

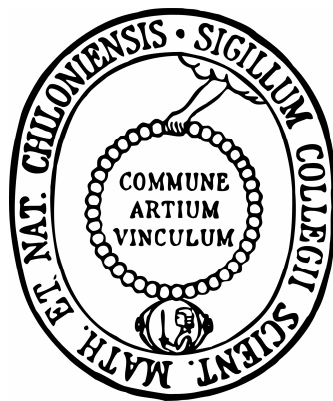
# Untersuchungen zur Funktion von Tocopherolen in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

**Kathleen Brückner**

**Kiel**

**2010**

Referentin: Prof. Dr. Karin Krupinska  
Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Bilger.....  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2011 .....  
Zum Druck genehmigt: 08.02.2011 .....

.....  
Der Dekan

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Biosynthese und Funktion der Tocopherole</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Struktur und Biosynthese .....	1
1.1.2	Verteilung und subzelluläre Lokalisation .....	3
1.1.3	Funktionen .....	4
1.1.3.1	Antioxidative Wirksamkeit .....	4
1.1.3.2	Nichtantioxidative Funktionen .....	7
<b>1.2</b>	<b>Photosystem II – Funktion und Reparatur</b> .....	<b>8</b>
1.2.1	Photoinhibierung .....	8
1.2.2	Produktion und Wirkung von $^1\text{O}_2$ .....	10
1.2.3	D1-Protein- <i>turnover</i> .....	12
1.2.4	Möglichkeiten zur Regulation des D1-Protein- <i>turnovers</i> .....	14
<b>1.3</b>	<b>Sigmafaktoren</b> .....	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Membranen der Chloroplasten</b> .....	<b>17</b>
1.4.1	Architektur und Heterogenität der Thylakoide .....	17
1.4.2	Lipide und Fettsäuren .....	18
1.4.3	Tocopherole in Membranen .....	20
1.4.4	Änderung der Fluidität bei abiotischem Stress .....	21
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien und Enzyme</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Messgeräte</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Anzucht und Behandlung der Pflanzen</b> .....	<b>25</b>
2.3.1	Anzucht und Ernte von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
2.3.2	Verwendung von tocopheroldefizienten ( <i>vte</i> ) Mutanten von <i>A. thaliana</i> .....	25
2.3.3	Starklichtbehandlung und Kinetik der Probenahme .....	26
2.3.4	Behandlung mit Eosin-Y .....	27
2.3.5	Behandlung mit Lincomycin .....	28
<b>2.4</b>	<b>Isolierung von subzellulären Fraktionen</b> .....	<b>29</b>
2.4.1	Anreicherung subzellulärer Membranfraktionen aus <i>Brassica oleracea botrytis</i> ..	29
2.4.2	Isolierung plastidärer Membranen aus Blättern von <i>Brassica oleracea botrytis</i> ....	30
2.4.3	Gewinnung von Plastiden aus der Infloreszenz von <i>Brassica oleracea botrytis</i> ....	31

<b>2.5</b>	<b>Physiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.5.1	Bestimmung von Pigmenten und Antioxidantien in Blättern.....	32
2.5.1.1	Tocopherole und Plastochinon-9.....	32
2.5.1.2	Chlorophylle und Carotinoide.....	32
2.5.1.3	Tocochinon.....	33
2.5.2	Messung der Aktivität des Enzyms Cytochrom c Oxidase.....	34
2.5.3	Maximale Quantenausbeute des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ).....	35
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>36</b>
2.6.1	Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial.....	36
2.6.1.1	Isolierung genomischer DNA.....	36
2.6.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit Boratpuffer.....	36
2.6.2	Chloroform-Phenol-Extraktion.....	37
2.6.3	Ethanolische Präzipitation von Nukleinsäuren.....	37
2.6.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	37
2.6.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	38
2.6.5.1	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	38
2.6.5.2	RNA-Agarosegelelektrophorese.....	38
2.6.6	Synthese von cDNA.....	39
2.6.7	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.6.8	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	39
2.6.9	Oligonukleotide.....	41
<b>2.7</b>	<b>Biochemische Methoden zur Untersuchung von Proteinen</b> .....	<b>42</b>
2.7.1	Extraktion und Quantifizierung von Proteinen.....	42
2.7.1.1	Proteinextraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
2.7.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976).....	42
2.7.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach LOWRY (1951).....	43
2.7.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	43
2.7.2.1	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	43
2.7.2.2	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen.....	44
2.7.3	Transfer von Proteinen auf Membranen ( <i>Western-Blot</i> ).....	44
2.7.4	Färbung von immobilisierten Proteinen auf Membranen.....	45
2.7.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	45
2.7.6	Antikörper.....	46
<b>2.8</b>	<b>Fettsäureanalytik</b> .....	<b>47</b>
<b>2.9</b>	<b>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</b> .....	<b>48</b>
<b>2.10</b>	<b>Datenbanken</b> .....	<b>49</b>
<b>2.11</b>	<b>Statistik und Densitometrie</b> .....	<b>49</b>

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur extraplastidären Verteilung von Tocopherolen in der Pflanzenzelle.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Auswirkungen einer Starklichtbehandlung in Wildtyp und <i>vte1</i>-Mutante.</b>	<b>53</b>
3.2.1	Photoinhibierung am Photosystem II .....	53
3.2.2	Tocopherol- und Tocochinongehalt .....	54
3.2.3	Expression von Genen des Tocopherolbiosyntheseweges und von Genen, die das Auftreten von ROS anzeigen.....	56
3.2.4	D1-Proteingehalt in Wildtyp und <i>vte1</i> -Mutante .....	58
<b>3.3</b>	<b>Rolle der Tocopherole bei der Beseitigung von <math>^1\text{O}_2</math> im Photosystem II.....</b>	<b>60</b>
3.3.1	Abbau des D1-Proteins in Wildtyp und <i>vte1</i> -Mutante in Gegenwart von $^1\text{O}_2$ .....	60
3.3.2	Beseitigung von $^1\text{O}_2$ durch andere Antioxidantien .....	62
3.3.3	Starklichtbehandlung von Pflanzen ohne Zeaxanthin.....	65
3.3.3.1	Effizienz des Photosystems II .....	65
3.3.3.2	D1-Proteingehalt und Bildung von D1-Spaltprodukten bei Starklicht .....	66
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss von Tocopherolen auf die Expression des <i>psbA</i>-Gens .....</b>	<b>68</b>
3.4.1	Sigmafaktoren in <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 und <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	68
3.4.2	Analyse einer $\Delta\text{Atsig2}$ -Mutante von <i>A. thaliana</i> .....	69
3.4.2.1	Nachweis der T-DNA-Insertion .....	69
3.4.2.2	Phänotyp und Expression des <i>sig2</i> - und <i>psbA</i> -Gens .....	70
3.4.2.3	Effizienz des Photosystems II, Chlorophyll- und Tocopherolgehalt .....	72
3.4.2.4	D1-/D2-Proteingehalt .....	73
3.4.3	Expression des <i>sig2</i> - und <i>psbA</i> -Gens in Wildtyp und <i>vte1</i> -Mutante bei Starklicht.	74
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von Tocopherolen auf den D1-Protein-turnover bei Starklicht.....</b>	<b>75</b>
3.5.1	Inhibierung der D1-Proteinsynthese durch Lincomycin .....	75
3.5.2	Reversible Phosphorylierung des D1-Proteins .....	79
3.5.3	Ultrastruktur der Chloroplasten .....	81
3.5.4	Fettsäurezusammensetzung in Wildtyp und <i>vte1</i> -Mutante .....	83
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Subzelluläres Vorkommen der Tocopherole .....</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Auswirkungen einer Starklichtbehandlung auf die <i>vte1</i>-Mutante .....</b>	<b>91</b>
<b>4.3</b>	<b>Bedeutung der Tocopherole für das D1-Protein im Photosystem II .....</b>	<b>95</b>
4.3.1	Tocopherole – Notwendige $^1\text{O}_2$ -Quencher zum Schutz des D1-Proteins? .....	95
4.3.2	D1-Proteinsynthese in der <i>vte1</i> -Mutante .....	98
4.3.2.1	Expression des <i>psbA</i> -Gens.....	99
4.3.2.2	Translation des D1-Proteins.....	100

4.3.3	D1-Proteinabbau in der <i>vte1</i> -Mutante .....	102
4.3.3.1	Reversible Phosphorylierung .....	102
4.3.3.2	Proteolyse und D1-Spaltprodukte .....	104
4.3.4	Membranbestandteil Tocopherol und der <i>turnover</i> des D1-Proteins .....	105
<b>4.4.</b>	<b>Modell zur Rolle der Tocopherole bei der Reparatur des Photosystems II</b>	<b>109</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>110</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b> .....	<b>111</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>113</b>
<b>Anhang</b>	.....	<b>I</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% v/v	Volumen/Volumen
% w/v	Masse/Volumen
APS	Ammoniumpersulfat
bp, kb	Basenpaare, Kilobasenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz ( <i>enhanced chemiluminescence</i> )
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FG	Frischgewicht
<i>for</i> , LP	<i>sense</i> Primer
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GC	Gaschromatographie
gDNA	genomische DNA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kDa	Kilodalton
LHC	Lichtsammelkomplex ( <i>light harvesting complex</i> )
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NPQ	nichtphotochemisches <i>Quenching</i>
O <sub>2</sub> <sup>*-</sup>	Superoxidradikal
OH <sup>*</sup>	Hydroxylradikal
Oligo(dT)	Oligodeoxythymidin
PAM	Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
pD1	Vorstufe des D1-Proteins ( <i>precursor</i> D1-Protein)
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PS	Phosphatidylserin

## Abkürzungsverzeichnis

---

PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev, RP	<i>antisense</i> - bzw. reverse Primer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekretorischer Weg
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
T-DNA	Transfer-DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
$\lambda_{\text{Abs}}$	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{\text{Em}}$	Emissionswellenlänge ( $\text{Em}$ – <i>emission</i> )
$\lambda_{\text{Exc}}$	Anregungswellenlänge ( $\text{Exc}$ – <i>excitation</i> )



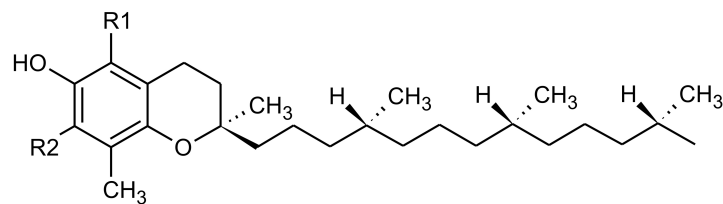
# 1. Einleitung

Tocopherole gehören zu einer Gruppe von lipophilen Substanzen, die auch unter der Bezeichnung Vitamin E bekannt sind. Vitamin E wurde erstmals vor über 80 Jahren als ein Faktor zur Erhaltung der Fruchtbarkeit bei Laborratten entdeckt (Evans & Bishop 1922). Da Tocopherole nur von Pflanzen und einigen Cyanobakterien synthetisiert werden können, sind sie ein essentieller Bestandteil der menschlichen und tierischen Ernährung. In Pflanzen wurde in den letzten Jahren vor allem die Bedeutung der Tocopherole als Antioxidantien bei abiotischen Stressbedingungen untersucht. Über eine nichtantioxidative Wirksamkeit, wie sie im tierischen und menschlichen Organismus bereits nachgewiesen wurde (Zingg 2007), ist in Pflanzen bisher nur wenig bekannt. Um die Bedeutung von Tocopherolen für Pflanzen besser zu verstehen, bedarf es daher weiteren Untersuchungen zu ihren Wirkmechanismen.

## 1.1 Biosynthese und Funktion der Tocopherole

### 1.1.1 Struktur und Biosynthese

Tocopherole sind lipidähnliche Moleküle, die aus dem Isoprenoidstoffwechsel der Pflanzen hervorgehen. Der Lipidcharakter ergibt sich aus ihrer chemischen Struktur, welche durch ein polares phenolisch-heterozyklisches Ringsystem (Chromanolring) und einer hydrophoben Polyprenylkette charakterisiert ist (Abb. 1-1). Tocopherole kommen als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Formen vor, die sich durch die Anzahl und Position von Methylsubstituenten ( $\text{CH}_3$ ) am Chromanolring unterscheiden. Für die Ernährungswissenschaft ist besonders  $\alpha$ -Tocopherol von Bedeutung, da es im Vergleich zu den anderen Tocopherolformen die höchste Bioverfügbarkeit und Aktivität im menschlichen Körper hat (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996).



Tocopherol	R1	R2
$\alpha$	$\text{CH}_3$	$\text{CH}_3$
$\beta$	$\text{CH}_3$	H
$\gamma$	H	$\text{CH}_3$
$\delta$	H	H

**Abb. 1-1:** Chemische Struktur der Tocopherole ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Form).

Die Biosynthese der Tocopherole findet in den Plastiden der Pflanzen statt, wo die beteiligten Enzyme an der inneren Hüllmembran (Soll *et al.* 1985) und in den Plastoglobuli (Vidi *et al.*



Zusammen mit Phityldiphosphat wird Homogentisinsäure zu 2-Methyl-6-Phityl-Benzohydrochinon (MPBQ) kondensiert, welches das erste Zwischenprodukt der Tocopherolbiosynthese darstellt. Phityldiphosphat kann aus dem plastidären Deoxyxylulose-5-Phosphat (DOXP) Stoffwechsel hervorgehen oder aus freiem Phytol (Valentin *et al.* 2006) gebildet werden. An der Reaktion zu MPBQ ist eine Prenyltransferase (HPT) beteiligt, deren Aktivität als limitierender Faktor für die Anreicherung von Tocopherolen, z. B. unter Starklichtbedingungen, beschrieben wurde (Collakova & DellaPenna 2003a, 2003b).

Welche Tocopherolformen entstehen, wird durch die Aktivität zweier Methyltransferasen (MPBQ-Methyltransferase,  $\gamma$ -TMT) und der Tocopherolzyklase bestimmt. Dabei kann die Tocopherolzyklase als ein Schlüsselenzym verstanden werden, da sie den Übergang von Zwischenprodukten der Synthese zu den ersten Tocopherolformen vermittelt. Das Enzym kann verschiedene Substrate binden und ist an der Bildung von  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol sowie der Synthese von Plastochromanol-8 beteiligt (Zbierzak *et al.* 2010). Die Tocopherolzyklase von *Arabidopsis* ist in den Plastoglobuli der Chloroplasten lokalisiert (Vidi *et al.* 2006). Da ein Verlust der Tocopherolzyklase zum Ausfall aller Tocopherolformen führt, wurde die Funktion der Tocopherole bevorzugt durch vergleichende Untersuchungen an Pflanzen des Wildtyps und einer Mutante ohne funktionsfähige Tocopherolzyklase untersucht (Munne-Bosch & Alegre 2002). Dazu gehören Mutanten in *Arabidopsis* (*vte1*), *Zea mays* (*sxd1*) sowie *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*slr1737*), die durch das Fehlen von Tocopherolen sowie einer Akkumulation von DMPBQ gekennzeichnet sind (Porfirova *et al.* 2002, Sattler *et al.* 2003).

### 1.1.2 Verteilung und subzelluläre Lokalisation

Vorkommen, Gehalt und Zusammensetzung der Tocopherole in Pflanzen können von dem vorliegenden Pflanzengewebe abhängig sein. So konnten Tocopherole sowohl in Blättern als auch in photosynthetisch inaktiven Geweben wie z. B. Samen, Früchten und Wurzeln gefunden werden (Horvath *et al.* 2006). Die dominante Form in Blättern ist  $\alpha$ -Tocopherol, während in Samen hauptsächlich  $\gamma$ -Tocopherol vorhanden ist (Hess 1993). Weiterhin können sich auch einzelne Pflanzenarten hinsichtlich ihrer Tocopherolmenge und -zusammensetzung voneinander unterscheiden (Szymanska & Kruk 2008). Beispielsweise wurde in Pflanzen der Gattung *Cuscuta* festgestellt, dass im Sprossgewebe je nach *Cuscuta*-Art unterschiedliche Tocopherolmengen und -formen zu finden sind (van der Kooij *et al.* 2005).

Aufgrund ihrer lipidähnlichen Eigenschaften sind Tocopherole mit den Membranen assoziiert. Der Hauptanteil der Tocopherole eines Blattes ist in den Hüllmembranen und Plastoglobuli der Chloroplasten zu finden. Daneben ist ein nicht unwesentlicher Teil der Tocopherole in den Thylakoiden und damit in direkter Nähe zum Photosyntheseapparat lokalisiert (Block *et al.* 2007). Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Tocopherole auch außerhalb von Plastiden in mikrosomalen Membranen und Mitochondrien vorkommen (Newton & Pennock 1971,

Hughes *et al.* 1971). Ein Nachteil dieser älteren Untersuchungen ist, dass keine verlässlichen Informationen über die Reinheit der isolierten Zellfraktionen vorliegen, sodass diese Ergebnisse das Vorkommen von Tocopherolen außerhalb der Plastiden nicht sicher aufzeigen.

Außerdem können sich Tocopherolgehalt und –zusammensetzung während der Entwicklung von Pflanzen und unter dem Einfluss von abiotischem Stress ändern. So weisen zum Beispiel senescente Blätter deutlich höhere Tocopherolgehalte auf als junge Blätter (Falk *et al.* 2003). Der Effekt abiotischer Stressfaktoren auf den Tocopherolgehalt kann je nach ihrer Wirkdauer sehr unterschiedlich sein. Während eine kurzzeitige Starklichtexposition zu einer Abnahme der Menge an Tocopherolen im Blattgewebe führt (Leipner *et al.* 2000), sind in Pflanzen, die über längere Zeit bei hohen Lichtintensitäten oder in Kühle wachsen, hohe Mengen an Tocopherolen nachweisbar (Havaux *et al.* 2005). Weiterhin wurde festgestellt, dass auch ein Wachstum von Pflanzen in Anwesenheit hoher Salz- und Zuckergehalte zu einer Steigerung der Tocopherolbiosynthese führt (Abbasi *et al.* 2007). Die Synthese der Tocopherole scheint je nach Wirkung der abiotischen Stressfaktoren und dem Entwicklungszustand der Pflanze einer noch nicht vollständig verstandenen Regulation zu unterliegen.

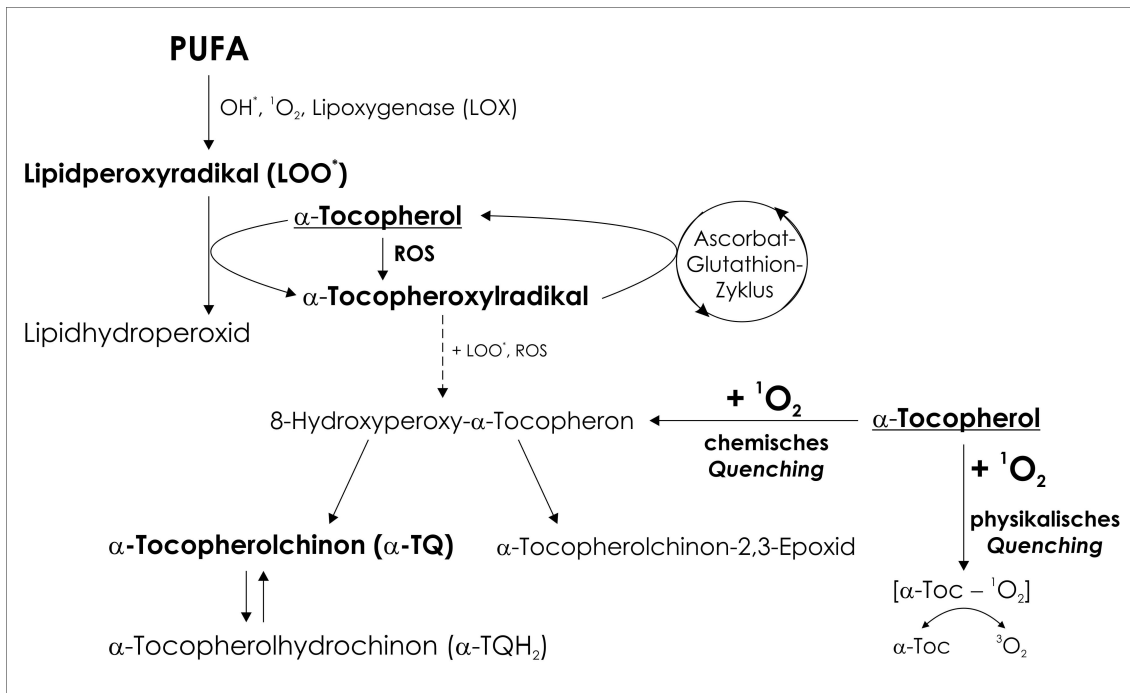
### 1.1.3 Funktionen

#### 1.1.3.1 Antioxidative Wirksamkeit

Die Tocopherole gehören zu einem Netzwerk aus enzymatisch und nichtenzymatisch wirksamen Antioxidantien, die die Thylakoidmembran und den Photosyntheseapparat vor Lipidperoxidation und vor anderen photooxidativen Schäden schützen (Munne-Bosch & Alegre 2002, Niyogi 1999). Ihre antioxidative Wirksamkeit beruht darauf, ein Proton bzw. Elektron auf Lipidperoxyradikale oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) übertragen zu können und diese damit zu neutralisieren (Abb. 1-3). Aus diesen Reaktionen gehen verschiedene Radikale der Tocopherole hervor, die in Pflanzen durch den Ascorbat-Glutathion-Zyklus zu antioxidativ wirksamen Tocopherolen regeneriert werden oder in Folgereaktionen zu Tocopherolchinonen oder –epoxiden weiterreagieren (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996).

Die antioxidative Chemie der Tocopherole wurde zuerst an tierischen Systemen und künstlich hergestellten Membranen untersucht (Serbinova *et al.* 1991). Beginnend mit dem Einsatz von Modellpflanzen, die infolge genetischer Veränderungen keine Tocopherole synthetisieren können, wurde es möglich, die antioxidative Wirksamkeit von Tocopherolen in Pflanzen zu analysieren. Wichtige Modellpflanzen sind insbesondere die *vte1*- und *vte2*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, an denen die Rolle der Tocopherole unter stressverursachenden Wachstumsbedingungen wie Starklicht und/oder Kühle untersucht wurde. Diese Studien zeigten, dass in *vte1*- und *vte2*-Pflanzen bereits nach einer fünfständigen Starklichtexposition eine im Vergleich zu Wildtyppflanzen erhöhte Lipidperoxidation vorhanden ist (Havaux *et al.*

2005). Entgegen der Erwartung wurde in dieser Untersuchung auch festgestellt, dass ein langanhaltendes Wachstum der *vte1*-Mutante unter Starklicht und bei Kühle zu keiner weiteren Steigerung der Lipidperoxidation führt. Darüber hinaus zeigten ähnliche Studien, dass die *vte2*-Mutante stärker von der Einwirkung abiotischer Stressfaktoren betroffen sein kann als die *vte1*-Mutante (Maeda *et al.* 2006). Diese Befunde führten zu der Annahme, dass andere antioxidative Systeme das Fehlen der Tocopherole kompensieren können.



**Abb. 1-3:** Quenching von Lipidperoxyradikalen und  $^1O_2$  durch  $\alpha$ -Tocopherol (nach: Fryer 1992, Kamal-Eldin & Appelqvist 1996). PUFA – mehrfach ungesättigte Fettsäuren, ROS – reaktive Sauerstoffspezies

Zu den Antioxidantien, die für eine kompensatorische Wirkung in Frage kommen, zählen neben dem Carotinoid Zeaxanthin auch DMPBQ, das ein Substrat der Tocopherolzyklase ist und in der *vte1*-Mutante stark angereichert vorliegt (Havaux *et al.* 2005). Da einige Studien gezeigt haben, dass die *vte1*-Mutante häufig geringer beeinträchtigt ist als die *vte2*-Mutante, könnte DMPBQ eine antioxidative Wirkung in *vte1*-Pflanzen haben (Sattler *et al.* 2004). In Keimlingen der *vte2*-Mutante von *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass Tocopherole bei der Bekämpfung von Lipidperoxidation sehr wichtig sind. Die untersuchten Keimlinge der *vte2*-Mutante hatten eine bis zu 100fach stärkere Lipidperoxidation als der Wildtyp und waren in ihrer Entwicklung enorm beeinträchtigt (Sattler *et al.* 2004). Durch Kreuzung der *vte2*-Mutante mit Pflanzen, die keine dreifach ungesättigten Fettsäuren synthetisieren können, wurde bestätigt, dass der Phänotyp der *vte2*-Keimlinge auf eine unkontrollierte Oxidation von ungesättigten Fettsäuren zurückzuführen ist (Mene-Saffrane *et al.* 2007). Dies zeigte deutlich, dass Tocopherole eine spezifische Schutzfunktion gegen Lipidperoxidation besitzen (Sattler *et al.* 2004). Indem Tocopherole das Ausmaß einer Lipidperoxidation begrenzen, leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung der Integrität von Membranen.

