

**Untersuchungen zur Schutzfunktion von
 α -Tocopherol und Δ pH-abhängiger
Energielöschung bei photooxidativem Stress
in höheren Pflanzen**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

**Thomas Wilfried Graßes
aus Duisburg**

Düsseldorf

2005

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

Referent: Prof. Dr. P. Jahns

Korreferent: Prof. Dr. A. W. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
1.1	Die photosynthetische Elektronentransportkette	6
1.2	Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe	8
1.2.1	Aufbau der Photosysteme I und II und Antennenorganisation	8
1.2.2	Lichtsammelkomplexe	9
1.3	Regulation und Schutzmechanismen der Photosynthese	11
1.3.1	Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	11
1.3.2	Schutzmechanismen gegen photooxidativen Stress	12
1.3.3	Die Bedeutung der Carotinoide und des Xanthophyll-Zyklus	13
1.3.4	Thermische Energiedissipation im PS II	15
1.3.4.1	<i>state transition</i> (qT)	15
1.3.4.2	Energie- oder Δ pH-abhängiger Mechanismus (qE)	16
1.3.4.3	Photoinhibition (qi)	18
1.3.5	Funktion und Synthese des α -Tocopherols	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Enzyme	24
2.1.3	Bakterienstämme	24
2.1.4	Plasmide	24
2.1.5	Verwendete Oligonukleotide	25
2.1.6	Antiseren	26
2.1.7	Saatgut.....	26
2.2	Pflanzenanzucht.....	27
2.2.1	Sterile Anzucht von <i>N. tabacum</i> -Keimlingen	27
2.2.2	Anzucht von <i>N. tabacum</i> auf Erde	27
2.2.3	Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde.....	28
2.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.1	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	28
2.3.2	Medien und Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>	28
2.3.3	Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.3.4	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	29
2.3.5	Herstellung von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> -Zellen	29
2.3.6	Transformation von <i>N. tabacum</i>	29
2.3.7	Regeneration von transgenen Pflanzen in Sterilkultur.....	29
2.3.8	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30

2.3.9	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen	30
2.3.10	Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen	30
2.3.11	Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	31
2.3.12	Restriktion von DNA.....	31
2.3.13	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	31
2.3.14	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.3.15	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	31
2.3.16	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.3.17	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	32
2.3.18	DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.3.19	Inverse PCR.....	33
2.3.20	DNA-Sequenzierung	33
2.3.21	Computerunterstützte Sequenzanalysen.....	33
2.3.22	Radioaktive Markierung von DNA durch <i>random priming</i>	34
2.3.23	Denaturierende gelelektrophoretische Auftrennung von RNA.....	34
2.3.24	Transfer von RNA („ <i>Northern Blotting</i> “)	35
2.3.25	Nachweis filtergebundener RNA.....	35
2.4	Pflanzenphysiologische Methoden	36
2.4.1	Fluoreszenzmessungen.....	36
2.4.1.1	Theoretische Grundlagen	36
2.4.1.2	Bestimmung der Fluoreszenzlöschungskoeffizienten.....	37
2.4.1.3	Messung der Photoinhibition anhand des F_v/F_M -Verhältnisses.....	38
2.4.1.4	Messung der P700-Absorptionsänderung – die Grundlagen	39
2.4.1.5	Bestimmung des P700-Redoxzustandes.....	39
2.4.2	Messung der CO ₂ -Assimilation <i>in vivo</i>	40
2.5	Biochemische Methoden.....	41
2.5.1	Präparation intakter Thylakoidmembranen.....	41
2.5.2	Chlorophyllbestimmung	41
2.5.3	Messung der Elektronentransportraten an intakten Thylakoiden	41
2.5.4	Messung von ROS mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie.....	42
2.5.4.1	Fenton Reaktion.....	43
2.5.4.2	Xanthin/Xanthinoxidase-System.....	43
2.5.4.3	<i>Trapping</i> der in belichteten Thylakoiden generierten ROS.....	43
2.5.5	Herstellung von Proteingesamtextrakten aus Blättern.....	43
2.5.6	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	43
2.5.7	Isoelektrische Fokussierung von Membranproteinen (IEF)	44
2.5.7.1	Entstapelung und Detergenzien-Behandlung von Thylakoiden.....	44
2.5.7.2	Trennung und Elution der pigmentbindenden Proteine	44
2.5.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.5.9	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	45
2.5.10	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CP24, CP26 und CP29 aus <i>N. tabacum</i>	46

2.5.11	Analyse des Tocopherol-Gehaltes.....	46
2.5.12	Pigmentanalyse durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	46
2.5.12.1	Aufbereitung der Proben.....	47
2.5.12.2	Quantifizierung der Pigmente	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Schutz durch α -Tocopherol bei photooxidativem Stress	48
3.1.1	Pigmentanalyse der <i>CHL P</i> -Antisense-Pflanzen	49
3.1.2	Charakterisierung der pigmentbindenden Proteinkomplexe.....	50
3.1.3	Die Photosyntheseaktivität <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	52
3.1.4	Die Löschung der Chl-Fluoreszenz.....	54
3.1.5	Die Empfindlichkeit gegenüber Starklichtstress.....	56
3.1.6	Die Aktivität des Xanthophyll-Zyklus.....	57
3.1.7	Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	59
3.1.8	Abbau des D1-Proteins	60
3.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	62
3.2	PsbS und seine Bedeutung für die Fitness der Pflanzen bei photooxidativem Stress.....	63
3.2.1	Mutation des <i>psbS</i> -Lokus in <i>A. thaliana</i>	63
3.2.2	Pigmentzusammensetzung und Aufbau der Photosysteme der <i>psbs-1.3</i> -Mutante	64
3.2.3	Wachstumsrate und CO ₂ -Assimilation der <i>psbs-1.3</i> -Mutanten	65
3.2.4	NPQ der variablen Chl a-Fluoreszenz der <i>psbs-1.3</i> -Mutante.....	66
3.2.5	PS II- und Xanthophyll-Zyklusaktivität der <i>psbs-1.3</i> -Mutante.....	68
3.2.6	Die Auswirkung von langanhaltendem Lichtstress auf die PS II-Aktivität.....	69
3.2.7	Starklicht-induzierter Abbau des D1-Proteins in der <i>psbs-1.3</i> -Mutante.....	71
3.2.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
3.3	CP29 und seine Bedeutung für den qE-Mechanismus.....	73
3.3.1	Die Herstellung und Sichtung von <i>Lhcb4</i> -Antisense-Tabakpflanzen.....	73
3.3.2	Charakterisierung von <i>A. thaliana Lhcb4.1-knock-out</i> -Mutanten.....	75
3.3.2.1	Die Insertion und Orientierung des <i>DsG</i> -Elementes im <i>Lhcb4.1</i> -Gen.....	76
3.3.2.2	Die Homozygotie der <i>DsG</i> -Insertionslinien 7 und 15.....	78
3.3.2.3	Proteinmengen und Genexpression der Antennenproteine	79
3.3.2.4	Die Analyse der PS II-Funktion in den <i>DsG</i> -Insertionslinien	81
3.3.2.5	Die Pigmentzusammensetzung der <i>DsG</i> -Insertionslinien	86
3.3.2.6	Nicht-photochemische Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz	86
3.3.2.7	PS II-Aktivität während langanhaltendem photooxidativem Stress	90
3.3.2.8	Komplementation der <i>DsG</i> -Insertionslinien	91
3.3.2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	93
4	Diskussion	95
4.1	Die physiologische Bedeutung des α -Tocopherols als Schutzfaktor gegenüber photooxidativem Stress.....	95
4.1.1	<i>CHL P</i> -Antisense-Pflanzen besitzen weniger Elektronentransportketten.....	95

4.1.2	Die Auswirkungen der geringeren CHL P-Aktivität auf die Photosyntheseleistung.....	97
4.1.3	Die Vergrößerung des Xanthophyll-Zyklusools	99
4.1.4	<i>CHL P</i> -Antisense-Pflanzen sind für photooxidativen Stress verstärkt anfällig	100
4.2	Die physiologische Bedeutung der Δ pH-abhängigen Energielöschung und die Relevanz des CP29 für diesen Mechanismus	104
4.2.1	Die Reduzierung des NPQ aufgrund der Mutation im <i>psbS</i> -Lokus	104
4.2.2	Die strukturelle Integrität der Elektronentransportkette	105
4.2.3	Die physiologischen Auswirkungen des reduzierten NPQ	106
4.2.4	Die Herabregulation des CP29 in <i>N. tabacum</i>	109
4.2.5	Die Auswirkungen der <i>DsG</i> -Insertion im <i>Lhcb4.1</i> -Lokus in <i>A. thaliana</i>	111
4.2.6	Der Verlust der strukturellen und funktionellen Integrität des PS II	112
4.2.7	Die Bedeutung des CP29 für die Δ pH-regulierte Energiedissipation	115
4.3	Abschließende Betrachtung.....	118
5	Zusammenfassung	121
6	Literatur	122
7	Anhang	138
7.1	Abkürzungsverzeichnis	138
7.2	<i>Lhcb4</i> -cDNA-Sequenz aus <i>N. tabacum</i>	140
7.3	Danksagung	142

1 EINLEITUNG

Die Nutzung des Sonnenlichts als Energiequelle in der oxygenen Photosynthese der Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen bildet die Grundlage des aeroben Lebens auf der Erde. Pflanzen sind sowohl diurnally als auch saisonal stark schwankenden Lichtintensitäten ausgesetzt. Dies stellt aufgrund ihrer sessilen Lebensweise ein essentielles Problem für die Pflanzen dar. Um eine effiziente Photosynthese zu gewährleisten, ist der Photosyntheseapparat höherer Pflanzen optimal an die am Standort jeweils vorherrschenden limitierenden Lichtintensitäten angepasst. Übersteigt die Menge der absorbierten Lichtquanten die maximale Kapazität der Photosynthese, so fördert dies die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese sind in der Lage den Photosyntheseapparat irreversibel zu schädigen, was eine anhaltende Reduzierung der Photosyntheseeffizienz verursachen kann. Dieses als photooxidativer Stress bezeichnete Phänomen tritt nicht nur bei hohen Lichtintensitäten auf, sondern ist in Kombination mit anderen abiotischen Stressfaktoren, die den Metabolismus der Photosynthese limitieren (wie z.B. Kälte oder Trockenheit), auch bei niedrigen Lichtintensitäten von Bedeutung (Demmig-Adams und Adams, 1992). Um der Bildung destruktiver ROS vorzubeugen bzw. um bereits vorhandene unschädlich zu machen, haben sich in höheren Pflanzen verschiedene Regulations- und Schutzmechanismen des Photosyntheseapparates entwickelt. Einen prophylaktischen Schutz bei auftretendem Starklicht bietet u.a. ein Prozess in der Antenne des Photosystems II, bei dem absorbierte überschüssige Anregungsenergie in Form von Wärme dissipiert wird (Niyogi, 1999). Bereits gebildete ROS werden durch eine Kombination aus Antioxidantien, wie z.B. dem α -Tocopherol (Fryer, 1992), und speziellen Schutzenzymen entgiftet. Sowohl die Bildung von ROS als auch einige der Schutzmechanismen gegen photooxidative Schädigung sind eng mit der Nutzung der absorbierten Lichtenergie in den Antennen bzw. dem photosynthetischen Elektronentransport verknüpft.

1.1 Die photosynthetische Elektronentransportkette

Die Energiekonversion der Photosynthese findet in bzw. an der Thylakoidmembran statt, einem komplexen Membransystem, das die Grundmatrix (Stroma) der Chloroplasten durchzieht. Gestapelte und ungestapelte Bereiche der Thylakoidmembran (Grana- bzw. Stromathylakoide) beherbergen die Komponenten des Photosyntheseapparates und umschließen zusammen das Thylakoidlumen. Die Photosynthese (Übersichtartikel: Ke, 2001; Blankenship, 2002) lässt sich in zwei Teilprozesse gliedern: Zunächst werden durch einen gerichteten,

lichtgetriebenen Elektronentransport gegen ein Redoxgefälle und einer daran gekoppelten Protonentranslokation Reduktions- und Energieäquivalente in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ und ATP bereitgestellt. In einem sekundären Prozess werden diese für die Fixierung von atmosphärischem CO_2 und dessen Reduktion zu Triosephosphat genutzt (Calvin-Zyklus).

Die photosynthetische Elektronentransportkette (Abbildung 1) wird durch 3 integrale Multiproteinkomplexe in der Thylakoidmembran gebildet: die pigmentbindenden Photosysteme II und I (PS II und PS I) sowie den Cytochrom (Cyt) b_6/f -Komplex. Diese sind durch die lateral mobilen Elektronencarrier Plastochinon (PQ) und Plastocyanin (PC) miteinander verbunden. Der lineare Elektronentransport wird alleine durch die Lichtreaktionen der beiden Photosysteme angetrieben. Die Anregung spezieller Chlorophyll (Chl) a-Dimere in den Reaktionszentren (RZ) der beiden Photosysteme, P680 im PS II bzw. P700 im PS I, induziert eine Ladungstrennung, was einen Elektronentransfer auf sekundäre Elektronenakzeptoren (Q_A im PS II bzw. NADP^+ am PS I) ermöglicht. Das Elektronendefizit des entstandenen P680^+ wird durch Elektronen aus der Wasseroxidation ausgeglichen, während das P700^+ durch den linearen Elektronentransport reduziert wird. An den Elektronentransport ist eine Protonentranslokation über die Thylakoidmembran gekoppelt. Durch die Oxidation des H_2O am PS II und des Plastochinols (PQH_2) am Cyt b_6/f -Komplex werden Protonen im Thylakoidlumen freigesetzt, was zu dessen Ansäuerung führt. Gleichzeitig findet mit der Reduktion von PQ und NADP^+ eine Alkalisierung des Stromas statt, sodass ein transmembraner Protonengradient (ΔpH) zwischen dem Lumen und dem Stroma aufgebaut wird. Dieser ΔpH dient einer

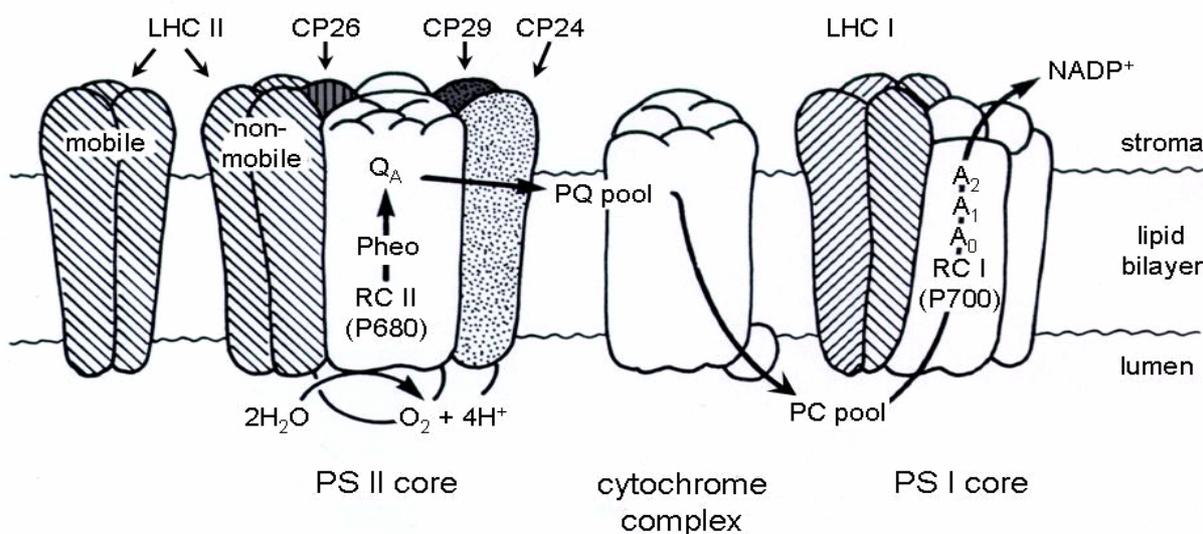


Abbildung 1: Schematische Darstellung der photosynthetischen Elektronentransportkette. Die Lichtsammelkomplexe (LHC I, LHC II, CP24, CP26, CP29) beider Photosysteme sind hervorgehoben. Das PS II befindet sich überwiegend in den Granathylakoiden und ist somit lateral vom PS I getrennt, das hauptsächlich in den Stromathylakoiden vorkommt. Der Cyt b_6/f -Komplex ist hingegen gleichmäßig verteilt (Allred und Staehelin, 1986). Diese heterogene Distribution der beiden Photosysteme ist jedoch dynamisch (Allen und Forsberg, 2001). Entnommen aus Green et al. (1991), verändert.

Membran-integralen CF_0/CF_1 -ATP-Synthase als Antriebskraft zur Synthese von ATP. Die Ansäuerung des luminalen pH-Wertes ist in mehrfacher Hinsicht für die Löschung überschüssiger Anregungsenergie bedeutsam (siehe 1.3.4).

1.2 Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe

1.2.1 Aufbau der Photosysteme I und II und Antennenorganisation

In höherer Pflanzen liegt das PS I in der Thylakoidmembran als Monomer vor (Ben-Shem et al., 2003). Sein RZ ist aus 12 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Den Kern des RZ bildet ein intrinsisches Proteinheterodimer (PsaA/PsaB), das alle Redoxfaktoren für die Ladungstrennung inklusive P700 trägt. Aufgrund der Bindung von weiteren 91 Chl a-Molekülen fungiert das PsaA/PsaB-Dimer gleichzeitig als so genannte *core*-Antenne (Ben-Shem et al., 2003). Die periphere Antenne des PS I besteht aus 5 unterschiedlichen Lichtsammelkomplexen (LHCs; Lhca1 bis Lhca5) (Storf et al., 2004; Ganeteg et al., 2004), wobei Lhca1 mit Lhca4 bzw. Lhca2 mit Lhca3 Heterodimere bilden, die halbkreisförmig um das PS I-RZ angeordnet sind (Schmid et al., 2002).

Im Gegensatz dazu liegt das PS II (Abbildung 2) in seiner funktionellen Form als Dimer vor (Egbert et al., 1998; Rhee et al., 1998). In Analogie zum PS I wird auch der RZ-Kern eines PS II von einem intrinsischen Heterodimer (D1/D2) gebildet. Mit diesem sind alle Redoxfaktoren der Ladungstrennung, 6 Chl a-Moleküle (inklusive P680) sowie 2 β -Carotine, assoziiert (Zouni et al., 2001; Kamiya und Shen, 2003). Das D1/D2-Dimer ist von 2 intrinsischen Chl a-bindenden Proteinen CP43 und CP47 flankiert, die mit insgesamt 30 Chl a-Molekülen die *core*-Antenne des PS II aufbauen (Kamiya und Shen, 2003). Komplettiert wird das RZ des PS II durch mindestens 17 weitere Untereinheiten (Zouni et al., 2001), deren Funktionen weitgehend unklar sind. Das PS II-RZ wird von einer komplexen Antenne aus LHCs ummantelt, die durch die PsbZ-Untereinheit stabilisiert wird (Ruf et al., 2000; Swiatek et al., 2001).

Hinsichtlich der Größe und Organisation unterscheiden sich die Antennen der beiden Photosysteme erheblich voneinander. Während die 4 LHCs der PS I-Antenne 40 Chl-Moleküle binden (Castelletti et al., 2003), können mit der wesentlich größeren und komplexeren PS II-Antenne bis zu 250 Chl-Moleküle pro RZ assoziiert sein (Krause und Jahns, 2004). Sechs verschiedene LHCs (Lhcb1 bis Lhcb6) sind am Aufbau der PS II-Antenne beteiligt, die in innere und äußere Antenne unterteilt wird. Diese supramolekulare Organisation der PS II-Partikel in der Thylakoidmembran ist offensichtlich für die Effizienz der Photosynthese von Bedeutung

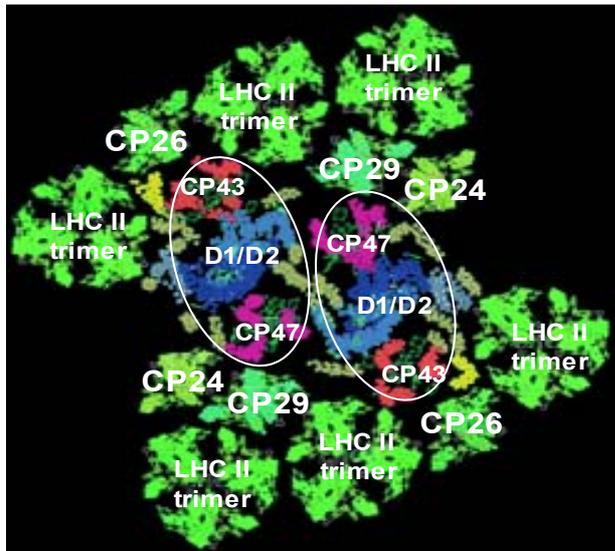


Abbildung 2: Modell der Antennenorganisation des PS II-Dimers. Aufsicht auf die Thylakoidmembran von der Stromaseite. Die 2 RZ aus D1/D2-Heterodimer und *core*-Antenne (CP43 und CP47) sind markiert. Die Antenne besteht 3 LHCII-Trimeren sowie je einer Kopie der minoren Antennenproteine CP24, CP26 und CP29 (pro RZ). Entnommen aus Havaux et al. (2004), verändert.

(Ruban et al., 2003). Der Großteil der PS II-Antenne besteht aus den an der Peripherie angeordneten Proteinen Lhcb1 bis Lhcb3, die in wechselnden Stöchiometrien Trimere ausbilden (Abbildung 2) und als LHC II bezeichnet werden (Hobe et al., 1995; Kuttkat et al., 1996; Jansson, 1994; 1999). Ein Teil dieser LHC II-Trimere ist nach Phosphorylierung in der Thylakoidmembran lateral beweglich (siehe 1.3.4.1; Allen und Forsberg, 2001). Die innere Antenne des PS II wird von den als Monomere vorliegenden minoren Antennenproteinen Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6 gebildet, die mit je einer Kopie (pro RZ) mit dem Kernkomplex eng verknüpft sind (Abbildung 2; Yakushevskaya et al., 2001). Ihre Stabilität hängt wechselseitig voneinander ab (Andersson et al., 2001).

1.2.2 Lichtsammelkomplexe

Im Gegensatz zu den pigmentbindenden Proteinen der *core*-Antennen (CP43, CP47, PsaA und PsaB) binden die LHCs in den Antennen der beiden Photosysteme auch Chl b-Moleküle (Mullet, 1988), und werden deshalb als Chl a/b-bindende Proteine (CAB-Proteine) zusammengefasst. Sie gehören zu der etwa 30 Mitglieder zählenden LHC-Superfamilie (Jansson, 1999; Elrad und Grossman, 2004). Diese umfasst neben den LHCs auch ELIPs und HLIPs (*early light* bzw. *high light induced proteins*), sowie das PsbS-Protein (Jansson, 1999). Während für ELIPs eine photoprotektive Funktion diskutiert wird (Hutin et al., 2003), stellt das PsbS einen essentiellen Faktor für die Löschung überschüssiger Anregungsenergie dar (Li et al., 2000). Ein gemeinsames Merkmal dieser LHC-Superfamilie ist eine stark hydrophobe Sequenz aus 22 Aminosäuren, die als LHC-Motiv bezeichnet wird (Jansson, 1999). Bisher wurden 10 verschiedene Typen an LHCs in höheren Pflanzen identifiziert (Abbildung 3A), deren Nomenklatur sich an der Genbezeichnung orientiert (Jansson, 1994; 1999). Lediglich für die

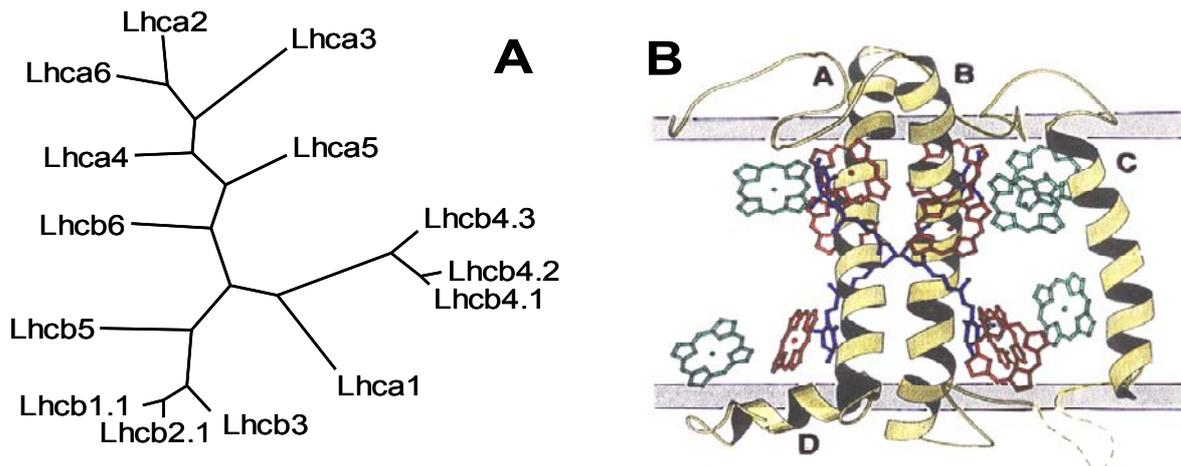


Abbildung 3: A) Die Verwandtschaft der LHCs aus *Arabidopsis thaliana*. B) Sekundärstruktur des monomeren LHC II-Apoproteins. A) Für die Erstellung des Cladogramms wurden die membranintegrateden Strukturelemente der LHCs berücksichtigt. Die Länge der Achsen ist proportional zu den Sequenzunterschieden der prozessierten Proteine. Die Bedeutung und Funktion *in vivo* der putativen Lhca5 und Lhca6 ist unklar. Übernommen aus Jansson (1999). **B)** Die Ansicht ist parallel zur Membranebene. Die 3 transmembranen Helices sind mit A, B und C gekennzeichnet. Die zwei gekreuzten Luteine stabilisieren die Struktur, ferner sind 12 der 14 Chl eingezeichnet. Entnommen aus Kühlbrandt et al. (1994).

minoren Antennenproteine Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6 haben sich die älteren Synonyme CP29, CP26 bzw. CP24 erhalten (Bassi et al., 1993). Die hochgradig konservierten LHCs sind alle kernkodiert (Jansson, 1999) und zeichnen sich durch ein ähnliches Molekulargewicht von 20 bis 30 kDa aus (Jansson, 1994; Green und Kühlbrandt, 1995). Ihre Tertiärstruktur wird von 3 transmembranen α -Helices dominiert (Abbildung 3B; Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005), wobei die korrekte Faltung und Stabilität der LHCs elementar von der Assoziierung der Pigmente und intramolekularen Ionenpaaren abhängt (Plumley und Schmidt, 1987; Bassi et al., 1999; Gastadelli et al. 2003). Im Zuge der Licht-induzierten Ansäuerung des Thylakoidlumens können bestimmte Lumen-exponierte Carboxylgruppen in den LHCs reversibel protoniert werden (Walters et al., 1994; 1996; Pesaresi et al., 1997), was zu einer umkehrbaren Konformationsänderung der LHC-Tertiärstruktur führt (Govindjee, 2002; Krause und Jahns, 2004).

Neben den Chlorophyllen sind Carotinoide (Abbildung 4) ein weiterer Bestandteil der LHCs (Morosinotto et al., 2003): Diese C_{40} -Tetraterpene besitzen ein Polyengerüst aus konjugierten Doppelbindungen und werden in Carotine, wie z.B. β -Carotin (β -Caro), und ihre oxygenierten Derivate, die Xanthophylle, unterteilt (Baroli und Niyogi, 2000; Holt et al., 2004). Zu letzteren gehören Neoxanthin (Neo), Lutein (Lut), sowie die ineinander konvertierbaren Pigmente des Xanthophyll-Zyklus (1.3.3) Violaxanthin (Vx), Antheraxanthin (Ax) und Zeaxanthin (Zx). Die Bedeutung der Carotinoide liegt: 1. in der Ergänzung der Absorptionsspektren der Chlorophylle (Lichtsammelfunktion; Frank und Brudvig, 2004), 2. in der Stabilisierung der

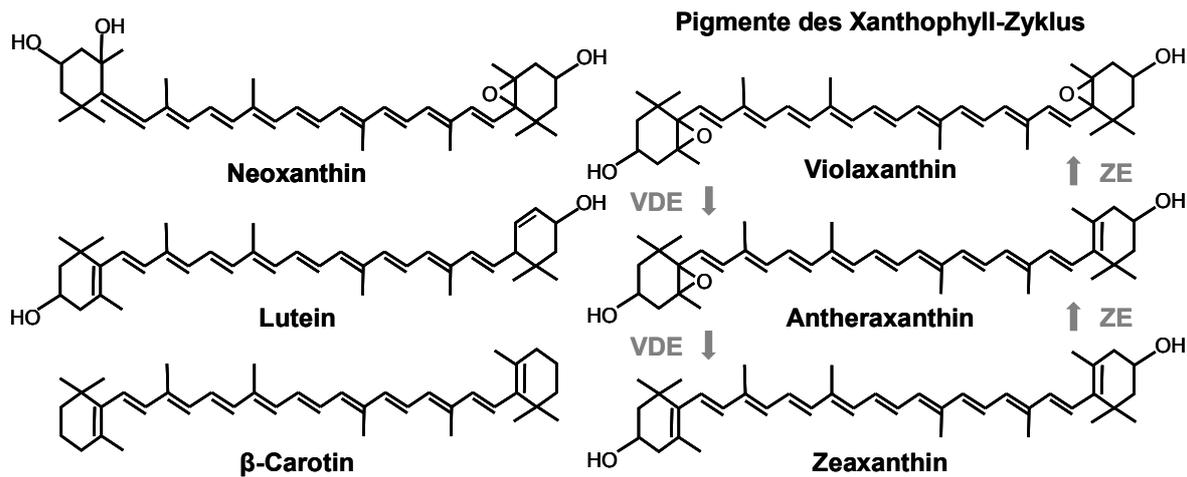


Abbildung 4: Strukturen der verschiedenen Carotinoide in den LHCs höherer Pflanzen. Rechts werden die Pigmente des Xanthophyll-Zyklus Violaxanthin (Vx), Antheraxanthin (Ax) und Zeaxanthin (Zx) gezeigt. Die Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) entfernt sukzessiv die beiden Epoxid-Gruppen, wodurch sich die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen von 9 auf 11 erhöht. Die Rückreaktion wird durch die Zeaxanthin-Epoxidase (ZE) katalysiert.

Struktur der LHCs (Kühlbrandt et al., 1994) und 3. in der Schutzfunktion gegenüber überschüssiger Lichtenergie (siehe 1.3.3; Horton et al., 1996).

1.3 Regulation und Schutzmechanismen der Photosynthese

1.3.1 Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Bildung von ROS erfolgt bei allen Lichtintensitäten (Niyogi, 1999). Sie ist allerdings besonders eklatant, wenn die Menge an absorbierten Photonen die Kapazität der Photosynthese übersteigt. Starklicht ($>1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) führt zu einer Akkumulation von Anregungsenergie in den LHCs, was die Lebensdauer von angeregten Singulett-Chl ($^1\text{Chl}^*$) verlängert (Niyogi, 1999). Durch einen als *intersystem crossing* bezeichneten physikalischen Prozess kann $^1\text{Chl}^*$ in angeregtes langlebiges Triplett-Chl ($^3\text{Chl}^*$) konvertiert werden, welches unfähig ist, den photosynthetischen Elektronentransport zu induzieren (Niyogi, 2000). Das $^3\text{Chl}^*$ selbst ist harmlos, kann aber seine Anregungsenergie auf O_2 übertragen (Abbildung 6; Foyer et al., 1994). Es entsteht hoch reaktiver Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2^*$), der essentielle Proteine, wie das D1-Protein im PS II-RZ, aber auch die Lipidmembran und Pigmente oxidativ zerstören kann (Barber und Andersson, 1992; Aro et al., 1993; Niyogi, 1999). Die Bildung von $^1\text{O}_2^*$ erfolgt sowohl in den Reaktionszentren als auch in den Antennen der beiden Photosysteme (Niyogi, 1999; Trebst, 2003). Ferner können bei einer übermäßigen Reduktion des NADP^+ -Pools (z.B. infolge einer limitierten Calvin-Zyklus-Aktivität) Elektronen

an der Akzeptorseite des PS I mittels Ferredoxin auf O_2 transferiert werden, wodurch Superoxidradikalanionen ($\bullet O_2^-$) entstehen (Mehler-Reaktion; Mehler, 1951; Halliwell, 1991; Asada, 1994). Dieses kann spontan oder durch die endogene Superoxid-Dismutase katalysiert in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) disproportionieren. Beide, H_2O_2 und $\bullet O_2^-$, sind bereits destruktiv reaktiv. Zusätzlich generieren sie in Gegenwart von katalytisch wirkenden Metallionen in einer als Haber-Weiss bekannten Reaktion extrem reaktive Hydroxylradikale ($\bullet OH$; Halliwell, 1991). $\bullet OH$ und $^1O_2^*$ reagieren bevorzugt mit ungesättigten Fettsäuren zu Hydroperoxiden und lösen somit Peroxylradikalkettenreaktionen in Lipidmembranen aus (Baroli und Niyogi, 2000). Die Thylakoidmembran ist besonders gefährdet, da sie, um die strukturelle Integrität der LHCs zu gewährleisten, einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren aufweist (Havaux und Niyogi, 1999).

1.3.2 Schutzmechanismen gegen photooxidativen Stress

Um einem potentiell schädigenden Effekt von Starklicht vorzubeugen, können Pflanzen durch Blattbewegung (negative Phototaxis; Björkman und Demmig-Adams, 1994) und Reorientierung der Chloroplasten (Brugnoli und Björkman, 1992) die Absorption überschüssiger Anregungsenergie reduzieren. Auf Chloroplastenebene reguliert die Anpassung der Antennenlänge und der Photosynthesekapazität sowohl die Absorption als auch die Nutzung der Lichtenergie (Abbildung 5; Niyogi, 1999). Diese Adaptationsprozesse sind langwierig (>24 h) und reichen nicht aus, um die Problematik schnell fluktuierender Lichtquantitäten zu bewältigen. Einen effizienten, kurzfristigen Schutz (innerhalb von Minuten) bietet der Mechanismus der thermischen Energiedissipation (Müller et al., 2001). So können unter Beteiligung von Carotinoiden 80% der bereits durch die Antennen absorbierten Lichtenergie in Wärme überführt und somit unschädlich gemacht werden (Baroli und Niyogi, 2000; Holt et al., 2004). Alternative Reaktionswege wie die Photorespiration und der zyklische Elektronentransport helfen ebenfalls absorbierte überschüssige Anregungsenergie aus den Photosystemen zu entfernen, indem sie den Elektronentransport aufrechterhalten, ohne dass es dabei zu einer Netto- CO_2 -Fixierung kommt (Niyogi, 2000). Bereits entstandene ROS werden in einer als Ascorbat-Glutathion-Zyklus bekannten Reaktionskette durch eine Kombination aus hydrophilen Antioxidantien (Ascorbat und Glutathion) und Schutzenzymen (Superoxid-Dismutase und Ascorbat-Peroxidase) unter Verbrauch von $NADPH+H^+$ entgiftet (Asada, 1994; 1999). Einen effizienten Schutz gegen Lipidperoxidation liefert das konstitutiv in der Lipidmatrix der Thylakoidmembran integrierte α -Tocopherol, indem es bereits gebildete ROS sowohl chemisch als auch physikalisch deaktiviert (siehe Abbildung 6; Fryer, 1992, Havaux und

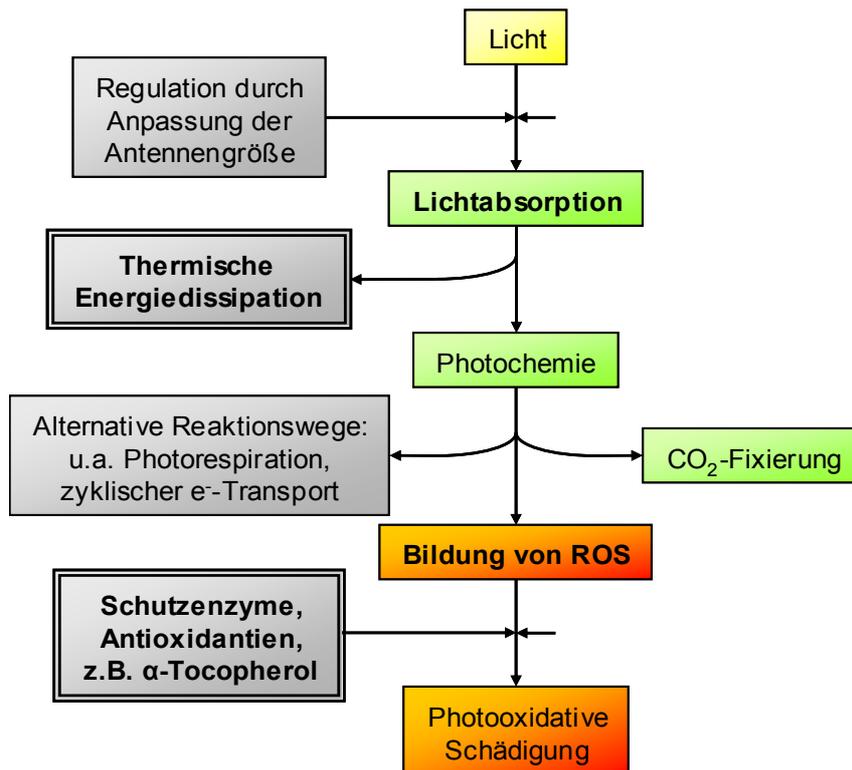


Abbildung 5: Schematisches Diagramm der verschiedenen photoprotektiven Mechanismen (grau unterlegt) im Chloroplasten. Die Menge der absorbierten Lichtenergie kann über die Größe der Antennen reguliert werden. Überschüssige Anregungsenergie wird in Form von Wärme dissipiert. Alternative Reaktionswege erlauben das Abfließen der Energie ohne CO₂-Fixierung. Bereits gebildete ROS werden durch Antioxidantien entfernt. Übersteigt die photooxidative Schädigung die Neusynthese der betroffenen Komponenten so führt dies zu einer Nettoschädigung und letztendlich zur Photoinhibition der Photosynthese.

Niyogi, 1999). Dabei wird es synergistisch durch Carotinoide unterstützt (Havaux, 1998).

1.3.3 Die Bedeutung der Carotinoide und des Xanthophyll-Zyklus

Die photoprotektive Wirkung der Carotinoide basiert auf ihrer Fähigkeit ³Chl* durch Triplett-Triplett-Energietransfer in den Grundzustand zu überführen, wobei die Anregungsenergie durch Wärmeemission gelöscht wird (Abbildung 6; Baroli und Niyogi, 2000). Durch einen analogen Prozess vermögen Carotinoide außerdem ¹O₂* zu deaktivieren (Abbildung 6; Croce et al., 1999). So tragen die intrinsischen β-Caro des PS II-RZ durch die Löschung des am ³P680* entstehenden ¹O₂* wesentlich zu einer Verminderung der photooxidativen Schädigung des PS II bei (Telfer et al., 1994; Trebst, 2003). Unter Beteiligung des Carotinoids Zx und der LHCs kann die Entstehung von langlebigen ³Chl* bereits im Vorfeld verhindert werden, indem die Anregungsenergie direkt vom ¹Chl* durch thermische Energiedissipation abgeführt wird (Abbildung 6; Müller et al., 2001; Govindjee, 2002; Holt et al., 2004). Dieser Prozess muss allerdings streng reguliert werden, da er in direkter Konkurrenz zur Photochemie steht (vgl. Abbildung 5; Krause und Jahns, 2004). Diese strenge Regulation geschieht über den luminalen pH (vgl. Abbildung 7; Govindjee, 2002).

Die reversible Bereitstellung des photoprotektiv wirksamen Zx erfolgt durch den bei Pflanzen, *Chlorophyta* und *Phaeophyta* ubiquitär verbreiteten Xanthophyll-Zyklus und wird durch den luminalen pH gesteuert (Abbildung 4; Übersichtsartikel: Demmig-Adams und Adams,

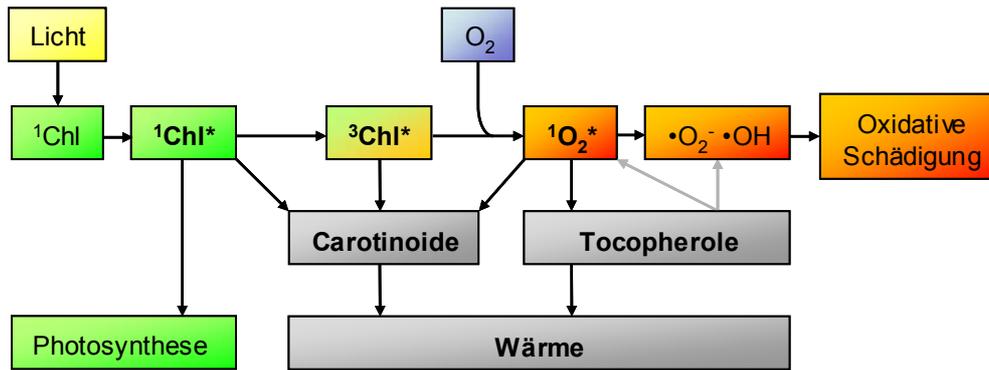


Abbildung 6: Photoprotektive Wirkung der Carotinoide und Tocopherole in photosynthetischen Membranen. Lichtabsorption führt zur Bildung von $^1\text{Chl}^*$, das in der Lage ist, Photochemie zu induzieren. Durch *intersystem crossing* kann $^1\text{Chl}^*$ zu $^3\text{Chl}^*$ konvertieren, was seine Anregungsenergie auf O_2 übertragen kann, wodurch $^1\text{O}_2^*$ und andere ROS entstehen. Carotinoide verhindern eine oxidative Schädigung, indem sie $^3\text{Chl}^*$ und $^1\text{O}_2^*$ durch Triplett-Triplett-Energietransfer bzw. $^1\text{Chl}^*$ durch Singulett-Singulett-Energietransfer deaktivieren, wobei die Anregungsenergie durch Wärmeemission gelöscht wird. $^1\text{O}_2^*$ kann auch durch Tocopherole physikalisch deaktiviert werden. Tocopherole vermögen zusätzlich als Radikalfänger $^1\text{O}_2^*$ und andere ROS chemisch zu binden (graue Pfeile), wobei das Tocopherol-Molekül irreversibel zerstört wird.

1996; Müller et al., 2001). In dunkeladaptierten Pflanzen liegt zunächst fast ausschließlich Vx vor. Im Zuge der Licht-induzierten Ansäuerung des Thylakoidlumens ($\text{pH} < 6,2$) wird die dort lokalisierte Vx-Deepoxidase (VDE) durch Protonierung aktiviert, bindet an die Thylakoidmembran und entfernt sukzessiv die beiden Epoxidgruppen des Vx (Hager und Holocher, 1994; Rockholm und Yamamoto, 1996; Müller et al., 2001). Das pH-Optimum der VDE liegt bei 5,2, was dem luminalen pH bei sättigendem Licht entspricht (Hager, 1969; Pfündel und Dilley, 1993). Der genaue Mechanismus der Deepoxidation ist noch unklar. Zahlreiche Studien deuten aber darauf hin, dass sich das gebundene Vx von den LHCs ablöst und als freies Pigment in der Lipidphase der Thylakoidmembran umgesetzt wird (Bassi et al., 1999; Macko et al., 2002, Morosinotto et al., 2002; 2003). Das gebildete Zx besitzt im Gegensatz zu Vx und Ax eine fast planare Molekülstruktur und unterstützt bei seiner Rückbindung an die LHCs die pH-induzierte Konformationsänderung der Antennenproteine (Horton et al., 1996; Wentworth et al., 2000; Crimi et al., 2001; Morosinotto et al., 2003; Dall'Osto et al., 2005). Freies Zx fungiert in der Lipidphase der Thylakoidmembran als Antioxidans und Regulator der Membranfluidität (Verhoeven et al., 1999; Havaux, 1998; Havaux und Niyogi, 1999). Die Rückreaktion von Zx zu Vx erfolgt durch die im Stroma lokalisierte, konstitutiv-aktive Zx-Epoxidase (Abbildung 4; Hager, 1975; Müller et al., 2001). Die Regulation der VDE durch den luminalen pH gewährleistet, dass der Zx-Gehalt optimal an die jeweils vorherrschenden Lichtbedingungen angepasst wird und die Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$ nur bei Starklicht erfolgt.

1.3.4 Thermische Energiedissipation im PS II

Durch die Analyse der Chl a-Fluoreszenz bei Raumtemperatur (RT) lassen sich auf einfache Weise die Regulations- und Schutzmechanismen, die zur reversiblen Herabsetzung der PS II-Aktivität bzw. zur thermischen Energiedissipation überschüssiger Anregungsenergie führen, untersuchen (Übersichtartikel: Krause und Jahns, 2003; 2004). Die Erniedrigung oder Löschung der Chl-Fluoreszenz ist auf photochemische und nicht-photochemische Prozesse zurückzuführen, die sich durch die Parameter q_P bzw. NPQ quantifizieren lassen und in direkter Konkurrenz zueinander stehen. Während q_P durch den Redoxzustand des Ubichinon A (Q_A ; siehe Abbildung 1) bestimmt wird und somit in engem Zusammenhang mit dem linearen Elektronentransport steht, ist NPQ vom Redoxzustand des Q_A unabhängig und proportional zur Größe der thermischen Energiedissipation. Daher kann NPQ als Maß für die Herabregulierung der PS II-Aktivität unter den jeweils vorherrschenden Lichtbedingungen herangezogen werden. Zu NPQ tragen drei Mechanismen bei, die sich experimentell durch charakteristische Erholungskinetiken der jeweiligen Anteile der Fluoreszenzlöschung voneinander unterscheiden (Quick und Stitt 1989): *state transition* (q_T), Energie- bzw. ΔpH -abhängige Löschung (q_E) und Photoinhibition (q_I).

1.3.4.1 *state transition* (q_T)

Der Mechanismus der *state transition* dient bei nicht-sättigenden Lichtintensitäten zur kurzfristigen Ausbalancierung der Anregungsenergie zwischen den beiden Photosystemen, indem ein mobiler Anteil der LHC II-Trimere reversibel mit dem PS II (*state 1*) oder mit dem PS I (*state 2*) assoziiert (vgl. Abbildung 1; Wollmann, 2001; Pesaresi et al., 2002). Seine Regulation erfolgt über den Redoxzustand des PQ-Pools, wobei die Q_0 -Bindstelle des Cyt b_6/f -Komplexes als Sensor fungiert (Vener et al., 1997). Infolge einer Überreduktion des PQ-Pools wird unter Vermittlung der Rieske-Untereinheit eine Thylakoidmembran-assoziierte Proteinkinase aktiviert (Zito et al., 1999; Snyders und Kohorn, 1999). Diese phosphoryliert die peripheren LHC II-Trimere der PS II-Antenne, die sich daraufhin vom PS II ablösen und an die PsaH-Untereinheit des PS I binden, wo sie offensichtlich als zusätzliche Antenne fungieren (Nilsson et al., 1997; Lunde et al., 2000; Pesaresi et al., 2002). Der *state 1-state 2*-Übergang ist *in vivo* im Dunkeln aber auch bei hohen Lichtintensitäten innerhalb von $t_{1/2} = 10$ min reversibel und mit einer entsprechenden Dephosphorylierung und Wiederanlagerung der LHC II-Trimere an das PS II verbunden (Quick und Stitt, 1989; Pesaresi et al., 2002). Im Gegensatz zu q_I und q_E hat die *state transition* allerdings keine photoprotektive Bedeutung (Krause und Jahns, 2004).

1.3.4.2 Energie- oder Δ pH-abhängiger Mechanismus (qE)

Der Δ pH-abhängige Mechanismus stellt bei sättigenden Lichtintensitäten aufgrund seiner großen Effizienz bei der thermischen Energiedissipation die Hauptkomponente von NPQ dar (Niyogi, 1999). Er ist strikt vom pH im Thylakoidlumen abhängig und somit innerhalb weniger Minuten reversibel induzierbar, was eine rasche, umkehrbare Herabregulierung der PS II-Aktivität ermöglicht (Krause und Jahns, 2004).

Das heutige Verständnis des qE-Mechanismus beruht im Wesentlichen auf der Charakterisierung zahlreicher Mutanten mit reduziertem NPQ aus *Arabidopsis thaliana*, *Clamydomonas reinhardtii* und Tabak (Krause und Jahns, 2004). Demnach sind für die Ausbildung von qE der luminaire pH (Munekage et al., 2001; Jahns et al., 2002; Maiwald et al., 2003), die Bildung von Zx (Niyogi et al., 1997a; 1998; Verhoeven et al., 2001) und Konformationsänderungen in der PS II-Antenne essentiell (Abbildung 7; Govindjee, 2002; Krause und Jahns, 2003). Verschiedene Untersuchungen deuten zudem auf eine Beteiligung der Carotinoide Ax (Gilmore et al., 1998; Gilmore und Yamamoto, 2001) und Lut (Pogson et al., 1998; Bungrad et al., 1999; Niyogi et al., 1997b; 2001; Garcia-Plazaola et al., 2003) an der Δ pH-abhängigen Löschung hin.

Die minoren Antennenproteine CP24, CP26 und CP29 werden in zahlreichen Studien als der Ort in der PS II-Antenne favorisiert, an dem die Energie-abhängige Löschung stattfindet (Krause und Jahns, 2004; Holt et al., 2004). Zum einen nehmen sie eine regulatorische Schlüsselposition zwischen der *core*-Antenne (CP43, CP47) und den peripheren LHC II-Trimeren ein (Abbildung 2; Jansson, 1994; Voigt et al., 2002; Yakushevskaya et al., 2003). Zum anderen ist ein Großteil der photoprotektiv wirksamen Xanthophyll-Zykluspigmente mit den minoren Antennenproteinen assoziiert (Morosinotto et al., 2003). Ferner weist die Kinetik der Deepoxidation in diesen Komplexen eine enge Korrelation mit der Dynamik des qE-Mechanismus auf (Färber et al., 1997). Weitere wichtige Hinweise lieferten Bindungsstudien mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD), einem Inhibitor der Δ pH-abhängigen Fluoreszenzlösung (Ruban et al., 1992). Dieses ist zwar in der Lage mit fast allen CAB-Proteinen zu reagieren, jedoch konnte alleine an CP26 und CP29 eine Bindung von DCCD unter qE-inhibierenden Bedingungen beobachtet werden (Walters et al., 1994; 1996; Pesaresi et al., 1997). *In vitro*-Experimente an isolierten Antennenproteinen zeigten außerdem, dass eine Zx-induzierte Fluoreszenzlösung nur an monomeren LHCs, wie z.B. CP29, erfolgt (Wentworth et al., 2000). Allerdings musste die Vorstellung einer exklusiven Funktion der minoren Antennenproteine im qE-Mechanismus aufgrund einer Studie an *A. thaliana*, denen einzelne minore LHCs fehlten, relativiert werden (Andersson et al., 2001).

Untersuchungen an *npq5*-Mutanten lassen auf eine essentielle Beteiligung des LHC II an der Energie-abhängigen Löschung in *C. reinhardtii* schließen (Elrad et al., 2002). Eine Übertragbarkeit dieses Befundes auf höhere Pflanzen erscheint allerdings unter Berücksichtigung einer vergleichbaren Arbeit an LHC II-defizienten *A. thaliana*-Pflanzen fraglich (Govindjee, 2002; Andersson et al., 2003).

Einen grundlegend neuen Aspekt für den molekularen Mechanismus der Δ pH-abhängigen Löschung lieferte die Analyse von PsbS-defizienten *npq4*-Mutanten aus *A. thaliana* (Li et al., 2000). Das Fehlen der 22 kDa großen Untereinheit des PS II verursachte einen vollständigen Verlust von qE und der mit ihr verknüpften, charakteristischen Δ pH-induzierten Absorptionsänderung bei 535 nm (ΔA_{535}) (Kim et al., 1992; Li et al., 2000; Peterson und Havir, 2000). Weiterführende Studien konnten sowohl eine stöchiometrische Abhängigkeit der Kapazität der Energie-abhängigen Löschung von der Menge des vorhandenen PsbS, als auch eine elementare Bedeutung von zwei Lumen-exponierten, protonierbaren Glutamatresten für die qE-Funktion des Proteins dokumentieren (Li et al., 2002a; b; c; d). Offensichtlich liegt das PsbS als Dimer vor, wobei dieser Aggregationszustand allerdings vom luminalen pH abhängig ist (Bergantino et al., 2003). Im Zuge der Licht-induzierten Ansäuerung des Thylakoidlumens wird das PsbS-Dimer in seine monomeren Bestandteile überführt (Bergantino et al., 2003). Diese sind zwischen Kernkomplex und peripherer Antenne lokalisiert (Nield et al., 2000; Thidholm et al., 2002; Dominici et al., 2002). Eine früher postulierte permanente Pigmentierung des PsbS ist aufgrund neuerer Studien umstritten (Funk et al., 1995; Dominici et al., 2002; Aspinall-O'Dea et al., 2002). Jedoch konnte *in vitro* die Assoziierung von 2 Zx pro PsbS-Protein gezeigt werden, was mit einer PsbS-abhängigen ΔA_{535} durch 2 Zx pro PS II in Einklang steht (Aspinall-O'Dea et al., 2002; Ruban et al., 2002). In Analogie zu den minoreren Antennenproteinen besitzt auch das PsbS-Protein die Fähigkeit DCCD *in vitro* zu binden (Li et al., 2004). Diese Befunde machen das PsbS-Protein ebenfalls zu einem potentiellen Kandidaten für die *quenching site* der Δ pH-abhängigen Energiedissipation (Krause und Jahns, 2004; Holt et al., 2004).

Nicht nur der Ort der Δ pH-abhängigen Energiedissipation ist umstritten, sondern auch der zugrunde liegende molekulare Mechanismus (Krause und Jahns, 2004). So gibt es für die Funktion des Zx zwei alternative Modelle, die als direkter bzw. indirekter Lösungsmechanismus bezeichnet werden (Holt et al., 2004). In dem direkten Modell geht man von einer unmittelbaren Fluoreszenzlöschung durch Zx aus (Gilmore und Yamamoto, 1993; Demmig-Adams et al., 1996). Aufgrund eines niedrigeren Energieniveaus ist Zx in der Lage, die Energie vom angeregten $^1\text{Chl}^*$ (und $^3\text{Chl}^*$) zu übernehmen (Frank et al., 1994; Polivka et al.,

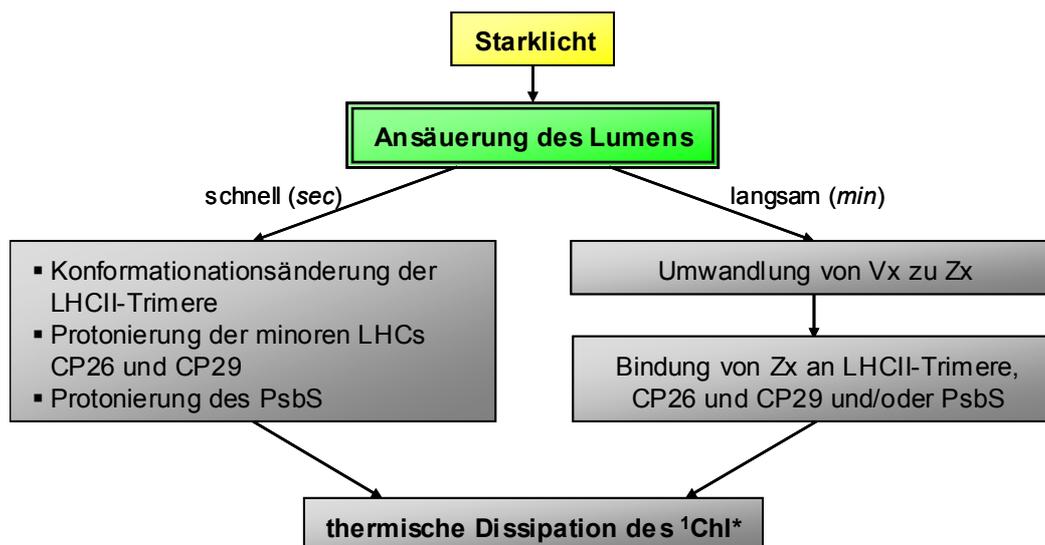


Abbildung 7: Modell der ΔpH -abhängigen thermischen Energiedissipation in höheren Pflanzen und Grünalgen. Die Starklicht-induzierte Ansäuerung des Thylakoidlumens stimuliert eine Veränderung der PS II-Antenne, die die thermische Energiedissipation fördert. Der genaue Mechanismus ist bislang unklar, umfasst aber zum einen die Protonierung von LHC II-Trimeren, den minoren Antennenproteinen CP26 und CP29 und/oder dem PsbS-Protein. Zum anderen wird die Deepoxidation von Vx induziert. Das gebildete Zx ist entweder direkt oder indirekt an der thermischen Energiedissipation beteiligt.

