3.16) mit der Bildung der in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen unter F_{NPQ} -Bedingungen detektierten fernroten Komponente (Abb. 3.12) korreliert und somit die Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen bzw. die Aktivierung des Lösungsortes Q1 (Abb. 3.14) widerspiegelt. Die in allen Genotypen zu beobachtende lichtinduzierte Erniedrigung der Fluoreszenzemission bei 685 nm unterstützt weiterhin die Zuordnung dieser Änderungen zur Induktion von Quenching-Prozessen in der PS II-Antenne und damit zur Aktivierung von Q2.

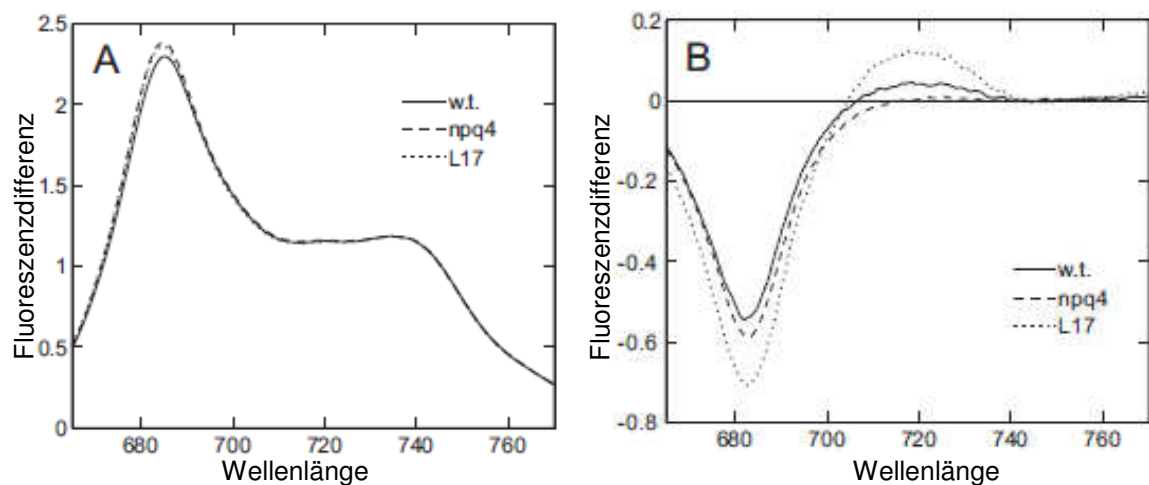


Abbildung 3.16: Fluoreszenzemissionsspektren in den Mutanten *npq4* und *L17*. **A:** Spektren im dunkeladaptierten Zustand für den WT (durchgezogene Linie) sowie die *npq4* (gestrichelte Linie) und *L17* (gepunktete Linie) Mutante. **B:** Differenzspektren (belichtet minus dunkeladaptiert) nach 30 min Belichtung mit $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Um Informationen über den Zeitverlauf der wellenlängenspezifischen Fluoreszenzänderungen zu erhalten, wurde die Kinetik der NPQ-Induktion bei 682, 720 und 750 nm während einer 30minütigen Belichtung und einer anschließenden Dunkelphase gemessen (Abb. 3.17). Im WT (Abb. 3.17 A) wies der lichtinduzierte Fluoreszenzanstieg bei allen Wellenlängen einen zweiphasigen Verlauf auf. Einer schnellen Phase der Fluoreszenzinduktion mit einer Anstiegszeit von etwa 1 min folgte eine langsame Phase mit einer Anstiegszeit von > 10 min. Die Relaxation der Fluoreszenz verlief ebenfalls zweiphasig, wobei der überwiegende Teil des NPQ mit einer Lebenszeit von etwa 1 min relaxierte. Die Fluoreszenzlöschung bei 682 nm war dabei im Vergleich mit der Fluoreszenzlöschung bei 720 nm und 750 nm im WT deutlich erhöht. Der geringere Anstieg bei 720 und 750 nm lässt sich durch den grundsätzlich verminderten relativen Anteil der Fluoreszenz von PS II im fernroten Bereich erklären und der Tatsache, dass die in diesem Wellenlängenbereich zu detektierende PS I Fluoreszenz nicht zum NPQ beiträgt (Genty, 1990; Pfündel, 1998). Vergleicht man den Zeitverlauf des NPQ bei 720 und 750 nm, so fällt auf, dass die schnelle Phase der NPQ Induktion bei

720 nm gegenüber 750 nm leicht erhöht war, während die langsame Phase bei beiden Wellenlängen identisch war, in Übereinstimmung mit der für den WT beobachteten schnellen Relaxation der lichtinduzierten Fluoreszenzemission bei 720 nm (Abb. 3.15 B). In Abwesenheit des PsbS-Proteins (*npq4*) war die schnelle Phase der NPQ Induktion wie auch die schnelle Phase der NPQ Relaxation bei allen Wellenlängen nicht zu beobachten, während eine (im Vergleich zum WT erhöhte) langsame Phase der NPQ Induktion zu beobachten war (Abb. 3.17 B). Die schnelle Phase der lichtinduzierten Änderungen in der Fluoreszenzemission bei 720 nm lässt sich damit eindeutig schnell induzierbaren und schnell relaxierenden, PsbS-abhängigen Prozessen zuordnen, welche demnach ausschließlich den pH- und PsbS-abhängigen qE Mechanismus des NPQ widerspiegeln.

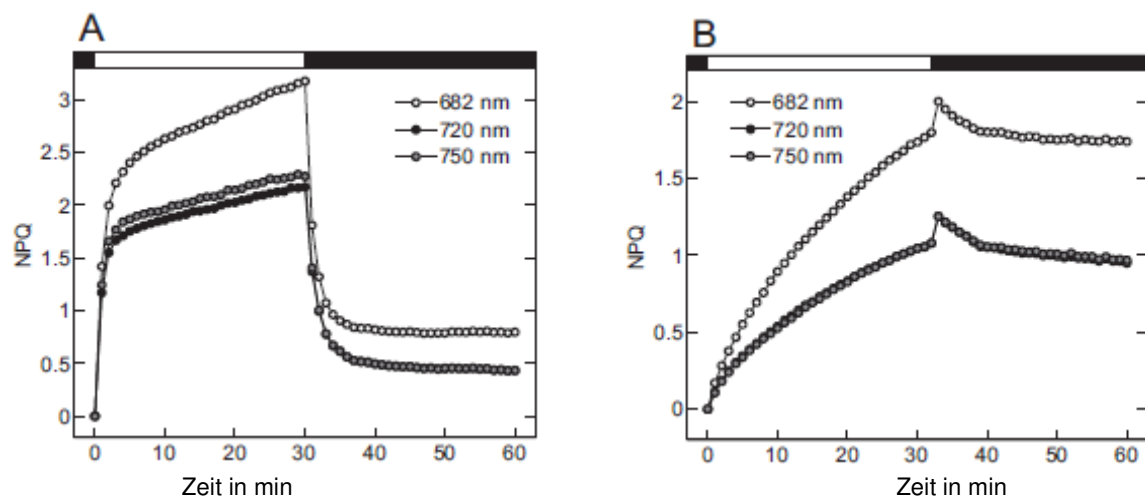


Abbildung 3.17: NPQ-Kinetiken bei drei verschiedenen Wellenlängen. Der WT (A) und die *npq4* Mutante (B) wurden jeweils 30 min mit $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet und anschließend weitere 30 min verdunkelt. Zur Messung der Fluoreszenz wurde im Abstand von 60 s jeweils ein zusätzlicher Blaulichtpuls (465 nm , $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gegeben.

Die Kinetik der NPQ Induktion bei 682 und 720 nm wurde an weiteren *Arabidopsis* Mutanten untersucht. Messungen an der *stn7* Mutante, welche keine ‚state transitions‘ betreiben kann, sollten dabei klären, inwieweit der Anstieg der Fluoreszenz im fernroten Bereich über 700 nm im Zusammenhang mit ‚state transition‘ stehen könnte. Messungen an den beiden Xanthophyllzyklusmutanten *npq1* (ohne Zx) und *npq2* (nur mit Zx) sollten den Einfluss von Zx auf diese Prozesse beleuchten und Messungen an der PsbS-überexprimierenden Mutante *L17* sollten schließlich noch einmal die Bedeutung des PsbS-Proteins für den Anstieg der Fluoreszenz im fernroten Bereich unterstreichen. Zur quantitativen Bestimmung der spektralen Unterschiede wurde dabei jeweils der Quotient aus den Fluoreszenzänderungen bei 682 und 720 nm im Verhältnis zu den Änderungen bei 750 nm ermittelt (F_{750}/F_{682} und F_{720}/F_{750}). In Abbildung 3.18 ist der zeitliche Verlauf dieser Quotienten während einer 30-40minütigen Belichtung und einer anschließenden 20-30minütigen Dunkelphase für alle Genotypen zusammengefasst.

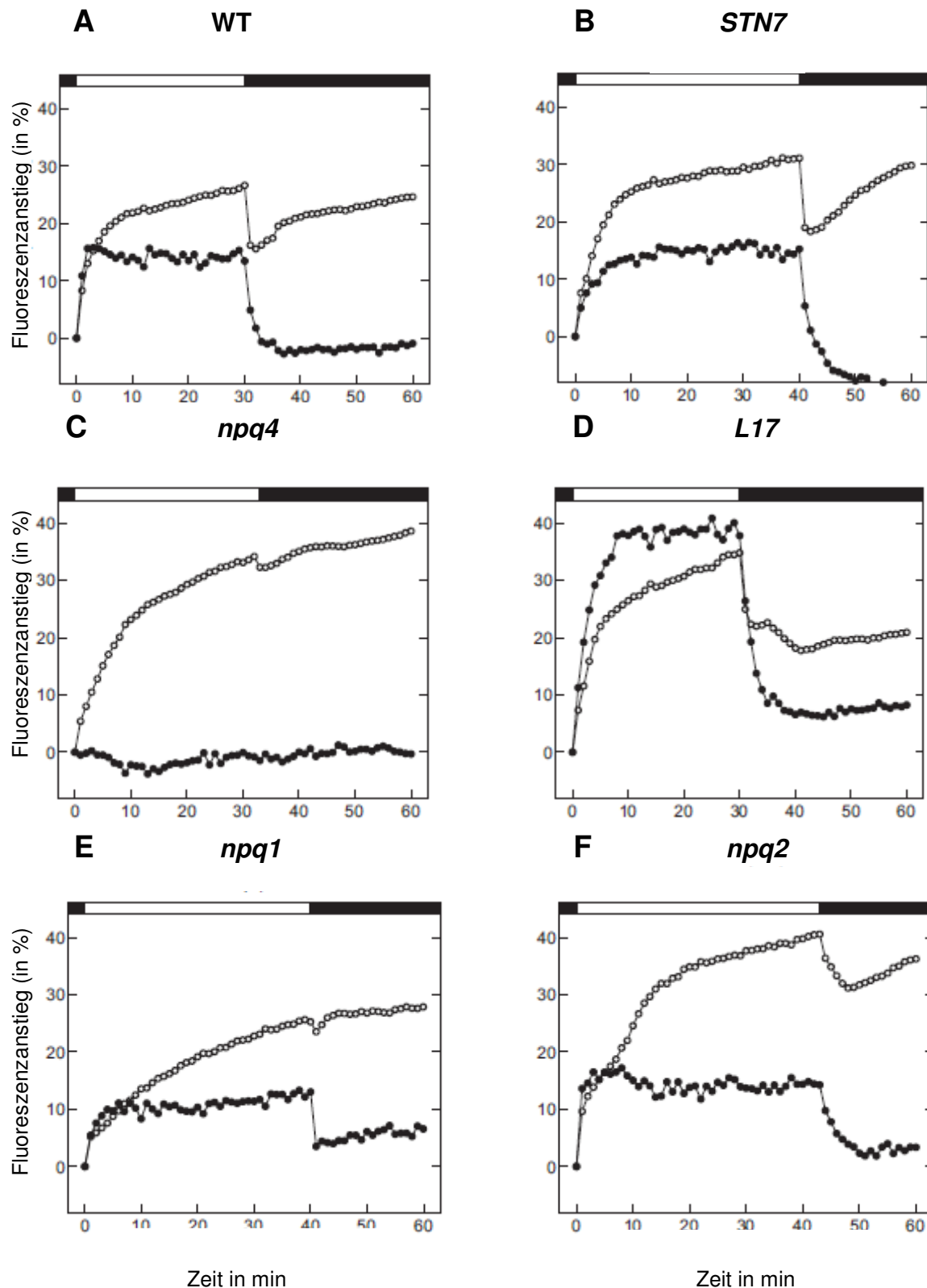


Abbildung 3.18: Zeitabhängige Änderungen der Fluoreszenz bei 682 und 720 nm, dargestellt als Quotienten F_{750}/F_{682} (offene Kreise) und F_{720}/F_{750} (schwarze Kreise). Blätter von WT Pflanzen sowie den Mutanten *stn7*, *npq4*, *L17*, *npq1* und *npq2* wurden für 30-40 min belichtet ($600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Fluoreszenzverhältnisse sind als prozentualer Anstieg relativ zum dunkeladaptierten Zustand angegeben.

Der WT (Abb. 3.18 A) zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Kurven (F_{750}/F_{682} und F_{720}/F_{750}). Die Kurve des Quotienten F_{720}/F_{750} stieg unter Belichtung schnell (1-2 min) an und relaxierte unter Verdunkelung ebenso schnell, während der Quotient F_{750}/F_{682} neben dieser schnellen Phase zusätzlich einen langsameren Anstieg (> 10 min) aufwies, der allerdings innerhalb von 20 min Dunkelheit nicht relaxierte. In der *stn7* Mutante (Abb. 3.18 B) war der Zeitverlauf des Quotienten F_{720}/F_{750} ähnlich wie im WT, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass ‚state transitions‘ für die Fluoreszenzänderungen bei 720 nm unter den gewählten Bedingungen verantwortlich sind. Die *npq4* Mutante zeigte keine lichtinduzierten Veränderungen des F_{720}/F_{750} Quotienten, wohingegen die *L17* Mutante im Vergleich zum WT deutlich erhöhte Änderungen sowohl für die Induktion als auch die Relaxation aufwies (Abb. 3.18 C/D). Dies unterstreicht die strikte PsbS-Abhängigkeit dieser lichtinduzierten Veränderungen. Die *npq1* und *npq2* Mutanten (Abb. 3.18 E/F) zeigten dem WT vergleichbare Kurven, wobei die der *npq1* Mutante jedoch weniger ausgeprägt war und nicht vollständig relaxierte. Die Kurve der *npq2* Mutante stieg dagegen etwas schneller an, relaxiert aber langsamer. Dies ist charakteristisch für die mittels PAM-Fluorometrie bestimmten qE-Kinetiken dieser Mutanten (Niyogi et al., 1998; Abb. 3.7) und deutet die Modulation dieser lichtinduzierten Veränderungen durch Zx an. Diese Beobachtungen decken sich somit vollständig mit den Befunden der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen in Bezug auf die Aktivierung des Lösungsortes Q1 und unterstreichen damit die Zuordnung der Fluoreszenzänderungen bei 720 nm (bzw. des Quotienten F_{720}/F_{750}) zur Ablösung von LHC II-Komplexen und der Bildung von gelöschten LHC II-Oligomeren (vgl. Modell in Abb. 3.14).

Es ist zu beachten, dass die Charakteristika des F_{720}/F_{750} Quotienten auch in den Kurven für den F_{750}/F_{682} Quotienten wieder zu finden sind, dort aber in allen Genotypen ein zusätzlicher langsamer Anstieg zu beobachten ist. Dieser langsame Anstieg jedoch wies in den einzelnen Mutanten im Vergleich zum WT zum Teil deutliche Unterschiede auf. Insbesondere die in allen Genotypen fehlende Relaxation dieser Komponente lässt vermuten, dass der F_{750}/F_{682} Quotient durch - im untersuchten Zeitbereich - nahezu irreversible Prozesse beeinflusst wird, die aufgrund der vorliegenden Daten aber nicht eindeutig interpretiert werden können. Die Kinetiken des Anstiegs des F_{750}/F_{682} Quotienten im WT, sowie den Mutanten *stn7*, *npq4* und *L17* stimmen aber gut mit den Kinetiken der Zx-Bildung unter vergleichbaren Lichtbedingungen überein (Reinhold et al., 2008), sodass diese Änderungen durchaus die Aktivierung des Zx-abhängigen Lösungsortes Q2 widerspiegeln könnten. Der in der Xanthophyllzyklus-Mutante *npq1* ebenfalls zu beobachtende Anstieg des F_{750}/F_{682} Quotienten deutet allerdings an, dass ähnliche NPQ Prozesse möglicherweise auch in Abwesenheit von Zx induziert werden können.

Zur weitergehenden Untersuchung der NPQ-Kinetiken und der Dynamik der verschiedenen NPQ Prozesse wurden daher Messungen mit Hilfe des PAM Fluorometers durchgeführt.

3.5 Untersuchungen zur Dynamik der NPQ Prozesse mittels PAM Fluorometrie

Die Dynamik der NPQ Prozesse wurde unter Verwendung der PAM Fluorometrie untersucht. Im Hinblick auf die vorherigen Befunde zur Untersuchung der wellenlängen-abhängigen Fluoreszenzänderungen ist dabei zu beachten, dass das PAM Fluorometer die gesamte Fluoreszenzstrahlung oberhalb von 700 nm detektiert und somit überwiegend, aber nicht ausschließlich, durch die fernrote Komponente bei 720 nm bestimmt wird. Die durchgeführten Analysen sollten insbesondere Aufschluss darüber geben, mit welcher Kinetik unterschiedliche NPQ Komponenten induziert werden und relaxieren. Dazu wurde an Blättern von WT Pflanzen und den Mutanten *L17*, *npq4*, *npq1*, *npq2* und *stn7* die Fluoreszenz während der Belichtung von bis zu 90 min bei einer Lichtintensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und in einer Dunkelphase von bis zu 90 min im Anschluss an die verschiedenen Vorbelichtungszeiten gemessen. Über diesen Ansatz sollte insbesondere die Dynamik der langsamen Phase des NPQ, die in allen bisherigen Untersuchungen nahezu vollständig außer Acht gelassen wurde, aber nach den bisherigen Ergebnissen offensichtlich mit der Bildung des Löschungsortes Q2 im Zusammenhang steht, eingehend charakterisiert werden.