Die antioxidative Wirkung der Tocopherole ist nicht allein auf die Beseitigung von Lipidperoxyradikalen beschränkt. So ist bekannt, dass auch reaktive Sauerstoffverbindungen wie Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) durch Tocopherole deaktiviert werden können (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996).  $^1\text{O}_2$  ist ein elektronisch angeregtes Sauerstoffmolekül, das während der Photosynthese in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten gebildet wird. Aufgrund seines elektrophilen Charakters ist  $^1\text{O}_2$  sehr reaktiv und kann ungesättigte Fettsäuren und Proteine oxidieren. Sind Pflanzen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, fördert dies eine Anreicherung von  $^1\text{O}_2$  im Photosystem II, wodurch es zu erhöhten Schäden am Photosyntheseapparat kommen kann (Krieger-Liszkay *et al.* 2008). Tocopherole können  $^1\text{O}_2$  inaktivieren, indem sie ihn über einen strahlungslosen Energietransfer wieder in molekularen Sauerstoff überführen (physikalisches *Quenching*) oder mit  $^1\text{O}_2$  in einer chemischen Reaktion zu Tocopherolchinon reagieren (chemisches *Quenching*, *Scavenging*) (Abb. 1-3). Beide Mechanismen laufen gleichzeitig ab, wobei der Prozess des physikalischen *Quenchings* überwiegt (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996).

Studien in Pflanzen und der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zeigten, dass insbesondere unter Starklichtbedingungen der Gehalt an  $\alpha$ -Tocopherolchinon ansteigt (Kruk *et al.* 2008). Weil Starklichtbedingungen zu einer vermehrten Bildung von  $^1\text{O}_2$  führen können, wurde geschlussfolgert, dass die Bildung von Tocopherolchinon auf die Reaktion der Tocopherole mit  $^1\text{O}_2$  zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Tocopherolhydrochinon als  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* wirksam sein kann und unter Starklichtbedingungen nach einer Reduktion von Tocopherolchinon durch Ascorbat entstehen kann (Gruszka *et al.* 2008). Daher scheinen nicht nur die Tocopherole, sondern auch noch deren Oxidationsprodukte bei der Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  mitzuwirken.

Welche Bedeutung die Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* im Photosystem II haben, wurde erstmals für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben (Trebst *et al.* 2002). Diese Studie zeigte, dass Grünalgen, die unter Starklichtbedingungen wachsen und bei denen die Tocopherolbiosynthese gehemmt ist, eine verminderte Effizienz des Photosystems II und einen verstärkten D1-Proteinabbau aufweisen. Die Zugabe löslicher Tocopherolderivate oder chemischer  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* führte zur Aufhebung der beobachteten Effekte. Dies führte zu der Annahme, dass Tocopherole obligatorisch für die Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  im Photosystem II bei Lichtstress sind (Kruk *et al.* 2005). Durch die Untersuchungen von Kruk *et al.* (2005) und Trebst *et al.* (2002) konnte Tocopherolen erstmals eine spezifische Funktion beim Schutz des D1-Proteins im Photosystem II bei Starklicht zugeordnet werden. In Höheren Pflanzen wurden bisher keine vergleichbaren Analysen durchgeführt. Es bleibt daher zu prüfen, ob und auf welche Weise Tocopherole in Pflanzen die Stabilität des D1-Proteins im Photosystem II gegenüber Starklicht beeinflussen können.

### 1.1.3.2 Nichtantioxidative Funktionen

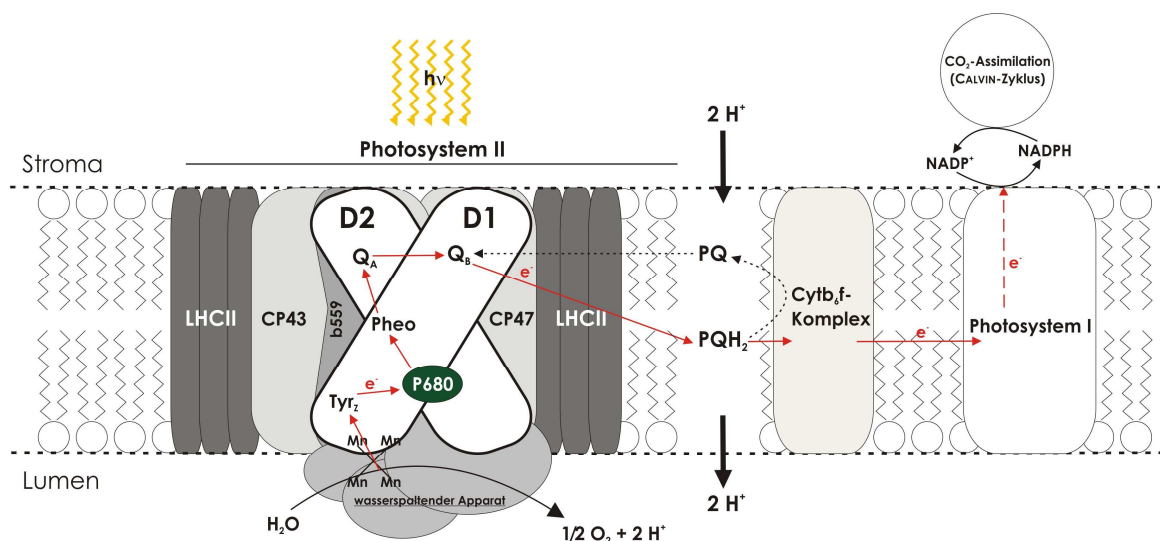
Untersuchungen an humanen und tierischen Zellen verweisen auf Wirkmechanismen der Tocopherole, die nicht durch ihre antioxidative Chemie erklärbar sind. Beispielsweise konnte für  $\alpha$ -Tocopherol eine regulatorische Funktion bei der Genexpression sowie eine Beteiligung an der Proteinkinase C Signalkaskade und der Bildung von Arachidonsäure nachgewiesen werden (Zingg 2007, Rimbach *et al.* 2010). Erste Hinweise auf eine Funktion der Tocopherole in Pflanzen, die über deren antioxidative Wirksamkeit hinausgeht, wurden durch Untersuchungen der *sxd1*-Mutante in Mais erhalten. Das *sxd1*-Gen in Mais hat eine ähnliche Sequenz wie das *vte1*-Gen in *Arabidopsis* und kodiert für eine Tocopherolzyklase. Bereits unter normalen Wachstumsbedingungen konnte in der *sxd1*-Mutante festgestellt werden, dass in Blättern, die von *sink* zu *source* wechselten, ein gestörter Export von Photoassimilaten vorliegt, infolgedessen in diesem Blattgewebe lösliche Zucker, Stärke und Anthocyane akkumulieren (Provencher *et al.* 2001). Dieser Effekt konnte auf eine Blockade des interzellulären Transportes über die Plasmodesmata parenchymatischer Phloemzellen zurückgeführt werden. Ähnliches wurde auch in transgenen SXD1-RNAi-Kartoffelpflanzen gezeigt (Hofius *et al.* 2004). Es wurde die Hypothese entwickelt, dass Tocopherole eine spezifische Funktion bei der Entwicklung von parenchymatischen Phloemzellen besitzen und dadurch den Photoassimilattransport zum Phloem beeinflussen können.

In den *vte1*- und *vte2*-Mutanten von *Arabidopsis* konnte ein ähnlicher Phänotyp nur bei Kühle induziert werden (Maeda *et al.* 2006). Dieser ging in Blättern der *vte1*- und *vte2*-Mutante mit einer veränderten Fettsäurezusammensetzung einher, die durch eine Abnahme der Menge an 18:3 Fettsäuren und einer Zunahme von 18:2 Fettsäuren charakterisiert war (Maeda *et al.* 2008). Hierbei wurde gezeigt, dass die Änderungen nur Fettsäurespezies betrafen, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden und an Phosphatidylcholin (PC-18:2) verestert sind. Diese Daten führten zu der Annahme, dass Tocopherole am extraplastidären Lipidstoffwechsel im ER beteiligt sind (Maeda *et al.* 2008). Jüngste Studien untermauern diese Annahme, da Doppelmутanten, die weder Tocopherole synthetisieren noch PC-18:2 bilden oder in die Chloroplasten importieren können (*vte2fad2*, *vte2tgd1*), den zuvor erwähnten kühleinduzierten Phänotyp nicht zeigen, sondern mit dem Wildtyp vergleichbar sind (Song *et al.* 2010).

## 1.2 Photosystem II – Funktion und Reparatur

### 1.2.1 Photoinhibierung

Licht ist die Antriebskraft der Photosynthese. Insbesondere hohe Lichtintensitäten können jedoch zu einer Photoinhibierung, d. h. zur Schädigung des Photosyntheseapparates, führen. Besonders anfällig gegenüber einer Photoinhibierung ist das Photosystem II (PSII) in den Thylakoiden der Chloroplasten. Das Photosystem II ist ein Pigment-Proteinkomplex, an dem die Reaktionen zur Wasserspaltung und Reduzierung der Plastochinone ablaufen. Die beteiligten Redoxkomponenten sowie das photochemisch aktive Chlorophyll P680 sind an ein Heterodimer gebunden, das aus dem D1- und D2-Protein besteht (Abb. 1-4).



**Abb. 1-4:** Vereinfachtes Modell des Photosystem II Komplexes in Pflanzen (in Anlehnung an Häder 1999). Der Elektronentransport ( $e^-$ ) ist durch rote Pfeile gekennzeichnet.

Die Anfälligkeit des Photosystems II gegenüber einer Photoinhibierung ist durch die direkte Nähe der beteiligten Redoxkomponenten zum Sauerstoff erklärbar. Sauerstoff wird während der Photosynthese fortlaufend gebildet und kann die Energie angeregter Chlorophylle übernehmen, wodurch Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) entsteht. Letzteres tritt verstärkt auf, wenn durch die auftreffende Lichtenergie die Kapazität des Elektronentransports die der  $CO_2$ -Assimilation übersteigt (Foyer 1997). Zentraler Angriffspunkt einer Photoinhibierung ist das D1-Protein im Reaktionszentrum des PSII. Das D1-Protein besitzt im Vergleich zu anderen Proteinen der Thylakoidmembran eine sehr hohe *turnover*-Rate und wird ständig abgebaut und wieder neu synthetisiert. Dies ist von zwingender Notwendigkeit, da beschädigte Reaktionszentren des Photosystems II nur durch den Abbau und die Neusynthese des D1-Proteins repariert werden können (Aro *et al.* 1993). Eine Photoinhibierung kommt bereits im Schwachlicht vor und tritt mit steigender Lichtintensität vermehrt auf, sodass fortwährend eine Reparatur des Photosystems II erforderlich ist (Tyystjärvi & Aro 1996).



Für eine Photoinhibierung und die sich daraus ergebenden Schäden am D1-Protein können Veränderungen der Redoxkomponenten an der Donorseite (wasserspaltender Apparat) und der Akzeptorseite ( $Q_A/Q_B$ ) des Photosystems II verantwortlich sein (Tyystjärvi 2008). Wird mehr Anregungsenergie absorbiert als durch die  $CO_2$ -Assimilation verbraucht werden kann, ist ein Rückstau der Elektronen an der Akzeptorseite des PSII möglich. Dies kann zur Überreduktion der Plastochinone und zur Bildung langlebiger reduzierter  $Q_A$  Moleküle führen. Der Ausfall des Plastochinons  $Q_A$  als Elektronenakzeptor kann dazu führen, dass oxidiertes P680 Chlorophyll ( $P680^+$ ) mit reduziertem Pheophytin ( $Pheo^-$ ) rekombiniert, wobei Triplet-Chlorophyll ( $^3P680^*$ ) entsteht.  $^3P680^*$  kann seine Anregungsenergie auf molekularen Sauerstoff übertragen und diesen in einen angeregten Singulettzustand überführen. Es entsteht Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), der hauptsächlich die Schäden am D1-Protein verursacht (Krieger-Liszkay *et al.* 2008). Wenn der wasserspaltende Apparat inaktiviert wird und dadurch der Elektronentransport vom Wasser zum Tyrosin im D1-Protein ( $Tyr_z$ ) bzw. dem zentralen Chlorophyll P680 unterbrochen wird, kann auch eine Photoinhibierung an der Donorseite des Photosystems II auftreten. Tyrosin kann nicht mehr reduziert werden und fällt als Elektronendonator für oxidiertes P680 ( $P680^+$ ) aus. Es kommt zu einer Anreicherung von  $P680^+$  Molekülen, die ähnlich  $Tyr_z^+$  starke Oxidationsmittel sind und zu einer Schädigung des D1-Proteins beitragen können (De Las Rivas *et al.* 1992).

Um das Auftreten einer Photoinhibierung und die Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies zu begrenzen, haben Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt (Niyogi 1999). Hierzu zählt beispielsweise die thermische Ableitung der Anregungsenergie von den Chlorophyllen in den Antennenkomplexen, was als nichtphotochemisches *Quenching* (NPQ) bekannt ist und über die Deepoxidation von Violaxanthin zu Zeaxanthin und das PsbS-Protein im PSII vermittelt wird (Müller *et al.* 2001). Zeaxanthin besitzt zudem antioxidative Eigenschaften und kann wie die Tocopherole an der Beseitigung von  $^1O_2$  in den Thylakoiden beteiligt sein (Havaux *et al.* 2005, 2007). Im Chloroplasten produzierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können darüber hinaus enzymatisch mithilfe von Peroxidasen oder Superoxiddismutasen sowie durch wasserlösliche Antioxidantien wie z. B. Ascorbat und Glutathion inaktiviert werden (Apel & Hirt 2004). Das Ausmaß des oxidativen Schadens am Photosystem II und in der Thylakoidmembran hängt entscheidend von der Aktivität der antioxidativen Systeme ab. Trotz der vielfältigen Schutzmechanismen kommt es bei einer Photoinhibierung zur Schädigung des Photosystems II. Weil inaktivierte Reaktionszentren mit beschädigtem D1-Protein nur über dessen Abbau und Ersatz durch ein neu synthetisiertes D1-Protein reaktiviert werden können (Aro *et al.* 1993), kann die Regeneration des D1-Proteins (D1-Protein-*turnover*) unter Starklichtbedingungen zu einem limitierenden Faktor der Photosynthese werden.

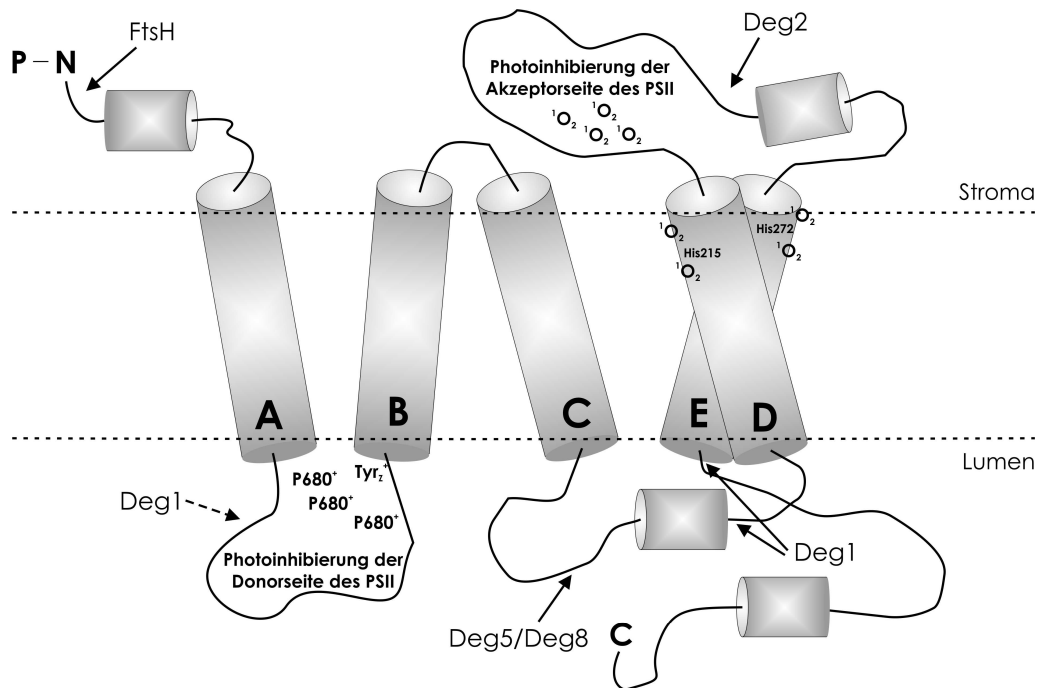
## 1.2.2 Produktion und Wirkung von $^1\text{O}_2$

In Pflanzen wird  $^1\text{O}_2$  hauptsächlich infolge der Energieübergänge zwischen molekularem Sauerstoff und Triplet-Chlorophyll ( $^3\text{P680}^*$ ,  $^3\text{Chl}^*$ ) im Photosystem II gebildet (Triantaphylides & Havaux 2009). Es wurde nachgewiesen, dass eine Starklichtexposition von Pflanzen, die an moderate Lichtintensitäten angepasst sind, das Auftreten einer Photoinhibierung begünstigt und die Produktion von  $^1\text{O}_2$  in diesen Pflanzen steigert (Havaux *et al.* 2005, Hideg *et al.* 1998).  $^1\text{O}_2$  kann in Pflanzen auch durch Inkubation mit lichtsensitiven Chemikalien wie z. B. Eosin und Bengalrosa (Knox & Dodge 1985, Hideg *et al.* 2007) sowie durch die Einwirkung phenolischer Herbizide (Fufezan *et al.* 2002) gebildet werden. Kommt es hierbei durch  $^1\text{O}_2$  zur irreversiblen oxidativen Schädigung der Reaktionszentren, kann dies auch ohne zusätzliche Einwirkung von Starklichtbedingungen zu einer Photoinhibierung führen. Demnach kann die Bildung von  $^1\text{O}_2$  sowohl eine Ursache als auch eine Folge einer Photoinhibierung im Photosystem II sein. Um die Funktion des Photosystems II zu erhalten, ist daher stets eine schnelle Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  notwendig.

Da  $^1\text{O}_2$  in direkter Nähe zum photochemisch aktiven Chlorophyll P680 entstehen kann, ist vor allem das D1-Protein von einer Oxidation durch  $^1\text{O}_2$  betroffen. So wurde unter dem Einfluss von Starklicht und lichtsensitiver Chemikalien gezeigt, dass  $^1\text{O}_2$  den oxidativen Schaden am D1-Protein erhöht (Trebst *et al.* 2002, Okada *et al.* 1996).

Wird das D1-Protein durch  $^1\text{O}_2$  oxidiert, kann dies zu Veränderungen einzelner Aminosäuren bis hin zur Spaltung von Peptidbindungen innerhalb des D1-Proteins führen (Okada *et al.* 1996, Lupinkova & Komenda 2004). So waren unter Bedingungen, die eine Photoinhibierung an der Akzeptorseite des Photosystems II und damit die Bildung von  $^1\text{O}_2$  begünstigen, D1-Proteinfragmente nachweisbar, deren molekulare Massen auf eine Spaltung des D1-Proteins zwischen den Transmembrandomänen D und E hindeuteten (De Las Rivas *et al.* 1992).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Aminosäure Histidin (His-215, His-272) in den dem Stroma zugewandten Bereichen der Transmembrandomänen D und E des D1-Proteins durch  $^1\text{O}_2$  oxidiert werden kann (Okada *et al.* 1996). Eine Spaltung des D1-Proteins an diesen Stellen führte zur Bildung von 22-24 kDa großen N-terminalen sowie 16 kDa und 8 kDa großen C-terminalen Fragmenten des D1-Proteins (Abb. 1-5). Das Auftreten dieser D1-Spaltprodukte deutete darauf hin, dass  $^1\text{O}_2$  zur spezifischen Spaltung des D1-Proteins führen kann. Wenn eine Photoinhibierung im Photosystem II an der Donorseite erfolgte, konnten 24 kDa große C-terminale und 10 kDa große N-terminale D1-Proteinfragmente nachgewiesen werden (De Las Rivas *et al.* 1992), die vermutlich durch eine Spaltung der im Lumen lokalisierten Schleife zwischen den Transmembrandomänen A und B des D1-Proteins entstehen (Abb. 1-5).



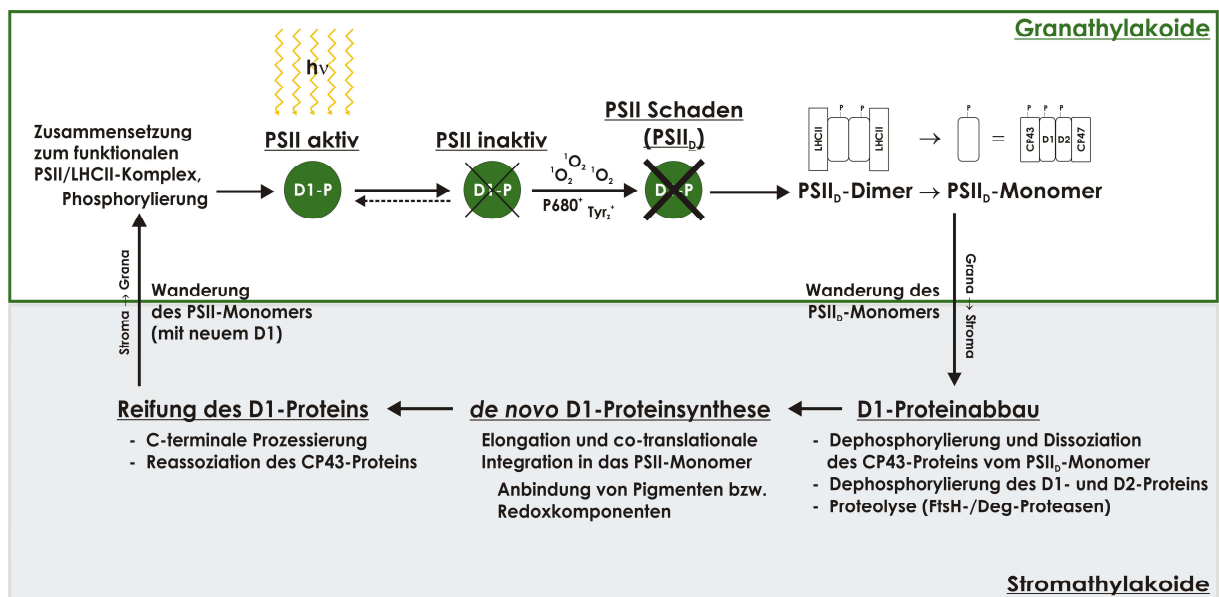
**Abb. 1-5:** Anordnung transmembranärer Domänen (A – E) des D1-Proteins in der Thylakoidmembran. Bekannte Proteasen, die den proteolytischen Abbau des D1-Proteins katalysieren und deren mögliche Angriffspunkte sind durch Pfeile gekennzeichnet (Kato & Sakamoto 2009). Außerdem ist die N-terminale Phosphorylierungsstelle (P) des D1-Proteins angegeben. Zusätzlich sind in vereinfachter Weise die Stellen gekennzeichnet, an denen die initiale Spaltung des D1-Proteins durch  $^1\text{O}_2$  bzw. anderer Oxidantien vermutet wird (De Las Rivas *et al.* 1992, Okada *et al.* 1996).

Aufgrund der begrenzten Lebensdauer ( $3,5 \mu\text{s}$  in Wasser,  $9 \mu\text{s}$  in einer Lipidsuspension) und Diffusionsreichweite von  $^1\text{O}_2$  (Baier *et al.* 2005), ist dessen oxidative Wirksamkeit hauptsächlich auf die dem Photosystem II angrenzende Umgebung beschränkt. Bei Starklicht wurde jedoch auch eine extraplastidäre Ausbreitung von  $^1\text{O}_2$  postuliert (Fischer *et al.* 2007). Untersuchungen mit der *flu*-Mutante von *Arabidopsis* zeigten auf, dass  $^1\text{O}_2$  nicht nur zerstörend wirkt, sondern auch als Signalmolekül zwischen Chloroplasten und Zellkern fungieren kann (Kim *et al.* 2008). An dieser Mutante wurde festgestellt, dass eine erhöhte Bildung von  $^1\text{O}_2$  mit der Expression spezifischer Gene im Zellkern einhergeht, die für Proteine kodieren, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind oder als Transkriptionsfaktoren wirken (op den Camp *et al.* 2003).

Schließlich hängt das Ausmaß des durch  $^1\text{O}_2$  verursachten oxidativen Schadens auch davon ab, inwiefern antioxidative Systeme zur Deaktivierung von  $^1\text{O}_2$  vorhanden sind. Obwohl Pflanzen eine Vielzahl von Antioxidantien besitzen, die  $^1\text{O}_2$  inaktivieren können, sind bis auf Carotinoide und Tocopherole nur wenige davon in der Thylakoidmembran lokalisiert (Triantaphylides & Havaux 2009).