1999; Ma et al., 2003; Holt et al., 2005). Für einen solchen Singulett-Singulett-Energietransfer von Chl auf Zx ist jedoch eine sehr enge räumliche Annäherung der beiden Pigmente notwendig, weshalb eine direkte Beteiligung des PsbS am Lösungsmechanismus aufgrund fehlender Chl unsicher erscheint (Holt et al., 2004).

Das indirekte Modell basiert auf dem strukturellen Unterschied der Xanthophylle und ordnet Zx eine eher passive Funktion bei der Energiedissipation zu (Horton et al., 1996; Holt et al., 2004). Demnach kommt es durch die Protonierung bestimmter Lumen-exponierter Aminosäurereste in Kombination mit der Assoziierung von Zx zu Konformationsänderungen verschiedener LHCs in der PS II-Antenne, was zu einer Ausbildung und Interaktion spezieller Chl a-Dimere in den jeweiligen LHCs führt (Horton et al., 1999; Horton et al., 2000). Die eigentliche Deaktivierung des angeregten $^1\text{Chl}^*$ erfolgt hier über Chl-Chl-Wechselwirkungen (Krause und Jahns, 2004). Dieses Modell steht in Einklang mit den jüngsten *in vitro*-Studien an LHC II-Monomeren von Wentworth et al. (2003; 2004).

1.3.4.3 Photoinhibition (qI)

Unter dem Begriff Photoinhibition werden alle Inaktivierungsprozesse des PS II zusammengefasst, deren Relaxation deutlich langsamer ist (bis zu mehreren Stunden) als bei qT und qE (Übersichtsartikel: Krause, 1994). qI beinhaltet sowohl destruktive als auch regulatorisch schützende Elemente und erfährt seine stärkste Ausprägung, wenn die Kapazität der ΔpH -

abhängigen Energiedissipation ausgeschöpft ist (Abbildung 5; Krause und Jahns, 2004). Dies ist vor allem bei extremem oder langanhaltendem Lichtstress der Fall, besonders in Kombination mit anderen Stressfaktoren wie Frost, Hitze und Trockenheit (Krause, 1994). Der Übergang von Energie-abhängiger zur photoinhibitorischer Löschung scheint dabei fließend zu sein (Öquist et al., 1992; van Wijk und van Hasselt, 1993).

Aufgrund von *in vivo*-Studien zur Photoinhibition, die eine zweiphasige Erholungskinetik zeigten, wurde geschlossen, dass qI aus mindestens zwei Komponenten besteht (Leitsch et al., 1994; Thiele et al., 1996). Die langsame Phase wird der photooxidativen Schädigung des D1-Proteins im PS II zugeschrieben, wobei eine Inaktivierung des PS II-RZ von der Donor- bzw. Akzeptorseite diskutiert wird (Übersichtsartikel: Aro et al., 1993; Schnettger et al., 1992; Leitsch et al., 1994). Beide Modelle gehen von einer irreparablen Schädigung des PS II aus, die nur durch den Abbau und Neusynthese des defekten D1-Proteins behoben werden kann (Barber, 1995; Melis, 1999). Mehrere Studien unterstützen die Hypothese, dass es nicht zu einer graduellen Inhibition der photochemischen Aktivität aller PS II-RZ kommt. Vielmehr entsteht eine Population vollständig inaktivierter PS II-Einheiten, während die nicht-betroffenen Photosysteme normal Photosynthese betreiben (Krause et al., 1990; van Wijk et al., 1993; Oja und Laisk, 2000). Die defekten PS II-RZ fungieren als *quenching site* und schützen sowohl benachbarte intakte PS II-Einheiten als auch die eigenen Antennensysteme vor photooxidativer Schädigung, indem sie die Anregungsenergie thermisch dissipieren (Lee et al., 1999; 2001; Krause und Jahns, 2004).

Die schnelle Phase des qI ist nach $t_{1/2} = 30$ min abgeschlossen und unabhängig vom D1-*turnover* (Leitsch et al., 1994; Thiele et al., 1996). Aufgrund der engen Korrelation zwischen der Erholung des qI mit der Epoxidation des Zx, wurde auf eine Beteiligung des Xanthophyll-Zyklus am qI-Mechanismus geschlossen (Demmig-Adams und Adams, 1996; Thiele et al., 1996). Als Wirkort wird eine Bindung des Zx mit den Antennenproteinen des PS II diskutiert, wobei sich die Bindestellen von denen des qE-Mechanismus unterscheiden (Krause und Jahns, 2004). Die Assoziierung des Zx an die LHCs führt zur Bildung eines Lösungskomplexes, der auch nach Relaxation des transmembranen ΔpH im Dunkeln noch aktiv ist. Ein Grund könnte eine verlangsamte Epoxidation sein, die durch tiefe Temperaturen oder eine Aufrechterhaltung des ΔpH im Dunkeln, infolge einer langanhaltenden ATP-Hydrolyse, verursacht wird (Jahns und Miesch, 1996; Gilmore, 1997). In einem alternativen Modell wird qI durch die Protonierung bestimmter Proteindomänen in der Thylakoidmembran verursacht, die zu stabilen Konformationsänderungen führen (Ruban und Horton, 1995; Pan und Dilley, 2000).

1.3.5 Funktion und Synthese des α -Tocopherols

Tocopherole sind lipophile Antioxidantien mit einer amphipatischen Molekülstruktur, die exklusiv in Photosynthese-betreibenden Organismen wie Pflanzen, Algen und einigen Cyanobakterien synthetisiert werden (Sattler et al., 2003). Ihre hydrophobe Phytyl-Seitenkette ist in der Lipidmembran integriert, während der polare Chromanol-Kopf auf der Membranoberfläche mit anderen, zytosolischen Molekülen interagieren kann (Fryer, 1992; Hofius und Sonnewald, 2003). Die vier natürlich vorkommenden Tocopherol-Derivate (α , β , γ , δ) differieren lediglich in der Anzahl und Position der Methyl-Substituenten am Chromanol-Ring (Abbildung 8; Dörmann, 2003; Sattler et al., 2004). Neben den Tocopherolen enthält pflanzliches Gewebe auch Tocotrienol-Derivate (α , β , γ , δ), die sich nur durch eine ungesättigte Seitenkette (Geranylgeranyl- statt Phytylrest) von den entsprechenden Tocopherolen unterscheiden (Abbildung 8; Dörmann, 2003; Sattler et al., 2004). Beide Tocochromanol-Gruppen werden unter dem Begriff Vitamin E zusammengefasst (Falk et al., 2003).

Bei Pflanzen variiert der Gehalt der Tocochromanol-Derivate sowohl qualitativ als auch quantitativ zwischen verschiedenen Gewebetypen und Spezies (Halliwell, 1981; Wise und Naylor, 1987; Tanaka et al., 1999). Während α -Tocopherol das dominante Vitamin E-Derivat in den Thylakoiden darstellt (Fryer, 1992; Havaux et al., 2003), überwiegt γ -Tocopherol in den Samen dikotyler bzw. Tocotrienole in den Samen monokotyler Pflanzen (Shintani und DellaPenna, 1998; Cahoon et al., 2003). Der Tocopherol-Gehalt ist darüber hinaus vom Entwicklungsstand der Pflanze und verschiedenen Umweltbedingungen, wie der Lichtintensität, Temperatur, Trockenheit und Schadstoffbelastung abhängig (Fryer, 1992).

Zwar besitzen *in vitro* alle Tocochromanol-Derivate eine antioxidative Wirkung, jedoch stellt α -Tocopherol das effizienteste Antioxidans der Vitamin E-Fraktion dar (Sattler et al., 2004).

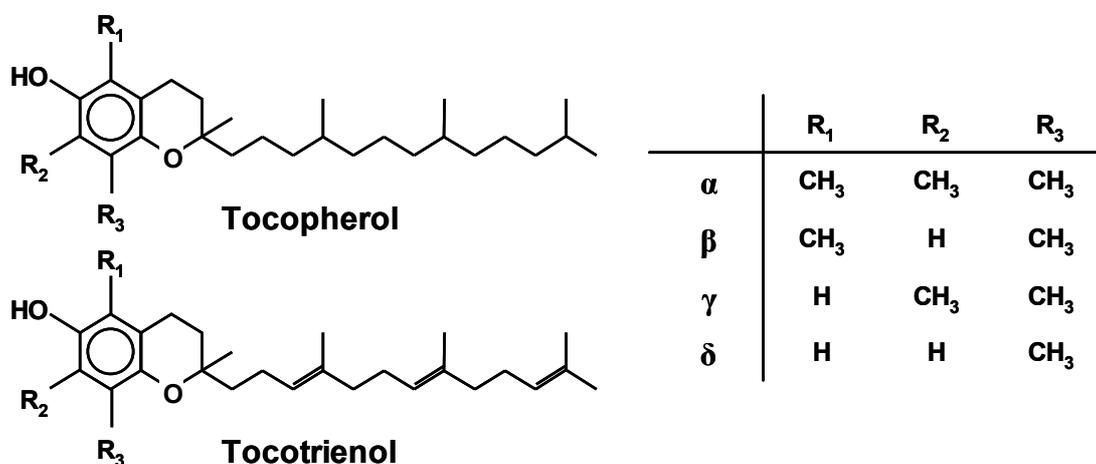


Abbildung 8: Struktur der natürlich vorkommenden Tocopherol- und Tocotrienol-Derivate.

Die physiologische Bedeutung der Vitamin E-Derivate ist für menschliche und tierische Gewebe schon lange bekannt und wurde intensiv erforscht (Havaux et al., 2003; Sattler et al., 2003). Obwohl eine vergleichbare physiologische Bedeutung der Tocopherole als Antioxidantien auch für pflanzliche Gewebe angenommen werden muss, ist die exakte Funktion von Vitamin E in Pflanzen bislang unbekannt (Porfirova et al., 2002; Havaux et al., 2003; Sattler et al., 2003). Die folgenden Erkenntnisse wurden daher im Wesentlichen aus *in vitro*-Experimenten und tierischen Systemen gewonnen. Tocopherole können $^1\text{O}_2^*$ entfernen, indem sie als Radikalfänger fungieren (Abbildung 6; Fryer, 1992). Dabei wird der O_2 gebunden und das Tocopherol-Molekül irreversibel zerstört (Neely et al., 1988). Die Wirksamkeit der Entgiftung nimmt von α über β und γ zu δ -Tocopherol kontinuierlich ab (Neely et al., 1988), was sich in ihrer Präsenz in der Thylakoidmembran widerspiegelt (Asada und Takahashi, 1987). Ebenso vermag α -Tocopherol $\bullet\text{O}_2^-$, $\text{HO}_2\bullet$ und $\bullet\text{OH}$ sehr effizient chemisch zu binden (Abbildung 6; Fukuzawa und Gebicki, 1983). Aus dem Intermediate 8-Hydroperoxy- α -Tocopheron entsteht dabei ein Gemisch aus α -Tocopherylquinon und 2,3-Epoxy-Tocopherylquinon (Trebst, 2003). Obwohl das Entfernen von $^1\text{O}_2^*$ durch α -Tocopherol unstrittig ist, ist das Ausmaß der Entgiftung von ROS *in vivo* in Membranen noch unbekannt (Fryer, 1992). In Analogie zu den Carotinoiden sind auch Tocopherole in der Lage angeregten $^1\text{O}_2^*$ physikalisch sehr effizient zu deaktivieren (Abbildung 6; Sattler et al. 2004). So kann ein α -Tocopherol-Molekül bis zu 120 Moleküle $^1\text{O}_2^*$ durch Resonanzenergietransfer in den Grundzustand überführen, bevor es selbst abgebaut wird (Fahrenholtz et al., 1974).

Eine weitere Hauptfunktion von α -Tocopherol besteht in der Terminierung von radikalischen Kettenreaktionen in Biomembranen, die durch Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren ausgelöst werden (Fryer, 1992; Havaux et al., 2003). Durch die Reduzierung der Lipidperoxyl-Radikale durch α -Tocopherol kommt es zur Bildung sogenannter α -Chromanoxyl-Radikale, die durch eine direkte Interaktion mit Ascorbat oder Glutathion reduziert werden (Liebler et al., 1986; Wefers und Sies, 1988). Die dabei gebildeten Monodehydroascorbat- und Glutathion-Radikale werden ihrerseits durch NADH oder NADPH regeneriert (Asada und Takahashi, 1987). Die antioxidative Wirksamkeit der Tocopherol-Derivate gegen Lipidperoxidation nimmt ebenfalls von α über β und γ zu δ -Tocopherol ab (Fukuzawa et al., 1982).

Ferner moduliert Vitamin E die Permeabilität von Biomembranen für kleine Ionen und Moleküle (Lucy, 1978; Fryer, 1992). Dies ist besonders für mitochondriale und chloroplastidäre Membranen von Bedeutung, da diese über einen elektrochemischen Gradienten zur ATP-Synthese verfügen. Darüber hinaus hat Vitamin E einen signifikanten Einfluss auf die Membranfluidität, ähnlich dem Cholesterol (Fryer, 1992). Jüngste Studien haben gezeigt, dass α -

Tocopherol neben seiner antioxidativen Wirkung noch andere Funktionen besitzt (Sattler et al., 2004). Dazu gehören die Modulation verschiedener Signaltransduktionswege und die Regulation der Transkription (Übersichtsartikel: Azzi et al., 2002).

Die Tocopherol-Biosynthese (Abbildung 9) bezieht ihre Substrate aus zwei separaten Stoffwechselwegen, der Isoprenoid-Synthese und dem Metabolismus aromatischer Aminosäuren (Sattler et al., 2003). Die Homogentisinsäure (HGA) ist Ausgangspunkt für den zukünftigen Chromanol-Kopf und wird aus *p*-Hydroxyphenylpyruvat im Zytosol gebildet (Garcia et al., 1999). Die spätere Tocopherol-Seitenkette entsteht aus Phytyldiphosphat (PhyPP) des 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Weges in den Chloroplasten (Lichtenthaler, 1998). Die restlichen Schritte der Tocopherolbiosynthese finden alle an der inneren Chloroplasten-hüllmembran statt und beinhalten die Prenylierung der HGA, sowie eine Zyklisierung und zwei Methylierungen des Intermediates 2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzochinol (Collakova und DellaPenna, 2001; Tsegaye et al., 2002; Falk et al., 2003; Porfirova et al., 2002; Sattler et al., 2003). Ein Schlüsselenzym für die Tocopherolbiosynthese ist offenbar die Geranylgeranyl-Reduktase (CHL P), die das Sesquiterpen Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) zu PhyPP reduziert (Abbildung 9; Tanaka et al., 1999). So führte eine Verminderung der CHL P-Aktivität in transgenen Tabakpflanzen zu einer deutlichen Reduzierung des α -Tocopherol-Gehaltes (Tanaka et al., 1999).

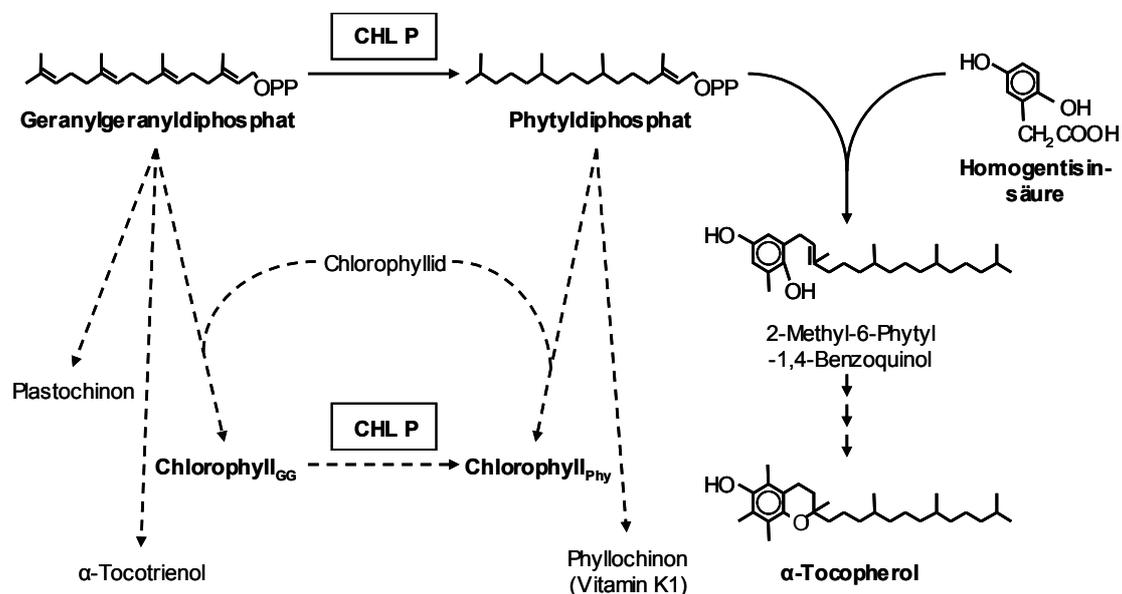


Abbildung 9: Die Biosynthese des α -Tocopherols ausgehend vom Geranylgeranyldiphosphat. Dieses wird durch die Geranylgeranyl-Reduktase (CHL P) zu Phytyldiphosphat (PhyPP) reduziert. Durch die Prenylierung der Homogentisinsäure entsteht zunächst das Intermediat 2-Methyl-6-Phytyl-1,4-Benzochinol, und schließlich α -Tocopherol. Das PhyPP ist darüber hinaus Substrat für die Phytylchlorophyll-, Plastochinon- und Chlorophyll-Synthese, angedeutet durch die gestrichelten Pfeile. CHL P vermag nach Tanaka et al. (1999) auch geranylgeranyliertes Chlorophyll (Chlorophyll_{GG}) in phytyliertes (Chlorophyll_{Phy}) zu überführen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische Bedeutung des Antioxidans α -Tocopherol und des Mechanismus der Δ pH-abhängigen Energielöschung (qE) für den Schutz gegenüber photooxidativem Stress in höheren Pflanzen untersucht werden. Hierfür wurden Mutanten mit Defekten in der Tocopherol-Biosynthese (*CHL P*-Antisense-Pflanzen in *Nicotiana tabacum*) bzw. in der Δ pH-regulierten Energiedissipation (PsbS- bzw. CP29-defiziente Mutanten in *Arabidopsis thaliana*) verwendet.

Da die verminderte Geranylgeranyl-Reduktaseaktivität in den Vitamin E-defizienten *CHL P*-Antisense-Pflanzen zu einer signifikanten Akkumulation von geranylgeranyliertem Chl (Chl_{GG}) führte (Tanaka et al., 1999), sollte zunächst geklärt werden, wie sich der Einbau des Chl_{GG} auf die Funktion und Stabilität der CAB-Proteine und somit auf die Photosyntheseleistung der Tabakpflanzen auswirkt. Anhand von *in vitro*-Experimenten sollte überprüft werden, ob es infolge der Reduktion des protektiven α -Tocopherols in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen zu einer vermehrten Bildung von ROS kommt. Schließlich sollten die Konsequenzen des Vitamin E-Verlustes bei Lichtstress auf die Photosynthese *in vivo* anhand der Aktivität und Integrität des PS II bestimmt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen einer reduzierten Δ pH-abhängigen Energiedissipation (qE) bei photooxidativem Stress auf die Photosyntheseleistung und Vitalität von höheren Pflanzen untersucht werden. Aufgrund seiner essentiellen Bedeutung für den qE-Mechanismus (Li et al., 2000), kam hierfür ein PsbS-defizientes Modellsystem aus *A. thaliana* zum Einsatz. Vorab sollten mögliche Effekte des Verlustes des PsbS auf die Assemblierung und Funktionalität der Elektronentransportkette überprüft werden.

Neben dem PsbS favorisieren zahlreiche Studien eine Beteiligung der minoreren Antennenproteine des PS II am qE-Mechanismus (Krause und Jahns, 2004). Infolgedessen sollte die Relevanz des minoreren Antennenproteins CP29 für die thermische Dissipation überschüssiger Anregungsenergie analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte zunächst ein CP29-defizientes Modellsystem mittels Antisense-Technik bzw. T-DNA-Insertion etabliert und anschließend charakterisiert werden. Neben einer Überprüfung der PS II-Struktur und Aktivität standen mögliche Veränderungen des qE-Mechanismus infolge eines CP29-Verlustes im Mittelpunkt des Interesses. Abschließend sollten die Konsequenzen einer möglichen modifizierten Δ pH-abhängigen Energielöschung bei Lichtstress auf die Photosyntheseleistung der CP29-defizienten Pflanzen *in vivo* analysiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten, sofern nicht anders angegeben, p.a.-Qualität und wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL (Eggenstein), Janssen Chimica (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Novagene-Calbiochem (Madison, USA), Riedel-deHaën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München) bezogen. Sämtliche Antibiotika stammten von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München).

2.1.2 Enzyme

Enzyme und die entsprechenden Reaktionspuffer wurden von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt a.M.), Qbiogene (Illkirch, Frankreich), Roche Diagnostics (Mannheim), Stratagene (Heidelberg) und TaKaRa Biomedicals (Shiga, Japan) bezogen.

2.1.3 Bakterienstämme

Es wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet: *Escherichia coli* DH5 α F' (Gibco BRL, Eggenstein), *E. coli* DH5 α -ME (Invitrogen, Carlsbad, USA), *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg), *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, Carlsbad, USA), *E. coli* EZ (Qiagen, Hilden), *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 (pGV2260) (Deblaere et al., 1985).

2.1.4 Plasmide

Für Standard-Klonierungen wurde der Vektor pBluescript KS II+ (Stratagene, Heidelberg) verwendet. PCR-Produkte mit 3'-überhängendem Desoxyadenosin wurden in die Vektoren pDrive (Qiagen, Hilden) bzw. pCR[®]2.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit 5'-Uracil- bzw. 5'-Thyminüberhang kloniert. Für Agrobakterien-vermittelte Pflanzentransformationen fand der Vektor pBinAR-TX Verwendung (freundlicherweise von B. Grimm, Berlin, zur Verfügung gestellt). Bei diesem handelt es sich um ein Derivat des pBin19-Vektors (Höfgen und

Willmitzer, 1990). Er enthält eine Kasette des pUC18-Vektors für die Expression chimärer Gene in Pflanzen mit CaMV S35-Promotor und dem Terminator des Octopinsynthese-Gens.

2.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer), einschließlich der jeweiligen Zielgene und des Verwendungszwecks. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen und sind in 5'→3'-Orientierung dargestellt. Restriktionsschnittstellen für gerichtete Klonierungen sind unterstrichen.

Primer	Sequenz	Verwendung
Lhcb4NTXbal	ATTGTATCTAGAAATGGCTACCGCAG CTGCCAC	Gerichtete Klonierung der <i>Lhcb4</i> -cDNA aus <i>Nicotiana tabacum</i> (Graßes, 1999) durch Einfügen von <i>Xba</i> I- bzw. <i>Eco</i> RV-Restriktionsschnittstellen.
Lhcb4NTEcoRV	GCGCCGGATATCTTAAGAGAAGAAG CCGAATG	
pBinARfor	ATGACGCACAATCCCCTATCCTT	Kontroll-PCR zur Insertion der T-DNA in das Genom von <i>N. tabacum</i>
pBinARrev	TTTACAACGTGCACAACAGAATTGA	
Lhcb41for511	ACCGGAAACCAGCAATTTGAGTGAA GCACAAGA	Amplifizierung; Test auf Homozygotie der <i>Lhcb4.1</i> -Allele (At5g01530) in Bezug auf die Disruption durch das <i>DsG</i> -Element (AF433043) in den CP29-defizienten Linien 7 und 15 aus <i>A. thaliana</i>
Lhcb41rev1533	ACTGTAAGAAAGAGAGAGACAGA CGCCAAAG	
DsG6357	ACCATGGACCTGCATATAACCTGCAT ATAACCT	
Anf1out	ATCAACAACCTCTCCTGGCGCACCA	Amplifizierung; <i>nested</i> -Primer für die inverse PCR
Anf1in	TGGAAGTGGCATAAACTTCGGTGAA	
End3in	TCCCGTTTCGTTTTCGTTACCGTGA	
End4out	TATTTTACCGACCGTTACCGACCG	
Gus4531for	CGCCAGGAGAGTTGTTGATTCATTG TTTGCCTC	Amplifizierung des <i>Gus</i> -Gens (AF433043)
Gus6357rev	AGGTTATATGCAGGTTATATGCAGGT CCATGGT	
M13for(-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierung und Amplifizierung
M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
T7promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	
T3promotor	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	
Sp6promotor	GAATTTAGGTGACACTATAG	
M13/pUCrev	AGCGGATAACAATTCACACAAGG	
M13/pUCfor	CCCAGTCACGACGTTGTTAAAACGA	

2.1.6 Antiseren

Tabelle 2: Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antiseren.

Antigen	Spezies	gewonnen aus	Quelle/Referenz	Verdünnung
D1 (PsbA)	<i>Spinacia oleracea</i>	Kaninchen	Godde, Bochum	1:1000
Lhca1	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
Lhca2	<i>Hordeum vulgare</i>	Maus	Simpson, Carlsberg, DK	1:1000
Lhca3	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:5000
Lhca4	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
Lhcb1	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
Lhcb2	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:10000
Lhcb3	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
Lhcb4 (CP29)	<i>N. tabacum</i>	Kaninchen	diese Arbeit	1:1000
	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
	<i>Hordeum vulgare</i>	Maus	Simpson, Carlsberg, DK	1:1000
Lhcb5 (CP26)	<i>N. tabacum</i>	Kaninchen	diese Arbeit	1:1000
	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
	<i>Petunia</i>	Kaninchen	Staehelein, Colorado, USA	1:100
Lhcb6 (CP24)	<i>N. tabacum</i>	Kaninchen	diese Arbeit	1:1000
	<i>A. thaliana</i>	Kaninchen	Jansson, Umeå, S	1:1000
PsbS	<i>Spinacia oleracea</i>	Kaninchen	Herrmann, München	1:1000

Als sekundärer Antikörper kamen anti-Kaninchen-IgG- bzw. anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugate der Firmen Calbiochem (Madison, USA) und Sigma-Aldrich (München) zum Einsatz (Verdünnung 1:10000).

2.1.7 Saatgut

Saatgut der Wildtyp-Tabakpflanzen (*N. tabacum*; Varietät Samsun NN) und den transgenen *CHL P*-Antisense-Linien 6, 10 und 20 (Tanaka et al., 1999) wurden freundlicherweise von B. Grimm, Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Mutante GT5588 stammte aus einer Transposon-mutagenisierten *A. thaliana*-Kollektion des Ökotyps Landsberg *erecta* (Sundaresan et al., 1995; Springer et al. 1995), und wurde vom Cold Spring Harbor (CSH) Laboratory bezogen. Saatgut der *A. thaliana*-Ökotypen Landsberg *erecta* und Columbia 0 wurden dankend von U. Höcker bzw. K. Meyerhoff, Düsseldorf, entgegen genommen. Die *psbs-1*-Mutante (Graßes et al., 2002) gehörte zu einer *A. thaliana*-Population, Ökotyp Columbia 0, die mit dem transposablen *En-1*-Element mutagenisiert wurde (Wisman et al., 1998a; b). Saatgut der germinalen *psbs-1.3*-Revertante wurde freundlicherweise von D. Leister, MPI Köln, zur Verfügung gestellt.

2.2 Pflanzenanzucht

2.2.1 Sterile Anzucht von *N. tabacum*-Keimlingen

Saatgut von *N. tabacum* wurde für 45 sec mit 70%igen Ethanol und für 5 min mit 30%igen Dan Klorix (Colgate-Palmolive GmbH, Hamburg) oberflächensterilisiert. Nach jedem der beiden Sterilisationsschritte wurden die Samen mit sterilem H₂O viermal gewaschen. Anschließend wurden die Samen auf Petrischalen mit 2MS-Medium aus 4,43 g/l MS-Salz (Murashige und Skoog, 1962), 0,5 g/l MES/NaOH, pH 5,7, 8 g/l BiTek-Agar mit wahlweise 50 µg/ml Kanamycin überführt, vereinzelt und überschüssiges H₂O abgesaugt. Bei der Verwendung von MS-Basalmedium wurden dem 2MS-Medium 5 ml einer sterilfiltrierten Vitaminlösung zugesetzt. Diese bestand aus 4g/l myo-Inositol, 0,1 g/l Nicotinsäureamid, 0,02 g/l Pyridoxin-HCl (Vitamin B₆), und 0,08 g/l Thiamin (Vitamin B₁). Die mit Parafilm umschlossenen Platten wurden in einer *in vitro*-Kammer bei Schwachlicht (14 h, PFD von 25 bis 50 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ Weißlicht; Philips, TLD 58W/86 und 65W/25RS) und 24°C gelagert. Die Keimlinge wurden nach ca. 14 Tagen in Glasgefäße (Weck GmbH, Wehr) mit 2MS-Agar überführt, in Sterilkultur gehalten (vgl. 2.3.7) und bei ausreichender Bewurzelung auf Erde gepflanzt.

2.2.2 Anzucht von *N. tabacum* auf Erde

Gewebekulturpflanzen wurden sorgfältig von Medium befreit und auf ein Erde-Sandgemisch im Verhältnis 3:1 gesetzt (Floraton, Floragrad, Oldenburg). Zur Akklimatisierung an die Gewächshausbedingungen wurden die frisch umgesetzten Pflänzchen zunächst 7 Tage in einem Kleingewächshaus bei 24°C und 85% Luftfeuchtigkeit im Schwachlicht (100 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) angezogen. Bis zur Samenbildung erfolgte die Kultivierung im Gewächshaus bei 24°C und 65% Luftfeuchtigkeit. Die Belichtungsdauer betrug 14 h bei einer PFD von etwa 100 bzw. 400 µmol Photonen m⁻² s⁻¹ (LL- bzw. HL-Pflanzen) (Queckersilber- und Natriumdampflampen HPL, SON, SON-T, Philips). Während der Anzucht wurden die Tabakpflanzen mehrmals umgetopft und gedüngt. Für alle Experimente wurden das 4. bis 7. Blatt von 6 bis 9 Wochen alten Pflanzen verwendet. Zur Saatgutgewinnung wurden die Blütenstände kurz vor der Blütenöffnung mit Pergamenttüten an der Pflanze verpackt, nach der Samenreife mitsamt Tüten abgeschnitten, die Kapseln getrocknet und die Samen im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.3 Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

Vor der Anzucht im Gewächshaus wurde Saatgut von *A. thaliana* auf Komposterde (Floraton, Floragrad, Oldenburg) ausgelegt und zur Synchronisation der Keimung für 48 h bei 4°C inkubiert. Nach der Akklimatisierung an die Gewächshausbedingungen in einem Kleingewächshaus (vgl. 2.2.2) wurden die Pflanzen nach 14 Tagen durch Pikieren vereinzelt und bei 24°C und 65% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Belichtungsdauer betrug 14 h bei einer PFD von 150 bzw. 600 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LL- bzw. HL-Pflanzen) (Queckersilber- und Natriumdampflampen HPL, SON, SON-T, Philips). Für die DNA- bzw. RNA-Isolation wurde Blattmaterial von 3 bis 4 Wochen alten Pflanzen geerntet, während für physiologische Experimente 5 bis 6 Wochen alte Pflanzen Verwendung fanden. Für die Saatgutgewinnung kamen Aracons (Arasystems, Gent, Belgien) zum Einsatz. Die Kultivierung in Klimakammern erfolgte gemäß Graßes et al. (2002).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Medien und Anzucht von *E. coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* wurden in LB-Medium mit 10 g/l Bacto-Trypton oder Pepton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl bei 37°C üN auf einem Rundschtüttler mit 220-250 upm angezogen. Für die Selektion auf eine Plasmid-kodierte Antibiotika-Resistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten 1,5% (w/v) Agar.

2.3.2 Medien und Anzucht von *A. tumefaciens*

Agrobakterien wurden in 2YT-Medium aus 16 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl/NaOH pH 7,0, bei 28°C üN auf Rundschtütlern bei 200 upm kultiviert. Rifampicin (100 $\mu\text{g/ml}$) und ein der plasmidkodierten Antibiotika-Resistenz entsprechendes Antibiotikum wurden dem Medium beigelegt. Feste Nährmedien wiesen zusätzlich 1,5% (w/v) Agar auf.

2.3.3 Transformation von *E. coli*

Nach der RbCl-Methode hergestellte gefrierkompetente *E. coli*-Zellen (Hanahan, 1985) wurden mit Hilfe der Hitzeschockmethode (Hanahan et al., 1991) mit Plasmid-DNA transformiert und auf LB-Agarplatten (2.3.1) ausgestrichen. Als Indikator wurden den festen Medien bei Bedarf 60 $\mu\text{g/ml}$ IPTG und 60 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal zugefügt.

2.3.4 Transformation von *A. tumefaciens*

Die Transformation von kompetenten *A. tumefaciens*-Zellen (2.3.5) wurde nach einer *freeze-thaw*-Methode, angelehnt an Höfgen und Willmitzer (1988), durchgeführt. Ein Aliquot der Agrobakterien wurde mit 1 bis 3 µg Plasmid-DNA versetzt und sukzessive für 5 min auf Eis, in flüssigem N₂ und bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 500 µl vorgewärmtem 2YT-Medium (2.3.2) versetzt, für 3 h bei 28°C geschüttelt, auf 2YT-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für ca. 2 Tage bei 28°C im Dunkeln inkubiert.

2.3.5 Herstellung von kompetenten *A.tumefaciens*-Zellen

Mittels 10 ml einer üN-angezogenen *A. tumefaciens*-Vorkultur wurden 200 ml 2YT-Medium (2.3.2) mit 100 µg/ml Rifampicin inokuliert und bis zu einer OD von 0,8 bei 28°C und 200 upm angezogen. Die Bakteriensuspension wurde bei 4°C mit 3000 g für 20 min zentrifugiert, das Pellet in 10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 20 ml 2YT-Medium aufgenommen, aliquotiert (500 µl), in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.6 Transformation von *N. tabacum*

Die Transformation von Tabak erfolgte durch einen Agrobakterien-vermittelten Gentransfer (Horsch et al., 1985). ÜN-Kulturen der mit den entsprechenden Plasmiden (2.1.4) transformierten Agrobakterien (2.3.5) wurden abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml 2YT-Medium aufgenommen. Von 3 Wochen alten, in Sterilkultur angezogenen Tabakpflanzen wurden 100 etwa 1 cm² große Blattstücke kurz in der Agrobakteriensuspension eingetaucht, von überschüssiger Bakterienlösung befreit, auf 2MS-Agarplatten (2.2.1) ohne Selektionsmarker ausgelegt und für 2 Tage im Dunkeln in einer *in vitro*-Kammer inkubiert.

2.3.7 Regeneration von transgenen Pflanzen in Sterilkultur

Nach der Transformation wurden die Blattscheiben zur Kallusbildung auf Petrischalen mit 2MG-Medium aus 4,43 g/l MS-Salz (Murashige und Skoog, 1962), 16 g Glucose, 0,5 g/l MES/NaOH, pH 5,7, 6 g/l BiTek-Agar, 50 mg/l Kanamycin und 500 mg/l Betabactyl überführt und in einer *in vitro*-Kammer bei Schwachlicht (14 h, PFD von 25 bis 50 µmol Photonen m⁻² s⁻¹) und 24°C kultiviert. Bis zur Regeneration von ca. 1 cm langen Sprossen wurden die Kalli wöchentlich auf frische Platten bzw. in Glasgefäße (Weck GmbH, Wehr) mit 2MG-Agar umgesetzt. Anschließend wurden die Sprossen abgeschnitten und auf 2MS-Agar (2.2.1) mit 20 g/l Saccharose, 50 mg/l Kanamycin, 250 mg/l Betabactyl in Weckgläser

überführt. Das 2MS-Medium wurde dabei alle 2 bis 3 Wochen erneuert. Ca. 2 Monate nach der Transformation wurde das 2MS-Medium zur Induktion der Wurzelbildung mit 1 mg/l 6-Benzylaminopurin und 0,2 mg/l Naphylessigsäure versetzt.

Zur Untersuchung der Primärtransformanten wurde die Sprossspitze der transgenen Linien abgeschnitten, um ein Duplikat zu behalten. Erst nach erneuter Wurzelbildung wurden die Tabakpflanzen auf Erde gepflanzt, während das Duplikat als Sterilkultur erhalten blieb.

2.3.8 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA aus 3 bis 4 ml üN-Kulturen erfolgte nach der Methode von Kattori und Sakaki (1986). Bei Bedarf besonders reiner DNA wurde der „GFX Micro Plasmid Prep Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet. Midi-Präparationen von Plasmid-DNA aus 50 ml üN-Kulturen wurden mit dem „QIAGEN Plasmid Midi Kit (25)“ (Qiagen, Hilden) bzw. „NucleoBond® PC 100“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in einer SpeedVac-Zentrifuge (Savant Speed vac® SC110) für 5 bis 10 min getrocknet und in Wasser aufgenommen.

2.3.9 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

100 mg (Frischgewicht) gefrorenes Blattmaterial wurde mit einem Mörser oder einem motorgetriebenen Pistill (Heidolph RZR 2051control) unter flüssigem N₂ aufgeschlossen und die genomische DNA gemäß Liu et al. (1995) oder nach der „CTAB-Methode“ beschrieben in Weigel und Glazebrook (2002) isoliert. Wahlweise kam auch der „DNeasy® Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) zum Einsatz. Die Integrität der DNA wurde mittels 0,8%iger Agarosegele (2.3.15) überprüft und spektralphotometrisch quantifiziert (2.3.11).

2.3.10 Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzen

Für die Präparation von Gesamt-RNA wurde etwa 100 mg (Frischgewicht) gefrorenes Blattmaterial mittels Mörser unter flüssigem N₂ aufgeschlossen und die RNA mittels eines Reagenziensatzes „RNeasy® Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) gemäß der Herstellerangaben isoliert. Die Integrität der RNA wurde anhand nativer 1,2%iger Agarosegele (2.3.15) kontrolliert und spektralphotometrisch quantifiziert (2.3.11).

2.3.11 Spektralphotometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde spektralphotometrisch bei 260 nm (DU 640 Spektralphotometer, Beckmann) ermittelt (Sambrook et al., 1989). Bei reinen Nukleinsäurelösungen sollte der Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ größer 1,8 für DNA bzw. 2,1 für RNA liegen. Eine Extinktion von $E_{260\text{nm}} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

2.3.12 Restriktion von DNA

Plasmid- und genomische DNA wurde für analytische Charakterisierungen als auch für präparative Zwecke mittels verschiedener Restriktionsendonukleasen (2.1.2) sequenzspezifisch gespalten. Die Restriktionsansätze wurden nach Angaben der Herstellerfirmen unter Verwendung der mitgelieferten Reaktionspuffer zusammengestellt und für 2 bis 15 h bei entsprechender Temperatur inkubiert.

2.3.13 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung von Religationen linearisierter Vektor-DNA wurden deren endständige 5'-Phosphatgruppen mittels *shrimp*-alkaliner-Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) entfernt. Die Reaktionsansätze wurden nach den Angaben der Herstellerfirma unter Verwendung des mitgelieferten Puffers zusammengestellt, für 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert und das Enzym für 15 min bei 65°C inaktiviert.

2.3.14 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierter Vektor-DNA erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 in Gegenwart von 1 U T4-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 16°C üN. Die Zusammenstellung der Ligationsansätze richtete sich nach den Herstellerangaben unter Benutzung des entsprechenden Reaktionspuffers. PCR-Produkte mit 3'-überhängendem Desoxyadenosin wurden mittels der Reagenziensätze „TA[®] Cloning Kit“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) und „QIAGEN PCR Cloning Kit“ (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben in die entsprechenden Vektoren (2.1.4) ligiert.

2.3.15 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit einer Größe von 0,2 bis 20 kb wurden durch native Gelelektrophorese (Sambrook et al., 1989) in 0,7 bis 2%igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1xTBE-Puffer aus 10,8g/l Tris, 5,5g/l Borsäure und 0,93 g/l EDTA. Der 10xProbenpuffer bestand aus 50% (w/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau

und 10 mM EDTA. Als Größenstandard dienten die DNA-Marker IV und XIV (Roche Diagnostics, Mannheim) und 1 kb-*Ladder* (New England Biolabs, Frankfurt a. M.). Die angelegte Spannung betrug 50 bis 100 V. Durch die Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu der aufgekochten Agarose-Matrix konnten die aufgetrennten Nukleinsäuren auf einer UV-Transilluminatorplatte (254 nm) detektiert und mittels Imager (LTF-Labortechnik; BioCapt MW1 Software) dokumentiert werden.

2.3.16 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung von Reagenziensätzen „QIAquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen, Hilden) bzw. „NucleoSpin[®] Extrakt“ (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend den Anleitungen der Hersteller eluiert.

2.3.17 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und anschließend mit Isopropanol oder Ethanol präzipitiert. Wahlweise kamen auch die Reagenziensätze „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Qiagen, Hilden) bzw. „NucleoSpin[®] Extrakt“ (Macherey-Nagel, Düren) zum Einsatz.

2.3.18 DNA-Amplifizierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden DNA-Fragmente aus genomischer DNA und Plasmid-DNA mittels der in Tabelle 1 aufgeführten Primer amplifiziert. Um eine gerichtete Klonierung der amplifizierten Fragmente zu ermöglichen, wurden Primer verwendet, die an ihren 5'-Enden Überhänge mit geeigneten Restriktionsschnittstellen aufwiesen. Sowohl für analytische PCR als auch für Klonierungszwecke wurde *Ex Taq*TM (TaKaRa Biochemicals, Shiga, Japan) verwendet. Die Reaktionsansätze wiesen ein Volumen von 50 µl auf und bestanden aus folgenden Komponenten: 5% DMSO, 1x Reaktionspuffer, dNTP-Mix 250 µM, jeweils 1 µM Primer, ca. 200 ng genomische bzw. 10 ng Plasmid-DNA und 1 bis 4 U Polymerase. Die Amplifizierungen wurden in einem Gradientcycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt und die Reaktionen durch Zugabe der Polymerase während der DNA-Denaturierung gestartet (*hot start* PCR). Die Anzahl der Reaktionszyklen, die *annealing*-Temperaturen und die Elongationszeiten wurden an die spezifischen Schmelztemperaturen der jeweiligen Oligonukleotide bzw. an die Größe des erwarteten Produktes angepasst.

2.3.19 Inverse PCR

Mittels einer inversen PCR sollten die flankierenden Sequenzbereiche um das transposable *DsG*-Element im *Lhcb4.1*-Lokus (At5g01530) der CP29-defizienten Linien 7 und 15 identifiziert werden (3.3.2.1). Das folgende Protokoll orientierte sich an der Methode von Long et al. (1993). Jeweils 3 µg genomische DNA wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, mit Na-Acetat/Isopropanol präzipitiert und mit 50 U *EcoRI* in einem Volumen von 200 µl üN bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde mittels gelelektrophoretischer Auftrennung überprüft und die DNA wurde erneut aufgereinigt und gefällt (s.o.). Ca. 0,5 µg DNA wurden mit 10 U T4-Ligase (2.3.14) üN bei 16°C religiert. Die nunmehr zirkuläre genomische DNA wurde nochmals extrahiert, präzipitiert und schließlich in 15 µl H₂O aufgenommen. Davon wurden 5 µl als Matrize in einer ersten von zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen (2.3.18) mit dem inneren Primerpaar Anf2in/End3in eingesetzt. Die zweite PCR wurde mit den äußeren Primern Anf1out/End4out durchgeführt, wobei 2 µl der ersten Reaktion als Matrize dienten. Die beiden *nested*-Primerpaare (2.1.5) binden im *Gus*-Reportergen bzw. in der *splice donor site* des *DsG*-Elements (vgl. Abbildung 30). Zur Identifizierung der flankierenden Sequenzen um das transposable *DsG*-Element wurde nun das zweite PCR-Produkt in den Vektor pDrive (2.1.4) kloniert und sequenziert.

2.3.20 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen) durchgeführt.

2.3.21 Computerunterstützte Sequenzanalysen

Zur Computer-unterstützten Sequenzanalyse von DNA- und Proteinsequenzen wurde das Programm PC/GENE (Intelli Genetics Inc., Oxford, UK) eingesetzt. Um zu einer gegebenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz ähnliche Sequenzen zu finden wurde der BLAST-Server (Basic Local Alignment Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, Altschul et al., 1997) vom National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) benutzt. Zum Auffinden von bekannten Motiven in Aminosäuresequenzen wurden die Proteinanalyseprogramme vom ExPASy-Server (Expert Protein Analysis System; www.expasy.ch/, Appel et al., 1994) des Swiss Institute of Bioinformatics verwendet. Sequenzvergleiche, sogenannte *alignments*, wurden mit Hilfe des Programms Clustal W 1.81 (Thompson et al., 1994) durchgeführt.

2.3.22 Radioaktive Markierung von DNA durch *random priming*

Die radioaktive Markierung von linearisierten DNA-Fragmente erfolgte mit dem „Random Primers DNA Labeling System“ der Firma Gibco BRL (Eggenstein). 20 bis 30 ng DNA wurden für 5 min bei 100°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Die Reaktionsansätze wurden nach Angaben des Herstellers zusammengestellt und für 1 h bei 25°C inkubiert. Sie enthielten 5 µl [α -³²P]-dCTP (Amersham Bioscience Biotech, Uppsala, Schweden; entspricht 50 µCi; 3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl). Durch die Zugabe von 5 µl 0,2 M Na₂-EDTA, pH 7,5 wurden die Reaktionen abgebrochen und nichtgebundene Nukleotide im Ansatz mit Hilfe von Sepharose-Säulchen („ProbeQuant G50 Micro Columns“, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gemäß des Herstellerprotokolls entfernt. Für die Hybridisierung (2.3.25) wurden die radioaktiv-markierten Sonden für 10 min bei 100°C denaturiert.

Für die Sichtung (*screening*) der *Lhcb4*-Antisense-Tabaklinien (3.3.1) wurde als homologe Sonde eine 1018 bp große *Lhcb4*-cDNA aus *N. tabacum* verwendet (Graßes, 1999). Die Northern-Analysen der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 (3.3.2.3) wurde mit homologen cDNA-Sonden durchgeführt, die durch eine *SalI/NotI*-Restriktion aus folgenden ESTs gewonnen wurden: 120O16 (*Lhcb1.1*), 123A24 (*Lhcb4.1*), 110 J22 (*Lhcb4.2*), 149G3 (*Lhcb4.3*), 105B16 (*Lhcb5*) und 103N19 (*Lhcb6*). Diese wurden vom Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, Ohio, USA) bezogen.

2.3.23 Denaturierende gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Um RNA strukturunabhängig nach dem Molekulargewicht auftrennen zu können, wurden Formamid-haltige denaturierende 1,2%ige Agarosegele verwendet. 1xMOPS-Puffer aus 20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Na-Acetat und 1 mM EDTA diente sowohl als Gel- als auch als Elektrophoresepuffer und wurde je nach Verwendung mit 1,8% (v/v) oder 2% (v/v) Formaldehyd versetzt. Das Gel wurde vor dem Start der Elektrophorese für mindestens 30 min in Elektrophoresepuffer äquilibriert. Die angelegte Spannung betrug 6 V/cm Trennstrecke. Durch die Zugabe von 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zur aufgekochten Agarose konnten nach der Elektrophorese sowohl eine gleichmäßige Beladung des Gels als auch die Integrität der RNA mittels einer UV-Transilluminatorplatte (254 nm) und Imager (LTF-Labor Technik; BioCapt MW1 Software) überprüft werden. Als Größenstandard diente der RNA-Längenstandard III (Roche Diagnostics, Mannheim) und RNA-*Ladder High Range* (Fermentas, St. Leon-Rot). Pro Spur wurden 10 µg mit 5xProbenpuffer versetzte Gesamt-RNA aufgetragen. Vor der Beladung des Gels wurde die RNA für 5 min bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Der verwendete 5xProbenpuffer setzte sich, bezogen auf 10 ml, wie folgt zusam-

men: 16 µl einer gesättigten Bromphenolblau-Lösung, 80 µl 0,5 M EDTA pH 8,0, 720 µl einer 37%igen (12,3 M) Formaldehyd-Lösung, 2 ml Glycerin, 3084 µl Formamid und 4 ml 10xMOPS-Puffer. Alle Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem H₂O angesetzt.

2.3.24 Transfer von RNA („Northern Blotting“)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurden die Agarosegele zweimal für 10 min in 10xSSC (1,5 M NaCl, 150 mM Na-Citrat pH 7,0) inkubiert. Der Transfer der RNA erfolgte üN mittels Kapillarblot nach Sambrook et al. (1989) auf Hybond-N-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Membranen wurden anschließend zweimal für 10 min mit 10xSSC, das auch als Transferpuffer während des Kapillarblots diente, gewaschen und an der Luft getrocknet. Durch eine 35- bis 45-minütige Inkubation bei 80°C wurde die RNA auf den Membranen fixiert. Durch das Einfärben mit Methyleneblau wurde die Homogenität des RNA-Transfers auf die Membranen kontrolliert und diese mehrmals kurz mit H₂O gespült.

2.3.25 Nachweis filtergebundener RNA

Die an Nylonmembranen immobilisierte RNA wurde durch Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Sonden (2.3.22) nachgewiesen. Die Filter wurden zunächst in 6xSSC (0,9 M NaCl, 90 mM Na-Citrat pH 7,0) für 20 min bei 42°C inkubiert. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 2 h bei entsprechender Temperatur mit 30 ml Hybridisierungspuffer (6xSSC, 1 mM EDTA pH 7,5, 0,5% (w/v) SDS, 100 µg/ml Heringssperma, 50% (v/v) Formamid und 5xDenhardt-Lösung (1 g/l Ficoll 400, 1 g/l Polyvinylpyrrolidon, 1 g/l BSA). Die Hybridisierung erfolgte üN bei 42°C durch Zugabe der denaturierten Sonden (2.3.22) zu der Prähybridisierungslösung. Um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen, wurden die Membranen sukzessiv dreimal für 20 min bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur mit 1xSSC (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat pH 7,0) mit 0,1% (v/v) SDS gewaschen. Die an der Luft-getrockneten Membranen wurden in handelsüblicher Frischhaltefolie eingeschlagen und üN bei -80°C einem Röntgenfilm (X-Omat AR 5, Kodak, USA) unter Verwendung einer Verstärkerkassette exponiert. Alternativ wurden die Filter zur Quantifizierung üN einer Detektorfolie (Fuji-Film, Tokio, Japan) exponiert und mittels eines Phosphoimagers „Bio Imaging Analyzer BAS-1800“ (Fuji-Film, Tokio, Japan) inklusive der Software „Image Reader BAS-1800 Version 1.4E“ und „Image Gauge Version 3.0“ ausgewertet.

2.4 Pflanzenphysiologische Methoden

2.4.1 Fluoreszenzmessungen

2.4.1.1 Theoretische Grundlagen

Bei der Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$ konkurrieren mehrere Reaktionen erster Ordnung miteinander. Dies sind die photochemische Reaktion (Geschwindigkeitskonstante k_P), die thermische Deaktivierung (k_D), der Transfer von Anregungsenergie (k_T) und Fluoreszenzemission (k_F), wobei aufgrund der großen Effizienz der photochemischen Reaktion gilt: $k_P \gg \gg k_D + k_T + k_F$. Die Messung der Chl a-Fluoreszenz erlaubt unter bestimmten experimentellen Bedingungen verlässliche Rückschlüsse über den Zustand des PS II. Gemäß des Modells von Butler und Kitajima (1975) lässt sich die Fluoreszenzausbeute (Φ_F) mittels der Ratenkonstanten k_P , k_D , k_T und k_F bestimmen (Gleichung 1). Man unterscheidet dabei zwei Populationen von PS II-RZ: sogenannte offene RZ (Anteil A), in denen Q_A oxidiert vorliegt und geschlossene RZ (Anteil $1-A$) mit reduziertem Sekundärakzeptor (Q_A^-).

$$\Phi_F = A * \frac{k_F}{k_P + k_D + k_T + k_F} + (1 - A) * \frac{k_F}{k_D + k_T + k_F} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Wenn Q_A in allen RZ oxidiert vorliegt ($A = 1$), ist Φ_F minimal (Φ_{F0} , Gleichung 2), da die Deaktivierung von $^1\text{Chl}^*$ hauptsächlich durch die photochemische Reaktion erfolgt ($k_P \gg \gg k_D + k_T + k_F$). Diese sogenannte Grundfluoreszenz lässt sich durch den Einsatz sehr schwacher Lichtintensitäten ($\text{PFD} < 1 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Fluoreszenzausbeute $\Phi_{F0} = 0,6\%$) messen. Im Fall geschlossener RZ ($A = 0$) wird Φ_F maximal (Φ_{FM} , Gleichung 3), da eine Anregung des Chl nicht zu einer stabilen Ladungstrennung führt kann ($k_P = 0$). Eine vollständige Reduktion des Q_A aller RZ lässt sich durch Belichtung mit einem Sättigungslichtpuls ($\text{PFD} > 3000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Fluoreszenzausbeute $\Phi_{FM} = 3\%$) erreichen.

$$\Phi_{F0} = \frac{k_F}{k_P + k_D + k_T + k_F} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$\Phi_{FM} = \frac{k_F}{k_D + k_T + k_F} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Durch Kombination der Gleichungen 1 bis 3 lässt sich die potentielle Effizienz der photochemischen Reaktion des PS II (Φ_P) ermitteln (Gleichung 4):

der Lichtquellen. Parallel dazu zeichnete ein Kompensationschreiber die Messkurve auf (Abbildung 10). Das Messsystem bestand aus folgenden Komponenten der Firma Walz (Effeltrich): Kontrolleinheit PAM 101, Blitzlichttriggereinheit PAM 103, Emitter/Detektor ED 800 T, Sättigungspulslichtlampe FL 103, Kaltlichtquelle für aktinisches Licht FL 101, Faseroptik 101 F/5, Blattscheibenküvette LSC-2 (ADC Ltd.), Umwälz-Thermostat mgw Lauda R6 (Lauda) und Schreiber SE 120 BBC Metrawatt (Goerz). Blattmaterial von dunkeladaptierten Pflanzen (> 4 h) wurde in einer Blattscheibenküvette eingespannt, die auf 20 °C temperiert und mit schwachem Luftstrom begast wurde. Nach einer 8- bis 10-minütigen Dunkeladaptationsphase wurde nach der Registrierung von F_0 (Messlicht 1,6 kHz, PFD 0,1 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durch einen sättigenden Lichtpuls (Dauer: 1 sec, PFD > 4000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) F_M bestimmt. Unmittelbar danach wurde aktinisches Weißlicht mit unterschiedlicher PFD für 2 bis 16 min zugeschaltet, und die Fluoreszenz für weitere 10 min im Dunkeln detektiert. Während der gesamten Versuchsdauer wurden sättigende Lichtblitze im Abstand von 2 min gegeben. Aus der Fluoreszenzkurve lassen sich die photochemische (qP; vgl. 1.3.4) und nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ), sowie die Koeffizienten der ΔpH -abhängigen Löschung (qE) und der Photoinhibition (qI) nach Stern-Volmer (Thiele et al., 1997) ermitteln: $qP = F_{ST}/F_{VS}$, $NPQ = (F_M/F_{MS}) - 1$, $qE(SV) = (F_M/F_{MS}) - (F_M/F_{M'})$, $qI(SV) = (F_M/F_{M'}) - 1$. Die Löschung durch *state transition* (qT) wurde bei dieser Auswertung nicht berücksichtigt, da sie unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nur einen sehr geringen Beitrag zum NPQ leistet. Im Gegensatz zur Analyse von Quick und Stitt (1989) gilt bei dieser Berechnungsmethode ein additiver Zusammenhang der Parameter: $NPQ = qE(SV) + qI(SV)$.