3.5.1 NPQ Induktion

Der Verlauf der NPQ-Induktion in dunkeladaptierten Pflanzen ist in Abbildung 3.19 zusammengefasst. Im oberen Teil (Abb. 3.19 A,B) ist der Verlauf während einer 90minütigen Belichtung gezeigt, wohingegen der untere Teil (Abb. 3.19 C,D) die Änderungen in den ersten 10 min detaillierter darstellt. Die gemessenen Kurven wurden jeweils mit einer multi-exponentiellen Funktion angepasst, wobei die besten ‚Fits‘ in allen Fällen mit einer doppel-exponentiellen Funktion erzielt wurden. Die daraus ermittelten Amplituden (A_1 , A_2) und Anstiegszeiten (τ_1 , τ_2) sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Für den WT (Abb. 3.19 A,C) war deutlich ein zweiphasiger Anstieg beobachtbar. Einer sehr schnellen, dominierenden Induktionsphase ($A = 1,5$; $\tau = 60 \text{ s}$) folgte eine langsamere Phase mit einer Amplitude von etwa 0,8 und einer Anstiegszeit von etwa 10 min (vgl. Tab. 3.5). Die schnelle Induktionsphase kann dem Aufbau des pH-Gradienten über der Thylakoidmembran zugeschrieben werden und weist eine ähnliche Kinetik wie die

Fluoreszenzänderung bei 720 nm (F_{720}/F_{750} , Abb. 3.18) auf. Die Kinetik der langsamen Phase stimmt in etwa mit der Kinetik der Umwandlung von Vx zu Zx (Jahns et al., 2009) überein und könnte daher auf Zx-abhängigen Prozessen beruhen. Es ist zu beachten, dass diese Phase nach 30-40 min vollständig ausgebildet war und das NPQ damit nach etwa 40 min einen stabilen Gleichgewichtszustand erreicht hatte. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen der zeitaufgelösten Spektroskopie, wo ein stabiler Zustand der Proben ebenfalls nach 30 bis 40 min erreicht war. Im Gegensatz dazu zeigte die langsame Phase der Fluoreszenzänderung bei 682 nm (F_{750}/F_{682} , Abb. 3.18) keine Sättigung in diesem Zeitbereich, was darauf hinweist, dass die bei 682 nm messbaren Änderungen möglicherweise von unspezifischen Prozessen überlagert werden.

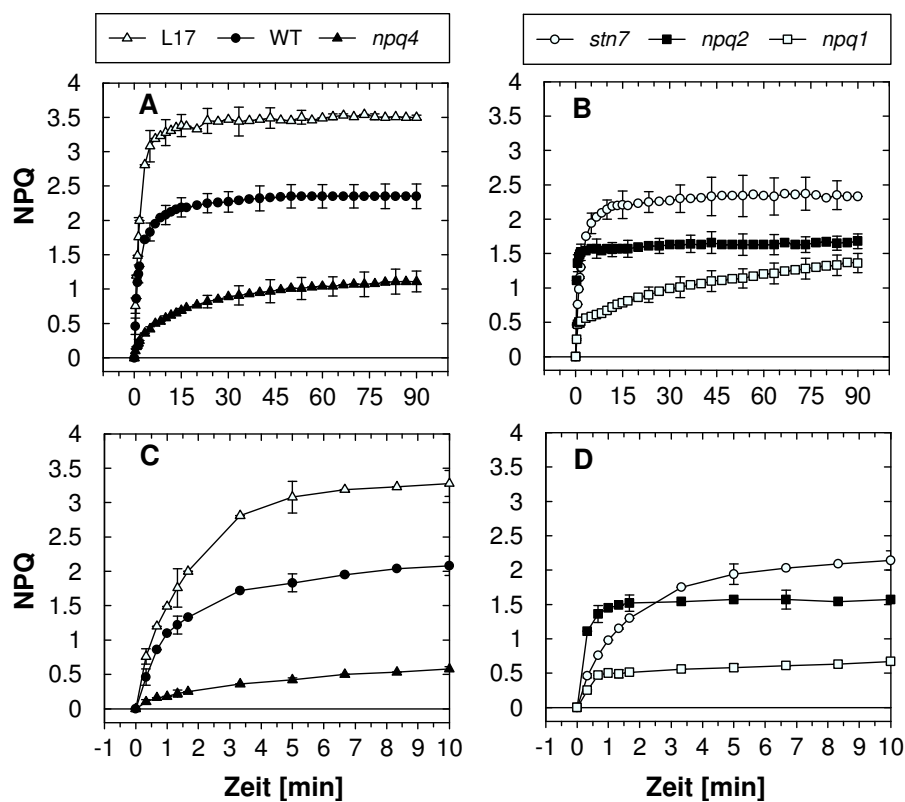


Abbildung 3.19: NPQ Induktion in dunkeladaptierten Pflanzen. A, B: NPQ Induktion während 90 min Belichtung; C, D: NPQ Induktion während der ersten 10 min. Die Pflanzen waren für mindestens 4 h dunkeladaptiert und wurden mit einer Lichtintensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Weißlicht) belichtet. Während der Messung wurden in den ersten 100 s alle 5 s sättigende Lichtpulse ($0,8 \text{ s}$, $4000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gegeben, gefolgt von 9 Pulsen mit 100 s Abstand und weiteren 49 Pulsen mit 200 s Abstand. Gezeigt werden die Mittelwerte $\pm$ SD von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

Die *stn7* Mutante zeigte im Vergleich mit dem WT keine Unterschiede in der NPQ Induktion. Ein zweiphasiger Anstieg mit sowohl vergleichbarer Amplitude als auch sehr ähnlicher Kinetik kann beobachtet werden (vgl. Abb. 3.19 B/D und Tab. 3.5). Demnach ist

die langsame Phase der NPQ Induktion unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht durch ‚state transitions‘ beeinflusst.

Erwartungsgemäß war die schnelle Induktionsphase essentiell vom PsbS-Protein abhängig: In der PsbS-überexprimierenden Linie (*L17*) war diese Phase nahezu verdoppelt und in der PsbS-defizienten Mutante (*npq4*) nicht detektierbar (Abb. 3.19 A/C). Die schnelle Phase der NPQ Induktion zeigte (ebenso erwartungsgemäß) zusätzlich eine Abhängigkeit von der Menge des vorhandenen Zx. Während die *npq2* Mutante im Vergleich mit dem WT eine ähnliche Amplitude für die schnelle Phase zeigte, war die Anstiegszeit jedoch deutlich schneller (Tab. 3.5). In Abwesenheit von Zx (*npq1*) war ebenfalls eine (im Vergleich mit dem WT) beschleunigte Anstiegszeit zu beobachten, allerdings war die Amplitude in diesem Fall deutlich geringer (Abb. 3.19 B/D und Tab. 3.5).

Die im WT und der *stn7* Mutante beobachtete langsame Phase der NPQ Induktion konnte ebenfalls in der *L17* Mutante und der *npq4* Mutante beobachtet werden (Abb. 3.19). Die langsame Phase zeigte in den beiden Mutanten ähnliche Kinetiken und Amplituden wie im WT. Das PsbS-Protein hat demnach keinen Einfluss auf die langsame Phase der NPQ Induktion. Die *npq2* Mutante zeigt nahezu keine langsame Phase und in der *npq1* Mutante war die Phase deutlich langsamer als im WT (Abb. 3.19, Tab. 3.5). Die Menge an Zx ist für die langsame Phase der NPQ-Induktion demnach von grundlegender Bedeutung. In der *npq4* Mutante konnte zusätzlich eine weitere sehr langsame Phase beobachtet werden, mit ähnlicher Kinetik wie sie auch in der *npq1* Mutante zu finden war.

Tabelle 3.5: Kinetische Parameter der NPQ Induktion. Die in Abb. 3.19 gezeigten Kurven wurden mit einer doppel-exponentiellen Funktion gefittet nach der Gleichung $y = y_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-x/\tau_1)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-x/\tau_2))$.

	A ₁	τ_1 [s]	A ₂	τ_2 [s]
WT	1.52 ± 0.05	59 ± 3	0.81 ± 0.04	570 ± 37
<i>stn7</i>	1.91 ± 0.03	96 ± 3	0.41 ± 0.04	980 ± 120
<i>npq4</i>	0.53 ± 0.05	460 ± 50	0.57 ± 0.07	2600 ± 700
<i>L17</i>	3.00 ± 0.07	96 ± 4	0.41 ± 0.06	770 ± 100
<i>npq1</i>	0.60 ± 0.03	9 ± 2	0.63 ± 0.02	1600 ± 120
<i>npq2</i>	1.36 ± 0.02	19 ± 1	0.30 ± 0.04	620 ± 40

Die im Vergleich zum WT deutlich schnellere Anstiegszeit der schnellen Phase in den beiden Xanthophylzyklusmutanten *npq1* und *npq2* spiegelt die bereits aus der Literatur bekannte (z.B. Johnson et al., 2009) zeitliche Limitierung der NPQ Induktion in dunkeladaptierten Pflanzen durch die Synthese des Zx wider. Um die Beteiligung von Zx an der schnellen Phase näher zu untersuchen wurde, wie in Abbildung 3.20 dargestellt, die NPQ Induktion in dunkeladaptierten und vorbelichteten Pflanzen während der ersten

Minuten bei erhöhter Zeitauflösung miteinander verglichen. Die vorbelichteten Pflanzen wurden für 30 min mit $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet (um die Bildung von Zx zu induzieren) und anschließend für 5 min dunkeladaptiert, um die Relaxation des transmembranen pH-Gradienten (und damit des qE) vor der erneuten Belichtung zu ermöglichen. In der unbelichteten Probe hingegen konnte in der kurzen Zeitspanne von 200 s keine Bildung von nennenswerten Mengen an Zx erwartet werden, so dass über diesen Ansatz der Einfluss von Zx auf die pH-abhängige qE Komponente des NPQ abgeschätzt werden konnte.

Erwartungsgemäß führte die Vorbelichtung für den WT (Abb. 3.20 A) zu einer beschleunigten Induktion des NPQ mit einer Anstiegszeit von etwa 5-10 s, was die Limitierung der NPQ Induktion im dunkeladaptierten Zustand durch die Zx Synthese unterstreicht.

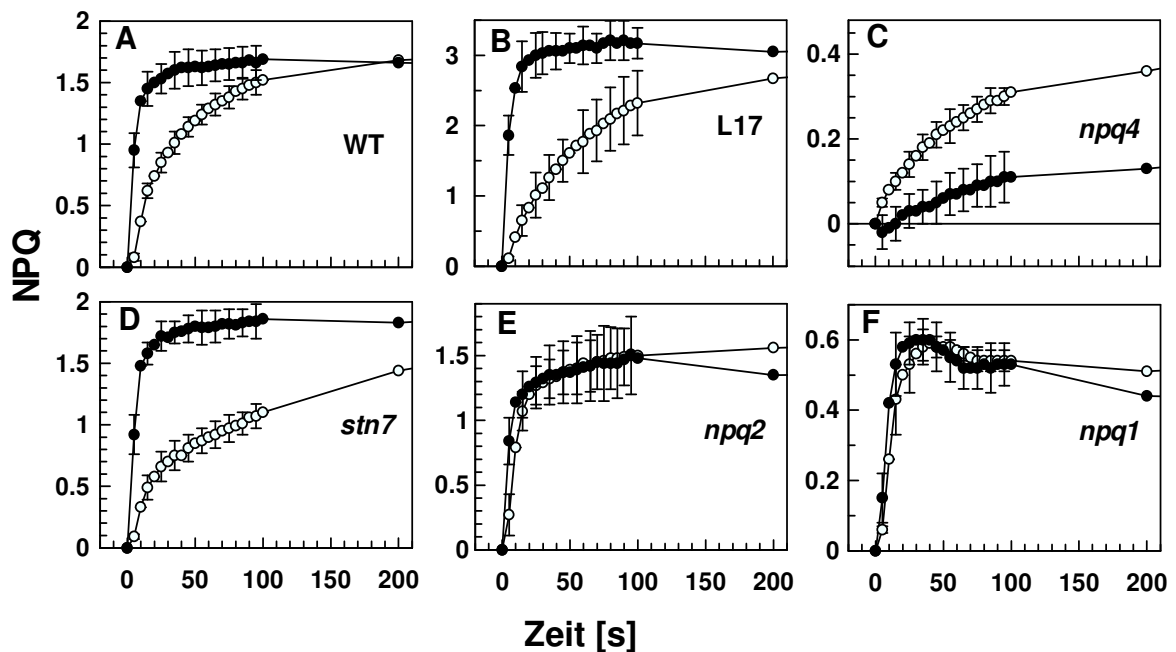


Abbildung 3.20 NPQ Induktion in dunkel- und lichtadaptierten Pflanzen. Die NPQ Induktion innerhalb der ersten 200 s wurde an Blättern von dunkeladaptierten (offene Kreise) und vorbelichteten Pflanzen (30 min, $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$; mit anschließender Verdunkelung für 5 min) gemessen (schwarze Kreise). Während der Messung wurden in den ersten 100 s alle 5 s sättigenden Lichtpulse ($2500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0,8 s Dauer) gegeben, sowie ein weitere Puls nach 200 s. Gezeigt werden die Mittelwerte $\pm$ SD von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

Die *stn7* und *L17* Mutanten (Abb. 3.20 B/D) zeigten ein dem WT vergleichbares Verhalten. Nach 30 min Vorbelichtung steigt die Kurve schnell an während nach Verdunkelung eine deutlich langsamere NPQ Induktion beobachtet werden konnte. Die beiden Xanthophyllzyklusmutanten *npq1* und *npq2* zeigten erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen vorbelichteten und dunkeladaptierten Blättern, da sich der Zx

Gehalt in den beiden Mutanten nicht verändert. Die schnelle Induktionskurve wird demnach in beiden Fällen (dunkel und vorbelichtet) nur durch den ΔpH beeinflusst. Die beiden Mutanten unterscheiden sich lediglich hinsichtlich der Amplitude des NPQ. In Abwesenheit von PsbS (*npq4*) war das NPQ nach Vorbelichtung deutlich verringert und auch nicht beschleunigt. Die geringe Amplitude des NPQ nach Vorbelichtung lässt sich für die *npq4* Mutante dadurch erklären, dass es in der 5minütigen Dunkelphase nicht zu einer Relaxation des NPQ kommt, da die schnell reversiblen NPQ Prozesse strikt vom PsbS-Protein abhängen. Dieses Experiment bestätigt also die zeitliche Limitierung der schnellen Phase der NPQ-Induktion in dunkeladaptierten Pflanzen durch die Synthese von Zx. Es ist zu beachten, dass in allen Pflanzen mit aktivem Xanthophyllzyklus (mit Ausnahme der *npq4* Mutante) nach Vorbelichtung dieselbe schnelle Kinetik (5-10 s Anstiegszeit) der NPQ Induktion beobachtet werden konnten wie für die *npq1* und *npq2* Mutante. Anhand der durchgeführten Messungen lassen sich somit 2 Phasen der NPQ Induktion unterscheiden:

- 1) Eine schnelle strikt pH- und PsbS-abhängige Phase, die von Zx moduliert wird. Diese Phase entspricht der bereits gut charakterisierten qE Komponente des NPQ und ist unter Berücksichtigung der vorherigen Messungen (Abschnitt 3.3 und 3.4) auf die Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen zurückzuführen (Löschungsort Q1, Abb. 3.14).
- 2) Die bislang schlecht charakterisierte langsame Phase der NPQ-Induktion scheint nach den hier erzielten Ergebnissen abhängig von der Bildung des Zx zu sein, ist aber unabhängig vom PsbS-Protein und wahrscheinlich mit dem Zx-abhängigen Quenching-Prozess in der mit PS II assoziierten Antenne (Löschungsort Q2, Abb. 3.14) identisch.

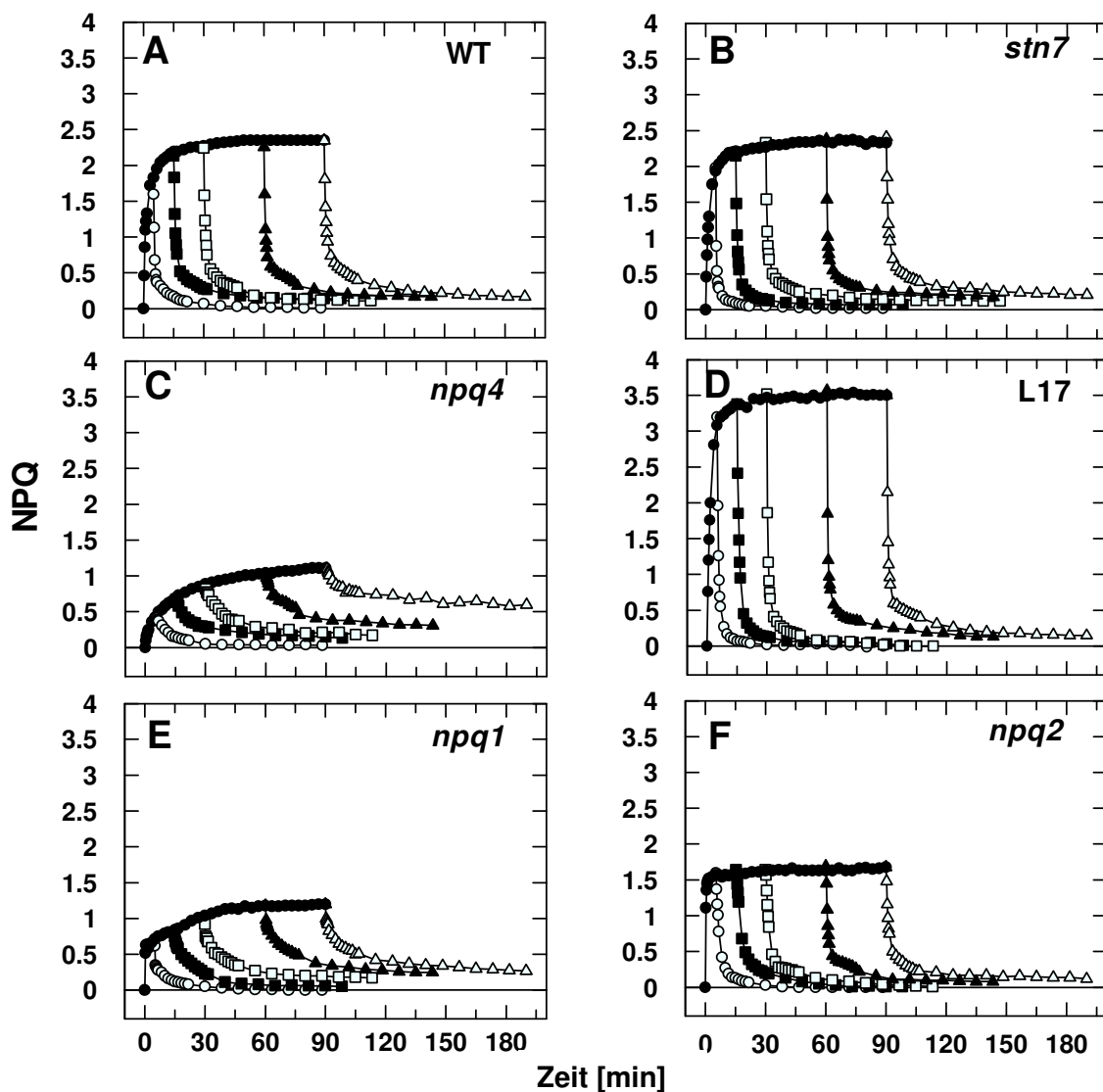
Zur besseren Charakterisierung der beiden NPQ-Prozesse wurde die Relaxation des NPQ nach verschiedenen Zeiten der Vorbelichtung untersucht. Die Idee dieses Ansatzes war es, aus zeitlichen Veränderungen der NPQ-Relaxation Rückschlüsse auf die Dynamik der unterschiedlichen NPQ Komponenten ziehen zu können.

3.5.2 NPQ Relaxation

Die Analyse der NPQ Relaxationskinetiken wurde bereits in früheren Arbeiten zur Charakterisierung verschiedener NPQ Komponenten herangezogen (Quick & Stitt, 1989; Walters und Horton, 1991). Allerdings waren alle bisher durchgeführten Untersuchungen dieser Art zum einen nur auf die schnell induzierbaren NPQ Prozesse (d.h. in 10-15 min) beschränkt und zum anderen wurde auch die NPQ Relaxation nur in einem Zeitbereich von 10-20 min untersucht und somit nie vollständig und umfassend analysiert. Daher

wurde im Folgenden die NPQ Relaxation nach verschiedenen Zeiten der Vorbelichtung (zwischen 5 und 90 min) für bis zu 2 h gemessen.