### 1.2.3 D1-Protein-turnover

Das D1-Protein im Reaktionszentrum des Photosystems II ist eines der am meisten untersuchten Proteine des Photosyntheseapparates, dessen Funktion dennoch bis heute nicht vollständig verstanden ist. Zusammen mit dem D2-Protein bildet es das zentrale Proteindimer im Reaktionszentrum des Photosystems II und initiiert als Wasser-Plastochinon-Oxidoreduktase den primären Elektronentransport. Es gilt aber auch als eine der anfälligsten Komponenten des Photosystems II gegenüber einer Photoinhibierung und oxidativen Schäden bei Starklicht (Aro *et al.* 1993). Die Tatsache, dass eine langanhaltende Starklichtexposition zwar die Schädigung des D1-Proteins erhöhen kann, aber gewöhnlich zu keinem totalen Ausfall der Photosyntheseleistung einer Pflanze führt, kann unter anderem auf den schnellen und effizienten Austausch von beschädigtem D1-Protein durch eine neue Kopie zurückgeführt werden (Aro *et al.* 2004). Diese Regeneration des D1-Proteins ist ein streng regulierter und koordinierter Prozess, der auch als D1-Protein-turnover bezeichnet wird (Aro *et al.* 1993, Melis 1999). Bis heute ist der turnover des D1-Proteins im Einzelnen noch immer nicht vollständig aufgeklärt.



**Abb. 1-6:** Schematische Darstellung des D1-Protein-turnovers ausgehend von einer durch Starklicht hervorgerufenen Inaktivierung des Photosystems II (PSII) (Zusammenfassende Darstellung nach Baena-Gonzales *et al.* 1999, Aro *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2000).

Wird das D1-Protein durch den Angriff von  $^1O_2$  oder anderer Oxidationen beschädigt, verliert es seine Funktion, was zu einer dauerhaften Inaktivierung des Reaktionszentrums und damit des gesamten jeweils betroffenen Photosystem II Komplexes führt. Um die Funktion des Photosystems II wiederherzustellen, muss das beschädigte D1-Protein zunächst proteolytisch abgebaut und anschließend durch eine neu synthetisierte Kopie ersetzt werden (Aro *et al.* 1993). Während die lichtgetriebene Schädigung des D1-Proteins in den Granathylakoiden

erfolgt, finden die Proteolyse und Neusynthese des D1-Proteins in den Stromathylakoiden der Chloroplasten statt (Aro *et al.* 2004). Daher ist zunächst ein Transport des beschädigten D1-Proteins aus den Grana- zu den Stromathylakoiden notwendig. Dieser wird eingeleitet, indem sich das in den Granathylakoiden vorwiegend als Dimer organisierte Photosystem II (PSII<sub>α</sub>) in eine Form auflöst, die nur noch aus einem D1-/D2-Heterodimer sowie der daran gebundenen Antennenproteine CP43 und CP47 besteht und als PSII-Monomer (PSII<sub>β</sub>) bezeichnet wird (Abb. 1-6) (Baena-Gonzalez *et al.* 1999). Da in Untersuchungen an isolierten Chloroplasten von *Arabidopsis* gezeigt wurde, dass unter Starklichtbedingungen ausschließlich monomeres PSII in den Stromathylakoiden zu finden ist, wird angenommen, dass nur die monomere Form des PSII entlang der Membran aus den Grana- zu den Stromathylakoiden wandern kann (Aro *et al.* 2004). Wie eine solche Wanderung erfolgt, ist indes nur wenig verstanden. Hierbei wird vermutet, dass sich unter Starklichtbedingungen der Abstand zwischen den Thylakoiden im Granastapel geringfügig vergrößert, wodurch die Wanderung der PSII-Monomere erleichtert und in der Folge der *turnover* des D1-Proteins gefördert wird (Khatoon *et al.* 2009).

Wenn monomeres Photosystem II in den Stromathylakoiden vorliegt, erfolgt eine schrittweise Dephosphorylierung der CP43, D1- und D2-Proteine (Baena-Gonzalez *et al.* 1999). Hierbei wird zunächst das CP43-Protein dephosphoryliert, wodurch es sich ablöst und das D1-Protein für die Proteolyse zugänglich macht. Damit beschädigtes D1-Protein vollständig proteolytisch abgebaut werden kann, muss es dephosphoryliert werden (Koivuniemi *et al.* 1995, Rintamäki *et al.* 1996). Es wird angenommen, dass die Abbaurrate über die reversible Phosphorylierung des D1-Proteins reguliert werden kann. Unter Bedingungen, bei denen kein schneller Ersatz des D1-Proteins durch Neusynthese möglich ist, könnte beschädigtes D1-Protein durch eine Phosphorylierung im Photosystem II stabilisiert werden (Edelmann & Matoo *et al.* 2008).

Untersuchungen an *Arabidopsis* zeigten, dass hauptsächlich FtsH- und Deg-Proteasen (vgl. Abb. 1-5) am proteolytischen Abbau des D1-Proteins beteiligt sind (Kato & Sakamoto 2009).

Das D1-Protein wird durch das plastidäre Gen *psbA* kodiert und an Polysomen translatiert, die an die Thylakoidmembran gebunden sind. Dabei wird das neu synthetisierte D1-Protein co-translational in das teilweise aufgegliederte, membrangebundene PSII-Monomer eingebaut (Zhang *et al.* 1999). Das D2-Protein scheint hierbei eine Funktion als Rezeptor für das sich neu bildende D1-Protein zu besitzen (Zhang *et al.* 2000). Während der Elongation des D1-Proteins erfolgt auch die Bindung von Pigmenten und Redoxkomponenten durch das D1-Protein (Zhang *et al.* 1999). Um ein voll funktionsfähiges Photosystem II Reaktionszentrum aufzubauen, sind des Weiteren *post*-translationale Veränderungen der Photosystem II Proteine notwendig. Dazu zählen die Wiederanbindung des CP43-Proteins und die Prozessierung des C-terminalen Aminosäurerests der Vorstufe des D1-Proteins (pD1) (van Wijk *et al.* 1997, Zhang & Aro 2002).

Übersteigt die Schädigung am D1-Protein die Möglichkeiten zu dessen Regeneration, werden Abtransport, proteolytischer Abbau und Ersatz des D1-Proteins durch Neusynthese zu einem

limitierenden Faktor bei der Erhaltung der Funktion des PSII. Dieser Zustand kann insbesondere unter Starklichtbedingungen auftreten. Während bereits eine 30-minütige Starklichtexposition zu irreversiblen Schäden am D1-Protein und damit am Photosystem II führen kann, wird für die Regeneration des D1-Proteins (D1-Protein-*turnover*) eine ungefähre Halbwertszeit von einer Stunde (Neidhardt *et al.* 1998, Melis 1999) angenommen. Um das Risiko eines vollständigen Verlusts des Photosystems II zu minimieren, müssen Abbau und Neusynthese des D1-Proteins durch verschiedene Regulationsmechanismen gut koordiniert werden.

#### 1.2.4 Möglichkeiten zur Regulation des D1-Protein-*turnovers*

Da die Effizienz des D1-Protein-*turnovers* im Wesentlichen von der Geschwindigkeit verschiedener Prozesse - proteolytischer Abbau, *de novo* D1-Proteinsynthese - abhängt, sind insbesondere an diesen Stellen regulatorische Mechanismen zu erwarten. So kann z. B. Licht eine wichtige Rolle bei der Regulation einzelner Schritte der D1-Proteinsynthese spielen. Die Transkription des plastidären *psbA*-Gens, welches für das D1-Protein im Photosystem II kodiert, wird durch die plastidäre RNA-Polymerase (PEP) vermittelt. Damit das *psbA*-Gen transkribiert werden kann, ist eine spezifische Untereinheit der PEP erforderlich, welche als Sigmafaktor bezeichnet wird (s. 1.3). Für *Arabidopsis* sind mehrere Sigmafaktoren beschrieben, die die Transkription des *psbA*-Gens steuern können und deren kodierende Gene lichtabhängig exprimiert werden (Schweer *et al.* 2010).

Während die *psbA*-Transkriptmenge nur wenig variiert, konnte gezeigt werden, dass Licht die Translation der *psbA*-mRNA stimuliert (Klein & Mullet 1987) und zu einer Zunahme der Menge thylakoidgebundener *psbA*-mRNA-Polysomen führt (Kettunen *et al.* 1997). Des Weiteren sind RNA-Bindeproteine beschrieben, die an die 5'-UTR Region der *psbA*-mRNA binden und die Translationsinitiation fördern können (Shen *et al.* 2001, Marin-Navarro *et al.* 2007). Andere Untersuchungen zeigten, dass auch die Elongation des D1-Proteins sowie *post*-translationale Prozesse reguliert sind (Zhang & Aro 2002). So wurde beispielsweise an isolierten Chloroplasten von Spinat festgestellt, dass die Elongation des D1-Proteins von Redoxsignalen beeinflusst wird, die mit der Aktivität des Photosystems I verbunden sind (Zhang *et al.* 2000).

Ein weiterer wichtiger Regulationsmechanismus ist die reversible Phosphorylierung des D1-Proteins. Experimentell belegt ist bisher, dass eine Dephosphorylierung des D1-Proteins den proteolytischen Abbau und damit den *turnover* des D1-Proteins einleitet (Rintamäki *et al.* 1996, Koivuniemi *et al.* 1995). Die Phosphorylierung des D1-Proteins wird durch Licht und endogene Rhythmen reguliert (Booij-James *et al.* 2002). Untersuchungen dazu zeigten, dass insbesondere unter Starklichtbedingungen die Menge an phosphoryliertem D1-Protein erhöht ist (Rintamäki *et al.* 1996). Das geschädigte D1-Protein scheint durch eine Phosphorylierung solange in den inaktiven Photosystem II Komplexen festgehalten zu werden, bis die Kapazität zur Proteolyse und co-translationalen Neusynthese ausreicht. Außerdem konnte in *Arabidopsis*

gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung weiterer Proteine des beschädigten PSII, vor allem der CP43- und D2-Proteine, zur Stabilisierung der PSII-Monomere bei ihrer Wanderung zu den Stromathylakoiden wichtig ist (Tikkanen *et al.* 2008). Bisher ist unklar, welcher Mechanismus der Wanderung von PSII-Monomeren durch die Thylakoidmembran zugrunde liegt. Darüber hinaus ist nicht belegt, ob der *turnover* des D1-Proteins durch eine Änderung der Fluidität der Thylakoidmembran reguliert werden kann.

### 1.3 Sigmafaktoren

Chloroplasten Höherer Pflanzen sind semiautonome Organellen, die evolutionsgeschichtlich von Cyanobakterien abstammen. Sie besitzen nur ein rudimentäres Genom mit ca. 120 Genen, die hauptsächlich für rRNA, tRNA und Proteine des Photosyntheseapparates kodieren. Andere für die Funktion der Chloroplasten wichtige Proteine werden im Zellkern kodiert. Die Transkription plastidärer Gene erfolgt durch eine plastidär kodierte RNA-Polymerase (PEP) eubakteriellen Typs und eine kernkodierte mit der von T3/T7-Bakteriophagen verwandten RNA-Polymerase (NEP) (Liere & Börner 2006). Die PEP ist ein Multienzymkomplex aus vier zentralen Proteinuntereinheiten ( $\alpha, \beta, \beta', \beta''$ ) und einem austauschbaren Sigmafaktor, der für die Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation der PEP notwendig ist. Während Gene für die PEP-Proteinuntereinheiten (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) auf dem Plastidengenom lokalisiert sind, werden Sigmafaktoren im Zellkern kodiert. Bis heute konnten in *Arabidopsis thaliana* sechs verschiedene Sigmafaktoren (SIG1 – SIG6) identifiziert werden (Schweer *et al.* 2010). Phylogenetische Untersuchungen und Sequenzvergleiche zeigten, dass die Sigmafaktoren von Pflanzen in ihrer Struktur und Spezifität für bestimmte Promotorelemente mit Transkriptionsfaktoren der  $\sigma^{70}$ -Proteinfamilie in Bakterien verwandt sind (Shiina *et al.* 2006). Ähnlich dem *E. coli*  $\sigma^{70}$ -Promotortypus besitzen Promotorbereiche von Genen, die durch die PEP transkribiert werden, charakteristische Erkennungssequenzen an den Positionen -10 (TATAAT) und -35 (TTGACA) aufwärts des Startpunktes zur Initiation der Transkription (Shiina *et al.* 2006).

Sigmafaktoren in Bakterien sind  $\sigma^{70}$ - und  $\sigma^{54}$ -Proteinfamilien zugeordnet, wobei erstere zusätzlich in weitere Untergruppen (Gruppe I – IV) eingeteilt werden (Osanaï *et al.* 2008). In *Synechocystis* sp. PCC 6803 sind neun Gene für Sigmafaktoren bekannt, die für jeweils einen Sigmafaktor der Gruppe I (SIGA) und Gruppe III (SIGF) kodieren sowie für vier Sigmafaktoren der Gruppe II (SIGB - SIGE) und drei der Gruppe IV (SIGG – SIGI) (Osanaï *et al.* 2008). Durch einen Vergleich der Genome verschiedener Stämme von Cyanobakterien wurde festgestellt, dass das für den Sigmafaktor SIGE kodierende Gen *sll1689* nur in den Cyanobakterien vorkommt, die auch Tocopherole synthetisieren können (Backasch 2008) (Tab. 1-1). Bisher ist nicht bekannt, warum ausschließlich Tocopherole produzierende Cyanobakterien den Sigmafaktor SIGE besitzen.

**Tab. 1-1:** Gene, die ausschließlich in Stämmen von Cyanobakterien vorkommen, welche Tocopherole synthetisieren können. Die Daten sind in einer vereinfachten Darstellung aus BAKASCH (2008) entnommen. Der Vergleich der Genome verschiedener Stämme von Cyanobakterien wurde mithilfe der Datenbank der Firma BioLingua® Research Inc. durchgeführt. Rot hervorgehoben ist das Gen *slI1689*, welches für den Sigmafaktor SIGE in *Synechocystis* sp. PCC 6803 kodiert.

Gen	Bezeichnung des Proteins in der Datenbank Cyanobase
<b>Tocopherolbiosynthese</b>	
<i>slr1736</i>	Homogentisat-Phytyltransferase
<i>slr0090</i>	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
<i>slr0089</i>	$\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase
<b>Weitere Proteine</b>	
<i>slr0918</i>	Methionin-Aminopeptidase
<i>slr0599</i>	Serin/Threonin-Kinase
<i>slr0535</i>	Protease
<i>slI1703</i>	Protease IV
<i>slr1077</i>	mögliche Glycosyl-Transferase
<i>slI1971</i>	mögliche Hexosyl-Transferase
<i>slr0493</i>	Mannose-1-Phosphat-Guanylyltransferase ähnlich
-	weitere 14 hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion
<b>Transkription</b>	
<b><i>slI1689</i></b>	<b>Gruppe 2 RNA-Polymerase Sigmafaktor SIGE (<i>sigE</i>, <i>rpoD2-V</i>)</b>

In *Synechocystis* sp. PCC 6803 ist SIGE als ein Sigmafaktor bekannt, der für das Wachstum und Überleben bei Stickstoffmangel erforderlich ist (Muro-Pastor *et al.* 2001). In anderen Analysen konnte festgestellt werden, dass Mutanten mit einem defekten *sigE*-Gen weniger Transkripte von Genen, die für Proteine des Zuckerstoffwechsels wie z. B. *gap1*, *pyk1* kodieren, aufweisen als der Wildtyp (Osana *et al.* 2005). Diese Mutanten zeigten außerdem ein vermindertes Wachstum unter mixotrophen Bedingungen mit Glucose im Anzuchtmedium (Pollari *et al.* 2008). Der Sigmafaktor SIGE scheint daher auch für die Regulation des Zuckerkatabolismus in *Synechocystis* sp. PCC 6803 notwendig zu sein. Darüber hinaus ist SIGE an der lichtinduzierten Transkription von Genen für Photosyntheseproteine wie *psbA2*, *petBD* oder *psaAB* beteiligt (Yoshimura *et al.* 2007).

Auch in Höheren Pflanzen wurde untersucht, ob Sigmafaktoren eine spezifische Funktion besitzen können. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass für die frühe Keimlings- und Chloroplastenentwicklung vor allem die Sigmafaktoren SIG2 und SIG6 notwendig sind (Privat *et al.* 2003, Ishizaki *et al.* 2005). Hingegen ist bei abiotischem Stress hauptsächlich SIG5 aktiv (Nagashima *et al.* 2004b). Vergleichende Untersuchungen zwischen Pflanzen des Wildtyps und Mutanten von *Arabidopsis*, denen bestimmte Sigmafaktoren fehlen, sowie *in vitro* Promotorbindestudien lieferten Erkenntnisse über die Präferenz der Sigmafaktoren für spezifische Promotoren von durch die PEP-transkribierten Genen. So konnte nachgewiesen



werden, dass SIG2 die Transkription der *trnE*-, *trnV*- und *trnD*-Gene sowie des plastidären *psbA*-Gens steuert (Kanamaru *et al.* 2001, Privat *et al.* 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Transkription des *ndhF*-Gens durch den Sigmafaktor SIG4 (Favory *et al.* 2005) sowie die des *psbD*-Gens durch SIG5 reguliert wird (Nagashima *et al.* 2004b).

Eine wichtige Rolle für die Chloroplastenentwicklung und bei der Anpassung an abiotischen Stress wird den Sigmafaktoren SIG2 bzw. SIG5 zugesprochen (Hanaoka *et al.* 2005, Kanamaru & Tanaka 2004). So weisen Mutanten mit einem Ausfall des *sig2*-Gens einen reduzierten Chlorophyllgehalt sowie ein verringertes Wachstum auf und besitzen nur kleine Chloroplasten mit unterentwickelten Thylakoiden (Kanamaru *et al.* 2001, Privat *et al.* 2003). Dieser Phänotyp wurde auf einen stark verminderten Gehalt an *trnE*-mRNA in diesen Pflanzen zurückgeführt. Das *trnE*-Gen kodiert für Glutamyl-tRNA, welche zum einen für die Translation erforderlich ist und zum anderen als ein Substrat zur Synthese von 5-Aminolävulinsäure dient, einer Vorstufe der Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen. Da SIG2 an der Transkription des *psbA*-Gens beteiligt ist (Privat *et al.* 2003), könnte die Aktivität von SIG2 auch für den *turnover* des D1-Proteins im Photosystem II wichtig sein.

Der Sigmafaktor SIG5 ist an der Transkription des *psbD*-Gens beteiligt, das für das D2-Protein im Reaktionszentrum des Photosystems II kodiert (Nagashima *et al.* 2004b). Für *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass die Expression des *sig5*-Gens durch Blaulicht induziert wird (Onda *et al.* 2008). Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Expression des *sig5*-Gens bei einer Vielzahl von abiotischen Stressbedingungen wie Starklicht, Kühle- und Salzstress gesteigert ist (Nagashima *et al.* 2004b).

## 1.4 Membranen der Chloroplasten

### 1.4.1 Architektur und Heterogenität der Thylakoide

Neben der äußeren und inneren Hüllmembran besitzen die Chloroplasten Höherer Pflanzen ein drittes, sehr komplexes Membransystem, die Thylakoidmembran. Thylakoidmembranen treten in zwei unterschiedlichen Strukturen auf, den Stroma- und Granathylakoiden, die sich zusätzlich in ihrer Funktion unterscheiden. Im Unterschied zu den Stromathylakoiden sind die Granathylakoide in Stapeln aus dicht übereinander liegenden Thylakoidmembranen organisiert (Häder 1999). Unterschiede in ihrer Funktion sind vor allem durch die heterogene Verteilung der Pigment-Proteinkomplexe des Photosyntheseapparates bedingt. So ist der PSII/LHCII-Komplex hauptsächlich in den Grana zu finden (75 – 80 % des gesamten PSII), während das Photosystem I und die ATP-Synthase in den Stromathylakoiden vorkommen (Aro *et al.* 2004). Außerdem tritt in den Stromathylakoiden monomeres Photosystem II auf, dessen Menge insbesondere unter Starklichtbedingungen mit dem *turnover* des D1-Proteins zunimmt (Aro *et al.* 2004). Aufgrund der räumlichen Trennung beider Photosysteme sowie des

Unterschiedes zwischen Funktions- und Syntheseort des D1-Proteins (vgl. 1.2.3) ist sowohl für den Ablauf der Photosynthese als auch für den *turnover* des D1-Proteins eine schnelle laterale Diffusion von Proteinen bzw. Redoxkomponenten in der Thylakoidmembran erforderlich. Es ist denkbar, dass bei abiotischen Stressbedingungen die Fluidität der Thylakoidmembran ein limitierender Faktor ist.

Die Möglichkeit, Granastapel auszubilden und diese in ihrer Anzahl und Membrandichte an die jeweilige Lichtbedingung anpassen zu können, erscheint für eine Vielzahl von Funktionen vorteilhaft (Chow *et al.* 2005). Beispielsweise besteht die Annahme, dass eine Veränderung des Abstandes einzelner Granathylakoidmembranen zueinander das Photosystem II vor einer Photoinhibierung schützt und zur Regulation des D1-Protein-*turnovers* beiträgt (Khatoon *et al.* 2009, Anderson & Aro 1994). Ob sich die in diesen Untersuchungen *in vitro* beobachteten Änderungen der Granastapelstruktur auch in intakten Pflanzen auf den *turnover* des D1-Proteins auswirken können, ist unbekannt.

#### 1.4.2 Lipide und Fettsäuren

Sowohl die Hüllmembranen als auch die Thylakoidmembran der Chloroplasten besitzen eine spezifische Lipidzusammensetzung, die sich von der anderer Zellmembranen unterscheidet. Bis auf wenige Phospholipide sind die Membranen der Chloroplasten hauptsächlich aus Galaktolipiden zusammengesetzt (Tab. 1-2). Außerdem sind lipidähnliche Komponenten wie Carotinoide, Chlorophylle und Tocopherole in den plastidären Membranen zu finden (Tab. 1-3). Die Thylakoidmembran ist mit zahlreichen Membranproteinen durchsetzt, die vorwiegend dem Photosyntheseapparat zugeordnet sind. Dadurch weisen Thylakoide im Vergleich zu den Hüllmembranen ein höheres Protein/Lipid-Verhältnis auf (Tab. 1-3). Die einzelnen Lipide sind mit verschiedenen Fettsäurespezies verestert, zu denen in den Thylakoidmembranen hauptsächlich dreifach ungesättigte 16:3 und 18:3 Fettsäuren zählen.

An der Biosynthese von Membranlipiden und Fettsäuren in Höheren Pflanzen sind sowohl Chloroplasten als auch das Endoplasmatische Retikulum (ER) beteiligt. Während im ER vor allem Phospholipide gebildet werden, können Galaktolipide und 16:3 Fettsäuren nur im Chloroplasten synthetisiert werden. Zwischen beiden Zellkompartimenten besteht ein intensiver Austausch von Lipiden bzw. Fettsäuren. So dient beispielsweise im ER synthetisiertes Phosphatidylcholin als Substrat zur Galaktolipidsynthese im Chloroplasten, wohingegen Fettsäuren aus dem Chloroplasten mit Phospholipiden im ER verestert werden (Benning 2009). Untersuchungen an Spinatblättern zeigten, dass sich die Fettsäurezusammensetzung mit dem täglichen Licht-/Dunkelrhythmus verändert (Browse *et al.* 1981). Hierbei konnte mit steigender Tageslänge eine Zunahme der Menge an 18:1 Fettsäuren bei gleichzeitiger Verringerung des 18:3-Fettsäuregehaltes beobachtet werden.