2.4.1.3 Messung der Photoinhibition anhand des F_V/F_M -Verhältnisses

Für die Licht-induzierte Inaktivierung des PS II wurden Blattscheiben von dunkeladaptierten Pflanzen (> 4 h) bei einer PFD von 2000 bis 2200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter einer Halogenlampe (Assimilationsamatur, HS2000 Deep 600 Watt SON-T-230 Watt, Bahrs Technik, Brüggen-Bracht; Beleuchtungsapparatur, Eigenbau, Mechanikwerkstatt Universität Düsseldorf) für 1 bis 8 h exponiert. Die Blattscheiben schwammen dabei auf H_2O , dessen Temperatur von 20°C durch einen Kryostaten (Colora/Lorch) und einem handelsüblichen Ventilator konstant gehalten wurde. Nach der Starklichtexposition wurden die Blattscheiben zur Erholung für mindestens 2 h in Schwachlicht mit einer PFD von 25 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ überführt. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden Blattscheiben entnommen und das F_V/F_M -Verhältnis mit Hilfe eines portablen PAM-Fluorimeters (PAM 2000, Walz, Effeltrich verbunden mit Palmtop-Computer Hewlett Packard 200LX, Corvallis, USA) bestimmt. Hier-

zu wurden die Blattscheiben in Küvetten (DCL-8 *leaf clips*, Walz, Effeltrich) für 8 min vorverdunkelt. Nach der Registrierung von F_0 (Messlicht 1,6 kHz, PFD $0,1 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und einem Fernrotlichtpuls wurde durch einen sättigenden Lichtblitz (Dauer: 1 sec, PFD $> 4000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) F_M bestimmt. Für anstehende Pigmentanalysen (2.5.12) wurden die Blattscheiben danach sofort in flüssigem N_2 gefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.1.4 Messung der P700-Absorptionsänderung – die Grundlagen

Das PS I wird hauptsächlich durch Fernrotlicht (700 bis 730 nm) angeregt. Dabei wird das zentrale Chl a-Dimer (P700) unter Bildung eines Kationradikals ($\bullet\text{P700}^+$) oxidiert, was zu einer Absorptionsänderung bei 700 nm und zusätzlich bei 810 bis 830 nm führt. Im infraroten Wellenlängenbereich erfolgt keine Anregung der Chl-Fluoreszenz und die Fluoreszenzemission ist nur gering. Daher lässt sich durch die Messung der Absorptionsänderung bei 810 bis 830 nm die Aktivität des PS I sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestimmen (Schreiber et al., 1988).

Im dunkeladaptierten Zustand liegt P700 reduziert vor und die Absorption bei 810 nm ist minimal. Die vollständige Oxidation des P700 durch Fernrotlicht induziert die maximale Absorption bei 810 nm maximal. Die Signaldifferenz (ΔA_{max}) zwischen reduziertem und oxidiertem P700 im *steady state* bei saturierendem Fernrotlicht gilt als relatives Maß für die PS I-Aktivität und wird als potentielle PS I-Aktivität bezeichnet (Klughammer und Schreiber, 1991; 1994).

Bei Exposition mit aktinischem Weißlicht mit geringer PFD überwiegt der Elektronentransfer zwischen den beiden Photosystemen gegenüber der Anregung des P700. Letzteres ist unter diesen Bedingungen überwiegend reduziert. Bei Sättigung des Elektronentransports im Starklicht liegt P700 hingegen im oxidierten Zustand vor. In Abhängigkeit von der PFD stellt sich somit ein intermediärer Oxidations- bzw. Reduktionszustand des P700 (ΔA) ein und erlaubt anhand des Anteils an oxidiertem P700 Rückschlüsse über den Redoxzustand der Elektronentransportkette.

2.4.1.5 Bestimmung des P700-Redoxzustandes

Für die Absorptionsänderung des P700 wurde ein modifiziertes PAM-Fluorimeter (Schreiber et al., 1988) verwendet, das aus folgenden Komponenten der Firma Walz (Effeltrich) bestand: Kontrolleinheit PAM 101, 2 Kontrolleinheiten PAM 102, Emitter/Detektor ED P700 DW, 2 Photodioden 102-FR, Kaltlichtquelle für aktinisches Licht FL 101, Faseroptik 101 F/4,

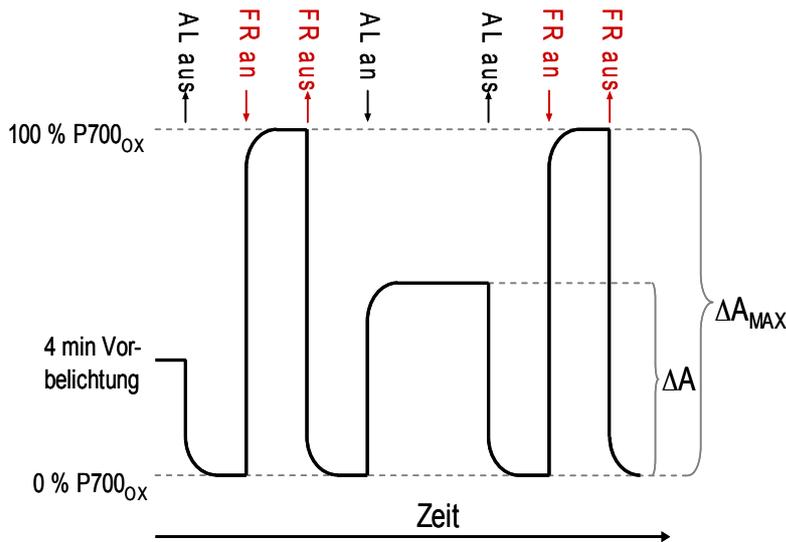


Abbildung 11: Fluoreszenzkurve zur Bestimmung der P700-Redoxzustandes. Der Anteil an oxidiertem P700 lässt sich aus der Signaldifferenz (ΔA) zwischen reduziertem und oxidiertem P700 im stationären Zustand der Photosynthese in Relation zu ΔA_{MAX} bei Fernrotlicht herleiten. Nach Weis und Lechtenberg (1989), verändert. AL ist das aktinische Licht mit unterschiedlicher PFD, FR bezeichnet das saturierende Fernrotlicht (30 sec, 720 nm).

Blattscheibenküvette LSC-2 (ADC Ltd.), Umwälz-Thermostat mgw Lauda R6 (Lauda) und Schreiber Kipp & Zonen (Delft BV, Niederlande).

Abbildung 11 zeigt eine schematische Fluoreszenzkurve zur Bestimmung des P700-Redoxzustandes. Das Blattmaterial wurde in eine Blattscheibenküvette eingespannt, die auf 20 °C temperiert und mit schwachem Luftstrom begast wurde. Nach einer 4-minütigen Vorbelichtungsphase (PFD 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurde die Kaltlichtquelle ausgeschaltet und der reduzierte Zustand des P700 registriert. Durch die Gabe eines Fernrotlichtpulses (Dauer 30 sec, 720 nm) wurde das P700 vollständig oxidiert. Eine anschließende 1-minütige Phase im aktinischen Licht reduzierte das P700 in Abhängigkeit von der eingesetzten PFD (variabel). Der Anteil an oxidiertem P700 lässt sich nun aus der Signaldifferenz (ΔA) zwischen reduziertem und oxidiertem P700 im *steady state* der Photosynthese in Relation zu ΔA_{MAX} bei saturierendem Fernrotlicht herleiten (Weis und Lechtenberg, 1989): $\text{P700}_{\text{OX}} [\%] = \Delta A / \Delta A_{\text{MAX}} * 100$

2.4.2 Messung der CO₂-Assimilation *in vivo*

Die CO₂-Assimilation wurde in Abhängigkeit von der Lichtintensität an intakten Blättern mittels CO₂-Infrarot-Gaswechselanalyse im Differenzmodus unter Berücksichtigung des Grundpegels gemessen. Das Messsystem (CMS 400 Kompakt Miniküvetten-System) der Firma Walz (Effeltrich) bestand aus folgenden Komponenten: Zentraleinheit CMS 400, Gasanalysator BINOS-100/4P (Rosemount), klimatisierbare Messküvette aus Plexiglas (Klimaaggregat GK-022), 5 Halogenlampen (12V, 50 W, Toshiba) und Neutralfiltergläser. Zur Ermittlung einer Lichtsättigungskurve wurde die Lichtintensität mittels Neutralfiltergläser moduliert (PFD: 0 bis 2200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die CO₂-Assimilation bei den einzelnen Lichtintensitäten wurde für jeweils 20 min bei einer konstanten Küvettemperatur von 24°C

und einer Luftfeuchtigkeit von 70% gemessen, wobei jede Minute ein Messwert aufgezeichnet wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit des Gasstroms betrug 1500 ml/min. Die Daten wurden mit dem Datenanalyseprogramm DIAGAS (Walz, Effeltrich) ausgewertet.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Präparation intakter Thylakoidmembranen

Die Präparation intakter Thylakoide erfolgte bei 4 °C. Es wurden nur vorgekühlte Medien, Zentrifugen und andere Geräte verwendet. Nach Beendigung der Isolation wurde der Chl-Gehalt der erhaltenen Thylakoidsuspension bestimmt (2.5.2). Die Thylakoide wurden für die Messung von Elektronentransportraten (2.5.3) dunkel auf Eis aufbewahrt bzw. für proteinbiochemische Untersuchungen (2.5.8) bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Intakte Thylakoidmembranen aus *N. tabacum* wurden gemäß Graßes et al. (2001) präpariert, während die Isolation aus *A. thaliana* nach dem Protokoll von Jahns et al. (2002) erfolgte.

2.5.2 Chlorophyllbestimmung

Die Bestimmung des Chl-Gehalts erfolgte nach Arnon (1949). Ein 10 µl Aliquot der zu untersuchenden Thylakoidsuspension wurde in 1 ml 80%igen Aceton aufgenommen und 2 min bei 10000 g zentrifugiert. Die Extinktion des Chl-haltigen Überstandes wurde spektralphotometrisch bei 645 nm und 663 nm gemessen. Die Chl-Konzentration errechnete sich nach der Formel: $c \text{ [mg/ml]} = E_{645\text{nm}} \times 20,2 + E_{663\text{nm}} \times 8,02$

2.5.3 Messung der Elektronentransportraten an intakten Thylakoiden

Die Messung der Einzelaktivitäten der beiden Photosysteme und des linearen Elektronentransports erfolgte mittels einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ (Bachhofer, Reutlingen) bei sättigendem Rotlicht (PFD: ca. 1500 µmol Photonen m⁻² s⁻¹). Als Lichtquelle diente ein Diaprojektor (Fantimat 250, Liesegang) mit Langpass-Kantenfilter (RG 630, Schott). Die Chl-Konzentration im Reaktionsansatz betrug 10 µg Chl ml⁻¹. Die Aktivität des PS II (H₂O → 1,4-Benzochinon) wurde in einem Medium gemessen aus 330 mM Sorbit, 40 mM HEPES pH 7,6, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 µM Gramicidin D, 5 mM NH₄Cl und 1 mM 1,4-Benzochinon. Die Messung des linearen Elektronentransports erfolgte in dem gleichen Medium mit 0,5 mM K₃[Fe(CN)₆] statt 1,4-Benzochinon als Elektronenakzeptor. Die Aktivität des PS I wurde in einem Ansatz bestimmt, bestehend aus 40 mM Tricin pH 8,0, 60 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1

mM NaN_3 , 1 μM DCMU und 100 U/ml Superoxid-Dismutase. 1 mM Na-Ascorbat fungierte zusammen mit 0,5 mM 2,3,5,6-Tetramethylphenylendiamin als Elektronendonator, während 25 μM Methylviologen den Elektronenendakzeptor bildete. Mit Hilfe des Löslichkeitskoeffizienten für O_2 (0,284 $\mu\text{mol O}_2/\text{ml}$ bei 20°C) wurden die Elektronentransportraten anhand der O_2 -Produktion bzw. -Verbrauchs berechnet.

2.5.4 Messung von ROS mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie

Die Bildung und Identität von ROS in belichteten Thylakoiden wurde mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Da die ROS $\bullet\text{OH}$ und $\bullet\text{O}_2^-$ diamagnetisch sind, weisen sie alleine kein ESR-Signal auf. Aus diesem Grund wurde der *spin trap* 5(-Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO; Novagene-Calbiochem, Madison, USA) für die ESR-Messungen eingesetzt (Abbildung 12; Sgherri et al., 1999). DEPMPO ist ein phosphoryliertes Derivat des gebräuchlichen *spin traps* 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) und reagiert sowohl mit $\bullet\text{O}_2^-$ als auch mit $\bullet\text{OH}$ unter Bildung von charakteristischen *spin trap*-Addukten (Sgherri et al., 1999). Diese zeichnen sich durch eine längere Stabilität aus (Zhang et al., 2000). Die Durchführung der ESR-Spektroskopie erfolgte in Kooperation mit T. Friedrich (Freiburg) und basierte auf der Arbeit von Sgherri et al. (1999). Die ESR-Spektren des *spin trap* DEPMPO wurden mit dem X-Band-Spektrometer EMX 6/1 (mit WinESR-Software) der Firma Bruker Biospin (Rheinstetten) aufgenommen. Die ESR-Parameter waren: Mikrowellenleistung 10 mW, Mikrowellenfrequenz 9,46 GHz, Modulationsamplitude 0,125 mT, Zeitkonstante 0,164 s, *Scan*-Rate 5,4 mT/min. Die ESR-Messungen wurden in Quarzröhrchen mit 1-mm Durchmesser durchgeführt, die an einem Ende verschlossen waren. Alle Ansätze wurden mit dem Chelatbildner Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) versetzt, um störende Reste von Metallionen zu entfernen.

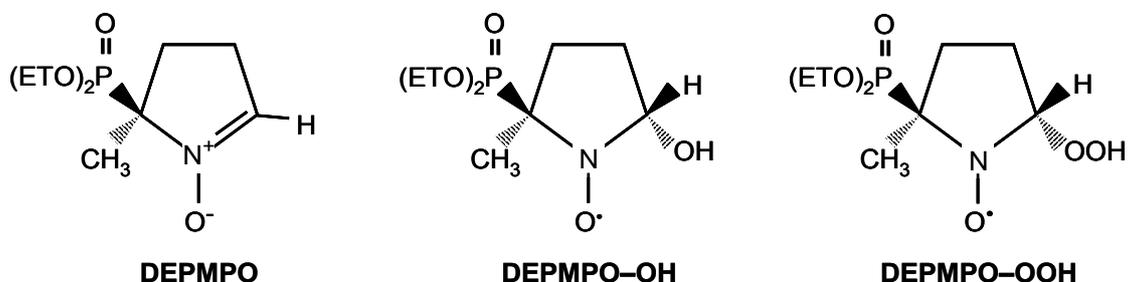


Abbildung 12: Strukturformeln des *spin trap* 5(-Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO) und seiner Addukte mit $\bullet\text{OH}$ und $\bullet\text{O}_2^-$.

2.5.4.1 Fenton Reaktion

Als Kontrolle wurden $\bullet\text{OH}$ mittels der Fenton-Reaktion ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$) generiert und die ESR-Spektren in Gegenwart von DEPMPO aufgenommen. Der Reaktionsansatz (Volumen 200 μl) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 10 mM HEPES/KOH pH 7,4, 2 mM DTPA, 2 mM FeSO_4 , 2 mM H_2O_2 und 10 mM DEPMPO.

2.5.4.2 Xanthin/Xanthinoxidase-System

Als weitere Kontrolle wurde das Xanthin/Xanthinoxidase-System zur Generierung von $\bullet\text{O}_2^-$ verwendet und die ESR-Spektren in Gegenwart von DEPMPO registriert. Der 200 μl -Ansatz bestand aus: 10 mM HEPES/KOH pH 7,4, 0,4 mM Xanthin, 0,2 U/ml Xanthinoxidase, 4 mM DTPA und 10 mM DEPMPO.

2.5.4.3 Trapping der in belichteten Thylakoiden generierten ROS

Der Reaktionsansatz (Volumen 200 μl) setzte sich aus intakten Thylakoiden (2.5.1; 0,45 mg Chl/ml), 10 mM HEPES/KOH pH 7,4, 4 mM DTPA und 10 mM DEPMPO zusammen, und wurde in Quarzröhrchen (1 mm Durchmesser) bei einer PFD von 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 5 min exponiert. Als Lichtquelle diente ein Diaprojektor (Fantimat 250, Liesegang). Dieser Basisansatz wurde durch die Zugabe von Superoxid-Dismutase (250 U/ml) oder Katalase (6500 U/ml) variiert bzw. die Länge der Starklichtexposition verändert. Ferner wurden als Kontrollen Spektren von unbelichteten Thylakoiden bzw. exponierte Membranen ohne *spin trap* aufgenommen.

2.5.5 Herstellung von Proteingestamtexttrakten aus Blättern

100 mg (Frischgewicht) Blattmaterial wurde mit einem motorgetriebenen Pistill (Heidolph RZR 2051control) unter flüssigem N_2 pulverisiert und mit 300 μl Lysispuffer aus 1,6% (w/v) SDS, 1 M Harnstoff und 50 mM Tris/HCl pH 7,5 versetzt. Die Suspensionen wurden für 20 min bei 80°C erhitzt und die unlöslichen Zellbestandteile bei 14000 g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteingestamtexttrakten (2.5.5) erfolgte mit dem „Bio Rad D_C Protein Assay“ (Bio Rad, München) nach Angaben des Herstellers. Als Standard diente BSA in Konzentrationen von 0,2 bis 4 mg/ml. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT

wurde die Konzentrationen spektralphotometrisch bei 750 nm ermittelt (DU 640 Spektralphotometer, Beckmann).

2.5.7 Isoelektrische Fokussierung von Membranproteinen (IEF)

Die IEF wurde gemäß dem Protokoll von Färber et al. (1997) für Spinat- bzw. Erbsenthylakoide durchgeführt, die ihrerseits auf der Vorschrift von Ruban et al. (1994) beruht. Dabei erwies sich die Anwendung der Methode auf Thylakoidpräparationen aus *N. tabacum* als unproblematisch.

2.5.7.1 Entstapelung und Detergenzien-Behandlung von Thylakoiden

Um die Granastrukturen der isolierten Thylakoide (2.5.1) aufzulösen (entstapelte Thylakoide), wurden Membranen mit einem Chl-Gehalt von 2 mg in 5 mM EDTA pH 6,3 aufgenommen, für 15 min mit 8000 g bei 4°C zentrifugiert und in destilliertem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Thylakoide mit einem Chl-Gehalt von 1,5 mg in 3%igem (w/v) β -Dodecylmaltosid solubilisiert und für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

2.5.7.2 Trennung und Elution der pigmentbindenden Proteine

Es wurde eine horizontale IEF-Apparatur der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) verwendet. Die Gelmatrix der IEF bestand aus 1% (w/v) Glycin, 0,06% (w/v) β -Dodecylmaltosid, 2,5% (v/v) Ampholin-Lösung (pH 3,5 bis 5) und 4% (w/v) Ultradex. Diese wurde solange getrocknet bis 25 g H₂O evaporiert waren. Ein einstündiger Vorlauf bei 4°C unter konstanter Leistung (8 W; Spannungsquelle Gibco PS3002, Gibco BRL, Eggenstein) diente zum Aufbau des pH-Gradienten. Der Hauptlauf mit den Proben erfolgte üN bei 4°C im Dunkeln. Die aufgetrennten, grün gefärbten Pigmentproteinkomplexe wurden in Elutions säulen (PEGG Columns, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) überführt und mit 10 mM HEPES/NaOH pH 7,6 und 0,06% (w/v) β -Dodecylmaltosid eluiert. Die Filtrate wurden bis zur Verwendung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.5.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das in dieser Arbeit verwendete diskontinuierliche Gelsystem (Laemmli, 1970, modifiziert nach Engelbrecht et al., 1986) bestand aus einem Sammelgel (5% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8, 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,5 μ l/ml TEMED) und einem Trenngel (13,5% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid 30:0,8, 375 mM

Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 3,45 $\mu\text{l/ml}$ 10% (w/v) APS, 0,26 $\mu\text{l/ml}$ TEMED). Um die Trennungseigenschaften zu verbessern wurden dem Trenngel 6 M Harnstoff zugesetzt. Für die Proteintrennung kamen Minigele (Multiple Gel Caster, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) mit einer Stärke von 0,75 mm zum Einsatz. Die eigentliche Elektrophorese wurde in Minigelkammern (Mighty-Small SE250, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) bei 50 V (30 min), später 85 V durchgeführt. Als Laufpuffer fungierte eine Lösung aus 3% (w/v) Harnstoff, 0,3% (w/v) Tris, 1,44% (w/v) Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Als Proteinstandard diente Sigma Dalton Mark VII (Sigma-Aldrich, München).

Die zu analysierenden Thylakoide (2.5.1) bzw. Proteingesamtextakte (2.5.5) wurden auf eine Chl-Konzentration von 250 $\mu\text{g Chl ml}^{-1}$ bzw. auf eine Proteinkonzentration von 0,67 oder 0,75 mg ml^{-1} mit Probenpuffer eingestellt, für 5 min aufgekocht, kurz abzentrifugiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Der Probenpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 1,6% (w/v) SDS, 1 M Harnstoff, 1% (w/v) β -Mercaptoethanol, 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 12,5% (w/v) Glycerin, 0,5 g/l Bromphenolblau.

2.5.9 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zur immunologischen Untersuchung wurden die in der SDS-PAGE (2.5.8) aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer *Semi-Dry-Blot*-Apparatur (Multiphor II Nova Blot, LKB, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) auf eine ungeladene Nitrocellulosemembran (0,2 μm Porengröße, Portran, Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Insgesamt 6 Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier (Gel Blotting Papier GB002, Schleicher & Schüll, Dassel) wurden verwendet. Der 45-minütige Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm^2 bei RT. Als Transferpuffer fungierte eine Lösung aus 10 mM NaHCO_3 , 3 mM Na_2CO_3 und 20 % (v/v) Methanol. Die Güte des Transfers wurde durch Ponceau S-Färbung (0,5% (w/v) Ponceau S in 1% (v/v) Essigsäure) der Nitrocellulosemembran überprüft.

Die Nitrocellulosemembranen wurden üN bei RT mit TBS-T-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,2% (v/v) Triton X-100, 0,05% (v/v) Tween 20 und 1% (w/v) BSA bzw. Casein) abgesättigt. Die Reaktion mit den Primärantikörpern erfolgte für 3 h bei RT (in TBS-T-Puffer mit 0,1% (w/v) BSA bzw. Casein). Die Filter wurden anschließend dreimal für 10 min in TBS-T-Puffer ohne BSA bzw. Casein gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde für 1 h bei RT durchgeführt (in TBS-T-Puffer mit 0,1% BSA bzw. Casein). In Analogie zur ersten Waschung wurden die Membranen dreimal in TBS-T-Puffer geschwenkt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mittels Chemolumineszenzreaktion (ECL-Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), und wurde mittels

Imager „LAS-1000 Intelligent Dark Box“ (Fuji-Film, Tokio, Japan) inklusive der Software „Image Reader LAS-1000 Version 1.0“ und „Image Gauge Version 3.0“ ausgewertet.

2.5.10 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CP24, CP26 und CP29 aus *N. tabacum*

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen Lhcb4, Lhcb5 und Lhcb6 aus *N. tabacum* wurde jeweils ein Oligopeptid aus 15 Aminosäuren synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Diese Oligopeptide wurden über eine Cystein-Brücke an das nicht-antigene Hapten *Keyhole Limpet Hemocyanine* (KLH) konjugiert, und damit jeweils zwei Kaninchen immunisiert. Sowohl die Oligopeptidsynthese als auch die Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma Genophere Biotechnologies (Paris, Frankreich) übernommen und erfolgten nach Standardmethoden der Firma. Die Antiseren wurden erfolgreich getestet und für alle Immunoblot-Experimente in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Unter Berücksichtigung von Sequenzanalysen (Graßes, 1999; Jansson, 1999) wurden folgende Oligopeptide synthetisiert: (C)PKKSWIPAVKGGGNL für CP24, (C)RRIFLPDGLLDRSEI für CP26 und (C)LDQNLAKNLAGDVIG für CP29.

2.5.11 Analyse des Tocopherol-Gehaltes

Die Analyse des Tocopherol-Gehaltes von Blättern und Thylakoidmembranen erfolgte in Kooperation mit B. Grimm, Berlin, und wurde gemäß Tanaka et al. (1999) durchgeführt.

2.5.12 Pigmentanalyse durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei dem verwendeten Verfahren erfolgte die Trennung der Pigmente durch eine *reversed-phase*-Säule (Gilmore und Yamamoto, 1991; Färber et al., 1997). Das Computer-gesteuerte HPLC-System der Firma Merck bzw. Merck/Hitachi (Darmstadt) bestand aus folgenden Komponenten: Interface Modul L-7000, Autosampler L-7200, Injektionsventil 7125 mit 100 µl Probenschleife (Cotati, CA, USA), Peltier Sample Cooler für L-7200, UV-Detektor/Wellenlängenmonitor L-7400 oder UV/Vis-Detektor/Wellenlängenmonitor L-7420, Pumpe L-7100, Vorsäule LiChroCART 4-4, Säule LiChroCart 250-4 mit Trennmateriale LiChrospher 100 RP-18, 5 µm Partikelgröße, Lösungsmittelentgaser Gastorr 104 (Schambeck, Bad Honnef) und Software HSM Sys-1. Die Pigmente wurden mit abnehmender Polarität eluiert und konnten durch den Einsatz eines linearen Laufmittelgradienten optimal getrennt werden. Das Elutionsprogramm umfasste 0-9 min 100% Lösungsmittel A, 9-12,5 min linearer Gradient zu 100% Lösungsmittel B, 12,5-18 min 100% Lösungsmittel B. Die Flussrate betrug 2 ml min⁻¹, das Injektionsvolumen 20 µl. Lösungsmittel A bestand aus Acetonitril, Methanol

und filtriertem Tris/HCl pH 8,0 in einem Verhältnis von 87:10:3 (v/v/v). Für Lösungsmittel B wurde Methanol und n-Hexan in einem Verhältnis von 4:1 (v/v) gemischt.

2.5.12.1 Aufbereitung der Proben

Gefrorene Blattscheiben wurden unter flüssigem N₂ mit einem motorgetriebenen Pistill (Heidolph RZR 2051control) pulverisiert. Durch die Zugabe von 1 ml Aceton (p.a.) wurden die Pigmente extrahiert und Zelltrümmer und Proteine bei 10000 g für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (Anotop^R 10-Einmalfilter; 0,2 µm, Merck, Darmstadt) und bis zur Verwendung im Dunkeln bei -20°C gelagert. Die Pigmente der über IEF aufgetrennten Pigmentproteinkomplexe wurden mit Ether aus der wässrigen Lösung extrahiert. Hierfür wurde die Probe mit 1 Volumen Ethanol und 2 Volumen Diethylether versetzt, und die Phasentrennung mittels 1 bis 2 Tropfen H₂O induziert. Die obere Phase wurde abgenommen und die untere erneut mit Ether ausgeschüttelt. Die beiden Etherphase wurden vereinigt, vollständig eingedampft und die Pigmente in 1 ml Aceton aufgenommen.

2.5.12.2 Quantifizierung der Pigmente

Die eluierten Pigmente wurden bei 440 nm detektiert und anhand ihrer spezifischen Retentionszeit identifiziert. Die Pigmentkonzentrationen wurden anhand der integrierten Peakflächen und Umrechnungsfaktoren (Tabelle 3) bestimmt, die durch eine Kalibrierung der HPLC mit reinen Pigmenten ermittelt worden waren (Färber et al., 1997; M. Graf, Düsseldorf, persönliche Mitteilung).

Tabelle 3: Pigmente mit den entsprechenden Retentionszeiten und Umrechnungsfaktoren für den UV-Detektor L7400¹⁾ bzw. UV/Vis-Detektor L7420²⁾. Die Retentionszeiten schwanken teilweise bis zu 1 min um den angegebenen Wert. Für Chl a'_{Phy} und Chl a_{GG} bzw. b_{GG} wurde als Umrechnungsfaktor der Mittelwert der Umrechnungsfaktoren von Chl a und b gewählt.

Pigment	Retentionszeit [min]	Umrechnungsfaktor ¹⁾ [Fläche/pmol Pigment]	Umrechnungsfaktor ²⁾ [Fläche/pmol Pigment]
Neo	3,2	2272	3434
Vx	4,2	3211	3832
Ax	6,3	2192	3045
Chl b _{GG}	6,9	1450	1308
Lut	9,3	2192	3167
Zx	10,3	2707	2764
Chl a _{GG}	11,6	1450	1308
Chl b	13,3	1298	1227
Chl a' _{Phy}	13,6	1450	1308
Chl a	13,9	1609	1389
β-Caro	16,8	2001	2852

3 ERGEBNISSE

Die Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie in den Antennen des PS II und das Antioxidans α -Tocopherol sind zwei der wichtigsten Komponenten der Thylakoidmembran für den Schutz gegenüber photooxidativer Schädigung (Fryer, 1992; Niyogi, 1999). Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung dieser beiden Schutzkomponenten wurden Analysen an Mutanten mit Defekten in der Tocopherolbiosynthese bzw. der thermischen Energiedissipation durchgeführt.

3.1 Schutz durch α -Tocopherol bei photooxidativem Stress

Die physiologische Bedeutung von Vitamin E bei der Bewältigung von photooxidativem Stress in Pflanzen wurde anhand von α -Tocopherol-defizienter *CHL P*-Antisense-Pflanzen aus Tabak untersucht. Die *CHL P* ist ein Schlüsselenzym der Tocopherolbiosynthese und reduziert in den Chloroplasten höherer Pflanzen des Sesquiterpen GGPP zu PhyPP (Abbildung 9; Tanaka et al., 1999). Letzteres wird sowohl für die Tocopherol- als auch für die Chl-Synthese benötigt. Durch die Expression von *CHL P*-Antisense-RNA in den transgenen Tabakpflanzen wurde der endogene Proteinlevel und die Aktivität der *CHL P* drastisch vermindert, was zu einer deutlichen Reduzierung des α -Tocopherol-Gehaltes auf 14 bis 19% des Wildtypniveaus führte (Tanaka et al., 1999). Die *CHL P*-Antisense-Pflanzen zeichneten sich ferner durch einen blassen Phänotyp mit retardiertem Wachstum, einem verringerten Chl-Gehalt sowie eine Akkumulation von mit Geranylgeraniol veresterten Chl (Chl_{GG}) aus (Tanaka et al. 1999).

Dieser Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte in Kooperation mit Prof. B. Grimm (Humboldt-Universität Berlin), in dessen Arbeitsgruppe die *CHL P*-Antisense-Pflanzen hergestellt wurden (Tanaka et al., 1999). Für die Analysen wurden drei verschiedene *CHL P*-Antisense-Linien verwendet, die im Folgenden mit 6, 10 und 20 bezeichnet werden. Zwei Frage-



Abbildung 13: Phänotypen der *CHL P*-Antisense-Pflanzen und des Wildtyps. Die hier gezeigten Tabakpflanzen sind 6 Wochen alt und wurden im Gewächshaus bei einer PFD von $400 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Von links nach rechts: Wildtyp SNN, transgene Tabaklinien 6, 10 und 20.

stellungen waren für die Untersuchung der *CHL P*-Antisense-Pflanzen von besonderem Interesse: 1) Welche Folgen hat der Einbau von Chl_{GG} auf die Stabilität und Funktion der pigmentbindenden Proteine der beiden Photosysteme? 2) Welche Konsequenz hat der Verlust des α -Tocopherols auf die Photosyntheseleistung bei photooxidativem Stress?

3.1.1 Pigmentanalyse der *CHL P*-Antisense-Pflanzen

Die *CHL P*-Antisense-Linien 6 und 10 zeigten eine drastisch reduzierte Wachstumsrate und Pigmentierung (Abbildung 13). Die Chl-Zusammensetzung spiegelte die unterschiedliche *CHL P*-Aktivität in den jeweiligen Tabaklinien wieder. Im Vergleich zu dem Wildtyp zeigten alle *CHL P*-Antisense-Pflanzen einen niedrigeren Chl-Gesamtgehalt pro Blattfläche (Tabelle 4). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Tanaka et al. (1999) überein, auch wenn die Reduktion des Chl-Gehaltes in den transgenen Linien 6 und 10 nicht so deutlich ausgeprägt war. Die Daten bestätigen auch die bereits früher beobachtete Abhängigkeit der Chl_{GG} -Akkumulation von dem *CHL P*-Expressionslevel in den Mutanten. Während etwa 40% der Chl-Gesamtmenge in den Linien 6 und 10 geranylgeranyliert vorlag, betrug der Anteil in der Linie 20 nur 7% (Tabelle 4). Die transgenen Tabaklinien und der Wildtyp verfügten über ein ähnliches Chl a/b-Verhältnis. Dies deutet darauf hin, dass die Antennengröße und die Stöchiometrie der Photosysteme in den Transformanten höchstwahrscheinlich unverändert sind, und sowohl geranylgeranyliertes als auch phytyliertes Chl in assemblierter Form Bestandteil der Photosysteme sind. Unter Berücksichtigung der verringerten Chl-Gesamtmenge kann aus dem unveränderten Chl a/b-Verhältnis weiterhin geschlossen werden, dass die Linien 6, 10 und 20 über weniger Elektronentransportketten pro Blattfläche verfügen als der Wildtyp.

Tabelle 4: Vergleich des Chl- und des Tocopherol-Gehaltes von *N. tabacum* Wildtyp- und *CHL P*-Antisense-Pflanzen. Die Chl-Zusammensetzung ($\text{Chl}_{\text{Gesamt}}$, Chl_{Phy} , Chl_{GG} und Chl a/b) und der Tocopherol-Gehalt des Wildtyps (WT) und der drei verschiedenen *CHL P*-Antisense-Linien (6, 10 und 20) wurde mittels HPLC analysiert. Alle Chl-Daten, mit Ausnahme des Chl_{GG} -Gehaltes, wurden auf die Blattfläche normiert. Der relative Chl_{GG} -Gehalt wurde hingegen auf den Chl-Gesamtgehalt bezogen. Es werden die Mittelwerte von 10 bis 12 Messungen \pm SD gezeigt. Der absolute Chl-Gehalt pro Blattfläche des Wildtyps betrug $14,8 \pm 1,4 \mu\text{mol Chl m}^{-2}$. Der Tocopherol-Gehalt wurde entweder auf die Blattfläche oder auf den Chl-Gesamtgehalt bezogen. Die absolute Tocopherol-Menge des Wildtyps betrug 648 ng/100 mg Frischgewicht.

	$\text{Chl}_{\text{Gesamt}}$ (% WT)	Chl_{Phy} (% WT)	Chl_{GG} (% $\text{Chl}_{\text{Gesamt}}$)	Chl a/Chl b	Tocopherol (% WT)	
					Blätter	Thylakoide
WT	100	100	0	$3,32 \pm 0,10$	100	100
6	62 ± 6	37 ± 4	41 ± 5	$3,50 \pm 0,17$	41,5	21,4
10	70 ± 6	44 ± 5	37 ± 6	$3,28 \pm 0,09$	37,5	29,6
20	61 ± 9	57 ± 8	7 ± 3	$3,21 \pm 0,09$	95,0	66,7

Tabelle 5: Vergleich der Carotinoid-Zusammensetzung von Wildtyp und *CHL P*-Antisense-Pflanzen. Der Carotinoid-Gehalt von Wildtyp (WT) und den *CHL P*-Antisense-Linien 6, 10 und 20 wurde mittels HPLC ermittelt. Die Daten wurden auf die Blattfläche bzw. auf die Chl-Gesamtmenge normiert (siehe Tabelle 4). Mittelwerte von 30 bis 40 verschiedenen Blattproben \pm SD werden gezeigt. Die hohe SD für einige Werte wird auf die heterogene Pigmentierung der Blätter, speziell bei den Antisense-Pflanzen, zurückgeführt.

	Chl/Car	Pigmentgehalt (μmol)							
		Neo		Lut		β -Caro		Vx+Ax+Zx	
		m^{-2} Blatt	$\text{mmol}^{-1}\text{Chl}$	m^{-2} Blatt	$\text{mmol}^{-1}\text{Chl}$	m^{-2} Blatt	$\text{mmol}^{-1}\text{Chl}$	m^{-2} Blatt	$\text{mmol}^{-1}\text{Chl}$
WT	$2,45 \pm 0,17$	$7,8 \pm 0,9$	53 ± 2	25 ± 4	164 ± 14	20 ± 4	136 ± 8	$0,8 \pm 0,2$	55 ± 8
6	$2,30 \pm 0,21$	$6,1 \pm 1,3$	65 ± 8	16 ± 3	176 ± 16	11 ± 1	116 ± 11	$0,8 \pm 0,2$	83 ± 8
10	$2,38 \pm 0,29$	$7,5 \pm 1,6$	66 ± 10	19 ± 5	172 ± 24	12 ± 1	117 ± 5	$0,9 \pm 0,2$	77 ± 8
20	$2,54 \pm 0,20$	$5,5 \pm 1,0$	54 ± 5	15 ± 1	159 ± 16	12 ± 2	124 ± 14	$0,6 \pm 0,1$	62 ± 5

Der Tocopherol-Gehalt verhielt sich umgekehrt proportional zur steigenden Menge an Chl_{GG} in den transgenen Pflanzen, und war sowohl in den Blättern als auch in den Thylakoiden der Linien 6 und 10 am stärksten reduziert (Tabelle 4). Aufgrund des in dieser Arbeit zur Pigmentanalyse verwendeten HPLC-Systems (siehe 2.5.12) konnte für die *CHL P*-Antisense-Pflanzen erstmalig auch eine Quantifizierung der Carotinoide Ax und Zx durchgeführt werden, was eine Charakterisierung des photoprotektiv wirksamen Xanthophyll-Zyklus ermöglichte (vgl. 3.1.6).

Die Analyse der Carotinoid-Zusammensetzung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den *CHL P*-Antisense-Pflanzen und dem Wildtyp (Tabelle 5). Mit Ausnahme des Xanthophyll-Zyklus waren die Mengen aller Carotinoide bezogen auf die Blattfläche in den drei transgenen Linien im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Werden die Carotinoid-Mengen jedoch auf den Chl-Gehalt normiert, so ist die Gesamtmenge an Xanthophyll-Zykluspigmenten in den *CHL P*-Antisense-Linien 6 und 10 um 50 bzw. 40% deutlich erhöht. Die Mengen der anderen Carotinoide sind dagegen mit denen des Wildtyps vergleichbar. Dies ist überaus bemerkenswert. Die ähnlichen Stöchiometrien für β -Caro, Neo und Lut in Relation zum Chl-Gehalt indizieren, dass in allen vier Pflanzenlinien die Antennenkomposition der beiden Photosysteme vergleichbar ist. Dies steht im Einklang mit den beobachteten konstanten Chl a/b-Verhältnissen (vgl. Tabelle 4).

3.1.2 Charakterisierung der pigmentbindenden Proteinkomplexe

Die Pigmentanalysen haben gezeigt, dass der Chl-Gesamtgehalt in den *CHL P*-Antisense-Linien 6 und 10 gegenüber dem Wildtyp drastisch reduziert war (Tabelle 4). Es ist allgemein akzeptiert, dass die Chlorophylle für die Assemblierung und Stabilität der pigmentbindenden Proteine des RZ und der Antenne essentiell sind (Mathis und Burkey, 1989; Paulsen et al.,

1993). Eine Verkleinerung der Gesamtantenne war aufgrund des unveränderten Chl a/b-Verhältnisses in den transgenen Linien jedoch nicht zu erwarten (siehe 3.1.1). Allerdings konnte eine spezifische Reduzierung einzelner Antennenproteine, z.B. aufgrund einer favorisierten Assemblierung mit Chl_{GG} innerhalb der Gesamtantenne, nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden die relativen Stöchiometrien der beiden Photosysteme und der Aufbau ihrer Antenne mittels Immunoblot-Analysen bestimmt. Normiert auf die gleiche Chl-Menge waren alle pigmentbindenden Proteine der beiden Photosysteme sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten in gleichen Mengen vorhanden (Graßes, 1999; Daten nicht gezeigt). Das traf nicht nur für die Proteine des RZ zu, sondern auch für die verschiedenen Antennenkomplexe. Somit störte der Einbau von 40% Chl_{GG} (bezogen auf die Chl-Gesamtmenge) weder die Organisation der Photosysteme noch die Assemblierung der Antennenproteine.

Um die Frage zu klären, ob es zu einer gleichmäßigen Assemblierung von Chl_{GG} mit den pigmentbindenden Proteinen kommt, wurden verschiedene pigmentbindende Komplexe der

Tabelle 6: Pigmentzusammensetzung der aus Thylakoiden von Wildtyp- und *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen isolierten IEF-Fraktionen (Lhcb1/2, Lhcb5/6 mit Kern, PS I). Die Pigmentzusammensetzung von isolierten Thylakoiden und den drei unterschiedlichen IEF-Fraktionen wurden mittels HPLC (siehe 2.5.12) analysiert. Die Zuordnung der einzelnen Fraktionen zu den verschiedenen Proteinen erfolgte aufgrund ihrer Pigmentzusammensetzung und ihrer relativen Position im Gel im Vergleich zu früheren Experimenten mit Thylakoiden aus Erbse und Spinat (vgl. Färber et al., 1997). Chl_{GG} in % ist auf den Chl-Gesamtgehalt bezogen. Es werden Daten eines typischen Einzelexperimentes gezeigt.

		% Chl _{GG}	Chl a/b	Chl _{GG} a/b	Car/Chl	Pigmentgehalt (μmol mmol ⁻¹ Chl)			
						Neo	Lut	Vx+Ax+Zx	β-Caro
Thylakoide	WT	0	3,16	-	0,37	50	151	40	128
	6	29	3,04	3,20	0,35	51	147	47	107
	10	31	2,94	2,83	0,37	57	164	55	98
	20	3	3,35	3,24	0,35	47	154	36	118
Lhcb1/2	WT	0	1,37	-	0,41	90	262	38	22
	6	28	1,59	1,52	0,40	101	253	33	9
	10	31	1,58	1,36	0,42	104	255	43	19
	20	5	1,26	0,46	0,36	90	228	26	12
Lhcb5/6 mit	WT	0	7,22	-	0,23	19	59	31	115
	6	25	3,34	2,62	0,32	56	127	76	57
PS II-Kern	10	25	3,84	2,69	0,29	48	98	71	72
	20	2	4,96	7,05	0,28	37	108	44	88
PSI	WT	0	9,42	-	0,26	4	53	32	171
	6	17	7,17	8,69	0,28	0	53	39	176
	10	19	6,83	7,54	0,27	1	52	42	177
	20	2	11,45	7,46	0,22	3	43	24	151

Thylakoidmembran mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) isoliert und anschließend ihre Pigmentzusammensetzung mittels HPLC untersucht (siehe Tabelle 6). Hierfür wurde ein IEF-Protokoll verwendet, das ursprünglich für die Auftrennung von Spinat-Thylakoiden entwickelt wurde (Färber et al., 1997).

Es wurden drei Hauptfraktionen voneinander getrennt: Lhcb1/2, Lhcb5/6 mit PS II-Kern und PS I. Ihre Identifizierung erfolgte anhand ihrer relativen Positionen im Gel verglichen mit denen aus Erbse und Spinat (vgl. Färber et al., 1997) sowie anhand ihrer Pigmentzusammensetzung. Die Lhcb5/6-Fraktion enthielt offensichtlich geringe Mengen an PS II-Kernkomplexen, was anhand des relativ hohen β -Caro-Gehalt deutlich wird (Tabelle 6), da dieses Carotinoid (mit Ausnahme von Lhca3) sonst nicht mit den LHCs assoziiert (Morosinotto et al., 2003). Die PS I-Fraktion konnte nicht weiter in PS I-Kernkomplex und Antennenproteine aufgetrennt werden. Die Pigmentanalyse der Thylakoide und IEF-Fraktionen der transgenen Tabaklinien zeigte, dass diese einen geringeren Chl_{GG} -Gehalt im Vergleich zu den Pigmentextrakten aus intakten Blättern aufwiesen (vgl. Tabelle 4). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf Pigmentverluste durch die Thylakoidpräparation an sich und die Behandlung mit Detergenz für die IEF (vgl. 2.5.7.1) zurückzuführen, was auf eine schwächere Assoziierung von geranylgeranyliertem Chl mit den pigmentbindenden Proteinen hindeutet.

Die PS I-Fraktion und in abgeschwächter Form auch die PS II-Kern-Fraktion mit Lhcb5/6 zeichneten sich durch einen verringerten Chl_{GG} -Anteil im Vergleich zu dem Pigmentgesamtextrakt aus Thylakoiden aus (vgl. Tabelle 4, 6). Die Lhcb1/2-Fraktion besaß einen mit den Thylakoiden vergleichbaren Chl_{GG} -Gehalt. Dies weist auf eine mögliche bevorzugte Assemblierung von Chl_{Phy} mit den Kernkomplexen der beiden Photosysteme im Vergleich zu den CAB-Proteinen hin.

3.1.3 Die Photosyntheseaktivität *in vivo* und *in vitro*

Anhand von Untersuchungen der Photosyntheseaktivität der *CHL P*-Antisense-Linien und des Wildtyps *in vivo* und *in vitro* sollten folgende Fragestellungen geklärt werden: 1) Hat die Assemblierung von Chl_{GG} einen Einfluss auf die Aktivität der beiden Photosysteme und des linearen Elektronentransports? 2) Ist möglicherweise eine verminderte Photosyntheseleistung für das retardierte Wachstum der *CHL P*-Antisense-Pflanzen verantwortlich?

Die *in vitro*-Elektronentransportraten der einzelnen Photosysteme und des linearen Elektronentransports, letzteres sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand, wurden mittels Sauerstoffmessungen an isolierten Thylakoiden analysiert. Abbildung 14 dokumentiert, dass *in vitro* weder für die Photosyntheseaktivität der einzelnen Photosysteme, noch für

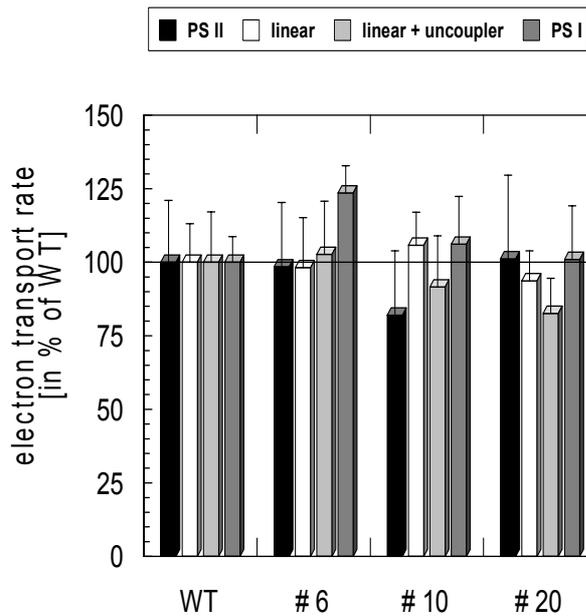


Abbildung 14: Elektronentransportraten in isolierten Thylakoidmembranen von *CHL P*-Antisense-Pflanzen und vom Wildtyp. Die Elektronentransportraten wurden anhand der Sauerstoffentwicklung unter saturierenden Lichtbedingungen berechnet. Die jeweiligen Raten des Wildtyps (WT) wurden auf 100% normiert und die entsprechenden Raten der transgenen Linien in Relation dazu angegeben. Die absoluten Elektronentransportraten des Wildtyps betragen für das PS II $780 \mu\text{mol e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$, für den gekoppelten Elektronentransport $213 \mu\text{mol e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$, für den entkoppelten Elektronentransport $450 \mu\text{mol e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$ und für das PS I $1100 \mu\text{mol e}^- \text{mg}^{-1} \text{Chl h}^{-1}$. Es sind Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Thylakoidpräparationen mit jeweils drei Messungen dargestellt.

den linearen Elektronentransport ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den drei transgenen Linien detektiert werden konnte. Das gleiche Verhältnis vom gekoppelten zum entkoppelten linearen Elektronentransport in allen vier Tabaklinien offenbart, dass die Reduktion des Tocopherol-Gehaltes die Permeabilität der Thylakoidmembran selbst in den am stärksten betroffenen Linien 6 und 10 nicht verändert hat.

Durch die Messung der Sauerstoffabgabe bzw. -aufnahme wurden die Intaktheit der linearen Elektronentransportkette sowie die unverminderte Aktivität der einzelnen Photosysteme in den Mutanten gezeigt. Demnach ist die Ursache für das retardierte Wachstum in den Linien 6 und 10 nicht auf der Ebene des Elektronentransports zu suchen. In weiterführenden Experimenten wurde daher die apparente Photosynthese intakter Blätter der transgenen Linien anhand der CO_2 -Assimilation, welche die Aktivität des Calvin-Zyklus widerspiegelt, analysiert. Abbildung 15 zeigt, dass alle Pflanzen eine ähnliche Lichtsättigungskurve der CO_2 -Assimilation aufwiesen. Weder die Respiration im Dunkeln (ca. $0,6 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), noch die maximale CO_2 -Assimilationsrate (zwischen 6 und $7 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zeigten signifikante Unterschiede. Die Lichtquanteneffizienz der CO_2 -Assimilation wurde aus der Anfangssteigung der Lichtsättigungskurve mit etwa 20 bis 30 Photonen pro fixiertem CO_2 ermittelt und war in allen vier Pflanzen vergleichbar. Offensichtlich hat weder die Reduzierung der Chl-Gesamtmenge um 30 bis 40% noch der Einbau von 40% Chl_{GG} in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen einen negativen Effekt auf die Photosyntheseaktivität unter *in vivo*-Bedingungen. Somit scheidet eine ineffiziente Photosyntheseleistung in den Linien 6 und 10 als Ursache für ihr retardiertes Wachstum aus. Eine mögliche Ursache könnte aufgrund des α -Tocopherol-Defizits eine vermehrte Bildung von ROS sein, was zu einer verstärkten irreparablen

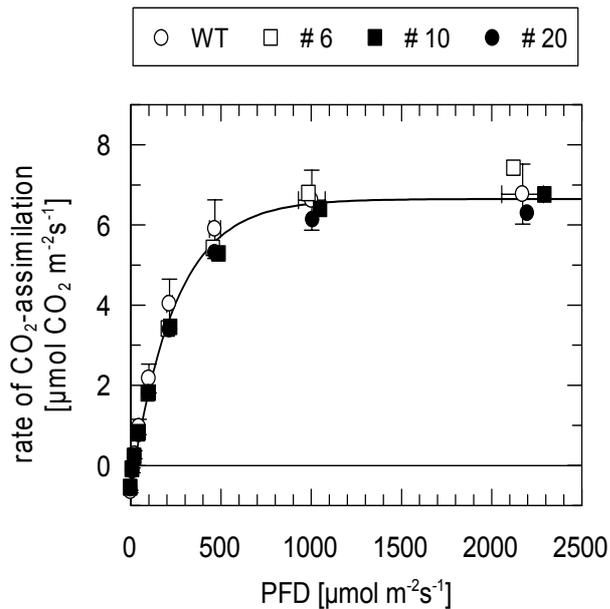


Abbildung 15: Lichtsättigungskurven der CO₂-Assimilation unter *in vivo*-Bedingungen von Wildtyp- und *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen. Es wurde jeweils das dritte oder vierte Blatt von gut gewässerten Tabakpflanzen in die Messküvette eingespannt und mit Weißlicht unterschiedlicher Intensität belichtet (beginnend mit der höchsten PFD) und die CO₂-Assimilation bei den einzelnen Lichtintensitäten für 20 min gemessen. Hierbei wurde jede Minute ein Messwert aufgezeichnet. Die einzelnen Messpunkte repräsentieren Mittelwerte aus 12 bis 15 Messwerten. Drei verschiedene Pflanzen pro Linie wurden analysiert. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde nur die SD des Wildtyps eingezeichnet. Die SD der transgenen Linien waren mit der des Wildtyps vergleichbar.

Schädigung von Komponenten in der Thylakoidmembran, wie z.B. den Photosystemen, führt. Die *CHL P*-Antisense-Pflanzen müssten dann, um einer Nettoschädigung entgegenzuwirken, einen Großteil der im Calvin-Zyklus gewonnenen Triosephosphate in die Neusynthese der betroffenen Komponenten investieren anstatt Biomasse aufzubauen. Die Existenz von photooxidativem Stress lässt sich auf einfache Weise durch die Analyse der Chl *a*-Fluoreszenz bei Raumtemperatur untersuchen (Krause und Weis, 1991; Krause und Jahns, 2003; 2004).

3.1.4 Die Löschung der Chl-Fluoreszenz

Die Chl *a*-Fluoreszenz kann durch photochemische (qP) oder nicht-photochemische Prozesse (NPQ) reduziert oder gelöscht werden (vgl. 1.3.4 und 2.4.1). Das vom Redoxzustand des Q_A abhängige qP spiegelt die Aktivität des linearen Elektronentransports wider, während die dem NPQ zugrunde liegenden Mechanismen vom Redoxzustand des Q_A unabhängig sind. Aufgrund seiner Proportionalität zur Größe der thermischen Energiedissipation, kann NPQ als Maß für die Herabregulierung der PS II-Aktivität unter den jeweiligen Lichtbedingungen verwendet werden.

Abbildung 16 dokumentiert die Abhängigkeit der Chl *a*-Fluoreszenzlöschungsparameter qP und NPQ von der Lichtintensität während einer 16-minütigen Belichtungsphase *in vivo*. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den *CHL P*-Antisense-Pflanzen beobachtet. Die ähnlichen Werte für qP unterstreichen, dass eine vergleichbare photosynthetische Nutzung der absorbierten Lichtenergie in allen vier Linien vorliegt, was mit den Daten der CO₂-Assimilation übereinstimmt. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Assoziierung von Chl_{GG} keinen negativen Einfluss auf die Lichtsammelfunktion der pigment-

bindenden Proteine in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen hat. Die nicht-photochemische Löschung der Chl a-Fluoreszenz verhielt sich umgekehrt proportional zur photochemischen Löschung. Die Untersuchung des NPQ zeigte jedoch keinen drastischen Unterschied zwischen den transgenen Linien und der Kontrolle auf.

Allerdings offenbarte eine weiterführende Analyse der beiden Hauptkomponenten des NPQ, qE und qI, signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten. Zwar wiesen alle vier Genotypen oberhalb von $500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ein gesättigtes qE auf, dieses war aber in den stark α -Tocopherol-defizienten Linien 6 und 10 um etwa 40% reduziert

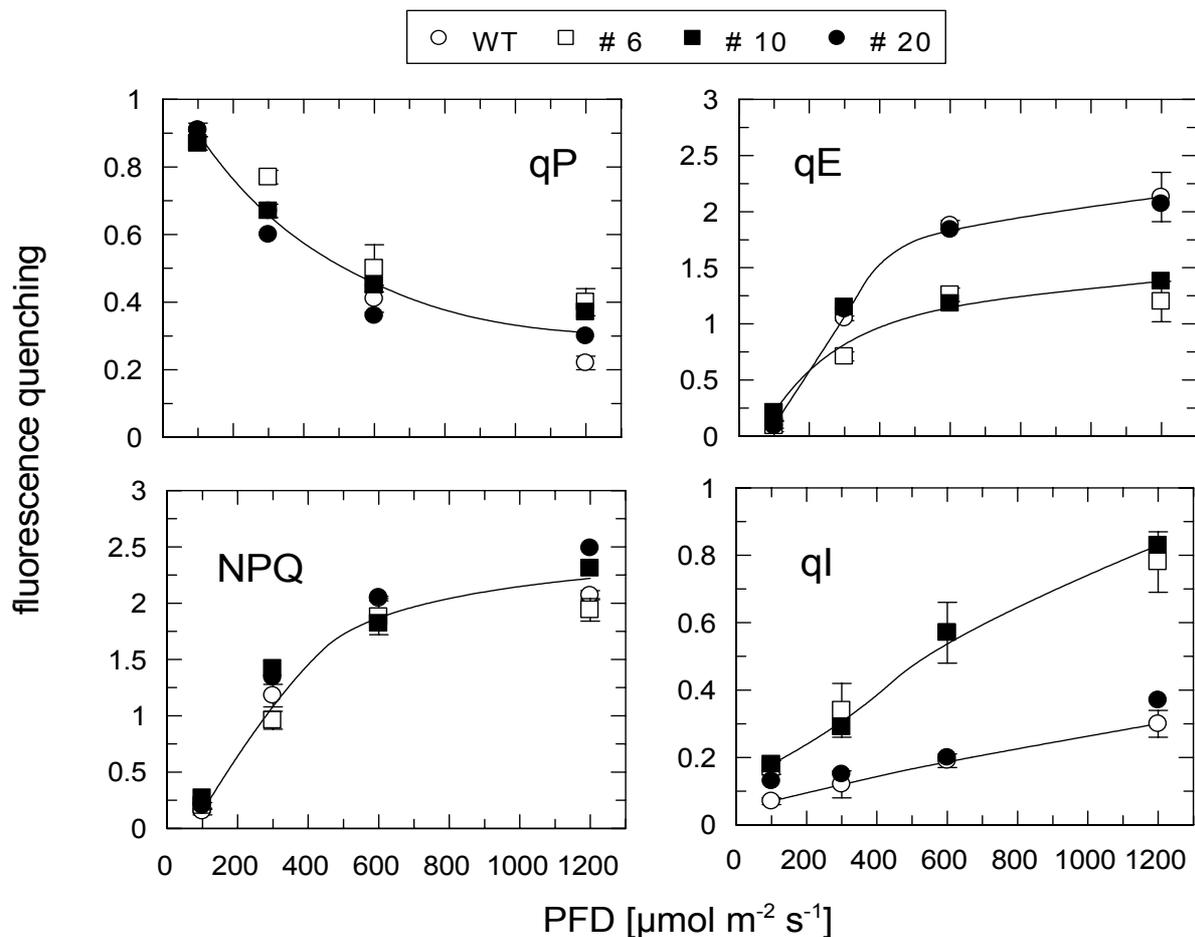


Abbildung 16: Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Lichtintensität des Anregungslichtes in Wildtyp- und *CHL P*-Antisense-Pflanzen. Blattscheiben von *N. tabacum* wurden für 16 min belichtet. Photochemische (qP) und nicht-photochemische Löschung (NPQ) wurde anhand der Fluoreszenzänderung aufgrund eines saturierenden Lichtblitzes am Ende der Belichtungsphase des aktinischen Lichtes ermittelt. Die zwei Hauptkomponenten des NPQ, die ΔpH -abhängige Löschung qE und die photoinhibitorische Löschung qI und ihre jeweiligen Stern-Volmer-Koeffizienten wurden von der Dunkelrelaxation des F_V nach 16-minütiger Belichtung bei unterschiedlicher PFD hergeleitet (siehe 2.4.1.2). Der Beitrag des qT (*state transition*) zur Fluoreszenzlöschung kann bei den vorliegenden Versuchsbedingungen vernachlässigt werden. Es sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten für jede der Linien dargestellt. Der Übersicht halber werden nur die SD für den Wildtyp und die Linie 6 gezeigt. Sie liegt für die Linien 10 und 20 in der gleichen Größenordnung.