In Abbildung 3.21 ist für alle Genotypen die NPQ Relaxation nach 5, 15, 30, 60 und 90 min Vorbelichtung bei $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Übersicht dargestellt. Alle Relaxationskurven zeigen, wie auch die Induktionskurve einen mehrphasigen Verlauf. Zur Quantifizierung wurden die gemessenen Kurven jeweils mit einer multi-exponentiellen Funktion angepasst, wobei die besten ‚Fits‘ - wie für die NPQ Induktion - in allen Fällen mit einer doppel-exponentiellen Funktion erzielt wurden (zusammengefasst in Tab. 3.6).



Abbildungen 3.21: NPQ Relaxation nach unterschiedlichen Vorbelichtungszeiten. Dargestellt sind die Kurven des WT (A), sowie der Mutanten *stn7* (B), *npq4* (C), *L17* (D), *npq1* (E) und *npq2* (F). Belichtet wurden jeweils einzelne Blätter für 5, 15, 30, 60 und 90 min und die Relaxation wurde unter Verdunkelung für bis zu 2 h registriert. Die Belichtungsintensität betrug $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Gezeigt werden die Mittelwerte $\pm$ SD von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

Für den WT (Abb. 3.21A) wurde nach allen Vorbelichtungszeiten eine dominierende schnelle Relaxationsphase (Lebenszeit 30-60 s) detektiert, die bereits nach 15minütiger Vorbelichtung ihre maximale Amplitude von etwa 1,5 erreicht hatte. Diese Phase kann somit eindeutig der pH- und PsbS-abhängigen qE Komponente zugeschrieben werden, da eine ähnliche Amplitude auch bei der schnellen Phase der NPQ Induktion ermittelt werden konnte (vgl. Tab 3.5 und Abb. 3.19). Zusätzlich war eine zweite, langsamere Relaxationsphase (Amplitude: 0,3-0,5; Lebenszeit 800-1000 s) detektierbar. Mit zunehmender Vorbelichtungsdauer erhöhte sich die Amplitude dieser Phase leicht und erreichte ihr Maximum nach etwa 30-60 min. Zusätzlich war tendenziell auch eine leichte Erhöhung der Lebenszeit dieser Phase mit zunehmender Vorbelichtungsdauer zu beobachten (Tab. 3.6). Sowohl in ihrer Amplitude als auch der Kinetik ähnelte diese Phase somit der langsamen Phase der NPQ Induktion und könnte daher im Zusammenhang mit Zx-abhängigen Prozessen stehen, da die Rückumwandlung des Zx zu Vx im ähnlichen Zeitbereich stattfindet. Darüber hinaus konnte mit zunehmender Belichtungszeit eine dritte, im Zeitbereich von 90 min nahezu irreversible NPQ Relaxationsphase detektiert werden. Diese Phase (in Tab. 3.6 als y_0 bezeichnet) erreichte nur eine geringe Amplitude (maximal 0,2), die aber mit zunehmender Vorbelichtungszeit langsam anstieg. Aufgrund dieser Charakteristik kann diese Phase wohl eindeutig photoinhibitorischen Prozessen (= qI Komponente des NPQ) zugeschrieben werden. Vergleicht man nun alle Genotypen mit dem WT so ergaben sich folgende Beobachtungen:

Die *stn7* Mutante (Abb. 3.21 B) zeigte im Vergleich zum WT sehr ähnliche NPQ-Relaxationskinetiken. Wie auch im WT stellte die schnelle Phase die dominierende Komponente dar, die bereits nach 5 min die maximale Amplitude von etwa 1,6 erreichte und ebenfalls Lebenszeiten im Bereich von 35-50 s aufwies. Auch die Amplituden und Lebenszeiten der beiden langsameren Phasen waren denen des WT sehr ähnlich. Daraus kann eindeutig geschlossen werden, dass unter den gegebenen Lichtbedingungen 'state transitions' (= qT Mechanismus) keinen Beitrag zum NPQ leisten.

Die *npq4* (Abb. 3.21 C) Mutante zeigte dagegen stark verlangsamte Relaxationskinetiken. Aufgrund des Fehlens der pH-abhängigen qE Komponente in dieser PsbS-defizienten Mutante konnte keine schnelle Relaxationsphase nachgewiesen werden. Die schnellste Relaxationsphase war hinsichtlich der Amplituden und Lebenszeiten vergleichbar mit der mittleren Phase der NPQ-Relaxation beim WT. Die *npq4* Mutante zeigte jedoch eine zusätzliche langsame Phase (Amplitude 0,2-0,5, Lebenszeiten 20-60 min), die ab einer Vorbelichtungszeit von 15 min zu detektieren war (Tab. 3.6). Weiterhin war auffällig, dass die Amplitude der irreversiblen Phase (qI) im Vergleich mit allen anderen Genotypen die größten Werte erreichte und dass nach der längsten Vorbelichtungszeit von 90 min fast

50% des gesamten NPQ dieser irreversiblen Phase zuzuordnen war. Offensichtlich werden in Abwesenheit von PsbS verstärkt photoinhibitorische Prozesse induziert.

Im Gegensatz führten erhöhte Mengen an PsbS (*L17*) wie zu erwarten zu einer stark erhöhte Amplitude (ca. 2.7) der schnell relaxierenden qE Komponente (Abb. 3.21 D, Tab. 3.6) im Vergleich zum WT, wie auch bereits für die schnelle Phase der NPQ Induktion gezeigt (Abb. 3.19). Die Lebenszeiten dieser schnell relaxierenden Phase lagen wie beim WT zwischen 30 und 50 s. Die mittlere Phase der NPQ Relaxation erreichte die maximale Amplitude von etwa 0,6 bereits nach 5 min Vorbelichtung und die Lebenszeiten waren denen des WT sehr ähnlich. Die irreversible Phase der NPQ Relaxation trat hingegen erst nach Vorbelichtungszeiten von mindestens 60 min auf.

Unerwarteter Weise zeigte die *npq1* Mutante (Abb. 3.21 E) ebenfalls drei Phasen der NPQ Relaxation. Die schnelle Phase der NPQ Relaxation ließ sich auch hier eindeutig der qE Komponente zuordnen und zeigte die typischen, aus der Literatur bekannten (Perez-Bueno et al., 2008; Johnson et al., 2009) Charakteristika. Im Vergleich mit dem WT war die Amplitude dieser Phase mit 0,1-0,4 deutlich kleiner, wies aber dafür etwas kürzere Lebenszeiten (10-40s) auf (Tab. 3.6). Das Auftreten einer mittleren Phase der NPQ Relaxation, die für den WT als Relaxation Zx-abhängiger Prozesse interpretiert wurde, war dagegen für diese (Zx-defiziente) Mutante unerwartet. Auffällig war allerdings, dass die Lebenszeit dieser Phase nach 90minütiger Vorbelichtungszeit mit etwa 1600 s sehr lang war. Darüber hinaus war auch, ähnlich wie bei der *npq4* Mutante, die Amplitude der irreversiblen Phase der NPQ Relaxation in der *npq1* Mutante erhöht, was insgesamt zu einer deutlichen Verlangsamung der NPQ Relaxation mit zunehmender Vorbelichtungszeit führte. Offensichtlich werden auch in Abwesenheit von Zx verstärkt photoinhibitorische Prozesse induziert.

Die *npq2* Mutante (Abb. 3.12F) zeigte eine verlangsamte Relaxation der schnellen Phase (und damit des qE) besonders nach Vorbelichtungszeiten von bis zu 30 min. Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Studien (Niyogi et al., 1998; Perez-Bueno et al., 2008; Johnson et al., 2009). Die maximale Amplitude (1,4) war schon nach 5minütiger Vorbelichtung erreicht, nahm allerdings mit längerer Vorbelichtung kontinuierlich ab. Trotz fehlender Umwandlung des Zx zu Vx im Dunkel, war auch in dieser Mutante eine mittlere Phase der NPQ Relaxation zu detektieren, die allerdings im Vergleich mit dem WT eine kleinere Amplitude aufwies und insbesondere nach 15-60minütiger Vorbelichtungszeit eine sehr lange Lebenszeit hatte. Offensichtlich ist die Relaxation der mittleren Phase in Gegenwart von hohen Zx Mengen verändert. Allerdings war, wie bereits in der *L17* Mutante beobachtet, die Amplitude der irreversiblen Phase (und damit ql) sehr klein, was den generellen photoprotektiven Effekt des Zx (Havaux & Niyogi, 1999; Havaux et al., 2007) unterstreicht.

Tabelle 3.6: Kinetische Parameter der NPQ Relaxation. Die in Abb. 3.21 gezeigten Kurven wurden mit einer doppel-exponentiellen Funktion gefittet nach der Gleichung:
 $y = A_1 \cdot \exp(-x/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-x/\tau_2) + y_0$

	Zeit [min]	A_1	τ_1 [s]	A_2	τ_2 [s]	y_0
WT	5	1.28 ± 0.05	33 ± 3	0.34 ± 0.03	770 ± 150	0.01 ± 0.01
	15	1.70 ± 0.05	53 ± 3	0.43 ± 0.04	910 ± 165	0.13 ± 0.02
	30	1.54 ± 0.03	42 ± 2	0.56 ± 0.02	800 ± 65	0.11 ± 0.01
	60	1.56 ± 0.03	34 ± 2	0.58 ± 0.02	910 ± 80	0.17 ± 0.02
	90	1.54 ± 0.03	48 ± 1	0.61 ± 0.02	980 ± 60	0.19 ± 0.01
stn7	5	1.59 ± 0.02	19 ± 1	0.35 ± 0.02	310 ± 25	0.03 ± 0.01
	15	1.63 ± 0.03	39 ± 2	0.44 ± 0.02	390 ± 30	0.08 ± 0.01
	30	1.67 ± 0.03	34 ± 2	0.51 ± 0.02	620 ± 40	0.14 ± 0.01
	60	1.67 ± 0.04	28 ± 2	0.51 ± 0.03	530 ± 60	0.21 ± 0.01
	90	1.60 ± 0.04	53 ± 2	0.54 ± 0.03	880 ± 90	0.25 ± 0.01
npq4	5	0.39 ± 0.01	490 ± 15			0.04 ± 0.01
	15	0.36 ± 0.03	250 ± 35	0.24 ± 0.02	2400 ± 800	0.11 ± 0.03
	30	0.46 ± 0.07	430 ± 70	0.27 ± 0.08	4100 ± 2000	0.09 ± 0.05
	60	0.22 ± 0.04	150 ± 30	0.52 ± 0.04	1000 ± 150	0.32 ± 0.02
	90	0.33 ± 0.03	210 ± 40	0.34 ± 0.05	3600 ± 1000	0.58 ± 0.07
L17	5	2.52 ± 0.05	32 ± 1	0.65 ± 0.02	220 ± 20	0.01 ± 0.01
	15	2.74 ± 0.07	55 ± 2	0.56 ± 0.07	420 ± 60	0.01 ± 0.01
	30	2.78 ± 0.05	24 ± 2	0.69 ± 0.04	440 ± 50	0.01 ± 0.01
	60	2.73 ± 0.06	22 ± 1	0.64 ± 0.04	570 ± 75	0.13 ± 0.02
	90	2.73 ± 0.03	31 ± 1	0.60 ± 0.02	1020 ± 120	0.15 ± 0.01
npq1	5	0.28 ± 0.01	9 ± 2	0.33 ± 0.01	590 ± 40	0.01 ± 0.01
	15	0.10 ± 0.01	29 ± 8	0.59 ± 0.02	770 ± 30	0.05 ± 0.01
	30	0.17 ± 0.02	12 ± 3	0.55 ± 0.01	730 ± 30	0.19 ± 0.01
	60	0.28 ± 0.02	26 ± 4	0.63 ± 0.01	930 ± 50	0.26 ± 0.02
	90	0.40 ± 0.04	86 ± 15	0.49 ± 0.02	1600 ± 200	0.26 ± 0.01
npq2	5	1.44 ± 0.05	97 ± 5	0.29 ± 0.05	710 ± 130	0.01 ± 0.01
	15	1.41 ± 0.07	160 ± 10	0.32 ± 0.08	1600 ± 700	0.01 ± 0.01
	30	1.35 ± 0.05	110 ± 9	0.36 ± 0.06	2500 ± 900	0.02 ± 0.02
	60	1.27 ± 0.04	55 ± 4	0.41 ± 0.03	1100 ± 240	0.07 ± 0.02
	90	1.16 ± 0.05	69 ± 4	0.42 ± 0.05	650 ± 110	0.15 ± 0.01

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Analysen somit feststellen, dass mindestens drei verschiedene Prozesse zur NPQ Relaxation beitragen:

- (i) Ein pH- und PsbS-abhängiger sowie schnell (Lebenszeit 30-60s) relaxierender Prozess, der eindeutig dem qE zugeschrieben werden kann.
- (ii) Ein nahezu irreversibler Prozess (Lebenszeit $\gg 1$ h), der eindeutig dem qI zugeschrieben werden muss.
- (iii) Ein langsam (Lebenszeit 10-20 min) relaxierender Prozess, der unabhängig von qE und qI ist, und wahrscheinlich Zx-abhängigen Prozessen zugeordnet werden muss, obgleich ein ähnlicher Prozess auch in Abwesenheit von Zx (in der *npq1* Mutante) (ohne Zx) gefunden wurde. Die Charakteristika dieses Prozesses lassen darauf schließen, dass es sich dabei um die Relaxation der Prozesse handelt, die der langsamen Phase der NPQ Induktion entsprechen.

Um den postulierten Zusammenhang zwischen der langsamen Phase der NPQ Induktion und der mittleren Phase der NPQ Relaxation mit der Bildung und Epoxidation des Zx näher zu charakterisieren, wurde unter identischen Belichtungsbedingungen die Dynamik der Xanthophyllzyklusaktivität untersucht.

3.6 Dynamik der Bildung und Epoxidation von Zx

Die lichtabhängige Umwandlung der Xanthophyllzykluspigmente wurde im Detail nur in den vier Genotypen untersucht, die Veränderungen in der Zusammensetzung der Xanthophyllzykluspigmente (Vx, Ax und Zx) während Belichtung und Dunkelrelaxation erwarten ließen, nämlich in WT Pflanzen und den Mutanten *stn7*, *npq4* und *L17*. Für die beiden Xanthophyllzyklusmutanten *npq1* und *npq2* Mutante wurde nur exemplarisch bestätigt, dass beide Mutanten (wie zu erwarten) auch tatsächlich keine lichtabhängigen Änderungen bezüglich der Xanthophyllzusammensetzung unter den experimentellen Bedingungen zeigten. Auf eine Darstellung dieser Mutanten wurde jedoch verzichtet.

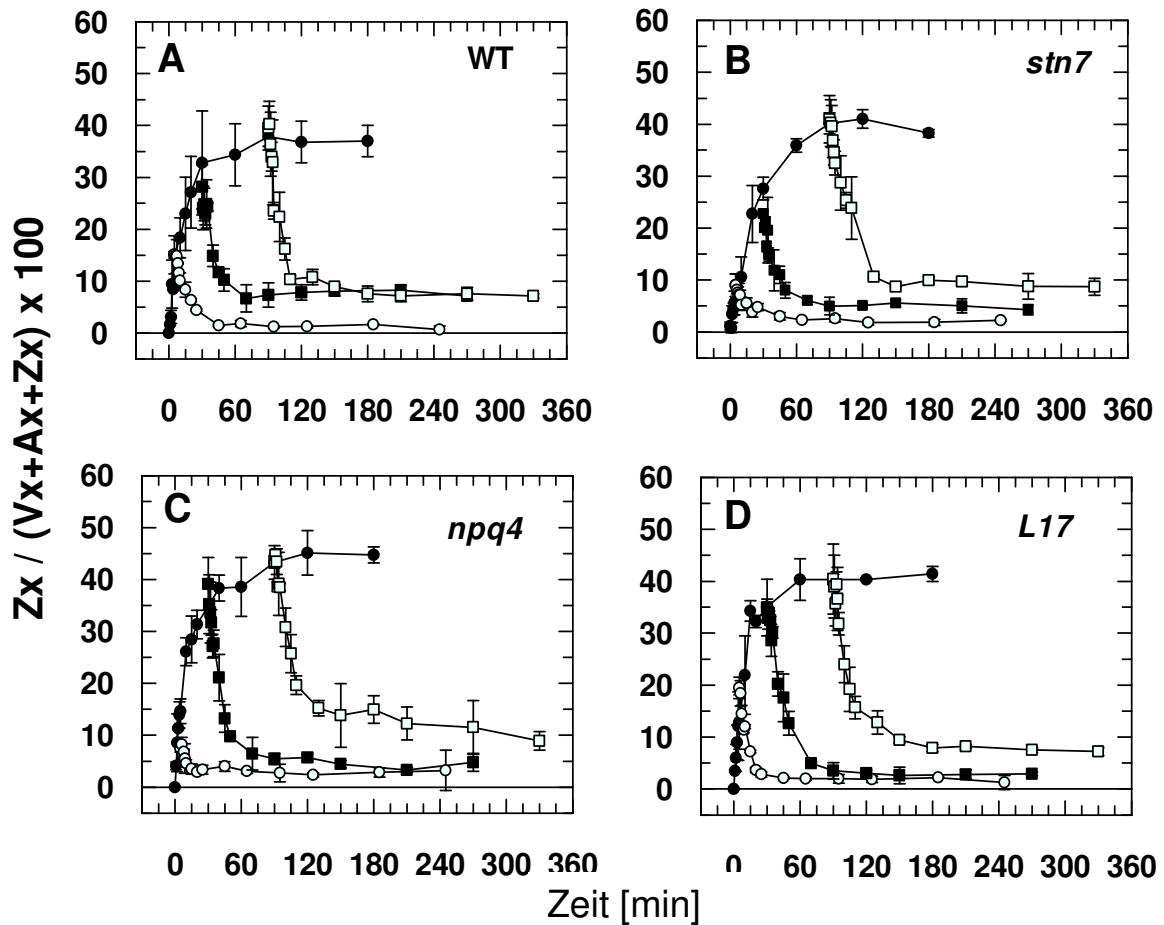


Abbildung 3.22: Dynamik der Xanthophyllzyklusaktivität. Die Bildung von Zx wurde während einer Belichtung von Blättern mit einer Lichtintensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über einen Zeitraum von bis zu 180 min gemessen. Die Epoxidation von Zx wurde während einer Dunkelperiode im Anschluss an eine Vorbelichtung von 5, 30 oder 90 min über einen Zeitraum von bis zu 240 min gemessen. **A:** WT, **B:** *stn7*, **C:** *npq4* und **D:** *L17*. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Blattproben in flüssigem N_2 eingefroren und die Pigmentzusammensetzung mittels HPLC-Analyse bestimmt. Gezeigt werden die Mittelwerte $\pm$ SD von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

Abbildung 3.22 zeigt in Übersicht den zeitlichen Verlauf der Bildung von Zx während einer 3stündigen Belichtung ($900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und die Epoxidation von Zx im Anschluss an eine Vorbelichtung von 5, 30 und 90 min. Die Bildung des Zx folgte in allen Genotypen einem einphasigen Verlauf, während die Epoxidation von Zx im Anschluss an die Vorbelichtung jeweils zwei Phasen aufwies. Obgleich die Zahl der verfügbaren Datenpunkte für die aufwändigen Pigmentanalysen im Vergleich zu den NPQ-Messungen recht klein und die Standardabweichungen relativ groß waren, wurden die Datensätze zur quantitativen Auswertung mit einer multiexponentiellen Funktion angepasst. Die ermittelten Parameter sind für die Zx-Bildung in Tabelle 3.7 und für die Zx Epoxidation in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

Vergleicht man die Menge des maximal gebildeten Zx und die Kinetik der Zx Bildung in den vier Genotypen, so ist in allen Fällen ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf zu erkennen (Abb. 3.22). Die kinetische Analyse ergab, dass die Zx Bildung einem einphasigen Anstieg mit einer Anstiegszeit von etwa 10-15 min folgt (Tab. 3.7). Lediglich in der *stn7* Mutante schien der Anstieg etwas langsamer zu verlaufen (Anstiegszeit etwa 25 min) als in den drei anderen Genotypen. Der relative Anteil des maximal gebildeten Zx betrug in allen Fällen etwa 40% des gesamten Pools an Xanthophyllzykluspigmenten (Abb. 3.22, Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Kinetische Parameter der Zx Bildung.