**Tab. 1-2:** Glycerolipidzusammensetzung in Blättern, Chloroplasten und nichtplastidären Membranen von *Arabidopsis thaliana*. Die Daten sind entnommen aus BONAVENTURE *et al.* (2003) und BROWSE & SOMERVILLE (1994). Die vollständigen Namen der einzelnen Glycerolipidklassen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen. n. d. – nicht detektiert

Glycerolipidklasse	Blatt (mol %)	Chloroplast (mol %)	nichtplastidär (mol %)
MGDG	35,5	53,7	n. d.
DGDG	20,2	20,9	n. d.
SQDG	4,3	3,9	n. d.
PG	12	9,5	4,4
PC	11,2	12,0	47,8
PE	10	n. d.	36,5
PI + PS	6,4	n. d.	10,9

**Tab. 1-3:** Vorkommen von Lipiden und lipidähnlichen Komponenten in der äußeren und inneren Hüllmembran sowie in Thylakoiden von Chloroplasten aus Spinat. Die Daten stammen in Teilen aus BLOCK *et al.* (2007). <sup>a</sup>nach DÖRMANN (2005), n. d. – nicht detektiert

Lipide und lipidähnliche Komponenten	äußere Hüllmembran	innere Hüllmembran	Thylakoide
Polare Lipide (mg mg <sup>-1</sup> Protein)	2,5 – 3	1	0,6 – 0,8
<u>Polare Lipide (% von Gesamt)</u>			
MGDG	17	55	57
DGDG	29	29	27
SQDG	6	5	7
PC <sup>a</sup>	32	6	4,5
PG	10	9	7
PI	5	1	1
PE	0	0	0
Chlorophylle (µg mg <sup>-1</sup> Protein)	n. d.	n. d.	160
Carotinoide (µg mg <sup>-1</sup> Protein)	2,9	7,2	20
Prenylchinone (µg mg <sup>-1</sup> Protein)	4 – 12	4 – 11	4 – 7
<u>Prenylchinone (% von Gesamt)</u>			
α-Tocopherol + α-Tocochinon	81	67	24

Die Fluidität einer Membran wird durch die Eigenschaften ihrer jeweiligen Fettsäuren und Lipide beeinflusst. Membranlipide können in zwei verschiedenen physikalischen Zuständen vorliegen, die als kristalline Phase ( $L_{\beta}$ , Gelpphase) bzw. flüssigkristalliner Zustand ( $L_{\alpha}$ ) bezeichnet werden. Der Übergang zwischen beiden Zuständen ist temperaturabhängig. Unter physiologischen Bedingungen liegen die meisten Membranbereiche im flüssigkristallinen Zustand vor, wobei die Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren weitgehend ungeordnet vorliegen und die freie Beweglichkeit von Proteinen oder Lipiden in der Ebene der Membran ermöglichen.

Die Anordnung von Membranlipiden innerhalb der Membran kann auch die Funktion von Proteinen beeinflussen. Ein Beispiel dafür ist Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), das den Hauptanteil an den Galaktolipiden der Thylakoidmembran hat und vorwiegend mit dreifach

ungesättigter  $\alpha$ -Linolensäure (18:3) und 16:3 Fettsäuren verestert ist. Hohe Anteile an MGDG in bestimmten Bereichen der Thylakoidmembran fördern die Ausbildung von sogenannten hexagonalen Strukturen ( $H_{II}$ ), welche die Aktivierung des Enzyms Violaxanthin-Deepoxidase begünstigen können (Jahns *et al.* 2009). Neben MGDG ist Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in der Thylakoidmembran angereichert, an welches hauptsächlich 18:3 und 16:0 Fettsäuren verestert sind.

Außer durch Membranlipide kann die Stabilität und Fluidität der Thylakoidmembran auch durch lipidähnliche Substanzen wie  $\alpha$ -Tocopherol oder Zeaxanthin beeinflusst werden. So wird angenommen, dass Zeaxanthin in senkrechter Orientierung zwischen den zwei gegenüberliegenden hydrophilen Regionen der Membran verankert ist und dadurch die Beweglichkeit der Fettsäuren im flüssigkristallinen Zustand einschränkt (Havaux 1998).

### 1.4.3 Tocopherole in Membranen

Ihr lipidähnlicher Charakter macht Tocopherole zu einem wichtigen strukturellen Bestandteil von Zellmembranen. Wie Tocopherole in die Membran integrieren und welche Auswirkungen sich dadurch auf die Fluidität ergeben, wurde bisher hauptsächlich für  $\alpha$ -Tocopherol an *in vitro* hergestellten modellhaften Phospholipidmembranen untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Polyprenylkette des  $\alpha$ -Tocopherols mit dem hydrophoben inneren Bereich der Membran in Wechselwirkung tritt, während der polare Chromanol-Ring hin zur hydrophilen äußeren Seite der Membran orientiert ist (Atkinson *et al.* 2008). Dabei können sich zwischen Chromanol-Ring und der veresterten Carbonylgruppe der Fettsäuren stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden (Gomez-Fernandez *et al.* 1989). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass  $\alpha$ -Tocopherol nicht homogen über die Membran verteilt ist, sondern verstärkt in eher fluiden Bereichen vorkommt, die anteilmäßig mehr ungesättigte Fettsäuren aufweisen (Gomez-Fernandez *et al.* 1989). Zudem konnte mit Hilfe von Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Tocopherol selbst eine interne strukturelle Beweglichkeit besitzt und lateral in der Membran diffundieren kann (Atkinson *et al.* 2008). Vergleichbare Studien mit plastidären Membranen, die hauptsächlich Galaktolipide statt Phospholipide besitzen, sind bisher nicht vorhanden. Eine Zugabe von  $\alpha$ -Tocopherol zu *in vitro* hergestellten Liposomen, die sich aus MGDG, DGDG und Sulfoglykolipiden zusammensetzten, führte zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Gefrierstress (Hincha 2008). Außerdem wurde festgestellt, dass sich durch den Einbau von  $\alpha$ -Tocopherol die Beweglichkeit der Lipide in den äußeren und direkt darunter liegenden Membranbereichen erhöht, während die der Fettsäureketten im hydrophoben Membraninneren vermindert wird (Hincha 2008).

Diese Untersuchungen zeigen, dass Tocopherole in Membranen nicht nur als Antioxidantien wirken und das Auftreten von Lipidperoxidation eingrenzen, sondern selbst einen wichtigen Membranbestandteil darstellen, der zur Ausbildung des flüssigkristallinen Zustandes einer Membran beiträgt.

#### 1.4.4 Änderung der Fluidität bei abiotischem Stress

In Chloroplasten ist es insbesondere unter der Einwirkung von abiotischen Stressbedingungen wichtig, den flüssigkristallinen Zustand der Membran und damit die Integrität und Funktion des Photosyntheseapparates aufrecht zu erhalten. So ist bekannt, dass niedrige Temperaturen den Übergang von Membranlipiden aus dem flüssigkristallinen in den gelartigen Zustand fördern, wovon z. B. das Membranlipid Phosphatidylglyzerol (PG) betroffen ist (Somerville 1995). Je mehr zweifach gesättigtes PG in der Membran vorliegt, desto anfälliger sind die Pflanzen gegenüber einer Photoinhibierung bei Kühle (Somerville 1995). Um dem gelartigen Zustand der Membran bei Kühle zu entgehen, wird in Blättern der Anteil mehrfach ungesättigter 18:3 und 16:3 Fettsäuren erhöht (Upchurch 2008). Andererseits nimmt in Blättern, die hohen Temperaturen ausgesetzt sind, der Gehalt an gesättigten 16:0 Fettsäuren und an 18:2 Fettsäuren zu (Falcone *et al.* 2004).

Wie sich Änderungen in der Fettsäurezusammensetzung der Thylakoide auf den *turnover* des D1-Proteins auswirken können, wurde zunächst für *Synechocystis* sp. PCC 6803 beschrieben (Kanervo *et al.* 1995). Hierbei wurde festgestellt, dass in Mutanten, die keine 18:2 und 18:3 Fettsäuren bilden können, eine im Vergleich zu Wildtypzellen stärkere Photoinhibierung und ein erhöhter D1-Proteinabbau auftreten. Da in dieser Mutante die Expression des *psbA*-Gens und die Abbaurrate des D1-Proteins nicht beeinträchtigt waren, wurde angenommen, dass ungesättigte Fettsäuren für die Neusynthese des D1-Proteins wichtig sind (Kanervo *et al.* 1995). Auch in Höheren Pflanzen konnte gezeigt werden, dass der Anteil ungesättigter Fettsäuren in der Membran bei einer durch Starklicht- bzw. Kühle verursachten Photoinhibierung die Reparatur des Photosystems II beeinflussen kann (Vijayan & Browse 2002). Welche Bedeutung den ungesättigten Fettsäuren dabei für einzelne Schritte des D1-Protein-*turnovers* zukommt, ist bisher nicht beschrieben.

## 1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, die Funktion von Tocopherolen in Pflanzen am Beispiel der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* zu klären. Erste Hinweise auf die Funktion sind von einer subzellulären Lokalisierung zu erwarten. Bisher wurden Tocopherole ausschließlich in Chloroplasten nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun geprüft werden, ob Tocopherole auch außerhalb der Plastiden in anderen Kompartimenten der Pflanzenzelle vorkommen können. Da Tocopherole lipidähnliche Eigenschaften besitzen und vorwiegend in Membranen angereichert sind, soll dafür eine Methode zur subzellulären Fraktionierung von Membranen erarbeitet werden.

Untersuchungen mit der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* haben ergeben, dass Tocopherole in Chloroplasten eine Schutzfunktion für das Photosystem II besitzen. Ausgehend von diesen Befunden besteht die Frage, ob Tocopherole auch in Höheren Pflanzen für die Funktion des Photosystems II bei Starklicht wichtig sind. Um dies zu überprüfen, sollen vergleichende Untersuchungen an Pflanzen des Wildtyps und der tocopheroldefizienten *vte1*-Mutante von *Arabidopsis* unter Starklichtbedingungen durchgeführt werden. Speziell ist dabei von Interesse, ob unter Starklichtbedingungen das Photosystem II in Pflanzen ohne Tocopherole verändert ist und inwiefern das D1-Protein davon betroffen ist.

Falls unter bestimmten Bedingungen ein veränderter D1-Proteingehalt in der *vte1*-Mutante auftritt, bleibt die Frage nach der Art und Weise, wie Tocopherole auf das D1-Protein einwirken. In diesem Zusammenhang soll überprüft werden, ob die antioxidative Wirksamkeit oder überdies andere Eigenschaften der Tocopherole für das D1-Protein relevant sind.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wie beispielsweise für die Chromatographie sowie verwendete Enzyme und Fertigkits sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt (Tab. 2-1). Alle Standardchemikalien waren von höchster Reinheit und wurden von den Firmen GE Healthcare (München), Bio-Rad (München), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich (München) bezogen.

**Tab. 2-1:** Verwendete Chemikalien, Enzyme, Fertigkits und Größenstandards.

Bezeichnung	Hersteller
<i>Chemikalien für die Chromatographie</i>	
n-Heptan HPLC <i>Optigrade</i> ®	LGC Standards (Wesel)
2-Propanol HPLC <i>grade</i>	AppliChem (Darmstadt)
Aceton HPLC <i>Optigrade</i> ®	LGC Standards (Wesel)
<i>Enzyme, Fertigkits und Größenstandards</i>	
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Cytochrom c Oxidase (aus Pferdeherz)	Fluka <i>BioChemika</i> (Buchs, Schweiz)
Roti®-Nanoquant	Roth (Karlsruhe)
DC Protein Assay	Bio-Rad (München)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder 10-170 kDa	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Sonstige Chemikalien</i>	
Lincomycin Hydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Eosin-Y, 5 % (w/v) Lösung	Sigma-Aldrich (München)
NADP	Sigma-Aldrich (München)
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
ECL Advance™ Blocking Agent	GE Healthcare (München)
Lumigen™ TMA-6, Lösungen A und B	GE Healthcare (München)
Tetenal Roentoroll HC	Tetenal AG (Norderstedt)
Tetenal Roentoroll Lösungen	Tetenal AG (Norderstedt)
Tetenal Superfix Lösungen	Tetenal AG (Norderstedt)

Allgemeine Lösungen sowie Pufferlösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das mithilfe einer Millipore-Anlage (Seradest SD 2000, USF Elga Seral, Ransbach-Baumbach) hergestellt wurde. Lösungen für Arbeiten mit Nukleinsäuren wurden vor der Benutzung für 20 min bei 120 °C sterilisiert.

## 2.2 Messgeräte

Im Folgenden sind die wesentlichen Messgeräte aufgelistet, welche in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden. Diese sind nach ihrem jeweiligen Anwendungsgebiet eingeteilt.

### *Zerkleinerung von Pflanzenmaterial*

- 2000 Geno/Grinder®, SPEX CertiPrep (München)
- Schwingmühle, Retsch (Haan)
- Blender, Waring Laboratory (Torrington, USA)

### *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

- PCR thermal cycler Primus96 plus, MWG Biotech (Ebersberg)
- 7300 real-time PCR System, Applied Biosystems (Darmstadt)

### *Spektralphotometrie / Chromatographie*

- UV-Vis Spektralphotometer UV-2501 PC, Shimadzu Cooperation (Kyoto, Japan)
- NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific (Bonn)
- MAXI-Imaging-PAM Chlorophyllfluorometer, Heinz Walz GmbH (Effeltrich)
- HPLC System, Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg)  
Trennsäulen: LiChrospher Si 60 (Ø 4 mm, Partikelgröße 5 µm)  
LiChrospher Si100 (Ø 4 mm, Partikelgröße 5 µm)  
Fluoreszenzdetektor: Rf-10A XL  
Diodenarray-Detektor: SPD-M10A vP  
Software: Shimadzu Class-VP Version 7.4 SP1
- Agilent 1100 HPLC System, Agilent Technologies (Böblingen)

### *Zentrifugation*

- Zentrifuge 5804R, Eppendorf (Hamburg); Ausschwingrotor A-4-44, Festwinkelrotor F34-6-38
- Tischzentrifuge 5415R, Eppendorf (Hamburg)
- Centrikon T-124, Kontron Instruments (München); Festwinkelrotor A 8.24
- Centrikon T-100 Ultrazentrifuge, Kontron Instruments (München); Ausschwingrotor TST 28.38



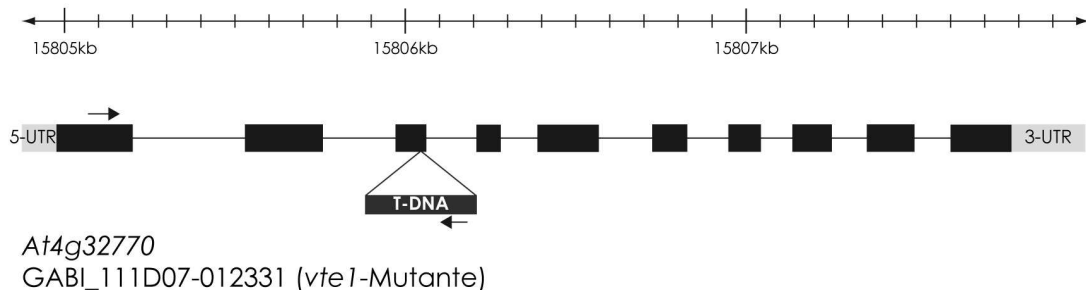
## 2.3 Anzucht und Behandlung der Pflanzen

### 2.3.1 Anzucht und Ernte von *Arabidopsis thaliana*

In der vorliegenden Arbeit verwendete Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* wurden auf einer Mischung aus Topfkultursubstrat 2 (Floragard, Oldenburg) und Sand (Mischungsverhältnis 3:2) angezogen. Vor der Aussaat wurden die Samen zunächst für drei Minuten in 70 % (v/v) Ethanol oberflächlich sterilisiert, zweifach mit deionisiertem Wasser gewaschen und direkt auf das Topfkultursubstrat-Sand-Gemisch ausgesät. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer bei 21 °C und einer Lichtintensität von 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Licht-/Dunkelrhythmus (10 h/14 h) angezogen. Im Alter von 6,5 – 7 Wochen wurden die Pflanzen für die Starklichtexperimente (s. 2.3.3) eingesetzt.

### 2.3.2 Verwendung von tocopheroldefizienten (*vte*) Mutanten von *A. thaliana*

Für die vorliegenden Stressversuche und Behandlungen wurde der Wildtyp von *A. thaliana* Columbia (Col-0) zusammen mit homozygoten Pflanzen der T-DNA-Insertionslinie *vte 1* (GABI\_111D07) eingesetzt. Pflanzen der *vte 1*-Linie besitzen eine T-DNA-Insertion im dritten Exon des Gens *At4g32770*, die zu einem Ausfall der Synthese des Enzyms Tocopherolzyklase führt (Abb. 2-1). Dadurch können die *vte 1*-Pflanzen keine Tocopherole ( $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -, $\delta$ ) produzieren.

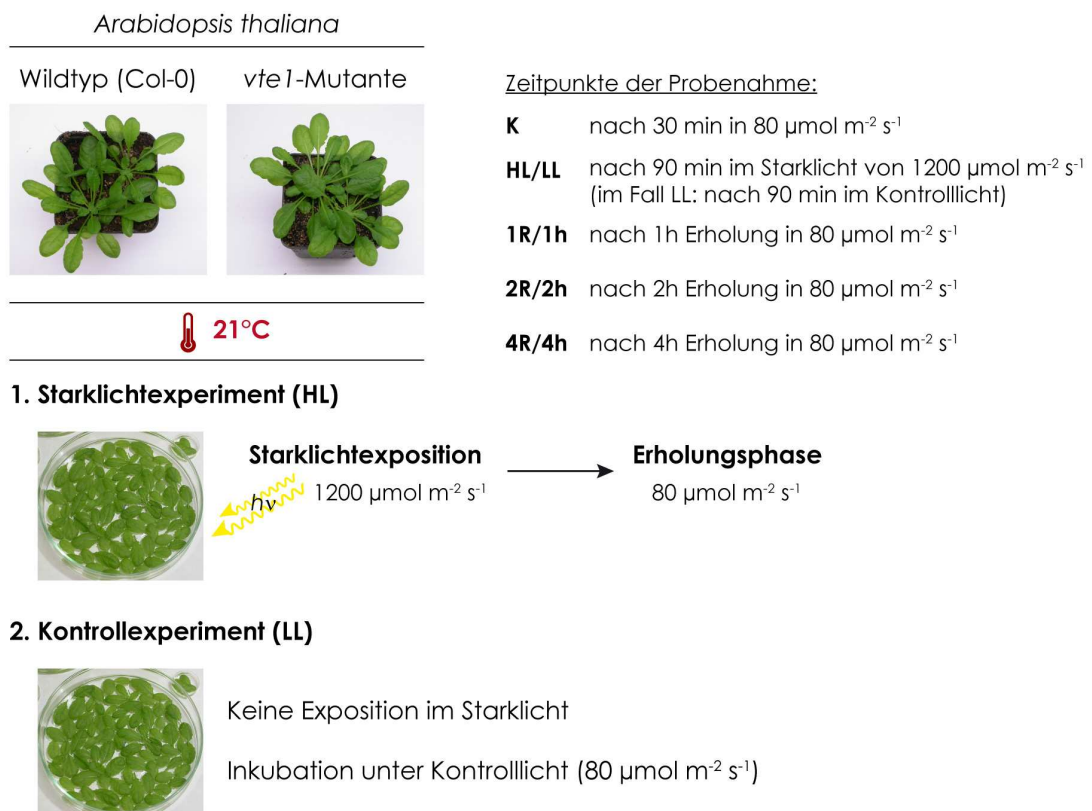


**Abb. 2-1:** Lage der T-DNA-Insertion in der Sequenz des Gens *At4g32770*.

Für die Starklichtversuche (s. 2.3.3) wurden außerdem Pflanzen der *npq1*-Mutante sowie der Doppelmutante *npq1xvte1* eingesetzt. In der *npq1*-Mutante kommt es infolge eines durch Mutagenese induzierten Austauschs zweier Basen der Nukleotidsequenz des Gens *At1g08550* zur fehlerhaften Synthese des Enzyms Violaxanthin-Deepoxidase (Niyogi *et al.* 1998). Daher sind diese Pflanzen außer Stande, Violaxanthin in Antheraxanthin und Zeaxanthin umzusetzen.

### 2.3.3 Starklichtbehandlung und Kinetik der Probenahme

Starklichtexperimente wurden mit abgetrennten Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (Abb. 2-2). Dafür wurden von 6,5 – 7 Wochen alten Pflanzen einzelne Blätter ähnlicher Entwicklung und Größe abgeschnitten und in mit je 200 ml Leitungswasser befüllte Glaspetrischalen überführt. Die Blätter wurden unter Grünlicht jeweils zum Ende der täglichen Dunkelphase in der Klimakammer abgetrennt. Anschließend wurden die Blätter für 30 min mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet. Diese Lichtintensität entsprach den Lichtverhältnissen der Anzucht und wurde daher als Kontroll- bzw. Schwachlicht bezeichnet. Um eine Photoinhibierung des Photosystems II zu erzeugen, wurden die Blätter darauffolgend für 90 min einer fünfzehnfach höheren Lichtintensität von  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt. Dieser Schritt wurde als Starklichtbehandlung bzw. Starklichtexposition benannt. Im Anschluss daran wurden die Blätter für insgesamt vier Stunden zurück in das Kontrolllicht gestellt. Das sollte eine Reparatur des Photosyntheseapparates ermöglichen. Im Rahmen der Experimente wurde dieser Abschnitt als Erholungsphase bezeichnet. Um die spezifischen Effekte des Starklichts zu erfassen, wurden zeitgleich Experimente unter Kontrollbedingungen ohne Starklichtexposition (Kontrollversuch bzw. Schwachlichtversuch) durchgeführt.



**Abb. 2-2:** Starklicht- und Kontrollversuche mit Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante von *A. thaliana*. Die Zeitpunkte der Probenahme sind wie folgt zugeordnet: Starklichtexperiment – K/HL/1R/2R/4R; R – Recovery, Erholung vom Starklicht; HL – Starklichtexposition; Kontrollversuch – K/LL/1h/2h/4h; h – Stunden; LL – Belichtung mit Kontroll- bzw. Schwachlicht

Es wurden vor und nach der Starklichtbehandlung sowie zu verschiedenen Zeitpunkten der Erholungsphase Blattproben entnommen. Die Zeitpunkte der Probenahme im Starklicht- und zugehörigen Kontrollversuch waren chronologisch übereinstimmend. Damit sollten diurnale Einflüsse minimiert werden. Alle Untersuchungen wurden bei einer Temperatur von 21 °C durchgeführt. Das Starklicht von 1200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurde mithilfe der LED Light Source SL 3500 (Photon System Instruments, Drasov, Tschechien) erzeugt.

Um die Effizienz des Photosystems II zu ermitteln, wurden Chlorophyllfluoreszenzmessungen durchgeführt. Dafür wurden jeweils vier bis fünf Blätter des Wildtyps und der *vfe1*-Mutante in den Experimenten mitgeführt und zu den jeweiligen Probenahmezeitpunkten zur Messung der maximalen Quantenausbeute des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) (s. 2.5.3) verwendet.

### 2.3.4 Behandlung mit Eosin-Y

Eosin-Y gehört zur Gruppe der Xanthene und führt nach Lichtabsorption in Anwesenheit von Sauerstoff zur spezifischen Bildung von  $^1\text{O}_2$  (Gl. 2-1). Bereits bei geringen Lichtintensitäten kann in Pflanzen aufgenommenes Eosin zu oxidativen Schäden am Photosyntheseapparat bis hin zum vollständigen Verlust der Zellintegrität beitragen (Knox & Dodge 1985).



Aus Blättern von *A. thaliana* wurden zunächst Blattscheiben mit einem Durchmesser von 9 mm ausgestanzt und diese für 60 min in einer 5 mM Eosin-Y-Lösung im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle dienten Blattscheiben, die zeitgleich mit destilliertem Wasser inkubiert wurden. Nach der Dunkelinkubation wurden die Blattscheiben auf feuchtes Filterpapier überführt und für zwei Stunden belichtet. Um zu vermeiden, dass zusätzlich  $^1\text{O}_2$  am Photosystem II entsteht, wurde der Versuch bei einer niedrigen Lichtintensität von 80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durchgeführt. Diese entsprach den Lichtbedingungen der Anzucht. Für die Bestimmung des Tocopherolgehaltes wurden 3 x jeweils zwei Blattscheiben und zur Carotinoidanalyse 3 x jeweils eine Blattscheibe als Proben entnommen. Für die Proteinanalyse standen jeweils zehn Blattscheiben zur Verfügung. Aufgrund der Absorptionsinterferenz zwischen Eosin-Y und BRADFORD-Reagenz wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration die Methode nach LOWRY (1951) (s. 2.7.1.3) angewandt. Im Experiment wurden sechs Blattscheiben mitgeführt, die zur Bestimmung der Effizienz des Photosystems II (s. 2.5.3) herangezogen wurden.