(Abbildung 16). Die Ursache für die geringere ΔpH -abhängige thermische Energiedissipation könnte eine Fehlfunktion der Antennenproteine infolge der Bindung von Chl_{GG} sein. Dies muss kein Widerspruch zu der beobachteten, intakten Lichtsammelfunktion sein, da beide Prozesse auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Die Reduzierung des $q\text{E}$ würde eine erhöhte Anfälligkeit der transgenen Pflanzen für photooxidativen Stress induzieren.

$q\text{I}$ spiegelt die langanhaltende Inaktivierung des PS II (Photoinhibition) wider (siehe 1.2.4.3), und stieg in allen vier Linien mit zunehmender Lichtintensität fast linear an. Jedoch war das $q\text{I}$ in den transgenen Linien 6 und 10 im Vergleich zum Wildtyp ab einer PFD von $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ etwa um den Faktor 3 erhöht (Abbildung 16). Da die Vergrößerung des $q\text{I}$ mit der Reduzierung des $q\text{E}$ bei den gleichen Lichtintensitäten korreliert, führte dies zu einem entsprechenden NPQ in den Transformanten 6 und 10 im Vergleich mit den anderen beiden Linien. Der generelle Anstieg des $q\text{I}$ in den Linien 6 und 10 deutet auf eine größere Anfälligkeit dieser Pflanzen gegenüber Photoinhibition hin. Dies kann als Folge des in diesen *CHL P*-Antisense-Pflanzen vorherrschenden α -Tocopherol-Defizits interpretiert werden. Alternativ kann er auch auf der Reduzierung des $q\text{E}$ oder beiden Effekten beruhen. Eine größere Sensitivität der Linien 6 und 10 gegenüber photooxidativem Stress sollte bei länger anhaltender Starklichtexposition deutlich akzentuiert sein. Diese Annahme wurde im folgenden Abschnitt untersucht (siehe 3.1.5).

3.1.5 Die Empfindlichkeit gegenüber Starklichtstress

Die Sensitivität von Pflanzen gegenüber Starklichtstress kann auf einfache Weise anhand der Inaktivierung des PS II bestimmt werden, indem man die Reduzierung des $F_{\text{V}}/F_{\text{M}}$ -Verhältnisses misst (Krause und Weis, 1991). In Abbildung 17 wird die Inhibition und Erholung der PS II-Aktivität während einer einstündigen Belichtung mit $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bzw. nach einer zweistündigen Erholung im Schwachlicht gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Wildtyp und die Linie 20 sehr ähnliche Eigenschaften besitzen. In beiden Genotypen wurde das $F_{\text{V}}/F_{\text{M}}$ im Starklicht auf 80% des Kontrollwertes reduziert. Im Schwachlicht erholte sich das Fluoreszenzsignal innerhalb von 2 h nahezu vollständig auf 95% des Ausgangswertes. Im Gegensatz dazu war in den transgenen Linien 6 und 10 eine deutlich stärkere Verminderung des $F_{\text{V}}/F_{\text{M}}$ auf 50% des Anfangswertes innerhalb von 60 min Starklichtexposition zu beobachten. Die Photoinhibition setzte bereits nach 15 min ein, und war mit 70% des Kontrollwertes bereits größer als bei der Linie 20 und dem Wildtyp nach 1 h. Zwar konnte auch in den *CHL P*-defizienten Linien 6 und 10 eine Relaxation des Fluoreszenzsignals um 15% nach 2 h Schwachlicht detektiert werden, dies reichte aber nicht aus um die Photoinhibition

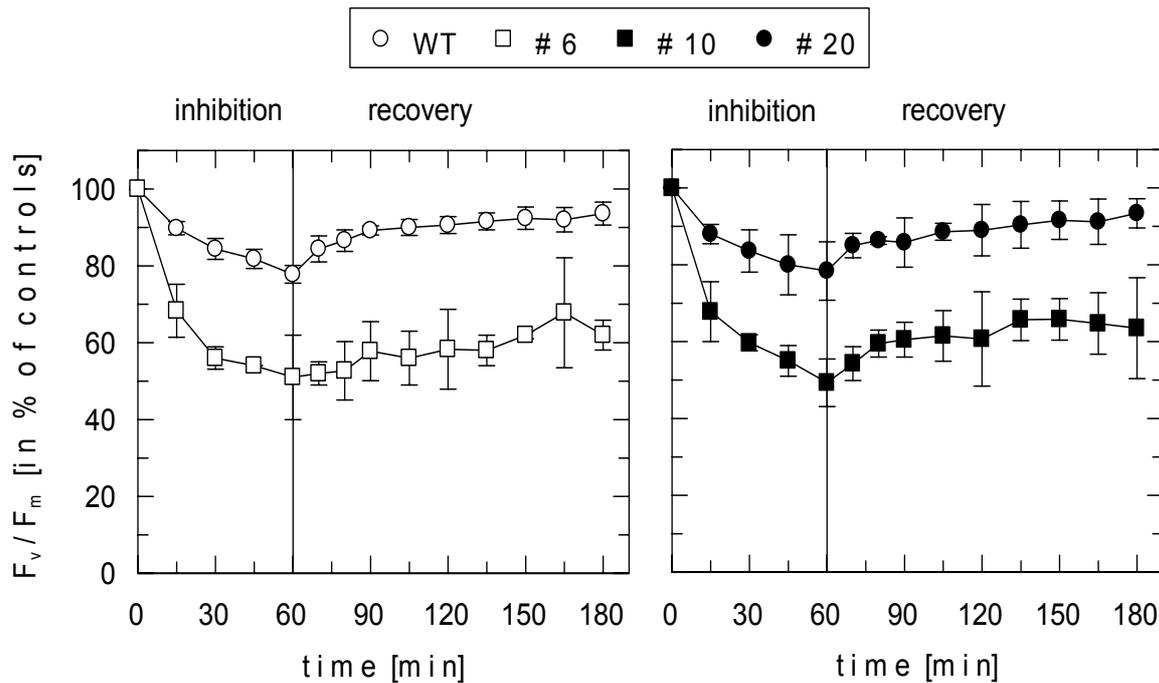


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Photoinhibition und Erholung. Blattscheiben von *CHL P*-Antisense-Pflanzen und des Wildtyps wurden für 1 h bei einer Temperatur von 20°C und bei einer PFD von 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Anschließend wurden die Blattscheiben für 2 h in Schwachlicht bei 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ überführt. Zu den jeweiligen Messpunkten wurden die Blattscheiben für 10 min dunkeladaptiert, um eine Relaxation des ΔpH -abhängigen qE zu ermöglichen. Anschließend wurde der Quotient F_V/F_M bestimmt. Innerhalb einer Messreihe wurden die Messwerte an verschiedenen Blattscheiben ermittelt. Es werden Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei unterschiedlichen Experimenten pro Pflanzenlinie gezeigt. Der Übersicht halber werden die Daten in zwei Diagrammen präsentiert.

vollständig zu kompensieren, so dass die Inaktivierung des PS II auch nach 2 h Schwachlicht erhalten blieb. Diese Ergebnisse belegen, dass die stark betroffenen Linien 6 und 10 auf dramatische Weise sensibel auf Starklichtstress reagieren. Die Reduktion des F_V/F_M konnte durch eine Verlängerung der Belichtungszeit auf mehrere Stunden bei einer Lichtintensität von 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ noch gesteigert werden (vgl. Abbildung 20A). Unter diesen Versuchsbedingungen wurde die variable Fluoreszenz (F_V) nach 4 h komplett gelöscht. Beim Wildtyp führte erst eine achtstündige Exposition zum vollständigen Verlust der variablen Fluoreszenz. Somit ist der deutlich verminderte Tocopherol-Gehalt mit einem starken Anstieg der Sensitivität gegenüber Starklichtstress verbunden.

3.1.6 Die Aktivität des Xanthophyll-Zyklus

Dem im Xanthophyll-Zyklus gebildeten Carotinoid Zx wird nicht nur eine essentielle Funktion im qE-Mechanismus zugeschrieben (vgl. 1.3.4.2), sondern es ist auch maßgeblich an der photoinhibitorischen Löschung qI beteiligt (vgl. 1.3.4.3). Die Analyse der Aktivität des Xanthophyll-Zyklus wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wie bei den Photoinhibitions- bzw. Relaxationsexperimenten in 3.1.5 beschrieben. Die Bildung von Ax

und Zx im Starklicht war in allen vier Tabaklinien vergleichbar (Abbildung 18). So zeigten die Kinetiken der Ax- und Zx-Bildung keine nennenswerten Unterschiede, und der maximale Deepoxidationszustand (DEPS) wurde in allen Fällen nach etwa 15-minütiger Belichtung erreicht. Lediglich der maximale DEPS war nach 60 min Starklicht in den beiden Linien 6 und 10 um etwa 5 bis 10% erhöht. Berücksichtigt man die um etwa 45% vergrößerte Gesamtmenge an Xanthophyll-Zykluspigmenten (bezogen auf den relativen Chl-Gehalt; Tabelle 5), so wird in den *CHL P*-Antisense-Linien 6 und 10 wesentlich mehr des photoprotektiv wirksamen Ax und Zx gebildet, was auf einen größeren photooxidativen Stress in diesen beiden Linien hindeutet.

In der anschließenden Schwachlichtphase zeigte die Kinetik der Epoxidationsreaktion keinen deutlichen Unterschied zwischen den einzelnen Linien. Allerdings war der DEPS nach Abschluss der schnellen Phase (etwa 30 min) der zweiphasigen Erholungskinetik in der Linie 6 etwa doppelt so groß und tendenziell auch in der Linie 10 deutlich erhöht im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen. Dies ist auf den erhöhten DEPS in den beiden α -Tocopheroldefizienten Linien 6 und 10 (mit Einschränkung) während der Starklichtexposition zurückzuführen.

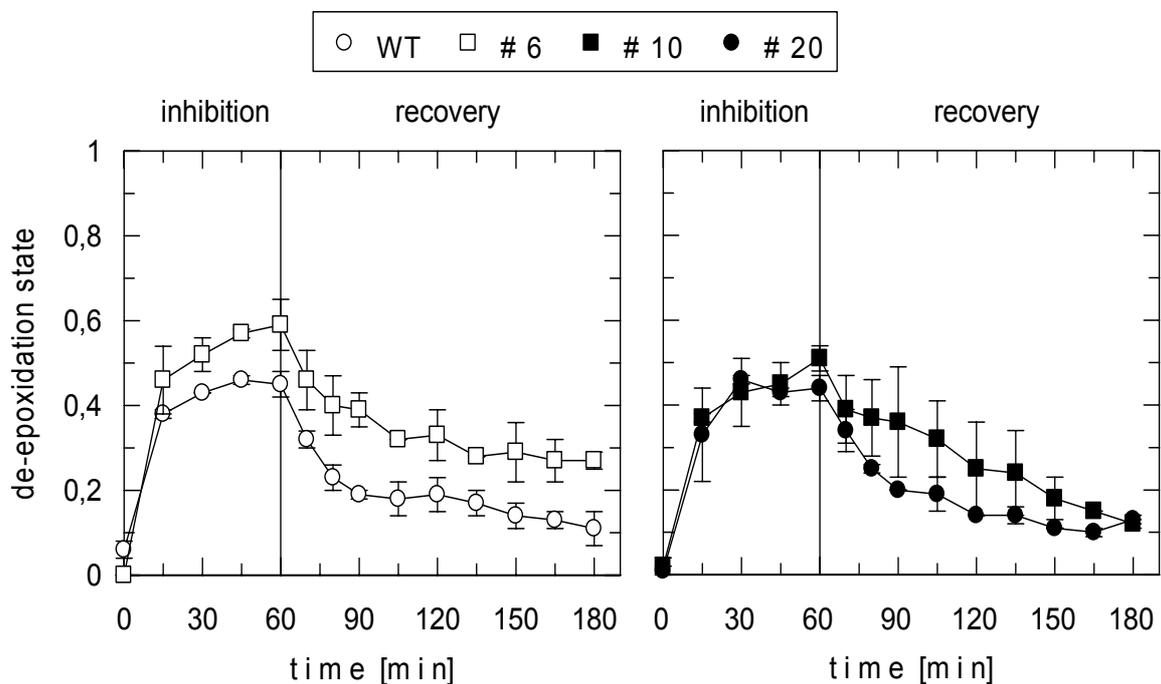


Abbildung 18: Dynamik des Deepoxidationszustandes (DEPS) während der Photoinhibition und Erholung. Dieselben Blattscheiben wie in Abbildung 17 wurden für die Analyse der Pigmentkomposition verwendet. Direkt nach der Messung der maximalen Fluoreszenz wurden die Blattscheiben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Pigmentextraktion und Analyse mittels HPLC erfolgte gemäß 2.5.12. Der DEPS der Xanthophyll-Zykluspigmente berechnet sich wie folgt: $DEPS = (Zx + \frac{1}{2} Ax) / (Vx + Ax + Zx) * 100$. Innerhalb einer Messreihe wurden die Messwerte an verschiedenen Blattscheiben ermittelt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SD aus jeweils drei unterschiedlichen Experimenten pro Pflanzenlinie. Der Übersicht halber werden die Daten in zwei Diagrammen präsentiert.

3.1.7 Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Wie in 3.1.4 und 3.1.5 dokumentiert wurde, kommt es bei den *CHL P*-Antisense-Linien 6 und 10 zu einem deutlichen Anstieg der Photoinhibition. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass ROS wie $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ und H_2O_2 an der oxidativen Schädigung des PS II beteiligt sind (z.B. Richter et al. 1994). Da α -Tocopherol ein effizienter physikalischer und chemischer *quencher* von ROS ist (vgl. 1.3.5; Fryer, 1992), wurde die Licht-induzierte Bildung von ROS in isolierten Thylakoiden in Gegenwart des *spin traps* 5(-Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid (DEPMPO) mittels Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie untersucht. Das DEPMPO ist ein phosphoryliertes Derivat des gebräuchlichen *spin traps* 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO). Es reagiert sowohl mit $\bullet\text{O}_2^-$ als auch mit $\bullet\text{OH}$ und bildet mit ihnen jeweils charakteristische *spin trap*-Addukte aus (vgl. Abbildung 12; Sgherri et al., 1999), die sich durch eine längere Stabilität auszeichnen (Zhang et al., 2000).

Abbildung 19A zeigt ein typisches ESR-Spektrum des *spin trap*-Adduktes aus DEPMPO und $\bullet\text{OH}$, das durch die Zugabe von Katalase vollständig hemmbar war (Abbildung 19B). Aus der Reaktion zwischen DEPMPO und $\bullet\text{O}_2^-$ resultierte ein DEPMPO-OOH-Addukt, dessen ESR-Spektrum eine charakteristische, superfeine Aufspaltung in 12 Signale aufwies (Abbildung

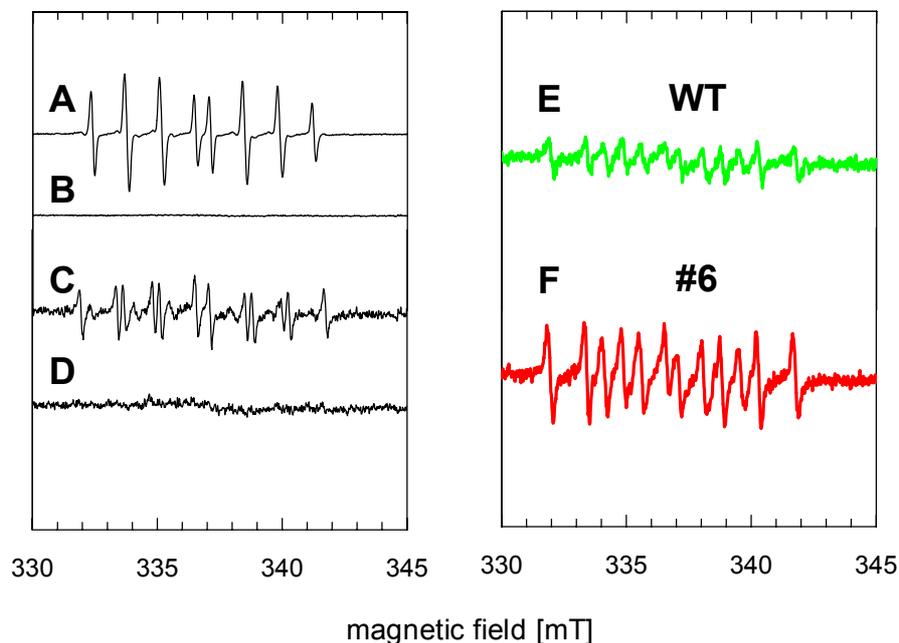


Abbildung 19: ESR-Spektren des *spin traps* DEPMPO von belichteten Thylakoiden aus Tabak (E und F) und Kontrollen (A bis D). **A)** Spektrum des DEPMPO-Adduktes mit $\bullet\text{OH}$, das mit der klassischen Fenton-Reaktion (vgl. 2.5.4.1) generiert wurde. **B)** Gleicher Ansatz wie in (A), aber in Gegenwart von Katalase. **C)** Spektrum des DEPMPO-Adduktes mit $\bullet\text{O}_2^-$, das mit Hilfe des Xanthin/Xanthin-Oxidase-Systems erzeugt wurde. **D)** Gleicher Ansatz wie bei (C), aber in Gegenwart von Superoxid-Dismutase. Für die genaue Zusammensetzung der Reaktionsansätze siehe 2.5.4. **E)** Spektrum von belichteten Thylakoiden des Wildtyps. Die Thylakoide wurden für 5 min bei einer PFD von $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Gegenwart von DEPMPO belichtet. **F)** Gleicher Ansatz wie bei (E), aber mit Thylakoiden der *CHL P*-Antisense-Linie 6.

19C) und in Gegenwart von Superoxid-Dismutase vollständig eliminiert werden konnte (Abbildung 19D). In weiteren Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass $\bullet\text{OH}$ und $\bullet\text{O}_2^-$ als diamagnetische Moleküle in Abwesenheit von DEPMPO kein ESR-Signal produzierten (Daten nicht gezeigt).

Die Belichtung von Thylakoiden des Wildtyps in Gegenwart von DEPMPO führte zu einer Bildung von *spin trap*-Addukten mit $\bullet\text{OH}$ und $\bullet\text{O}_2^-$, da das ESR-Spektrum ein Mischsignal aus DEPMPO-OH und DEPMPO-OOH darstellt (Abbildung 19E). In weiterführenden Experimenten konnte zudem ein proportionaler Anstieg der Signalgröße der ESR-Spektren mit steigender Belichtungsdauer dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen lieferten unbelichtete Thylakoide in Gegenwart des *spin trap* kein ESR-Signal (Daten nicht gezeigt). Diese Daten stimmen mit Untersuchungen an Thylakoiden aus Weizen und PS II-Membranfragmenten überein (Sgherri et al., 1999; Zhang et al., 2003; Pospíšil et al., 2004).

Das ESR-Spektrum von belichteten Thylakoiden der α -Tocopherol-defizienten Linie 6 zeigte ebenfalls ein Mischsignal aus DEPMPO-OH und DEPMPO-OOH (Abbildung 19F). Allerdings war das ESR-Signal der Linie 6 bei gleicher Belichtungsdauer stets zwei- bis dreimal so groß wie beim Wildtyp. Dieses Ergebnis veranschaulicht, dass bei Verwendung gleicher Chl-Mengen in der Linie 6 eine zwei- bis dreifach größere Menge an $\bullet\text{OH}$ und $\bullet\text{O}_2^-$ während der Belichtung gebildet wurde als in den Wildtyp-Thylakoiden. Damit konnte erstmalig dokumentiert werden, dass es in der *CHL P*-Antisense-Linie 6 tatsächlich zu einer verstärkten Akkumulation von ROS bei photooxidativem Stress unter *in vitro*-Bedingungen kommt. Da sich in den vorangegangenen Experimenten die Linie 20 und der Wildtyp bzw. die stark Tocopherol-defizienten Linie 6 und 10 stets nahezu identisch verhalten haben, wurde angesichts des stets knappen Versuchsmaterials auf eine Wiederholung der Experimente mit den Linien 10 und 20 verzichtet. Dies gilt auch für die Untersuchung des D1-Abbaus (vgl. 3.1.8).

3.1.8 Abbau des D1-Proteins

Das D1-Protein im PS II-RZ stellt ein Hauptziel der photooxidativen Schädigung im PS II dar (Trebst, 2003). Trebst et al. (2002) konnten in *C. reinhardtii* zeigen, dass ein durch eine Inhibitorbehandlung verursachter Tocopherol-Mangel zum Verlust der PS II-Aktivität und des D1-Proteins führt. Dementsprechend wurde der D1-Abbau bei lang anhaltendem Starklichtstress in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen analysiert. Die Untersuchung erfolgte in Gegenwart von Streptomycin, einem Inhibitor der plastidären Proteinbiosynthese. Dies ist notwendig, da das Plastom-kodierte D1-Protein zwar einem fortwährenden Licht-induzierten Abbau unterliegt, es aber aufgrund seiner permanenten Neusynthese zu keinem Nettoabbau kommt

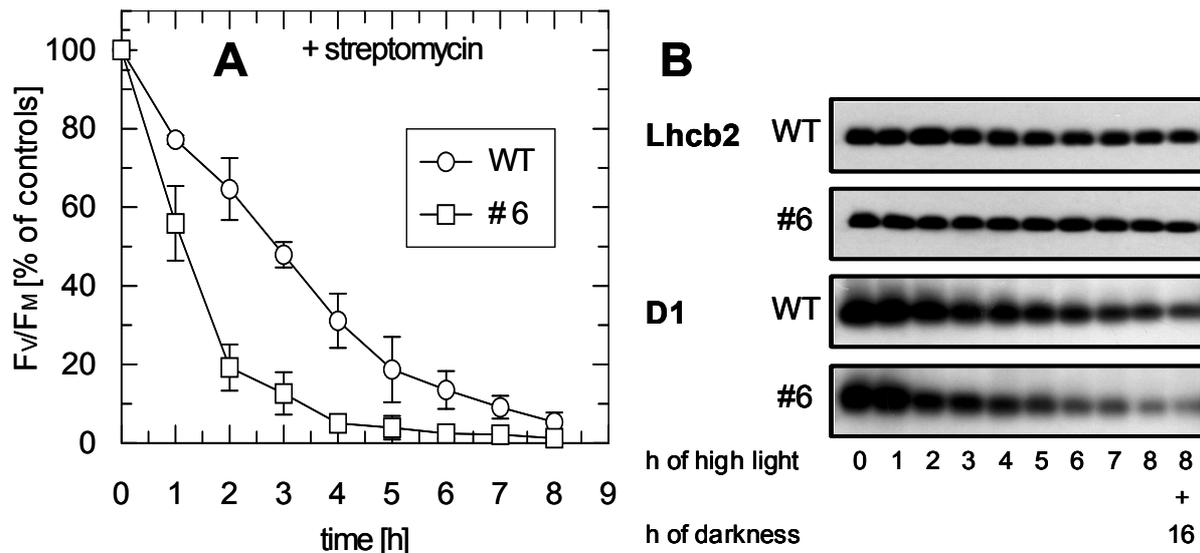


Abbildung 20: Kinetik der Starklicht-induzierten Photoinhibition des PS II (A) und Immunoblot-Analyse der D1-Degradierung (B) in Gegenwart von Streptomycin in Blattscheiben des Wildtyps (WT) und der *CHL P*-Antisense-Linie 6. A) Vor dem Beginn der Starklichtexposition bei $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden die Blattscheiben für 30 min bei $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und anschließend für 60 min im Dunkeln mit einer 3 mM Streptomycin-Lösung inkubiert. Zu den jeweiligen Messpunkten wurde der Quotient F_v/F_m bestimmt und die Blattscheiben in flüssigem N_2 für die Immunoblot-Analysen schockgefroren. Die Daten wurden auf das F_v/F_m zum Zeitpunkt $t = 0$ normiert (WT: $0,83 \pm 0,01$; #6: $0,70 \pm 0,07$). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD aus drei unterschiedlichen Experimenten pro Pflanzenlinie. **B)** Aus den Blattscheiben, die für die Inhibitionsmessung verwendet wurden, wurden jeweils Thylakoide isoliert und je $2 \mu\text{g}$ Chl Thylakoide pro Spur auf das PAA-Gel aufgetragen. Nachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die Proteine D1 bzw. Lhcb2.

(Aro et al., 1993).

Anhand des F_v/F_m -Verhältnisses wurde eine beschleunigte Inaktivierung des PS II in Gegenwart von Streptomycin während der Starklichtexposition dokumentiert (Abbildung 20A). Während das PS II im Wildtyp nach 8 h Starklicht komplett inaktiviert war, zeigte die *CHL P*-Antisense-Linie 6 schon nach vierstündiger Belichtung eine vollständige Inhibition. Für beide Pflanzenlinien wurde keine Erholung der PS II-Aktivität nach 16 h Schwachlicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die im Vergleich mit dem Wildtyp forcierte Inaktivierung des PS II in der Linie 6 ging mit einem beschleunigten Abbau des D1-Proteins unter den gleichen Bedingungen einher (Abbildung 20B). Für das Lhcb2-Protein konnte in beiden Linien in Gegenwart von Streptomycin erwartungsgemäß, da das Lhcb2 im Kern kodiert wird, keine Veränderung des Proteinlevels beobachtet werden. In einem Kontrollexperiment ohne Inhibitor wurde für beide Linien nur eine geringe Netto-D1-Degradierung mittels Immunoblotting detektiert (Daten nicht gezeigt; vgl. aber Abbildung 27B). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der α -Tocopherol-defizienten Linie 6 die drastisch erhöhte Sensitivität gegenüber Starklichtstress in Gegenwart des Inhibitors Streptomycin mit einem fast vollständigen Abbau des D1-Proteins verbunden war.

3.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von α -Tocopherol als Schutzfaktor bei photooxidativem Stress wurden *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen analysiert, die einen deutlich reduzierten Tocopherol-Gehalt aufwiesen. Anhand von Immunoblotting- und Pigmentanalysen konnte gezeigt werden, dass trotz der Verringerung der Chl-Gesamtmenge um 30% die relativen Stöchiometrien der Photosysteme unverändert blieben und die pigmentbindenden Proteine in gleicher Menge vorhanden waren. Daraus muss geschlossen werden, dass die transgenen Linien über weniger Elektronentransportketten pro Blattfläche verfügen. Die Assemblierung großer Mengen an Chl_{GG} mit den pigmentbindenden Proteinen hatte weder einen signifikanten Effekt auf die Aktivität der einzelnen Photosysteme noch auf die CO₂-Assimilation. Eine länger anhaltende Starklichtexposition führte in den Tocopherol-defizienten Pflanzen zu einer drastisch erhöhten Inaktivierung des PS II, die auch nach Überführung in Schwachlicht nicht vollständig reversibel war. Diese photooxidative Schädigung korrelierte mit einer zwei- bis dreifach höheren Akkumulation von ROS unter *in vitro*-Bedingungen. Die erhöhte Photoinhibition des PS II ging einher mit einem beschleunigten Abbau des D1-Proteins in den transgenen Linien. Der in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen offensichtlich erhöhte photooxidative Stress konnte durch einen größeren Pool an Xanthophyll-Zyklus-pigmenten nicht kompensiert werden. Die hier präsentierten Daten dokumentieren anschaulich, dass ein ausgeprägtes Tocopherol-Defizit zu einer dramatischen Beeinträchtigung der Vitalität von Pflanzen bei photooxidativem Stress führt.

3.2 PsbS und seine Bedeutung für die Fitness der Pflanzen bei photooxidativem Stress

Neben der Deaktivierung von bereits gebildeten ROS durch Tocopherol stellt die präventive Wärmedissipation von Anregungsenergie zur Vermeidung der Neubildung von ROS das zweite grundlegende Schutzprinzip gegen photooxidative Schädigung der Thylakoidmembran dar (vgl. Abbildung 5). Die Δ pH-regulierte Energiedissipation (qE) in den Antennen des PS II spielt dabei eine zentrale Rolle. Während der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der Δ pH-abhängigen Löschung in den letzten Jahren immer besser verstanden wurde (vgl. 1.3.4.2), ist wenig bekannt über die physiologische Bedeutung des qE-Mechanismus für die Fitness der Pflanzen unter photooxidativem Stress. Zur Klärung dieser Frage wurden transgene *A. thaliana*-Pflanzen analysiert, denen aufgrund einer Rasterschubmutation im *psbS*-Lokus das PsbS-Protein im PS II fehlte.

3.2.1 Mutation des *psbS*-Lokus in *A. thaliana*

Wisman et al. (1998a; b) sichteten mittels eines reversen genetischen Ansatz eine *A. thaliana*-Population, die mit dem transposablen *En-1*-Element mutagenisiert wurde. Dabei konnte eine *psbs-1*-Mutante identifiziert werden, die ein *En-1*-Element an Position 376 im *open reading frame* (ORF) des *psbS*-Gens (AF134131) besaß (Abbildung 21A). In zwei unabhängigen

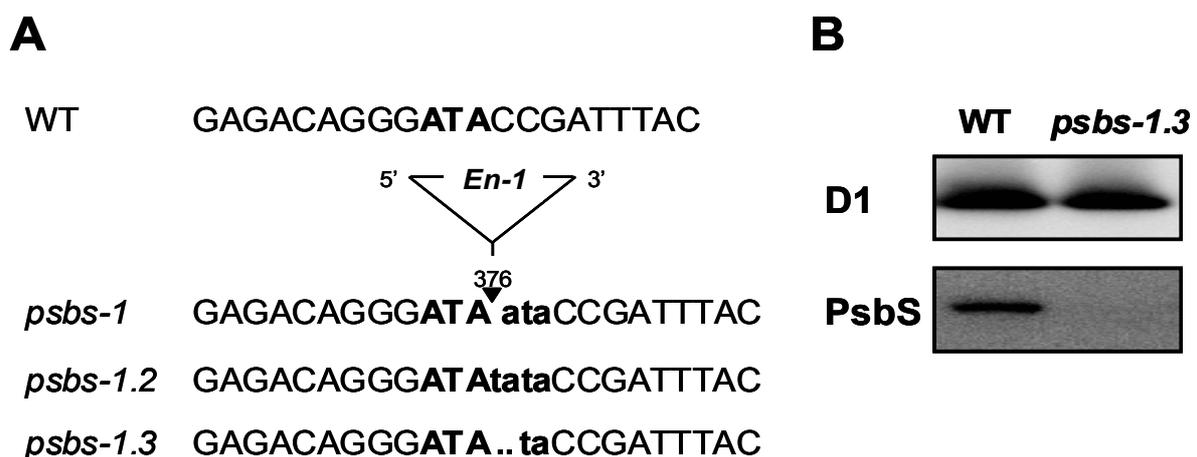


Abbildung 21: Insertionsstelle und *footprints* des transposablen *En-1*-Elements im ORF des *psbS*-Gens (AF134131) (A) und Immunoblot-Analyse der *psbs-1.3*-Referentante und des Wildtyps (B). **A)** Die verschiedenen Mutationen im *psbS*-Lokus. Die DNA-Sequenzen der Donorstellen des *En-1*-Elements in den beiden unabhängigen germinalen Referentanten *psbs-1.2* ((+4)-Rasterschub) und *psbs-1.3* ((+2)-Rasterschub) wurden mittels PCR ermittelt. Die *footprints* im *psbS*-Gen nach der Exzision des Transposons sind in fettgedruckten Kleinbuchstaben dargestellt, während die Zielsequenz im Wildtyp mit fettgedruckten Großbuchstaben markiert ist. Die Sequenzanalysen wurden von der Arbeitsgruppe D. Leister, MPI Köln, durchgeführt. **B)** Aus Blättern der jeweiligen Linie wurden Proteingeesamtextrakte isoliert und 8 μ g Proteinextrakt pro Spur im PAA-Gel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die angezeigten Proteine.



Abbildung 22: Phänotypen der *psbs-1.3*-Mutante und des Wildtyps. Die hier gezeigten *A. thaliana*-Pflanzen sind 6 Wochen alt und wurden unter LL-Bedingungen im Gewächshaus kultiviert (PFD von $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Links: Wildtyp, Ökotyp Columbia 0; rechts: *psbs-1.3*-Mutante

germinalen Revertanten hinterließ die Exzision des transposablen *En-1*-Elementes sogenannte *footprints* in den leeren Donorstellen des *psbS*-Gens, was einen (+2) bzw. (+4)-Rasterschub im ORF verursachte (Abbildung 21A). Für die nachfolgenden physiologischen und biochemischen Untersuchungen wurden Nachkommen der stabilen germinalen *psbs-1.3*-Revertante ((+2)-Rasterschub; Abbildung 22) verwendet, die freundlicherweise von D. Leister, MPI Köln, zur Verfügung gestellt wurde. Immunoblot-Analysen von Proteingesamtextrakten (Abbildung 21B) und von Thylakoidmembranen (Graßes et al., 2002) mit spezifischen Antikörpern demonstrierten, dass in der *psbs-1.3*-Mutante kein PsbS-Protein mehr detektiert werden konnte. Somit verursachte der (+2)-Rasterschub im ORF des *psbS*-Lokus einen vollständigen Verlust der Genfunktion, was aber offensichtlich zu keinem signifikanten Phänotyp in der *psbs-1.3*-Mutante führte (Abbildung 22).

3.2.2 Pigmentzusammensetzung und Aufbau der Photosysteme der *psbs-1.3*-Mutante

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von D. Leister, MPI Köln, konnte anhand von Untersuchungen an isolierten Thylakoidmembranen mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass der Verlust des PsbS-Proteins qualitativ und quantitativ keine Auswirkungen auf den Aufbau des PS II-Multiproteinkomplexes in der *psbs-1.3*-Revertante hatte (vgl. Graßes et al., 2002). So zeigten die densitometrischen Analysen der Coomassie-gefärbten 2-D-Gele eine vergleichbare Menge der verschiedenen Untereinheiten des Photosyntheseapparates in beiden Genotypen.

Dies wurde auch durch die Analyse der Pigmentzusammensetzung der *psbs-1.3*-Mutanten mittels HPLC bestätigt (Tabelle 7). Sowohl das Chl a/b- als auch das Car/Chl-Verhältnis waren in der PsbS-defizienten Linie nicht verändert. Die Menge der einzelnen Carotinoide, bezogen auf die Chl-Gesamtmenge, war mit denen des Wildtyps vergleichbar. Der Verlust des 22 kDa-Proteins des PS II beeinträchtigte auch nicht die Summe der für die thermische

Tabelle 7: Vergleich der Chl- und der Carotinoid-Zusammensetzung des Wildtyps und der *psbs-1.3*-Mutante, kultiviert unter LL- und HL-Bedingungen (PFD 100 bzw. 800 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Der Carotinoid-Gehalt des Wildtyps (WT) und der PsbS-defizienten Mutante wurde mittels HPLC ermittelt. Die Pigmentdaten wurden auf die Chl-Gesamtmenge normiert ($\mu\text{mol mmol}^{-1} \text{Chl}_{\text{Gesamt}}$). Gezeigt werden Mittelwerte von mindestens 10 verschiedenen Messungen von Blattproben \pm SD.

	WT		<i>psbs-1.3</i>	
	LL	HL	LL	HL
Chl a	739 \pm 5	794 \pm 4	746 \pm 5	787 \pm 5
Chl b	261 \pm 5	206 \pm 4	254 \pm 5	213 \pm 5
Chl a/b	2,83 \pm 0,07	3,85 \pm 0,10	2,94 \pm 0,08	3,70 \pm 0,10
Neo	46 \pm 2	42 \pm 1	45 \pm 2	41 \pm 1
Lut	166 \pm 6	188 \pm 8	167 \pm 10	181 \pm 6
β -Caro	115 \pm 8	164 \pm 11	120 \pm 9	154 \pm 6
Vx + Ax + Zx	37 \pm 5	78 \pm 10	36 \pm 4	66 \pm 9
Car/Chl	0,36 \pm 0,02	0,48 \pm 0,03	0,36 \pm 0,02	0,44 \pm 0,02

Energiedissipation essentiellen Xanthophyll-Zykluspigmente. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit Li et al. (2000). Die Anpassungsfähigkeit der Mutante an unterschiedliche Lichtintensitäten wurde durch den vollständigen Funktionsverlust des *psbs*-Gens in keinsten Weise beeinflusst. So zeigten der Wildtyp und auch die PsbS-defiziente Linie sowohl die für unter HL-Bedingungen kultivierten Pflanzen typische Erhöhung des Chl a/b-Verhältnisses als auch die Vergrößerung des photoprotektiv wirksamen Xanthophyll-Zyklusools.

3.2.3 Wachstumsrate und CO_2 -Assimilation der *psbs-1.3*-Mutanten

Die *psbs-1.3*-Mutante verfügte zwar über keinen markanten Phänotyp, jedoch konnte mit Hilfe eines Video-Imaging-Systems in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe D. Leister,

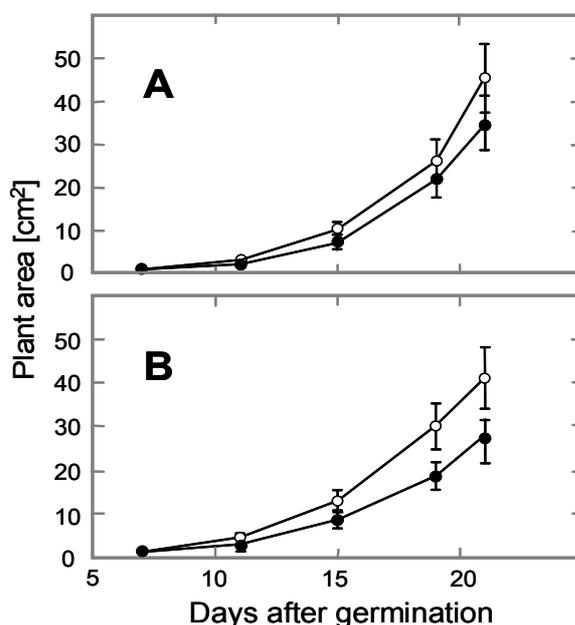


Abbildung 23: Wachstumskinetik des Wildtyps (weiß) und der *psbs-1.3*-Mutante, (schwarz) kultiviert unter LL-Bedingungen (A; PFD 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und HL-Bedingungen (B; PFD 800 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Das Wachstum basiert auf der Zunahme der Größe der photosynthetisch-aktiven Pflanzenfläche. Die Versuchsdurchführung erfolgte durch P. Pesaresi aus der Arbeitsgruppe von D. Leister, MPI Köln. Entnommen aus Graßes et al. (2002), verändert.

MPI Köln, gezeigt werden, dass die Zunahme der Biomasse in der PsbS-defizienten Linie (bezogen auf die Blattfläche) unter HL-Anzuchsbedingungen auf 65% des Wildtypniveaus signifikant reduziert war (Abbildung 23B). Unter LL-Bedingungen war die Verzögerung der Wachstumsrate in den *psbs-1.3*-Mutanten hingegen nur schwach ausgeprägt (Abbildung 23A). Eine geringere CO₂-Assimilationsrate war nicht für das retardierte Wachstum verantwortlich, da diese sich in beiden Genotypen nicht signifikant voneinander unterschied, unabhängig von den Kulturbedingungen (Graßes et al., 2002). Die Ursache ist wahrscheinlich ein infolge der eingeschränkten Δ pH-abhängigen thermischen Energiedissipation größerer photooxidativer Stress in der *psbs-1.3*-Mutante.

3.2.4 NPQ der variablen Chl a-Fluoreszenz der *psbs-1.3*-Mutante

Die nicht-photochemische Löschung der Chl a-Fluoreszenz (NPQ) ist nicht nur ein hervorragender Indikator für die Δ pH-abhängige Wärmedissipation (qE), sondern auch für die Lichtinduzierte Inaktivierung des PS II (qI; vgl. 1.3.4). Das Ausmaß von qE und qI wurde in Abhängigkeit von der Belichtungsintensität in der *psbs-1.3*-Mutante überprüft. Wie Abbildung 24 illustriert, bildete qE bei sättigenden Lichtbedingungen die Hauptkomponente des NPQ. Die Δ pH-regulierte Löschung erreichte in unter LL-Bedingungen (Anzucht bei 100 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹) kultivierten Wildtyp-Pflanzen bereits bei einer PFD von 600 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹ ihr maximales Niveau. In den *psbs-1.3*-Mutanten veränderte der Verlust des PsbS-Proteins die nicht-photochemische Löschung hingegen dramatisch. qE war nahezu vollständig unterdrückt und erreicht nur etwa 10% des Wildtypniveaus (Abbildung 24B).

Die qI-Komponente des NPQ stieg in beiden Genotypen in Abhängigkeit von der Lichtintensität annähernd linear an. Nur bei einer maximalen Lichtintensität von 1800 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹ konnte ein signifikant erhöhtes qI in der PsbS-defizienten Linie detektiert werden (Abbildung 24C). Da qI die langanhaltende Inaktivierung des PS II reflektiert, deutet das erhöhte qI auf eine verstärkte Sensitivität der *psbs-1.3*-Mutante gegenüber photooxidativem Stress hin.

In unter HL-Bedingungen (Anzucht bei 800 μ mol Photonen m⁻² s⁻¹) kultivierten Wildtyp-Pflanzen war der Anstieg des qE zu stärkeren Lichtintensitäten hin verschoben, was mit einer Erhöhung der Δ pH-abhängigen Fluoreszenzlöschung einherging (Abbildung 24E). Letzteres macht den höheren Bedarf an thermischer Dissipation überschüssiger Anregungsenergie in den HL-Pflanzen deutlich. In Analogie zu den unter LL-Bedingungen kultivierten Mutanten war qE in der unter HL-Bedingungen angezogenen PsbS-defizienten Linie unabhängig von der Intensität des Anregungslichtes gänzlich dezimiert, was erneut die Bedeutung des PsbS-

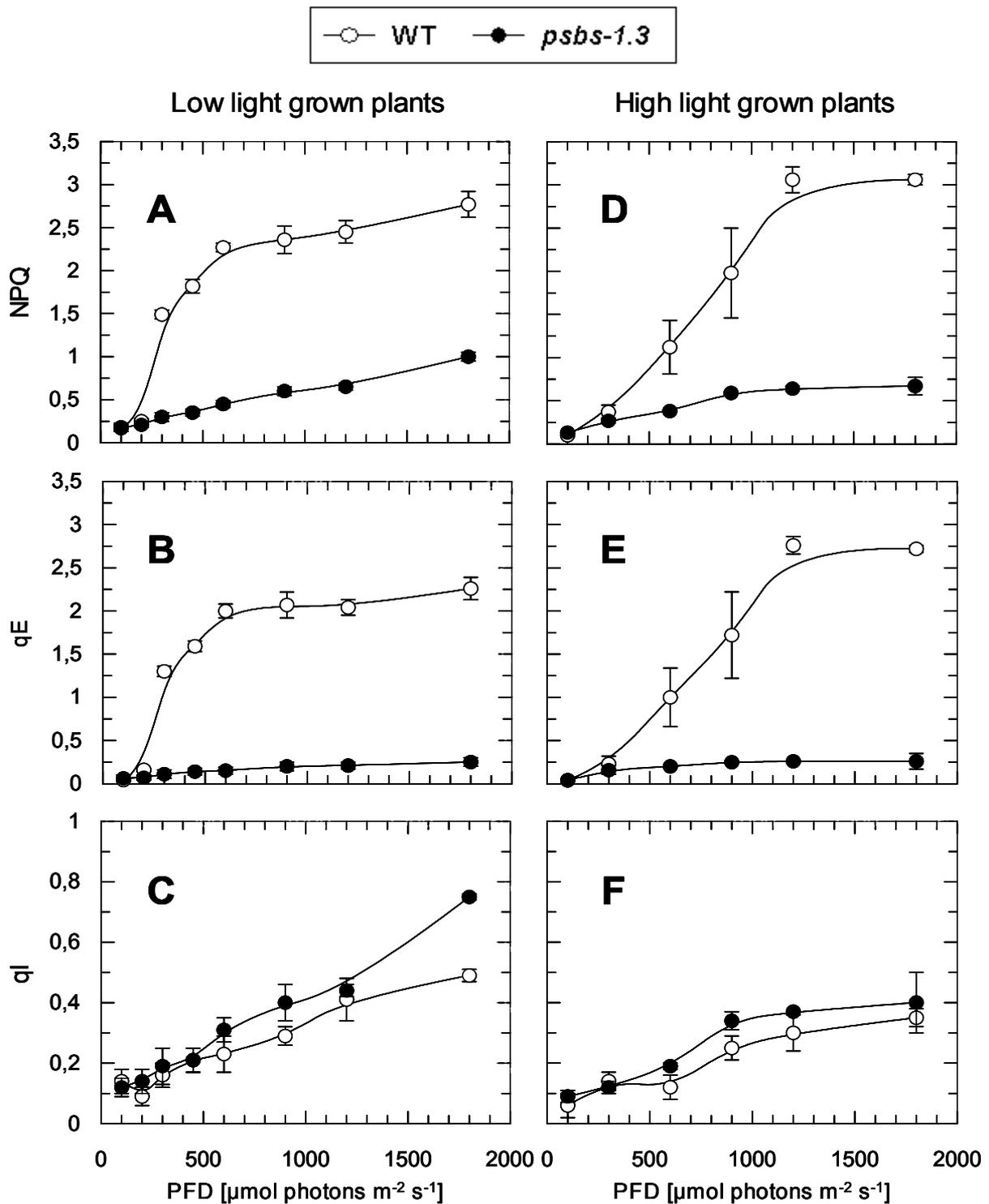


Abbildung 24: Nicht-photochemische (A, D), ΔpH -abhängige (B, E) und photoinhibitorische (C, F) Löschung der variablen Chl *a*-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der PFD des Anregungslichtes in Blattscheiben der *psbs-1.3*-Mutante und des Wildtyps (WT). Die Löschung der Fluoreszenz wurde an dunkeladaptierten Blattscheiben von *A. thaliana* ermittelt, die entweder unter LL- (A, B, C) oder HL-Bedingungen (D, E, F) kultiviert wurden. Die Blattscheiben wurden für 16 min belichtet und NPQ anhand der Fluoreszenzänderung aufgrund eines saturierenden Lichtblitzes am Ende der Belichtungsphase des aktinischen Lichtes ermittelt. qE und qI und ihre jeweiligen Stern-Volmer-Koeffizienten wurden anhand der Dunkelrelaxation des F_V nach 16-minütiger Belichtung bei unterschiedlicher PFD hergeleitet (siehe 2.4.1.2). Es sind die Mittelwerte von drei (A, B, C) bzw. zwei (D, E, F) unabhängigen Experimenten für jede der Linien dargestellt.

Proteins für die Δ pH-abhängige Energiedissipation unterstreicht. Unter HL-Kulturbedingungen zeigte qI in beiden Genotypen eine vergleichbare Abhängigkeit von der Lichtintensität (Abbildung 24F). Im Vergleich zu den LL-Pflanzen war die photoinhibitorische Löschung in beiden *A. thaliana*-Linien jedoch oberhalb einer Lichtintensität von $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ deutlich reduziert, was eine Anpassung beider Genotypen an die Anzuchtsbedingungen unter Starklicht reflektiert.

3.2.5 PS II- und Xanthophyll-Zyklusaktivität der *psbs-1.3*-Mutante

Die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte photoinhibitorische Löschung deutete auf eine größere Empfindlichkeit der Mutante gegenüber Lichtstress hin. Zur detaillierteren Untersuchung dieses Sachverhaltes wurde die Inaktivierung und Erholung der PS II-Aktivität während und nach einer zweistündigen Starklichtexposition analysiert (Abbildung 25A, B). Parallel dazu wurde die Aktivität des Xanthophyll-Zyklus unter den gleichen Bedingungen bestimmt (Abbildung 25C, D).

Nach zweistündiger Starklichtbehandlung war die PS II-Aktivität, bezogen auf das Ausgangsniveau, in der PsbS-defizienten Mutante auf 53% gegenüber 68% des Wildtyps gesunken (Abbildung 25A). Die verstärkte Photoinhibition des PS II in der *psbs-1.3*-Linie konnte nur teilweise während der Erholung im Schwachlicht kompensiert werden. So war die PS II-Aktivität bezogen auf den Ausgangswert in der *psbs-1.3*-Revertante mit 78% nach wie vor stärker reduziert als im Wildtyp mit 87%. Diese Ergebnisse belegen, dass die Mutante auf photooxidativen Stress sensibler reagierte, es dabei allerdings nur zu einer leicht erhöhten irreversiblen Schädigung des PS II am Ende der Exposition kam (vgl. Abbildung 17).

Bei Anzucht unter HL-Bedingungen war die im Vergleich zum Wildtyp vermehrte Inaktivierung des PS II in der PsbS-defizienten Mutante weniger stark ausgeprägt (Abbildung 25B). So betrug nach zweistündiger Starklichtbehandlung die PS II-Effizienz der *psbs-1.3*-Linie 74%, die des Wildtyps noch 81% der Ausgangsaktivität. Dies ist ein weiteres Indiz für die Befähigung beider Genotypen, an hohe Lichtintensitäten zu adaptieren.

Der Xanthophyll-Zyklus zeigte sich in der PsbS-defizienten Mutante im Vergleich zur Kontrolle unauffällig, unabhängig von den Anzuchtsbedingungen (Abbildung 25C, D). Der relative Zx-Gehalt erreichte bereits nach 15-minütiger Belichtung sein maximales Niveau, das in beiden Genotypen mit etwa 55 bis 60% Zx, bezogen auf die Summe der Xanthophyll-Zykluspigmente, nahezu identisch war. Beide Linien besaßen im anschließenden Schwachlicht eine entsprechende zweiphasige Epoxidationskinetik. In einer schnellen Phase von etwa 30 min sank der relative Zx-Gehalt bei beiden Genotypen um 50%, während nach Abschluss

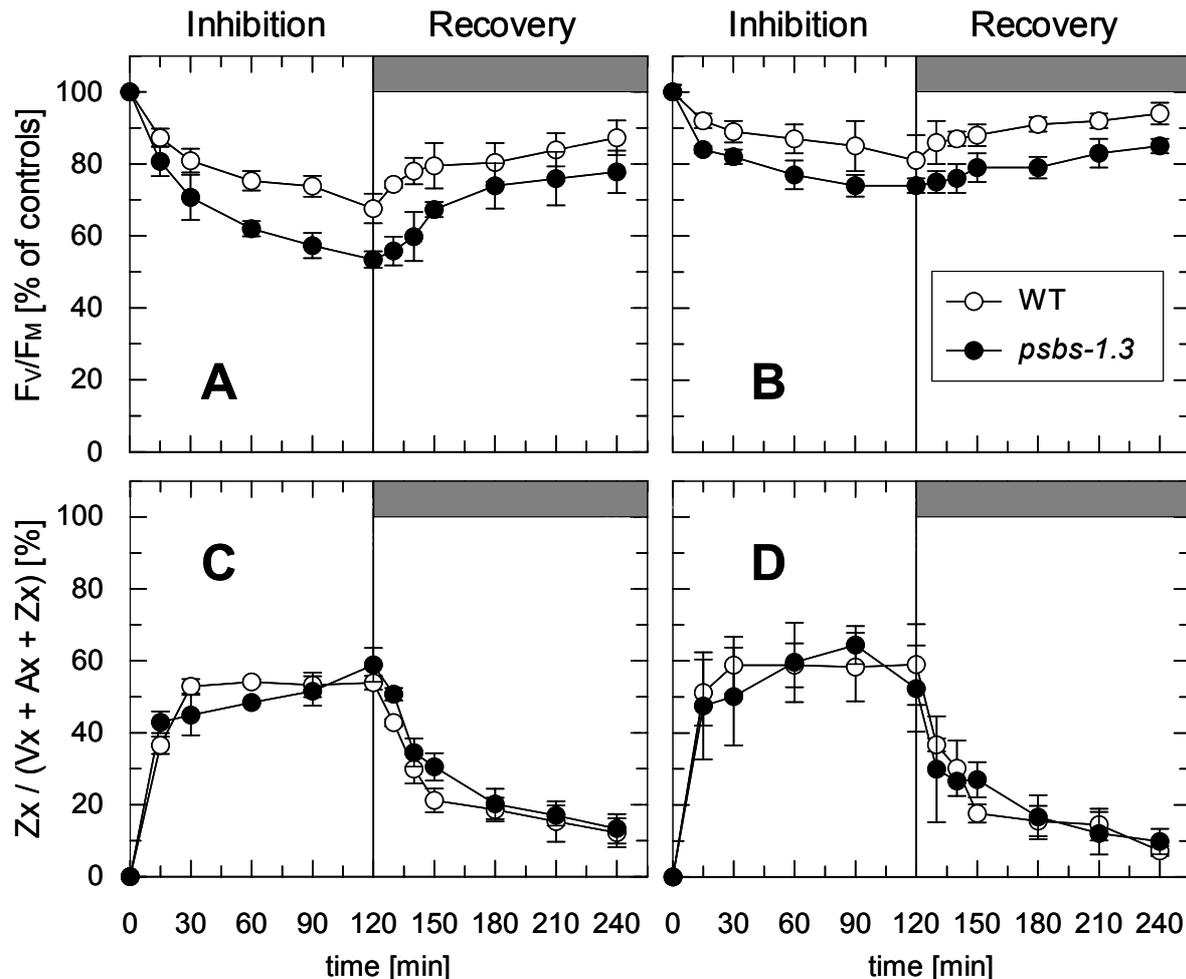


Abbildung 25: Verlauf der Photoinhibition und der Erholung der PS II-Aktivität (A, B), sowie die Dynamik des relativen Zx-Gehaltes (C, D) in intakten Blättern der *psbs-1.3*-Mutante und des Wildtyps (WT). Blattscheiben von unter LL- (A, C) und HL-Bedingungen kultivierten Pflanzen (B, D) wurden für die Photoinhibition bei einer PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 2 h belichtet. Die Erholung von der Starklichtexposition erfolgte bei einer PFD von $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (graue Balken). **A, B** Zu den jeweiligen Messpunkten wurden die Blattscheiben für 8 bis 10 min dunkeladaptiert und anschließend der Quotient F_V/F_M bestimmt. Die Fluoreszenzdaten wurden auf das jeweilige F_V/F_M zum Zeitpunkt $t = 0$ normiert ($0,82 \pm 0,01$ für beide Genotypen unter LL-Bedingungen; $0,81 \pm 0,02$ für beide Genotypen unter HL-Bedingungen). Es sind die Mittelwerte \pm SD von 9 bzw. 3 unabhängigen Experimenten für jede der Linien dargestellt. **C, D** Die Bestimmung des Zx-Gehaltes bezogen auf die Summe der Xanthophyll-Zykluspigmente erfolgte mittels HPLC an den gleichen Blattscheiben der gezeigten Fluoreszenzmessungen (A, B). Direkt nach der Bestimmung des F_V/F_M -Verhältnisses wurden die Blattscheiben in flüssigem N_2 gefroren und die Pigmente extrahiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von maximal 5 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

der zweistündigen Schwachlichtphase noch ungefähr 10% Zx, bezogen auf die Gesamtmenge an Xanthophyll-Zykluspigmenten, vorhanden waren.