Die in Abb. 3.22 dargestellten Daten wurden mit einer mono-exponentiellen Funktion gefittet nach der Gleichung: $y = y_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-t/\tau_1))$.

	A₁	τ₁ [s]
WT	36.1 ± 1.8	860 ± 100
<i>stn7</i>	40.9 ± 1.4	1600 ± 150
<i>npq4</i>	39.3 ± 1.8	700 ± 70
L17	40.4 ± 1.6	670 ± 70

Die Rückumwandlung (Epoxidation) des Zx zu Vx während einer Dunkelphase im Anschluss an eine Vorbelichtung von 5, 30 und 90 min zeigte dagegen einen zweiphasigen Verlauf. Einer dominierenden Phase, in der jeweils mindestens 80% des vorher gebildeten Zx epoxidiert wurde und die mit einer Lebenszeit von 10-15 min in allen Genotypen sehr ähnlich war, folgte eine im gewählten Zeitbereich nahezu irreversible Phase mit einer geringeren Amplitude (Tab. 3.8). In allen Fällen war ein Anstieg der Amplitude dieser irreversiblen Phase mit zunehmender Vorbelichtungszeit zu beobachten. Vergleicht man den Zeitverlauf der Zx Bildung bzw. Zx Epoxidation mit dem Zeitverlauf der NPQ Induktion bzw. NPQ Relaxation, so fällt auf, dass die Zx Bildung kinetisch mit der langsamen Phase der NPQ Induktion und die Zx Epoxidation mit der mittleren Phase der NPQ Relaxation korreliert. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass die langsame Phase der NPQ Induktion und die mittlere Phase der NPQ Relaxation im Zusammenhang mit Zx-abhängigen Prozessen stehen. Im Zeitbereich der sehr schnell induzierbaren und schnell relaxierenden pH- und PsbS-abhängigen NPQ Prozesse (jeweils 1-2 min) erfolgte dagegen weder eine Bildung noch eine Epoxidation von Zx, was die Schlussfolgerung untermauert, dass qE nicht primär von Zx abhängig ist. Bemerkenswert war allerdings, dass die beobachtete Ausbildung von irreversiblen NPQ Prozessen (qI) nach längeren Vorbelichtungszeiten (Abb. 3.19) mit der Bildung eines Pools an nicht epoxidierbarem Zx korrelierte. Dies deutet darauf hin, dass Zx auch eine Rolle bei photoinhibitorischen Prozessen spielen könnte.

Tabelle 3.8: Kinetische Parameter der Zx Epoxidation. Die in Abb. 3.22 dargestellten Daten wurden mit einer mono-exponentiellen Funktion gefittet nach der Gleichung: $y = A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + y_0$

	Zeit	A_1	τ_1 [s]	y_0
WT	5	15.1 ± 0.3	750 ± 40	1.4 ± 0.1
	30	24.9 ± 2.0	580 ± 80	7.5 ± 0.5
	90	33.2 ± 1.6	500 ± 80	8.0 ± 0.4
stn7	5	6.0 ± 0.4	1050 ± 150	2.2 ± 0.1
	30	17.2 ± 0.5	630 ± 90	5.2 ± 0.3
	90	35.8 ± 2.3	900 ± 80	8.2 ± 0.3
npq4	5	5.6 ± 0.5	340 ± 70	2.6 ± 1.2
	30	35.2 ± 1.9	650 ± 30	4.3 ± 0.3
	90	33.8 ± 1.2	990 ± 100	11.9 ± 0.8
L17	5	16.9 ± 1.1	480 ± 50	2.1 ± 0.2
	30	35.8 ± 0.5	880 ± 40	2.8 ± 0.2
	90	33.8 ± 1.7	980 ± 100	7.9 ± 0.2

3.7 Dynamik des NPQ bei verschiedenen Belichtungsintensitäten

In den bisher vorgestellten Experimenten zur Fluoreszenzlöschung waren alle Experimente bei einer Lichtintensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durchgeführt worden. Diese Lichtintensität war hoch genug, um eine Sättigung des Elektronentransportes (und damit den Aufbau eines maximalen pH-Gradienten) sicher zu stellen, aber noch niedrig genug, um (zumindest im WT) nennenswerte photoinhibitorische Schädigungen zu vermeiden. Um Hinweise darauf zu erhalten inwieweit die verschiedenen NPQ Prozesse von der Belichtungsintensität abhängen, wurde damit begonnen, die Dynamik des NPQ bei nicht-sättigenden ($450 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und stark erhöhten ($1800 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) Lichtintensitäten zu charakterisieren.

In Abb. 3.23 sind die bisher durchgeführten Messungen für den WT vergleichend dargestellt. Da die in diesen Experimenten gewählte Zeitauflösung (100 s) nicht ausreichend war um die schnellen ($< 2 \text{ min}$) Phasen der NPQ Induktion und Relaxation zuverlässig zu quantifizieren, wurde in diesem Fall auf eine detaillierte kinetische Analyse verzichtet.

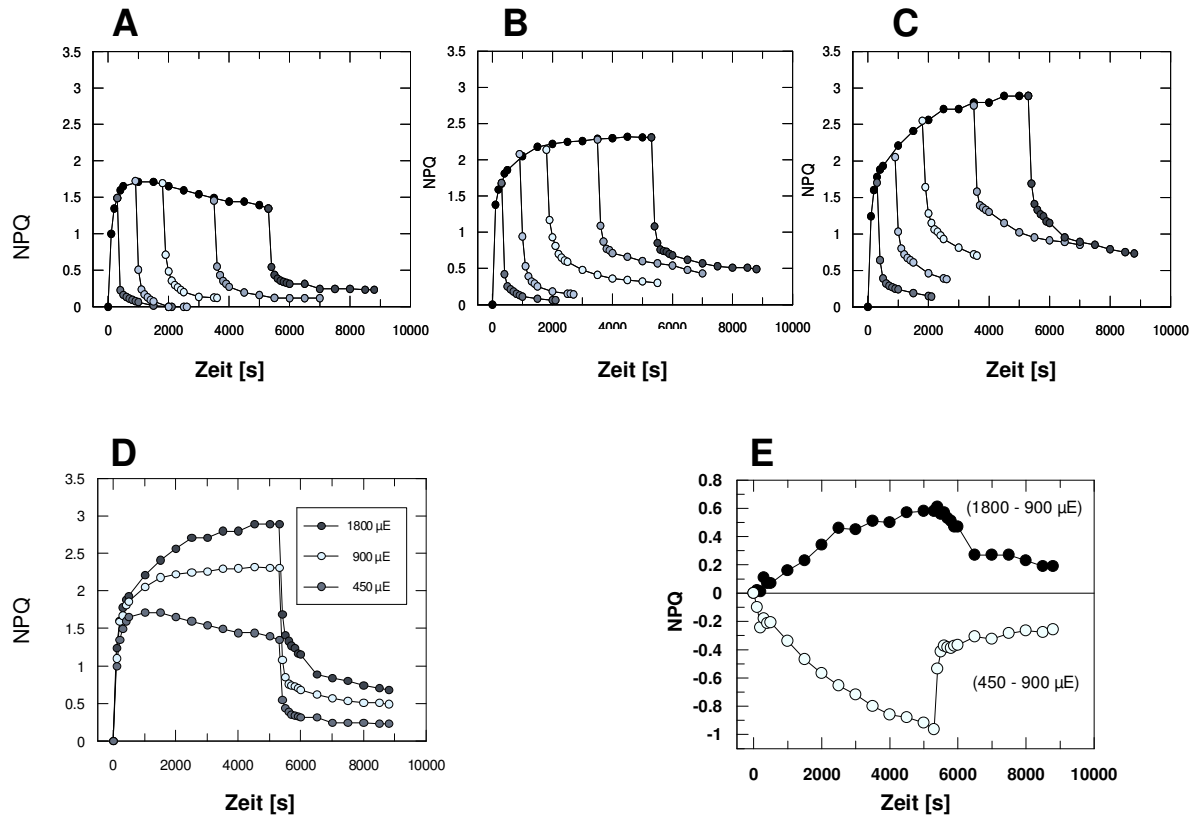


Abbildung 3.23: Dynamik des NPQ in WT Pflanzen bei verschiedenen Lichtintensitäten. Die NPQ Induktion während einer Belichtung von 90 min und die NPQ Relaxation nach 5, 15, 30, 60 und 90minütiger Vorbelichtung wurde bei drei verschiedenen Lichtintensitäten gemessen: **A:** 450, **B:** 900 und **C:** 1800 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$. **D:** Vergleich der Induktion und Relaxation des NPQ bei den drei Lichtintensitäten. **E:** Differenzen der in D dargestellten Kurven: 900 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ minus 450 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (offene Kreise), 1800 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ minus 900 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (schwarze Kreise). Gezeigt werden die Mittelwerte von 2-3 unabhängigen Experimenten.

Es ist jedoch auch so deutlich zu erkennen, dass die schnelle Phase ($\leq 200 \text{ s}$) der NPQ Induktion bei allen drei Lichtintensitäten nahezu identisch war (Abb. 3.23 D,E). Im weiteren Verlauf der Induktion, fiel die Kurve bei 450 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.23A) nach Erreichen eines transienten Maximums von etwa 1,7 (nach etwa 10 min) stetig ab, während bei einer Intensität von 900 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wie in den vorherigen Experimenten (Abb. 3.21), nach etwa 30 min ein stabiler Wert für NPQ von etwa 2,3 erreicht wurde (Abb. 3.23B). Im Gegensatz dazu stieg die Kurve bei Belichtung mit 1800 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.23C) weiter an und erreichte nach 90 min einen Wert von etwa 3,0, der offensichtlich noch nicht ganz den Sättigungspunkt der Kurve darstellte. Der Abfall der Kurve bei 450 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ lässt sich dadurch erklären, dass diese Lichtintensität nicht sättigend für den Elektronentransport und die Photophosphorylierung war und somit der transmembrane pH-Gradient (mit zunehmender Effizienz der ATP-Synthese und dem damit verbundenen Abbau des ΔpH) stetig abnahm.

Der kontinuierliche Anstieg des NPQ bei $1800 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dagegen zeigt an, dass bei diesen hohen Lichtintensitäten wahrscheinlich verstärkt photoinhibitorische Prozesse zum NPQ beitragen. Diese Interpretationen wurden bestätigt durch die Relaxation des NPQ nach verschiedenen Zeiten der Vorbelichtung (Abb. 3.23). So korrelierte der Abfall des NPQ bei längerer Belichtung mit $450 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit einer Verringerung der Amplitude der schnell ($\leq 200 \text{ s}$) relaxierenden Komponente, die eindeutig der Relaxation des ΔpH zugeordnet werden kann. Im Gegensatz dazu korrelierte die Zunahme des NPQ bei $1800 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit der Zunahme der Amplitude der sehr langsam relaxierenden bzw. irreversiblen Komponente des NPQ, die eindeutig photoinhibitorischen Prozessen zugeordnet werden kann.

3.8 Erweitertes NPQ-Modell

Das aufgrund der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen aufgestellte Modell für zwei unabhängige Löschungsorte (vgl. Abb. 3.14), kann mit Hilfe der weiterführenden Analysen zur NPQ- und Zx-Dynamik (Abschnitte 3.5 bis 3.8) nun im Hinblick auf die Kinetik der Entstehung der beiden Löschungsorte Q1 und Q2 erweitert werden (Abb. 3.24).

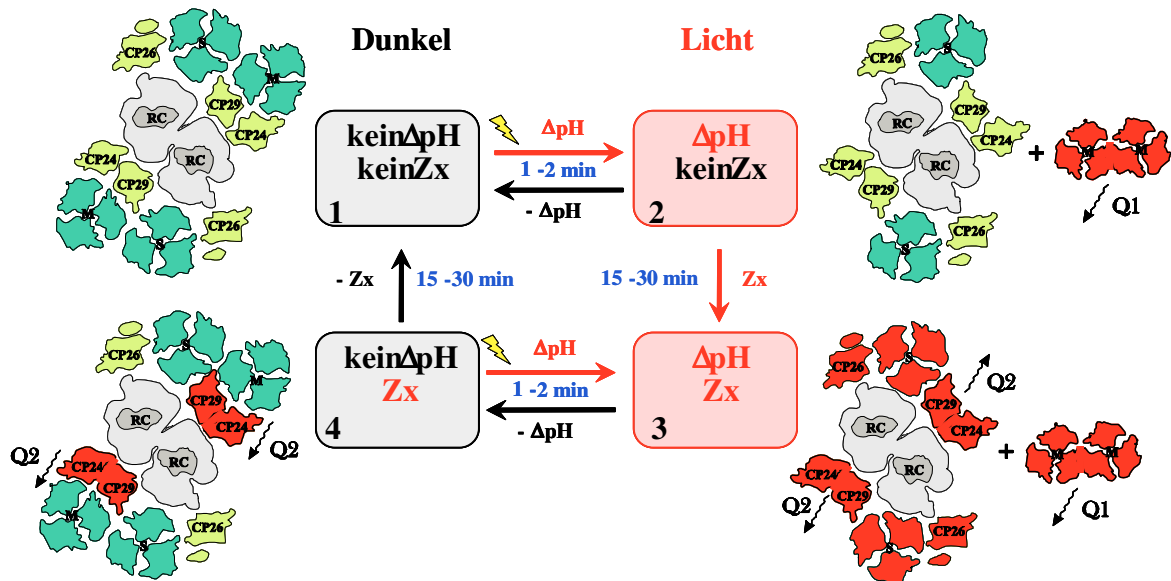


Abbildung 3.24: 4-Zustands-Modell für das NPQ unter *in vivo* Bedingungen. Aus den durchgeführten Messungen lassen sich die durch Belichtung induzierbaren NPQ-Prozesse in *Arabidopsis* mit vier Zuständen beschreiben. Der Übergang vom dunkeladaptierten Zustand (Zustand I) in den lichtadaptierten Zustand verläuft in zwei Schritten. Im Zeitbereich von 1-2 min wird mit dem Aufbau des pH-Gradienten der Löschungsort Q1 aktiviert (Zustand II). Q1 beruht auf der Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen. Im weiteren Verlauf (15-30 min) wird unter Synthese von Zx der Löschungsort Q2 aktiviert (Zustand III). Q2 ist in Antennenkomplexen lokalisiert, die mit PS II assoziiert bleiben. Beim Übergang ins Dunkel relaxiert zunächst schnell (1-2 min) Q1 und langsamer (15-30 min) Q2. RC = Reaktionszentren; CP24, CP26, CP29 = minore Antennenproteine des PS II; S,M = stark oder moderat gebundener LHC II.

In dem Modell sind die minoren Antennenproteinen CP24 und CP29 als Ort von Q2 vorgeschlagen. Unter erneuter Verdunkelung sind die Prozesse wie beschrieben in verschiedenen Zeitskalen reversibel. Die Aktivierung/Deaktivierung von Q1 lässt sich dabei grundsätzlich jeweils in kurzer Zeit (1-2 min) schalten, während die Aktivierung/Deaktivierung von Q2 – gekoppelt an die Synthese und Expoxidation von Zx – mit 15-30 min deutlich langsamer geschaltet werden kann. Es ist zu beachten, dass die beiden Löschungsorte nach dem Modell unabhängig von einander sind, d.h. sowohl Q1 (in Zustand II) als auch Q2 (in Zustand IV) kann jeweils alleine aktiviert sein.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden pflanzliche Schutzmechanismen gegenüber Starklicht induzierter Schädigung (= photo-oxidativer Stress) untersucht. Photo-oxidativer Stress wird grundsätzlich durch die Schädigung der Pflanzen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht (Niyogi 1999; Apel und Hirt, 2004; Triantaphylides und Havaux, 2009). Die lichtinduzierte Bildung von ROS ist dabei im Wesentlichen auf Prozesse zurückzuführen, die ihren Ursprung in Chloroplasten haben und in Folge der Absorption von Lichtenergie in den Antennen der beiden Photosysteme induziert werden. Dementsprechend sind die pflanzlichen Schutzmechanismen gegenüber photo-oxidativer Schädigung im Wesentlichen im Chloroplasten aktiv und folgen zwei grundlegenden Prinzipien: 1. Vermeidung der Bildung von ROS und 2. Deaktivierung gebildeter ROS. Die Funktionalität beider Grundprinzipien ist essentiell für das Überleben der Pflanze. Für beide Schutzstrategien haben Pflanzen jedoch eine Vielfalt verschiedener Mechanismen entwickelt (Apel und Hirt, 2004; Li et al., 2009), die häufig synergistisch wirken, sich z.T. aber auch – beim Ausfall einzelner Schutzmechanismen – funktionell kompensieren können.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von zwei Schutzmechanismen, die der Vermeidung der Bildung von ROS dienen und zwar der Deaktivierung von $^3\text{Chl}^*$ und $^1\text{Chl}^*$ in den Antennen des PS II. Beides wurde mit spektroskopischen Methoden (EPR-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie) untersucht, wobei der Schwerpunkt der Arbeiten auf Fluoreszenzanalysen zur Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$ (= NPQ) lag. Da viele grundlegende wichtige Aspekte bereits im Ergebnisteil diskutiert werden mussten, um das Verständnis und die Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, werden im Folgenden nur noch darüber hinaus gehende allgemeine Aspekte und einige Punkte, die für die Interpretation der Ergebnisse besonders kritisch sind bzw. sein könnten, ausführlicher diskutiert.

4.1 EPR Spektroskopische Untersuchungen an isolierten LHC II Komplexen

Mit Hilfe der EPR Spektroskopie wurde die lichtinduzierte Bildung von $^3\text{Chl}^*$ und $^3\text{Car}^*$ in isolierten LHC II-Komplexen mit verschiedener Carotinoid-Ausstattung (isoliert aus WT Pflanzen und verschiedenen Mutanten mit Defekten in der Carotinoid-Biosynthese) untersucht, um mögliche spezifische Funktionen einzelner Carotinoide nachweisen zu können. Dabei zeigte sich, dass in allen verwendeten LHC II-Präparationen sowohl $^3\text{Chl}^*$ als auch $^3\text{Car}^*$ in ähnlichem Ausmaß nachzuweisen waren. Aufgrund der Unterschiede in

der Carotinoid-Ausstattung der verschiedenen LHC II-Präparationen wurde geschlossen, dass keines der verschiedenen Carotinoide (Nx, Vx, Zx und Lut) für die Deaktivierung des $^3\text{Chl}^*$ essentiell ist und die Besetzung der L1 und L2 Bindestelle mit entweder Lut, Vx oder Zx ausreichend ist für die $^3\text{Chl}^*$ -Deaktivierung.