### 2.3.5 Behandlung mit Lincomycin

Lincomycin hemmt die Proteinbiosynthese in den Chloroplasten, indem es an die Ribosomen bindet und die Peptidyltransferase blockiert (Vazquez 1974). Dies verhindert die Ausbildung von Peptidbindungen zwischen Aminosäuren und damit die Elongation von Proteinen. Für Versuche mit Lincomycin wurden zunächst einzelne Blätter von 6,5 – 7 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen abgetrennt und auf Leitungswasser aufgelegt. Dies erfolgte zum Ende der täglichen Dunkelphase in der Klimakammer und wurde unter Grünlicht durchgeführt. Nach einer halben Stunde Belichtung bei einer Lichtintensität von  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wurden die Blätter auf eine 1,5 mM Lincomycin-Lösung transferiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Starklichtexposition mit nachfolgender Erholungsphase (vgl. 2.3.3). Um die Effekte von Lincomycin unter Schwachlichtbedingungen zu erfassen, wurde ein zusätzliches Experiment durchgeführt, bei dem Blätter auf Lincomycin-Lösung nur dem Anzuchtlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (vgl. Kontrollexperiment Kapitel 2.3.3) ausgesetzt waren. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 21 °C durchgeführt. Für die Starklichtexposition wurde die Lampe LED Light Source SL 3500 (Photon System Instruments, Drasov, Tschechien) verwendet. Es wurden jeweils fünf Blätter im Experiment mitgeführt, die nach Ende der jeweiligen Inkubationszeiten zur Bestimmung der Effizienz des Photosystems II (s. 2.5.3) eingesetzt wurden. Für die Bestimmung des Tocopherolgehaltes wurden 3 x jeweils zwei Blattscheiben und zur Proteinanalyse fünf Blätter als Proben entnommen.

## 2.4 Isolierung von subzellulären Fraktionen

Alle Arbeiten und Zentrifugationsschritte zur Isolierung von Zellorganellen aus Pflanzenmaterial wurden bei einer Temperatur von 4-6 °C durchgeführt. Die einzelnen Lösungen zum Zellaufschluss sowie für die Gradienten wurden einen Tag vor Versuchsbeginn vorbereitet und über Nacht auf 4 °C abgekühlt.

### 2.4.1 Anreicherung subzellulärer Membranfraktionen aus *Brassica oleracea botrytis*

Für die Anreicherung subzellulärer Membranfraktionen aus der Infloreszenz von *Brassica oleracea botrytis* wurde die Methode von GIBEAUT & CARPITA (1994) geringfügig verändert. Am Versuchstag wurde frischer Blumenkohl von einem lokalen Markt bezogen, gewaschen, grob zerkleinert und auf Eis gelagert. Ein Teil des Infloreszenzgewebes wurde mit Isolierungsmedium im Waring-Blender für 3 x 2 s bei maximaler Leistung homogenisiert und anschließend durch Nylongaze (Maschenweite: 40 µm, Hydro-Bios, Kiel) filtriert. Plastiden, Zellkerne sowie nicht aufgeschlossenes Zellmaterial wurden durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 18000 x g sedimentiert. Der so erhaltene Überstand wurde auf sechs diskontinuierliche Saccharosedichtegradienten aufgeteilt und diese in einer Ultrazentrifuge (Ausschwingrotor TST 28.38) für zwei Stunden bei 135000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die einzelnen Membranfraktionen, welche sich an den Grenzflächen zwischen den Saccharosestufen ausgebildet hatten, vorsichtig abgenommen. Die jeweiligen Fraktionen aus sechs Gradienten wurden vereint und mit Gradientenpuffer gewaschen. Dazu erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation für zwei Stunden bei 135000 x g und 4 °C. Die Pellets wurden in 1 ml Gradientenpuffer unter Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

<u>Isolierungsmedium</u>	<u>Gradientenpuffer</u>	<u>Saccharosegradient</u>
70 mM Hepes-KOH pH 7,8	10 mM Hepes-KOH pH 7,6	0,277 M Saccharose (5 ml)
60 mM KCl	40 mM KCl	0,570 M Saccharose (6 ml)
15 mM EDTA	20 mM D-Glucose	0,977 M Saccharose (8 ml)
15 mM EGTA		1,167 M Saccharose (10 ml)
20 mM D-Glucose		Zellaufschluss (8 ml)
2,417 M Saccharose		1,645 M Saccharose (5 ml)
0,1 % (w/v) BSA		
2 mM DTT		in Gradientenpuffer
10 mM Ascorbinsäure		

### 2.4.2 Isolierung plastidärer Membranen aus Blättern von *Brassica oleracea botrytis*

Die Isolierung von Chloroplasten und ihre Auftrennung in Hüll- und Thylakoidmembranen erfolgte in Anlehnung an DOUCE *et al.* (1973). Dafür wurden zunächst ca. 50 g Blattmaterial mit Isolierungsmedium ((g FG):(ml Medium), 1:5) versetzt und im Waring-Blender für 2 x 1 s mit niedriger Leistung und 3 x 5 s mit maximaler Leistung zerkleinert. Nach einer Filtration durch vier Lagen Miracloth (Merck CalBiochem, München) wurden die Chloroplasten durch eine einminütige Zentrifugation bei 2000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem kleinen Volumen Waschmedium resuspendiert. Anschließend wurden ca. 2 ml der Plastidensuspension auf einen diskontinuierlichen Percollgradient von 80 % (v/v) und 40 % (v/v) Percoll (jeweils in 50 mM Hepes-KOH pH 8,0, 330 mM Sorbitol) geschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei 5800 x g (Ausschwingrotor A-4-44) und 4 °C wurden an der Phasengrenze von 40 %- und 80 %-Percoll intakte Chloroplasten erhalten. Nach zweimaligem Waschen der intakten Plastiden im Waschmedium wurde die Suspension für 30 min bei -80 °C eingefroren und im Anschluss daran langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Chloroplasten wurden in eine Schocklösung überführt (10 mM Tricin pH 7,8, 600 µM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM PMSF) und dadurch osmotisch aufgebrochen. Danach wurden 8 ml der Suspension auf einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradient geschichtet und für 90 min bei 95000 x g und 4 °C zentrifugiert (Ausschwingrotor TST 28.38). Die so erhaltenen Fraktionen sollten nach DOUCE *et al.* (1973) wie folgt zusammengesetzt sein:

Fraktion 1 – Phasengrenze 0,6/0,93 M Saccharose – Hüllmembranen

Fraktion 2 – Phasengrenze 0,93/1,2 M Saccharose – Hüllmembranen, Plastoglobuli und Stromathylakoide

Fraktion 3 – Phasengrenze 1,2/1,5 M Saccharose – Grana- und Stromathylkoide.

Alle Fraktionen wurden mit vier Volumen 10 mM Tricin (pH 7,8) verdünnt und durch eine einstündige Zentrifugation bei 113000 x g (Ausschwingrotor TST 28.38) und 4 °C sedimentiert. Die Sedimente wurden in einem kleinen Volumen einer Lösung aus 10 mM Tricin (pH 7,8) und 0,3 M Saccharose resuspendiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

<u>Isolierungsmedium</u>	<u>Waschmedium</u>	<u>Saccharosegradient</u>	
330 mM Sorbitol	330 mM Sorbitol	Plastidenfraktion	(8 ml)
50 mM Tris-HCl pH 8,0	50 mM Hepes-KOH pH 8,0	0,60 M Saccharose	(8 ml)
3 mM EDTA	3 mM EDTA	0,93 M Saccharose	(8 ml)
0,1 % (w/v) BSA		1,20 M Saccharose	(8 ml)
2 mM DTT		1,50 M Saccharose	(8 ml)
		in: 10 mM Tricin pH 7,8, 4 mM MgCl <sub>2</sub>	

### 2.4.3 Gewinnung von Plastiden aus der Infloreszenz von *Brassica oleracea botrytis*

Die Isolierung von farblosen Plastiden aus dem Infloreszenzgewebe von *Brassica oleracea botrytis* wurde nach JOURNET *et al.* (1985) und ALBAN *et al.* (1988) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst frisches Infloreszenzgewebe des Blumenkohls mit zwei Volumen Isolierungsmedium versetzt und im Waring-Blender homogenisiert (2 x 1 s, min. Leistung; 3 x 5 s, max. Leistung). Im Anschluss daran wurde der Zellaufschluss über vier Lagen Miracloth filtriert und das Filtrat für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Gefäße überführt und erneut zentrifugiert (20 min, 3000 x g). Das erhaltene Sediment wurde in 20 ml Medium B resuspendiert und durch zwei weitere Zentrifugationsschritte (5 min, 200 x g; 10 min, 3000 x g) mit Plastiden angereichert. Dann wurde die Plastidensuspension auf einen Gradienten von 35 % (v/v) Percoll (in Medium B) aufgetragen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 40000 x g konnte eine gelbliche Bande in Bodennähe des Gradienten beobachtet werden, die den intakten Plastiden zugeordnet wurde. Überschüssiges Percoll wurde durch einen zweimaligen Waschschriff entfernt. Das in Medium B resuspendierte Plastidenpellet wurde anschließend für 30 min bei -80 °C eingefroren. Nachdem die Suspension wieder auf Raumtemperatur erwärmt wurde, erfolgte eine zehnmünütige Inkubation mit Schocklösung (10 mM Tricin pH 7,8, 600 µM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM PMSF). Daraufhin wurde die Suspension auf einen Gradienten aus 32 % (w/v) und 20,5 % (w/v) Saccharose (in Tricinpuffer: 10 mM Tricin pH 7,8, 4 mM MgCl<sub>2</sub>) geschichtet und dieser für zwei Stunden bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert (Ausschwingrotor TST 28.38). An der Phasengrenze zwischen der 32 % (w/v) und 20,5 % (w/v) Saccharoselösung war eine gelbliche Fraktion zu beobachten, die den Hüllmembranen zugeordnet wurde. Diese Fraktion wurde in ein neues Gefäß überführt und in Schocklösung aufgenommen. Schließlich wurden die Hüllmembranen durch eine einstündige Zentrifugation bei 113000 x g und 4 °C sedimentiert (Ausschwingrotor TST 28.38), in einer Lösung aus 10 mM Tricin (pH 7,8) und 0,3 M Saccharose resuspendiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

#### Isolierungsmedium

330 mM Mannitol  
20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> pH 7,6  
1 mM EDTA  
4 mM L-Cystein  
0,1 % (w/v) BSA

#### Medium B

300 mM Saccharose  
10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2  
1 mM EDTA  
100 µM PMSF

## 2.5 Physiologische Methoden

### 2.5.1 Bestimmung von Pigmenten und Antioxidantien in Blättern

#### 2.5.1.1 Tocopherole und Plastochinon

Tocopherole und Plastochinon wurden gemeinsam aus gefrorenem Blattmaterial extrahiert. Dafür wurden 3 x jeweils zwei Blattscheiben ( $\varnothing$  10,3 mm) aus Blättern ausgestanzt und in mit Glaskugeln (3 x  $\varnothing$  2,85-3,45 mm, 4-5 x  $\varnothing$  1,7-2,0 mm, Fa. Roth) bestückte 2 ml Plastikgefäße überführt. Das Blattmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Geno/Grinder® für 2 x 2 min mit 1500 strokes  $\text{min}^{-1}$  zermahlen. Dann wurde das Blattpulver mit 150  $\mu\text{l}$  Heptan versetzt und vollständig resuspendiert. Die Extraktion erfolgte für mindestens 24 Stunden bei einer Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Schließlich wurde der Extraktionsrückstand durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 16000 x g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  sedimentiert und 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes für die HPLC-Analyse verwendet.

Bei der Extraktion von Tocopherolen aus einer Zellsuspension wurde 1 Volumen der Zellfraktion mit fünf Volumen Heptan versetzt, durchmischt und nach dem oben genannten Verfahren extrahiert. Der tocopherolhaltige Extrakt wurde mithilfe von Stickstoff eingedampft und für die HPLC-Messung in 60  $\mu\text{l}$  Heptan aufgenommen.

#### HPLC Methode

Messgerät: HPLC System, Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg) (s. 2.2)

Verfahren: isokratisch; Normalphasenchromatographie

Eluent: Tocopherole – 99+1 (v/v) n-Heptan/Isopropanol  
Plastochinon – 99,95+0,05 (v/v) n-Heptan/Isopropanol

Durchfluss: 1  $\text{ml min}^{-1}$

Trennsäule: Tocopherole – LiChrospher Si 60  
Plastochinon – LiChrospher Si 100

Detektion: Tocopherole – Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{Exc}}$  290 nm,  $\lambda_{\text{Em}}$  328 nm)  
Plastochinon – Absorption ( $\lambda$  254 nm)

Kalibrierung: externer Standard

#### 2.5.1.2 Chlorophylle und Carotinoide

Die Extraktion von Chlorophyllen und Carotinoiden für die quantitative HPLC-Analyse wurde in Anlehnung an die Methode von PORRA *et al.* (1989) durchgeführt. Dafür wurden zunächst 3 x jeweils 1-2 Blattscheiben ( $\varnothing$  9 mm) aus Blättern ausgestanzt und in mit Glaskugeln (3 x  $\varnothing$  2,85-3,45 mm, 4-5 x  $\varnothing$  1,7-2,0 mm, Fa. Roth) bestückte 2 ml Plastikgefäße überführt sowie danach umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Blattmaterial in der Zelmühle Geno/Grinder® für 1 x 3 min mit 1600 strokes  $\text{min}^{-1}$  zerkleinert und bis zur Extraktion in flüssigem Stickstoff gelagert. Um einen vorzeitigen Abbau der Chlorophylle zu vermeiden, wurden alle Extraktionsschritte im Halbdunkel und auf Eis durchgeführt. Zunächst erfolgte eine



zweimalige Extraktion mit je 500 µl kaltem Aceton-Tris-Gemisch (70 % (v/v) Aceton, 10 mM Tris). Im Anschluss daran wurde zweimal mit je 250 µl kaltem 100 %igen Aceton extrahiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurde das Blattmaterial im Extraktionsmittel durch mehrmaliges Schütteln resuspendiert, zwei Minuten auf Eis inkubiert und der Extraktionsrückstand in einer Tischzentrifuge für 5 min bei 12000 rpm sedimentiert. Die chlorophyll- und carotinoidhaltigen Überstände wurden vereint und vor der HPLC-Messung erneut für 5 min zentrifugiert. Für die HPLC-Analyse wurden 500 µl des Extraktes in entsprechende HPLC-Probengefäße filtriert und umgehend gemessen.

#### HPLC Methode

Messgerät: Agilent 1100 HPLC System, Agilent Technologies (Waldbronn)  
Verfahren: binär; Reverse-Phasen-Chromatographie  
Eluenten: A - 100 % Aceton, B - 10 mM Tris pH 7,8  
Zufuhr der Eluenten im Verhältnis A/B = 1:3 (v/v)  
Durchfluss: 2 ml min<sup>-1</sup>  
Trennsäule: Hypersil ODS (Ø 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm)  
Detektion: Absorption (λ 655 nm, λ 445 nm, λ 407 nm, λ 432 nm, Referenz λ 760 nm)  
Diodenarray-Detektor der Agilent 1100 Serie  
Kalibrierung: externe Standards

#### **2.5.1.3 Tocochinon**

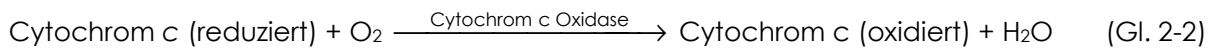
Die Tocochinonanalytik wurde im Rahmen einer Kooperation durch Prof. Jerzy Kruk am Institut für Pflanzenphysiologie und -biochemie der Jagellonian Universität in Krakau durchgeführt. Die Probenaufarbeitung und das HPLC-Verfahren erfolgten in Anlehnung an Kruk *et al.* (2008). Für die Tocochinonanalyse wurden sechs Blätter in kaltem Ethylacetat zu einem feinen Pulver zermahlen, in neue Reaktionsgefäße überführt und der Extrakt mithilfe von Stickstoff eingedampft. Direkt nach einer Wiederaufnahme des Extraktes in Methanol erfolgte die HPLC-Messung. Tocochinonstandards wurden durch Oxidation der jeweiligen Tocopherole mit 50 % (w/v) FeCl<sub>3</sub> erhalten, aufgereinigt und durch Behandlung mit NaBH<sub>4</sub> reduziert. Um die Tocochinone der Proben in ihre reduzierte Form zu überführen, wurde zwischen Trennsäule und Detektor eine zweite Säule integriert, die mit Platinpulver gefüllt war. Die so reduzierten Tocochinone wurden durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen.

#### HPLC Methode

Verfahren: Reverse-Phasen-Chromatographie  
Eluent: 97,5+2,5 (v/v) Methanol/Wasser  
Durchfluss: 1 ml min<sup>-1</sup>  
Trennsäule: Teknokroma C<sub>18</sub>, Nucleosil 100 (Ø 4 mm, Partikelgröße 5 µm)  
Vorsäule: gefüllt mit 5 % (w/v) Platinpulver (Reduktion TQ → TQH<sub>2</sub>)  
Detektion: Fluoreszenz (λ<sub>Exc</sub> 290 nm, λ<sub>Em</sub> 330 nm)  
Kalibrierung: externer Standard

### 2.5.2 Messung der Aktivität des Enzyms Cytochrom c Oxidase

Die Aktivität des mitochondrialen Enzyms Cytochrom c Oxidase wurde in Anlehnung an DOUCE *et al.* (1972) und BOMHOFF *et al.* (1977) bestimmt. Cytochrom c ist ein mitochondriales Protein, welches am Elektronentransport der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran beteiligt ist. Seine Oxidation durch das Enzym Cytochrom c Oxidase (Gl. 2-2) kann spektralphotometrisch nachgewiesen werden, da sich die Absorptionsmaxima der oxidierten und reduzierten Form von Cytochrom c unterscheiden.



Zunächst wurden 100 µl Zellfraktion mit 400 µl 300 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,8) versetzt und für 90 min bei 16000 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment in einer Lösung aus 250 µl zweifach konzentriertem Reaktionspuffer (100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,4, 0,02 % (v/v) Triton-X100), 5 µl 20 mM NADP (Endkonzentration 200 µM NADP) und 162 µl deionisiertem, sterilem Wasser resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde 1 ml einer 300 µM Cytochrom c Lösung (in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,4) durch den Zusatz von 20 µl 20 mM Ascorbinsäure (in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,4) reduziert. Diese Reaktion war vollständig, wenn bei einer Wellenlänge von 550 nm ein Absorptionsgleichgewicht feststellbar war. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 83 µl der 300 µM reduzierten Cytochrom c Lösung (Endkonzentration 50 µM) zum Reaktionsmix gestartet. Der Grad des Abfalls der Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm war der Aktivität des Enzyms Cytochrom c Oxidase äquivalent.

### 2.5.3 Maximale Quantenausbeute des Photosystems II ( $F_v/F_m$ )

Um die maximale Quantenausbeute des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) in Anlehnung an SCHREIBER *et al.* (1986) zu ermitteln, wurden Chlorophyllfluoreszenzmessungen durchgeführt. Hierfür wurde das Chlorophyllfluorometer MAXI-Imaging-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich) verwendet. Um eine Relaxation angeregter Chlorophyllmoleküle in den Lichtsammelantennen sowie die Oxidation des Plastochinons  $Q_A$  im Reaktionszentrum zu erzielen, wurde das zu messende Blattmaterial vor der Messung für 15 min dunkeladaptiert. Die Dunkeladaption sollte darüber hinaus den Abbau des lichtinduzierten Protonengradienten entlang der Thylakoidmembran gewähren, sodass eine nichtphotochemische Ableitung der Anregungsenergie zum Erliegen kommt. Im Anschluss daran wurde zunächst die Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) bestimmt und das Photosystem II durch einen Sättigungslichtimpuls ( $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) vollständig reduziert. Daraus ergab sich die maximale Fluoreszenz  $F_m$ . Die Auswertung der Daten und Berechnung der  $F_v/F_m$ -Werte (Gl. 2-3) erfolgte mithilfe der Software ‚ImagingWin‘.  $F_v/F_m$  dient als ein Maß für die Effizienz, mit der die Anregungsenergie aus den Antennenkomplexen von den offenen Reaktionszentren des Photosystems II übernommen werden kann. Intakte, nicht gestresste Blätter weisen in der Regel  $F_v/F_m$ -Werte im Bereich von 0,75 – 0,8 auf. Davon abweichende, verminderte Werte können beispielsweise auf eine Photoinhibierung am Photosystem II und Schäden am Photosyntheseapparat hindeuten.

Um die Auswirkungen des jeweiligen Experimentes auf die Effizienz des Photosystems II zu erfassen, wurde in der vorliegenden Arbeit die prozentuale Abnahme von  $F_v/F_m$  relativ zur jeweiligen Kontrolle berechnet (Gl. 2-4). Dadurch konnte ermittelt werden, um welchen Betrag sich  $F_v/F_m$  in den Proben als Folge der Behandlung und im Vergleich zur Kontrolle verringert. Kontrollproben waren Blätter oder Pflanzen vor Beginn des jeweiligen Experimentes z. B. der Starklichtexposition oder einer Behandlung mit Eosin-Y.

$$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

$$\text{relative Abnahme von } F_v/F_m (\%) = 100\% - \left( \frac{(F_v/F_m)_{\text{Behandlung}} \times 100\%}{(F_v/F_m)_{\text{Kontrolle}}} \right) \quad (\text{Gl. 2-4})$$

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Extraktion von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

#### 2.6.1.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung von pflanzlicher genomischer DNA für die PCR erfolgte in Anlehnung an EDWARDS *et al.* (1991). Dafür wurden zwei Rosettenblätter von *A. thaliana* in flüssigem Stickstoff zermahlen und das Blattpulver mit 400 µl DNA-Extraktionspuffer vollständig durchmischt. Um Proteine aus dem Extrakt zu entfernen, wurden anschließend 150 µl einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 6,0) zugefügt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 12000 x g wurden 550 µl des Überstandes mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Nukleinsäuresediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert. Für eine PCR-Reaktion wurden 2 µl genomische DNA eingesetzt.

#### DNA-Extraktionspuffer

250 mM NaCl  
250 mM Tris-HCl pH 7,5  
25 mM EDTA  
0,5 % (w/v) SDS

#### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA

#### 2.6.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit Boratpuffer

Die Isolierung von RNA aus Blättern von *A. thaliana* wurde in veränderter Form nach SAMBROOK *et al.* (1989) durchgeführt. Zunächst wurden ca. 500 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerkleinert. Anschließend wurde das Blattpulver im gefrorenen Zustand in ein mit 800 µl Boratpuffer (auf 65 °C vorgewärmt) gefülltes 2 ml Plastikgefäß überführt und nach Zugabe von 600 µl Phenol sofort durchmischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 30 °C wurden die Phasen durch eine Zentrifugation (10 min, 14000 x g, RT) getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels Chloroform-Phenol-Extraktion aufgereinigt (s. 2.6.2). Anschließend wurde die RNA mit 2 M Lithiumchlorid über Nacht bei 4 °C gefällt und darauffolgend durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C sedimentiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Sediment an der Luft getrocknet, in 20-30 µl sterilem DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

#### Boratpuffer

0,2 M Na-Tetraborat  
1 % (w/v) SDS  
30 mM EDTA pH 9,0

### 2.6.2 Chloroform-Phenol-Extraktion

Um wässrige DNA- bzw. RNA-Lösungen aufzureinigen, können Proteine durch Chloroform-Phenol-Extraktion herausgelöst werden. Dazu wurde die Probe mit je einem Volumen Phenol sowie Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, durchmischt und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 14000 x g zentrifugiert, wodurch die in der Probe vorhandenen Proteine an der Interphase akkumulierten. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, erneut für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Nucleinsäuren in der wässrigen Phase wurden durch Ethanol (s. 2.6.3) oder durch Lithiumchlorid (s. 2.6.1.2) präzipitiert.

### 2.6.3 Ethanolische Präzipitation von Nucleinsäuren

Durch Ethanol wurden Nucleinsäuren (DNA, RNA) präzipitiert und in der Lösung ankonzentriert. Hierfür wurden die Nucleinsäuren durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0) und dem 2,5fachen Volumen kaltem 100 %igen Ethanol für 30 min bei -80 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 16000 x g, 4 °C) wurde das Nucleinsäuresediment zweimal mit kaltem 70 %igen (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in einem kleinen Volumen sterilen Wassers resuspendiert. Die so erhaltenen Nucleinsäureproben wurden bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.6.4 Quantifizierung von Nucleinsäuren

Die Konzentration der Nucleinsäurelösung wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer gemessen. Hierbei entsprach eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng x µl<sup>-1</sup> bzw. einem RNA-Gehalt von 40 ng x µl<sup>-1</sup>. Um die Reinheit der Nucleinsäurepräparation einschätzen zu können, wurde zusätzlich die Extinktion bei Wellenlängen von 280 nm (Proteine) und 230 nm (Phenole, Kohlenhydrate) bestimmt. Ein Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm von ca. 1,8 zeigte eine hohe Reinheit der DNA bzw. von ca. 2,0 der RNA an.