3.2.6 Die Auswirkung von langanhaltendem Lichtstress auf die PS II-Aktivität

Eine zeitliche Ausdehnung der Starklichtexposition auf 4 bzw. 8 h resultierte bei beiden Genotypen in einem weiteren Anstieg der Photoinhibition (Abbildung 26A). Dementsprechend besaß das PS II im Wildtyp nach 4 bzw. 8 h nur noch 65 bzw. 50% der Anfangs-

aktivität, während die PS II-Effizienz in der *psbs-1.3*-Mutante auf 44 bzw. 29% sank. Auffallend war jedoch, dass die drastisch verstärkte Inhibition in der PsbS-defizienten Mutante ausschließlich innerhalb der ersten 2 h Starklichtbehandlung induziert wurde. Während der weiteren Exposition zeigten beide *A. thaliana*-Linien eine nahezu identische Kinetik der PS II-Inaktivierung. Im Vergleich zu der kürzeren, zweistündigen Starklichtphase (vgl. Abbildung 25A) verursachte die zeitliche Ausweitung der Photoinhibition in beiden Genotypen eine verzögerte Erholung der PS II-Aktivität in der anschließenden Schwachlichtphase. Davon war allerdings das Regenerationsvermögen der Mutante stärker betroffen, da selbst nach 16 h Erholung ihre PS II-Aktivität mit 72% geringer war als die des Wildtyps (83%). Pflanzen sind in ihrer natürlichen Umgebung ständig schnell fluktuierenden Lichtintensitäten ausgesetzt, auf die sie entsprechend reagieren müssen, um photooxidativen Stress zu vermeiden. Hierbei sind rasch induzierbare Schutzmechanismen, wie die ΔpH -abhängige Wärme-dissipation überschüssiger Anregungsenergie von besonderer Bedeutung. In Anlehnung an diese natürlichen, d.h. schwankenden, Lichtverhältnisse wurden Blattscheiben beider Genotypen einer alternierenden Abfolge von Stark- und Schwachlichtphasen ausgesetzt und die

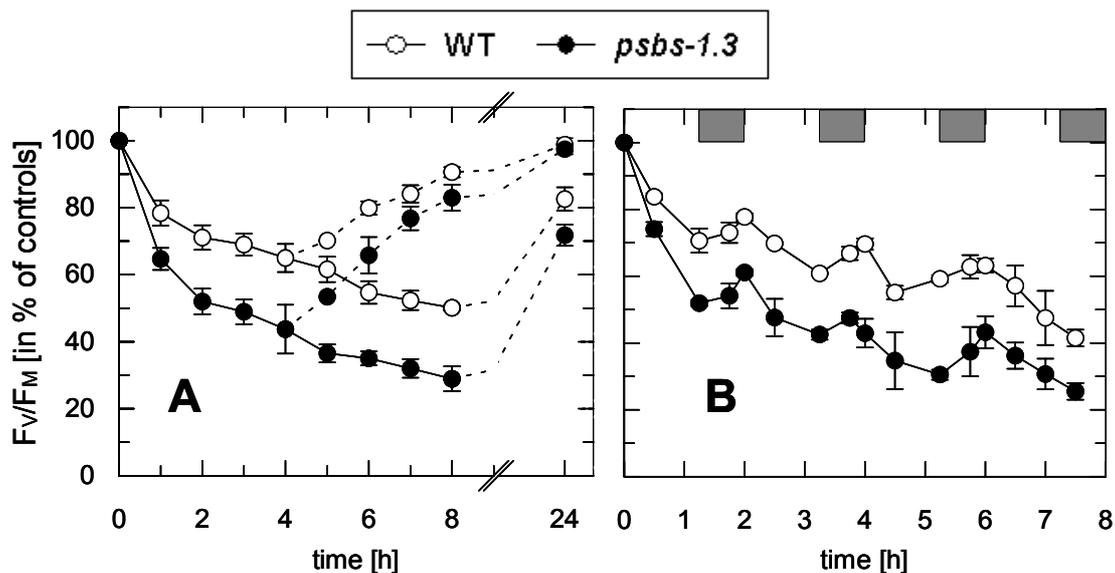


Abbildung 26: Photoinhibition der PS II-Aktivität in intakten Blättern der *psbs-1.3*-Mutante und des Wildtyps (WT). **A)** Verlauf der Starklicht-induzierten Inaktivierung des PS II (durchgezogene Linie) und Erholung im Schwachlicht (gepunktete Linie). Blattscheiben von LL-Pflanzen wurden für die Photoinhibition bei einer PFD von 2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Für die Erholung wurden die Blattscheiben nach 4 bzw. 8 h Starklichtexposition ins Schwachlicht überführt (PFD von 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B)** Verlauf der Photoinhibition des PS II während einer alternierenden Abfolge von Starklicht- (75 min, PFD: 2000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und Schwachlichtexpositionen (graue Balken; 45 min, PFD: 20 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). An den jeweiligen Messpunkten wurden die Blattscheiben für 8 bis 10 min dunkeladaptiert und anschließend der Quotient F_v/F_M bestimmt. Die Fluoreszenzdaten wurden auf das jeweilige F_v/F_M zum Zeitpunkt $t = 0$ (für beide Genotypen: $0,82 \pm 0,01$) normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von 5 bzw. 3 unabhängigen Experimenten für jede Linie.

PS II-Aktivität anhand des Quotienten F_V/F_M dokumentiert (Abbildung 26B). Obwohl die reine Starklichtexposition nur 5 h betrug, verursachten diese wechselnden Lichtverhältnisse in beiden Linien eine stärkere Inaktivierung der PS II-Aktivität als in dem 8 h Starklichtexperiment (Abbildung 26A). Die signifikant erhöhte Photoinhibition der *PsbS*-defizienten Mutante war wiederum auf die ersten 2 h der Belichtung zurückzuführen.

3.2.7 Starklicht-induzierter Abbau des D1-Proteins in der *psbs-1.3*-Mutante

Die detaillierten Untersuchungen zur Inaktivierung und Erholung der PS II-Aktivität während und nach verschiedenen Starklichtexpositionen haben anschaulich dokumentiert, dass das PS II der *PsbS*-defizienten-Mutante verstärkt photoinhibiert wird (Abbildung 25, 26). Da das D1-Protein ein Hauptziel der photooxidativen Schädigung des PS II darstellt (Trebst, 2003), wurde der D1-Abbau bei langanhaltendem Lichtstress in der Mutante überprüft (Abbildung 27). Die Versuchsdurchführung erfolgte aus den in 3.1.8 aufgeführten Gründen in Gegenwart des Inhibitors Streptomycin.

Das F_V/F_M -Verhältnis belegte klar, dass das PS II in Gegenwart von Streptomycin in beiden Pflanzenlinien nach 5 h Starklicht komplett inaktiviert wurde (Abbildung 27A). Allerdings

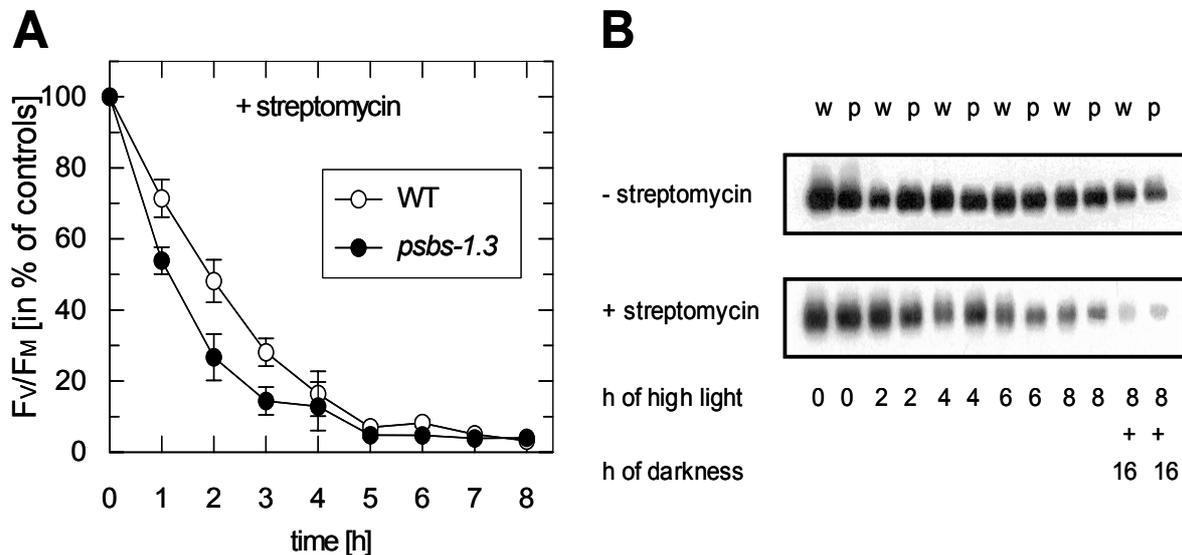


Abbildung 27: Kinetik der Starklicht-induzierten Inaktivierung der PS II-Aktivität (A) und des D1-Abbaus (B) in Gegenwart von Streptomycin in Blattscheiben der *psbs-1.3*-Mutante (p) und des Wildtyps (w). Vor dem Beginn der Starklichtexposition bei $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden die Blattscheiben für 30 min bei $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und anschließend für 60 min im Dunkeln mit einer 3 mM Streptomycin-Lösung oder Wasser inkubiert. **A)** Zu den jeweiligen Messpunkten wurde der Quotient F_V/F_M bestimmt und die Blattscheiben in flüssigem N_2 für die Immunoblot-Analysen schockgefroren. Die Daten wurden auf das F_V/F_M zum Zeitpunkt $t = 0$ normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD aus 3 unterschiedlichen Experimenten pro Pflanzenlinie. **B)** Immunoblot-Analyse: Aus den in (A) verwendeten Blattscheiben wurden jeweils Proteingestamtextrate isoliert und je $4 \mu\text{g}$ Protein pro Spur des PAA-Gel aufgetragen. Der Nachweis des D1-Proteins erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers.

wies die *psbs-1.3*-Mutante erneut eine größere Empfindlichkeit gegenüber photooxidativem Stress auf, da ihre PS II-Aktivität in den ersten 3 h der Starklichtbehandlung im Vergleich zur Kontrolle um 15 bis 20% stärker reduziert war. Für beide Genotypen konnte keine Erholung der PS II-Effizienz nach 16-stündiger Schwachlichtexposition detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht überraschend, da eine Regeneration der PS II-Aktivität nach erlittener photooxidativer Schädigung nur durch die Neusynthese des defekten D1-Proteins behoben werden kann (Barber, 1995; Melis, 1999). Dies wurde aber durch die Gegenwart des Streptomycins verhindert.

Ohne Inhibitor wurde nur ein geringer Nettoabbau des D1-Proteins in beiden *A. thaliana*-Linien ermittelt (Abbildung 27B). Hingegen kam es in Gegenwart von Streptomycin zu einer fast vollständigen Degradierung des D1-Proteins in beiden Genotypen nach 8 h Belichtung, wobei sich die *psbs-1.3*-Mutante in Bezug auf die Abbaudynamik im Vergleich zum Wildtyp unauffällig zeigte (vgl. dazu Abbildung 20B). Somit war die in der *psbs-1.3*-Mutante detektierte, verstärkte Licht-induzierte Inaktivierung des PS II nicht mit einer vermehrten Schädigung und Abbau des D1-Proteins verbunden.

3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die physiologische Bedeutung der ΔpH -abhängigen Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie (qE) als Schutzsystem bei photooxidativem Stress wurde anhand von *A. thaliana*-Mutanten untersucht, denen aufgrund einer Rasterschubmutation im *psbS*-Lokus das PsbS-Protein fehlte. Dies führte zu einem fast vollständigen Verlust der ΔpH -abhängigen Energielöschung und unterstreicht damit die Bedeutung des PsbS für den qE-Mechanismus. Anhand von 2-D-Gelen und Pigmentanalysen konnte dokumentiert werden, dass der Verlust des PsbS weder die relativen Stöchiometrien der Photosysteme noch die Assemblierung des PS II störte. Auch die Dynamik und Pigmentmengen des Xanthophyll-Zyklus waren unverändert. Aufgrund einer vergleichbaren CO_2 -Assimilation zwischen Wildtyp und Mutante scheidet eine ineffiziente Photosyntheseleistung als Ursache für ein leicht verzögertes Wachstum der *psbs-1.3*-Linie aus. Der Grund hierfür ist vielmehr in einer erhöhten Sensitivität der Mutante gegenüber photooxidativem Stress zu suchen. So induzierte eine länger anhaltende Starklichtexposition in der Mutante eine prononcierte Inaktivierung des PS II. Diese ging allerdings in Gegenwart des Inhibitors Streptomycin nicht mit einem beschleunigten Abbau des D1-Proteins einher und war nach Überführung in Schwachlicht teilweise reversibel.

3.3 CP29 und seine Bedeutung für den qE-Mechanismus

Neben dem PsbS-Protein ist für die Ausbildung der Δ pH-abhängigen Energiedissipation (qE) die Gegenwart von weiteren Antennenproteinen des PS II nötig (Elrad et al., 2002; Govindjee, 2002). Die minoren Antennenproteine CP24, CP26 und CP29, die das Bindeglied zwischen der PS II-Kernantenne (CP43, CP47) und der sogenannten *bulk*-Antenne (LHC II) darstellen (vgl. Abbildung 2), werden in einer Vielzahl von Studien als möglicher Ort der qE-Löschung favorisiert (vgl. 1.3.4.2).

Im Folgenden wurde die Relevanz des minoren Antennenproteins CP29 für die thermische Dissipation überschüssiger Anregungsenergie untersucht. Da bisherige Modellsysteme, wie *intermittent light*-Pflanzen (Färber und Jahns, 1998) oder *chlorina f2*-Mutanten, darin versagt haben, einzelne CAB-Proteine der PS II-Antenne auszuschalten, wurde ein reverser genetischer Ansatz zunächst in *N. tabacum* und später in *A. thaliana* gewählt, um die Proteinmenge an CP29 herunter zu regulieren.

3.3.1 Die Herstellung und Sichtung von *Lhcb4*-Antisense-Tabakpflanzen

Für die Herstellung von *Lhcb4*-Antisense-Tabakpflanzen wurde zunächst eine cDNA-Bibliothek aus *N. tabacum* nach der *Lhcb4*-cDNA mittels Plaque-Hybridisierung durchsucht. Als heterologe Sonde kam ein 1,2 kb großes cDNA-Fragment des *Lhcb4.2*-Gens aus *A. thaliana* zum Einsatz. Von den rund drei Dutzend Signalen im Autoradiogramm konnte ein Klon als *Lhcb4*-cDNA mit vollständigem ORF verifiziert werden (Graßes, 1999). Der kodierende Bereich der *Lhcb4*-cDNA-Sequenz aus *N. tabacum* und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz sind im Anhang (7.2) dargestellt.

Mittels PCR wurde am 5'- und 3'-Ende der *Lhcb4*-cDNA-Sequenz jeweils eine *Xba*I- bzw. eine *Eco*RV-Restriktionsschnittstelle eingefügt und das PCR-Produkt in Antisense-Orientierung in die Schnittstellen *Sma*I und *Xba*I der *multiple cloning site* (MCS) des Vektor pBinAR TX (Höfgen und Willmitzer, 1990) kloniert. Die eigentliche Pflanzentransformation erfolgte an Blattscheiben von *N. tabacum* durch einen Agrobakterien-vermittelten Gentransfer gemäß der Methode von Horsch et al. (1985). Aus anfänglich 100 Blattscheiben konnten 58 Primärtransformanten mit der Bezeichnung TG4/1 bis TG/60 (ohne TG4/18 und TG4/44) regeneriert werden und wurden in Sterilkultur gehalten (2.3.6 und 2.3.7). Für die weiteren Untersuchungen wurden Duplikate der jeweiligen Linie in Erde bei einer PFD von 150 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Gewächshaus angezogen.

Die meisten der 58 TG4-Tabaklinien zeigten im Vergleich zum Wildtyp in Bezug auf die Morphologie der Blätter, die Wachstumsrate und die Färbung keinen auffälligen Phänotyp. Lediglich zwei Linien zeigten ein reduziertes Wachstum und drei Pflanzen besaßen eine hellere Färbung, wovon wiederum zwei eine veränderte Blattaderung aufwiesen. Zusätzlich fielen drei weitere Linien durch eine veränderte Blattmorphologie auf (ohne Abbildung). Diese morphologischen Unterschiede können sowohl auf die Antisense-Effekte als auch auf die Anzucht in Sterilkultur zurückzuführen sein. Daher wurde zunächst die Integration der T-DNA in das Genom in allen Linien mittels PCR überprüft (Abbildung 28). Hierbei wurden Sequenz-spezifische Primer des Vektors pBinAR TX verwendet, die flankierend von der MCS binden. Wie Abbildung 28A zeigt, konnte in allen *Lhcb4*-Antisense-Linien ein 1043 bp großes Fragment amplifiziert werden. Demzufolge wurde offensichtlich in allen transgenen Pflanzen die T-DNA mindestens einmal ins Genom integriert.

Anhand von Immunoblot-Analysen konnte auch eine Reduzierung des CP29-Proteingehaltes in den *Lhcb4*-Antisense-Linien 13, 14, 16,17 und 21 nachgewiesen werden (Abbildung 28B). In diesen Linien sind nur ca. 50 bis 75% der CP29-Proteinmenge des Wildtyps detektierbar. Da der zum Vergleich untersuchte D1-Gehalt in allen Linien konstant war (Daten nicht gezeigt), scheint die verminderte Proteinmenge des CP29 ein spezifischer Antisense-Effekt zu sein. Allerdings zeigten die Northern-Analysen, dass augenscheinlich die Herabsetzung der *Lhcb4*-Proteinmenge nicht direkt mit der Veränderung der entsprechenden Transkriptmenge korrelierte (Abbildung 28C). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass durch die Verwendung der doppelsträngigen *Lhcb4*-cDNA-Sonde sowohl Sense- als auch Antisense-Transkript detektiert wurden. Somit konnte mit diesem Verfahren keine objektive Aussage über das Ausmaß der Verringerung des *Lhcb4*-RNA-Levels gemacht werden.

In keiner der 58 *Lhcb4*-Antisense-Linien konnte eine Reduzierung des CP29-Proteinlevels unter die Nachweisgrenze erzielt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit einer ähnlichen Studie (Flachmann und Kühlbrandt, 1995; Flachmann, 1997), in der der *Lhcb1*-Proteingehalt in Tabak mittels Antisense-Technik nicht deutlich reduziert werden konnte. Da nicht bekannt ist, ob das *Lhcb4* in *N. tabacum* durch ein einzelnes Gen oder wie in *A. thaliana* (vgl. Abbildung 3A) durch eine Multigenfamilie kodiert wird, kann es sein, dass die Transkriptmenge mittels Antisense-Technik nicht signifikant reduziert werden kann. Möglicherweise ist eine reduzierte Transkriptmenge noch ausreichend, um eine normale Proteinbiogenese zu ermöglichen, z.B. falls die *Lhcb4*-mRNA sehr stabil ist. Wie dem auch sei, andere Arbeiten mit *A. thaliana* zeigten, dass eine spezifische Inhibition der Genexpression einzelner Antennenproteine in einer Größenordnung von über 90% durchaus möglich war (Zhang et al., 1997;

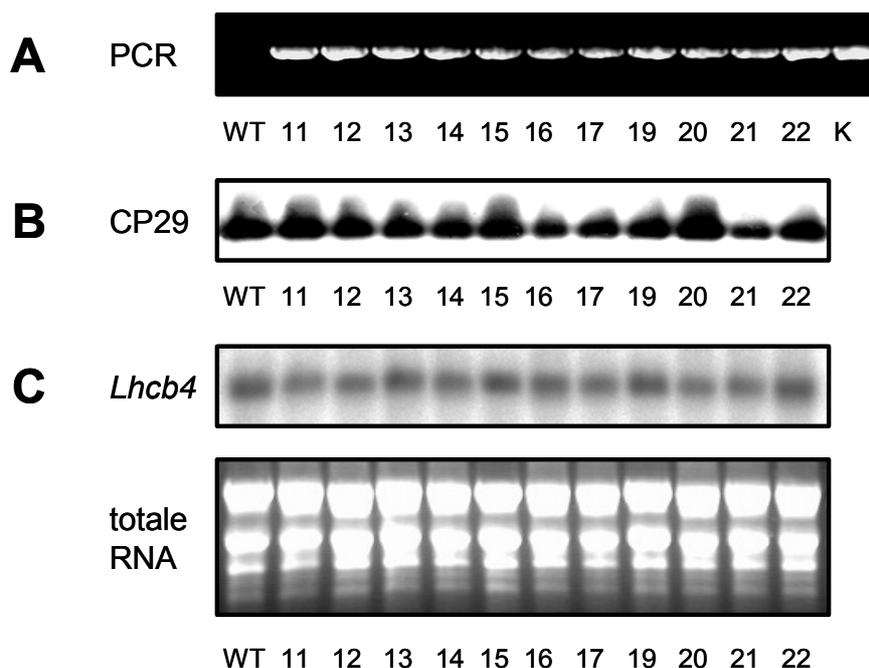


Abbildung 28: PCR als Kontrolle der T-DNA-Insertion in das Genom verschiedener *Lhcb4*-Antisense-Tabakpflanzen (A), Immunoblot-Analyse des CP29- und des D1-Proteingehaltes (B), sowie Northern-Analyse in den gleichen Linien (C). A) Mittels Sequenz-spezifischer Primer, die flankierend der MCS des Vektors pBinAR TX binden, wurde ein 1043 bp Fragment amplifiziert. Hierfür diente die genomische DNA der jeweiligen *Lhcb4*-Antisense-Linien (TG4/11 bis 22, ohne 18), des Wildtyps sowie pBinAR TX-DNA mit *Lhcb4*-Insert in Antisense-Orientierung (K) als Matrize. B) Aus Blättern der jeweiligen Linie wurden Proteingesamtextrakte isoliert, und jeweils 10 µg Proteinextrakt auf das PAA-Gel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die angezeigten Proteine (CP29 und D1). C) Aus den gleichen Blättern wurde Gesamt-RNA präpariert, und 10 µg RNA pro Spur eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten homologen *Lhcb4*-cDNA-Sonde. Die Daten für die anderen 47 *Lhcb4*-Antisense-Linien werden nicht gezeigt, da sie keine neuen Aspekte liefern.

Ganeteg et al., 2001; Andersson et al., 2001; 2003). Aufgrund der geringen Reduktion des *Lhcb4*-Proteingehalts in Tabak mittels Antisense-Technik, wurde dieser Versuchsansatz zunächst nicht weiter verfolgt. Die experimentelle Strategie wurde dahingehend geändert, eine *A. thaliana knock-out*-Mutante zu charakterisieren, die in einem der drei *Lhcb4*-Gene eine Insertion eines transposablen *Dissociation*-Elementes (*Ds*-Elementes) besaß (3.3.2).

3.3.2 Charakterisierung von *A. thaliana Lhcb4.1-knock-out*-Mutanten

Martienssen und Mitarbeiter haben am Cold Spring Harbor (CSH) Laboratory eine Transposon-Mutagenese an *A. thaliana* durchgeführt und so eine große Kollektion an Insertionslinien kreiert (Sundaresan et al., 1995; Springer et al., 1995). 95% dieser Linien besitzen eine stabile, unikale Insertion eines transposablen *Genetrap* oder eines *Enhancer trap Ds*-Elementes im Genom. Mittlerweile wurden die Insertionsstellen der *Ds*-Elemente in vielen Linien mit Hilfe von TAIR-PCR identifiziert und die Daten in einer Datenbank (CSH Genetrap Database) der Öffentlichkeit zugänglich gemacht (Martienssen, 1998; 2000).



Abbildung 29: Phänotypen der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 sowie des Wildtyps. Die 6 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen wurden unter LL-Bedingungen im Gewächshaus angezogen (PFD von $150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Links und rechts: transgene Linien 7 bzw. 15. In der Mitte: Wildtyp, Ökotyp *Landsberg erecta*

Die Linie GT5588 wird in der CSH Genetrap Datenbank als CP29-Mutante beschrieben. Diese weist die Insertion eines *Ds-Genetrap*-Elements (*DsG*-Elements) im Lokus At5g01530 auf, welcher das *Lhcb4.1*-Gen kodiert. Es wurde Saatgut der Linie GT5588 vom CSH Laboratory bezogen. Da es sich um heterozygote Samen handelte, wurden die Pflanzen auf Erde kultiviert und anschließend geselbstet. Die daraus resultierende Tochtergeneration zeigte gegenüber dem Wildtyp morphologisch keinen auffälligen Phänotyp und wurde daher einer Sichtung mittels Immunoblot-Analyse unterzogen. Bei 5 der getesteten 24 Pflanzen lag der Lhcb4-Proteingehalt in den isolierten Proteingesamtextrakten unter der Nachweisgrenze. Weitere 11 Pflanzen wiesen einen geringeren CP29-Proteingehalt im Vergleich zur Kontrolle auf (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht grob einer Segregation von 1:2:1. Die Reduzierung des CP29-Proteingehalts durch die Insertion des *DsG*-Elementes in das *Lhcb4.1*-Gen ist überaus bemerkenswert, da das CP29-Apoprotein durch drei hoch-homologe Gene kodiert wird (vgl. Abbildung 3A; Jansson, 1999). Die ESTs (*expressed sequence tag*) der Gene *Lhcb4.1* und *Lhcb4.2* zeigen eine hohe Expressionsfrequenz, während *Lhcb4.3*, das ein etwas kleineres Protein kodiert, nur eine geringe Transkriptmenge aufweist (Jansson, 1999).

Für weitere Analysen wurden die CP29-defizienten *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 ausgewählt, ihr Saatgut gesammelt und die Pflanzen der Tochtergeneration physiologisch, biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert. Die Pflanzen der Tochtergeneration der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 wiesen in Bezug auf die Morphologie der Blätter, die Wachstumsrate und die Färbung keinen signifikanten Phänotyp auf (Abbildung 29).

3.3.2.1 Die Insertion und Orientierung des *DsG*-Elementes im *Lhcb4.1*-Gen

Mittels inverser PCR (2.3.19) wurden zunächst der genaue Integrationspunkt und die Orientierung des *DsG*-Elementes im *Lhcb4.1*-Gen (At5g01530) der CP29-defizienten Linien 7 und 15 analysiert. Dafür wurde isolierte genomische DNA einer *EcoRI*-Restriktion unterzogen, aufgereinigt und mit T4-Ligase religiert (siehe 2.3.14). Nach einer erneuten Aufreinigung

nung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten Sonde des *Gus*-Gens. Hierfür wurde mittels PCR ein 1826 bp großes Fragment des *Gus*-Gens aus der transgenen Linie 7 amplifiziert und durch Sequenzierung verifiziert. Bei einer vollständigen Restriktion des Genoms mit *Eco*RI wurde bei einer unikaligen Insertion des Transposons in das Genom der transgenen Linien 7 und 15 nur ein Signal eines 3675 bp großen DNA-Fragments im Autoradiogramm erwartet.

3.3.2.2 Die Homozygotie der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15

Aufgrund der beobachteten phänotypischen Segregation im Verhältnis 1:2:1 der geselbstelten GT5588-Linie (siehe 3.3.2) musste man davon ausgehen, dass die CP29-defizienten Tochterlinien 7 und 15 in Bezug auf die Disruption des *Lhcb4.1*-Gens durch das *DsG*-Element homozygot waren. Zur Kontrolle wurde die Homozygotie auch genotypisch mittels PCR untersucht. Hierbei kamen pro PCR drei Primer zum Einsatz (2.1.5), von denen zwei im *Lhcb4.1*- und der dritte im *Gus*-Gen des transposablen *DsG*-Elementes binden. Bei Homozygotie wurde für den Wildtyp entweder ein 1022 bp großes Fragment durch die beiden *Lhcb4.1*-Primer oder für die Linien 7 und 15 ein 1309 bp großes Fragment durch eine Kombination aus *Gus*- und einem der *Lhcb4.1*-Primer amplifiziert (Abbildung 31). Die Identität der beiden Fragmente wurde durch Sequenzierung verifiziert. Hierbei konnte die durch die inverse PCR identifizierte Insertionsstelle des Transposons in das *Lhcb4.1*-Gen (siehe 3.3.2.1) bestätigt werden. War die genomische DNA in Bezug auf die Disruption des *Lhcb4.1*-Gens heterozygot, so wurden beide Fragmente amplifiziert (Abbildung 31). Dies war bei der F1-Generation aus einer Kreuzung zwischen dem Wildtyp und der *DsG*-Insertionslinie 7 der Fall, die zur Komplementierung der *Lhcb4.1*-Gendisruption durchgeführt wurde (siehe 3.3.2.8). Mittels dieser Kontroll-PCR wurden über 150 Pflanzen der CP29-defizienten Linien 7 und 15 auf Homozygotie getestet, bevor sie für die weiteren Experimente verwendet wurden. Es stellte sich heraus, dass alle Pflanzen, wie erwartet, homozygot waren.

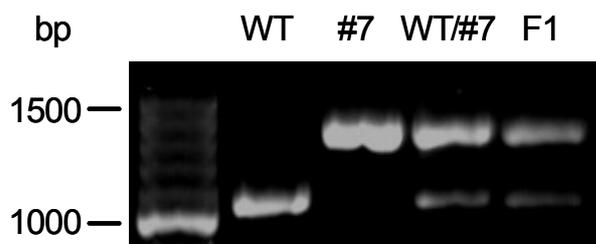


Abbildung 31: Nachweis der Homozygotie der CP29-defizienten Linie 7 in Bezug auf die Disruption des *Lhcb4.1*-Gens durch das *DsG*-Element mittels PCR. Für die PCR wurden genomische DNA als Template und drei Primer verwendet, von denen zwei im *Lhcb4.1*- und der dritte im *Gus*-Gen des *DsG*-Elementes binden. Als Kontrolle wurde DNA des Wildtyps und der Linie 7 gemischt (WT/#7) bzw. die DNA der F1-Generation (F1) einer Kreuzung zwischen der Linie 7 und dem Wildtyp (siehe 3.3.2.8) eingesetzt.

3.3.2.3 Proteinmengen und Genexpression der Antennenproteine

Die Entfernung eines Proteins aus einem Multiproteinkomplex kann zur Destabilisierung der anderen Proteine führen. So zeigten Ganeteg et al. (2001), dass die Stabilität der beiden LHC I-Proteine Lhca2 und Lhca3 wechselseitig voneinander abhängt, wahrscheinlich aufgrund einer physikalischen Interaktion der Polypeptide. Alternativ kann es zur Kompensation des Verlustes eines der pigmentbindenden Antennenproteine durch eine erhöhte Proteinmenge eines anderen LHCs kommen, um die makromolekulare Struktur des PS II aufrecht zu erhalten (Ruban et al., 2003). Daher wurde die Antennenkomposition der beiden Photosysteme in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 untersucht und Immunoblot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen alle Antennenproteine und gegen das PsbS-Protein durchgeführt (Abbildung 32A). Während die Proteinlevel der einzelnen Antennenproteine des PS I keine Auffälligkeiten zeigten, konnte ein pleiotroper Effekt auf die Antennenstruktur des PS II in den CP29-defizienten Linien beobachtet werden: in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 war neben dem Verlust des CP29 auch die Proteinmenge von CP24 signifikant reduziert. Die Proteinmengen der anderen Antennenproteine des PS II war hingegen unverändert.

Um zu testen, ob die Ursache des partiellen Verlustes des CP24-Proteins auf transkriptioneller Ebene liegt, wurden die mRNA-Level verschiedener Antennenproteine des PS II mittels Northern-Blotting analysiert (Abbildung 32B). Für die Hybridisierung kamen radioaktiv-markierte, homologe cDNA-Sonden zum Einsatz. Die Häufigkeit der *Lhcb6*-Transkriptmenge war in den CP29-defizienten Linien im Vergleich zum Wildtyp unauffällig. Dahingegen lagen in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 die mRNA-Mengen von *Lhcb4.1* unterhalb der Nachweisgrenze, während der mRNA-Level von *Lhcb4.2* leicht reduziert war. Letzteres konnte in einem unabhängigen Experiment verifiziert werden. In Übereinstimmung mit früheren Studien (Jansson, 1999; Andersson et al., 2001) wurden sowohl im Wildtyp als auch in den transgenen Linien nur Spuren des *Lhcb4.3*-Transkriptes detektiert. Die Abundanz der anderen getesteten mRNA-Mengen war in den *DsG*-Insertionslinien unverändert.

Die Disruption des *Lhcb4.1*-Gens durch die Insertion des *DsG*-Elements führte somit zu einer Eliminierung der *Lhcb4.1*-Transkriptmenge und einer Verminderung des *Lhcb4.2*-mRNA-Niveaus. Dies hatte den Verlust des CP29 in den Proteingestamtexttrakten zur Folge. Gleichzeitig kam es auch zu einer signifikanten Reduktion des CP24-Proteingehaltes. Diese muss aufgrund von normalen *Lhcb6*-Transkriptmengen in den *DsG*-Insertionslinien auf einem posttranskriptionalen Effekt beruhen. Da sich LHCs in ihrer Stabilität wechselseitig beeinflussen können (Ganeteg et al., 2001; Andersson et al., 2001), ist die partielle Reduzierung der CP24-Proteinmenge wahrscheinlich auf den Verlust des CP29 zurückzu-

führen. Dies impliziert, dass das CP29 zur Stabilisierung des CP24 diesem in der PS II-Antenne benachbart sein muss.

Aufgrund der detektierten *Lhcb4.2*-Transkriptmengen kann man vermuten, dass noch Lhcb4 in den *DsG*-Insertionslinien vorhanden war, seine Proteinmenge in den analysierten Proteingestamtexttrakten jedoch unterhalb der Nachweisgrenze lag. Um die Sensitivität des Nach-

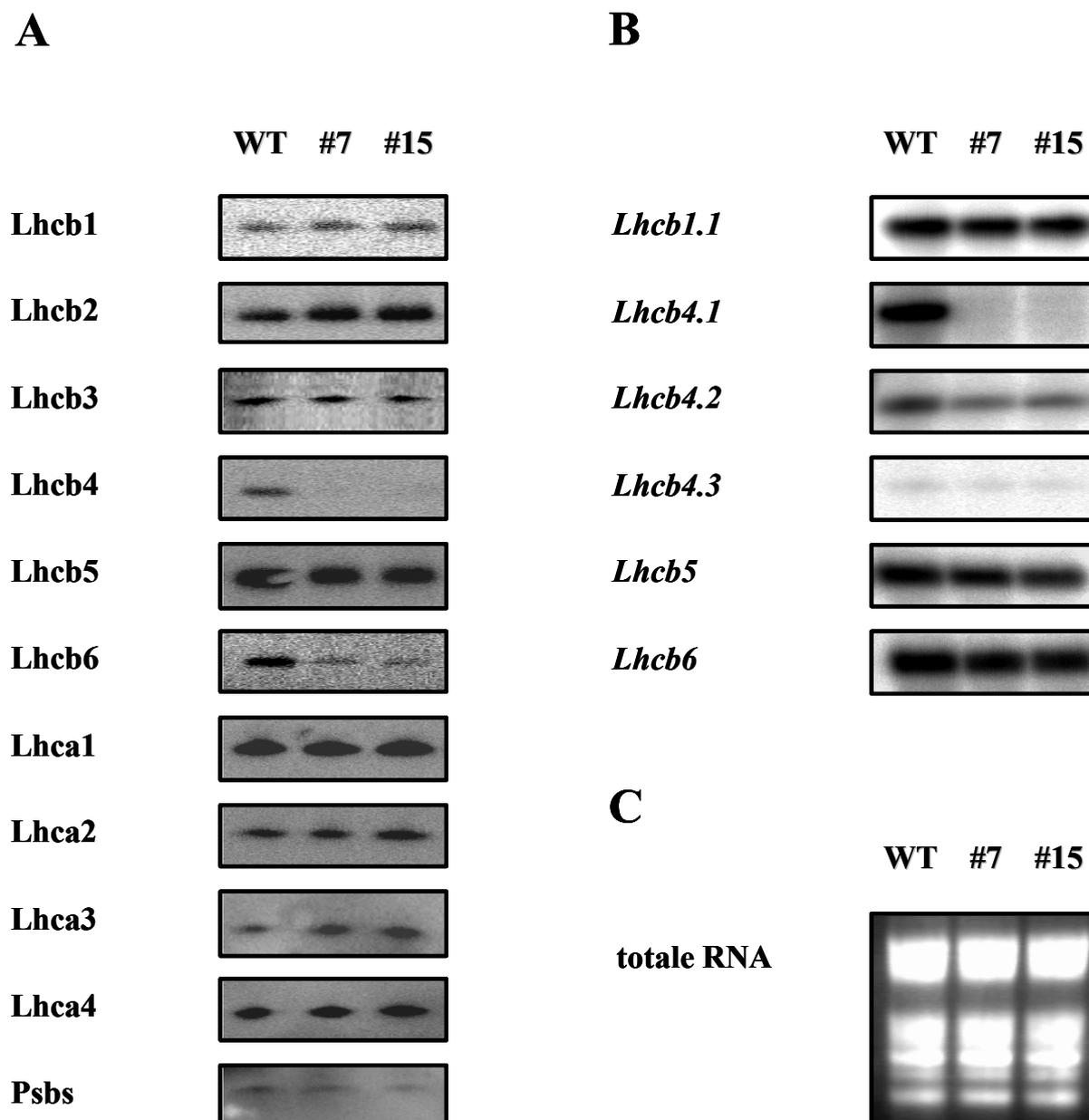


Abbildung 32: Immunoblot-Analyse (A) und Northern-Analyse (B) der *DsG*-Insertionslinie 7 und 15 und des Wildtyps (WT). A) Aus Blättern der jeweiligen Linien wurden Proteingestamtextrate isoliert und 8 µg Proteingestamtextrat pro Spur auf das PAA-Gel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die gezeigten Proteine. **B)** Aus den gleichen Blättern wurde Gesamt-RNA präpariert und jeweils 10 µg RNA pro Spur eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv-markierten homologen cDNA-Sonden, die mittels Restriktion aus folgenden ESTs gewonnen wurden: 120O16 (*Lhcb1.1*), 123A24 (*Lhcb4.1*), 110 J22 (*Lhcb4.2*), 149G3 (*Lhcb4.3*), 105B16 (*Lhcb5*) und 103N19 (*Lhcb6*). **C)** Da keine homologe Sonde zum Nachweis von rRNA zur Verfügung stand, wurde die Beladung der einzelnen Spuren im Gel mit identischen Mengen Gesamt-RNA anhand der mit Ethidiumbromid-versetzten Agarosegele überprüft.

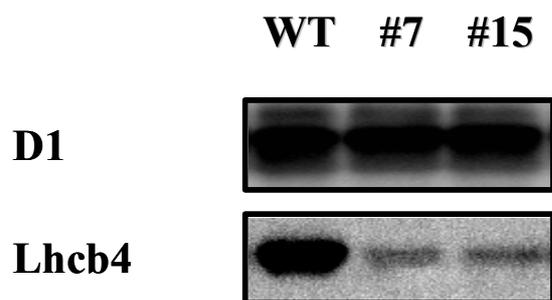


Abbildung 33: Immunoblot-Analyse der CP29- und der D1-Proteinmengen in intakten Thylakoiden aus dem Wildtyp (WT) und den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15. Aus Blättern der jeweiligen Linie wurden Thylakoide isoliert, und 2 μg Chl pro Spur im PAA-Gel aufgetragen. Der Proteinnachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die angezeigten Proteine (CP29 und D1).

weises zu erhöhen, wurden deshalb Thylakoide isoliert und anschließend mittels Immunoblotting untersucht (Abbildung 33). Tatsächlich wurden so noch Spuren von CP29 in den beiden *DsG*-Insertionslinien detektiert. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen konnte die Menge des Lhcb4-Proteins im Vergleich zum Wildtyp bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). In den Thylakoiden der Linien 7 und 15 wurden noch etwa 10 bis 15% der CP29-Proteinmenge des Wildtyps nachgewiesen.

3.3.2.4 Die Analyse der PS II-Funktion in den *DsG*-Insertionslinien

Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Auswirkungen der fast vollständige Verlust von CP29 und eines Teils von CP24 auf die Aktivität des PS II und die thermische Energiedissipation in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 hat. Dazu wurden die Elektronentransportraten der einzelnen Photosysteme und des linearen Elektronentransports an intakten Thylakoiden anhand der Sauerstoffentwicklung unter sättigenden Lichtbedingungen ermittelt. Wie Tabelle 8 illustriert, konnte *in vitro* weder für die Photosyntheseaktivität der einzelnen Photosysteme, noch für den nicht-zyklischen Elektronentransport ein signifikanter Unterschied zwischen den *Lhcb4.1-knock-out*-Linien und dem Wildtyp detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass das

Tabelle 8: Vergleich der Elektronentransportraten in isolierten Thylakoidmembranen von den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 und dem Wildtyp (WT). Die Elektronentransportraten wurden anhand der Sauerstoffentwicklung unter saturierenden Lichtbedingungen berechnet. Für die Messungen wurde eine Clark-Elektrode verwendet. Es werden sowohl die absoluten Elektronentransportraten der beiden Photosysteme und des linearen Elektronentransports als auch die relativen Raten in Prozent, bezogen auf den Wildtyp dargestellt. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD aus drei verschiedenen Thylakoidpräparationen mit jeweils drei Messungen. Die teilweise recht hohen SD sind auf die unterschiedlichen Thylakoidpräparationen zurückzuführen.

	absolute Elektronentransportraten in [$\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$]			Elektronentransportraten in Prozent bezogen auf den WT		
	PS II	linear (entkoppelt)	PS I	PS II	linear (entkoppelt)	PS I
WT	260 \pm 50	247 \pm 25	798 \pm 37	100 \pm 19	100 \pm 10	100 \pm 5
#7	243 \pm 55	240 \pm 33	766 \pm 77	93 \pm 21	97 \pm 13	96 \pm 10
#15	255 \pm 30	235 \pm 30	819 \pm 50	98 \pm 12	95 \pm 12	103 \pm 6

PS II der Linien 7 und 15 unter saturierenden Lichtbedingungen im entkoppelten Zustand *in vitro* trotz des Verlustes eines Großteils seiner minoren Antennenproteine voll funktionsfähig ist.

Die Funktion des PS II im *steady state* der Photosynthese wurde *in vivo* durch die Analyse des Lösungsparameters der Chl a-Fluoreszenz qP überprüft. qP liefert einen ungefähren Anhaltspunkt über den Redoxzustand des Q_A im RZ des PS II und wird daher häufig benutzt, um den „Druck durch Anregungsenergie“ auf das PS II und den Redoxzustand des PQ-Pools zu bestimmen (Krause und Jahns, 2004). Abbildung 34 dokumentiert, dass der Anteil an oxidiertem PS II im *steady state* der Photosynthese mit steigender Lichtintensität in allen drei Pflanzenlinien abnimmt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Genotypen detektiert werden. Dies spricht für eine vergleichbare photochemische Nutzung der absorbierten Lichtenergie im *steady state* der Photosynthese der *DsG*-Insertionslinien.

Trotz des Verlustes eines Teils der minoren Antennenproteine ist die PS II-Antenne in den *DsG*-Insertionslinien in der Lage, an unterschiedliche PFDs zu akklimatisieren. So erreichte der Anteil an oxidiertem PS II in den LL-Pflanzen bereits bei $900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ein Minimum, das durch eine Erhöhung der PFD nicht weiter reduziert werden konnte. Das qP

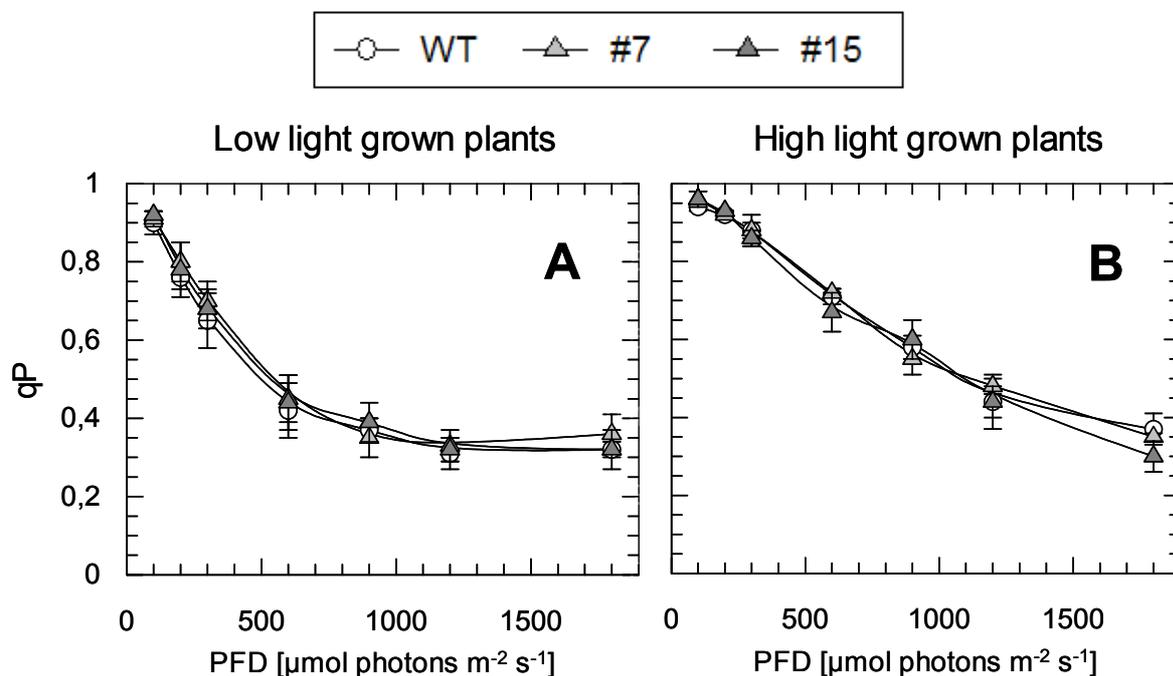


Abbildung 34: Photochemische Löschung (qP) der variablen Chl a-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der PFD des Anregungslichtes in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 und dem Wildtyp (WT). Die Fluoreszenz wurde an dunkeladaptierten Blattscheiben von *A. thaliana* ermittelt, die entweder unter LL- (A) oder HL-Bedingungen (B) kultiviert wurden. Die Blattscheiben wurden für 16 min belichtet und die photochemische Löschung anhand der Fluoreszenzänderung aufgrund eines saturierenden Lichtblitzes am Ende der Belichtungsphase des aktinischen Lichtes bestimmt (siehe 2.4.1.2). Gezeigt werden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SD für jede der Linien.

in den HL-Pflanzen zeigte hingegen eine fast lineare Abnahme. Diese Anpassungsfähigkeit der *DsG*-Insertionslinien an unterschiedliche Lichtquantitäten spiegelte sich auch anhand der nicht-photochemischen Lösungsparameter wider (vgl. Abbildung 37). Demgemäß besaßen LL-Pflanzen gegenüber HL-Pflanzen bereits bei niedrigen Lichtintensitäten (100 bis 300 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ein deutliches NPQ bzw. qE.

Allerdings verhält sich qP nicht immer streng linear-proportional zum Redoxzustand des Q_A . In Abhängigkeit vom Aggregationsgrad der PS II-Antennen kann es zu einem Transfer von Anregungsenergie von Photosystemen mit geschlossenen RZ zu solchen mit offenen RZ kommen. Die Folge ist ein zu großes qP im Vergleich zur tatsächlichen Menge an oxidiertem PS II (Krause und Jahns, 2003). Um dieser Problematik zu begegnen, wurde zusätzlich der Redoxzustand des P700 bei einer Exposition mit aktinischem Weißlicht *in vivo* bestimmt. Die Absorptionsänderung des P700 bei 810 nm bis 830 nm spiegelt dabei nicht nur die potentielle Aktivität des PS I wider, sondern auch den Redoxzustand der Elektronencarrier PQ, PC und des Cyt b_6/f -Komplexes (Schreiber et al., 1988; Klughammer und Schreiber, 1991). Das heißt, dass der Übergang vom reduzierten zum oxidierten Zustand des P700 in Abhängigkeit von

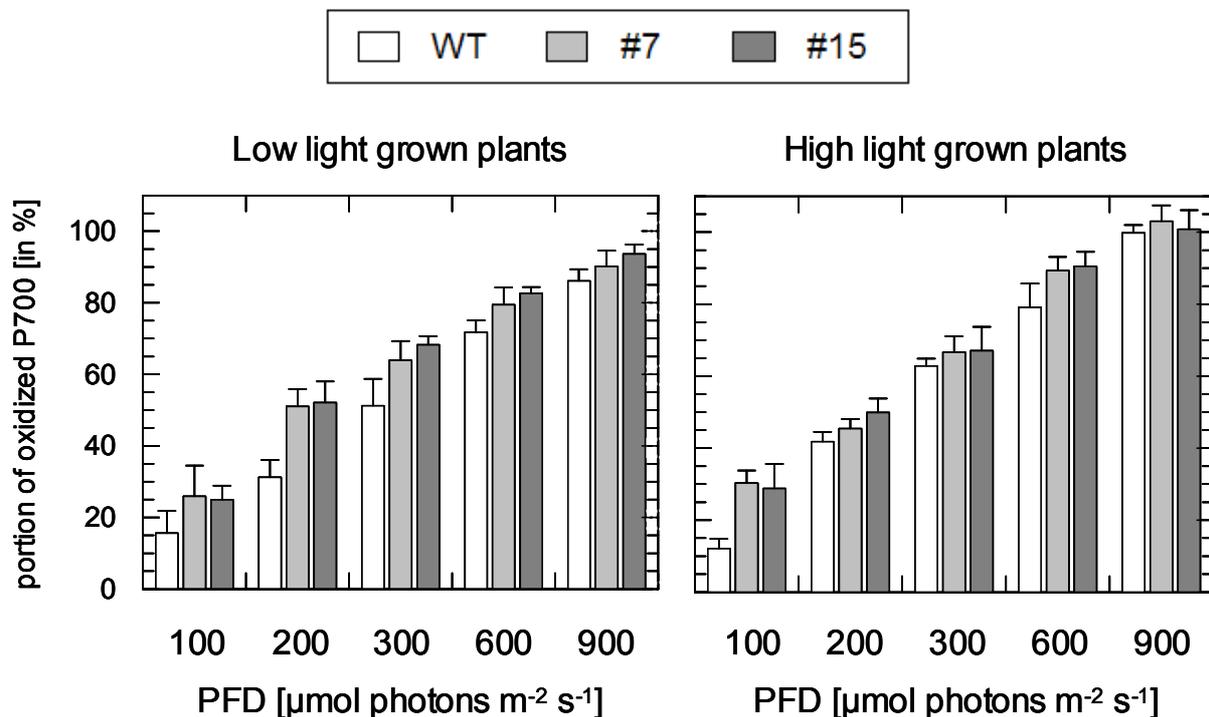


Abbildung 35: Redoxzustand des P700 in Abhängigkeit von der PFD des weißen Anregungslichtes in Blattscheiben der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 und des Wildtyps (WT). Der Redoxzustand des P700 *in vivo* wurde nach einer 1-minütigen Weißlichtexposition bei unterschiedlicher PFD ermittelt. Das aus der Weißlichtexposition resultierende Signal der P700-Absorptionsänderung wurde prozentual auf die maximale Absorptionsänderung durch Fernrotlicht bezogen (vgl. Abbildung 11; 2.4.1.5). Für die Messungen wurden Blattscheiben von *A. thaliana* verwendet, die entweder unter LL- oder HL-Bedingungen kultiviert wurden. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von fünf unabhängigen Experimenten für jede der Linien.

der PFD des aktinischen Lichtes Aufschluss über die Effizienz des Elektronentransfers zwischen den beiden Photosystemen gibt.

Wie die Messung der P700-Absorptionsänderung anschaulich illustriert, stieg der Oxidationsgrad des P700 in Abhängigkeit von der zunehmenden PFD des aktinischen Lichtes in allen drei Genotypen an (Abbildung 35). Allerdings war der Anteil an oxidiertem P700 in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 gegenüber dem Wildtyp bei niedrigen Lichtintensitäten (100 bis 200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) signifikant erhöht. Somit scheint ein effizienter Elektronentransfer zwischen den beiden PS, der normalerweise bei niedrigen Lichtquantitäten vorherrscht, in den *Lhcb4.1-knock-out*-Linien gestört zu sein. Dieses Phänomen wurde sowohl an LL- als auch an HL-Pflanzen beobachtet und schwand mit zunehmender Lichtintensität. Dies ist kein Widerspruch zu den *in vitro* gemessenen Elektronentransportraten (vgl. Tabelle 8), da diese im entkoppelten Zustand und bei saturierenden Lichtbedingungen ermittelt wurden. Als Ursache kommt eventuell eine vergrößerte Antenne des PS I in den CP29-defizienten Linien in Frage. Aufgrund des Verlustes eines Großteils der minoren Antennenproteine könnte die Mehrheit der LHC II-Trimere nur noch schwach mit dem PS II assoziiert sein.

Dass die Charakteristika des PS II tatsächlich durch die Reduzierung der CP29-Proteinmenge und eines Teils des CP24-Proteingehaltes verändert wurden, zeigte eine genaue Analyse des F_V/F_M -Verhältnisses dunkeladaptierter Blätter (Abbildung 36). Dieser Parameter reflektiert etwaige Veränderungen der photochemischen Effizienz des PS II (Maxwell und Johnson, 2000) und war in den transgenen Linien 7 und 15 signifikant reduziert. Dieser Effekt wurde unabhängig von den Kultivierungsbedingungen der Pflanzen beobachtet. Die Ursache ist unklar, entweder ist die Grundfluoreszenz F_0 erhöht oder die variable Fluoreszenz F_V reduziert. Jedenfalls resultiert der Verlust des CP29 in einer Veränderung der Exzitonenverteilung innerhalb der Antenne des PS II, ohne dabei qP negativ zu beeinflussen (vgl. Abbildung 34).

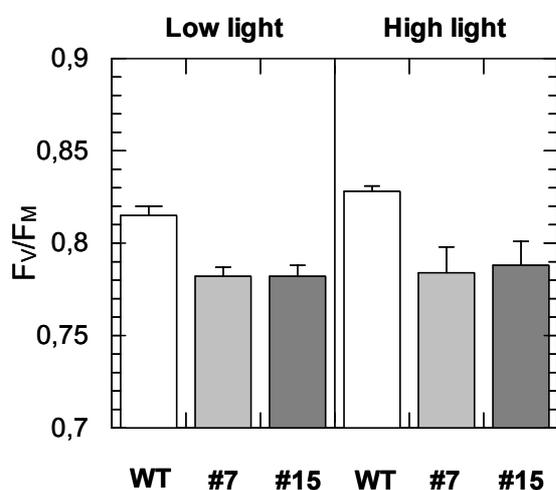


Abbildung 36: Chl a-Fluoreszenz dunkeladaptierter Blätter der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 und des Wildtyps (WT). Gezeigt wird das absolute F_V/F_M -Verhältnis intakter Blätter der CP29-defizienten Linien im Vergleich zur Kontrolle. Für die Messungen wurden ganze Blätter von dunkeladaptierten Pflanzen verwendet, die entweder unter LL- oder HL-Bedingungen kultiviert wurden. Es sind die Mittelwerte von 18 bzw. 6 unabhängigen Experimenten \pm SD für jede der Linien dargestellt.

3.3.2.5 Die Pigmentzusammensetzung der *DsG*-Insertionslinien

Die minoren Antennenproteine binden signifikante Mengen der Xanthophyll-Zykluspigmente (Färber et al., 1997; Verhoeven et al., 1999). Im Folgenden wurde daher die Auswirkung des partiellen Verlustes der minoren Antennenproteine CP29 und CP24 auf die Pigmentzusammensetzung in den *DsG*-Insertionslinien mittels HPLC analysiert.

Sowohl das Chl a/b- als auch das Car/Chl-Verhältnis waren in beiden *Lhcb4.1-knock-out*-Linien im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert (Tabelle 9). Diese Veränderungen waren statistisch signifikant (t-Test, $P < 0,01$). Die Menge der Carotinoide war, bezogen auf die Chl-Gesamtmenge, mit denen des Wildtyps vergleichbar. Einen Sonderfall bildete die Größe des Xanthophyll-Zyklusools. Dieser zeigte eine signifikante Reduktion um 14% in den beiden CP29-defizienten Linien im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 9). Diese Verminderung wurde auch in transgenen HL-Pflanzen beobachtet, war dort aber weniger deutlich ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Die Reduzierung des Xanthophyll-Zyklusools war im Hinblick auf die pigmentbindenden Eigenschaften des CP29 und CP24 zu erwarten.