Entscheidend für die Zuverlässigkeit der Interpretation der Daten sind neben der Qualität der verwendeten Proben vor allem die Annahmen über die Besetzung der Carotinoid-Bindestellen. Die Western-Blot-Analysen der LHC II-Präparationen zeigten, dass die untersuchten Proben keine reinen LHC II darstellten, sondern mit anderen minoren Antennenproteinen (in geringen Mengen aus PS I und in etwas erhöhtem Maße aus PS II) verunreinigt waren (Abb. 3.2). Dies hat allerdings für die Interpretation der Daten keine grundlegende Relevanz, da die Veränderungen der Carotinoid-Zusammensetzung in den einzelnen Mutanten sich auf die minoren Antennenproteine beider Photosysteme in gleicher Weise auswirkt wie auf den LHC II.

In Bezug auf die verschiedenen Carotinoid-Bindestellen gilt dies uneingeschränkt auch für die L1 Bindestelle, die in allen LHC Proteinen mit Lut besetzt ist (Morosinotto et al. 2003) und dementsprechend in den beiden Lut-Mutanten (*lut2npq1* und *lut2npq2*) in allen LHC Proteinen durch Vx (*lut2npq1*) bzw. Zx (*lut2npq2*) ersetzt wird. Die L2 Bindestelle dagegen ist in den minoren Antennenproteinen des PS II nicht – wie in den anderen LHC Proteinen – mit Lut, sondern überwiegend mit Vx besetzt (Morosinotto et al., 2003), sodass eine mögliche spezifische Funktion von Lut an L2 durch die detektierte Verunreinigung der LHC II Proben mit Lhcb5 und Lhcb6 Einfluss auf die Schlussfolgerungen bezüglich dieser Bindestelle haben könnte. In diesem Falle wäre aber zu erwarten gewesen, dass der generelle Austausch von Lut durch Vx in der *lut2npq1* Mutante zu Veränderungen im EPR Signal führt, was aber nicht der Fall war (Abb. 3.4). Die N1 und V1 Bindestellen schließlich sind nur im LHC II besetzt, und zwar mit Nx (N1) und Vx (V1) (Morosinotto et al., 2003), wobei die N1 Bindestelle spezifisch für Nx ist. Das unveränderte EPR Spektrum in Abwesenheit von Nx lässt damit zweifelsfrei den Schluss zu, dass die N1 Bindestelle nicht an der $^3\text{Chl}^*$ -Deaktivierung beteiligt ist. Gleiches gilt auch für die V1 Bindestelle, die sowieso nur eine periphere Bindestelle darstellt, die überhaupt nur in LHC II und Lhca3, jeweils mit Vx, besetzt ist. Aufgrund der in allen Präparationen gefundenen Stöchiometrie von maximal 3 Carotinoiden pro Monomer (Tab 3.1) kann davon ausgegangen werden, dass die V1 Bindestelle wohl grundsätzlich nicht besetzt war. So kann die Bedeutung dieser Bindestelle für die $^3\text{Chl}^*$ -Deaktivierung zwar nicht zuverlässig beurteilt werden, allerdings ist zu erwarten, dass diese Bindestelle keine große Rolle bei diesen Prozessen spielt, da ein an V1 gebundenes Carotinoid nur mit wenigen Chl-Molekülen in Wechselwirkung treten kann, im Gegensatz zu den an den

zentralen Bindestellen L1 und L2 gebundenen Carotinoiden, die in engem Kontakt zu mehreren Chl a Molekülen stehen (vgl. Abb. 3.3 A).

Somit bleibt festzuhalten, dass die L1 und L2 Bindestellen im LHC II (und vermutlich auch in den übrigen LHC Proteinen) für die $^3\text{Chl}^+$ -Deaktivierung relevant sind. Die aus den durchgeführten Experimenten abzuleitende Schlussfolgerung, dass sowohl Vx als auch Zx das dort im WT gebundene Lut dabei funktionell ersetzen können, steht allerdings im Widerspruch zu der beobachteten erhöhten Lichtstress-Empfindlichkeit von Lut-defizienten Mutanten unter *in vivo* Bedingungen, die mit einem lichtinduzierten Abbau des LHC II einhergeht (Kalituho et al., 2007, Dall'Osto et al., 2006). Möglicherweise ist die Bindung von Lut an L1 und L2 daher bedeutsam für die Stabilisierung von LHC II unter *in vivo* Bedingungen.

4.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zum NPQ

Die Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$ im Zusammenhang mit der nicht-photochemischen Löschung der Anregungsenergie (NPQ) wurde mit drei verschiedenen Methoden untersucht. Aus den durchgeführten zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen (Abschnitt 3.3) konnte geschlossen werden, dass unter moderat sättigenden Lichtbedingungen im Gleichgewichtszustand zwei verschiedene Löschungsorte (genannt Q1 und Q2) zum NPQ beitragen. Dazu wurde ein Modell aufgestellt (Abb. 3.14), nach dem Q1 die Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen darstellt, während Q2 in den mit PS II assoziierten Antennen lokalisiert ist. Die Analyse verschiedener Mutanten zeigte, dass die Aktivierung/Ausbildung von Q1 zwar ein strikt pH- und PsbS-abhängiger Prozess ist, jedoch die Löschung über diesen Prozess zusätzlich noch durch Zx moduliert wird. Q2 dagegen spiegelt einen überwiegend Zx-abhängigen Mechanismus wider, der aber auch in Abwesenheit von Zx noch auftritt, dann allerdings nur mit geringer Effizienz. Mit Hilfe von Untersuchungen zur wellenlängenspezifischen Fluoreszenzlöschung (Abschnitt 3.4) wurde das Vorhandensein von mindestens zwei unabhängigen Löschprozessen zweifelsfrei bestätigt und zudem konnte daraus abgeleitet werden, dass die Aktivierung und Deaktivierung von Q1 ein schnell (1-2 min) schaltbarer Prozess ist, der somit strikt vom Aufbau bzw. Abbau des ΔpH abhängt. Detaillierte Untersuchungen zur Dynamik des NPQ mit dem PAM Fluorometer zeigten schließlich, dass der Löschmechanismus an Q1 dem qE Mechanismus entspricht und dass mit langsamerer Kinetik (15-30 min) ein weiterer NPQ Prozess induziert wird, der kinetisch mit der Zx-Synthese korreliert und dessen Relaxation ebenfalls langsam (15-30 min) und in Korrelation mit der Epoxidation von Zx erfolgt und der deswegen Q2 zugeordnet werden kann.

4.2.1 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Ein kritischer Punkt bei der Interpretation der Daten aus den ultraschnellen Fluoreszenzmessungen war die Identifizierung einer unter NPQ-Bedingungen neu gebildeten fernrot fluoreszierenden Komponente und deren Zuordnung zu oligomeren, von PS II abgelösten LHC II-Komplexen. Die Identifizierung dieser Komponente erfolgte durch die durchgeführten Target-Analysen. Die Anpassung der gemessenen Daten war ohne zu Hilfenahme dieser zusätzlichen Komponente nicht zufriedenstellend möglich (im Detail dargestellt in Holzwarth et al., 2009.). Dass die in WT, *npq1* und *L17* gefundene Komponente jeweils leicht unterschiedliche spektrale Eigenschaften hat, ist sicherlich darin begründet, dass die Messungen an intakten Blättern durchgeführt wurden. In diesem komplexen und sehr heterogenen System sind je nach Wachstum und physiologischem Zustand eines Blattes z.T. erhebliche Schwankungen in den optischen und spektralen Eigenschaften nicht zu vermeiden. Es ist des Weiteren nicht auszuschließen, dass die beiden Mutanten durch die fehlende Zx Bildung (*npq1*) und den erhöhten PsbS-Gehalt (*L17*) im Vergleich mit dem WT möglicherweise Änderungen in der supramolekularen Organisation der PS II-Antenne bzw. der Thylakoidmembran aufweisen, die ebenfalls zu diesen Unterschieden beitragen könnten.

Die Zuordnung dieser Komponente zu oligomeren, von PS II abgelösten LHC II-Komplexen erfolgte auf Grundlage verschiedener Befunde:

- (i) Die Komponente konnte nicht mit Hilfe der kinetischen Schemata für PS II oder PS I (Abb. 3.9) beschrieben werden.
- (ii) Es konnte insbesondere ausgeschlossen werden, dass die fernrote Komponente von einer PS I Komponente stammt (die grundsätzlich die fernrote Fluoreszenz dominieren), da die unter allen Bedingungen zu detektierten PS I Komponenten auch unter NPQ Bedingungen unverändert waren.
- (iii) Das Entstehen der neuen Komponente ging eindeutig einher mit der Abnahme der Amplitude der PS II-Komponenten, was für eine verminderte effektive Antennengröße in PS II spricht.
- (iv) Die Lebenszeit dieser Komponente zeigte keine Änderung in Bezug auf das Öffnen oder Schließen der PS II-Reaktionszentren, und ist somit nicht funktionell an PS II gekoppelt.
- (v) Die spektralen Eigenschaften der Komponente ähnelten sehr stark dem Spektrum von isolierten, oligomerisierten LHC II-Komplexen (Miloslavina et al., 2008; Abb. 3.13)

Diese vielfältigen Befunde lassen somit keine andere Interpretation der Identität der neuen Komponente zu. Diese Zuordnung wurde darüber hinaus durch die

wellenlängenspezifischen Fluoreszenzmessung (Abschnitt 3.4) bestätigt. Die Abhängigkeit der Bildung dieser Komponente vom PsbS-Protein und die weiter durchgeführten Untersuchungen (Abschnitt 3.4 und 3.5) konnten konsistent bestätigen, dass diese Komponente bzw. Q1 direkt die Bildung des qE widerspiegelt.

Die deutlich längere Lebenszeit der fernroten Komponente in Abwesenheit von Zx (*npq1*, Tab. 3.4) zeigte, dass die Effizienz der Energielöschung in Q1 aber nicht nur von PsbS abhängt, sondern anscheinend auch durch Zx beeinflusst wird. Dieser Befund kann so verstanden werden, dass entweder die Ablösung des LHC II, wahrscheinlicher aber die Oligomerisierung von LHC II durch Zx verstärkt wird. Tatsächlich wurde ein solcher Effekt von Zx in früheren *in vitro* Studien an LHC II bereits beschrieben (s. Horton et al., 1996) und führte zu der Modellvorstellung, dass NPQ auf die Aggregation von LHC II zurückzuführen ist (Horton et al., 2005). Die PsbS induzierte Ablösung (und durch Zx verstärkte) Oligomerisierung von LHC II könnte auch die in der Literatur beschriebene Zx-unabhängige und Zx-abhängige Komponente des qE erklären (z.B. Johnson et al., 2009). In der Tat konnten auch in den hier durchgeführten Untersuchungen mit dem PAM-Fluorometer Hinweise auf einen Zx-abhängigen Anteil des qE und damit auf einen Einfluss von Zx auf Q1 gefunden werden (s. Punkt 4.2.3).

Der Löschungsort Q2 konnte zweifelsfrei einer Zx-abhängigen Energielöschung in der mit PS II assoziierten Antenne zugeordnet werden. Allerdings zeigte sich auch hier, dass das NPQ_{PSII} in Abwesenheit von Zx (*npq1*) nicht vollständig verschwunden war (Tab. 3.4). Somit scheint Q2 nicht ganz strikt durch Zx bestimmt zu sein. Dies deckt sich mit den durchgeführten PAM-Messungen, in denen auch in der *npq1* Mutante noch ein sich langsam entwickelndes NPQ detektiert werden konnte (Abb. 3.21). Offensichtlich besitzen also beide Löschungsorte, Q1 und Q2, eine gewisse Flexibilität, wobei aber anscheinend in beiden Fällen dem Zx eine wichtige Rolle zukommt, die größtmögliche Effizienz der Energiedissipation zu ermöglichen, wobei die Bedeutung von Zx an Q2 größer scheint als an Q1.

4.2.2 Wellenlängenspezifische Fluoreszenzspektroskopie

Die normalisierten Emissionsspektren von Starklicht behandelten Pflanzen zeigten einen auch bereits von anderen Autoren beschriebenen, charakteristischen Fluoreszenzabfall in der PS II-Region (Kyle et al., 1983; Krause et al., 1983; McTavish, 1988). Zusätzlich wurde jedoch auch ein Anstieg der Fluoreszenz in der fernroten Region (um 720 nm) beobachtet. Die bei Raumtemperatur durchgeführten Messungen zeigten deutlich, dass das positive Signal im (Licht minus Dunkel) Differenzspektrum bei 720 nm (Abb. 3.15 B) andere kinetische Charakteristika besitzt, als das negative Signal bei 682 nm (Löschung

in PS II). Obwohl einige Autoren dieses Phänomen bereits als eine Art ‚state transition‘ beschrieben haben (Butler & Kitajima, 1975; Mawson & Cummins, 1986; McTavish, 1988; Walters & Horton, 1991) können diese Fluoreszenzänderungen so nicht verstanden werden. Zum einen, weil dies nicht erklärt, warum der Fluoreszenzanstieg nur bei 720 nm, nicht aber bei höheren Wellenlängen beobachtbar ist und zum anderen, weil die *stn7* Mutante, bei der ‚state transition‘ unmöglich ist, ein dem WT sehr ähnliches Verhalten zeigt. Demnach müssen an der NPQ Induktion mindestens zwei unabhängige Mechanismen beteiligt sein, die unterschiedliche spektrale Charakteristika besitzen: Ein Mechanismus, der die PS II-Fluoreszenz erniedrigt und ein Mechanismus, welcher für die Ausbildung einer neuen Komponente verantwortlich ist, die bei 720-730 nm fluoresziert. Aufgrund der Kinetik der lichtinduzierten, spektralen Veränderungen bei 720 nm (Abb. 3.17) und deren Abhängigkeit von PsbS, konnten diese Änderungen eindeutig der energieabhängigen Löschungskomponente qE zugeschrieben werden. Die Kinetiken der Quotienten von F_{720}/F_{750} (Abb. 3.18) sind für alle Pflanzen (Ausnahme: *npq4*) sehr ähnlich: Nach wenigen Minuten der Belichtung ist ein stabiles Plateau erreicht und die vollständige Relaxation erfolgt ebenfalls innerhalb von wenigen Minuten im Dunkeln. Die Messungen an den Xanthophyllzyklusmutanten (*npq1* und *npq2*) zeigten auch hier, dass qE unabhängig von Zx ist, aber durchaus durch Zx moduliert wird (Abb. 3.18). Somit erlaubte die Messung von F_{720}/F_{750} , das qE unabhängig von anderen Löschungskomponenten, wie z.B. qI, zu untersuchen.

4.2.3 PAM Fluorometrie

Die durchgeführten Messungen mit dem PAM Fluorometer zur Dynamik des NPQ bestätigten zum einen grundsätzlich die aus der Literatur bekannten Charakteristika des qE in Bezug auf die Abhängigkeit von PsbS und Zx, untermauerten aber auch noch einmal die Zuordnung des F_{720}/F_{750} Signals zum qE. Mit beiden Methoden wurden unter identischen experimentellen Bedingungen vergleichbare Kinetiken der Induktion und Relaxation von qE, sowie die gleiche Abhängigkeit von PsbS und Zx bestimmt. Die PAM-Messungen lieferten so, als zweite unabhängige Methode, kinetische Informationen über den Löschungsort von Q1. Darüber hinaus erbrachten die PAM-Messungen (in Zusammenhang mit den parallel durchgeführten Pigmentanalysen) aber zudem kinetische Informationen über die Dynamik von Zx-abhängigen NPQ Prozessen und damit auch über die Bildung und Relaxation des Löschungsortes Q2. Im Folgenden sind die wichtigsten Aspekte der Ergebnisse aus den PAM-Messungen hinsichtlich der Zuordnung der verschiedenen Induktions- und Relaxationsphasen zu unterschiedlichen NPQ Prozessen, sowie die daraus abzuleitenden Schlussfolgerungen in Zusammenhang mit bekannten

Literaturdaten und den Ergebnissen der anderen hier durchgeführten Messungen dargestellt. Aus den Untersuchungen zur Dynamik des NPQ (Abschnitt 3.5) im Vergleich mit der Dynamik des Xanthophyllzyklus (Abschnitt 3.6) konnte neben den bereits bekannten und in der Literatur gut beschriebenen Komponenten des qE und qI eine weitere Zx -abhängige Komponente identifiziert werden, die im Zeitbereich von 15-30 min induziert wird und mit ähnlichen Kinetiken auch relaxiert und die im Folgenden als qZ bezeichnet wird.

4.2.3.1 Die qE Komponente des NPQ

Die schnell induzierbare (1-2 min) und relaxierende (1-2 min) Phase des NPQ (Tab. 3.5 und 3.6) kann eindeutig der bekannten pH - und $PsbS$ -abhängigen qE Komponente des NPQ (z.B. Niyogi et al., 1998; Li et al., 2000; Johnson et al., 2009) zugeschrieben werden. Die hier durchgeführten vergleichenden Messungen zur Induktion von qE an dunkeladaptierten und lichtadaptierten Blättern (Abb. 3.20) bestätigen nicht nur die Annahmen über einen Zx -unabhängigen und Zx -abhängigen Anteil des qE (Johnson et al., 2009), sondern erlauben auch eine Abschätzung der Kinetik und Amplituden dieser beiden qE Komponenten. Betrachtet man genauer den Zeitverlauf der NPQ Induktion an dunkeladaptierten WT Pflanzen (Abb. 3.20 A), so lassen sich bei dieser Zeitauflösung (5 s Abstand der Sättigungspulse) in der Tat zwei Phasen unterscheiden: (i) Eine schnelle Phase mit einer Anstiegszeit von etwa 10 s und einer Amplitude von 0.6-0.8. Diese Phase entspricht dem Zx -unabhängigen Anteil von qE und wird im Weiteren als qE_{pH} bezeichnet. (ii) Eine langsamere Phase mit einer Anstiegszeit von etwa 100 s und einer Amplitude von 0.7-0.9. Diese Phase entspricht dem Zx -abhängigen Anteil von qE , im Folgenden als qE_Z bezeichnet. qE_{pH} und qE_Z lassen sich kinetisch auch in der *stn7* Mutante (Abb. 3.20 D) unterscheiden (obgleich der Anstieg von qE_Z hier etwas verlangsamt ist), nicht aber in der *L17* Mutante (Abb. 3.20 B). Das Fehlen dieser deutlichen kinetischen Unterscheidbarkeit der beiden qE Phasen in *L17* lässt sich wahrscheinlich mit einer etwas langsameren Kinetik des qE_{pH} erklären. Möglicherweise verlangsamt eine größere Menge an $PsbS$ diese Zx unabhängige Komponente des qE . Die Zuordnung der schnellen Phase zu qE_{pH} lässt sich sehr schön in dem entsprechenden Experiment mit den beiden Xanthophyllzyklusmutanten (*npq1* und *npq2*) erkennen (Abb. 3.20 E,F). In Abwesenheit von Zx (*npq1*) lässt sich nur qE_{pH} detektieren (und zwar mit gleicher Amplitude und Kinetik wie für den WT abgeleitet) während bei hohen Zx -Mengen (*npq2*) auch im dunkeladaptierten Zustand das maximale NPQ ($=qE_{pH} + qE_Z$) mit derselben schnellen Kinetik von etwa 10 s Anstiegszeit aufgebaut wird.