## 2.6.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

### 2.6.5.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA bzw. cDNA wurde elektrophoretisch mit Agarose als Gelmatrix durchgeführt. Je nach den Fragmentgrößen, die aufgetrennt werden sollten, wurde die Agarosekonzentration und damit die Porengröße variiert. DNA-Fragmente mit einer Größe bis 0,2 kb wurden in einem 2 %igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Für größere Fragmente bis 1 kb wurden 1-1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde der Agaroselösung 0,005 % (v/v) Ethidiumbromid zugefügt. Für die Elektrophorese wurde 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Vor dem Probenauftrag wurde die DNA-Probe mit 1/10 Volumen 10 x BPB-Farblösung versetzt. Die unter UV-Licht sichtbaren Nukleinsäurebanden wurden mithilfe des Gerätes Multiimage™ Light Cabinet und der Software ‚Alpha Imager 2200 Version 5.5‘ (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) dokumentiert.

#### 10 x BPB-Farblösung

50 % (v/v) Glycerin  
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

#### 50 x TAE-Puffer

2 M Tris  
50 mM EDTA-NaOH pH 8,0  
5,71 % (v/v) Eisessig

### 2.6.5.2 RNA-Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität der isolierten Gesamt-RNA zu überprüfen, wurde diese unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurde zunächst 1 µg der RNA mit RNA-Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurde die RNA in einem 1 %igen (w/v) Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 10 x MOPS-Puffer (pH 7,0)

400 mM MOPS  
100 mM Natriumacetat, wasserfrei  
10 mM EDTA

#### RNA-Auftragspuffer

40 % (v/v) Formamid, deionisiert  
20 % (v/v) 10 x BPB-Farblösung  
5 % (v/v) Formaldehyd  
in 1 x MOPS-Puffer

### 2.6.6 Synthese von cDNA

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des Fertigkits ‚QuantiTec Reverse Transcription‘ der Firma Qiagen durchgeführt. Das zugehörige Protokoll war für eine reverse Transkription von 10 pg bis 1 µg RNA ausgelegt. Um restliche genomische DNA aus der RNA-Probe zu entfernen, wurde 1 µg der isolierten RNA (s. 2.6.1.2) mit 2 µl gDNA-Wipeout-Puffer versetzt und für 10 min bei 42 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde durch Zugabe einer Fertiglösung aus Reverse Transkriptase, dNTPs und Oligo(dT)-/Random-Nukleotiden gestartet. Die enzymatische Umsetzung von RNA zu cDNA erfolgte für 25 min bei 42 °C und wurde danach durch eine dreiminütige Inkubation bei 95 °C gestoppt. So erhaltene cDNA wurde 1:3 (v/v) mit sterilem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 2.6.7 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die semiquantitative PCR wurde mithilfe des PCR-Gerätes Primus-96-Plus der Firma MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Um bestimmte Bereiche eines Gens ausgehend von cDNA zu amplifizieren, wurde die Taq-DNA-Polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>) eingesetzt. Standardmäßig wurde ein 15 µl Reaktionsansatz verwendet, welcher sich aus 1 µl cDNA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dNTPs und 0,25 µM der jeweiligen Oligonukleotide zusammensetzte. Um zu kontrollieren, ob für die jeweiligen Proben die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde, wurde der Transkriptgehalt des konstitutiv exprimierten *act2*-Gens bestimmt. Die *annealing*-Temperatur orientierte sich an der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide und lag bei 58 °C – 60 °C. Da vor allem Fragmente bis 500 bp amplifiziert werden sollten, wurde eine Elongationszeit von 30 Sekunden gewählt. Die Zyklenanzahl variierte je nach vorhandener mRNA-Menge des zu untersuchenden Gens in der Probe. Für das *act2*-Gen wurden 25 Zyklen und für die Zielgene 27–28 Zyklen angewendet.

### 2.6.8 Quantitative *real-time* PCR

Die *real-time* PCR ermöglichte eine Quantifizierung der Expression verschiedener Gene relativ zu einem endogenen Referenzgen. Als Referenzgen wurde das *act2*-Gen gewählt, da dessen Transkriptgehalt nicht durch die gegebenen experimentellen Bedingungen beeinflusst wurde. Für die *real-time* PCR wurde ein zweistufiges Verfahren angewandt, welches eine separate Synthese von cDNA (s. 2.6.6) voraussetzte. Anschließend wurde gemäß dem ‚QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kit‘ ein 15 µl Ansatz hergestellt, der 0,5 µl cDNA enthielt. Alle Proben wurden in MicroAmp™ Optical 96-Well Reaktionsplatten angesetzt und mithilfe des ‚7300 Real-Time PCR‘ Gerätes der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) gemessen. Die Vervielfältigung der DNA wurde während der Messung mithilfe des Farbstoffes SYBR Green I detektiert, der nach Bindung an doppelsträngige DNA bei einer Wellenlänge von 521 nm fluoresziert. Eine

Steigerung der SYBR Green I Signalintensität war der Zunahme an PCR-Produkten proportional. Um unspezifische Einflüsse auf das Fluoreszenzsignal auszugleichen, wurde das SYBR Green I Signal auf den im gleichen Ansatz mitgeführten Fluoreszenzfarbstoff ROX normiert. Temperatur- und Zeitprofil der PCR-Reaktion richteten sich nach den Angaben des ‚QuantiFast™ SYBR® Green PCR Kits‘. Die Fluoreszenzdaten wurden während einer 40 Zyklen andauernden Amplifikationsphase aufgezeichnet. Um zu überprüfen, ob während der PCR unspezifische Primerdimere oder degradierte Fragmente auftreten, wurde im Anschluss an die gesamte Messung eine Schmelzkurve aller entstandenen PCR-Produkte aufgenommen.

In Anlehnung an PFAFFL (2001) wurden die Daten nach einer relativen Quantifizierung bei äquivalenter PCR-Effizienz ausgewertet. Dieses Verfahren wird als komparative  $\Delta\Delta C_T$ -Methode bezeichnet. Dabei wurde von einer optimalen Amplifikationseffizienz der *real-time* PCR von Referenz- und Zielgen in allen Proben ausgegangen. Unter der Annahme, dass sich die DNA-Menge in jedem Zyklus verdoppelt, wurde die Effizienz der *real-time* PCR auf den Zahlenwert 2 festgesetzt. Anhand der exponentiellen Phase der Messkurve wurde der  $C_T$ -Wert bestimmt. Der  $C_T$ -Wert ist die Zyklenzahl, bei der die Menge an PCR-Produkt beginnt exponentiell anzusteigen. Indem SYBR Green I an die gebildete DNA bindet, entsteht ein Fluoreszenzsignal, das sich signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abzeichnet. Niedrige mRNA-Mengen des Zielgens in der Probe führen zu einem steigenden  $C_T$ -Wert.

Für jede Probe wurde der  $C_T$ -Wert eines Zielgens zunächst auf das endogene Referenzgen *act2* normiert (Gl. 2-5) und anschließend in Bezug zu einer Standardprobe z. B. dem Wildtyp gesetzt (Gl. 2-6). Dadurch konnte die relative Änderung der Expression des Zielgens in der Probe im Vergleich zur Kontrolle und in Abhängigkeit des Experimentes quantifiziert werden (Gl. 2-7).

#### Normierung auf ein endogenes Referenzgen

$$C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{endogenes Referenzgen}) = \Delta C_T \quad (\text{Gl. 2-5})$$

#### Differenz zur Standardprobe (Kontrolle)

$$\Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{Standardprobe}) = \Delta\Delta C_T \quad (\text{Gl. 2-6})$$

#### Relative Genexpression

$$n = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Gl. 2-7})$$



### 2.6.9 Oligonukleotide

Im Folgenden sind Oligonukleotide aufgelistet, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Die Bezeichnung der Oligonukleotide sowie deren Sequenz in 5' – 3' Orientierung ist angegeben. In Tabelle 2-2 und Tabelle 2-3 sind die Oligonukleotide paarweise aufgeführt.

**Tab. 2-2:** Oligonukleotide für die semiquantitative PCR mit Angabe der Lokalisation des zugehörigen Gens im Genom von *Arabidopsis thaliana* sowie der Größe der amplifizierten PCR-Fragmente mit cDNA als Vorlage.

Genlokus	Name	Sequenz	Fragmentgröße [bp]
At2g18950	<i>vte2</i> for <i>vte2</i> rev	AGTAAAGTTGTCGCAAACCG CCAAGATGCCAGTGAAAAGTAAAGG	301
At4g32770	<i>vte1</i> for <i>vte1</i> rev	TCACTGGTGTGGAGCTCAG AACATCACCCCAACCGTAAA	317
At1g64970	<i>vte4</i> for <i>vte4</i> rev	GGATGTTGGGTGTGGGATTGGAGG CTGGCCTTGTGAGGCATATGC	244
At5g54080	<i>hgo</i> for <i>hgo</i> rev	CCATCAATGTGGTTGCCTGG TCCAAGCTTATGCGCGAGAAA	536
Atcg00270	<i>psbD</i> for <i>psbD</i> rev	GGCTCTGCTATGCGCTATTC TGGGAAACGAAGTCATAGGC	282
At1g77490	<i>tAPX</i> for <i>tAPX</i> rev	CATTCAGCCTCTCAAAGACAA CTCCCATATTCATCGGGATA	117
At2g28190	<i>csd2</i> for <i>csd2</i> rev	CCACCGTCTCCAATCTGTTT GAGCTCCGTGTGTCATGTTG	284
At5g01600	<i>fer1</i> for <i>fer1</i> rev	CTCCACCCTATCGTCTCACC ATCTGGTCGAAATGCCAAAC	278
At2g38470	<i>wrky33</i> for <i>wrky33</i> rev	GAAACAAATGGTGGGAATGG TGTCGTGTGATGCTCTCTCC	217
At5g24120	<i>sig5</i> for <i>sig5</i> rev	GGCTCCTTCGTGTTGTTAG TCAACAGAAGCAACGACTGG	279
At2g36990	<i>sig6</i> for <i>sig6</i> rev	CCAGAACAATCCGTTTACCG GTCCTCATCAGCTGCTTCC	287

**Tab. 2-3:** Oligonukleotide für die semiquantitative PCR und quantitative *real-time* PCR.

Genlokus	Name	Sequenz	Fragmentgröße [bp]
At3g18780	<i>act2</i> for <i>act2</i> rev	AAGCTCTCCITTTGTGCTGTT GACTTCTGGGCATCTGAATCT	138
At1g06570	<i>hpd</i> for <i>hpd</i> rev	CGCCTTTACCTACTCACCTC GGGATAGAAGCTGTGGTTGTC	108
Atcg00020	<i>psbA</i> for <i>psbA</i> rev	CGGTGCCATTATTCCTACTTC ATAAGGACCGCCGTTGTATAG	100
At1g08540	<i>sig2</i> for <i>sig2</i> rev	TAAAATCACTGCATCTGCCTC ACTCACTGAAGGTTGCTCCTC	100

**Tab. 2-4:** Oligonukleotide zur Analyse der T-DNA-Insertionslinien.

Name	Sequenz	Verwendung
LP- <i>vte1</i>	TCGAGGGATGGTATTCAGG	Amplifizierung des Gens <i>At4g32770</i>
RP- <i>vte1</i>	CCATGCATATCTGCCAATGA	
T-DNA <i>pAC161</i>	GTGGATTGATGTGATATCTCC	Nachweis des T-DNA-Insertionsvektors <i>pAC161</i> (GABI-Pflanzenlinien)
LP- <i>sig2</i>	CTTCTTCGCTTCATCATCCG	Amplifizierung des Gens <i>At1g08540</i>
RP- <i>sig2</i>	CATTGAAGATTGGGAACCAC	
<i>Lba1</i>	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Nachweis des T-DNA-Insertionsvektors <i>pBIN-pROK2</i> (SALK-Pflanzenlinien)

## 2.7 Biochemische Methoden zur Untersuchung von Proteinen

### 2.7.1 Extraktion und Quantifizierung von Proteinen

#### 2.7.1.1 Proteinextraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus Blättern von *A. thaliana* wurden zunächst ca. 500 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff fein zermahlen und nach Zugabe zu 500 µl Extraktionspuffer umgehend durchmischt. Bei mehr als 500 mg Blattmaterial wurden 1,5 Volumen Extraktionspuffer eingesetzt. Alle Proben wurden für 10 min bei 95 °C inkubiert, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und für 10 min abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration auf Eis gelagert. Die Proteinextrakte wurden bei -20 °C gelagert.

#### Proteinextraktionspuffer

62,5 mM Tris-HCl pH 6,8  
 10 % (v/v) Glycerin  
 1 % (w/v) SDS  
 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

#### 2.7.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976)

Um den Proteingehalt nach BRADFORD (1979) zu ermitteln, wurden 3 µl des Proteinextraktes mit deionisiertem Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl BRADFORD-Lösung (Roti®-Nanoquant) versetzt. Sofort nach Zugabe des BRADFORD-Reagens wurden die Proben durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine spektralphotometrische Messung der Absorption des BRADFORD-Proteinkomplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Proteinkonzentration in µg x µl<sup>-1</sup> wurde über eine mit BSA erstellte Kalibrierung berechnet. Proben- und Standardwerte repräsentierten jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen desselben Proteinextraktes.

### 2.7.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach LOWRY *et al.* (1951)

Um die Proteinkonzentration in Anlehnung an LOWRY *et al.* (1951) bestimmen zu können, mussten zuvor 20 µl des Proteinextraktes mit Aceton ausgefällt werden. Dies war notwendig, da das verwendete LOWRY-Reagenz (DC Protein Assay, Bio-Rad) nicht mit β-Mercaptoethanol im Proteinextrakt verträglich war. Für die Fällung wurden 20 µl des Extraktes mit drei Volumina kaltem 100 %igen Aceton versetzt, durchmischt und über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurden die Proteine durch eine einstündige Zentrifugation (16000 x g) bei 4 °C sedimentiert. Das Proteinsediment wurde getrocknet und in 200 µl 0,1 M NaOH resuspendiert. Davon wurden 20 µl zusammen mit 125 µl Lösung A' (Lösung S + Lösung A, 1:50 v/v) und 1 ml Lösung B des Fertigkits 'Bio-Rad DC Protein Assay' vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Der Proteingehalt in µg x µl<sup>-1</sup> wurde über eine mit BSA (gelöst in 0,1 M NaOH) erstellte Kalibrierung berechnet. Die Proteinkonzentration der Proben und Standards entsprach dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen desselben Proteinextraktes.

## 2.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

### 2.7.2.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach LAEMMLI (1970) in einem SDS-Polyacrylamidgel. Dafür wurden standardmäßig 15 µg Protein auf ein 4,5 %iges Sammelgel (pH 6,8) aufgetragen und im Trenngel (pH 8,8) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Je nach Molekulargewicht der Proteine, die gelelektrophoretisch aufgetrennt werden sollten, waren bestimmte Porengrößen des Trenngels erforderlich. Diese konnten über den prozentualen Anteil an Acrylamid im Gel eingestellt werden. Da kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 kDa und 40 kDa untersucht werden sollten, wurden hauptsächlich 14 %ige (w/v) Polyacrylamidgele für die Auftrennung verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden die Proteine in 5 x Proteinladepuffer aufgenommen, vorsichtig durchmischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4 °C oder Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 18 mA pro Gel (Gelgröße 115 x 100 x 1 mm) und wurde mithilfe einer Gelelektrophoreseapparatur der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde einfach konzentrierter LAEMMLI-Puffer verwendet. Um das Molekulargewicht der Proteine zu bestimmen, wurde zeitgleich mit den Proteinproben der Größenstandard 'Prestained-Protein-Ladder' der Firma MBI Fermentas gelelektrophoretisch aufgetrennt.

5 x Proteinladepuffer

0,225 M Tris-HCl pH 6,8  
 50 % (v/v) Glycerin  
 5 % (w/v) SDS  
 0,25 M DTT  
 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

10 x LAEMMLI-Puffer

1,9 M Glycin  
 0,25 M Tris  
 1 % (w/v) SDS

Sammelgel

4,5 % (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid  
 260 mM Tris-HCl pH 6,8  
 0,1 % (w/v) SDS  
 0,1 % (w/v) APS  
 0,16 % (v/v) TEMED

14 % (w/v) Trenngel

14 % (w/v) Acrylamid/Bis-Acrylamid  
 0,38 M Tris-HCl pH 8,8  
 0,1 % (w/v) SDS  
 0,05 % (w/v) APS  
 0,05 % (v/v) TEMED

**2.7.2.2 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen**

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennte Proteine können durch Anfärben mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau sichtbar gemacht werden. Dafür wurden die Gele für mindestens 12 Stunden in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend in eine Entfärbelösung überführt. Die Dauer der Entfärbung richtete sich nach der gewünschten Farbintensität der Proteinbanden. In der Regel wurden die Gele für vier Stunden entfärbt, wobei die Entfärbelösung nach zwei Stunden gewechselt wurde. Um die Farbintensität der Proteinbanden zusätzlich zu erhöhen, wurden die Gele anschließend für zwei Stunden in deionisiertem Wasser inkubiert.

Coomassie-Färbelösung

25 % (v/v) Isopropanol  
 10 % (v/v) Essigsäure  
 0,05 % (w/v) Coomassie-Blau-R250

Entfärbelösung

10 % (v/v) Isopropanol  
 10 % (v/v) Essigsäure

**2.7.3 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western-Blot)**

Um Proteine zu immobilisieren, wurden diese nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 2.7.2.1) auf eine PVDF-Membran (*porablot* PVDF, Machery-Nagel, Düren) oder auf eine Nitrocellulosemembran (Protran® BA79, Whatman, Dassel) transferiert. Für den Transfer auf PVDF-Membranen wurde ein diskontinuierliches Puffersystem benutzt. Zu Beginn wurde die PVDF-Membran durch mehrmaliges Schwenken in Methanol aktiviert und anschließend für 2 min in deionisiertem Wasser inkubiert. Danach wurde die Membran für 10 min im Anodenpuffer und das Proteingel im Kathodenpuffer äquilibriert. Wurden Nitrocellulosemembranen eingesetzt, fand ein kontinuierliches Puffersystem Verwendung. Hierbei wurden das Proteingel und die Nitrocellulosemembran vor dem Transfer für 10-15 min im Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte nach dem *semi-dry*-Verfahren mithilfe der Elektroblotapparatur ‚Fastblot B44‘ der Firma Biometra (Göttingen). Während der Transfer auf PVDF-Membranen für zwei

Stunden bei 4 °C und einer Stromstärke von 0,65 mA je cm<sup>2</sup> Proteingel erfolgte, wurde auf Nitrocellulosemembranen für 75 min bei 4 °C und einer Stromstärke von 112 mA geblottet. Nach Verfahrensende wurden die Membranen mit deionisiertem Wasser gespült und danach entweder für eine immunologische Nachweisreaktion eingesetzt (s. 2.7.5) oder getrocknet bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### *kontinuierliches Puffersystem*

##### Transferpuffer

39 mM Glycin  
48 mM Tris  
0,0375 % (w/v) SDS  
20 % (v/v) Methanol

#### *diskontinuierliches Puffersystem*

##### Kathodenpuffer

150 mM Glycin  
20 mM Tris  
0,1 % (w/v) SDS

##### Anodenpuffer

150 mM Glycin  
20 mM Tris  
30% (v/v) Methanol

## **2.7.4 Färbung von immobilisierten Proteinen auf Membranen**

Um den Erfolg eines Transfers von Proteinen auf PVDF- oder Nitrocellulosemembranen zu überprüfen, wurden die immobilisierten Proteine mit Ponceau-Lösung angefärbt. Dazu wurde die Membran für 5 min mit 50 ml der Ponceau-Färbelösung inkubiert und anschließend mit deionisiertem Wasser entfärbt. Ein mehrmaliger Wasserwechsel sowie eine 2 x 10-minütige Inkubation in 1 x TBS-Puffer ermöglichten eine vollständige Entfärbung der Membran.

##### Ponceau-Lösung

5 % (v/v) Essigsäure  
0,1 % (w/v) Ponceau-Rot

##### 10 x TBS-Puffer (pH 8,0)

100 mM Tris  
1,5 M NaCl

## **2.7.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen**

Um immobilisierte Proteine auf Membranen nachzuweisen, wurden spezifische Antikörper eingesetzt. Nach dem *Western-Blot* wurde die Membran zunächst für 5 min in 1 x TBS-Puffer äquilibriert und anschließend für eine Stunde in 2 % (w/v) Blockierungslösung ('ECL Advance™ blocking agent', GE Healthcare) inkubiert. Dadurch sollten unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden. Danach folgten mehrere Waschschrte mit 1 x TBS (2 x kurz, 1 x 15 min) und 1 x TBST (2 x 5 min). Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Dieser Antikörper war spezifisch gegen das zu untersuchende Zielprotein gerichtet und wurde in einer geeigneten Konzentration in 1 x TBST verdünnt. Erneut folgten die bereits genannten Waschschrte mit 1 x TBST. Dann wurde die Membran für eine Stunde mit

einem zweiten Antikörper (Sekundärantikörper) inkubiert. Dieser war spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einer Peroxidase verbunden. In der Regel wurde der Sekundärantikörper 20-25fach stärker als der Primärantikörper in 1 x TBST verdünnt. Nach den letzten Waschschritten mit 1 x TBST (2 x kurz, 1 x 30 min, 4 x 5 min) wurde der Protein-Antikörper-Komplex durch *Enhanced-Chemiluminescence* (ECL) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran zunächst für eine Minute mit einer 1:1 (v/v) Mischung der ECL-Lösungen ‚SuperSignal® West Pico Chemilumenscent Substrate‘ inkubiert. In einigen Fällen wurden ‚Lumigen™ TMA-6‘ ECL-Lösungen verwendet. Anschließend wurde die Membran je nach der erwarteten Signalintensität für 1-10 min autoradiographischen Filmen (Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) ausgesetzt, die für die Aufnahme von Chemilumineszenz optimiert sind. Die ECL-Detektion bzw. Autoradiographie wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt.

#### 10 x TBST-Puffer (pH 8,0)

100 mM Tris  
1,5 M NaCl  
0,5 % (w/v) Tween-20

#### Entwickler-Lösung

70 % (v/v) Leitungswasser  
25 % (v/v) Tetenal Roentoroll HC  
2,5 % (v/v) Tetenal Roentoroll Part 2  
2,5 % (v/v) Tetenal Roentoroll Part 3

#### Fixierlösung

75 % (v/v) Leitungswasser  
20 % (v/v) Tetenal Superfix Part 1  
5 % (v/v) Tetenal Superfix Part 2

### **2.7.6 Antikörper**

Im Folgenden sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper angegeben. Primärantikörper mit ihrem Zielprotein und der Verdünnung, die in der Arbeit für immunologische ECL-Detektionen verwendet wurde, sind Tabelle 2-5 zu entnehmen.

Als Sekundärantikörper, an die eine Peroxidase gebunden war, wurden zum einen der ‚ECL Anti-rabbit IgG HRP-Linked Species-Specific Whole Antibody‘ (GE Healthcare, München) sowie zum anderen ein ‚Anti-Chicken IgG – Peroxidase‘ Antikörper (Sigma-Aldrich, München) verwendet.

**Tab. 2-5:** Verwendete Primärantikörper zur proteinbiochemischen Analyse.

Antikörper	Genlokus und Name des Zielproteins	Hersteller	Molekulargewicht des Zielproteins	Verdünnung (ECL)
Anti-AtPGL35	<i>At4g04020</i> Fibrillin	Agrisera (Vännäs, Schweden)	35 kDa	1:1000
Anti-E37	<i>At3g63410</i> MPBQ/MSBQ- Methyltransferase	Prof. Dr. Karsten Fischer (Tromsø, Norwegen)	37 kDa	1:1000
Anti-PsbA C-terminal	<i>Atcg00020</i> D1-Protein	Agrisera	38 kDa SDS-Gel: 28-30 kDa	1:2000
Anti-PsbA N-terminal	<i>Atcg00020</i> D1-Protein	Agrisera	38 kDa SDS-Gel: 28-30 kDa	1:1000
Anti-PsbD	<i>Atcg00270</i> D2-Protein	Agrisera	39,5 kDa SDS-Gel: 28-30 kDa	1:5000
Anti-Phospho(Thr)	Proteine, die an der Aminosäure Threonin phosphoryliert sind	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)		1:1000

## 2.8 Fettsäureanalytik

Der Gehalt verschiedener veresterter Fettsäurespezies in Blättern von *A. thaliana* wurde in Kooperation mit Prof. Ivo Feussner am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen analysiert. Dafür wurden 3 x jeweils fünf Blätter des Wildtyps und der *vte1*-Mutante als Proben zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden durch die Mitarbeiter von Prof. Ivo Feussner an der Universität Göttingen ausgeführt.