3.3.2.6 Nicht-photochemische Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz

Viele Studien favorisieren die minoren Antennenproteine als den Ort in der Antenne des PS II, an dem die Δ pH-abhängige Fluoreszenzlöschung stattfindet (siehe 1.3.4.2). Daher werden im nun nachstehenden Abschnitt die Auswirkungen des reduzierten CP29- und CP24-Proteingehalts auf die Δ pH-abhängige thermische Dissipation überschüssiger Anregungsenergie untersucht (Abbildung 37). Die Daten für die Linie 15 sind mit denen der Linie 7 identisch. Da sie keine neuen Aspekte liefern, werden sie der Übersicht halber nicht gezeigt.

Der Verlust des CP29 und eines Teils des CP24 veränderte die nicht-photochemische Löschung in den transgenen Linien. Das NPQ war in der CP29-defizienten Linie 7 bei moderaten bis hohen Lichtintensitäten (600 bis $1800 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) um 20 bis 25%

Tabelle 9: Vergleich des Chl a/b-Verhältnisses und der Carotinoid-Zusammensetzung von Wildtyp und der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15, kultiviert unter LL-Bedingungen (PFD $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Der Carotinoid-Gehalt von Wildtyp (WT) und den CP29-defizienten Linien 7 und 15 wurde mittels HPLC ermittelt. Die Daten wurden auf die Chl-Menge normiert. Gezeigt werden Mittelwerte von 18 verschiedenen Blattproben \pm SD. Die hohe SD für einige Werte ist auf die heterogene Pigmentierung der Blätter zurückzuführen.

	Chl a/b	Car/Chl	Pigmentgehalt ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$ Chl)			
			Neo	Lut	β -Caro	Vx+Ax+Zx
WT	$3,17 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,01$	35 ± 1	121 ± 3	81 ± 2	30 ± 3
#7	$3,12 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$	33 ± 2	117 ± 3	79 ± 4	26 ± 2
#15	$3,11 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,01$	33 ± 2	117 ± 4	78 ± 3	26 ± 3

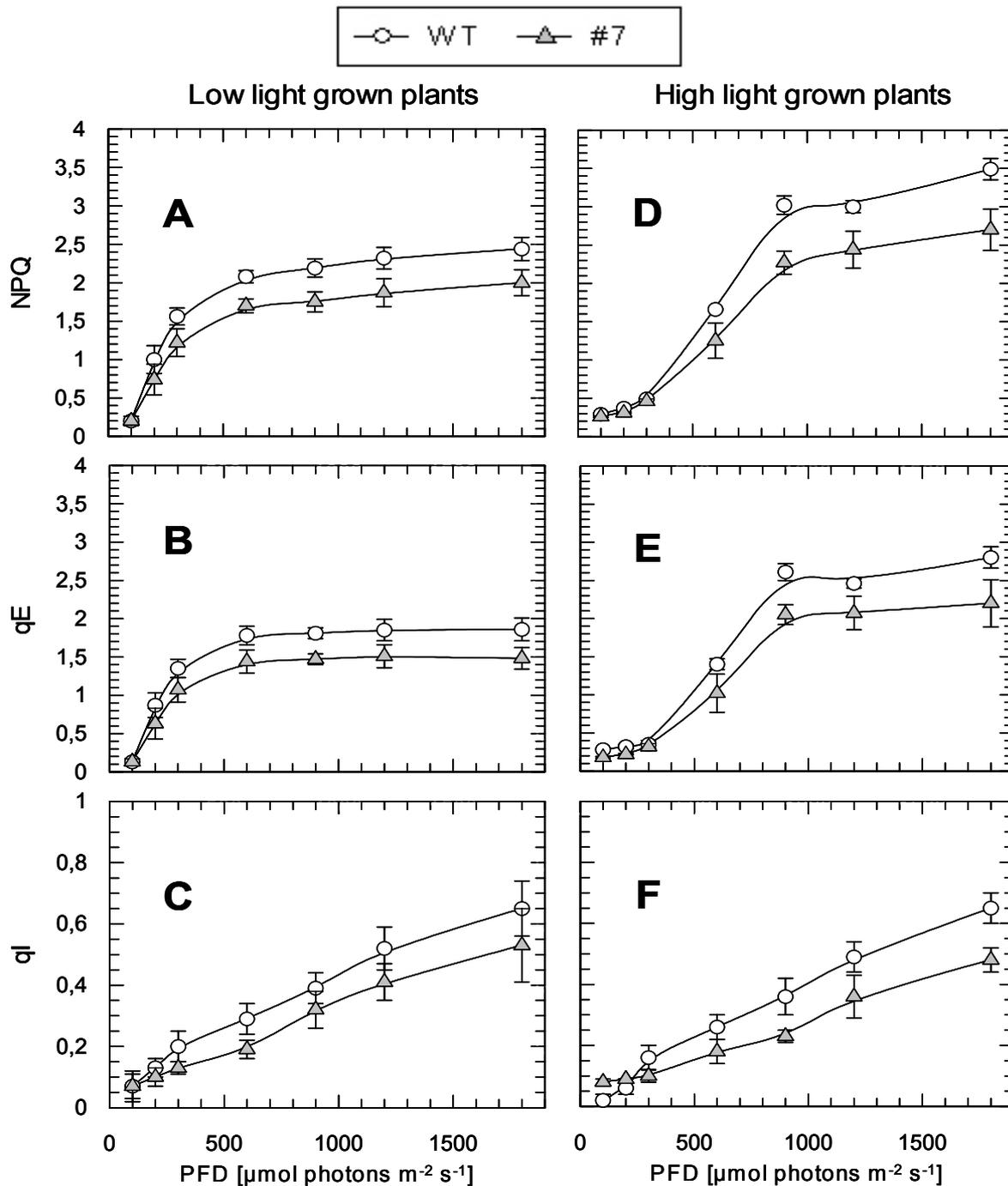


Abbildung 37: Nicht-photochemische (A, D), ΔpH -abhängige (B, E) und photoinhibitorische (C, F) Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der PFD des Anregungslichtes in Blattscheiben der *DsG*-Insertionslinie 7 und des Wildtyps (WT). Die Löschung der Fluoreszenz wurde an dunkeladaptierten Blattscheiben von *A. thaliana* ermittelt, die entweder unter LL- (A, B, C) oder HL-Bedingungen (D, E, F) kultiviert wurden. Die Blattscheiben wurden für 16 min belichtet und die Fluoreszenzlöschungskoeffizienten gemäß 2.4.1.2 ermittelt (vgl. Abbildung 10). Gezeigt werden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten für jede der Linien. Die Daten für die Linie 15 sind mit denen der Linie 7 vergleichbar. Da sie keine neuen Aspekte liefern, werden sie der Übersicht halber nicht gezeigt.

gegenüber dem Wildtyp reduziert, unabhängig von den Kulturbedingungen der Pflanzen (Abbildung 37A, D). Dieser Unterschied war im Wesentlichen auf eine Verringerung des qE in der transgenen Linie 7 zurückzuführen (Abbildung 37B, E). In den unter LL-Bedingungen

angezogenen Wildtyp-Pflanzen erreichte qE bei einer PFD von $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sein maximales Niveau. In HL-Wildtyp-Pflanzen wurde der Anstieg des qE zu stärkeren Lichtintensitäten verschoben, was mit der Erhöhung des maximalen qE-Wertes einherging. Hingegen war der qE-Mechanismus sowohl in den LL- als auch in den HL-Pflanzen der *DsG*-Insertionslinie 7 um 20 bis 25% deutlich reduziert. Die Verringerung korrelierte also unabhängig von der Lichtintensität mit der Reduktion des NPQ.

Diese gegenseitige Beeinflussung wurde auch durch die Analyse der Kinetik der NPQ- und qE-Bildung dokumentiert (Abbildung 38). Dabei zeigte sich, dass die Reduktion beider Parameter im zeitlichen Verlauf vollständig korrelierte. Somit ist die geringere ΔpH -abhängige Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz als Ursache für das reduzierte NPQ in der CP29-defizienten Linie 7 anzusehen. Einzig die etwas schnellere Relaxation des NPQ im Dunkeln scheint auf ein geringeres qI zurückzuführen zu sein, da der Wildtyp und die Insertionslinie 7 den gleichen qE-Level aufwiesen (Abbildung 38). In den entsprechenden LL-Pflanzen wurden Kinetiken mit einem ähnlichen Verlauf für NPQ und qE beobachtet (Daten nicht gezeigt). Eine Verminderung des linearen Elektronentransports und eine damit verbundene geringere Ansäuerung des Lumens sind aufgrund der Messung des P700-Redoxzustandes (Abbildung

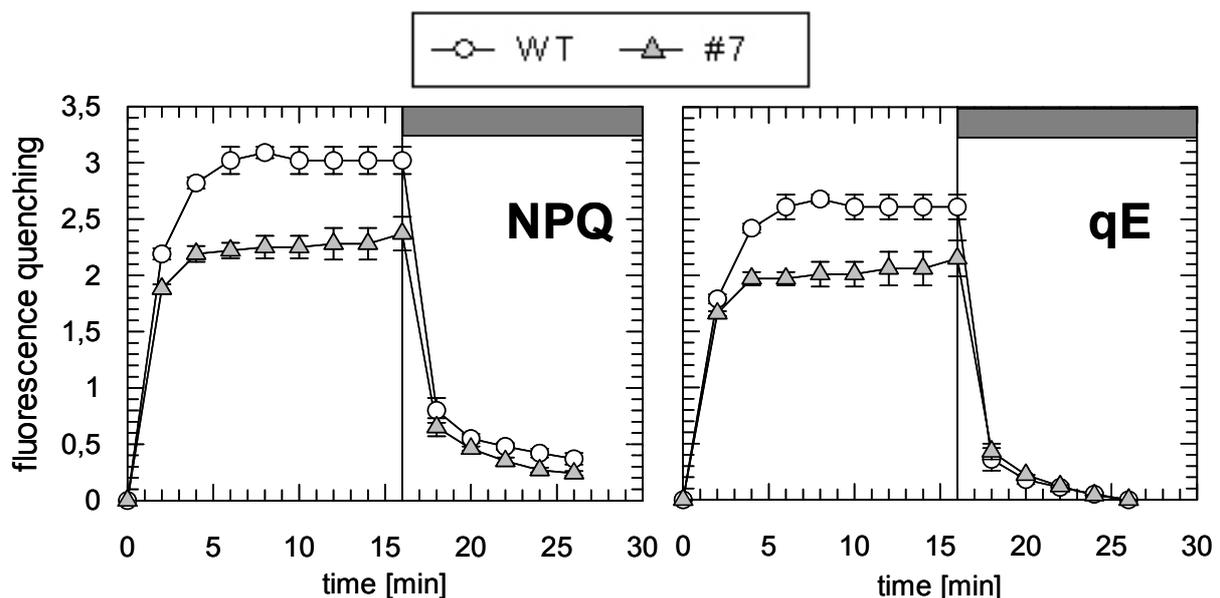


Abbildung 38: Kinetik der Bildung und Relaxation der nicht-photochemischen (NPQ) und ΔpH -abhängigen (qE) Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz in Blattscheiben von HL-Pflanzen. Die Löschung der Fluoreszenz wurde an dunkeladaptierten Blattscheiben der *DsG*-Insertionslinie 7 und des Wildtyps (WT) bestimmt. Die Fluoreszenzlöschungskoeffizienten wurden gemäß 2.4.1.2 anhand der Fluoreszenzänderung aufgrund von saturierenden Lichtblitzen zu den jeweiligen Messpunkten während einer 2- bis 16-minütigen Belichtung ($\text{PFD } 900 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bzw. anschließender 10-minütigen Dunkelperiode (graue Balken) ermittelt. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten für jede der Linien. Die Daten für die Linie 15 sind mit denen der Linie 7 vergleichbar. Da sie keine neuen Aspekte liefern, werden sie der Übersicht halber nicht dargestellt.

35) als Ursache für die Reduzierung des qE-Mechanismus bei mittleren bis hohen Lichtintensitäten in den CP29-defizienten Linien auszuschließen. Gegen eine solche Annahme spricht zudem ein vergleichbares qP im *steady state* der Photosynthese in den *Lhcb4.1-knock-out*-Linien und der Kontrolle (Abbildung 34). In einem weiteren Experiment wurde geprüft, inwieweit eine geringere Aktivität des Xanthophyll-Zyklus das verminderte qE hervorgerufen haben könnte. Dazu wurden Blattscheiben bei unterschiedlichen Lichtintensitäten (100, 300, 600 und 1000 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) für 30 min belichtet und der zeitliche Verlauf der Carotinoid-Umwandlung mittels HPLC bestimmt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied, sowohl in der Dynamik als auch im maximalen Niveau des Deepoxidationszustand (DEPS), zwischen den drei Genotypen detektiert werden (Daten nicht gezeigt, vgl. dazu Abbildung 39). Infolgedessen ist die Reduzierung der ΔpH -abhängigen Löschung in den transgenen Linien auf den Verlust des CP29 und eines Teils des CP24 zurückzuführen.

Der qI-Komponente des NPQ werden alle langsamen Anteile (> 20 min) der Relaxation des NPQ zugeordnet (Quick und Stitt, 1989) und reflektiert somit die langanhaltende Inaktivierung des PS II (vgl. 1.3.4.3). Wie Abbildung 37C und F dokumentiert, steigt qI sowohl in der transgenen Linie 7 als auch im Wildtyp in Abhängigkeit von der Lichtintensität annähernd linear an. Da die *DsG*-Insertionslinien, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen, tendenziell sogar ein geringeres qI aufwiesen, scheint die Reduzierung der ΔpH -abhängigen Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie nicht zu einer erhöhten Sensitivität der CP29-defizienten Linien gegenüber Lichtstress zu führen.

Zur detaillierteren Untersuchung dieses Befundes wurde die Inaktivierung und Erholung der PS II-Aktivität anhand des F_V/F_M -Verhältnisses während und nach einer zweistündigen Starklichtexposition in allen drei Genotypen ermittelt (Abbildung 39A). Parallel dazu wurde die Aktivität des Xanthophyll-Zyklus anhand des DEPS bestimmt (Abbildung 39B). In allen drei *A. thaliana*-Linien sank die PS II-Aktivität kontinuierlich mit steigender Belichtungsdauer und war nach 2 h auf 60% des Ausgangswertes reduziert. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den CP29-defizienten Linien und dem Wildtyp detektiert werden. In der anschließenden Schwachlichtphase zeigten sowohl die Mutanten als auch der Wildtyp eine vergleichbare zweiphasige Erholungskinetik. So verbesserte sich in allen drei Linien die PS II-Aktivität im Schwachlicht nach 30 min auf 70 bis 75% und nach weiteren 1,5 h auf 85 bis 90% des Ausgangswertes.

Der DEPS wies in allen drei Genotypen eine vergleichbare Dynamik auf (Abbildung 39B). Allein der maximale DEPS war nach 90-minütiger Belichtung in den *DsG*-Insertionslinien signifikant um 5 bis 8% gegenüber dem Wildtyp erhöht. Dies könnte auf eine bessere

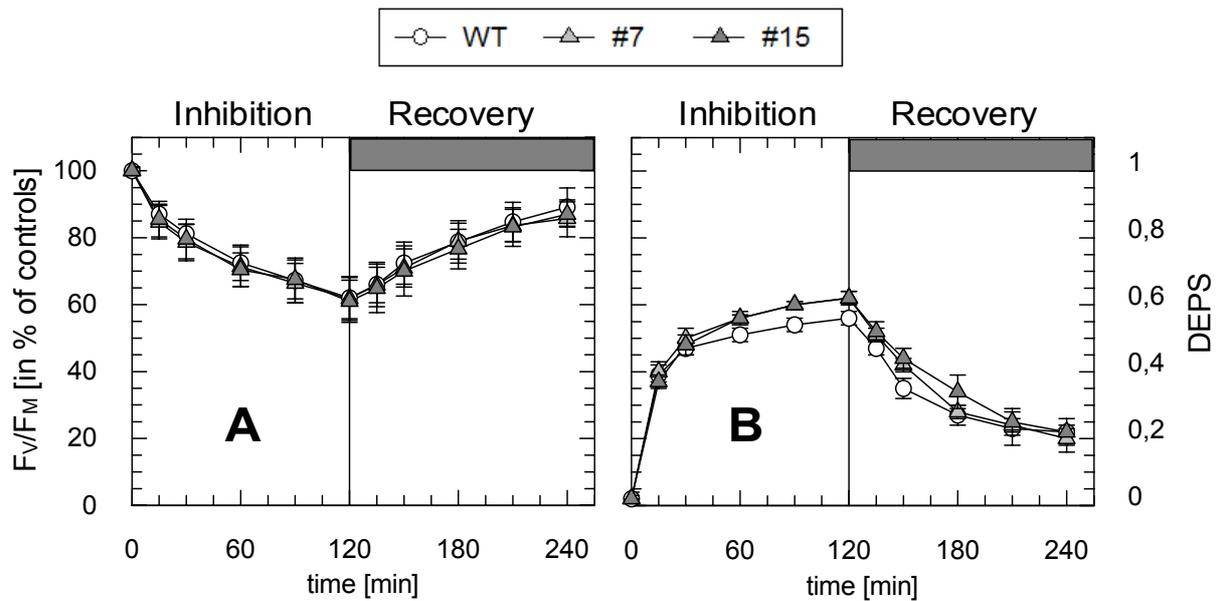


Abbildung 39: Verlauf der Photoinhibition und der Erholung (A) im Vergleich mit der Dynamik des DEPS (B) in intakten Blättern der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 und dem Wildtyp (WT). **A)** Blattscheiben von LL-Pflanzen wurden bei einer PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für 2 h (Photoinhibition) bzw. $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Erholung; grauer Balken) belichtet. Zu den jeweiligen Messpunkten wurden die Blattscheiben für 8 bis 10 min dunkeladaptiert und anschließend das F_V/F_M -Verhältnis bestimmt. Die Fluoreszenzdaten wurden auf das jeweilige F_V/F_M zum Zeitpunkt $t = 0$ normiert (WT: $0,804 \pm 0,006$; #7: $0,770 \pm 0,007$; #15: $0,774 \pm 0,009$). **B)** Die Bestimmung des Depoxidationszustandes (DEPS) erfolgte an den gleichen Blattscheiben wie in (A). Direkt nach der Bestimmung des F_V/F_M -Verhältnisses wurden die Blattscheiben in flüssigem N_2 schockgefroren und anschließend die Pigmente extrahiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von 8 unabhängigen Experimenten für jede der Linien.

Zugänglichkeit der Xanthophyll-Zykluspigmente in den Mutanten für die VDE hindeuten. Alle drei *A. thaliana*-Linien zeigten im späteren Schwachlicht für die Epoxidationsreaktion eine vergleichbare zweiphasige Dynamik. In der ersten 30-minütigen, schnellen Phase sank der DEPS in allen drei Genotypen um 50%, während nach Abschluss der zweistündigen Schwachlichtexposition noch ungefähr 20% des DEPS vorhanden waren.

In HL-Pflanzen konnte keine Erhöhung des DEPS während der Starklichtphase in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 gegenüber der Kontrolle beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vielmehr verhielt sich der DEPS in den Mutanten während und nach der Belichtung im Bezug auf Dynamik und Quantität unauffällig. Der Grad der Photoinhibition des PS II war in den HL-Pflanzen im Vergleich zu den LL-Pflanzen abgeschwächt. Dementsprechend betrug der Quotient F_V/F_M in allen drei Genotypen nach 2 h Starklichtexposition noch 80% des Ausgangswertes. Ein war jedoch kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Photoinhibition und der anschließenden Erholung zwischen den *DsG*-Insertionslinien und dem Wildtyp nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.2.7 PS II-Aktivität während langanhaltendem photooxidativem Stress

Um die Vitalität der *DsG*-Insertionslinien bei langanhaltendem Lichtstress zu testen, wurde in den nun folgenden Versuchsreihen die Starklichtexposition zeitlich deutlich verlängert und teilweise mit anderen Stressfaktoren kombiniert (Abbildung 40).

Die zeitliche Ausweitung der Starklichtexposition führte in allen drei Genotypen zu einem deutlichen Anstieg der Photoinhibition (Abbildung 40A). So wies das PS II nach 4 bzw. 8 h Starklichtbehandlung nur noch 62 bzw. 43% der Anfangsaktivität auf. Allerdings konnte auch unter diesen Versuchsbedingungen weder für die Dynamik der PS II-Inaktivierung noch für dessen Erholung ein signifikanter Unterschied zwischen den *Lhcb4.1-knock-out*-Linien und

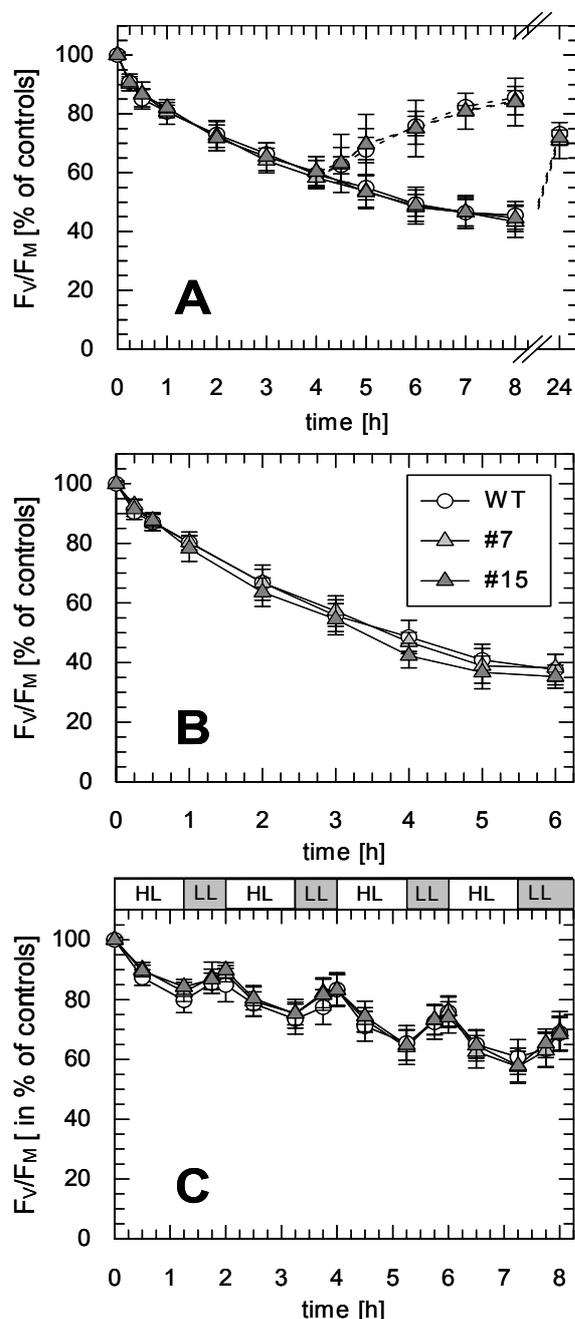


Abbildung 40: Photoinaktivierung des PS II in intakten Blättern der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 und dem Wildtyp (WT). **A)** Verlauf der Starklicht-induzierten Inaktivierung des PS II (durchgezogene Linie) und Erholung im Schwachlicht (gepunktete Linie). Blattscheiben von LL-Pflanzen wurden für die Photoinhibition bei einer PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet. Für die Erholung wurden die Blattscheiben nach 4 oder 8 h Starklichtbehandlung ins Schwachlicht überführt (PFD von $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$). **B)** Dynamik der Photoinhibition des PS II bei 8°C. Die Blattscheiben schwammen während der Starklichtexposition (PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) auf 8°C kaltem Wasser, dessen Temperatur durch einen Kryostaten konstant gehalten wurde. **C)** Verlauf der Photoinhibition des PS II während einer alternierenden Abfolge von Starklicht- (75 min , PFD von $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL)) und Schwachlichtexpositionen (45 min , PFD von $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL)). Zu den jeweiligen Messpunkten wurden die Blattscheiben für 8 bis 10 min dunkeladaptiert und anschließend der Quotient F_v/F_M bestimmt. Die Fluoreszenzdaten wurden auf das jeweilige F_v/F_M zum Zeitpunkt $t = 0$ (entspricht 100%) normiert. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von 3 bis 4 unabhängigen Experimenten für jede der Linien.

der Kontrolle dokumentiert werden. Auch eine Kombination aus Licht- und Kältestress (PFD $2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 8°C) verursachte keine verstärkte Inhibition des PS II in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 40B).

In der Natur werden Pflanzen ständig mit schnell wechselnden Lichtintensitäten konfrontiert. Um photooxidativen Stress zu vermeiden sind rasch induzierbare Schutzmechanismen, wie die Energie-abhängige Wärmedissipation, für die Pflanzen von besonderer Bedeutung. In Anlehnung an natürliche, d.h. schwankende Lichtverhältnisse wurden Blattscheiben der drei Genotypen einer alternierenden Abfolge von Stark- und Schwachlichtphasen ausgesetzt und die PS II-Aktivität bestimmt (Abbildung 40C). Während es bei Starklichtexpositionen zu einer kontinuierlichen Zunahme der Photoinhibition in allen drei *A.thaliana*-Linien kam, konnte in den Schwachlichtphasen eine Erholung der PS II-Aktivität verzeichnet werden. Allerdings verhielten sich die *DsG*-Insertionslinien gegenüber dem Wildtyp auch unter diesen Lichtverhältnissen unauffällig. Auffallend ist, dass die Inhibition der drei Genotypen weniger stark ausgeprägt war als in dem entsprechenden Experiment mit der *psbs-1.3*-Mutante (vgl. Abbildung 26B). Der Grund dafür ist nicht in der Verwendung verschiedener Ökotypen zu sehen (Columbia 0 und Landsberg *erecta*), da diese in einer vergleichenden Studie keine Unterschiede aufwiesen (Daten nicht gezeigt), sondern vielmehr in den jahreszeitlich bedingten Schwankungen bei der Anzucht im Gewächshaus. Dies ändert nichts an der Aussagekraft der Versuche, da für die einzelnen Messreihen immer Mutanten mit den entsprechenden Kontrollpflanzen kultiviert und analysiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlust eines Teils der minoren Antennenproteine zwar zu einer Reduktion der ΔpH -abhängigen Energiedissipation führt, aber nicht die Sensitivität der Pflanzen gegenüber photooxidativem Stress steigert.

3.3.2.8 Komplementation der *DsG*-Insertionslinien

Anhand einer Komplementation der *DsG*-Insertionslinie 7 wurde überprüft, ob die beobachtete Reduzierung der *Lhcb4.1*-Transkriptmenge tatsächlich für den dokumentierten Phänotyp der *DsG*-Insertionslinien verantwortlich war. Hierbei wurde bewusst auf eine *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation der homozygoten Mutante mit einem zweiten T-Plasmid verzichtet. Zum einen, weil eine Co-Integration oft zu einer Co-Suppression der beiden T-DNAs führt (z. B. Andersson et al., 2001). Zum anderen, weil solche Transformanten häufig einen erhöhten Proteinlevel im Vergleich zum eigentlichen Wildtyp zeigen, selbst wenn dafür der entsprechende endogene Promotor des zu komplementierenden Gens in der Expressionskassette der T-DNA verwendet wird (z. B. Li et al., 2002c). Infolgedessen wurde die homo-

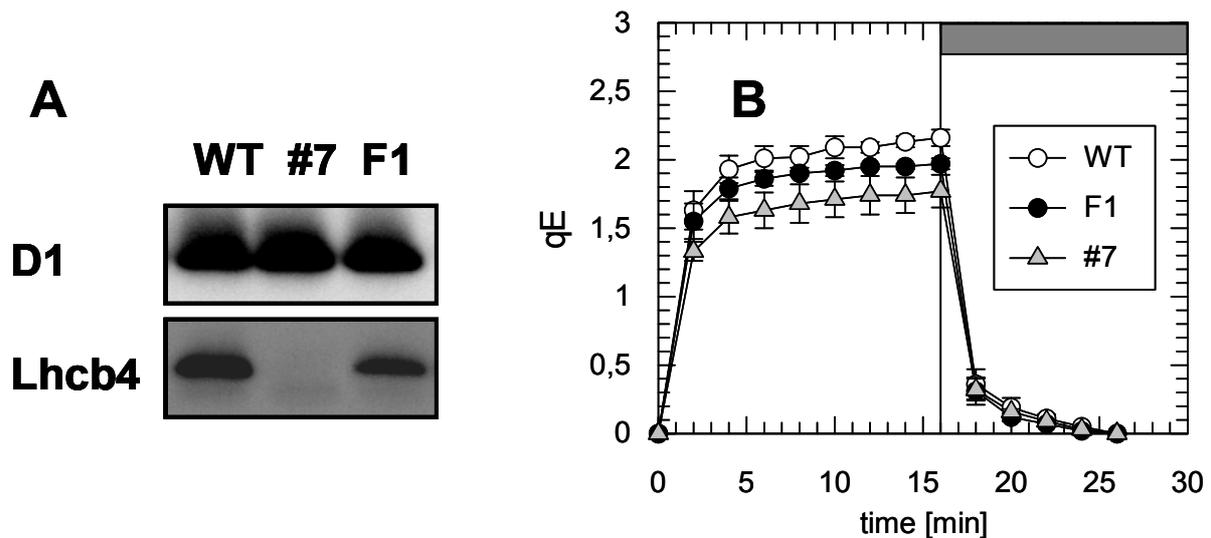


Abbildung 41: Immunoblot-Analyse (A) und Kinetik der Δ pH-abhängigen Löschung der variablen Chl a-Fluoreszenz (qE) *in vivo* der *DsG*-Insertionslinie 7, des Wildtyps (WT) und der heterozygoten F1-Generation (F1) (B). **A** Aus Blättern des jeweiligen Genotyps wurden Proteingesamtextrakte isoliert und 8 μ g Proteinextrakt pro Spur im PAA-Gel aufgetragen. Der Proteinachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die angezeigten Proteine (CP29 und D1). **B** Die Löschung der Chl a-Fluoreszenz wurde an dunkeladaptierten Blattscheiben von LL-Pflanzen bestimmt. Die Bildung und die Relaxation von qE wurde anhand der Fluoreszenzänderung aufgrund von saturierenden Lichtblitzen zu den jeweiligen Messpunkten während und nach (grauer Balken) einer 2- bis 16-minütigen Starklichtexposition (PFD von 900 μ mol Photonen $m^{-2} s^{-1}$) ermittelt. Der Fluoreszenzlöschungskoeffizient für qE wurde gemäß 2.4.1.2 hergeleitet. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten für jede der Linien.

zygote *DsG*-Insertionslinie 7 mit dem Wildtyp (Ökotyp Landsberg *erecta*) gekreuzt. Die daraus resultierende F1-Generation, im Folgenden kurz F1 genannt, wurde mittels PCR auf ihre Heterozygotie überprüft. Hierbei kam das in 3.3.2.2 beschriebene PCR-System mit drei Primern pro PCR-Ansatz zur Anwendung (zwei Primer binden im *Lhcb4.1*- und der dritte im *Gus*-Gen des *DsG*-Elementes). In allen Pflanzen der F1 wurde, wie erwartet, sowohl das 1022 bp große PCR-Fragment des Wildtyp-Allels als auch des 1309 bp große Fragment des mutierten Allels amplifiziert (siehe Abbildung 31).

Mittels Immunoblot-Analyse wurde die Auswirkung des eingeführten *Lhcb4.1*-Wildtypallels auf den CP29-Proteinlevel in der F1-Generation untersucht (Abbildung 41A). Die Pflanzen der F1 zeigten einen Dosiseffekt des *Lhcb4.1*-Gens, da sie etwa 60% der CP29-Proteinmenge der homozygoten Wildtyp-Pflanzen besaßen (Daten der entsprechenden Verdünnungsreihen nicht gezeigt). Solch ein intermediärer Phänotyp wurde bereits bei der immunologischen Sichtung der Tochtergeneration der ursprünglichen Cold Spring Harbor-Linie GT5588 beobachtet (vgl. 3.3.2).

Die Analyse der nicht-photochemischen und der Δ pH-abhängigen Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von der Lichtintensität unterstrichen den intermediären Charakter der heterozygoten F1-Linie. Zwar waren beide Löschungsparameter, NPQ und qE, um etwa 10% gegen-

Tabelle 10: Vergleich des Chl a/b-Verhältnisses und der Carotinoid-Komposition von Wildtyp und der heterozygoten F1-Generation (F1), kultiviert unter LL-Bedingungen. Der Carotinoid-Gehalt des Wildtyps (WT) und der F1-Generation wurde mittels HPLC ermittelt. Die Daten wurden auf die Chl-Menge normiert. Mittelwerte von 14 verschiedenen Blattproben \pm SD werden gezeigt.

	Chl a/b	Car/Chl	Pigmentgehalt ($\mu\text{mol mmol}^{-1}$ Chl)			
			Neo	Lut	β -Caro	Vx+Ax+Zx
WT	3,25 \pm 0,04	0,27 \pm 0,00	35 \pm 1	123 \pm 6	81 \pm 2	33 \pm 5
F1	3,22 \pm 0,04	0,27 \pm 0,01	35 \pm 1	120 \pm 4	79 \pm 2	31 \pm 2

über der Kontrolle verringert, sie lagen damit aber über dem Niveau der homozygoten *DsG*-Insertionslinie 7 (Daten nicht gezeigt). Dies konnte auch anhand der Untersuchung der Kinetik der qE-Bildung dokumentiert werden (Abbildung 41B). Die ΔpH -abhängige Fluoreszenzlöschung wurde in allen drei Genotypen bereits nach zwei Minuten induziert. Indes lag das maximale Niveau des qE der heterozygoten Tochtergeneration ebenfalls zwischen dem des Wildtyps und der CP29-defizienten Linie 7. Die anschließende Relaxation im Dunkeln offenbarte hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei *A. thaliana*-Linien.

Die Auswirkungen der Einkreuzung eines *Lhcb4.1*-Wildtypallels auf die Pigmentzusammensetzung in der F1-Linie wurden mittels HPLC untersucht (Tabelle 10). Die Mengen der Carotinoide (mit Ausnahme des Xanthophyll-Zyklus) waren, bezogen auf die Chl-Gesamtmenge, in der F1-Linie mit denen des Wildtyps praktisch identisch. Allein das Chl a/b-Verhältnis und die Größe des Xanthophyll-Zyklusools waren gegenüber der Kontrolle leicht reduziert. Diese Veränderungen waren allerdings nicht signifikant (t-Test; $P > 0,05$). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass anhand des intermediären Charakters der heterozygoten F1-Generation dokumentiert werden konnte, dass der *knock-out* des *Lhcb4.1*-Gens für den beobachteten Phänotyp der *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 verantwortlich war.

3.3.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um die funktionelle Bedeutung des Antennenproteins CP29 für den Schutzmechanismus der ΔpH -abhängigen Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie zu untersuchen, wurden zwei *A. thaliana*-Linien analysiert, die aufgrund der Insertion eines *DsG*-Elementes in dem *Lhcb4.1*-Gen einen um 90% verminderten CP29-Proteingehalt aufwiesen. Die *Lhcb4.1*-Transkriptmenge lag in den transgenen Linien unterhalb der Nachweisgrenze, während die mRNA-Menge des homologen *Lhcb4.2*-Gens leicht dezimiert war. Ferner wiesen beide *DsG*-Insertionslinien einen signifikant reduzierten CP24-Proteingehalt auf, obwohl der *Lhcb6*-Transkriptlevel keine Veränderung aufwies. Der Verlust des CP29 und eines Teils des CP24 beeinflusste weder die Wachstumsrate der transgenen Pflanzen, noch die Anpassungsfähigkeit

des PS II an unterschiedliche Lichtquantitäten. Auch die Elektronentransportraten *in vitro* sowie die photochemische Löschung von Anregungsenergie waren unverändert. Anhand des verminderten Quotient F_V/F_M wurde jedoch deutlich, dass die Effizienz der Energiesammlung durch die PS II-Antenne in den *DsG*-Insertionslinien beeinträchtigt war. Gleichzeitig zeigten die CP29-defizienten Linien einen erhöhten Anteil an oxidiertem P700, insbesondere bei niedrigen Lichtintensitäten. Die Gesamtgröße des für seine Schutzfunktion bei Lichtstress bekannten Xanthophyll-Zyklus war um ca. 15% verringert. Auf die Aktivität des Xanthophyll-Zyklus hatte dies allerdings keinen Einfluss. Der Verlust des CP29 verursachte offenbar eine Verminderung der ΔpH -abhängigen Energiedissipation um 20 bis 25% in den *DsG*-Insertionslinien. Diese Reduzierung des qE führte allerdings nicht zu einer gesteigerten Sensitivität der *DsG*-Insertionslinien gegenüber photooxidativem Stress. Durch das Einkreuzen eines *Lhcb4.1*-Wildtypallels in die *DsG*-Insertionslinie 7 wurde diese in Bezug auf den CP29-Proteingehalt, die Fluoreszenzlöschungparameter NPQ und qE, sowie die Pigmentzusammensetzung ganz oder teilweise komplementiert.

4 DISKUSSION

4.1 Die physiologische Bedeutung des α -Tocopherols als Schutzfaktor gegenüber photooxidativem Stress

Über die physiologische Bedeutung des Antioxidans α -Tocopherol ist in höheren Pflanzen, im Gegensatz zu tierischen Organismen, nur wenig bekannt (Havaux et al., 2003; Porfirova et al., 2002; Sattler et al., 2003; Trebst, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Schutzfunktion des α -Tocopherols gegenüber photooxidativem Stress in höheren Pflanzen anhand von α -Tocopherol-defizienten *CHL P*-Antisense-Pflanzen aus *N. tabacum* untersucht. Dabei waren auch mögliche Auswirkungen infolge des Einbaus von geranylgeranyliertem Chl auf die Funktion und Stabilität der pigmentbindenden Proteinkomplexe und somit letztlich auf die Photosyntheseleistung der transgenen Linien von Interesse.

4.1.1 *CHL P*-Antisense-Pflanzen besitzen weniger Elektronentransportketten

Die Analyse der Pigmentzusammensetzung und des Tocopherol-Gehaltes der *CHL P*-Antisense-Pflanzen (Tabellen 4, 5) stehen grundsätzlich im Einklang mit früheren Daten von Tanaka et al. (1999). Die starke Reduzierung der Tocopherol-Menge in den Transformanten 6 und 10 korrelierte stets mit einem hohen Anteil an Chl_{GG} an der Chl-Gesamtmenge (Tabelle 4), und spiegelt somit die geringere *CHL P*-Aktivität in diesen Linien im Vergleich zum Wildtyp und der Linie 20 wider (vgl. Tanaka et al., 1999). Aufgrund der Pigmentanalyse intakter Thylakoide (Tabelle 6) ist eine bevorzugte Veresterung von Geranylgeraniol mit einem der beiden Chlorophylle auszuschließen, da das $\text{Chl}_{\text{GG a}}/\text{Chl}_{\text{GG b}}$ -Verhältnis etwa dem der phytylierten Chl-Moleküle entsprach. Einen ähnlichen Sachverhalt fanden Shibata et al. (2004) bei der Untersuchung von mutagenisierten Reispflanzen, die neben Chl_{GG} auch Chl mit teilreduzierten Seitenketten wie Di- und Tetrahydrogeranylgeraniol aufwiesen.

Neben der Akkumulation von Chl_{GG} ist die Reduktion der Chl-Gesamtmenge auf 62 bis 70% des Wildtypniveaus ein weiteres herausragendes Charakteristikum der transgenen Tabaklinien (Tabelle 4). Eine vergleichbare drastische Dezimierung des Chl-Gesamtpools wurde ebenfalls infolge fehlender *CHL P*-Aktivität in *Synechocystis sp.* PCC6803 (Shpilyov et al., 2005) und in *Oriza sativa* (Shibata et al., 2004) beobachtet. Hingegen wiesen verschiedene α -Tocopherol-defiziente *A. thaliana*-Mutanten nur eine geringfügige Verringerung der Chl-Gesamtmenge auf (Porfirova et al., 2002; Bergmüller et al., 2003; Kanwischer et al., 2005).

So besaßen die Vitamin E-defizienten *vte1*- und *vte4*-Mutanten aus *A. thaliana* noch 94 bzw. 85% der Chl-Menge des Wildtypniveaus (Bergmüller et al., 2003). Als Ursache für den reduzierten Chl-Gesamtgehalt in den CHL P-defizienten Spezies (*N. tabacum*, *Synechocystis ps.* und *O. sativa*) wird eine labilere Assoziation von Chl_{GG} mit den pigmentbindenden Proteinen vermutet, sodass die Ch_{GG}-Proteinkomplexe einem erhöhten Abbau unterliegen (Tanaka et al., 1999; Shibata et al., 2004; Shpilyov et al., 2005). Der Grund für den reduzierten Chl-Gehalt in den α -Tocopherol-defizienten *A. thaliana*-Mutanten wird hingegen in einer vermehrten Bildung von ROS gesehen, was zu einer gesteigerten photooxidativen Schäden führen könnte (Kanwischer et al., 2005). Dies steht in Einklang mit Feldstudien und Licht-*shift*-Experimenten (Munné-Bosch und Alegre, 2000; Collakova und DellaPenna, 2003), in denen der Chl-Gehalt mit zunehmender Lichtintensität bzw. Belichtungsdauer sank.

Schon früh haben zahlreiche Studien auf die regulatorische und funktionelle Bedeutung des Chl für den Zusammenbau und die Stabilität der Photosysteme hingewiesen (Apel und Kloppstech, 1980; Mathis und Burkey, 1989; Paulsen et al., 1993). So führte eine begrenzte Verfügbarkeit von Chl in *intermittent light*-Pflanzen (Jahns, 1995) und in *chlorina f2*-Mutanten der Gerste (Preiss und Thornber, 1995) sowohl zu einer Reduzierung der Antennengröße als auch zu einer Verringerung der Anzahl der Photosysteme. Aufgrund eines nahezu identischen Chl a/b-Verhältnisses und eines vergleichbaren Lut-Gehaltes (bezogen auf die Chl-Gesamtmenge) in den CHL P-Antisense-Pflanzen (Tabelle 4, 5) kann jedoch eine Verringerung der Gesamtantenne als Folge des reduzierten Chl-Gehalts ausgeschlossen werden. Eine mögliche spezifische Dezimierung einzelner Antennenproteine ist aus dem gleichen Grund unwahrscheinlich und wurde in einer vorangegangenen Studie aufgrund von Immunoblot-Analysen (Graßes, 1999) als negativ beschieden. Eine Modifikation der Stöchiometrie der beiden Photosysteme, wie sie Jahns und Junge (1992) in *intermittent light*-Pflanzen beobachtet haben, ist bei einer unveränderten Antennengröße infolge eines vergleichbaren β -Caro-Gehaltes und Chl a/b-Verhältnisses (Tabelle 4, 5) in den CHL P-defizienten Tabakpflanzen nicht zu erwarten. Da β -Caro hauptsächlich im RZ der beiden Photosysteme gebunden ist (Färber et al., 1997; Morosinotto et al., 2003), kann es als Indikator für die relativen Mengen der RZ der beiden Photosysteme angesehen werden. Aus den hier vorliegenden Daten muss geschlossen werden, dass die CHL-defizienten Linien 6 und 10 im Vergleich zum Wildtyp über weniger Elektronentransportketten (pro Blattflächeneinheit) verfügen, wobei sich die einzelnen Photosysteme in ihrer Antennengröße und Struktur nicht von denen der Kontrolle unterscheiden. Eine geringere Anzahl an Elektronentransportketten gilt als Indiz für eine vermehrte photooxidative Schädigung in Pflanzen (Pogson et al., 1998).

4.1.2 Die Auswirkungen der geringeren CHL P-Aktivität auf die Photosyntheseleistung

Die *in vitro* und *in vivo* gemessenen Photosyntheseaktivitäten belegen (Abbildung 14, 15), dass durch die Änderung der Pigmentkomposition und der Reduzierung des α -Tocopherol-Gehaltes weder der Energietransfer von den Antennen zum RZ noch der lineare Elektronentransport in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen beeinflusst wurden. Dies wird durch eine ergänzende spätere Studie von Havaux et al. (2003) an den gleichen *CHL P*-defizienten Tabaklinien bestätigt. Selbst ein Chl_{GG} -Anteil von mehr als 98% am Chl -Gesamtpool in *CHL P*-defizienten *O. sativa*-Pflanzen hatte keinen Effekt auf den linearen Elektronentransport und die Photosynthese (Shibata et al., 2004). Somit wird, wie schon früher für *bchP*-Insertionsmutanten in *Rhodobacter capsulatus* gezeigt wurde (Bollivar et al., 1994), die Assemblierung und Funktion der Antennensysteme auch in höheren Pflanzen nicht gestört, wenn Chl_{Phy} durch Chl_{GG} ersetzt wird.

Dabei ist bemerkenswert, dass das geranylgeranylierte Chl nicht gleichmäßig mit den Chl -bindenden Proteinen der beiden Photosysteme assoziiert ist. So wurde in der IEF eine Bevorzugung von Chl_{Phy} gegenüber Chl_{GG} speziell für die PS I-Fraktion gefunden (Tabelle 6). Da das Chl_{GG} a/b-Verhältnis in allen IEF-Fractionen etwa dem der phytylierten Chl -Moleküle entspricht (Tabelle 6), muss man daraus schließen, dass bei der Assemblierung der *core*- bzw. peripheren Antenne der beiden Photosysteme nicht selektiv zwischen Chl_{Phy} und Chl_{GG} unterschieden wird. Tatsächlich fanden Maloney et al. (1989) in *C. reinhardtii*, dass eine Reduzierung der alkoholischen Seitenkette der Chl -Moleküle für die Assemblierung der CAB-Proteine nicht notwendig ist.

Die Assoziierung von Chl_{GG} mit den pigmentbindenden Proteinen hatte keine Beeinträchtigung der Aktivität der beiden Photosysteme zur Folge. Dies muss auch für den putativen Einbau eines geranylgeranylierten Phylloquinons (Vitamin K1) im PSI-RZ angenommen werden (vgl. Abbildung 9). Die Phylloquinone sollten in dem gleichen Ausmaß wie die Chlorophylle in geranylgeranylierter Form vorliegen, wenn die Prenylierung des Phylloquinon-Vorläufers 1,4-Dihydroxy-2-Naphthonat mit PhyPP nicht in einem gesonderten Reaktionsweg erfolgt. Allerdings ist eine Verwertung von GGPP durch die 1,4-Dihydroxy-2-Naphthonat-Phytyltransferase aufgrund der gefundenen Substratspezifität der charakterisierten Homogentisin- bzw. Solanesyl-Polyprenyltransferasen in *A. thaliana* (Collakova und DellaPenna, 2001) fraglich.

Die *in vivo* Messungen der CO_2 -Assimilation demonstrierten klar, dass die *CHL P*-Antisense-Pflanzen in Bezug auf das Sättigungsniveau der apparenten Photosynthese keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Abbildung 15). Somit bleibt die

Ursache für das reduzierte Wachstum der Linien 6 und 10 (Abbildung 13) zunächst spekulativ. Es ist bekannt, dass die Abwesenheit von α -Tocopherol die Permeabilität von Phospholipidmembranen, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind, für kleine Moleküle und Ionen drastisch erhöht (Diplock und Lucy, 1973; Lucy, 1978). Eine für Protonen durchlässigere Thylakoidmembran würde einen verzögerten bzw. unvollständigen Δ pH aufbauen, was zu einer Unterversorgung des Calvin-Zyklus mit Energieäquivalenten führt. Eine Entkopplung der Thylakoidmembran aufgrund des α -Tocopherol-Defizits ist als Grund für das verzögerte Wachstum in den transgenen Linien 6 und 10 jedoch auszuschließen. Dem widerspricht eine nahezu identische Quantenausbeute im linearen Proportionalitätsbereich der Lichtkurve bei nichtsättigenden Lichtintensitäten in allen vier Genotypen (Abbildung 15). Ein weiteres Argument gegen eine Entkopplung der Thylakoidmembran liefern die vergleichbaren bzw. teilweise erhöhten Deepoxidationsraten in den Linien 6 und 10 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 18). Da die Aktivität der VDE streng vom luminalen pH abhängig ist (Hager, 1969; Pfündel und Dilley, 1993) würde eine teilweise Entkopplung der Thylakoidmembran in einer geringeren oder verzögerten Deepoxidation des Vx münden. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Einen Erklärungsansatz für den geringeren Wuchs liefert der bereits vermutete erhöhte Abbau der vermeintlich labilen Chl_{GG}-Proteinkomplexe (vgl. 4.1.1), was anhand der durchgeführten Experimente nicht überprüft werden kann. Für diese These spricht, dass Tocopherol-defiziente Mutanten mit normaler CHL P-Aktivität (Porfirova et al., 2002; Bergmüller et al., 2003; Kanwischer et al., 2005) ein normales oder nur leicht verzögertes Wachstum aufwiesen. Einen retardierten Phänotyp zeigten hingegen Tocopherol-Mangelmutanten, die gleichzeitig eine Akkumulation von CO₂-Assimilaten in den Blättern offenbarten (*sxd1*-Mutanten; Sattler et al., 2003; Hofius et al., 2004). Hier liegt die Ursache indes in einer direkten oder indirekten *feedback*-Inhibition der Photosynthese durch die Anhäufung der Kohlenhydrate in den Blättern, jedoch nicht in dem α -Tocopherol-Defizit an sich (Hofius et al., 2004). Ob es in den *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen auch zu einer vergleichbaren Blockierung des Saccharose-Exports aus den Blättern kommt, ist nicht bekannt. Die vorgelegten Daten belegen, dass die *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen infolge des deutlich niedrigeren Tocopherol-Gehaltes sensitiver auf photooxidativen Stress reagieren (Abbildung 17) und es zu einer verstärkten irreparablen Schädigung von Zellkomponenten durch die vermehrt gebildeten ROS kommt (Abbildung 20, 19). Wahrscheinlich ist für das retardierte Wachstum der *CHL P*-Antisense-Linien ein additiver Effekt aus erhöhtem *turnover* der labilen Chl_{GG}-Proteinkomplexe und verstärkter photooxidativer Zerstörung von Zellbestandteilen verantwortlich. Eine vermehrte

photooxidative Schädigung allein sollte nicht ausreichen, um den beobachteten Phänotyp zu induzieren (vgl. Abbildung 13). Andernfalls sollten auch Tocopherol-Mangelmutanten mit normaler CHL P-Aktivität einen entsprechend geringeren Wuchs aufweisen. Eine zusätzliche Störung des Zucker-Transports in den *CHL P*-Antisense-Linien ist nicht gänzlich auszuschließen.

4.1.3 Die Vergrößerung des Xanthophyll-Zyklusools

Eine genauere Betrachtung der Carotinoid-Zusammensetzung (Tabelle 5) offenbart eine Erhöhung der Pigmentmenge des Xanthophyll-Zyklus bezogen auf den Chl-Gesamtgehalt in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen um 40 bis 50%. Diese Vergrößerung wurde von Havaux et al. (2003) bestätigt. Zx fungiert in der Thylakoidmembran nicht nur als Antioxidans (vgl. 1.3.3; Abbildung 6), sondern reguliert wohl auch ihre Fluidität, Permeabilität und Thermostabilität (Havaux, 1998; Havaux und Niyogi, 1999; Havaux et al., 2000). Aufgrund der ähnlichen bzw. sich ergänzenden Funktion von Zx und α -Tocopherol in der Thylakoidmembran (Fryer, 1992) kann der vergrößerte Xanthophyll-Zykluspool als Kompensation des α -Tocopherol-Mangels in den transgenen Linien 6 und 10 interpretiert werden. Zx ist in der Lage, den Starklicht-induzierten Abbau des D1-Proteins zu verringern (Jahns et al., 2000). Havaux und Niyogi (1999) konnten zudem eine verstärkte Lipidperoxidation bei Zx-Mangel in NPQ-defizienten *A. thaliana*-Mutanten zeigen. Die Vergrößerung des Xanthophyll-Zyklusools in den Transformanten 6 und 10 stellt somit wahrscheinlich eine Adaptation an die erhöhte Sensitivität gegenüber Lichtstress (vgl. 4.1.4.) in diesen Mutanten dar. Die Hochregulierung bzw. Akkumulation von Schutzenzymen und/oder anderen Antioxidantien bei Verlust einer oder mehrerer Komponenten der Stressantwort ist ein häufig zu beobachtendes Phänomen in Pflanzen. Beispielsweise wiesen α -Tocopherol-defiziente *vte1*-Mutanten in *A. thaliana* ein drastisch erhöhtes Niveau an Ascorbat und Glutathion auf (Kanwischer et al., 2005). Ascorbat-Mangelmutanten zeigten indes eine Akkumulation einer im Stroma lokalisierten Alkylhydroperoxid-Reduktase (2-Cys-Peroxiredoxin), die in der Thylakoidmembran Lipidhydroperoxide reduziert (Müller-Moulé et al., 2003). In den *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen konnte hingegen weder ein Anstieg des Ascorbat- noch des Glutathion-Gehaltes gemessen werden (Havaux et al., 2003). Auch eine Anhäufung von Tocotrienolen wurde aufgrund der Substratspezifität der Homogentisin-Phytyltransferase nicht beobachtet (Tanaka et al., 1999; Collakova und DellaPenna, 2001). Allerdings zeigt die hohe Sensitivität der Mutanten 6 und 10 gegenüber Photoinhibition, dass die Carotinoide nicht (vollständig) in der Lage sind, eine vermehrte photooxidative Schädigung von Zellkomponenten zu verhindern.

Es ist beachtenswert, dass der Anstieg des Xanthophyll-Zyklus in den Linien 6 und 10 in absoluten Zahlen (15 bis 20 auf 1000 Chlorophylle, was grob 1 Xanthophyll auf 50 bis 60 Chlorophylle entspricht) etwa der α -Tocopherol-Konzentration in Tabakblättern entspricht (1 Tocopherol auf 40 bis 50 Chlorophylle; Tanaka et al., 1999). Es ist unklar, ob die zusätzlichen Pigmente des Xanthophyll-Zyklus in den Mutanten 6 und 10 frei oder an Proteine gebunden in der Thylakoidmembran vorliegen. Man würde erwarten, dass, um die Funktion des α -Tocopherols zu übernehmen, der zusätzliche Anteil des Xanthophyll-Zyklus, zumindest im deepoxidierten Zustand, nur lose oder gar nicht mit den Antennenproteinen assoziiert ist. Król et al. (1995) und Härtel et al. (1996) führen eine deutlich verstärkte Deepoxidation in Chl b-Mangelmutanten infolge fehlender CAB-Proteine auf einen ungebundenen Xanthophyll-Zykluspool zurück. Der relative Anstieg der Xanthophyll-Menge in der PSI- und der Lhcb5/6-Fraktion der IEF (Tabelle 6) belegt indes, dass diese Annahme scheinbar nicht bestand hat. Dagegen spricht auch ein vergleichbarer bzw. nur geringfügig erhöhter Deepoxidationszustand in den *CHL P*-Antisense-Linien 6 und 10 (Abbildung 18). Es ist möglich, dass, in Analogie zu *intermittent light*-Pflanzen (Król et al., 1995), ein Teil der Xanthophylle mit ELIPs (vgl. 1.2.2) assoziiert ist. Die Synthese der ELIPs, denen eine bedeutende Schutzfunktion bei photooxidativem Stress zugeordnet wird (Hutin et al., 2003), wird durch Lichtstress induziert (Adamska und Kloppstech, 1994). Um diese Frage abschließend zu klären, sind weitere, quantitative Analysen notwendig, um den Anteil an Protein-assoziierten und freien Xanthophyllen, vor allem im deepoxidierten Zustand, zu bestimmen.

4.1.4 *CHL P*-Antisense-Pflanzen sind für photooxidativen Stress verstärkt anfällig

Anhand der *CHL P*-Antisense-Pflanzen konnte über Fluoreszenzmessungen zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die Reduktion des α -Tocopherol-Gehaltes unter *in vivo* Bedingungen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber photooxidativem Stress führt.