Die Aktivierung des Löschungsortes Q1 ließ sich eindeutig mit dem Aufbau von qE korrelieren. Bereits in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen wurden Hinweise auf eine Beteiligung von Zx-unabhängigen und Zx-abhängigen Prozessen – und damit qE_{pH} und qE_Z – an Q1 gefunden (s. 4.2.1). Im Zusammenhang mit der Zuordnung der langsamer induzierten qZ Komponente des NPQ zu Zx-abhängigen Prozessen muss daher gefordert werden, dass es unterschiedliche Pools an Zx geben muss, die mit unterschiedlicher Kinetik und unterschiedlichen Wirkorten (= Bindestellen) aktivierbar sind. In der Tat haben detaillierte Untersuchungen der Zx-Bildung in einzelnen Antennenproteinen gezeigt, dass das an die unterschiedlichen LHC Proteine gebundene Vx in Abhängigkeit vom jeweiligen LHC Protein und der jeweiligen Bindestelle mit unterschiedlichen Kinetiken zu Zx umgewandelt werden kann (Jahns et al., 2001, Wehner et al., 2004, 2006). Eine schnelle Umwandlung von Vx zu Zx im Zeitbereich von wenigen (2-4) Minuten, wie es für qE_Z zu fordern ist, ließ sich innerhalb der mit PS II assoziierten LHC Proteinen dabei nur für den LHC II, nicht aber für die minoren Antennenproteine (Lhcb4-6) zeigen (Jahns et al., 2001, Wehner et al., 2006). Es ist daher naheliegend, dass das an die V1 Bindestelle der LHC II-Trimere gebundene Vx an der Bildung von qE_Z beteiligt ist und für eine effiziente Energielöschung an Q1 sorgt. Das mit langsamerer Kinetik umgewandelte Vx, das an die minoren Antennenproteine des PS II gebunden ist, könnte demnach die Bildung von qZ regulieren.

4.2.3.2 Die qZ Komponente des NPQ

Die langsame Phase der NPQ Induktion und die mittlere Phase der NPQ Relaxation konnten in dieser Arbeit einer Zx-abhängigen NPQ Komponente, genannt qZ, zugeordnet werden. Damit widerlegen die hier gezeigten Daten die frühere Zuordnung dieser Phasen zu entweder dem qT Mechanismus (Quick & Stitt, 1989) oder einem modifizierten qE Prozess (Walters & Horton, 1991; Horton et al., 1996) oder photoinhibitorischen Prozessen (Ruban & Horton, 1995). Die Identifizierung von qZ als Zx-abhängige NPQ Komponente beruhte insbesondere auf der Korrelation der Kinetiken der langsamen Phase der NPQ Induktion (= qZ Induktion) bzw. der mittleren Phase der NPQ Relaxation (= qZ Relaxation) mit den Kinetiken der Zx Bildung bzw. Zx Epoxidation (Abschnitte 3.5 und 3.6).

Bei der kinetischen Korrelation der NPQ Dynamik mit der Zx Dynamik war jedoch zu beobachten, dass diese Korrelation nicht in allen Fällen perfekt war. Die Ursache dafür ist in der Tatsache begründet, dass für die Zx Dynamik der gesamte Pool an Xanthophyllzykluspigmenten von ganzen Blättern betrachtet wurde und somit zum einen auch die Zx Dynamik der an die PS I-Antennenproteine gebundenen Xanthophylle immer

mit analysiert wurde, zum anderen aber auch nicht die unterschiedlichen Pools der an die PS II-Antennenproteine gebundenen Xanthophylle differenziert analysiert werden konnten. Dies führt dazu, dass die Pigmentdaten jeweils ein Gemisch aus allen Komponenten der Xanthophylle betrachten und sich so nicht zwischen den spezifischen (anhand der NPQ-Daten) postulierten Wirkorten des Zx differenzieren lässt. Eine solche Differenzierung wäre prinzipiell nur möglich, wenn für die Pigmentdaten zu jedem Messzeitpunkt (jeweils etwa 15 verschiedene Zeiten für die Zx Bildung und Relaxation und das für jeden Genotyp) Thylakoide isoliert und die Antennenproteine nach Detergenz-Solubilisierung über eine Dichtegradienten-Zentrifugation getrennt würden und anschließend die Zx Dynamik für die verschiedenen Antennenproteine separat analysiert würde. Abgesehen von dem damit verbundenen erheblichen Material- und Zeitaufwand (für jeden Genotyp sicher mindestens 3 Monate) bleibt auch die Aussagekraft eines solchen Ansatzes begrenzt, da während der zeitaufwendigen Isolation der Thylakoide die Zx Umwandlung unkontrolliert fortschreiten würde und so die Ergebnisse bei kurzen Zeitabständen (im Minutenbereich) – die für die Bestimmung von schnellen Änderungen in der Zx Bildung und Epoxidation nötig sind – sehr schwer interpretierbar wären. Die Analyse der Pigmentzusammensetzung ganzer Blätter liefert somit die zuverlässigsten Ergebnisse und die dadurch bestimmten Kinetiken der Zx Dynamik liefern trotz der ausgeführten Unsicherheiten insgesamt eine gute Korrelation der Zx Dynamik mit der Dynamik von q_Z .

Ein weiterer kritischer Punkt bei der Interpretation von q_Z war die Tatsache, dass in den beiden Mutanten *npq1* und *npq4* eine unerwartete NPQ Dynamik beobachtet wurde (Abb. 3.21). So war das Auftreten einer langsamen Phase der NPQ Induktion in Abwesenheit von Zx (*npq1*) und das Auftreten einer zusätzlichen Phase der NPQ Relaxation in Abwesenheit von PsbS (*npq4*) nicht zu erwarten. Allerdings zeichnete sich die NPQ Induktion in *npq1* und *npq4* durch eine deutlich langsamere Induktionskinetik aus (Anstiegszeit *npq1*: 1600 s; *npq4*: 2600 s) im Vergleich mit den anderen Genotypen (Anstiegszeiten von 570-980 s). Ähnliches galt zusätzlich auch für die Relaxation dieser Phasen. Diese Auffälligkeiten korrelierten weiterhin mit einem in *npq1* und *npq4* zu beobachtenden erhöhten Anteil an q_l (Tab. 3.6), sodass davon ausgegangen werden kann, dass in diesen beiden Mutanten verstärkt photoinhibitorische Prozesse induziert werden. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, dass speziell für diese beiden Mutanten unter Lichtstress auch eine erhöhte Bildung von ROS im Vergleich mit dem WT nachgewiesen wurde (Havaux und Niyogi, 1999).

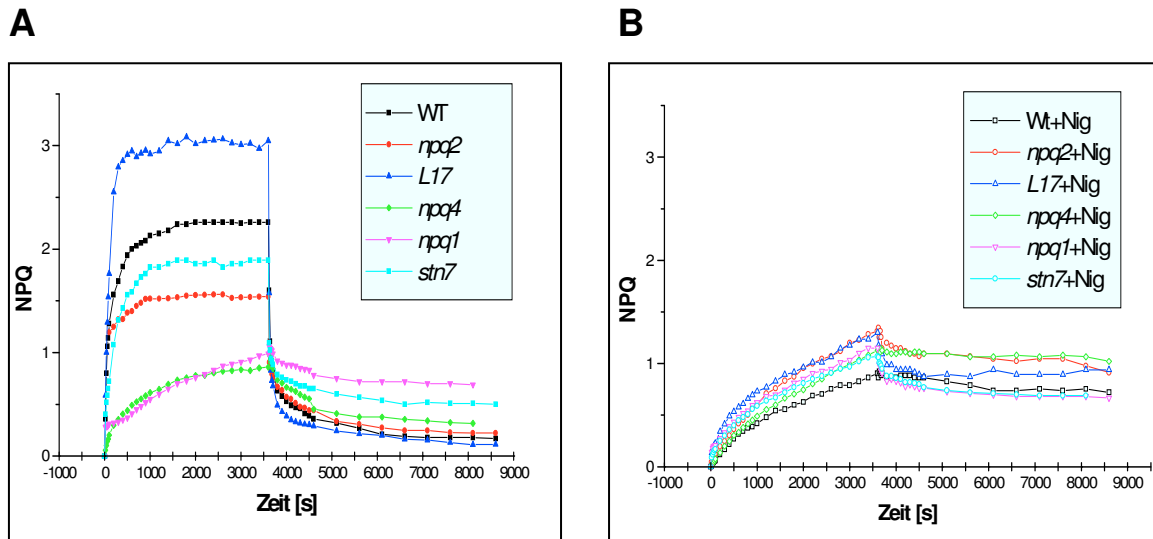


Abbildung 4.1: NPQ Dynamik in Gegenwart des Entkopplers Nigericin. Blätter der verschiedenen Pflanzen wurden entweder mit Resuspensionspuffer (A) oder mit 50 µM Nigericin (gelöst in Resuspensionspuffer) (B) vakuuminfiltriert. Die Induktion bzw. Relaxation des NPQ wurde während einer 60minütigen Belichtung mit einer Intensität von 900 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ bzw. einer anschließenden 60 minütigen Dunkelphase gemessen. Gezeigt werden die Mittelwerte von 2-3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

Obgleich qZ nicht direkt vom pH abhängig ist, da qZ nach Abbau des pH-Gradienten aufrechterhalten bleibt, wird zumindest die Induktion dieser Phase (bedingt durch die pH-Abhängigkeit der Zx Bildung) vom pH kontrolliert. In einem Kontrollexperiment (Abb. 4.1) wurde daher in Gegenwart des Entkopplers Nigericin (nach Vakuuminfiltration der Blätter) geprüft, inwieweit die NPQ Induktion generell vom pH-Gradienten abhängt.

Es ist gut erkennbar, dass in Gegenwart von Nigericin die NPQ Induktion stark verlangsamt wird und unabhängig vom Genotyp eine ähnliche Kinetik zu beobachten ist. Zudem ist das induzierte NPQ in allen Fällen nicht oder nur sehr langsam reversibel. Vergleicht man die beiden Kurven des WT, so wird deutlich, dass durch Nigericin offensichtlich beide Phasen der NPQ Induktion unterdrückt werden. Gleiches gilt für die Mutanten *L17*, *stn7* und *npq2*. In *npq1* und *npq4* sind die schnellen Anteile der NPQ Induktion unterdrückt, jedoch stimmen die Kinetiken der in diesen beiden Mutanten beobachteten langsamen Anteile der NPQ Induktion unter Kontrollbedingungen (Abb. 4.1 A) recht gut mit der zu beobachtenden Kinetik der NPQ Induktion in Gegenwart von Nigericin (Abb. 4.1 B) überein. Die fehlende schnelle Relaxation des NPQ in Gegenwart des Entkopplers in allen Genotypen spricht dafür, dass in Abwesenheit eines pH-Gradienten überwiegend photoinhibitorische Prozesse induziert werden. Dieses Experiment bestätigt somit nicht nur die pH-Abhängigkeit der Induktion von qE und qZ, sondern unterstützt auch die Annahme, dass die in *npq1* und *npq4* langsam induzierten NPQ-Zustände photoinhibitorischen Charakter aufweisen.

4.2.3.3 Die q_l Komponente des NPQ

Die nicht oder nur sehr langsam (Lebenszeit > 1 h) relaxierenden Anteile des NPQ lassen sich eindeutig photoinhibitorischen Prozessen und damit q_l zuordnen. Die in den meisten durchgeführten Experimenten verwendete Belichtungsintensität von $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ induzierte im WT bei kürzeren Belichtungszeiten (5 min) nahezu gar kein q_l während bei längeren Belichtungszeiten (bis zu 90 min) ein geringer Anstieg des q_l zu beobachten war. Dies unterstreicht, dass die gewählten experimentellen Bedingungen optimal waren, um ein maximales q_E und q_Z zu induzieren, ohne gleichzeitig in größerem Maße photo-oxidative Schädigungsprozesse zu verursachen.

Das im Vergleich mit dem WT verminderte q_l in den Mutanten *L17* und *npq2* bei gleichzeitig erhöhtem q_l in den Mutanten *npq2* und *npq1* unterstreicht die generelle photoprotektive Funktion von PsbS und Zx. Während die photoprotektive Wirkung von PsbS wahrscheinlich ausschließlich in der essentiellen Funktion für q_E begründet liegt, wurde für Zx nachgewiesen, dass dieses Xanthophyll eine von q_E unabhängige photoprotektive Wirkung besitzt (Havaux und Niyogi, 1999). In der Literatur finden sich zudem Hinweise, dass Zx möglicherweise eine Funktion im q_l besitzt. So wurde anhand der kinetischen Korrelation von q_l Relaxation und Zx Epoxidation nach lang anhaltendem Lichtstress (Leitsch et al., 1994; Jahns und Miesch, 1995) spekuliert, dass Zx direkt oder indirekt an den photoinhibitorischen Prozessen im Reaktionszentrum von PS II beteiligt sein könnte. Eine solche Funktion könnte auch erklären, warum unter extremen Lichtstressbedingungen – wie z.B. bei immergrünen Pflanzen während des Winters – die häufig zu beobachtende, lang anhaltende (d.h. über mehrere Tage und Nächte) Inaktivierung von PS II mit der fast vollständigen Inaktivierung der Zx Epoxidation einhergeht (Adams und Demmig-Adams, 1995; Ebbert et al., 2005; Zarter et al., 2006). Der molekulare Mechanismus einer solchen Funktion von Zx im q_l (und damit möglicherweise im Reaktionszentrum) ist jedoch völlig unklar. Diese Beobachtungen deuten jedoch darauf hin, dass Zx anscheinend an allen NPQ Prozessen (q_E , q_Z und q_l) entweder direkt oder indirekt beteiligt ist.

4.2.3.4 Modell für die NPQ Prozesse in PS II

Basierend auf den PAM-Messungen konnten anhand der kinetischen Analysen der NPQ Induktion und Relaxation in dieser Arbeit vier verschiedene NPQ Komponenten identifiziert und kinetisch unterschieden werden: $q_{E_{pH}}$, q_{E_Z} , q_Z und q_l (Abb. 4.2). Zusammenfassend sind diese Komponenten folgendermaßen charakterisiert:

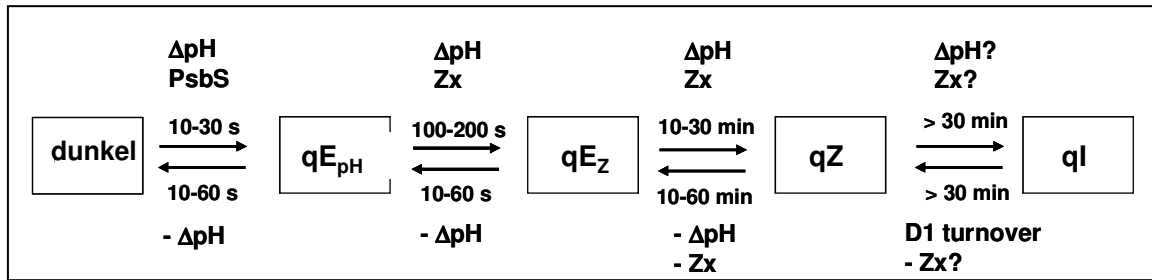


Abbildung 4.2: Modell für die unterschiedlichen NPQ Prozesse. Ausgehend vom dunkeladaptierten Zustand sind die verschiedenen induzierbaren NPQ-Zustände dargestellt, jeweils mit den dazugehörigen Induktions- und Relaxationskinetiken sowie den Abhängigkeiten vom ΔpH , PsbS und Zx. Weitere Einzelheiten im Text.

1. qE_{pH} ist ein Zx-unabhängiger qE Mechanismus, der in 10-30 s ausgebildet wird. Die Induktion des qE_{pH} Prozess ist strikt abhängig vom ΔpH und dem PsbS-Protein. Die Relaxation (in 10-60 s) erfolgt in Abhängigkeit vom Abbau des ΔpH . qE_{pH} kann eindeutig dem Löschungsort Q1 zugeordnet werden und ist somit in den von PS II abgelösten und oligomeren LHC II-Komplexen lokalisiert.
2. qE_Z ist ein Zx-abhängiger Mechanismus, der in 100-200 s gebildet wird. Die Induktion von qE_Z hängt wie qE_{pH} vom ΔpH und dem PsbS-Protein ab, bedarf aber zusätzlich noch der Bildung von Zx. Auch die Relaxation (in 10-60 s) von qE_Z erfolgt in Abhängigkeit vom Abbau des ΔpH . qE_Z ist ebenfalls in Q1 lokalisiert.
3. qZ ist ein weiterer Zx-abhängiger Mechanismus, der in 10-30 min ausgebildet wird. Die Induktion von qZ ist abhängig von der Zx Bildung (und darüberhinaus indirekt auch vom ΔpH). Die Relaxation (in etwa 10-60 min) von qZ hängt von der Zx Epoxidation ab. qZ kann dem Löschungsort Q2 zugeordnet werden und ist somit in den mit PS II assoziierten Antennenproteinen lokalisiert.
4. ql wird nur bei lang anhaltendem (> 30 min) Lichtstress gebildet. Das Ausmaß von ql hängt nicht nur von der Belichtungszeit, sondern besonders auch von der Belichtungsintensität ab. Die Ausbildung von ql geht in der Regel mit der Inaktivierung des PS II-Reaktionszentrums und der Schädigung des D1 Proteins einher. Die Relaxation des ql ist deswegen abhängig von der Reparatur des D1-Proteins und damit dem D1 turnover. ql ist im Reaktionszentrum von PS II lokalisiert.
5. Der qT Mechanismus trägt bei sättigenden Lichtintensitäten nicht zum NPQ bei.

Im zeitlichen Verlauf der Induktion der einzelnen NPQ Prozesse beginnt somit die Energiedissipation zunächst in den peripheren Antennen des PS II und setzt sich anschließend weiter in Richtung Reaktionszentrum fort. Das Carotinoid Zx scheint dabei eine zentrale Rolle zu spielen. Es ist denkbar, dass die Umwandlung von Vx zu Zx zur

Umorganisation der Antenne des PS II ebenso beiträgt wie das PsbS-Protein. Über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Energielöschung kann anhand der vorliegenden Untersuchungen keine genaue Aussage getroffen werden. Aufgrund der Lokalisation des qE in abgelösten LHC II-Komplexen (Q1) ist denkbar, dass qE auf Chl-Chl (Miloslavina et al., 2008) oder Chl-Car (Pascal et al., 2005; Ruban et al., 2007) Wechselwirkungen zurückzuführen ist, die durch Konformationsänderungen im LHC II induziert werden. Ein solcher, über die Konformation von LHC II kontrollierter Mechanismus könnte beide identifizierten Komponenten des qE, qE_{pH} und qE_Z , erklären, wobei der pH und das PsbS-Protein für die Konformationsänderungen essentiell wären, diese aber zusätzlich durch Zx modulierbar wären. Die Zx-abhängige Energielöschung (qZ) in der PS II-Antenne (Q2) dagegen könnte mechanistisch mit der Bildung eines Zx Kation-Radikals erklärt werden, wie für die minoren Antennenproteine vorgeschlagen (Holt et al., 2005; Ahn et al., 2008; Avenson et al., 2008).

Neben der Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen, bleibt weiter zu klären inwieweit der qZ Mechanismus möglicherweise einen Übergangszustand vom qE zum qI Mechanismus darstellen könnte. Ein Hinweis darauf könnte die beobachtete Verlangsamung der qZ Relaxation bei höheren Lichtintensitäten (Abb. 3.23) sein. Dafür würde zudem auch die in der Literatur beschriebene stufenweise Herabregulierung der Aktivität der Zx Epoxidase mit steigendem Lichtstress sprechen, die einhergeht mit einer erhöhten Photoinhibition von PS II (Reinhold et al., 2008).