Um die veresterten Fettsäuren zu bestimmen, wurden zunächst ca. 20 mg des gefrorenen, zerkleinerten Blattmaterials mit 1 ml HIP-Lösung versetzt und für 10 min bei 8 °C schüttelnd extrahiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (3200 x g, 4 °C) des Extraktes wurden dem Überstand 0,6 ml einer 6,7 %igen (w/v) Kaliumsulfatlösung zugegeben. Danach wurde die Probe erneut für 10 min bei 8 °C schüttelnd inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die obere hexanhaltige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und unter Stickstoff eingedampft. Um die veresterten Fettsäuren zu transmethylieren, wurde die Probe mit 0,33 ml eines Toluol-Methanol-Gemisches (1:2, v/v) und 0,17 ml 0,5 mM Natriummethanolat (Sigma-Aldrich, München) versetzt und für 20 min schüttelnd inkubiert. Danach wurden 0,5 ml einer gesättigten Natriumchloridlösung und 50 µl 32 %ige (v/v) Salzsäure zugegeben. Die aus dieser Reaktion entstandenen Fettsäuremethylester (FAME) wurden danach in einem zweifachen Extraktionsschritt mit Hexan extrahiert. Nach Eindampfen des Hexanextraktes unter Stickstoff wurden die zurückgebliebenen Fettsäuremethylester schließlich in 20 µl Acetonitril gelöst und gaschromatographisch analysiert.

### HIP-Lösung

Hexan/Isopropanol (3:2, v/v)

0,0025 % (w/v) Butylhydroxytoluen (BHT)

10 µg 1,2,3-Triheptadecanoylglycerol (interner Standard)

### GC Methode

Messgerät: Agilent 6890 Gaschromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn)

Temperaturgradient: 180 °C für 1 min  
180 – 200 °C mit 20 K min<sup>-1</sup>  
200 – 250 °C mit 25 K min<sup>-1</sup>  
250 °C für 2,5 min

Trägergas: Helium

Durchfluss: 0,8 ml min<sup>-1</sup>

Trennsäule: Kapillarsäule DB-23 (15 m x 0,18 mm, 0,2 µm Schichtdicke)  
(J&W Scientific, Agilent Technologies, Waldbronn)

Kalibrierung: interner Standard

## **2.9 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Für die TEM-Analyse wurden von je drei Blättern ähnlichen Alters und Größe jeweils sechs Segmente (schmale Querstreifen aus der oberen Blattmitte) mithilfe einer Rasierklinge ausgeschnitten und umgehend in 5 ml Fixierlösung überführt. Um ein vollständiges Eindringen der Fixierlösung in die Interzellularen zu gewährleisten, wurden die Blattsegmente zunächst für 30 min Unterdruck ausgesetzt und anschließend über Nacht bei 4 °C fixiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden durch die Mitarbeiter der Zentralen Mikroskopie an der CAU Kiel ausgeführt. Nach Waschen in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3) (3 x 10 min) erfolgte eine Nachfixierung für vier Stunden in 1 % (w/v) OsO<sub>4</sub>. Erneut wurden die Segmente in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,3) gewaschen (4 x 10 min) und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 % v/v, 70 % v/v, 90 % v/v, 2 x 100 %, jeweils 30 min) schrittweise entwässert. Die Proben wurden über EtOH-LR-White-Gemische (2:1 / 1:1 / 1:2 (v/v), 2 x reines LR White; jeweils 2 h) stufenweise in LR White (Plano GmbH, Wetzlar) eingebettet und bei 60 °C im Wärmeschrank polymerisiert. Die Fixierung und Einbettung erfolgte im Leica EM TP (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar). Mithilfe des Ultramikrotoms Ultracut UCT (Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar) wurden Ultradünnschnitte hergestellt, die mit Bleicitrat und Uranylacetat nachkontrastiert wurden. Die mikroskopische Dokumentation der Präparate am Philips CM10 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Philips Scientific, Eindhoven (Niederlande)) führte Dr. Maria Mulisch durch.

### Fixierlösung

2,5 % (v/v) Glutaraldehyd

1 % (v/v) Formaldehyd

in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer pH 7,3



## 2.10 Datenbanken

Internetadresse	Beschreibung / Verwendungszweck
<a href="http://www.arabidopsis.org">http://www.arabidopsis.org</a>	TAIR (The Arabidopsis Information Resource)
<a href="http://atidb.org">http://atidb.org</a>	<i>Arabidopsis thaliana</i> Integrated Database; Informationen über T-DNA-Linien in <i>A. thaliana</i>
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	NCBI (National Center for Biotechnology Information)
<a href="http://www.brenda-enzymes.org">http://www.brenda-enzymes.org</a>	BRENDA; Enzymanalyse
<a href="http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase">http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase</a>	Cyanobase; Informationen über Gene und Proteine in Cyanobakterien u. a. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<a href="http://arabidopsisacyllipids.plantbiology.msu.edu">http://arabidopsisacyllipids.plantbiology.msu.edu</a>	Informationen zum Lipidstoffwechsel und beteiligten Enzymen/Proteinen in <i>Arabidopsis</i>
<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2</a>	ClustalW2; Analyse von Gensequenzen
<a href="http://www.bioinformatics.org/sms2">http://www.bioinformatics.org/sms2</a>	Sequence Manipulation Suite; Analyse von Protein- und Gensequenzen
<a href="http://ipsort.hgc.jp/">http://ipsort.hgc.jp/</a>	Vorhersage N-terminaler Zielsequenzen von Proteinen in Pflanzen
<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3">http://frodo.wi.mit.edu/primer3</a>	Primer3 Version 0.4.0; Primerdesign
<a href="http://signal.salk.edu">http://signal.salk.edu</a>	SALK Institute Genomic Analysis Laboratory
<a href="http://www.gabi-kat.de">http://www.gabi-kat.de</a>	GABI-Kat Projekt des Max-Planck Instituts für Züchtungsforschung (Köln)
<a href="http://www.genevestigator.com">http://www.genevestigator.com</a>	Microarray-Datenbank, Analyse der Expression und Regulation von Genen

## 2.11 Statistik und Densitometrie

Die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichung und Signifikanztests wurde mithilfe der Software Microsoft® Excel ausgeführt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz von zwei unabhängigen Messreihen wurde der Student'sche t-Test ausgewählt.

Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  festgelegt. Die Signifikanz der jeweiligen Teststatistik wurde wie folgt bewertet und gekennzeichnet:

$P > 0,05$  kein Hinweis auf einen Unterschied, nicht signifikant

$P \leq 0,05$  \* indifferent

$P \leq 0,01$  \*\* signifikant

$P \leq 0,001$  \*\*\* hoch signifikant

### Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung von Autoradiogrammen nach ECL-Detektion sowie von Proteingelen, die mit Coomassie angefärbt wurden, erfolgte mithilfe der Software ‚ImageJ Version 1.42i‘. Das Verfahren der Densitometrie sollte eine semiquantitative Bestimmung der D1-Proteinmenge zu den verschiedenen Zeitpunkten des Starklicht- und Kontrollexperimentes ermöglichen. Dazu wurden die ECL-Filme und Proteingele eingescannt (Auflösung 300dpi) und die mittlere Tonwertdichte pro Flächeneinheit (ID – *integrated pixel density*) für die Proteinbanden bestimmt. Dieser Wert wurde mit einer Proteinmenge gleichgesetzt.

Je Experiment und Pflanzenlinie wurden mehrere Expositionszeiten der ECL-Filme ausgewertet (Anti-PsbA C-terminal: 1 min, 2 min; Anti-PsbA N-terminal: 1 min, 2 min, 5 min) und in den Proteingelen die große Proteinuntereinheit des Enzyms Rubisco (RbcL) sowie LHC-Proteine densitometrisch erfasst. Um mögliche Änderungen der D1-Proteinmenge, z. B. nach einer Starklichtexposition zu erfassen, wurde eine Probe als Kontrolle festgelegt (z. B. Wildtyp vor einer Behandlung) und alle Werte der anderen Proben mit dieser ins Verhältnis gesetzt (Gl. 2-8). Anschließend wurden durch densitometrische Auswertung der Coomassie-Gele (RbcL und LHC-Proteine) mögliche Abweichungen der aufgetragenen Proteinmenge zwischen Kontrolle und Proben erfasst ( $K_{Coo}$ ) (Gl. 2-9). Diese Abweichungen wurden bei der Berechnung der relativen D1-Proteinmenge berücksichtigt (Gl. 2-8).

$$\text{relative D1-Proteinmenge} = \left( \frac{ID_{\text{Probe}}}{ID_{\text{Kontrolle}}}_{ECL} \right) \times K_{Coo} \quad (\text{Gl. 2-8})$$

$$K_{Coo} = \left( \frac{ID_{\text{Probe}}}{ID_{\text{Kontrolle}}}_{LHC \text{ bzw. } RbcL} \right) \quad (\text{Gl. 2-9})$$

### 3. Ergebnisse

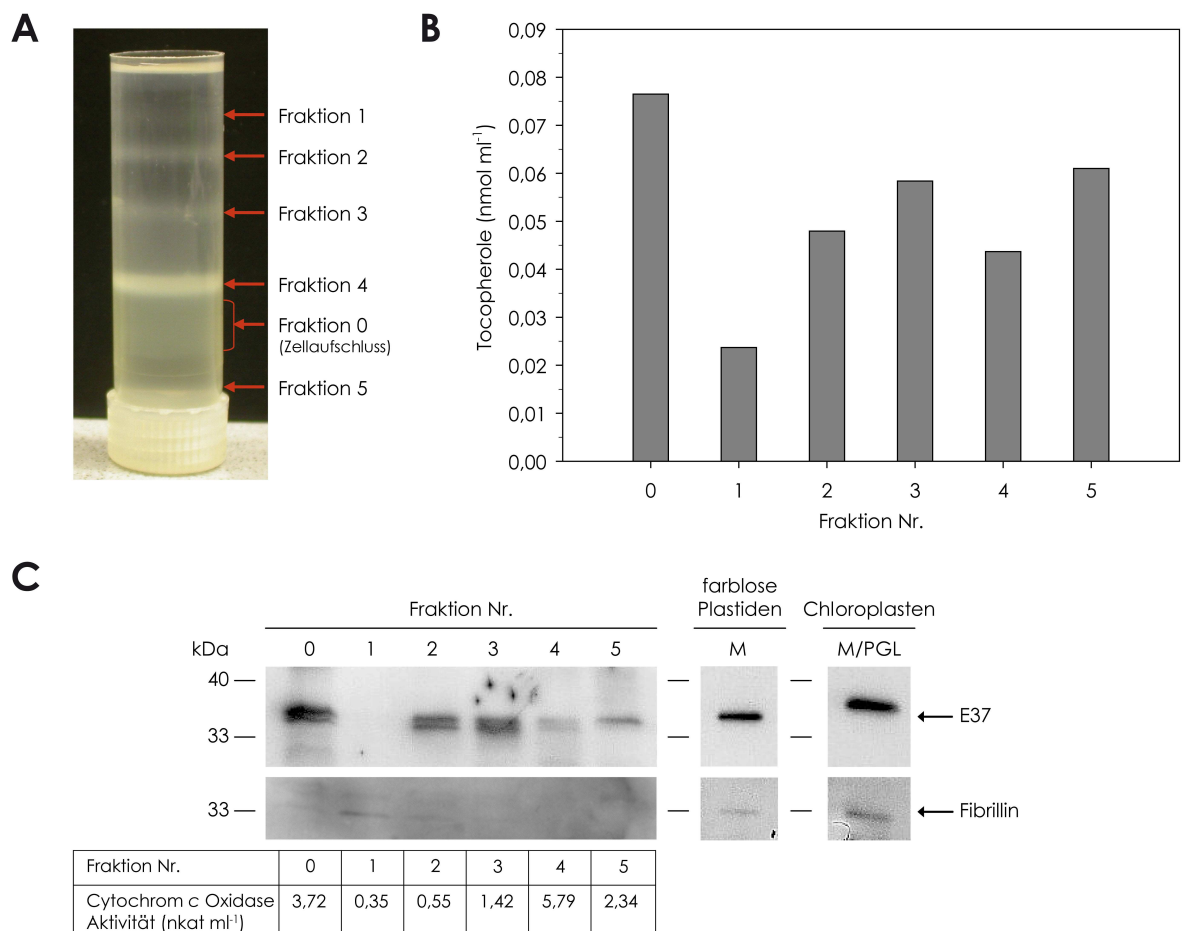
#### 3.1 Untersuchungen zur extraplastidären Verteilung von Tocopherolen in der Pflanzenzelle

Bisher ist bekannt, dass Tocopherole in der pflanzlichen Zelle antioxidativ wirksam sind und hauptsächlich in den Membranen der Plastiden vorkommen, wo auch ihre Biosynthese stattfindet (Munne-Bosch & Alegre 2002). Um Hinweise zu erhalten, ob Tocopherole auch außerhalb der Plastiden vorkommen und somit an intrazellulären Signalwegen beteiligt sein könnten, wurde die subzelluläre Verteilung von Tocopherolen in pflanzlichen Zellen analysiert. Da in grünem Gewebe der Anteil des plastidären Tocopherols sehr hoch ist und plastidäre Verunreinigungen in den Zellfraktionen die Analysen behindern könnten, wurde für alle Versuche das nichtgrüne Infloreszenzgewebe von *Brassica oleracea botrytis* (Blumenkohl) verwendet.

Es wurde eine subzelluläre Fraktionierung mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation nach GIBEAUT und CARPITA (1994) durchgeführt (s. 2.4.1). Diese ermöglichte eine Anreicherung von Membranen aus verschiedenen Zellkompartimenten (Abb. 3-1A). In den erhaltenen Fraktionen wurde die Menge an Tocopherolen bestimmt und durch Nachweis von charakteristischen Markerproteinen für pflanzliche Zellmembranen ermittelt, welche Membranen in den einzelnen Fraktionen angereichert sind. Um zu überprüfen, ob in den Fraktionen plastidäre Verunreinigungen auftreten, wurde das Vorkommen von plastidären Hüllmembranen und von Plastoglobuli in den Fraktionen analysiert. Zusätzlich wurden Membranfraktionen aus den farblosen Plastiden (Leukoplasten) der Infloreszenz sowie aus Chloroplasten von Blättern des Blumenkohls gewonnen (s. 2.4.2, 2.4.3). Diese dienten dazu, die Spezifität der verwendeten Antikörper für ihr jeweiliges Zielprotein bei verschiedenen Plastidentypen im Gewebe des Blumenkohls zu kontrollieren.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz der Verwendung von nichtgrünem Gewebe in allen Fraktionen plastidäre Verunreinigungen vorhanden waren (Abb. 3-1C). Eine Anreicherung plastidärer Hüllmembranen wurde vor allem in den Fraktionen 2 und 3 beobachtet, wohingegen Fraktion 1 vorwiegend Bestandteile der Plastoglobuli aufwies. Der Hauptanteil mitochondrialer Membranen wurde nach Messung der Aktivität des Enzyms Cytochrom c Oxidase der Fraktion 4 zugeordnet. Der immunologische Nachweis des E37-Proteins und die Bestimmung der Tocopherolmenge in den Fraktionen zeigte, dass der Tocopherolgehalt insbesondere in den Fraktionen erhöht war, die vermehrt plastidäre Hüllmembranen aufwiesen (Abb. 3-1B,C). Es wird daher vermutet, dass die in diesen Fraktionen detektierten Tocopherole aus plastidären Hüllmembranen stammen. Die in Fraktion 1 nachgewiesenen Tocopherole könnten aus Plastoglobuli stammen. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnt, sind

Tocopherole in plastidären Hüllmembranen und Plastoglobuli nachgewiesen worden (Vidi et al. 2006).



**Abb. 3-1:** Tocopherolgehalt und Charakterisierung der angereicherten Membranfraktionen aus *Brassica oleracea botrytis*. **(A)** Diskontinuierlicher Saccharosedichtegradient mit Zuordnung der Fraktionen 1–5. **(B)** Tocopherolgehalt in den Fraktionen 1–5 bezogen auf 1 ml Fraktionsvolumen. **(C)** Immunologischer Nachweis des E37- und des Fibrillin-Proteins in den Fraktionen 1–5 sowie in Kontrollfraktionen, die mit Hüllmembranen (M) aus farblosen Plastiden der Blumenkohlinfloreszenz bzw. mit Hüllmembranen/Plastoglobuli (M/PGL) aus Chloroplasten von Blumenkohlblättern angereichert sind. Das E37-Protein ist das Enzym MPBQ/MSBQ-Methyltransferase aus dem Tocopherolbiosyntheseweg und dient als Markerprotein für die innere Hüllmembran der Plastiden. Als Marker für die Anreicherung von Plastoglobuli fungiert das Fibrillin-Protein. Je 20 µl Fraktionsvolumen wurden in einem 12 %igen (w/v) Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Abgebildet sind Autoradiogramme nach ECL-Detektion. Der Nachweis mitochondrialer Membranen erfolgte durch Messung der Aktivität des Enzyms Cytochrom c Oxidase (s. 2.5.2) und ist tabellarisch dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich der Hauptanteil der Tocopherole in plastidären Membranen befindet. Eine extraplastidäre Lokalisation von Tocopherolen in der pflanzlichen Zelle konnte mit der angewandten Methode zur Zellfraktionierung nicht belegt werden.

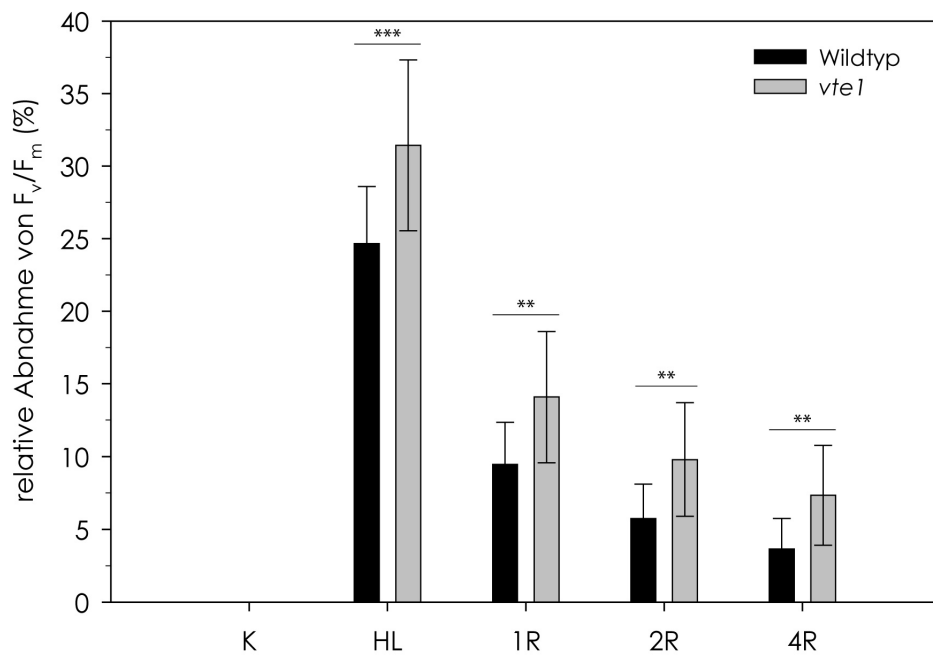
## 3.2 Auswirkungen einer Starklichtbehandlung in Wildtyp und *vte1*-Mutante

Da ein extraplastidäres Vorkommen der Tocopherole in pflanzlichen Zellen nicht gezeigt werden konnte (s. 3.1), stand in den darauffolgenden Untersuchungen die Frage nach der Funktion der Tocopherole in Chloroplasten im Mittelpunkt. Insbesondere die Rolle der Tocopherole in Pflanzen unter Starklichtbedingungen wurde analysiert. Zunächst wurde geprüft, wie Starklicht auf Pflanzen wirkt, die keine Tocopherole synthetisieren können. Dafür wurden Starklichtversuche an Blättern von 6,5 – 7 Wochen alten Pflanzen des Wildtyps und der tocopheroldefizienten *vte1*-Mutante von *A. thaliana* durchgeführt (s. 2.3.3). Während eines Starklichtversuches wurden die Pflanzen zunächst für 1,5 Stunden einer gegenüber den Anzuchtbedingungen 15fach höheren Lichtintensität ausgesetzt. Es war zu erwarten, dass unter diesen Bedingungen eine Photoinhibierung am Photosystem II sowie eine Schädigung des D1-Proteins eintreten. Um darüber hinaus zu prüfen, ob Tocopherole einen Einfluss auf die Reparatur des Photosystems II und den *turnover* des D1-Proteins besitzen, folgte der Starklichtexposition eine mehrstündige Erholungsphase im Schwachlicht. Zeitgleich wurden Kontrollversuche ohne Starklicht durchgeführt. Alle Experimente fanden bei einer Temperatur von 21 °C statt.

### 3.2.1 Photoinhibierung am Photosystem II

Um herauszufinden, welche Auswirkungen eine Starklichtbehandlung auf das Photosystem II in Pflanzen des Wildtyps und der *vte1*-Mutante hat, wurden Chlorophyllfluoreszenzmessungen durchgeführt und die Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) bestimmt. Aus der Differenz der  $F_v/F_m$ -Werte vor und nach der Starklichtbehandlung wurde die relative Abnahme von  $F_v/F_m$  ermittelt (s. 2.5.3). Eine Abnahme von  $F_v/F_m$  kann auf eine Photoinhibierung am Photosystem II (PSII) hindeuten.

Es konnte festgestellt werden, dass die Starklichtbehandlung zu einem signifikanten Abfall von  $F_v/F_m$  in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante führt (Abb. 3-2). Während die Effizienz des PSII im Wildtyp durch die Starklichtexposition um 25 % abfiel, nahm sie in der *vte1*-Mutante um 31 % ab und war damit deutlich stärker reduziert als im Wildtyp. In der Erholungsphase nach Starklichtexposition wiesen Blätter der *vte1*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant verzögerte Wiederherstellung der Effizienz des Photosystems II auf. Während am Ende der Erholungsphase (4R) die Effizienz des PSII im Wildtyp wieder bis auf 97 % des Anfangswertes angestiegen war, war sie hingegen in Blättern der *vte1*-Mutante noch um 7 % vermindert. In den Kontrollversuchen ohne Starklichtexposition konnte keine Beeinträchtigung der Effizienz des Photosystems II nachgewiesen werden (s. A.1).

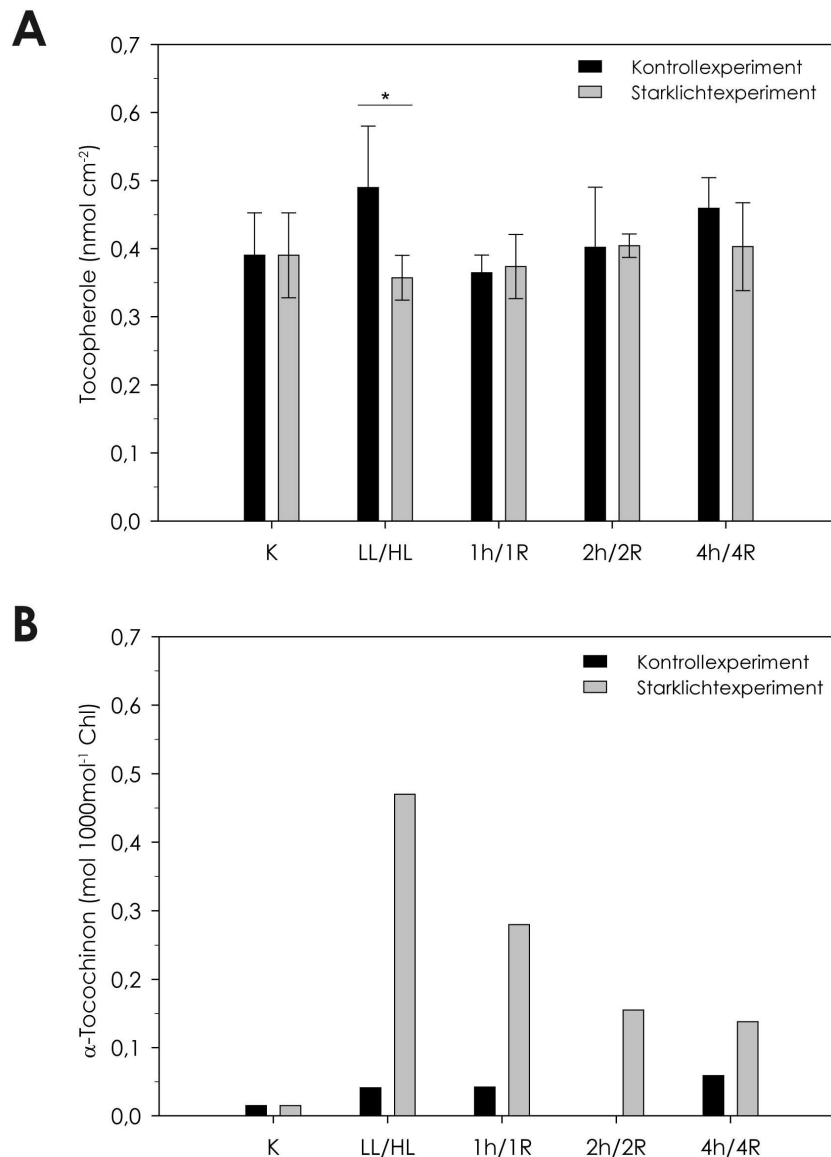


**Abb. 3-2:** Relative Abnahme von  $F_v/F_m$  in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante bei Starklichtexposition ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sowie während der nachfolgenden Erholungsphase (R – Recovery). Die Berechnung der Abnahme von  $F_v/F_m$  durch die Starklichtbehandlung erfolgte relativ zu den  $F_v/F_m$ -Werten des Wildtyps bzw. der *vte1*-Mutante vor Beginn des Experimentes (K). Diese Werte wurden auf 100% gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante waren zum jeweiligen Versuchszeitpunkt signifikante Unterschiede mit \*\*\* hoch signifikant,  $P < 0,001$  und \*\* signifikant,  $P = 0,002$  (t-Test, zweiseitig) feststellbar. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht

### 3.2.2 Tocopherol- und Tocochinongehalt

Um den Einfluss der Starklichtbehandlung auf den Tocopherolgehalt und die Entstehung von  $^1\text{O}_2$  in den Chloroplasten zu testen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuches der Tocopherol- und Tocochinongehalt im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante bestimmt (Abb. 3-3). Tocochinone sind Oxidationsprodukte der Tocopherole, welche bei einer Reaktion von Tocopherolen mit  $^1\text{O}_2$  entstehen. Eine Akkumulation von Tocochinonen unter Starklichtbedingungen wäre ein Indikator dafür, dass  $^1\text{O}_2$  gebildet und spezifisch durch Tocopherole inaktiviert wird. Da in Blättern hauptsächlich  $\alpha$ -Tocopherol vorkommt, ist nach Oxidation mit  $^1\text{O}_2$  vorwiegend  $\alpha$ -Tocopherolchinon zu erwarten.