Diese Empfindlichkeit der α -Tocopherol-defizienten Pflanzen wurde besonders deutlich anhand der starken Reduzierung der PS II-Aktivität während einer nur einstündigen Starklichtexposition (Abbildung 17). Diese Sensitivität ist nicht auf die beobachtete geringere Δ pH-regulierte Energiedissipation in den Linien 6 und 10 zurückzuführen (vgl. Abbildung 16), da eine Analyse der Kinetik des qE-Mechanismus während der ersten 5 min der Exposition zeigte, dass der zugrunde liegende Mechanismus in Dynamik und Umfang nicht verändert war (Daten nicht gezeigt). Mit zunehmender Belichtungszeit bilden sich jedoch in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen vermehrt inaktivierte PS II-RZ aus, die als Energielöcher fungieren und die Anregungsenergie thermisch dissipieren (vgl. 1.3.4.3). Dies wird an dem er-

höhten qI und der gleichzeitig verminderten Wärmedissipation durch die Antennen (qE) deutlich (Abbildung 16).

Das Fluoreszenzsignal zeigte in allen Genotypen nach Beendigung der Starklichtexposition in der anschließenden Schwachlichtphase eine schon aus früheren Studien bekannte zweiphasige Erholungskinetik (Abbildung 17; Leitsch et al., 1994; Jahns und Miehe, 1996). Die schnelle Phase war nach 30 min abgeschlossen und korrelierte mit der Epoxidation des vorher gebildeten Zx (Abbildung 18). Die langsame Erholungsphase wird dem *D1-turnover* zugeschrieben (vgl. 1.3.4.3). Aufgrund der geringen PS II-Aktivität in den Linien 6 und 10 nach Beendigung der Schwachlichtphase (Abbildung 17) muss auf eine vermehrte Schädigung des D1-Proteins infolge des α -Tocopherols-Defizits geschlossen werden. Diese Hypothese wurde durch die Ermittlung des Starklicht-induzierten D1-Abbaus in Gegenwart von Streptomycin (Abbildung 20B) bestätigt. So konnten in der Linie 6 nach 8 h Starklichtexposition im Vergleich zum Wildtyp in einer Immunoblot-Analyse nur noch Spuren des D1-Proteins detektiert werden (Abbildung 20B). In der Tat stellt das D1-Protein im PS II-RZ das Hauptziel für Schädigungen durch Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich dar (Zhang und Aro, 2002). Trebst et al. (2002) konnten erstmals eine direkte Korrelation zwischen α -Tocopherol-Gehalt und D1-Schädigung in *C. reinhardtii* dokumentieren und daraus eine spezifische Schutzfunktion des α -Tocopherols für das D1-Protein gegenüber $^1O_2^*$ ableiten (Trebst, 2003).

In Übereinstimmung mit früheren Studien von Schnettger et al. (1992) und Jahns et al. (2000) wurde in Abwesenheit des Inhibitors nur ein geringer Netto-D1-Abau in beiden getesteten Genotypen verzeichnet. Da die photooxidative Zerstörung des Lhcb2 mit mehreren Stunden wesentlich langsamer verläuft als beim D1-Protein (Zolla und Rinalducci, 2002), weisen die während der Starklichtexposition konstanten Lhcb2-Proteinmengen darauf hin (Abbildung 20B), dass die PS II-Komplexe auch nach Verlust des D1-Proteins nicht abgebaut werden. Dies steht im Einklang mit der Idee, dass D1-freie PS II-Komplexe als Akzeptor für neusynthetisierte D1-Proteine fungieren (van Wijk et al., 1997).

Kritisch betrachtet könnte der beschleunigte D1-Abbau in den *CHL P*-Antisense-Linien auch auf einer labileren Assoziation des Chl_{GG} beruhen (vgl. 4.1.1), da zumindest für neusynthetisierte D1-Proteine Chlorophylle und Carotinoide zur Stabilisierung notwendig sind (Zhang und Aro, 2002). In Übereinstimmung mit Sgherri et al. (1999) und Zhang et al. (2003) zeigte das ESR-Spektrum ein Mischsignal aus DEPMPO-OH und DEPMPO-OOH (Abbildung 19), was die Licht-induzierte Bildung von $\bullet O_2^-$ und $\bullet OH$ in den Thylakoiden der beiden Genotypen dokumentiert. Das ESR-Signal der Linie 6 war bei gleicher Belichtungsdauer (und identischen Chl-Mengen) stets zwei- bis dreimal so groß wie beim Wildtyp, was eine entsprechend

größere Akkumulation von ROS in der α -Tocopherol-defizienten Linie 6 aufgrund der gegebenen der Proportionalität zwischen ESR-Signalgröße und Radikalmenge widerspiegelt. Da die Bildung des $\bullet\text{OH}$ auch über ein Nicht-Häm- Fe^{2+} -gebundenes Peroxid im PS II-RZ erfolgt (vgl. Pospišil et al., 2004), kann in Einklang mit Pospišil et al. (2004) die vermehrte $\bullet\text{OH}$ -Akkumulation für die verstärkte photooxidative Schädigung des D1-Proteins in den Mutanten verantwortlich gemacht werden. $\bullet\text{OH}$ und $^1\text{O}_2^*$ verursachen zudem Peroxylradikalkettenreaktionen in Lipidmembranen (Baroli und Niyogi, 2000). Tatsächlich konnte Havaux et al. (2003) eine deutlich vermehrte Lipidperoxidation in den *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen nachweisen, und daraus eine lineare Korrelation zwischen α -Tocopherol-Gehalt und Lipidperoxidation ableiten. Somit beruht die erhöhte Sensitivität der *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen gegenüber photooxidativem Stress auf einer verstärkten irreparablen Schädigung von Zellkomponenten durch eine infolge des α -Tocopherol-Defizits vermehrte Bildung von ROS.

Die hier präsentierten Daten unterstreichen anschaulich die physiologische Bedeutung des Antioxidans α -Tocopherol für höhere Pflanzen bei photooxidativem Stress. Ein ausgeprägtes α -Tocopherol-Defizit führt bei Starklicht zu einer verstärkten Schädigung von Zellkomponenten, was sich negativ auf die Vitalität der Pflanzen auswirkt. Entsprechende Ergebnisse wurden auch von Trebst et al. (2002), Havaux et al. (2003) und Kanwischer et al. (2005) dokumentiert. Jüngst wurde von Hofius et al. (2004) eine Blockierung des Saccharose-Exports aus Blättern an α -Tocopherol-defizienten *sxd1*-Mutanten beobachtet. Inwieweit ein direkter Zusammenhang zwischen dem Tocopherol-Mangel und der Hemmung des Zucker-Exports besteht, ist jedoch noch unklar (vgl. 4.1.2; Sattler et al., 2003; Hofius et al., 2004).

Verschiedene Autoren sehen in der Assoziation von Chl_{GG} mit den pigmentbindenden Proteinen die Ursache für die verstärkte Sensitivität der *CHL P*-Antisense-Pflanzen gegenüber Lichtstress (Porfirova et al., 2002; Shibata et al., 2004). Die hier durchgeführten Experimente haben hierfür keinen Anhaltspunkt geliefert. Ein Argument gegen diese These stellt die von Havaux et al. (2003) dokumentierte erhöhte Sensitivität der *CHL P*-Antisense-Tabakpflanzen gegenüber Eosin dar, einem Erzeuger von $^1\text{O}_2^*$ bei Lichteinwirkung. Während bei Schwachlicht in Abwesenheit von Eosin kein Unterschied in der Lipidperoxidation zwischen der *CHL P*-defizienten Linie 6 und dem Wildtyp detektiert werden konnte, so war diese in Gegenwart von Eosin in der transgenen Linie 6 deutlich erhöht (Havaux et al., 2003).

In anderen Studien wird dem α -Tocopherol jedoch nur eine geringe physiologische Bedeutung zugeordnet, da photooxidativer Stress in α -Tocopherol-defizienten Mutanten kaum einen Effekt auf die Vitalität der *A. thaliana*-Pflanzen auslösen konnte (Collakova und DellaPenna,

2001; Porfirova et al., 2002; Bergmüller et al., 2003). Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem Befund dieser Studie und den Ergebnissen von Porfirova et al. (2002) und Bergmüller et al. (2003) liefern die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zur Bestimmung der Lichtstress-induzierten Schädigung. So wurde in dieser Arbeit für die Erzeugung von photooxidativem Stress eine wesentlich höhere Lichtintensität ($2000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) verwendet. Die bei Porfirova et al. (2002) und Bergmüller et al. (2003) angewandte PFD von $1000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ist hingegen nicht ausreichend, um eine irreversible Photoinhibition des PS II in *A. thaliana*-Pflanzen zu erzeugen (vgl. Graßes et al., 2002). Noch entscheidender ist jedoch, dass in der vorliegenden Arbeit die kurzfristigen Auswirkungen, im Bereich von Minuten bis wenigen Stunden, von photooxidativem Stress auf α -Tocopherol-Mangelmutanten untersucht wurde, während in den Studien von Porfirova et al. (2002) und Bergmüller et al. (2003) erst nach einer fünftägigen Starklichtexposition (Licht-*shift*-Experiment) die Pflanzen auf mögliche Effekte analysiert wurden. Diese Vorgehensweise ist für die Untersuchung der physiologischen Bedeutung des α -Tocopherols äußerst problematisch. Sie gibt den Pflanzen ausreichend Zeit an die höheren Lichtintensitäten zu adaptieren, womit diese gegebenenfalls durch die Hochregulation von anderen Schutzkomponenten die Auswirkungen des α -Tocopherol-Mangels ganz oder teilweise kompensieren können. So war z.B. der F_V/F_M -Quotient in Ascorbat-defizienten *A. thaliana*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nach 24 h Starklicht um 20% reduziert, während nach 96 h Starklichtexposition kein Unterschied mehr zwischen den beiden Genotypen detektiert werden konnte (Müller-Moulé et al., 2003). Aufgrund der unvollständigen bzw. fehlenden Untersuchung wichtiger Parameter für photooxidativen Stress, wie D1-Abbau und Malondialdehyd-Bildung in vielen Studien (Collakova und DellaPenna, 2001; 2003; Porfirova et al., 2002; Bergmüller et al., 2003), kann eine Bewertung der physiologischen Bedeutung des α -Tocopherols als Schutzfaktor unter diesen Bedingungen nur unter Vorbehalt erfolgen.

Eine einfache Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass *A. thaliana* als „Unkraut“ bei α -Tocopherol-Mangel generell eine höhere Stresstoleranz gegenüber Starklicht aufweist (vgl. dazu Hofius et al., 2004) als z.B. *N. tabacum*. Um die bestehende Diskrepanz zwischen den Resultaten der verschiedenen Studien auszuräumen, sollten in Zukunft *vte1*- und *sxd1*-Mutanten aus *A. thaliana* unter Berücksichtigung des D1-Abbaus und der Lipidperoxidation auf die kurzfristigen Auswirkungen von photooxidativem Stress hin untersucht werden. Eine entsprechende Charakterisierung von CHL P-defizienten *A. thaliana*-Pflanzen wäre ebenfalls wünschenswert, um die an den CHL P-Antisense-Tabakpflanzen gewonnen Erkenntnisse zu vertiefen.

4.2 Die physiologische Bedeutung der Δ pH-abhängigen Energielöschung und die Relevanz des CP29 für diesen Mechanismus

Die präventive Reduktion der Neubildung von ROS stellt ein weiteres grundlegendes Schutzprinzip gegen photooxidative Schädigung der Thylakoidmembran dar. Für diesen Prozess spielt die Δ pH-regulierte thermische Energiedissipation in der PS II-Antenne eine entscheidende Rolle. Die generelle physiologische Bedeutung des qE-Mechanismus für die Vitalität von Pflanzen bei Lichtstress wurde anhand eines Modellsystems aus *A. thaliana* untersucht, das aufgrund des Verlustes des PsbS-Proteins in Folge einer Mutation im *psbS*-Lokus keine Δ pH-regulierte Energielöschung ausbildet (3.2). In einer weiterführenden Studie stand die Relevanz des minoren Antennenproteins CP29 für den zugrunde liegenden Mechanismus der Δ pH-abhängigen Energiedissipation im Mittelpunkt des Interesses (3.3).

4.2.1 Die Reduzierung des NPQ aufgrund der Mutation im *psbS*-Lokus

Die Exzision des transposablen *EN-1*-Elementes in den *psbs-1.3*-Mutanten hinterließ einen (+2)-Rasterschub im ORF des *psbS*-Gens (Abbildung 21A). Dies führte zu einem vollständigen Ausfall der Genfunktion, so dass mittels Immunoblot-Analyse weder in Proteingestamextrakten (Abbildung 21B) noch in Thylakoiden (Graßes et al., 2002) das PsbS-Protein detektiert werden konnte. Durch den Verlust des PsbS wurde die qE-Komponente der nicht-photochemischen Löschung in der Mutante auf etwa 10% des Wildtypniveaus reduziert (Abbildung 24B, E), und auch die mit qE verknüpfte, charakteristische Absorptionsänderung bei 535 nm (vgl. 1.3.4.2) ging verloren (Daten nicht gezeigt). Ein geringerer Δ pH, der für das reduzierte NPQ in *pgr1*-Mutanten aus *A. thaliana* verantwortlich ist (Graßes und Jahns, unveröffentlichte Daten; Munekage et al., 2001), kann als Ursache für das geringfügige NPQ in der *psbs-1.3*-Mutante ausgeschlossen werden. Dies wird deutlich anhand der mit dem Wildtyp vergleichbaren Deepoxidationsraten (Abbildung 25C, D) und eine nahezu identische Quantenausbeute im linearen Proportionalitätsbereich der gemessenen Lichtkurven in beiden Genotypen (vgl. Graßes et al., 2002). Da zudem weder die Integrität des PS II (vgl. 4.2.2) noch die Größe und Aktivität des Xanthophyll-Zyklus in der *psbs-1.3*-Mutante verändert war (Tabelle 7; Abbildung 25C, D), ist der Verlust des qE alleine auf die Einbuße des PsbS-Proteins zurückzuführen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Vielzahl von Studien, in denen verschiedene, unabhängig voneinander isolierte NPQ-Mutanten mit verschiedenartigen Defekten im *psbS*-Lokus charakterisiert wurden und die essentielle Bedeutung des PsbS für die Δ pH-abhängige Energiedissipation herausgestellt haben (Li et al.,

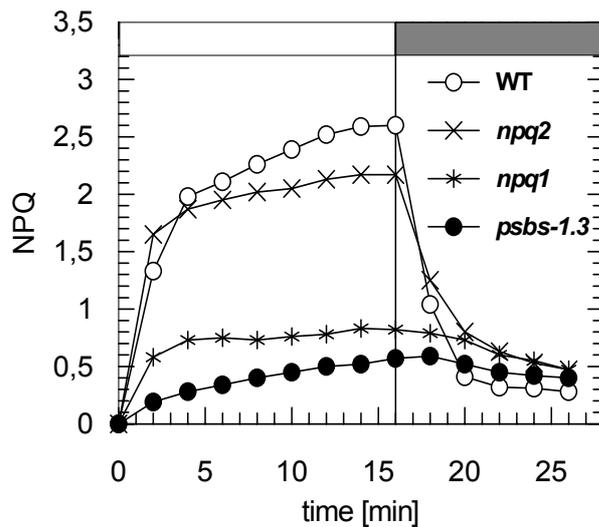


Abbildung 42: Vergleich der Kinetik der Bildung und Relaxation des NPQ in verschiedenen NPQ-defizienten Mutanten und des Wildtyps (WT). Die Fluoreszenzlöschungskoeffizienten wurden gemäß 2.4.1.2 anhand der Fluoreszenzänderung infolge von saturierenden Lichtblitzen zu den jeweiligen Messpunkten während der 16-minütigen Belichtung ($1200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bzw. anschließender 10-minütiger Dunkelfase ermittelt (grauer Balken). Gezeigt wird jeweils ein typisches Einzelexperiment. Die Xanthophyll-Zyklusmutanten *npq1* bzw. *npq2* sind nicht in der Lage Zx bzw. Vx zu synthetisieren (Niyogi et al., 1998; 2001).

2000; 2002a; b; c; Peterson und Havir, 2000; 2001).

Das Ausmaß der NPQ-Reduzierung ist in der *psbs-1.3*-Revertante deutlicher ausgeprägt als in anderen NPQ-defizienten *A. thaliana*-Linien, wie z.B. den Xanthophyll-Zyklusmutanten *npq1* und *npq2* (Abbildung 42). Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein (Pogson et al., 1998; Havaux und Niyogi, 1999; Li et al., 2000). Ein weiteres Charakteristikum der PsbS-defizienten Mutante ist die einphasige, sehr langsame Relaxierung des NPQ im Dunkeln (Abbildung 42; Li et al., 2000; 2002b; c; Dall'Osto et al., 2005). Es wird vermutet, dass das PsbS-Protein als Sensor des luminalen pHs fungiert und dadurch erst die schnelle reversible Induzierung des qE ermöglicht (Niyogi et al., 2005; Horton und Ruban, 2005). Ohne die Unterstützung des PsbS-Proteins basiert der Prozess der Relaxierung des NPQ hingegen alleine auf dem passiven Masseneffekt der Epoxidationsreaktion des Xanthophyll-Zyklus (vgl. Abbildung 7), worin sich qE und qI nicht von einander unterscheiden (Horton und Ruban, 2005).

4.2.2 Die strukturelle Integrität der Elektronentransportkette

Das 22 kDa große PsbS besitzt vier transmembrane Domänen (Kim et al., 1992) und ist wahrscheinlich zwischen dem PS II-RZ und dem peripheren LHC II lokalisiert (Niyogi et al., 2005). Funk et al. (1995) fanden ein PsbS/PS II-RZ-Verhältnis von 2 in *S. oleracea* vor. Infolge eines unveränderten Chl a/b-Verhältnisses und eines vergleichbaren Lut-Gehaltes (bezogen auf die Chl-Gesamtmenge) in der *psbs-1.3*-Mutante gegenüber dem Wildtyp (Tabelle 7), kann eine Veränderung der Antenne im PS II durch den Verlust des PsbS ausgeschlossen werden, was mit Ergebnissen aus anderen Studien übereinstimmt (Li et al.; 2000; 2002c; Peterson und Havir, 2003). Tatsächlich ist die photochemische Effizienz des PS II in beiden Genotypen identisch ($F_V/F_M = 0,82 \pm 0,01$; vgl. Abbildung 25, 26). Eine mögliche

spezifische Dezimierung einzelner Antennenproteine ist aus dem gleichen Grund unwahrscheinlich und wurde aufgrund der 2-D-Gelelektrophorese ausgeschlossen (vgl. 3.2.2). Ein entsprechender Befund wurde ebenfalls von Li et. (2000) und Havaux und Niyogi (1999) für PsbS-defiziente *npq4*-Mutanten dokumentiert.

Die stöchiometrische Korrelation zwischen der PsbS-Menge und der Amplitude des qE (Li et al., 2002c; Niyogi et al., 2005), sowie weitere experimentelle Hinweise (Krause und Jahns, 2004; Holt et al., 2004) sprechen dafür, dass das PsbS als *quenching site* in der PS II-Antenne fungiert. Hierfür muss das PsbS-Protein allerdings bei einem direkten Lösungsmechanismus in eine enge Interaktion mit den benachbarten LHCs treten. Zahlreiche Studien dokumentieren, dass die Entfernung eines Proteins aus dem PS II-Komplex zu einer Destabilisierung von anderen Untereinheiten führt bzw. die makromolekulare Struktur des PS II verändert (vgl. 3.3.2.3; Andersson et al., 2001; 2003; Ruban et al., 2003; Ruf et al., 2000). Somit ist die Erhaltung der Integrität des PS II in den *psbs-1.3*-Mutanten trotz des vollständigen Verlustes der PsbS-Untereinheit(en) erstaunlich. Eine Akkumulation von bis zu 22 PsbS-Proteinen pro D1-Untereinheit, erzeugt durch eine Überexpression des PsbS in *npq4*-Mutanten, hatte keine Veränderung der PS II-Struktur zur Folge (Li et al., 2002c; Niyogi et al., 2005). Eine Erklärung dieses Phänomens wird wohl erst durch eine exakte Lokalisierung des PsbS im PS II-Gesamtkomplex möglich sein. Eine Modifikation der Stöchiometrie der beiden Photosysteme, wie sie in *Lhcb2*-Antisense-Pflanzen beobachtet wurde (Andersson et al., 2003), ist bei der unveränderten Antennengröße infolge des vergleichbaren Chl a/b-Verhältnisses und entsprechenden β -Caro-Mengen (Tabelle 7) in der PsbS-defizienten Linie nicht zu erwarten. Dies wird durch die gefundenen konstanten D1-Mengen in beiden Genotypen bestätigt (Abbildung 21B), und stimmt mit anderen Arbeiten überein (Li et al., 2002b; c).

4.2.3 Die physiologischen Auswirkungen des reduzierten NPQ

Zahlreiche physiologische Studien mit NPQ-defizienten Xanthophyll-Zyklusmutanten weisen dem qE-Mechanismus eine entscheidende photoprotektive Funktion zu (z.B. Niyogi et al., 1998; Verhoeven et al., 2001). Allerdings unterscheiden diese Arbeiten nicht zwischen dem Beitrag des qE-Mechanismus an sich und dem Schutz durch die deepoxidierten Xanthophyll-Moleküle als solche. Dies ist jedoch wichtig, da die Xanthophylle, neben ihrer Beteiligung an qE, auch wichtige lipophile Antioxidantien sind, die $^3\text{Chl}^*$ und $^1\text{O}_2^*$ löschen, Lipidperoxidation inhibieren und Membranen stabilisieren (Havaux, 1998; Havaux und Niyogi, 1999). In der *psbs-1.3*-Mutante wurden hingegen weder die Integrität des PS II noch die Pigmentzusammensetzung der Thylakoidmembran durch den Verlust des PsbS verändert (4.2.1,

4.2.2). Daher stellt sie ein geeigneteres, NPQ-defizientes Modellsystem dar, um die physiologische Bedeutung der Δ pH-regulierten Energiedissipation zu untersuchen.

Der Verlust des PsbS-Proteins in der Mutante hatte bei einer Kultivierung unter Laborbedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp zur Folge (Abbildung 22). Jedoch zeigten die *psbs-1.3*-Mutanten bei der Anzucht unter HL gegenüber dem Wildtyp eine signifikant verzögerte Wachstumskinetik (Abbildung 23B), obwohl beide Genotypen *in vivo* nahezu identische CO₂-Assimilationraten besitzen (vgl. Graßes et al., 2002). Da die Mutanten mit dem Verlust des PsbS einen Teil ihrer Fähigkeit zur thermischen Energiedissipation eingebüßt haben, ist es nahe liegend zu vermuten, dass vermehrter photooxidativer Stress in der Mutante die Ursache für das retardierte Wachstum ist. Tatsächlich wird die PS II-Aktivität in der *psbs-1.3*-Linie im Vergleich zum Wildtyp bei Starklichtexposition wesentlich stärker herabreguliert (Abbildung 25A, B, 26A), was sich auch in einer erhöhten qI-Komponente der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung widerspiegelt (Abbildung 24C). Andere Studien kommen zu einem ähnlichen Ergebnis (Havaux und Kloppstech, 2001; Li et al., 2002c). Somit scheint die Δ pH-regulierte Energiedissipation einen wichtigen Beitrag zum Lichtschutz des PS II zu leisten.

Auffallend ist jedoch, dass die verstärkte Herabregulation der PS II-Aktivität in der *psbs-1.3*-Mutante innerhalb der ersten 2 h der Starklichtbehandlung induziert wird (Abbildung 26A, B). Da auch eine verlängerte Starklichtexposition die Photoinaktivierung des PS II in der Mutante gegenüber dem Wildtyp nicht weiter forcierte (Abbildung 26A), scheint die erhöhte Sensitivität für Lichtstress in der PsbS-defizienten Linie ein zeitlich begrenztes Phänomen zu sein. Entscheidender ist jedoch die Tatsache, dass die vermehrte Photoinhibition des PS II in der *psbs-1.3*-Mutante nicht mit einer größeren photooxidativen Schädigung des D1-Proteins einhergeht (Abbildung 27B). Ein analoger Sachverhalt wurde auch von Peterson und Havir (2001) in *npq4*- und Baroli et al. (2004) in *npq1/lor1*-Mutanten beobachtet. Aufgrund dieses Befundes muss die essentielle Bedeutung der Δ pH-regulierten Energiedissipation als genereller Schutz des PS II vor photooxidativer Zerstörung hinterfragt werden. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die *psbs-1.3*-Mutante während des Wachstums in der Lage ist, ähnlich dem Wildtyp, an hohe Lichtintensitäten zu adaptieren. So führte selbst ein zweiwöchiges Wachstum bei 800 oder 1200 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nicht zu einer Reduktion der PS II-Effizienz in der *psbs-1.3*-Mutante (Daten nicht gezeigt). Havaux und Niyogi (1999) konnten indes dokumentieren, dass ein dreitägiges Wachstum bei 1600 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ weder zu einer erhöhten Inaktivierung der PS II-Effizienz noch zu einer verstärkten Lipidperoxidation in PsbS-defizienten Mutanten führt. *psbs-1.3*-Pflanzen, die im Schwachlicht angezogen wurden, weisen in Übereinstimmung mit Peterson und Havir

(2000) kein signifikant verändertes Wachstum auf (Abbildung 23A). Dies zeigt, dass unter optimalen Kulturbedingungen die Effizienz der Photosynthese durch den Verlust des NPQ nicht eingeschränkt wird. Offensichtlich ist die ΔpH -regulierte Energiedissipation nicht für eine generelle, sondern nur für eine kurzfristige Adaptation an hohe Lichtintensitäten notwendig. In Abwesenheit des qE scheint Starklicht die PS II-Aktivität durch einen Mechanismus herabzuregulieren, der im Gegensatz zur Photoinhibition nicht zu einer Schädigung des D1-Proteins führt, aber trotzdem eine langsame Reversibilität aufweist (vgl. Abbildung 26A). Peterson und Havir (2001; 2003) fanden in PsbS-defizienten Mutanten zwar eine Akkumulation von herabregulierten PS II, aber keinen Hinweis auf eine Inaktivierung durch $^1\text{O}_2^*$. Da der Übergang zwischen qE und qI fließend ist (Öquist et al., 1992; van Wijk und van Hasselt, 1993), könnte der herabregulierte Zustand des PS II in der *psbs-1.3*-Mutante eine frühe Form des qI repräsentieren, die gebildet wird, wenn die Kapazität des qE-Mechanismus erschöpft ist. Somit ist die Reduzierung des F_v/F_M in der Mutante nicht auf eine größere Schädigung, sondern auf eine verstärkte, protektive Energiedissipation zurückzuführen. Dieser intermediäre Zustand des PS II tritt auch im Wildtyp auf, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Eine im Vergleich zur Kontrolle verstärkte Bildung dieses Übergangszustandes des PS II könnte auch das reduzierte Wachstum unter HL-Bedingungen in der Mutante erklären.

Külheim et al. (2002) sehen in der ΔpH -regulierten Energiedissipation eher eine kurzfristige Regulation der Photosynthese als einen Schutzmechanismus gegen Starklicht. Es ist in der Tat vorstellbar, dass bei Lichtbedingungen, die den photosynthetischen Elektronentransport nahezu sättigen, die Funktion des qE-Mechanismus in der Feinabstimmung der Energieverteilung liegt. Ein entsprechendes Modell zur Funktion des qE wird auch von Peterson und Havir (2003) vorgeschlagen. Ohne ein solches *fine tuning* zwischen Lichtsammlung und Energiedissipation würde die Effizienz des Photosyntheseapparates bei den fluktuierenden Lichtbedingungen in der Natur drastisch sinken, entweder aufgrund einer suboptimalen Lichtabsorption oder durch eine schädigende Überanregung (Andersson et al., 2001). In den untersuchten Wildtyp-Pflanzen steigt die Energiedissipation innerhalb eines schmalen Bereiches der Lichtintensität an und erreicht ihre Sättigung bei einer PFD, die nur geringfügig über den Kulturbedingungen während der Anzucht liegt (Abbildung 24). Daraus folgt, dass die Energiedissipation möglicherweise dazu dient, den Elektronendruck auf die Elektronentransportkette besser auszugleichen. Tatsächlich weisen die Pflanzen der *psbs-1.3*-Mutante aufgrund der gestörten Energiedissipation einen größeren Anregungsdruck im PS II bzw. eine verstärkte Reduktion der PS II-Akzeptorseite (geringeres qP) im Vergleich zum Wildtyp auf

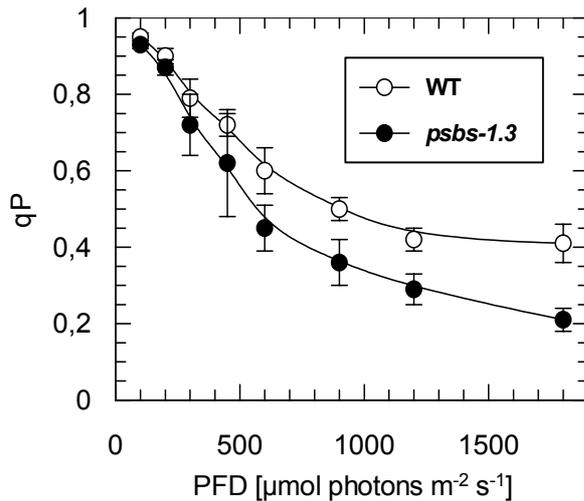


Abbildung 43: Photochemische Löschung (qP) der variablen Chl a-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der PFD des Anregungslichtes in der *psbs-1.3*-Mutante und dem Wildtyp (WT). Die Fluoreszenz wurde an dunkeladaptierten Blattscheiben von *A. thaliana* ermittelt, die unter LL-Bedingungen kultiviert wurden. Die Blattscheiben wurden für 16 min belichtet und das qP anhand der Fluoreszenzänderung aufgrund eines saturierenden Lichtblitzes am Ende der Belichtungsphase des aktinischen Lichtes bestimmt (siehe 2.4.1.2). Gezeigt werden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SD für jede der Linien.

(Abbildung 43). Dieser Befund ist auch in anderen Studien dokumentiert (Peterson und Havar, 2001; 2003; Li et al., 2002c). Die Funktion des qE-Mechanismus würde folglich der des qT (*state transition*; vgl. 1.3.4.1) sehr ähneln, allerdings in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen auf einem höheren PFD-Niveau. Somit gleicht die ΔpH -regulierte Energiedissipation die natürlich auftretenden Fluktuationen der Lichtintensität aus und ermöglicht einen konstanten Elektronentransport und transmembranen ΔpH . Durch die bessere Feinabstimmung der Energieverteilung in der Antenne verringert der qE-Mechanismus gleichzeitig konsequenterweise auch den Druck auf diejenigen photoprotektiven Schutzsysteme, die direkt an der Entfernung bzw. Deaktivierung von ROS beteiligt sind (α -Tocopherol, Carotinoide, Ascorbat, Schutzenzyme). Der Verlust dieser Regulation muss nicht zwingend zu einer dramatisch erhöhten Anfälligkeit gegenüber Photoinhibition führen, er kann aber die optimale Rate der Energienutzung beeinträchtigen. Dies würde erklären, warum die *psbs-1.3*-Mutanten auf der einen Seite keine reduzierte PS II-Aktivität und verminderte Lichtnutzung zeigen (vgl. Graßes et al., 2002), während sie andererseits eine geringere Produktivität der Photosynthese (bezogen auf die Blattfläche) aufweisen (Abbildung 23B). Dies demonstriert eine neue und zugleich physiologisch wichtige Rolle des qE-Mechanismus im Lichtschutz.

4.2.4 Die Herabregulation des CP29 in *N. tabacum*

Obwohl dem PsbS-Protein eine Schlüsselstellung in der Regulation der ΔpH -abhängigen Energiedissipation zukommt (Horton und Ruban, 2005; Niyogi et al., 2005), sind weitere Antennenproteine des PS II für eine vollständige Ausbildung von qE notwendig (Elrad et al., 2002; Govindjee, 2002). Die photosynthetischen LHCs sind daher in der Lage schnell von der Funktion der Lichtsammlung in den Modus der Energiedissipation zu wechseln (Horton et al., 1996). Das CP29 bildet zusammen mit den beiden anderen minoren Antennenproteinen, CP24

und CP26, das Bindeglied zwischen der Kern- und der peripheren Antenne im PS II (vgl. Abbildung 2), und wird aufgrund zahlreicher experimenteller Hinweise als möglicher Ort der Δ pH-regulierten Energielöschung favorisiert (vgl. 1.3.4.2).

Da bisherige Modellsysteme wie *intermittent light*-Pflanzen (Färber und Jahns, 1998) und *chlorina f2*-Mutanten (Preiss und Thornber, 1995) darin versagt haben, einzelne Antennenproteine des PS II gezielt auszuschalten, sollte zunächst eine CP29-defiziente Pflanzenlinie in *N. tabacum* entwickelt werden, um die Relevanz des CP29 für die thermische Energiedissipation untersuchen zu können. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass mittels der Antisense-Technik die mRNA von Antennenproteinen in *A. thaliana* effizient herabreguliert werden kann (Zhang et al., 1997; Andersson et al., 2001; 2003; Ganeteg et al., 2001; 2004). Die Methode ist zudem hinreichend spezifisch, um die anderen Mitglieder der LHC-Multigenfamilie unbehelligt zu lassen (Andersson et al., 2001; 2003; Ganeteg et al., 2001; 2004). Folglich wurde ein *Lhcb4*-cDNA-Volllängenfragment in Antisense-Orientierung in einen binären Vektor kloniert, und durch einen Agrobakterien-vermittelten Gentransfer Blattscheiben aus *N. tabacum* transformiert (3.3.1). Allerdings konnte in keiner der getesteten 58 *Lhcb4*-Antisense-Linien eine ausreichende Verminderung des CP29-Proteingehaltes erzielt werden (Abbildung 28). Die Ursache ist unklar, aber der Befund stimmt mit einer ähnlichen Studie von Flachmann und Kühlbrandt (1995) bzw. Flachmann (1997) überein, die das Lhcb1-Protein-niveau in Tabak mittels Antisense-Technik nicht reduzieren konnten. Die Autoren vermuten einen posttranskriptionellen Effekt als Ursache. Diese These kann aufgrund der verwendeten doppelsträngigen cDNA-Sonde in der Northern-Analyse (Abbildung 28C) nicht überprüft werden (vgl. 3.3.1). Dabei ist interessant, dass auch der Proteingehalt der anderen beiden minoren Antennenproteine CP24 und CP26 durch ein entsprechendes Antisense-Konstrukt in *N. tabacum* nicht unter 50% des Wildtypniveaus reduziert werden konnte (Graßes und Jahns, unveröffentlichte Daten). *N. tabacum* ist ein Artbastard aus *Nicotiana sylvestris* und *Nicotiana tomentosiformis* und besitzt ein amphidiploides Genom. Eine einfache Erklärung ist, dass die Transkriptmenge des *Lhcb4*-Antisense-Konstruktes nicht ausreicht, um das mRNA-Niveau in *N. tabacum* hinreichend zu reduzieren. Zudem ist nicht bekannt, ob das CP29 durch ein einzelnes Gen oder wie in *A. thaliana* (vgl. Abbildung 3A; Jansson, 1999) durch eine Multigenfamilie kodiert wird. Aufgrund der nur geringen Reduktion des CP29-Proteingehaltes durch die Antisense-Technik wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.

4.2.5 Die Auswirkungen der *DsG*-Insertion im *Lhcb4.1*-Lokus in *A. thaliana*

Die experimentelle Strategie wurde dahingehend geändert, eine *A. thaliana* knock-out-Mutante zu charakterisieren, die eine Insertion des transposablen *DsG*-Elements im *Lhcb4.1*-Lokus besitzt (3.3.2). Die Mutante (GT5588) stammt aus der „Martienssen-Kollektion“ verschiedener Insertionslinien am CSH Laboratory (Martienssen, 1998; 2000; Sundaresan et al., 1995; Springer et al., 1995). Die *DsG*-Insertionslinie wurde geselbstet und 24 Pflanzen der Tochtergeneration auf mögliche Veränderungen des CP29-Proteingehalts mittels Immunoblot-Analyse gesichtet. Bei 5 Pflanzen lag der CP29-Proteingehalt in den isolierten Proteingestamtexttrakten unterhalb der Nachweisgrenze, während 11 weitere Linien in Bezug auf die *Lhcb4*-Proteinmenge einen intermediären Phänotyp zeigten. Dies entspricht grob einer Segregation von 1:2:1 nach Mendelschem Muster. Von den 5 CP29-defizienten Pflanzen wurden die *DsG*-Insertionsmutanten 7 und 15 ausgewählt und Pflanzen ihrer Tochtergeneration umfassend charakterisiert. Zunächst wurde mittels einer inversen PCR (vgl. 3.2.2.1) die exakte Insertionsstelle des transposablen *DsG*-Elementes sowie seine Orientierung im *Lhcb4.1*-Lokus bestimmt (Abbildung 30), und die Pflanzen der Linien 7 und 15 durch ein PCR-System mit drei Primern (vgl. 3.2.2.2) in Bezug auf die Disruption des *Lhcb4.1*-Gens auf Homozygotie erfolgreich überprüft (Abbildung 31).

Der Verlust eines Großteils des CP29 (s.u.) in den beiden *DsG*-Insertionslinien hatte bei einer Kultivierung unter Laborbedingungen keinen signifikanten Phänotyp zur Folge (Abbildung 29), was mit der Studie von Andersson et al. (2001) an *Lhcb4*-Antisense-Pflanzen übereinstimmt. Ganeteg et al. (2004) konnten zudem zeigen, dass sich bei einer Kultivierung von CP29-defizienten *A. thaliana*-Pflanzen im Freiland die Einbuße des *Lhcb4* nur unwesentlich auf das Wachstum auswirkt, jedoch eine deutliche Reduzierung der Samenproduktion pro Pflanze zur Folge hat. Dieses Phänomen wurde auch in anderen *A. thaliana*-Linien beobachtet, denen aufgrund der Expression von Antisense-RNA einzelne Antennenproteine fehlten (Ganeteg et al., 2004). Eine Modifikation der Stöchiometrie der beiden Photosysteme, wie sie in *Lhcb2*- bzw. *Lhca4*-Antisense-Pflanzen beobachtet wurde (Andersson et al., 2003; Ganeteg et al., 2004), ist in den beiden *DsG*-Insertionslinien auszuschließen. Dagegen sprechen sowohl die in den Immunoblot-Analysen gegenüber dem Wildtyp vorgefundenen konstanten Proteinmengen der verschiedenen LHCs (Ausnahme CP24 und CP29; vgl. Abbildung 32A), als auch der unveränderte β -Caro-Gehalt in allen drei Genotypen (Tabelle 9). Allerdings wurde die Integrität des PS II in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 durch den Verlust des CP29 massiv in Mitleidenschaft gezogen (4.2.6).

Die Reduzierung des CP29-Proteingehaltes in den beiden Mutanten auf 10 bis 15% des Wildtypniveaus in intakten Thylakoiden (Abbildung 33) bzw. unterhalb der Nachweisgrenze in den isolierten Proteingestextrakten (Abbildung 32A) ist überaus bemerkenswert. Sie wurde in diesem Ausmaß nicht erwartet, da das CP29 durch drei homologe Gene kodiert wird (Abbildung 3A; Jansson, 1999; Andersson et al., 2001). Die ESTs der Gene *Lhcb4.1* und *Lhcb4.2* besitzen eine hohe Frequenz, während der *Lhcb4.3*-Lokus nur ein geringes Expressionsniveau aufweist (Jansson, 1999). Heterozygote Pflanzen der F1-Generation zeigten indes einen deutlichen Dosisseffekt des *Lhcb4.1*-Wildtypallels, da sie 60% der CP29-Proteinmenge der Kontrollpflanzen akkumulieren (Abbildung 41A). Somit handelt es sich bei der Disruption des *Lhcb4.1*-Lokus um eine semidominante Mutation. Offensichtlich führte die Expression des *Lhcb4.2*-Gens nicht zu einer adäquaten Akkumulation des CP29 in den *DsG*-Insertionslinien. Tatsächlich konnte in den Northern-Analysen eine deutliche Reduzierung der *Lhcb4.2*-Transkriptmenge in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 32B). Aufgrund seiner Reproduzierbarkeit scheint es sich hierbei um einen spezifischen Effekt zu handeln, dessen Ursache jedoch unklar ist. Wie erwartet, konnte infolge der Disruption des *Lhcb4.1*-Gens durch die Insertion des *DsG*-Elements in der Northern-Analyse keine *Lhcb4.1*-mRNA detektiert werden. Dieser Verlust ist zusammen mit der Verminderung der *Lhcb4.2*-Transkriptmenge für die ungewöhnlich geringe Abundanz des CP29 in den Linien 7 und 15 verantwortlich.

In Übereinstimmung mit Andersson et al. (2001) wurden in allen drei Genotypen nur Spuren der *Lhcb4.3*-mRNA nachgewiesen. Über die Bedeutung des *Lhcb4.3*-Gens, das ein kleineres Protein kodiert, war lange nichts bekannt (Jansson, 1999; Andersson et al., 2001). Seine Expression scheint jedoch durch Starklicht induziert zu werden, da Golan et al. einen drastischen Anstieg der *Lhcb4.3*-Transkriptmenge in *A. thaliana*-Wildtyp-Pflanzen detektieren konnten, die für mindestens 4 h bei einer PFD von $1500 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ exponiert wurden (Dr. T. Golan, Berkeley, Kalifornien USA, persönliche Mitteilung). Diese Induzierbarkeit durch Starklicht ist gegenwärtig einzigartig unter den CAB-Proteinen. Möglicherweise stellt das *Lhcb4.3*, wie das LHCF aus *Diatomaeen* (vgl. Horton und Ruban, 2005), einen funktionellen Übergang zwischen den rein photoprotektiv wirksamen HLIPs (1.2.2) auf der einen Seite, und dem LHC II mit seiner Lichtsammelfunktion auf der anderen Seite dar.

4.2.6 Der Verlust der strukturellen und funktionellen Integrität des PS II

Der Verlust der *Lhcb4.1*-Genfunktion hatte in den CP29-defizienten Linien einen pleiotropen Effekt auf die Antennenstruktur des PS II zur Folge. Neben der erwarteten Einbuße des *Lhcb4*

war auch die Proteinmenge des CP24 signifikant reduziert (Abbildung 32A). Da die Häufigkeit der *Lhcb6*-Transkriptmenge in den *DsG*-Insertionslinien im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert war, muss der partielle Verlust des CP24 auf einen posttranskriptionellen Effekt beruhen. Ganeteg et al. (2001) konnten für die Antennenproteine Lhca2 und Lhca3 eine wechselseitige Abhängigkeit ihrer Stabilität dokumentieren. Durch biochemische Untersuchungen wurde schon früh ein unmittelbarer physikalischer Kontakt zwischen CP29 und CP24 aufgezeigt (Bassi und Dainese, 1992; vgl. auch Abbildung 2). Somit ist die partielle Reduzierung der CP24-Proteinmenge auf den Verlust des CP29 zurückzuführen, das offenbar wesentlich zur stabilen Assemblierung des *Lhcb6* beiträgt. Einen analogen Sachverhalt fanden auch Andersson et al. (2001) in *Lhcb4*-Antisense-Pflanzen. Sie berichteten ferner, dass auch die Stabilität des CP29 von der Präsenz des CP24 beeinflusst wird (Andersson et al., 2001). Die Stabilität des dritten minoren Antennenproteins, CP26, hängt indes von dem Assemblierungsfaktor *ycf9* ab (Ruf et al. (2000)), während sein eigener Verlust nicht die Beständigkeit anderer CAB-Proteine in der PS II-Antenne manipuliert (Andersson et al., 2001).

Die Bedeutung des CP29 geht jedoch über die Konsolidierung des CP24 hinaus. Es trägt auch erheblich zur Stabilität der makromolekularen Struktur des PS II bei. So waren Yakushevskaja et al. (2003) nicht in der Lage, aus *Lhcb4*-Antisense-Pflanzen PS II-Superkomplexe des C₂S₂M₂-Typs (C₂: 2 *core*-Komplexe; S₂: 2 *strongly bound*-LHC II; M₂: *moderately bound*-LHC II) zu isolieren, welcher die vorherrschende Form des PS II in Thylakoidmembranen in *A. thaliana* darstellt (Yakushevskaja et al., 2001). Die Autoren sehen in dem Verlust des CP29 die Ursache für die geringere Stabilität des PS II (Yakushevskaja et al., 2003). Die Aufrechterhaltung der makromolekularen Organisation der Thylakoidmembran ist für die Photosynthese offenbar von großer Bedeutung. Dies erklärt, warum sich in LHC II-defizienten *A. thaliana*-Pflanzen Trimere aus dem minoren Antennenprotein CP26 ausbilden (Andersson et al., 2003; Ruban et al., 2003).

Mit dem partiellen Ausfall eines Großteils der minoren Antennenproteine in den beiden *DsG*-Insertionslinien wurde die Pigmentzusammensetzung der Thylakoidmembran verändert. So ist in den Linien 7 und 15 das Chl a/b-Verhältnis und die Größe des Xanthophyll-Zyklus pools geringfügig, aber signifikant, im Vergleich zum Wildtyp reduziert (Tabelle 9). Dies war zu erwarten, da das *Lhcb4* nicht nur bedeutende Mengen an Carotinoiden bindet, sondern auch von allen LHCs des PS II das höchste Chl a/b-Verhältnis aufweist (Morosinotto et al., 2003). Dies steht im Einklang mit der Studie von Andersson et al. (2001). Allerdings ist die Verminderung der Menge der Xanthophyll-Zykluspigmente um 14% nicht für die Reduzierung des NPQ in den beiden CP29-defizienten Linien 7 und 15 verantwortlich (vgl. 4.2.7). Be-

rücksichtigt man das um 10% erhöhte maximale DEPS-Niveau in den LL-Pflanzen (Abbildung 39B), so wird in den Mutanten etwa die gleiche Menge an Zx gebildet wie in der Kontrolle. Anhand der Pigmentkomposition manifestiert sich auch der Dosiseffekt des *Lhcb4.1*-Gens. So weist die heterozygote F1-Generation durch das Einbringen des Wildtypallels im Bezug auf die Pigmentierung einen intermediären Charakter auf (Tabelle 10).

Eine der für die Minoren CP24 und CP29 vorgeschlagenen Funktionen ist die Organisation der *bulk*-Antenne des PS II, bestehend aus LHC II-Trimeren (vgl. 1.2.1; Andersson et al., 2001). Wahrscheinlich stellt das CP29 zusammen mit dem CP24 die entscheidende Bindestelle des distalen LHC II dar (Mäenpää und Andersson, 1989). Durch die Einbuße des *Lhcb4* und eines Teils des *Lhcb6* in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 sind die peripheren LHCs möglicherweise nur noch locker mit dem PS II assoziiert, und es kommt im Zuge des *state transition* (vgl. 1.4.3.1) in den Mutanten zu einer verstärkten Ablösung der phosphorylierten LHC II-Trimere vom PS II. Diese mobilen LHCs binden an das PS I, wo sie als zusätzliche Antenne fungieren können. Dies würde den beobachteten, signifikant erhöhten Anteil an oxidiertem P700 in den CP29-defizienten Linien gegenüber dem Wildtyp bei niedrigen Lichtintensitäten erklären (Abbildung 35). Diese These wird auch durch den gegenüber dem Wildtyp erhöhten DEPS in den Mutanten unterstützt (vgl. Abbildung 39B). Es ist bekannt, dass mit der Ablösung des phosphorylierten LHC II vom PS II im Zuge der *state transition* eine Auflockerung der Granastruktur einhergeht (Allen, 1992). Färber und Jahns (1998) konnten in einer *in vitro* Studie zeigen, dass in entstapelten gegenüber gestapelten Thylakoidmembranen mehr Zx gebildet wird. Die Ursache wird in einer verbesserten Zugänglichkeit der Xanthophylle für die VDE im Bereich der aufgelockerten Granastruktur gesehen (Färber und Jahns, 1998). Somit kommt es infolge des Verlustes des CP29 in den Linien 7 und 15 im Zuge des *state transition* zu einer überproportionalen Assemblierung von phosphorylierten LHC II-Trimeren mit der PS I-Antenne, was sowohl für das erhöhte maximale Niveau des DEPS (unter LL-Bedingungen), als auch für den größeren Anteil an oxidiertem P700 verantwortlich ist.

Dabei ist interessant, dass die HL-Pflanzen der *DsG*-Insertionslinien zwar einen erhöhten Anteil an oxidiertem P700 aufweisen, jedoch keine verstärkte Deepoxidation zeigen (vgl. 3.2.2.6). Letzteres steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die distale Antenne unter HL-Kultivierungsbedingungen weitgehend fehlt (Walters und Horton, 1999). Offenbar ist die distale Antenne in den HL-Pflanzen so verringert, dass die Ablösung der LHC II-Trimere keine spürbare Auflockerung der Grana bewirkt. Der erhöhte Anteil an oxidiertem P700 in

den Mutanten ist wahrscheinlich auf die Ablösung der *strongly*- und *moderately*-gebundenen LHC II-Trimere zurückzuführen.

Der Verlust eines Großteils der minoren Antennenproteine hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Elektronentransportraten unter sättigenden Lichtbedingungen (Tabelle 8) und auf das Wachstum (4.2.5) der *DsG*-Insertionslinien. Obwohl dies verdeutlicht, dass die Funktion des PS II keiner größeren Störung unterliegt, konnte eine Veränderung der funktionellen Integrität des PS II identifiziert werden: So war die photochemische Effizienz des PS II unabhängig von den Kultivierungsbedingungen in den transgenen Linien 7 und 15 gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert (Abbildung 36). Andersson et al. (2001) fanden einen entsprechenden Effekt in *Lhcb4*-Antisense-Pflanzen, und führen die Verminderung des F_v/F_M -Verhältnisses auf ein geringeres F_M zurück. Dies trifft mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die *DsG*-Insertionslinien zu. Allerdings hat dies keinen Einfluss auf den Elektronendruck bzw. auf den Reduktionszustand des Q_A im PS II-RZ (Abbildung 34), was mit den Beobachtungen von Andersson et al. (2001) übereinstimmt. Offensichtlich verändert die Entfernung des CP29 die Energieverteilung innerhalb der PS II-Antenne, aber die Pflanzen sind in der Lage, diese Modifizierung durch eine Neuordnung des Photosyntheseapparates zu kompensieren. Dies erklärt zum einen die konstanten Elektronentransportraten *in vitro* (Tabelle 8), aber auch die uneingeschränkte Vitalität der *DsG*-Insertionslinien bei der Anzucht unter standardisierten Laborbedingungen (Abbildung 29).

4.2.7 Die Bedeutung des CP29 für die Δ pH-regulierte Energiedissipation

Die Analyse der Kapazität der thermischen Energiedissipation offenbarte eine deutliche Reduzierung des NPQ um 20% in den *DsG*-Insertionslinien 7 und 15 gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 37A, B, 38). Diese Reduzierung ist unter Berücksichtigung der Deepoxidationsexperimente (vgl. 3.3.2.6) auf eine Verminderung des schnell induzierten, Z_x -unabhängigen Anteils der qE-Komponente zurückzuführen (Abbildung 38), und wurde sowohl in den unter LL- als auch in den unter HL-Bedingungen kultivierten Pflanzen beobachtet. Ein geringerer PsbS-Proteingehalt, der für das reduzierte NPQ in *Lhcb2*-Antisense-Pflanzen verantwortlich ist (Andersson et al., 2003), kann als Ursache für das verminderte qE in den transgenen Linien 7 und 15 aufgrund der Immunoblot-Analysen (Abbildung 32A) ausgeschlossen werden. Ein Vergleich mit Z_x -defizienten *npq2*-Mutanten zeigt zudem, dass die Reduzierung des Xanthophyll-Zyklusools in den *DsG*-Insertionslinien nicht ausreicht, um die Verkleinerung des NPQ in den CP29-defizienten Mutanten zu bewirken (vgl. Abbildung 42), zumal die teilweise erhöhten Deepoxidationsraten die geringere Poolgröße in den transgenen Linien ausgleichen

(vgl. 4.2.6). Eine mögliche Erklärung für die Verringerung des qE könnte in der postulierten Funktion des CP29 als Protonenkanal liegen (Walters et al., 1996). Da die schnell induzierte Komponente des NPQ direkt von der Ausbildung des Δ pH abhängig ist, könnte der Phänotyp der *DsG*-Insertionslinien eine Veränderung des pH-Gradienten in den Pflanzen reflektieren. Die gemessenen Deepoxidationsraten widersprechen jedoch dieser Hypothese (Abbildung 39B). Somit ist die Verringerung des NPQ in den *DsG*-Insertionslinien alleine auf den Verlust des CP29 und eines Teils des CP24 bzw. auf die dadurch induzierte Neuordnung der PS II-Antenne zurückzuführen. Dieser Befund steht im Einklang mit der Studie von Andersson et al. (2001) an *Lhcb4*-Antisense-Pflanzen.

Allerdings sind die Linien 7 und 15 im Vergleich zu anderen NPQ-defizienten *A. thaliana*-Mutanten in der Lage, ein signifikantes Niveau an nicht-photochemischer Fluoreszenzlöschung aufzubauen. So ist das NPQ der CP29-defizienten Linien bei entsprechender Lichtintensität etwa drei- bis viermal so groß wie das maximale NPQ-Niveau in *psbs-1.3*-, *npq4*-, *npq1*- und *npq1/npq4*-Einzel- bzw. Doppelmutanten (vgl. Abbildung 42; Niyogi et al., 1998; Pogson et al., 1998; Havaux und Niyogi, 1999; Li et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass der reduzierte *Lhcb4*-Proteingehalt, im Gegensatz zum *PsbS*-Protein (Niyogi et al., 2005), nicht für die Bildung des NPQ limitierend ist. Wie dem auch sei, trotz der Reduzierung der Δ pH-regulierten Energiedissipation um etwa 20% scheinen die *DsG*-Insertionslinien über adäquate Lichtschutzmechanismen zu verfügen. Selbst bei einer Kombination mit anderen Stressfaktoren (z.B. Kälte) konnte in keinem der durchgeführten Experimente eine gesteigerte Sensitivität der CP29-defizienten Linien 7 und 15 gegenüber länger anhaltendem photooxidativen Stress im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abbildung 39A, 40). Dies stimmt mit einer Feldstudie von Ganeteg et al. (2004) überein, in der *Lhcb4*-Antisense-Pflanzen unter natürlichen, fluktuierenden Lichtbedingungen keine verstärkte Photoinhibition zeigten. Der bemerkenswerte Umfang des qE in den transgenen Linien deutet daraufhin, dass die Menge des CP29 für die Bildung der Δ pH-abhängigen Energiedissipation nicht kritisch ist. Im Vergleich zu anderen NPQ-defizienten *psbs-1.3*-, *npq4*-, *npq1*- und *npq5*-Mutanten weisen die *DsG*-Insertionslinien eine schnelle Relaxation des qE im Dunkeln auf (vgl. Abbildung 38, 43; Niyogi et al., 1998; Li et al., 2000; Elrad et al., 2002). Die schnelle, Zx-unabhängige Komponente des qE ist zwar in den Linien 7 und 15 reduziert (Abbildung 38), aber der zugrunde liegende Mechanismus wurde offenbar durch den Verlust des CP29 nicht beeinträchtigt. *In vitro* Deepoxidationsstudien an isolierten LHCs dokumentieren zudem, dass das CP29 nur eine geringere Bindungskapazität für Zx besitzt (Morosinotto et al., 2002). Dieser Befund ist jedoch mit der postulierten Funktion des CP29 als *quenching site* bei einem direkten

Löschungsmechanismus durch Z_x (vgl. 1.3.4.2) nicht vereinbar. Somit ist eine direkte Beteiligung des CP29 am qE-Mechanismus eher unwahrscheinlich.

Durch die Einbuße eines Großteils der minoren Antennenproteine bzw. infolge der dadurch induzierten Neuordnung der verbliebenen LHCs, wird die Energieverteilung innerhalb der PS II-Antenne massiv verändert, was sich an der verminderten photochemischen Effizienz des PS II manifestiert (vgl. 4.2.6). Da die nicht-photochemische Löschung von der Größe des F_M abhängig ist (Andersson et al., 2003), ist die Reduzierung des NPQ in den *DsG*-Insertionslinien wahrscheinlich auf das geringere F_V/F_M zurückzuführen. Der beobachtete Dosiseffekt durch das eingekreuzte Wildtypallel auf die ΔpH -regulierte Energiedissipation in der F1-Generation ist daher von indirekter Art (Abbildung 41B), da mit zunehmender CP29-Proteinmenge auch vermehrt PS II-Komplexe mit voll funktionsfähiger Antenne ausgebildet werden können.