Aus physiologischer Sicht ist die mit der Ablösung der LHC II-Komplexe (= Induktion von qE bzw. Q1) verbundene Verkleinerung der funktionellen PS II-Antenne, nicht nur die einfachste, effizienteste und über den pH (und PsbS) am schnellsten regulierbare Anpassung an sättigende Lichtbedingungen, sondern entspricht auch exakt dem gleichen Prinzip das in Pflanzen bei langfristiger Akklimatisierung an unterschiedliche Lichtintensitäten verfolgt wird, nämlich der Veränderung der Antennengröße des PS II über die Zahl der pro Reaktionszentrum gebundenen LHC II-Trimere. Es wäre daher wichtig, in Folgeexperimenten Pflanzen zu untersuchen, die unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogen wurden und damit von vornherein unterschiedliche Antennengrößen aufweisen.

5 Zusammenfassung

Pflanzen sind an ihren jeweiligen Standorten unterschiedlichen Lichtintensitäten ausgesetzt, die auch innerhalb von Minuten um mehr als zwei Größenordnungen variieren können. Um eine effiziente Photosynthese bei niedrigen Lichtintensitäten zu gewährleisten, gleichzeitig aber bei hohen Lichtintensitäten mögliche Schädigungen durch die lichtinduzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu vermeiden, verfügen Pflanzen über effiziente photoprotektive Regulations- und Schutzmechanismen. Die Deaktivierung von angeregten Chlorophyllzuständen ($^3\text{Chl}^*$ und $^1\text{Chl}^*$) in den Antennenproteinen von Photosystem II (PS II) stellt dabei einen der wichtigsten Mechanismen dar, um die Bildung von ROS bei hohen Lichtintensitäten zu minimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle einzelner Carotinoide bei der Deaktivierung von $^3\text{Chl}^*$ in LHC II, der Hauptkomponente der PS II-Antennenproteine, unter *in vitro* Bedingungen mittels EPR Spektroskopie an LHC II-Trimerkomplexen untersucht, die aus verschiedenen Carotinoidmutanten aus *Arabidopsis thaliana* isoliert worden waren. Dabei konnte gezeigt werden, dass anscheinend keines der verschiedenen Carotinoide, die an LHC II gebunden sein können, für die $^3\text{Chl}^*$ Deaktivierung essentiell ist, sondern dass unterschiedliche Carotinoide sich offensichtlich funktionell ersetzen können. Weiterhin konnte aus den Messungen geschlossen werden, dass von den vier Carotinoid-Bindestellen im LHC II (die als V1, N1, L1 und L2 bezeichnet werden) die Bindestellen V1 und N1 für diese Funktion entbehrlich sind, und die $^3\text{Chl}^*$ Deaktivierung wohl ausschließlich an den zentralen Bindestellen L1 und L2, entweder durch Lutein (wie im nativen Komplex), aber auch durch Violaxanthin (Vx) und Zeaxanthin (Zx) in den entsprechenden Mutanten, erfolgt.

Die Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$, auch nicht-photochemische Löschung (NPQ) der Anregungsenergie genannt, wurde anhand von Analysen der Chl-Fluoreszenz mit verschiedenen spektroskopischen Methoden unter *in vivo* Bedingungen untersucht. Zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzabklingkinetik an intakten *Arabidopsis* Blättern zeigten, dass im Starklicht zwei unabhängige Löschungsorte (Q1 und Q2) aktiviert werden, die zum NPQ beitragen. Q1 beruht auf einer pH- und PsbS-abhängigen Ablösung und Oligomerisierung von LHC II-Komplexen, was zu einer Verkleinerung der funktionellen PS II-Antenne um bis zu 50% und zu einer effizienten Löschung der Anregungsenergie in den abgelösten LHC II-Oligomeren führt. Q2 beruht auf einer Zx-abhängigen Löschung der Anregungsenergie in der verbleibenden PS II-Antenne. Zusätzlich, unter den gleichen experimentellen Bedingungen, durchgeführte wellenlängenspezifischen Fluoreszenzmessungen und Messungen mit dem PAM Fluorometer konnten die beiden Löschungsorte nicht nur eindeutig bestätigen, sondern

zugleich die zeitliche Dynamik der Bildung (im Licht) und Relaxation (im Dunkel) von Q1 und Q2 aufzeigen. Demnach wird Q1 unter Belichtung in 1-2 min aktiviert und ebenso schnell im Dunkel wieder deaktiviert, was mit dem Aufbau (für die Bildung) und dem Abbau (für die Relaxation) des pH-Gradienten über der Thylakoidmembran korrelierte. Q2 dagegen wird auf deutlich langsamerer Zeitskala (Aktivierung: 15-30 min; Deaktivierung: 15-60 min), parallel zur Bildung und Rückumwandlung von Zx, geschaltet. Anhand dieser Daten konnte ein neues Modell für die NPQ Prozesse in *Arabidopsis* aufgestellt werden, das die bisher vorliegenden, und z.T. widersprüchlichen, Daten der Literatur konsistent erklären kann.

5 Summary

At most habitats, plants are exposed to varying light intensities which may change within minutes over more than two orders of magnitude. To allow efficient photosynthesis at low light intensities on the one hand, but to prevent possible damages at high light intensities due to the light-induced formation of reactive oxygen species (ROS) on the other hand, plants have developed efficient photoprotective regulation and protective mechanisms. The deactivation of excited chlorophyll (Chl) states ($^3\text{Chl}^*$ and $^1\text{Chl}^*$) in the antenna proteins of photosystem II (PS II) represents one of the most important mechanisms to minimize the formation of ROS at high light intensities.

In this work, the role of single carotenoids in the deactivation of $^3\text{Chl}^*$ in LHC II, the major component of the PS II antenna proteins, has been investigated under *in vivo* conditions by applying EPR spectroscopy to trimeric LHC II complexes, which had been isolated from different carotenoid mutants from *Arabidopsis thaliana*. It was shown that none of the different carotenoids was specifically required for the deactivation of $^3\text{Chl}^*$. Obviously, the different carotenoids can functionally replace each other with respect to $^3\text{Chl}^*$ deactivation. It could be furthermore concluded from these measurements that among the four carotenoid binding sites in LHC II (named V1, N1, L1 and L2), the binding sites V1 and N1 are obviously dispensable for this function and that the deactivation of $^3\text{Chl}^*$ seems to be related exclusively to the action of either lutein (as in case of native LHC II) or violaxanthin or zeaxanthin (Zx) (in case of respective mutants) at the two central binding sites L1 and L2.

The deactivation of $^1\text{Chl}^*$, also termed non-photochemical quenching (NPQ) of excitation energy, was investigated under *in vivo* conditions by means of Chl fluorescence analyses based on different spectroscopic methods. Time resolved measurements of fluorescence decay kinetics showed that two independent quenching sites (Q1 and Q2) contribute to the high light-induced NPQ. Q1 is based on the pH- and PsbS-dependent detachment and oligomerization of LHC II complexes, resulting in a reduction of the functional PS II antenna size of up to 50 % and an efficient quenching of the excitation energy in the detached LHC II oligomers. Q2 is based on a Zx-dependent quenching of excitation energy in the remaining PS II antenna. Further wavelength specific fluorescence analyses and measurements with a PAM fluorometer performed under the same experimental conditions did not only confirm these two independent quenching sites but provided also information about the kinetics of the formation (in the light) and relaxation (in the dark) of Q1 and Q2. According to these measurements, Q1 is activated in the light within 1-2 min and deactivated in the dark with similar kinetics, in correlation with the build-up (for the formation) and breakdown (for the relaxation) of the transthylakoid pH gradient. By

contrast, Q2 is switched on a longer time scale (activation: 15-30 min; deactivation: 15-60 min), in parallel with the formation and reconversion of Zx. Based on these data, a new model for the NPQ processes in *Arabidopsis* has been proposed, which can explain consistently the present, and in parts contradictory, data on NPQ in the literature.

6 Literatur

Adams, W.W., und Demmig-Adams, B. (1995): The xanthophyll cycle and sustained thermal energy dissipation activity in *Vinca minor* and *Eunymus kiautschovicus* in winter. *Plant Cell Environment*, 18. 117-127

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.

Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C. Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Dean, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmid, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., Ecker, J.R. (2003): Genom-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* Vol 301, 653-657.

Andrews, J.R., Fryer, M.J., and Baker, N.R. (1995): Consequences of LHC II deficiency for photosynthetic regulation in chlorina mutants of barley. *Photosynth. Res.* 44: 81-91.

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

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

Asada, K. (1994): Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker, N.R., Bowyer, J.R. (Hrsg.), *Photoinhibition of Photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the Field*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, S. 129-142.

Avenson, T.J., Ahn, T.K., Zigmantas, D., Niyogi, K.K., Li, Z., Ballottari, M., Bassi, R., Fleming, G.R. (2008): Zeaxanthin radical cation formation in minor light-harvesting complexes of higher plant antenna, *J. Biol. Chem.* 283 3550-3558.

Avenson TJ, Ahn TK, Niyogi KK, Ballottari M, Bassi R, Fleming GR (2009): Lutein can act as a switchable charge-transfer quencher in the CP26 light-harvesting complex. *J Biol Chem* 284: 2830-283

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.

Bassi, R., Caffarri, S. (2000): Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosyn. Res.* 64, pp. 243-256.

Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P., Marquardt, J. (1993): Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 212, pp. 297-303.

Becker, W. (2005): The bh TCSPC Handbook., Becker & Hickl GmbH, Berlin.

- Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., Rochaix, J.D. (2005):** State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433:892–895
- Bennett, J., Steinback, K.E., Arntzen, C.J. (1980):** Chloroplast phosphoproteins: regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5253-5257.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2003):** Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426, 630-635.
- Betterle, N., Ballottari, M., Zorzan, S., de Bianchi, S., Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2009)** Light-induced Dissociation of an Antenna Hetero-oligomer Is Needed for Non-photochemical Quenching Induction. *J Biol Chem* **284**: 15255-15266
- Bevan, M. (1984):** Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* Vol 12, No. 22, 8711-8721.
- Boulcombe, D.C., Saunders, G.R., Bevan, M.W., Mayo, A. M., Harrison, B.D., (1986):** Expression of biologically active viral satellite RNA from the nuclear genome of transformed plants. *Nature* Vol 321, 446-449.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., Chua, N.-H. (1994):** Cyclic GMP and calcium mediated phytochrome phototransduction. *Cell* 77, 73-81.
- Briantais J-M, Vernotte C, Picaud M, Krause GH (1979):** A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 548: 128-138
- Broess, K., Trinkunas, G., van der Weij-de Wit, C.D., Dekker, J.P., van Hoek, A., van Amerongen, H. (2006):** Excitation energy transfer and charge separation in photosystem II membranes revisited. *Biophys J* 91:3776–3786
- Butler WL, Kitajima M (1975):** Energy transfer between photosystem II and photosystem I in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 396: 72-85
- Caffarri, S., Croce, R., Breton, J., Bassi, R. (2001):** The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, No. 38, pp. 35924-35933.
- Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R. (1999b):** The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Letters* 456, pp. 1-6.
- Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999a):** Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No. 42, pp. 29613-29623.
- Crofts, A.R. and Yerkes, C.T. (1994):** A molecular mechanism for qE-quenching. *FEBS Lett.* 352: 265- 270. 57.
- Dall'Osto, L., Caffarri, S., and Bassi, R. (2005):** A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell*. 17: 1217-1232.

- Dall'Osto, L., Lico, C., Alric, J., Giuliano, G., Havaux, M., and Bassi, R. (2006):** Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light *BMC Plant Biology*, 6:32
- de Bianchi, S., Dall'Osto, L., Tognon, G., Morosinotto, T., and Bassi, R. (2008):** Minor antenna proteins CP24 and CP26 affect the interactions between photosystem II subunits and the electron transport rate in grana membranes of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 20: 1012-1028.
- Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005):** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. et Biophys. Acta* 1706, pp. 12-39.
- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C (1987):** Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant Physiol* 84: 218-224
- Demmig-Adams B, Adams WW (1992):** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 599-626
- Demmig-Adams, B. (1990):** Carotenoid and photoprotection in plants: A role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, pp. 1-24.
- Ebbert, V., Adams III, W.W., Mattoo, A.K., Sokolenko, A. and Demmig-Adams, B.(2005):** Upregulation 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.
- Eskling M.; Arvidsson, P.-O.; Akerlund, H.-E. (1997):** The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* 100, 806-816.
- Färber, A., Young, A.J., Ruban, A.V., Horton, P., Jahns, P. (1997):** Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol.* 115, pp. 1609-1618.
- Finazzi, G., Johnson, G.N., Dall'Osto, L., Joliot, P., Wollman, F.A., and Bassi, R. (2004):** A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 12375-12380.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, D.J. (1994):** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92, 696-717.
- Frank, H. A., Bautista, J. A., Josue, J. S., and Young, A. J. (2000):** Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin, *Biochemistry*, Vol. 39, pp. 2831-2837.
- Fryer, M.J. (1992):** The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15, 381-392.
- Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Andersson, G., Renger, G. (1995):** The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* 270, pp. 30141-30147.
- Ganeteg, U., Klimmek, F., Jansson S. (2004):** Lhca5 an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant Mol Biol.* Mar 54 (5):641-51

Ganeteg, U., Kühlheim, C., Andersson, J., Jansson, S. (2004): Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness? *Plant Physiol.*, Vol. 134, pp. 502-509.

Genty B, Wonders J, Baker NR (1990): Non-photochemical quenching of F_o in leaves is emission wavelength dependent: consequences for quenching analysis and its interpretation. *Photosynth Res* 26: 133-139

Gilmore, A.M. und Yamamoto, H.Y. (1991): Resolution of Lutein and Zeaxanthin using a non-encapped lightly carbon loaded C18 high-performance liquid chromatographic column. *J. Chromatogr.* 543, pp. 137-145.

Gilmore, A.M., Hazlett, T.L., Debrunner, P.G., and Govindjee (1996): Photosystem II chlorophyll *a* fluorescence lifetimes and intensity are independent of the antenna size differences between barley wild-type and chlorina mutants: Photochemical quenching and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching of fluorescence. *Photosynth. Res.* 48: 171-187 .

Golan T, Li X-P, Müller-Moule P, Niyogi KK (2004): Using mutants to understand light stress acclimation in plants. In GC Papageorgiou, Govindjee, eds, Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Springer, Dordrecht, pp 525-554

Graßes, T., Pesaresi, P., Schiavon, F., Varotto, C., Salamini, F., Jahns, P., and Leister, D. (2002): The role of Δ pH-dependent dissipation of excitation energy in protecting photosystem II against light-induced damage in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 41-49.

Graßes, T.W. (2005): Untersuchungen zur Schutzfunktion von α -Tocopherol und Δ pH-abhängiger Energielöschung bei photooxidativem Stress in höheren Pflanzen, Dissertation

Grinvald, A. and Steinberg, I.Z. (1974): On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal. Biochem.* 59: 583-598.

Haber, F. and Weiss, J. (1934): The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Roy. Soc.*, 147, 332-351

Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E.J., Jansson, S., Barber, J. (1997): Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur. J. Biochem.* 243, pp. 422–429.

Havaux M, Dall'Osto L, 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(1[C][W]). *Plant Physiol* **145**: 1506-1520

Havaux, M., Dall'Osto, L. Cuine, S., Giuliano, G. and Bassi, R. (2004): The Effect of zeaxanthin as the only xanthophyll on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, No. 14, pp. 13878–13888.

Havaux, M., Niyogi, K.K. (1999): the violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, pp. 8762-8767.

Havaux, M., Ksas, B., Szewczyk, A., Rumeau, D., Franck, F., Caffarri S. and Triantaphylidès C. (2009): Vitamin B6 deficient plants display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress *BMC Plant Biology*, 9:130

- Hieber, A.D., Bugos, R.C., Yamamoto, H.Y. (2000):** Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 84–91.
- Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H. (2000):** Carotenoid binding sites in LHCIIb. Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267, pp. 616-624.
- Holt, N., Fleming, G.R., Niyogi, K.K. (2004):** Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry*, Vol. 43, No. 26, pp. 8281-8289.
- Holt, N.E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.-P., Niyogi, K.K., Fleming, G.R. (2005):** Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science*, Vol. 307, pp. 433-436.
- Holzwarth, A.R. (1995):** Time-resolved fluorescence spectroscopy. In: (Sauer, K., Ed.) *Methods in Enzymology*. Vol.246 *Biochemical Spectroscopy*. Academic Press, San Diego, pp. 334-362.
- Holzwarth, A.R. (1996):** Data analysis of time-resolved measurements. In: (Amesz, J. and Hoff, A.J., Eds.) *Biophysical Techniques in Photosynthesis*. *Advances in Photosynthesis Research*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 75-92.
- Holzwarth, A.R. (2008):** Ultrafast primary reactions in the photosystems of oxygen evolving organisms. In: (Braun, M., Gilch, P., and Zinth, W., Eds.) *Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering: Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine*. Springer, Dordrecht, pp. 141-164.
- Holzwarth, A.R., Miloslavina, Y., Nilkens, M., Jahns, P., (2009):** Identification of two quenching sites active in the regulation of photosynthetic light-harvesting studied by time-resolved fluorescence. *Chem. Phys. Lett.* In press.
- Holzwarth, A.R., Müller, M.G., Niklas, J., and Lubitz, W. (2005):** Charge recombination fluorescence in photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Phys. Chem. B*. 109: 5903-5911.
- Holzwarth, A.R., Müller, M.G., Niklas, J., and Lubitz, W. (2006a):** Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 2. Mutations around the P700 reaction center chlorophylls provide new insight into the nature of the primary electron donor. *Biophys. J.* 90: 552-565.
- Holzwarth, A.R., Müller, M.G., Reus, M., Nowaczyk, M., Sander, J., and Rögner, M. (2006b):** Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: Pheophytin is the primary electron acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103: 6895-6900.
- Holzwarth, A.R., Wendler, J., and Haehnel, W. (1985):** Time-resolved picosecond fluorescence spectra of the antenna chlorophylls in *Chlorella vulgaris*. Resolution of photosystem I fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*. 807: 155-167.
- Horten, P., Wentworth, M., Ruban, A. (2005):** Control of light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Letters* 579, pp. 4201-4206.
- Horton, P. and Ruban, A.V. (1992):** Regulation of photosystem II. *Photosynth. Res.* 34: 375-385.

- Horton, P. and Ruban, A.V. (1999):** Regulation of the structure and function of the light harvesting complexes of photosystem II by the Xanthophyll cycle. In: (Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G., and Cogdell, R.J., Eds.) *Advances in Photosynthesis Vol.8: The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 271-291.
- Horton, P. and Ruban, A.V. (2005):** Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: Photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* 56: 365-373.
- Horton, P., Ruban, A. V., 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., Rees, D., Pascal, A.A., Noctor, G., and Young, A.J. (1991):** Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Lett.* 292: 1-4.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K., Havaux, M. (2003):** Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4921-4926.
- Ihalainen, J.A., Croce, R., Morosinotto, T., van Stokkum, I.H.M., Bassi, R., Dekker, J.P., and van Grondelle, R. (2005a):** Excitation decay pathways of Lhca proteins: A time-resolved fluorescence study. *J. Phys. Chem. B.* 109: 21150-21158.
- Ihalainen, J.A., van Stokkum, I.H.M., Gibasiewicz, K., Germano, M., van Grondelle, R., and Dekker, J.P. (2005b):** Kinetics of excitation trapping in intact photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1706: 267-275.
- Ivanov, A.G., Hurry, V., Sane, P.V., Öquist, G., and Hüner, N.P.A. (2008):** Reaction centre quenching of excess light energy and photoprotection of photosystem II. *Journal of Plant Biology.* 51: 85-96.
- Jahns P, Latowski D, 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. (1995):** The xanthophylls cycle in intermittent light grown pea plants. Possible functions of chlorophyll a/b binding proteins. *Plant Physiol.* 108, pp. 149-156.
- Jahns, P. and Miehe, B. (1996):** Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198, pp. 202–210.
- Jahns, P., Graf, M., Munekage, Y., and Shikanai, T. (2002):** Single point mutation in the Rieske iron- sulfur subunit of cytochrome *b6/f* leads to an altered pH dependence of plastoquinol oxidation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 519: 99-102 .
- Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, H., Hobe, S. (2001):** De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, No. 25, pp. 22154-22159.
- Jansson, S. (1999):** A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 4, No. 6, pp. 236-240.
- Jansson, S., 1994:** The light harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1184 1-19

Johnson, M.P., Havaux, M., Triantaphyllides, C., Ksas, B., Pascal, A.A., Robert, B., Davison, P.A., Ruban, A.V., Horton, P. (2007): Elevated zeaxanthin bound to oligomeric LHCII enhances the resistance of Arabidopsis to photooxidative stress by a lipidprotective, antioxidant mechanism, *J. Biol. Chem.* 282 22605–22618.

Johnson MP, Davison PA, Ruban AV, Horton P (2008): The xanthophyll cycle pool size controls the kinetics of non-photochemical quenching in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* 582: 259-263

Johnson MP, Perez-Bueno ML, Zia A, Horton P, Ruban AV (2009): The Zeaxanthin-Independent and Zeaxanthin-Dependent qE Components of Nonphotochemical Quenching Involve Common Conformational Changes within the Photosystem II Antenna in Arabidopsis. *Plant Physiol* 149: 1061-1075

Kalituho, L., Rech, J., and Jahns, P. (2007): The roles of specific xanthophylls in light utilization. *Planta.* 225: 423-439.

Krause GH, Briantais J-M, Vernotte C (1983): Characterization of chlorophyll fluorescence quenching in chloroplasts by fluorescence spectroscopy at 77K. 1. Delta-pH-dependent quenching. *Biochim Biophys Acta* 723: 169-175

Krause GH, Vernotte C, Briantais J-M (1982) Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim Biophys Acta* 679: 116-124

Krause, G.H. (1988): Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant.* 74: 566-574.

Krause, G.H. and Jahns, P. (2004): Nonphotochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function. In: (Papageorgiou, G.C. and Govindjee, Eds.) *Advances in Photosynthesis and Respiration Vol.19: Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, pp. 463-495.

Krause, G.H. und Jahns, P. (2003): Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. In: Green, B.R., Parson, W.W. (Eds.) *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. Kluwer, Dordrecht, pp. 373-399.

Kyle DJ, Arntzen CJ, Franck F, Inoue Y (1983): Light-induced quenching of photosystem II fluorescence at 77K. *Photochem Photobiol* 38: 609-614

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, pp. 680-685

Larsson, U. K., Anderson, J. M., Andersson, B. (1987): Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHCII) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. *Biochim. Biophys. Acta* 894, 69-75

Leitsch, J., Schnettger, B., Critchley, C., Krause, G.H. (1994): Two mechanisms of recovery from photoinhibition in vivo: Reactivation of photosystem II related and unrelated to D1 protein turnover. *Planta* 194, 15-21.

Leutweiler, L.S., Meyerowitz, E.M., and Tobin, E.M., (1986): Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein genes in Arabidopsis thaliana, *Nucleic Acid Res.* 14, 4051-4064

Li X-P, Müller-Moule P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002): PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 15222-15227

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, pp. 391-395.

Li, X.-P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., and Niyogi, K.K. (2004): Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J. Biol. Chem.* 279: 22866-22874 .

Li, Z., Ahn, T. K., Avenson, T. J., Ballottari, M., Cruz, J. A., Kramer, D. M., Bassi, R., Fleming, G. R., Keasling, J. D., and Niyogi K. K. (2009): Lutein Accumulation in the Absence of Zeaxanthin Restores Nonphotochemical Quenching in the Arabidopsis thaliana npq1 Mutant. *PLANT CELL*, 21(6): 1798 - 1812.

Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, Z., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004): Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, Vol. 428, pp. 287-291.

Lunde, C., Jensen, P.E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H.V. (2000): The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* 408, 613-615.

Mawson BT, Cummins WR (1986): The kinetics of invivo state transitions in mesophyll and guard-cell chloroplasts monitored by 77k fluorescence emission spectra. *Plant Physiol* 82: 873-879

McGrath, J.M., et al. (1992): Sequence of the fourth and fifth photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein genes in Arabidopsis thaliana and evidence for the presence of a full complement of extended CAB gene family, *Plant Mol.Biol.* 19, 725-733

McTavish H (1988): A demonstration of photosynthetic state transitions in nature. *Photosynth*

Mehler, A.H. (1951): Studies on the reaction of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 65-77.

Miloslavina Y, Grouneva I, Lambrev PH, Lepetit B, Goss R, Wilhelm C, Holzwarth AR (2009): Ultrafast fluorescence study on the location and mechanism of non-photochemical quenching in the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Cyclotella meneghiniana*. *Biochim Biophys Acta*. PMID: 19486881

Miloslavina, Y., Szczepaniak, M., Müller, M.G., Sander, J., Nowaczyk, M., Rögner, M., and Holzwarth, A.R. (2006): Charge separation kinetics in intact photosystem II core particles is trap-limited. A picosecond fluorescence study. *Biochemistry.* 45: 2436-2442. References 180-184.

Miloslavina, Y., Wehner, A., Wientjes, E., Reus, M., Lambrev, P., Garab, G., Croce, R., and Holzwarth, A.R. (2008): Far-red fluorescence: A direct spectroscopic marker for LHClI oligomers forming in non photochemical quenching . *FEBS Lett.* 582: 3625-3631.

Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2003): Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plantarum* 119, pp. 347-354.

Müller, M.G. (1992): Picosekundenuntersuchungen an Photosyntheseantennen. Schriftenreihe des MPI für Strahlenchemie Nr. 65, ISSN 0932-5131.

Müller, P., Li, X.-P., and Niyogi, K.K. (2001): Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.

Mullineaux, C.W., Pascal, A.A., Horton, P., and Holzwarth, A.R. (1993): Excitation energy quenching in aggregates of the LHC II chlorophyll-protein complex: A time-resolved fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1141: 23-28 .

Nield J., Redding K. & Hippler M. (2004): Remodeling of light harvesting protein complexes in *Chlamydomonas* in response to environmental changes. *Eukaryotic Cell* 3:1370-1380

Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A.R., and Jahns, P.,(2009): Resolution and Characterisation of Different Components of Non-photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence Generated under Steady State Conditions in *Arabidopsis* unpublished

Nilsson, A., Stys, D., Drakenberg, T., Spangfort, M.D., Forsén, S., Allen, J.F. (1997): Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* 272, 18350-18357.

Niyogi KK (2000): Safety valves for photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 455- 460

Niyogi KK, Li X-P, Rosenberg V, Jung H-S (2005): Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* 56: 375-382

Niyogi, K.K. (1999): Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*50, pp. 333-359.

Niyogi, K.K., Grossman, A.R., Björkman, O. (1998): Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophylls cycle in the regulation of the photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10, pp. 1121-1134.

Niyogi, K.K., Shih, C., Chow, W.S., Pogson, B.J., DellaPenna, D., and Björkman, O., (2001): Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of Arabidopsis *Photosynthesis Research* Volume 67, Numbers 1-2

O'Connor, D.V. and Phillips, D. (1984): Time-correlated single photon counting, Academic Press, London.

Öquist, G., Huner, N.P.A. (2003): Photosynthesis of overwintering evergreen plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 329–355.

Osmond, C.B. (1994): What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants (N. R. Baker and J. R. Bowyer) pp.1-24, Oxford.

Pascal, A.A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W., Ruban, A. (2005): Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting *Nature* 436, 134-137

Perez-Bueno ML, Johnson MP, Zia A, Ruban AV, Horton P (2008) The Lhcb protein and xanthophyll composition of the light harvesting antenna controls the $[\Delta\text{pH}]$ -dependency of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 582: 1477-1482

Pesaresi, P., Sandona, D., Giuffra, E., Bassi, R. (1997): A single point mutation (E166Q) prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the photosystem II subunit CP29. *FEBS Lett.* 402, 151-156.

Pesaresi, P., Sandonà, D., Giuffra, E., Bassi, R. (1997): A single point mutation (E 166 Q) prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the photosystem II subunit CP29. *FEBS Letters* 402, pp. 151-156.

Peter, G.F., Thornber, J.P. (1991): Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266, pp. 16745-16754.

Pfündel EE (1998): Estimating the contribution of photosystem I to total leaf chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* 56: 185-195

Pfündel, E., Bilger, W. (1994): Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth Res* 42: 89-109

Polle, A. (1997): Defense against photooxidative damage in plants. *Oxidative Stress and molekular Biology of Antioxidant Defense*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 623-666.

Quick WP, Stitt M (1989): An examination of factors contributing to non-photochemical 26 quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim Biophys Acta* 977: 287-296

Remelli, R., Varotto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R. (1999): Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *J. Biol. Chem.* 274, pp. 33510-33521. *Res* 17: 247-254

Reinhold, C., Niczyporuk, S., Beran, K.C., Jahns, P. (2008): Short-term down-regulation of zeaxanthin epoxidation in *Arabidopsis thaliana* in response to photo-oxidative stress conditions, *Biochim. Biophys. Acta* 1777 462-469.

Ruban AV, Horton P (1999) The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. *Plant Physiol* 119: 531-542

Ruban, A.V. and Horton, P. (1992): Mechanism of ΔpH -dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. 1. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1102: 30-38.

Ruban, A.V. and Horton, P. (1994): Spectroscopy of non-photochemical and photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in leaves Evidence for a role of the light harvesting complex of photosystem II in the regulation of energy dissipation. *Photosynth. Res.* 40: 181-190.

Ruban, A.V., Berera, R., Iliaia, C., van Stokkum, I.H.M., Kennis, J.T.M., Pascal, A.A., van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P., and van Grondelle, R. (2007): Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature.* 450: 575-578. 235.

Ruban, A.V., Horton, P. (1995): An investigation of the sustained component of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and leaves of spinach. *Plant Physiol.* 108, 721-726.

Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J., 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, No. 15, pp. 10458-10465.

Ruban, A.V., Walters, R.G., Horton, P. (1992): The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes. Inhibition of Δ pH-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS Letters* Vol. 309, No. 2, pp. 175-179.

Ruban, A.V., Young, A.J., Pascal, A.A., Horton, P. (1994): The effect of the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 104, pp. 227-234.

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986): Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10: 51-62

Siefermann-Harms, D. (1977): The xanthophyll cycle in higher plants, In: T. Tevini, H.K.Lichtenthaler (Eds.), *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*, Springer, Berlin, pp. 218–230.

Siefermann, D., Yamamoto, H.Y. (1975): Properties of NADPH and oxygen-dependent zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts, *Arch. Biochem. Biophys.* 171 70–77.

Siefermann, D., Yamamoto, H.Y. (1975): NADPH and oxygen-dependent epoxidation of zeaxanthin in isolated chloroplasts, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 62 456–461

Slavov, C., Ballottari, M., Morosinotto, T., Bassi, R., and Holzwarth, A.R. (2008): Trap-limited charge separation kinetics in higher plant photosystem I complexes. *Biophys. J.* 94: 3601-3612.

Standfuß, J., van Scheltinga, A.C.T., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005): Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *Embo J.* 24, pp. 919-928.

Storf, S., Jansson, S., and Schmid, V. H. R. (2005): Pigment Binding, Fluorescence Properties, and Oligomerization Behavior of Lhca5, a Novel Light-harvesting Protein. *The Journal of biological chemistry* Vol. 280, no 7, pp. 5163-5168

Taiz, L., Zeiger, E., 2002: *Plant Physiology*

Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K., 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., 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.

Toth, S.Z., Schansker, G., and Strasser, R.J. (2005): In intact leaves, the maximum fluorescence level (FM) is independent of the redox state of the plastoquinone pool: A DCMU-inhibition study. *Biochim. Biophys. Acta.* 1708: 275-282.

Triantaphyllides, C., Krischke, M., Hoebrichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusgem, F., Mueller, M.J. (2008): Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants. *Plant Physiology*, Vol. 148, pp. 960–968

Vasil'ev S, Schrötter T, Bergmann A, Irrgang K-D, Eichler H-J, Renger G (1997): Cryoprotectant-induced quenching of chlorophyll a fluorescence from light-harvesting complex 2 in vitro: Time-resolved fluorescence and steady state spectroscopic studies. *Photosynth* 33: 553-561

Verhoeven, J. T. A., W. Koerselman, and A. F. M. Meuleman. (1996): Nitrogen-or phosphorous-limited growth in herbaceous, wet vegetation: relations with atmospheric inputs and management regimes. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 494-497.

Walters RG, Horton P (1991): Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* 27: 121-133

Walters, R.G., Ruban, A.V., and Horton, P. (1994): Higher plant light-harvesting complexes LHCIIa and LHCIIc are bound by dicyclohexylcarbodiimide during inhibition of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* 226: 1063-1069.

Wehner, A., Storf, S., Jahns, P., Schmid, V.H.R. (2004): De-epoxidation of violaxanthin in light-harvesting complex I proteins, *J. Biol. Chem.* 279 26823–26829

Wehner, A., Grasses, T., and 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.

Weis E, Berry JA (1987): Quantum efficiency of photosystem II in relation to energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 894: 198-208

Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2004): The functional significance of the monomeric and trimeric states of the photosystem II light harvesting complexes. *Biochemistry*, Vol. 43, pp. 501-509.

Wraight, C.A. and Crofts, A.R. (1970): Cellular Biochemistry and Metabolism Energy-dependent quenching of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts . *Eur. J. Biochem.* 17: 319-327.

Yakushevskaya, A.E., Keegstra, W., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Andersson, J., Jansson, S., Ruban, A.V., Horton, P. (2003): The structure of photosystem II in *Arabidopsis*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes, *Biochemistry* 42, pp. 608– 613.

Yamamoto, H.Y., Nakayama, T.O.M. and Chichester, C.O. (1962): Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch biochem Biophys* 97; 168-173

Yamamoto, H.Y., Bassi, R. (1996): Oxygenic photosynthesis: The light reactions (Ort, D.R. And Yocum, C.F., Ed.). *Carotenoids: Lokalisation and function*, 539-563

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 Envir* 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

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ant	Antenne
ABA	Abscisinsäure
AL	aktinisches Licht
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Ax	Antheraxanthin
β -Caro	β -Carotin
CAB	Chlorophyll a/b-bindend
Car	Carotinoide
³ Car*	angeregtes, langlebiges Triplett-Carotinoid
¹ Chl*	angeregtes Singulett-Chlorophyll
³ Chl*	angeregtes, langlebiges Triplett-Chlorophyll
Chl	Chlorophyll
Cyt	Cytochrom
DAS	Decay Associated Emission Spectra
DCMU	3-(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
Δ pH	pH-Gradient
DEPS	Deepoxidationszustand
DNA	Desoxyribonukleinsäure
α -DM	α -Dodecyl-Maltosid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglycoltetraessigsäure
ELIP	<i>early-light inducible protein</i>
EPR	Elektronenspinresonanz
F ₀	Grundfluoreszenz
F _{Max}	Maximalfluoreszenz
F _{NPQ}	Fluoreszenz gemessen unter Belichtung
FR	Fernrotlicht
F _V	variable Fluoreszenz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HL	<i>high light</i> , Starklicht
HLIP	<i>high light induced proteins</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ig	Immunglobulin
k.A.	keine Angaben
k _D	Ratenkonstante der thermischen Deaktivierung
k _F	Ratenkonstante der Fluoreszenzemission
k _P	Ratenkonstante der photochemischen Reaktion
k _T	Ratenkonstante des Transfers von Anregungsenergie
LHC	<i>light harvesting complex</i> , Lichtsammelkomplex
LHC II	<i>light harvesting complex II</i> , bestehend aus den Antennenproteinen Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3
LL	<i>low light</i> , Schwachlicht
Lut	Lutein
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
NADP	Nicotinamadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamadenindinucleotidphosphat
Nx	Neoxanthin

NPQ	nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung
$^1\text{O}_2^*$	angeregter Singulett-Sauerstoff
$\bullet\text{O}_2$	Superoxidradikal
$\bullet\text{OH}$	Hydroxylradikal
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PC	Plastocyanin
PFD	Photonenflussdichte
ΦF	Fluoreszenzausbeute
ΦF_0	minimale Fluoreszenzausbeute
ΦF_M	maximale Fluoreszenzausbeute
ΦP	potentielle Effizienz der photochemischen Reaktion
PQ	Plastoquinon
PQH_2	Plastohydrochinon
PS I/ PS II	Photosystem I/II
QA	Ubichinon A
qE	Energie- oder ΔpH -abhängige Fluoreszenzlöschung
qI	photoinhibitorische Fluoreszenzlöschung
qP	photochemische Fluoreszenzlöschung
qT	Fluoreszenzlöschung durch <i>state transition</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RP	Radikalpaar
RZ	Reaktionszentrum
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV	Stern-Vollmer
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
τ_av	mittlere Lebenszeit
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl-)methylglycin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl-)methylamin
ün	über Nacht
VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
Vs	gegen
Vx	Violaxanthin
WT	Wildtyp
Zx	Zeaxanthin

7.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Jahns danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die Betreuung während der Arbeit. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Jahns für die Möglichkeiten meine Ergebnisse in diversen SFB-Symposien mittels Poster oder Vorträgen präsentieren zu können.

Herrn Prof. Dr. A.R. Holzwarth danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. A.R. Holzwarth für die Möglichkeit einige Messungen im Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie durchführen zu können.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Holzwarth des Max-Planck-Instituts für Bioanorganische Chemie, insbesondere Dr. Yuliya Miloslavina, Dr. Petar Lambrev, Dr. Mark Müller und natürlich Michael Reus danke ich für die Mithilfe an dem Projekt, sowie für nette Gespräche in Mülheim und auf allen gemeinsamen Tagungen und Symposien.

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Lubitz danke ich für die Möglichkeit in seinem Labor transiente EPR-Messungen an isolierten LHC II-Komplexen durchführen zu können.

Ein besonderer Dank geht daher auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. W. Lubitz des Max-Planck-Institutes für Bioanorganische Chemie, besonders an Dr. Shipra Prakash und Dr. Jens Niklas für die Durchführung der Messungen sowie für ausgiebige thematische Diskussionen und nette Gespräche.

Bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Jahns möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und für die Unterstützung bei den kleinen und großen Problemen des Laboralltags bedanken. Ein ganz spezieller Gruß geht natürlich an Christian, Dagmar, Maria und Sylvia, die mich während der ganzen, manchmal schwierigen Laborzeit begleitet haben. Danke für thematische Hilfe aber auch für aufmunternde Worte und für viel Spaß bei der Arbeit.

Bei den Mitarbeitern des Gewächshauses unter der Leitung von Herrn Rogmann bedanke ich mich für die liebevolle Pflege der Pflanzen.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinen Eltern die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben.

Besonders danke ich auch meinem Verlobten Matthias Hübinger für seine Unterstützung, für aufmunternde und auch oft tröstende Worte. Danke!!!

7.3 Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die Vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe als die angegebenen.

Straelen, den 01.12.2009