Man kann argumentieren, dass bereits eines der minoren Antennenproteine alleine ausreicht, um die Ausbildung des NPQ bewirken. Folglich könnte man einen deutlichen Effekt auf das NPQ erst bei einem Verlust von CP29 und CP26 erzielen. Diese Hypothese ist unwahrscheinlich, da das Niveau der nicht-photochemischen Löschung mit der Akkumulation des CP26 in *Lhcb2*-Antisense-Pflanzen nicht korrelierte (Andersson et al., 2003). Im Gegenteil, der leichte Verlust der PsbS-Proteinmenge ist auch in den *Lhcb2*-Antisense-Linien für das geringere NPQ verantwortlich (Andersson et al., 2003). Offensichtlich liegt die Funktion des CP29 in der Koordination und Stabilisierung der peripheren PS II-Antenne, und nicht in einer dominierenden Rolle im NPQ. Die hier präsentierten Daten stimmen mit der Hypothese überein, dass das PsbS-Protein die *quenching site* für die ΔpH -regulierte Energiedissipation in der PS II-Antenne darstellt (Li et al., 2000; Niyogi et al., 2005). Demnach wäre die Reduzierung des qE in den *DsG*-Insertionslinien auf eine geringere Effizienz der Löschung infolge einer schlechteren physikalischen Interaktion zwischen den LHCs zurückzuführen. Die Ergebnisse stehen aber auch im Einklang mit dem Modell von Horton und Ruban (2005), wonach das NPQ in allen Antennenproteinen erfolgt, inklusive der *core*-Antenne. Die Z_x -induzierte Löschung ist jedoch in den einzelnen LHCs gering (Wentworth et al., 2000), und wird erst durch die Interaktion der verschiedenen Untereinheiten vervielfacht (Ruban und Horton, 1992). Somit läge die Ursache für das verminderte qE in den *DsG*-Insertionslinien in einer geringeren Anzahl an *quenching sites*.

Da die LHCs in allen Pflanzenspezies ubiquitär vorhanden und hoch konserviert sind, bringt ihr Erhalt den Pflanzen offensichtlich einen evolutionären Vorteil. Daraus muss man schließen, dass die verschiedenen LHCs eine nicht-redundante Funktion besitzen. Andernfalls

gäbe es Pflanzenspezies, denen einzelne Antennenprotein fehlen. Wie auch immer, die hier präsentierten Daten dokumentieren anschaulich, dass das CP29 nicht nur für die Stabilität des benachbarten CP24 von Bedeutung ist, sondern es konsolidiert auch die strukturelle und funktionelle Integrität des gesamten PS II-Superkomplexes. Indes konnten kein Hinweis gefunden werden, der die Hypothese einer exklusiven Beteiligung des CP29 an der Δ pH-regulierten Energiedissipation unterstützt. Es scheint, dass die Pflanzen in der Lage sind, den Verlust eines einzelnen Antennenproteins zu kompensieren. Daraus ist zu folgern, dass erst eine voll entwickelte PS II-Antenne den Pflanzen unter natürlichen Lichtbedingungen eine vitale Flexibilität bei der Regulation der Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen verleiht.

4.3 Abschließende Betrachtung

Die Δ pH-regulierte thermische Energiedissipation in der Antenne des PS II und das Antioxidans α -Tocopherol sind zwei der wichtigsten Komponenten zum Schutz der Thylakoidmembran gegen photooxidative Schädigung. Ihre Funktionsweisen sind jedoch gänzlich unterschiedlich. Der qE-Mechanismus wirkt indirekt der Neubildung von ROS präventiv entgegen (vgl. 4.2.3), und ist dem *scavenger*-System der verschiedenen Antioxidantien vorgeschaltet (vgl. Abbildung 5). Das α -Tocopherol ist hingegen in der Lage, bereits gebildete ROS physikalisch oder chemisch als Radikalfänger zu deaktivieren. Eine abschließende Bewertung, welcher der beiden Schutzmechanismen für die Pflanzen eine größere physiologische Bedeutung bei der Bewältigung von Lichtstress hat, ist nur eingeschränkt möglich. Dies liegt zum einen an den unterschiedlichen Pflanzenspezies in den Experimenten, die von sich aus vermutlich eine ungleiche Toleranz gegenüber Lichtstress besitzen. Dagegen spricht allerdings, dass die beiden entsprechenden Wildtypen nach einer einstündigen Starklichtexposition eine nahezu identische Photoinhibition des PS II zeigten (vgl. Abbildung 17, 25A). Zum anderen ist ein Teil der in den α -Tocopherol-defizienten Mutanten beobachteten Effekte auf die Akkumulation des Chl_{GG} zurückzuführen. So beruht das retardierte Wachstum der *CHL P*-Antisense-Pflanzen wahrscheinlich auf einem additiven Effekt aus einer verstärkten photooxidativen Schädigung von Zellkomponenten und einem erhöhten *turnover* der labileren Chl_{GG}-Proteinkomplexe (vgl. 4.1.2). Dennoch kann man aufgrund der durchgeführten Lichtstressexperimente das Fazit ziehen, dass dem α -Tocopherol wohl eine größere Bedeutung als Schutzmechanismus zukommt als der Δ pH-regulierten Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie. So wurde die PS II-Aktivität in den

CHL P-Antisense-Pflanzen bereits nach einer einstündigen Starklichtexposition deutlich stärker inhibiert als in der *psbs-1.3*-Mutante (vgl. Abbildung 17, 25A). Von größerer Relevanz ist jedoch die Tatsache, dass die erhöhte Inaktivierung des PS II in den α -Tocopherol-defizienten Mutanten im Gegensatz zu der *psbs-1.3*-Mutante aus *A. thaliana* mit einem beschleunigten Abbau des D1-Proteins korrelierte. In Analogie konnten Havaux und Niyogi (1999) bzw. Havaux et al. (2003) in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen gegenüber dem Wildtyp eine vermehrte Lipidperoxidation im Vergleich zu NPQ-defizienten *npq4*-Mutanten und der entsprechenden Kontrolle aufzeigen.

Die Ursache für den in verschiedenen Studien beobachteten geringen phänotypischen Effekt des α -Tocopherol-Mangels in *A. thaliana*-Mutanten (Porfirova et al., 2002; Bergmüller et al., 2003) ist in den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zur Bestimmung der Starklicht-induzierten Schädigung (Licht-*shift*-Experiment) zu sehen, und nicht in einer untergeordneten Bedeutung des α -Tocopherols als Schutzfaktor (vgl. 4.1.4). Zu einer entsprechenden Bewertung kommen auch andere Autoren (vgl. Müller-Moulé et al. 2003).

Havaux et al. (2000) konnten zeigen, dass die gemessene höhere Lichtstresstoleranz von jungen Blättern aus *Zx*-defizienten *npq1*-Mutanten nicht auf einer Vergrößerung des qE-Mechanismus basiert, sondern auf der Akkumulation von α -Tocopherol und anderen Antioxidantien. Zu einem entsprechenden Ergebnis kommen auch Munné-Bosch und Algre (2002). Infolge der Alterung wird das *scavenger*-System verstärkt herabreguliert, was in 7 Jahre alten *Cistus chusii*-Pflanzen gegenüber jüngeren Exemplaren zu einer vermehrten photooxidativen Schädigung führt. *npq1*-Mutanten sind in der Lage, den Verlust des NPQ während einer langfristigen Adaptation an HL-Kulturbedingungen zu kompensieren (Havaux und Kloppstech, 2001). Dies ist in Ascorbat-Mangelmutanten aus *A. thaliana* nicht der Fall (*vtc1*-Mutanten; Müller-Moulé et al., 2003). Die Einbuße des Ascorbats induziert einen vollständigen Zusammenbruch des *scavenger*-Systems, wodurch die *vtc1*-Mutanten wesentlich sensitiver auf photooxidativen Stress reagierten als die NPQ-defiziente *npq1*-Linie (Müller-Moulé et al., 2003).

Diese Studien unterstreichen die essentielle Bedeutung des α -Tocopherols und anderer Radikalfänger für Pflanzen bei der Bewältigung von Lichtstress. Die Funktion des qE-Mechanismus liegt indes im Wesentlichen in einer verbesserten Feinabstimmung der Energieverteilung zwischen den Photosystemen, was den Elektronendruck auf die Elektronentransportkette verringert (vgl. 4.2.3). Li et al. (2002c) konnten durch die Überexpression des PsbS-Proteins in *npq4*-Mutanten tatsächlich einen geringeren Anregungsdruck im PS II anhand des qP ermitteln. Bei der langfristigen Anpassung von Pflanzen an höhere

Lichtintensitäten tritt der qE-Mechanismus nicht in Aktion (Kühlheim et al., 2002). Die Adaptation erfolgt vielmehr durch die Akkumulation von α -Tocopherol und anderen Antioxidantien (vgl. Munné-Bosch und Algre, 2000), einer Verkleinerung der Antenne und einer Vergrößerung der Kapazität des Calvin-Zyklus über die Enzymmenge (Kühlheim et al., 2002). Die Δ pH-regulierte Energiedissipation verhilft den Pflanzen vielmehr zu einer besseren Toleranz gegenüber schnell fluktuierenden Lichtbedingungen (vgl. 4.2.2).

Sowohl die Δ pH-regulierte Energiedissipation als auch der Radikalfänger α -Tocopherol agieren jedoch nicht alleine, sondern sind Bestandteile eines großen Netzwerks von Schutzmechanismen gegen photooxidative Schädigung in Pflanzen. Dieses Geflecht verleiht den Pflanzen eine große vitale Flexibilität bei der Bewältigung von Lichtstress, und erlaubt ihnen sich optimal an die jeweils vorherrschenden Lichtbedingungen, unter Berücksichtigung von anderen abiotischen Stressfaktoren, anzupassen. Dieses flexible Netzwerk ermöglicht es den Pflanzen auch, den Ausfall eines einzelnen Schutzfaktors durch die Hochregulation von anderen Komponenten ohne die Ausbildung eines signifikanten Phänotyps zu kompensieren. Dies erklärt auch das oft beobachtete Phänomen, das Doppelmutanten einen kumulativen Effekt gegenüber den Einzelmutanten aufweisen. Es darf jedoch nicht übersehen werden, dass die Kompensation des Verlustes eines oder mehrerer Schutzfaktoren zwar das Überleben des Individuums erlaubt, jedoch gewährleistet erst ein vollständiges Netzwerk an Schutzmechanismen den langfristigen Fortbestand der Art unter natürlichen Lichtverhältnissen, wie der Feldversuch von Kühlheim et al. (2002) anschaulich demonstriert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Übersteigt die Menge der absorbierten Lichtenergie die Kapazität der Photosynthese, so fördert dies die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die den Photosyntheseapparat irreparabel schädigen. Die Δ pH-regulierte Wärmedissipation überschüssiger Anregungsenergie (qE) in der Antenne des Photosystems II (PS II) und das Antioxidans α -Tocopherol sind zwei der wichtigsten Schutzkomponenten in der Thylakoidmembran, um der Neubildung von ROS vorzubeugen bzw. um bereits entstandene unschädlich zu machen. Ihre physiologische Bedeutung zum Schutz der Pflanzen bei photooxidativem Stress wurde an Mutanten mit Defekten in der Tocopherol-Biosynthese (*CHL P*-Antisense-Pflanzen in *Nicotiana tabacum*) bzw. in der thermischen Energiedissipation (PsbS- bzw. CP29-defiziente Mutanten in *Arabidopsis thaliana*) untersucht.

Anhand der *CHL P*-Antisense-Pflanzen konnte über Fluoreszenzmessungen zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass die Reduktion des α -Tocopherol-Gehalts unter *in vivo* Bedingungen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber photooxidativem Stress führt. Dies zeigte sich insbesondere in einer drastisch verstärkten, größtenteils irreversiblen Inaktivierung des PS II, die mit einem beschleunigten Abbau des D1-Proteins einherging. Als Ursache ist die unter *in vitro* Bedingungen beobachtete zwei- bis dreifach höhere Akkumulation von ROS anzusehen. Die vermehrte Schädigung von Zellkomponenten in den *CHL P*-Antisense-Pflanzen unterstreicht die physiologische Bedeutung des α -Tocopherols für die Vitalität der Pflanzen bei photooxidativem Stress. Demgegenüber muss nach den vorliegenden Untersuchungen der Δ pH-regulierten Wärmedissipation eine geringere Schutzfunktion bei langanhaltendem Lichtstress zugeordnet werden. Die PsbS-defizienten Mutanten zeigten zwar auch infolge des Verlustes des qE-Mechanismus eine erhöhte Sensitivität gegenüber Starklicht, die beobachtete verstärkte Inaktivierung des PS II korrelierte allerdings nicht mit einem höheren D1-Abbau. Die Bedeutung der Δ pH-regulierten Energiedissipation ist daher wohl eher in einer optimalen Ausbalancierung der Anregungsenergie zwischen den beiden Photosystemen bei fluktuierenden Lichtbedingungen zu sehen, um so den Druck auf andere Schutzkomponenten, wie Antioxidantien und Schutzenzyme, zu minimieren.

Während die Bedeutung des PsbS-Proteins für die Δ pH-regulierte Energiedissipation unstrittig ist, gab es keinen Hinweis auf essentielle Beteiligung des Antennenproteins CP29 des PS II am qE-Mechanismus. Der Verlust des CP29 reduziert zwar das qE in *A. thaliana*-Mutanten um 25%, wodurch aber weder der zugrunde liegende Mechanismus noch die PS II-Aktivität der Pflanzen bei extremem Lichtstress beeinträchtigt wurden. Die Funktion des CP29 liegt vielmehr in der Konsolidierung der PS II-Antenne, insbesondere des benachbarten CP24, und in der Organisation der distalen LHC II-Trimere.

6 LITERATUR

- Adamska, I., Klopstech, K. (1994): Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions. *J. Biol. Chem.* 269, 30221-30226.
- Allen, J.F. (1992): Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 275-335.
- Allen, J.F., Forsberg, J. (2001): Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6, 317-326.
- Allred, D.R., Staehelin, L.A. (1986): Spatial organization of the cytochrome b_6 -f complex within chloroplast thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 849, 94-103.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Andersson J., Walters, R.G., Horton, P., Jansson, S. (2001): Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell.* 13, 1193-1204.
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R.G., Howard, C.A., Ruban, A.V., Horton, P., Jansson, S. (2003): Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J.* 35, 350-361.
- Apel, K., Klopstech, K. (1980): The effect of light on the biosynthesis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding-protein: evidence for the requirement of chlorophyll a for the stabilization of the apoprotein. *Planta* 150, 426-430.
- Appel, R.D., Bairoch, A., Hochstrasser, D.F (1994): A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASY WWW server. *Trends Biochem. Sci.* 19, 258-260.
- Arnon, D.I. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Aro, E.-M., Virgin, I., Andersson, B. (1993): Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143, 113-134.
- 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.
- Asada, K. (1999): The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601-639.
- Asada, K., Takahashi, M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In *Photoinhibition* (eds. D.J. Kyle, C.B. Osmond, C.J. Arntzen), S. 227-280. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Aspinall-O'Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., Horton, P. (2002): *In vitro* reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16331-16335.
- Azzi, A., Ricciarelli, R., Zingg, J.M. (2002): Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett.* 519, 8-10.

- Barber, J., Andersson, B. (1992): Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17, 61-66.
- Barber, J. (1995): Molecular Basis of Photoinhibition. *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. IV, 159-164. Kluwer Academic Publishers.
- Baroli, I., Niyogi, K.K., (2000): Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plant. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 355, 1385-1394.
- Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T., Niyogi, K.K. (2003): Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell* 15, 992-1008.
- Baroli, I., Gutman, B.L., Ledford, H.K., Shin, J.W., Chin, B. L., Havaux, M., Niyogi, K.K. (2004): Photooxidative stress in a xanthophyll-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 279, 6337-6344.
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D., Sandonà, D. (1999): Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10056-10061.
- Bassi, R., Dainese P. (1992): A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes. *Eur. J. Biochem.* 204, 317-326.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P., Marquardt, J. (1993): Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 212, 297-303.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2003): Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* 426, 630-635.
- Bergantino, E., Segalla, A., Brunetta, A., Teardo, E., Rigoni, F., Giacometti, G.M., Szabo, I. (2003): Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15265-15270.
- Bergmüller, E., Porfirova, S., Dörmann, P. (2003): Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in gamma-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol. Biol.* 52(6), 1181-1190.
- Björkman, O., Demmig, B. (1987): Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vesicular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489-504.
- Björkman, O., Demmig-Adams, B. (1994): Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: *Ecophysiology of photosynthesis* (Schulze, E.-D., Caldwell, M.M., Hrsg.), S. 17-47, Springer-Verlag, Berlin.
- Blankenship, R.E. (2002): *Molecular Mechanisms of photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford.
- Bollivar, D.W., Wang, S.J., Allen, J.P., Bauer, C.E. (1994): Molecular genetic analysis of terminal steps in bacterioChl a biosynthesis: Characterization of a *Rhodobacter capsulatus* strain that synthesizes geranylgeraniol-esterified Bacteriochlorophyll a. *Biochem.* 33, 12763-12768.
- Brugnoli, E., Björkman, O. (1992): Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to Δ pH and zeaxanthin formation. *Photosynth. Res.* 32, 23-35.
- Bungrad, R.A., Ruban, A.V., Hibberd, J.M., Press, M.C., Horton, P., Scholes, J.D. (1999): Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1135-1139.
- Butler, W.L., Kitajima, M. (1975): Fluorescence quenching in photosystem II of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 376, 116-125.

- Cahoon, E.B., Hall, S.E., Ripp, K.G., Ganzkem, T.S., Hitz, W.D., Coughlan, S.J. (2003): Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat. Biotechnol.* 21, 1082-1087.
- Castelletti, S., Morosinotto, T., Robert, B., Caffarri, S., Bassi, R., Croce R. (2003): Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the Photosystem I Antenna System. *Biochem.* 42, 4226-4234.
- Collakova, E., DellaPenna, D. (2001): Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 1113-1124.
- Collakova, E., DellaPenna, D. (2003): The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiol.* 133(2), 930-940.
- Crimi, M., Dorra, C., Böisinger, C.S., Guiffra, E., Holzwarth, A.R., Bassi, R. (2001): Time-resolved fluorescence analysis of the recombinant photosystem II antenna complex CP29. *Eur. J. Biochem.* 268, 260-267.
- Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999b): Carotenoid-binding sites in the major light-harvesting complex (LHCII) of higher plants. *J. Biol. Chem.* 274, 29613-29623.
- Dall'Osto, L., Caffarri, S., Bassi, R. (2005): A Mechanism of Nonphotochemical Energy Dissipation, Independent from PsbS, revealed by conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell.* 17, 1217-1232.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 13, 4777-4788.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (1996): The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Sci.* 1, 21-26.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III (1992): Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 599-626.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M., Adams, W.W. III (1996): *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10, 403-412.
- Diplock, A.T., Lucy, J.A. (1973): Biochemical modes of action of Vitamin E and selenium. A hypothesis. *FEBS Lett.* 29, 205-210.
- Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., Bassi, R. (2002): Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J. Biol. Chem.* 277, 22750-22758.
- Dörmann, P. (2003): Corn with enhanced antioxidant potential. *Nat. Biotechnol.* 21, 1015-1016.
- Egbert, J.B., van Roon, H., Dekker, J.P. (1998): Specific association of photosystem II and light-harvesting complex II in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS Lett.* 424, 95-99.
- Elrad, D., Grossman, A.R. (2004): A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* 45, 61-75.
- Elrad, D., Niyogi, K.K., Grossman, A.R. (2002): A major light-harvesting polypeptide of photosystem II functions in thermal dissipation. *Plant Cell* 14, 1801-1816.
- Engelbrecht, S., Lill, H., Junge, W. (1986): The proton channel, CF0, in thylakoid membranes – Only a low proportion of CF1-lacking CF0 is active with a high unit conductance (169fS). *Eur. J. Biochem.* 16, 635-643.

- Fahrenholtz, S.R., Doleiden, F.J., Trozzolo, A.M., Lamola, A.A. (1974): Quenching of singlet oxygen by α -tocopherol. *Photochem. Photobiol.* 20, 505-509.
- Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., Krupinska, K. (2003): Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Lett.* 540, 35-40.
- Färber, A., Jahns, P. (1998): The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization. *Biochim. Biophys. Acta* 1363, 47-58.
- 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 (The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching). *Plant Physiol.* 115, 1609-1618.
- Flachmann, R. (1997): Composition of photosystem II antenna in light-harvesting complex II antisense tobacco plants at varying irradiances. *Plant Physiol.* 113, 787-794.
- Flachmann, R., Kühlbrandt, W. (1995): Accumulation of plant antenna complexes is regulated by posttranscriptional mechanisms in tobacco. *Plant Cell* 7, 149-160.
- Foyer, C.H., Lelandais, M., Kunert, D.J. (1994): Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92, 696-717.
- Frank, H.A., Brudvig, G.W. (2004): Redox functions of carotenoids in photosynthesis. *Biochem.* 43, 8607-8715.
- Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D., Wasielewski, M.R. (1994): Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 41, 389-395.
- Fryer, M.J. (1992): The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant Cell Environ.* 15, 381-392.
- Fukuzawa, K., Gebicki, J.M. (1983): Oxidation of alpha-tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 242-251.
- Fukuzawa, K., Tokumura, A., Ouchi, S., Tsukatani, H. (1982): Antioxidant activities of tocopherols on Fe^{2+} -ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. *Lipids.* 17, 511-513.
- Funk, C., Schröder, W.P., Napiwotzki, A., Tjus, S.E., Renger, G., Andersson, B. (1995): The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochem.* 34, 11133-11141.
- Ganeteg, U., Külheim, C., Andersson, J., Jansson, S. (2004): Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness? *Plant Physiol.* 134, 502-509.
- Ganeteg, U., Strand, A., Gustafsson, P., Jansson, S. (2001) The properties of the chlorophyll a/b-binding proteins Lhca2 and Lhca3 studied *in vivo* using antisense inhibition. *Plant Physiol.* 127,150-158.
- Garcia, I., Rogers, M., Pepin, R., Hsieh, T.F., Matringe, M. (1999): Characterization and subcellular compartmentation of recombinant 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Arabidopsis* in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 119, 1507-1516.
- Garcia-Plazaola, J.I., Hernández, A., Olano, J.M., Becerril, J.M. (2003): The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. *Funct. Plant Biol.* 30, 319-324.

- Gastadelli, M., Canino, G., Croce, R., Bassi, R. (2003): Xanthophyll binding sites of the CP29 (Lhcb4) subunit of higher plant photosystem II investigated by domain swapping and mutation analysis. *J. Biol. Chem.* 278, 19190-19198.
- Gilmore, A.M. (1997): Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* 99, 197-209.
- Gilmore, A.M., Shinkarev V.P., Hazlett T.L., Govindjee (1998): Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments of chlorophyll a fluorescence lifetime distributions and intensity in thylakoids. *Biochem.* 37, 13582-13593.
- Gilmore, A.M., 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, 137-145.
- Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. (1993): Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.* 35, 67-78.
- Gilmore, A.M., Yamamoto, H.Y. (2001): Time-resolution of the antheraxanthin- and delta pH-dependent chlorophyll a fluorescence components associated with photosystem II energy dissipation in *Mantoniella squamata*. *Photochem. Photobiol.* 74, 291-302.
- Govindjee (2002): A role for a light-harvesting antenna complex of photosystem II in photoprotection. *Plant Cell.* 14(8):1663-1668.
- Graßes, T. (1999): Herstellung und Analyse von transgenen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) mit Defekten in den Pigmentroteinkomplexen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Graßes, T., Grimm, B., Koroleva, O., Jahns, P. (2001): Loss of alpha-tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta.* 213, 620-628.
- Graßes, T., Pesarese, P., Schiavon, F., Varotto, C., Salamini, F., Jahns, P., 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.
- Green, B.R., Kühlbrandt, W. (1995): Sequence conservation of light-harvesting and stress response proteins in relation to the three dimensional molecular structure of LHC II. *Photosyn. Res.* 44, 139-148.
- Green, B.R., Pichersky, E., Kloppstech, K. (1991): Chlorophyll a/b-binding proteins: An extended family. *Trends Biochem. Sci.* 16, 181-186.
- Hager, A. (1969): Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplastenkompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung: Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* 89, 224-243.
- Hager, A. (1975): Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyll-Umwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88, 27-44.
- Hager, A., Holocher, K. (1994): Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin deepoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* 192, 581-589.
- Halliwell, B. (1981): The biological effects of the superoxide radical and its products. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* 17 Suppl., 21-29.

- Halliwell, B. (1991): Oxygen radicals: their formation in plant tissues and their role in herbicide damage. In: Herbicides, Baker, N.R. und Percival, M.P. (Hrsg.), S. 87-129, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Hanahan, D. (1985): Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: DNA-Cloning I, edited by Glover, D.M., Oxford, IRL Press, S. 109-135.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F.R. (1991): Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204, 63-113.
- Härtel, H., Lokstein, H., Grimm, B., Rank, B. (1996): Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. *Plant Physiol.* 110, 471-482.
- Havaux, M. (1998): Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Sci.* 3, 147-150.
- Havaux, M., Bonfils, J.P., Lutz, C., Niyogi, K.K. (2000): Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.* 124, 273-284.
- Havaux, M., Dall'Osto, L., Cuine, S., Giuliano, G., 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.* 279, 13878-13888.
- Havaux, M., Klopstech, K. (2001): The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta.* 213, 953-966.
- Havaux, M., Lütz, C., Grimm, B. (2003): Chloroplast membrane photostability in *chlP* transgenic tobacco plants deficient in tocopherols. *Plant Physiol.* 132, 300-310.
- Havaux, M., Niyogi, K.K. (1999): The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20, 8762-8767.
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995): N-Proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochem.* 34, 11224-10228.
- Höfgen, R., Willmitzer, L. (1988): Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877.
- Höfgen, R., Willmitzer, L. (1990): Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various cultivars of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 66, 221-230.
- Hofius, D., Hajirezaei, M.R., Geiger, M., Tschiersch, H., Melzer, M., Sonnewald, U. (2004) RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* 135, 1256-1268.
- Hofius, D., Sonnewald, U. (2003): Vitamin E biosynthesis: biochemistry meets cell biology. *Trends Plant Sci.* 8, 6-8.
- Holt, N.E., Fleming, G.R., Niyogi, K.K. (2004): Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochem.* 43, 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* 307, 433-436.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.

- Horton, P., Ruban, A. (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., Young A.J. (1999): in *The Photochemistry of Carotenoids* (Frank, H.A., Young A.J., and Cogdell, R.J., eds) Vol. 8, S. 271-291, Kluwer, Dordrecht.
- Horton, P., Ruban, A.V., Wentworth, M. (2000): Allosteric regulation of the light-harvesting system of Photosystem II. *Phil Trans. R. Soc. Lond. B.* 355, 1361-1370.
- 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.
- Jahns, P. (1995): The xanthophyll cycle in intermittent light grown pea plants: possible functions of chlorophyll a/b-binding proteins. *Plant Physiol.* 108, 149-156.
- Jahns, P., Depka, B., Trebst, A. (2000): Xanthophyll cycle mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* indicate a role of zeaxanthin in the D protein turnover. *Plant Physiol Biochem.* 38, 371-376.
- Jahns, P., Graf, M., Munekage, Y., Shikanai, T. (2002): Single point mutation in the Rieske iron-sulfur subunit of cytochrome b_6/f leads to an altered pH dependence of plastoquinol oxidation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 519, 99-102.
- Jahns, P., Junge, W. (1992): Thylakoids from pea seedlings grown under intermittent light: biochemical and flash-spectrophotometric properties. *Biochem.* 31, 7390-7397.
- Jahns, P., Miede, B. (1996): Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198, 202-210.
- Jansson, S. (1994): The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 1-19.
- Jansson, S. (1999): A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 4, 236-240.
- Kamiya, N., Shen, J.-R. (2003): Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus valcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98-103.
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmüller, E., Dörmann, P. (2005): Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol.* 137, 713-723.
- Ke, B. (2001): *Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N.R., Aebersold, R., Green, B.R., Vlahakis, S., Yocum, C.F., Pichersky, E. (1992): Characterization of a spinach *psbS* cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS Lett.* 314, 67-71.
- Klughammer, C., Schreiber, U. (1991): Analysis of light-induced absorbance changes in the near-infrared spectral region. *Z. Naturforsch.* 46c, 233-244.
- Klughammer, C., Schreiber, U. (1994): An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192, 261-268.

- Krause, G.H. (1994): Photoinhibition at low temperatures. In: Baker, N.R., Bowyer, J.R. (Hrsg.), Photoinhibition of photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the Field, BIOS Scientific Publishers, Oxford, S. 331-591.
- Krause, G.H., Jahns, P. (2003): Pulse Amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. In: Green B. and Parson W. (eds) Light Harvesting Antennas, S. 373-399. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Krause, G.H., Jahns, P. (2004): Non-photochemical Energy dissipation determined by Chlorophyll fluorescence quenching. Characterization and Function. In Papageorgiou, G.C., Govindjee (eds) Chlorophyll Fluorescence: A signature of Photosynthesis, S. 463-495. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Krause, G.H., Somersalo, S., Zumbusch, E., Weyers, B., Laasch, H. (1990): On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of Photosystem II. J. Plant Physiol. 136, 472-479.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313-349.
- Król, M., Spangfort, M.D., Huner, N.P., Öquist, G., Gustafsson, P., Jansson, S. (1995): Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in chlorophyll b-less barley mutant. Plant Physiol 107, 873-883.
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. (1994): Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. Nature 367, 614-621.
- Külheim, C., Agren, J., Jansson, S. (2002): Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. Science 297, 91-93.
- Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, S. (1996): The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. Eur. J. Biochem. 242, 288-292.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lee, H.-Y., Chow, S., Hong, Y.-N. (1999): Photoinactivation of Photosystem II in leaves of *Capsicum annuum*. Physiol. Plant 105, 37-384.
- Lee, H.-Y., Hong Y.-N., Chow, W.S. (2001): Photoinactivation of Photosystem II complexes and photoprotection by non-functional neighbours in *Capsicum annuum* L. leaves. Planta 212, 332-342.
- 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.
- Li, X.P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000): A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. Nature 403, 391-395.
- Li, X.P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., 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, X.P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., Niyogi, K.K. (2002a): Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. J. Biol. Chem. 279, 22866-22874.

- Li, X.P., Gilmore, A.M., Niyogi, K.K. (2002b): Molecular and global time-resolved analysis of a *psbS* gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. *J. Biol. Chem.* 277, 33590-33597.
- Li, X.P., Müller-Moulé, P., Gilmore, A.M., Niyogi, K.K. (2002c): PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 15222-15227.
- Li, X.P., Phippard, A., Pasari, J., Niyogi, K.K. (2002d): Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) *in vivo*. *Funct. Plant Biol.* 29, 1131-1139.
- Lichtenthaler, H.K. (1998): The plants' 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fett. Lipid* 100, 128-138.
- Liebler, D.C., Kling, D.S., Reed, D.J. (1986): Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione. *J. Biol. Chem.* 261, 12114-12119.
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Whittier, R.F. (1995): Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8, 457-463.
- Liu, Z., Yan, H., Kuang, R., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004): Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428, 287-292.
- Long, D., Martin, M., Sundberg, E., Swinburne, J., Puangsomlee, P., Coupland G. (1993): The maize transposable element system *Ac/Ds* as a mutagen in *Arabidopsis*: Identification of an *albino* mutation induced by *Ds* insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10370-10374.
- Lucy, J.A. (1978): Structural interactions between Vitamin E and polyunsaturated phospholipids. In: Tocopherol, oxygen and biomembranes. De Duve, C., Hayaishi, O., (Hrsg.), S. 109-120, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 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.
- Ma, Y.Z., Holt, N.E., Li, X.P., Niyogi, K.K., Fleming, G.R. (2003): Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4377-4382.
- Macko, S., Wehner, A., Jahns, P. (2002): Comparison of violaxanthin de-epoxidation from the stroma and lumen sides of isolated thylakoid membranes from *Arabidopsis*: implications for the mechanism of de-epoxidation. *Planta* 216, 309-314.
- Mäenpää, P., Andersson, B. (1989): Photosystem II heterogeneity and long-term acclimation of light-harvesting. *Z. Naturforsch. Tiel. C.* 44, 403-406.
- Maiwald, D., Dietzmann, A., Jahns, P., Pesaresi, P., Joliot, P., Joliot, A., Levin, J.Z., Salamini, F., Leister, D. (2003): Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-Synthase δ -subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. *Plant Physiol.* 133, 191-202.
- Maloney, M.A., Hooper, J.K., Marks, D.B. (1989): Kinetics of chlorophyll accumulation and formation of chlorophyll-protein complexes during greening of *Chlamydomonas reinhardtii* y-1 at 30°C. *Plant Physiol.* 91, 1100-1106.
- Martienssen, R.A. (1998): Functional Genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2021-2026.

- Martienssen, R.A. (2000): Weeding out the genes: the *Arabidopsis* genome project. *Funct. Integr. Genomics* 1, 2-11.
- Mathis, J.N., Burkey, K.O. (1989): Light intensity regulates the accumulation of the major light-harvesting chlorophyll-protein in greening seedlings. *Plant Physiol.* 90, 560-566.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659-668.
- 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.
- Melis A. (1999): Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage? *Trends Plant Sci.* 4, 130-135.
- Morosinotto, T., Baronio, R., Bassi, R. (2002): Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins *in vivo* and *in vitro* during operation of the xanthophyll cycle. *J. Biol. Chem.* 277, 36913-36920.
- Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2003): Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiologia Plantarum* 119, 347-354.
- Müller, P., Li, X.-P., Niyogi, K.K. (2001): Non-photochemical quenching: A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125, 371-374.
- Müller-Moulé, P., Havaux, M., Niyogi, K. K. (2003): Zeaxanthin deficiency enhances the high light sensitivity of an ascorbate-deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 748-760.
- Mullet, J.E. (1988): Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 475-502.
- Munekage, Y., Takeda, S., Endo, T., Jahns, P., Hashimoto, T., Shikanai, T. (2001): Cytochrome b_6/f mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. *Plant J.* 28, 351-359.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2000): Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta.* 210, 925-931.
- Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2002): Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta.* 214, 608-615
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Neely, W.C., Martin, J.M., Barker, S.A. (1988): Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochem. Photobiol.* 48, 423-428.
- Nield, J., Funk, C., Barber, J. (2000): Supermolecular structure of photosystem II and location of the PsbS protein. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 1337-1344.
- 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, K.K. (1999): Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333-359.
- Niyogi, K.K. (2000): Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 3, 455-460.

- Niyogi, K.K., A. R. Grossman, O. Björkman (1998): *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10, 1121-1134.
- Niyogi, K.K., Björkman, O., Grossman, A.R. (1997a): Chlamydomonas Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. *Plant Cell*. 1997 Aug; 9(8):1369-1380.
- Niyogi, K.K., Björkman, O., Grossman, A.R. (1997b): The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14162-14167.
- Niyogi, K.K., 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., Shih, C., Chow, W.S., Pogson, B.J., DellaPenna, D., Björkman, O. (2001): Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth. Res.* 67: 139-145.
- Oja, V., Laisk, A. (2000): Oxygen yield from single turnover flashes in leaves: non-photochemical excitation quenching and the number of active PSII. *Biochim. Biophys. Acta* 1460, 291-301.
- Öquist, G., Anderson, J.M., McCaffery, S., Chow, W. S. (1992): Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 188, 422-431.
- Pan, R.S., Dilley, R. A. (2000): Influence of Ca^{2+} on the thylakoid lumen Violaxanthin de-epoxidase activity through Ca^{2+} gating of H^+ flux at the $CF_0 H^+$ Channel. *Photosynth. Res.* 65, 141-154.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kuhlein, N. (1993): Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215, 809-816.
- Pesaresi, P., Lunde, C., Jahns, P., Tarantino, D., Meurer, J., Varotto, C., Hirtz, R.-D., Soave, C., Scheller, H. V., Salamini, F., Leister, D. (2002): A stable LHCII-PSI aggregate and suppression of photosynthetic state transitions in the *spae1-1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215, 940-948.
- 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.
- Peterson, R.B., Havir, E.A. (2000): A Nonphotochemical quenching-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* possessing normal pigment composition and xanthophyll-cycle activity. *Planta* 210, 205-214.
- Peterson, R.B., Havir, E.A. (2001): Photosynthetic properties of an *Arabidopsis thaliana* mutant possessing a defective PsbS gene. *Planta*. 214, 142-152.
- Peterson, R.B., Havir, E.A. (2003): Contrasting modes of regulation of PSII light utilization with changing irradiance in normal and psbS mutant leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Photosyn. Res.* 75, 57-70.
- Pfündel, E.E., Dilley, R.A. (1993): The pH dependence of violaxanthin deepoxidation in isolated pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 101, 65-71.
- Plumley, F.G., G.W. Schmidt (1987): Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 146-150.

- Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Björkman, O., DellaPenna, D. (1998): Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13324-13329.
- Polivka, T., Herek, J.L., Zigmantas, D., Akerlund, H.E., Sundstrom, V. (1999): Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4914-4917.
- Porfirova, S., Bergmüller, E., Tropf, S., Lemke, R., Dörmann, P. (2002): Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 12495-12500.
- Pospišil, P., Arato, A., Krieger-Liszkay, A., Rutherford, A.W. (2004): Hydroxyl radical generation by photosystem II. Biochem. 43, 6783-6792.
- Preiss, S., Thornber, J.P. (1995): Stability of the apoproteins of light-harvesting complex I and II during biogenesis of thylakoids in the chlorophyll b-less barley mutant *chlorina f2*. Plant Physiol. 107, 709-717.
- Quick, W.P., Stitt, M. (1989): An examination of factors contributing to non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. Biochim. Biophys. Acta 977, 287-296.
- Rhee, K.-H., Morris, E.P., Barber, J., Kühlbrandt, W., (1998): Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. Nature 396, 283-286.
- Richter, M., Wild, A., Ruhle, W. (1994): Studies on the mechanism of photosystem II photoinhibition. II. The involvement of toxic oxygen species. Photosynth. Res. 24, 237-243
- Rockholm, D.C., Yamamoto, H.R. (1996): Violaxanthin deepoxidase. Plant Physiol. 110, 697-703.
- Ruban, A.V., Horton, P. (1992): Mechanism of pH-dependent dissipation of absorbed excitation energy by photosynthetic membranes. I. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complexes. Biochim. Biophys. Acta 1102, 30-38.
- 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., Pascal, A.A., Robert, B., Horton, P. (2002) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. J. Biol. Chem. 277, 7785-7789.
- Ruban, A.V., Walters, R.G., Horton, P. (1992): The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes. Inhibition of delta pH-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by dicyclohexylcarbodiimide. FEBS Lett. 309, 175-179.
- Ruban, A.V., Walters, R.G., Horton, P. (1994): The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complex of spinach thylakoid membranes. Plant Physiol. 104, 227-234.
- Ruban, A.V., Wentworth, M., Yakushevskaya, A.E., Andersson, J., Lee, P.J., Keegstra, W., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Jansson, S., Horton, P. (2003): Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. Nature 421, 648-652.
- Ruf, S., Biehler, K., Bock, R. (2000): A small chloroplast-encoded protein as a novel architectural component of the light-harvesting antenna. J. Cell Biol. 149, 369-378.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sattler, S.E., Cahoon, E.B., Coughlan, S.J., DellaPenna, D. (2003): Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. Evolutionary implications for tocopherol synthesis and function. Plant Physiol. 132, 2184-2195.

- Sattler, S.E., Cheng, Z., DellaPenna, D. (2004): From *Arabidopsis* to agriculture: engineering improved Vitamin E content in soybean. *Trends Plant Sci.* 9, 365-367.
- Schmid, V.H., Potthast, S., Wiener, M., Bergauer, V., Paulsen, H., Storf, S. (2002): Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 37307-37314.
- Schnettger, B., Leitsch, J., Krause, G.H. (1992): Photoinhibition of photosystem 2 *in vivo* occurring without net D1 protein degradation. *Photosynthetica* 27, 261-265.
- Schreiber, U. (1986): Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated fluorometer. *Photosynth. Res.* 9, 261-272.
- Schreiber, U., Klughammer, C., Neubauer, C. (1988): Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of puls modulation system. *Z. Naturforsch.* 43c, 686-698.
- Sgherri, C.L., Pinzino, C., Samaritani, E., Navari-Izzo, F. (1999): Activated oxygen generation from thylakoids: a novel spin trap. *Free Radic, Res.* 31, 199-204.
- Shibata, M., Mikota, T., Yoshimura, A., Iwata, N., Tsuyama, M., Kobayashi, Y. (2004): Chlorophyll formation and photosynthetic activity in rice mutants with alterations in hydrogenation of the chlorophyll alcohol side chain. *Plant Sci.* 166, 593-600.
- Shintani, D., DellaPenna, D. (1998): Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* 282, 2098-2100
- Shpilyov, A.V., Zinchenko, V.V., Shestakov, S.V., Grimm, B., Lokstein, H. (2005): Inactivation of the geranylgeranyl reductase (ChIP) gene in the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1706, 195-203.
- Snyders, S., Kohorn, B.D. (1999): TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J. Biol. Chem.* 274, 9137-9140.
- Springer, P.S., McCombie, W.R., Sundaresan, V., Martienssen, R.A. (1995): Gene Trap Tagging of PROLIFERA, an Essential MCM2-3-5-like gene in *Arabidopsis*. *Science* 268, 877-880.
- Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005): Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24, 919-928.
- Storf, S., Stauber, E.J., Hippler, M., Schmid, V.H.R (2004): Proteomic Analysis of the Photosystem I Light-Harvesting Antenna in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biochem.* 43, 9214-9224.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., Martienssen, R. (1995): Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev.* 9, 1797-17810.
- Swiatek, M., Kuras, R., Sokolenko, A., Higgs, D., Olive, J., Cinque, G., Müller, B., Eichacker, L.A., Stern, D.B., Bassie, R., Herrmann, R.G., Wollman, F.-A. (2001): The chloroplast gene *ycf9* encodes a photosystem II (PSI) core subunit, PsbZ, that participates in PSII supramolecular architecture. *Plant Cell* 13, 1347-1367.
- Tanaka, R., Oster, U., Kruse, E., Rüdiger, W., Grimm, B. (1999): Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiol.* 120, 695-704.
- Telfer A, Dhani S, Bishop SM, Phillips D, Barber J. (1994): beta-Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers. *Biochemistry.* 33, 14469-14474.

- Thidholm, E., Lindstrom, V., Tissier, C., Robinson, C., Schröder, W.P., Funk, C. (2002): Novel approach reveals localisation and assembly pathway of the PsbS and PsbW proteins into the photosystem II dimer. *FEBS Lett.* 513, 217-222.
- 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.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Trebst, A. (2003): Function of beta-carotene and tocopherol in photosystem II. *Z. Naturforsch.* 58, 609-620.
- Trebst, A., Depka, B., Hollander-Czytko, H. (2002): A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 516, 156-160.
- Tsegaye, Y., Shintani, D.K., DellaPenna, D. (2002): Over-expression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* 40: 913-920.
- van Wijk, K.J., Roobol-Boza, M., Kettunen, R., Andersson, B., Aro, E.-M. (1997): Synthesis and assembly of the D1 Protein into Photosystem II: Processing of the C-terminus and identification of the initial assembly partners and complexes during photosystem repair. *Biochem.* 36, 6178-6186.
- Van Wijk, K.J., Schnettger B., Graf, M., Krause, G.H. (1993): Photoinhibition and recovery in relation to heterogeneity of Photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1142, 59-68.
- Van Wijk, K.J., van Hasselt, P.R. (1993): Photoinhibition of Photosystem II *in vivo* is preceded by down-regulation through light-induced acidification of the lumen: Consequences for the mechanism of Photoinhibition *in vivo*. *Planta* 189, 359-368.
- Vener, A. V., Van Kan, P.J., Rich, P.R., Ohad, I., Andersson, B. (1997): Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single turnover flash. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1585-1590.
- Verhoeven, A.S., Adams, III W.W., Demmig-Adams, B., Croce, R., Bassi, R. (1999): Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in vinca major. *Plant Physiol.* 120, 727-738.
- Verhoeven, A.S., Bugos, R.C., Yamamoto, H.Y. (2001): Transgenic tobacco with suppressed zeaxanthin formation is susceptible to stress-induced photoinhibition. *Photosyn. Res.* 67, 27-39.
- Voigt, B., Irrgang, K.-D., Ehlert, J., Beenken, W., Renger, G., Leupold D., H. Lokstein (2002): Spectral substructure and excitonic interactions in the minor photosystem II antenna complex CP29 as revealed by non-linear polarization spectroscopy in the frequency domain. *Biochem.* 41, 3049-3056.
- Walters, R.G., Horton, G. (1999): Structural and functional heterogeneity in the major light-harvesting complexes of higher plants. *Photosyn. Res.* 61, 77-89.

- Walters, R.G., Ruban, A. V., Horton, P. (1996): Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14204-14209.
- Walters, R.G., Ruban, A.V., 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.
- Wefers, H., Sies, H. (1988): The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur. J. Biochem.* 174, 353-357.
- Weigel, D., Glazebrook, J. (2002): *Arabidopsis*, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Weis, E., Lechtenberg, D. (1989): Fluorescence analysis during steady-state photosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 323, 253-2678.
- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2000): Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by xezanthin. *FEBS Lett.* 471, 71-74.
- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2004): The functional significance of the monomeric and trimeric states of the photosystem II light harvesting complexes. *Biochem.* 43, 501-509.
- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2003): Thermodynamic investigation into the mechanism of the chlorophyll fluorescence quenching in isolated photosystem II light-harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* 278, 21845-21850.
- Wise, R.R., Naylor, A.W. (1987): Chilling-enhanced photooxidation: evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol.* 83, 278-282.
- Wisman, E., Cardon, G.H., Fransz, P., Saedler, H. (1998a): The behaviour of the autonomous maize transposable element En/Spm in *Arabidopsis thaliana* allows efficient mutagenesis. *Plant Mol. Biol.* 37, 989-999.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H., Weisshaar, B. (1998b): Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12432-12437.
- Wollmann, F.-A. (2001): State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* 20, 3623-3630.
- Yakushevskaya, A.E., Jensen, P.E., Keegstra, W., van Roon, H., Scheller, H.V., Boekema, E.J., Dekker, J.P. (2001): Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 268, 6020-6028.
- 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. *Biochem.* 28, 608-613.
- Zhang H, Joseph J, Vasquez-Vivar J, Karoui H, Nsanzumuhire C, Martasek P, Tordo P, Kalyanaraman B. (2000): Detection of superoxide anion using an isotopically labeled nitron spin trap: potential biological applications. *FEBS Lett.* 473, 58-62.
- Zhang, H., Goodman, H.M., Jansson, S. (1997): Antisense inhibition of the photosystem I antenna protein Lhca4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 115, 1525-1531.
- Zhang, L., Aro, E.M. (2002): Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Lett.* 512, 13-18.

- Zhang, S., Weng, J., Pan, J., Tu, T., Yoa, S., Xu, C. (2003): Study on the photo-generation of superoxide radicals in photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosyn. Res.* 75, 41-48.
- Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., Wollman, F.A. (1999): The Q_o site of cytochrome b₆f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J.* 18, 2961-2929.
- Zolla, L., Rinalducci, S. (2002): Involvement of active oxygen species in degradation of light-harvesting proteins under light stresses. *Biochem.* 41, 14391-14402.
- Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W., Orth, P. (2001): Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Lett. Nature* 409, 739-743.

7 ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AL	aktinisches Licht
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Ax	Antheraxanthin
β -Caro	β -Carotin
BSA	Rinderserumalbumin
CAB	Chlorophyll a/b-bindend
Car	Carotinoide
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
$^1\text{Chl}^*$	angeregtes Singulett-Chlorophyll
$^3\text{Chl}^*$	angeregtes, langlebiges Triplett-Chlorophyll
Chl a _{Phy}	modifiziertes, phytyliertes Chlorophyll a
Chl a _{GG}	geranylgeranyliertes Chlorophyll a
Chl b _{GG}	geranylgeranyliertes Chlorophyll b
CHL P	Geranylgeranyl-Reduktase
Chl	Chlorophyll
Chl _{GG}	geranylgeranyliertes Chlorophyll
Chl _{Phy}	phytyliertes Chlorophyll
CP	Chlorophyll-bindendes Protein
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cyt	Cytochrom
DCMU	3-(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
ΔA	Signaldifferenz
ΔpH	pH-Gradient
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPMPO	5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolin-N-oxid
DEPMPO-OH	Addukt aus DEPMPO und $\cdot\text{OH}$
DEPMPO-OOH	Addukt aus DEPMPO und $\cdot\text{O}_2^-$
DEPS	Deepoxidationszustand
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>DsG</i>	<i>dissociation genetrap element</i>
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELIP	<i>early-light inducible protein</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
EST	<i>enhanced sequence tag</i>
F ₀	Grundfluoreszenz
F _M	Maximalfluoreszenz
FR	Fernrotlicht
F _V	variable Fluoreszenz
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HGA	Homogentisinsäure
HL	<i>high light</i> , Starklicht
HLIP	<i>high light induced proteins</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
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
LL	<i>low light</i> , Schwachlicht
Lut	Lutein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NADP	Nicotinamidadeninucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadeninucleotidphosphat
Neo	Neoxanthin
NPQ	nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung
$^1O_2^*$	angeregter Singulett-Sauerstoff
$\bullet O_2^-$	Superoxidradikal
$\bullet OH$	Hydroxylradikal
ORF	<i>open reading frame</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFD	Photonenflussdichte
Φ_F	Fluoreszenzausbeute
Φ_{F0}	minimale Fluoreszenzausbeute
Φ_{FM}	maximale Fluoreszenzausbeute
Φ_P	potentielle Effizienz der photochemischen Reaktion
PhyPP	Phytyldiphosphat
PQ	Plastochinon
PQH ₂	Plastohydrochinon
PS	Photosystem
Q _A	Ubichinon A
qE	Energie- oder ΔpH -abhängige Fluoreszenzlöschung
qI	photoinhibitorische Fluoreszenzlöschung
qP	photochemische Fluoreszenzlöschung
qT	Fluoreszenzlöschung durch <i>state transition</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RZ	Reaktionszentrum
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNN	Wildtyp-Tabak der Varietät Samsun NN
SV	Stern-Vollmer
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAIR	<i>thermal asymmetric interlaced PCR</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
üN	über Nacht
VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
Vx	Violaxanthin
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid
Zx	Zeaxanthin

7.2 *Lhcb4*-cDNA-Sequenz aus *N. tabacum*

Kodierender Bereich der *Lhcb4*-cDNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode aus *N. tabacum*. Die *Lhcb4*-cDNA-Sequenz besteht ohne Poly-A-Kette aus 1018 Nukleotiden. Der Translationsstartpunkt ist das ATG-Triplet 12 bis 14. Dieses Leseraster kodiert ein Protein von 285 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 31,5 kDa.

```

      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |
ATGGCTACCGCAGCTGCCACATCCTCATTTCATCGGAACACGGCTGCCGGAAATTCACTCC
      M A T A A A T S S F I G T R L P E I H S

      80      90      100     110     120     130
      |      |      |      |      |      |
GGTGCCGGTAGAGTCCAAGCCCGATTTCGGATTTCGGAAAAAAGCCGCACCTAAAAAGGCT
      G A G R V Q A R F G F G K K A A P K K A

      140     150     160     170     180     190
      |      |      |      |      |      |
CCAAAAAGGCAAATCCCAGACAGACCGTTATGGTACCCAGGAGCTAAGGCACCAGAATAT
      P K R Q I P D R P L W Y P G A K A P E Y

      200     210     220     230     240     250
      |      |      |      |      |      |
CTGGACGGGAGTCTCGTTCGGCGATTACGGATTTCGATCCATTTGGTTTGGGGAAACCTGCT
      L D G S L V G D Y G F D P F G L G K P A

      260     270     280     290     300     310
      |      |      |      |      |      |
GAGTACTTGCAATTTGATTTGGATTTCATTGGACCAGAATTTGGCTAAGAATTTGGCCGGT
      E Y L Q F D L D S L D Q N L A K N L A G

      320     330     340     350     360     370
      |      |      |      |      |      |
GACGTAATTTGGGACCAGGACTGAACTTGCTGATGTGAAATCGACACCGTTCCAGCCGTAC
      D V I G T R T E L A D V K S T P F Q P Y

      380     390     400     410     420     430
      |      |      |      |      |      |
AGTGAGGTGTTTGGACTGCAGAGATTCAGAGAATGTGAGCTGATCCATGGGAGATGGGCT
      S E V F G L Q R F R E C E L I H G R W A

      440     450     460     470     480     490
      |      |      |      |      |      |
ATGTTGGCTACACTTGGTGCTTTGACTGTTGAGTGGCTCACTGGTATTACATGGCAAGAC
      M L A T L G A L T V E W L T G I T W Q D

      500     510     520     530     540     550
      |      |      |      |      |      |
GCTGGAAAGGTTGAGCTGGTTGAGGGATCATCTACTTGGGGCAACCACTCCCATTCTCC
      A G K V E L V E G S S Y L G Q P L P F S

      560     570     580     590     600     610
      |      |      |      |      |      |
ATTACAACATTGATCTGGATTGAGGTCCTTGTTATTGGATACATTGTTGAATTCCAAAGA
      I T T L I W I E V L V I G Y I V E F Q R

```

```
        620          630          640          650          660          670
        |           |           |           |           |           |
AACGCTGAGCTTGACCCGGAAAAGAGGCTTTACCCTGGTGGATCATTCTTCGACCCATTG
N A E L D P E K R L Y P G G S F F D P L

        680          690          700          710          720          730
        |           |           |           |           |           |
GGCCTTGCTGCTGACCCGGAGAAAAAAGCCACACTTCAACTTGCTGAGATCAAGCATGCT
G L A A D P E K K A T L Q L A E I K H A

        740          750          760          770          780          790
        |           |           |           |           |           |
CGTCTTGCTATGGTTGCCTTCTTGGGCTTTGCTGTCCAAGCTGCTGCTACTGGAAAAGGC
R L A M V A F L G F A V Q A A A T G K G

        800          810          820          830          840          850
        |           |           |           |           |           |
CCACTTAACAACCTGGGCTACCCACTTGAGTGACCCACTTCACACTACCATTTTCGACACA
P L N N W A T H L S D P L H T T I F D T

        860
        |
TTCGGCTTCTTCTCT
F G F F S
```

7.3 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Jahns danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die überaus gute Betreuung in der ihm eigenen Art. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Peter Jahns ganz herzlich für die Unterstützung, meine Ergebnisse auf dem *13th International Congress of Photosynthesis* in Montreal präsentieren zu dürfen, sowie für die Möglichkeit insgesamt 6 Monate im Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben arbeiten zu können.

Herrn Prof. Dr. A. W. Alfermann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und sein großes Entgegenkommen.

Bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Grimm von der Humboldt Universität in Berlin möchte ich mich für die Überlassung der *CHL P*-Antisense-Pflanzen und für die Einladung, in seinem damaligen Labor am IPK in Gatersleben zu arbeiten, bedanken. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Grimm für die familiäre Aufnahme und die intensiven Diskussionen.

Herrn Dr. Dario Leister und seinen Mitarbeitern vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln danke ich für die äußerst produktive Kooperation und die Überlassung der *psbs-1.3*-Mutanten, sowie für die ständige Hilfsbereitschaft.

Dank auch an Herrn Priv.-Doz. Dr. Dirk Gansert für die Möglichkeit, die Messung der CO₂-Assimilation am Institut für Ökologische Pflanzenphysiologie, Abteilung Geobotanik, durchführen zu können, und an Prof. Dr. Thorsten Friedrich von der Universität Freiburg für die ESR-Messungen während seiner Düsseldorfer Zeit am Institut für Biochemie.

Bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Krause/Jahns möchte ich mich für das gute Arbeitsklima bedanken, und für die Unterstützung bei den kleinen und großen Problemen des Laboralltags. Ein riesiges Dankeschön geht an unsere gute Seele der Arbeitsgruppe Maria Graf für ihre unentbehrliche Hilfe.

Den übrigen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie der Pflanzen sei gedankt für die kollegiale Zusammenarbeit. Ein ganz spezieller Gruß geht natürlich an Antje, Alex, Claudia, Claudia, Nicole, Silke, Jan und Erik. Den beiden letzteren danke ich für die geniale Unterstützung bei der Behebung von Computerproblemen. Danke auch an Dr. Ariane Atteia und Dr. Robert van Lis für die freundschaftliche Unterweisung in einige molekularbiologische Methoden.

Mein Dank gilt allen damaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Bernhard Grimm am IPK in Gatersleben für die herzliche Aufnahme und für ihre tatkräftige Hilfe. Dr. Sanjay Mishra und Dr. Ulrich Keetmann danke ich darüber hinaus für die guten fachlichen Diskussionen und privaten Gespräche.

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 und Steffi für die wirklich unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

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.

Düsseldorf, den 23.05.2005