In den Blättern der *vte1*-Mutante konnten erwartungsgemäß weder Tocopherole noch Tocochinone nachgewiesen werden. In Blättern des Wildtyps führte die Starklichtexposition (HL) zu einer Abnahme des Tocopherolgehaltes. Der verminderte Tocopherolgehalt ging mit einer gleichzeitigen Akkumulation von  $\alpha$ -Tocochinon einher. Unter Kontrollbedingungen war indes nur wenig Tocochinon im Wildtyp nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass bei Starklicht vermehrt  $^1\text{O}_2$  entsteht und dieser durch Tocopherole beseitigt werden kann.



**Abb. 3-3:** Gehalt an **(A)** Tocopherolen und **(B)**  $\alpha$ -Tocochinon in Blättern des Wildtyps im Kontrollversuch sowie bei Starklichtexposition mit nachfolgender Erholungsphase (R – Recovery). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils drei individuellen Blättern  $\pm$  SD. \* indifferent,  $P=0,04$  (t-Test, einseitig). Die Werte des  $\alpha$ -Tocochinongehalts entstammen einer Versuchsreihe (2. Experiment s. A.2). Zum Zeitpunkt 2h lag die Menge an  $\alpha$ -Tocochinon außerhalb der Nachweisgrenze der HPLC. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollversuch

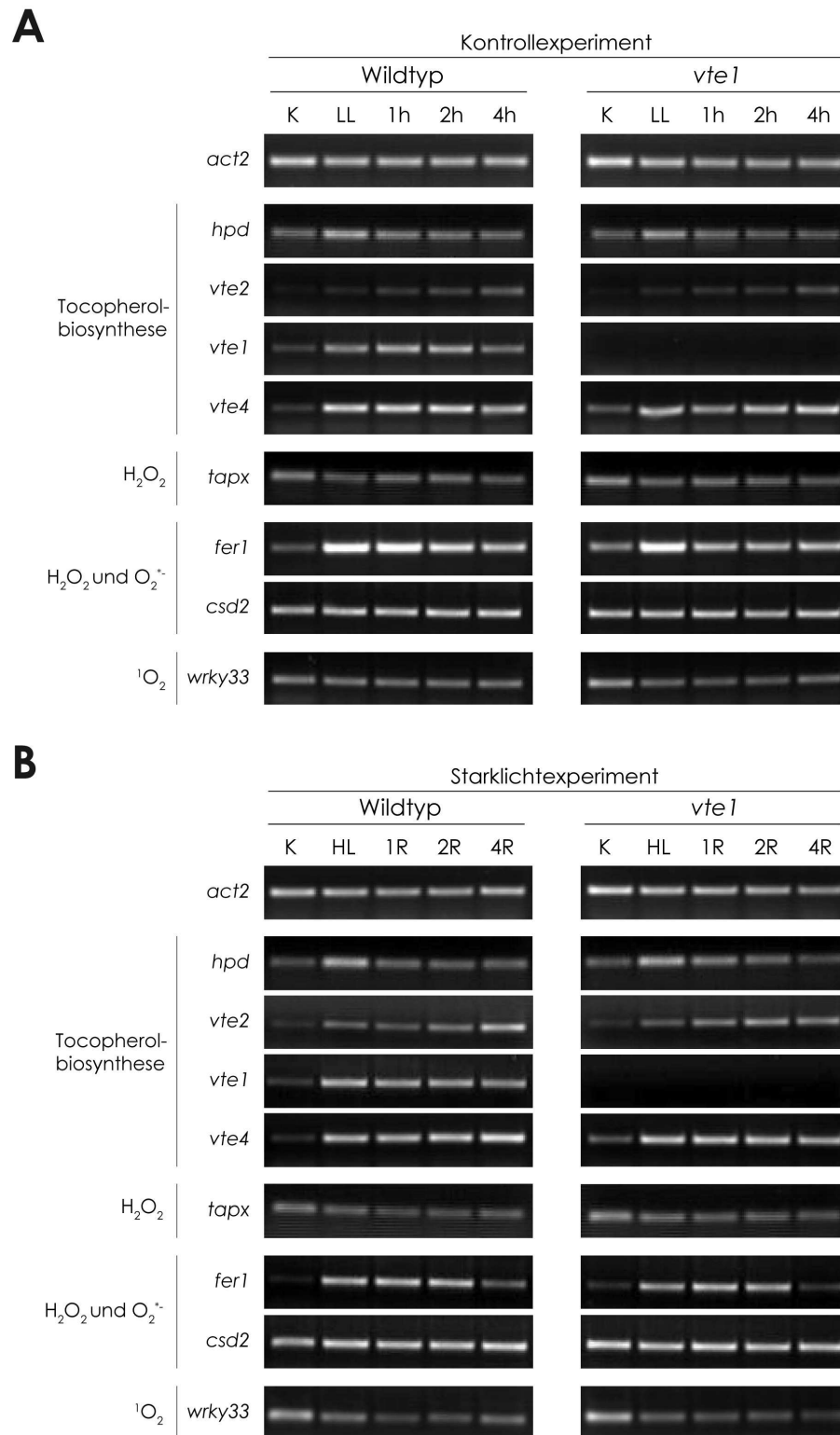
Der Tocopherolgehalt in Blättern des Wildtyps war nur bei Starklichtexposition reduziert. Während der Erholungsphase konnten keine Unterschiede zum Kontrollversuch festgestellt werden. Mit zunehmender Erholungszeit nahm die Menge an  $\alpha$ -Tocochinon fortwährend ab. Die vorliegenden Ergebnisse wurden durch ein weiteres unabhängiges Experiment bestätigt (s. A.3).

### 3.2.3 Expression von Genen des Tocopherolbiosyntheseweges und von Genen, die das Auftreten von ROS anzeigen

Die folgenden Untersuchungen sollten klären, ob die Starklichtbehandlung die Expression von Genen des Tocopherolbiosyntheseweges beeinflusst. Zusätzlich wurden Gene analysiert, die in Abhängigkeit von der Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies exprimiert werden können. Dazu gehörten das *tapx*- und *csd2*-Gen, die für die thylakoidgebundene Ascorbatperoxidase bzw. für eine Cu/Zn-Superoxiddismutase kodieren. Die Expression des *fer1*-Gens diente als Indikator für das Vorkommen von  $H_2O_2$  und  $O_2^{\cdot-}$  und die des *wrky33*-Gens für die spezifische Akkumulation von  $^1O_2$  (op den Camp *et al.* 2003). Es wurden semiquantitative PCR-Ansätze durchgeführt und der Transkriptgehalt der verschiedenen Gene in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante im Kontroll- und Starklichtexperiment bestimmt.

Sowohl im Kontrollexperiment als auch unter Starklichtbedingungen konnten keine auffälligen Unterschiede in der Expression von Genen der Tocopherolbiosynthese zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 3-4). Im Vergleich zum Kontrollexperiment war bei Starklichtexposition und während der nachfolgenden Erholungsphase bei beiden Pflanzentypen (WT, *vte1*) eine höhere Transkriptmenge des *vte2*-Gens feststellbar. Weitere Unterschiede in den Transkriptmengen von Genen, die das Auftreten verschiedener Arten von ROS anzeigen sollten, konnten zwischen Wildtyp und der *vte1*-Mutante nicht aufgezeigt werden. Der Transkriptgehalt des *wrky33*-Gens, welcher auf ein Vorkommen von  $^1O_2$  hinweist, war nur zu Beginn des Experimentes erhöht. Dies konnte in keinen Zusammenhang mit einer Anreicherung von  $^1O_2$  zu diesem oder einem späteren Zeitpunkt gestellt werden (vgl. Abb. 3-3B). Es ist denkbar, dass die Expression des *wrky33*-Gens auch durch andere Faktoren, wie z. B. durch einen Wechsel aus der Dunkel- in die Lichtphase, beeinflusst werden kann.

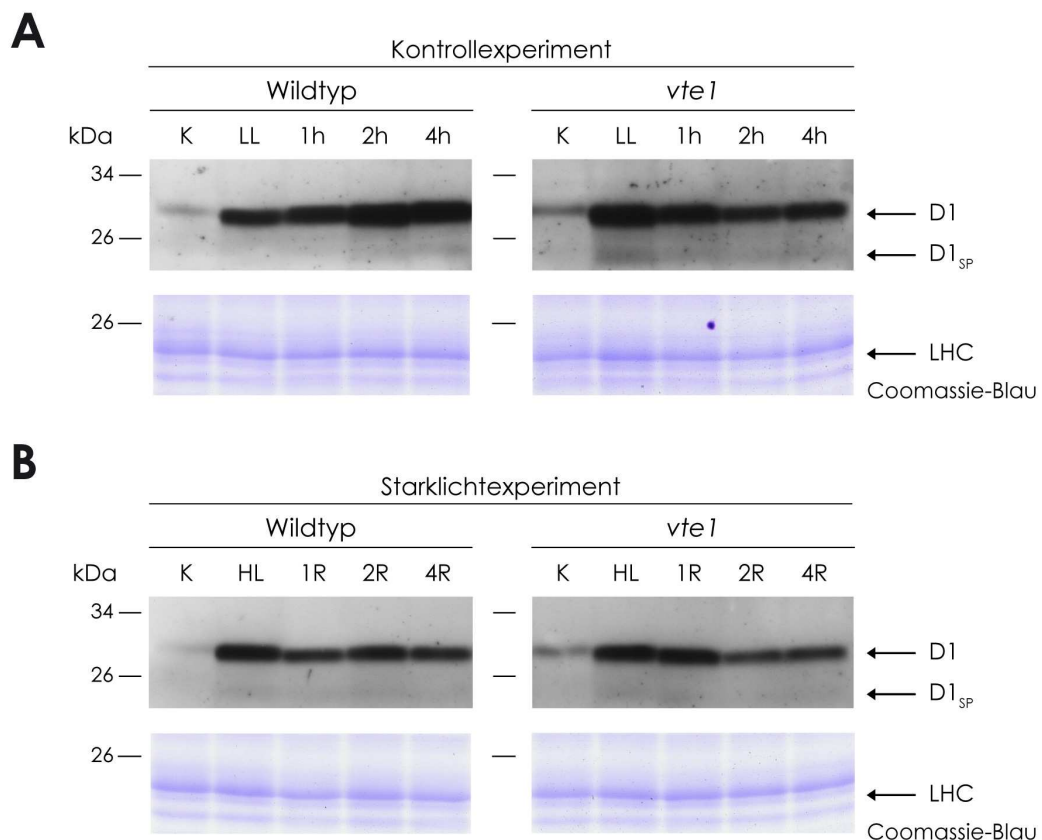




**Abb. 3-4:** Transkriptgehalte von Genen des Tocopherolbiosyntheseweges sowie durch ROS induzierter Gene in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante unter **(A)** Kontrollbedingungen und bei **(B)** Starklicht mit nachfolgender Erholungsphase (R – Recovery). Als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge dient der Transkriptgehalt des *act2*-Gens. Die Gene kodieren für folgende Proteine in *A. thaliana*: *hpd* – *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, *vte2* – Homogentisat-Prenyltransferase, *vte1* – Tocopherolzyklase, *vte4* –  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, *fer1* – Ferritin 1, *wrky33* – WRKY33. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment

### 3.2.4 D1-Proteingehalt in Wildtyp und *vte1*-Mutante

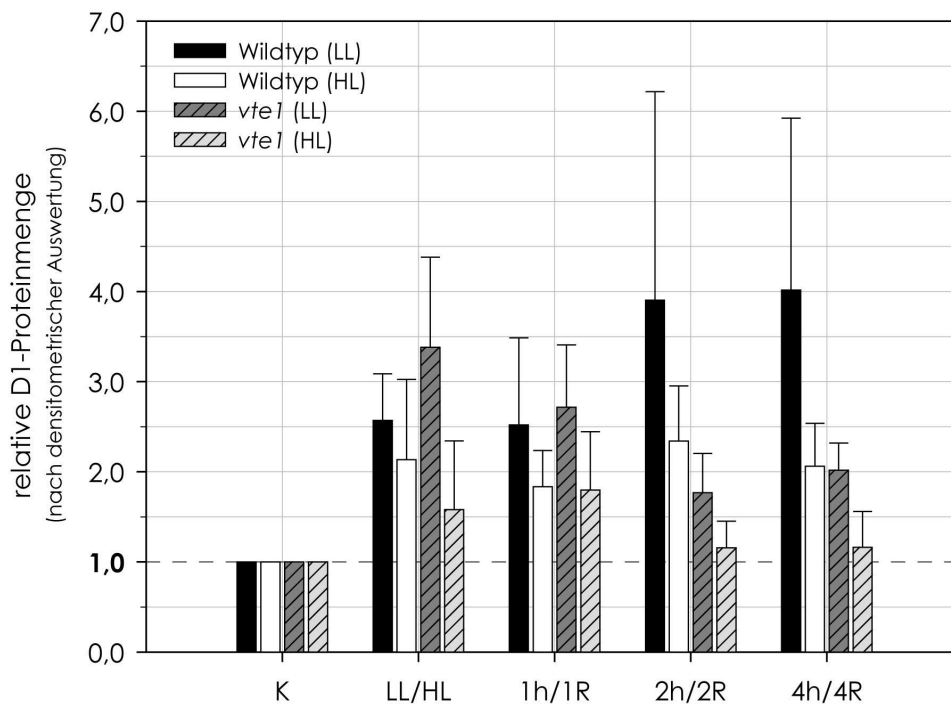
Um den Einfluss von Starklicht und Tocopheroldefizienz auf die Menge des D1-Proteins zu untersuchen, wurde der D1-Proteingehalt in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante bestimmt. Für den immunologischen Nachweis des D1-Proteins wurde ein Antikörper (Anti-PsbA) verwendet, der gegen einen Bereich am C-terminalen Ende des D1-Proteins gerichtet ist und sowohl die phosphorylierte als auch die nichtphosphorylierte Form des D1-Proteins detektiert. Zusätzlich war mit Hilfe des Antikörpers der Nachweis eines ca. 24 kDa großen C-terminalen Fragmentes des D1-Proteins möglich.



**Abb. 3-5:** Immunologischer Nachweis des D1-Proteins in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante unter **(A)** Schwachlicht im Kontrollexperiment und bei **(B)** Starklichtexposition mit nachfolgender Erholungsphase (R – Recovery). Dargestellt sind Autoradiogramme nach ECL-Detektion. Das jeweilige Signal entspricht der Summe aus phosphorylierter und nichtphosphorylierter Form des D1-Proteins. Die Färbung der Proteingele mit Coomassie-Blau diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung. Hierbei dargestellt ist ein Ausschnitt, der u. a. Proteine der Lichtsammelkomplexe (LHC) zeigt. D1<sub>SP</sub> – C-terminales Spaltprodukt des D1-Proteins, K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment

Nach zwei Stunden Belichtung mit Schwachlicht (LL) war die Menge an D1-Protein in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante gegenüber dem Beginn der Lichtphase (K) erhöht (Abb. 3-5, Abb. 3-6). Dabei war in der *vte1*-Mutante eine stärkere Zunahme des D1-Proteingehaltes als im Wildtyp zu beobachten. Im Unterschied zu Blättern des Wildtyps, in denen der D1-

Proteingehalt während der anschließenden vier Stunden im Schwachlicht (1h, 2h, 4h) zunahm, sank zeitgleich in Blättern der *vte1*-Mutante die Menge an D1-Protein ab. Nach Starklichtexposition (HL) war im Wildtyp geringfügig weniger D1-Protein als bei Schwachlicht (LL) feststellbar (Abb. 3-6). Demgegenüber war bei Starklichtexposition (HL) der Gehalt an D1-Protein in Blättern der *vte1*-Mutante niedriger. Während nach einstündiger Erholungsphase (1R) die Menge an D1-Protein im Wildtyp sank, blieb diese in Blättern der *vte1*-Mutante annähernd konstant. Im weiteren Verlauf der Erholungsphase (2R, 4R) nahm im Wildtyp der D1-Proteingehalt wieder zu und ähnelte der Menge an D1-Protein, welche direkt nach der Starklichtexposition (HL) detektiert wurde. Zeitgleich sank dahingegen der D1-Proteingehalt in der *vte1*-Mutante ab. Hierbei lag die D1-Proteinmenge der dem Starklicht ausgesetzten *vte1*-Blätter noch unter derjenigen von *vte1*-Blättern, die nur Schwachlicht (2h, 4h) erhalten hatten (Abb. 3-6). Dies könnte auf einen stärkeren Abbau des D1-Proteins in der *vte1*-Mutante unter Starklichtbedingungen hindeuten. Das C-terminale Spaltprodukt des D1-Proteins trat jedoch sowohl unter Schwachlichtbedingungen als auch im Starklichtexperiment auf und schien in der Menge nicht durch die jeweilige Lichtbehandlung beeinflusst zu werden (Abb. 3-5).



**Abb. 3-6:** Relative D1-Proteinmenge (nach densitometrischer Auswertung) in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante im Kontrollversuch (LL) sowie bei Starklichtexposition (HL) und nachfolgender Erholungsphase (R – Recovery). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier densitometrisch ausgewerteten Autoradiogrammen  $\pm$  SD, die aus zwei unabhängigen Experimenten stammen. Die D1-Proteinmenge wurde relativ zum D1-Proteingehalt im Wildtyp bzw. der *vte1*-Mutante vor Beginn der Lichtbehandlung (K) berechnet, welcher auf den Wert 1 gesetzt wurde. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollversuch

### 3.3 Rolle der Tocopherole bei der Beseitigung von $^1\text{O}_2$ im Photosystem II

Die in Kapitel 3.2 beschriebenen Untersuchungen lassen vermuten, dass Tocopherole die Stabilität des D1-Proteins und somit des Photosystems II gegenüber einer Lichtschädigung beeinflussen. Die Wirkung der Tocopherole scheint insbesondere dann wichtig zu sein, wenn Blätter eine kurze Starklichtexposition erfahren und möglicherweise auch während einer nachfolgenden Erholungsphase.

Sind Pflanzen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, kann eine verstärkte Photoinhibierung am Photosystem II eintreten und zur vermehrten Bildung von  $^1\text{O}_2$  führen, welcher irreversible oxidative Schäden am D1-Protein hervorrufen kann (Aro *et al.* 1993, Okada *et al.* 1997).

Untersuchungen mit *Chlamydomonas reinhardtii* (Trebst *et al.* 2002, Kruk *et al.* 2005) haben gezeigt, dass Tocopherole den Abbau des D1-Proteins bei Starklicht vermindern, indem sie zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  beitragen. Es ist zu vermuten, dass Tocopherole auch in Höheren Pflanzen eine ähnlich obligatorische Rolle bei der Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  spielen und damit zum Schutz des D1-Proteins beitragen.

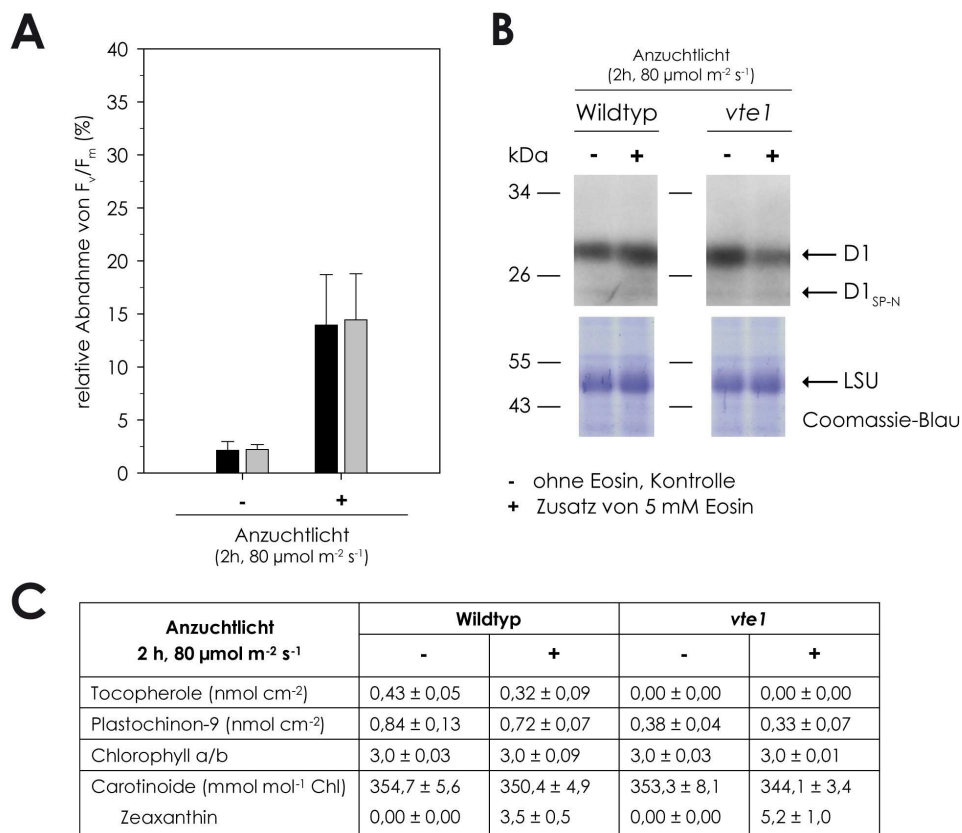
Um zu klären, welche Wirkmechanismen dem Einfluss der Tocopherole auf das D1-Protein in den eigenen Studien zu Grunde liegen, wurde daher zunächst die antioxidative Funktion der Tocopherole überprüft.

#### 3.3.1 Abbau des D1-Proteins in Wildtyp und *vte1*-Mutante in Gegenwart von $^1\text{O}_2$

Um zu überprüfen, ob eine verstärkte Bildung von  $^1\text{O}_2$  in der *vte1*-Mutante den Abbau des D1-Proteins fördert, wurden Blattscheiben des Wildtyps und der *vte1*-Mutante mit Eosin-Y behandelt (s. 2.3.4). Als Kontrolle dienten Blattscheiben, die mit destilliertem Wasser inkubiert wurden. Nach Aufnahme von Eosin durch die Blätter sollte es bei Belichtung zur Bildung von  $^1\text{O}_2$  im Blattgewebe kommen. Um zu vermeiden, dass zusätzlich  $^1\text{O}_2$  im Photosystem II entsteht, wurde der Versuch bei einer Lichtintensität von nur  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , bei der die Pflanzen auch angezogen wurden, durchgeführt. Für den Versuch wurden Pflanzen verwendet, die nach ihrer täglichen Dunkelphase bereits für zwei Stunden in der Klimakammer belichtet wurden. Um eine gleichmäßige Aufnahme des Eosins zu gewährleisten, wurden die Blattproben in destilliertem Wasser ohne bzw. mit 5 mM Eosin für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Blattscheiben auf feuchtes Filterpapier transferiert und für zwei Stunden belichtet ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). In den Blattproben wurde die Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) sowie der D1-Proteingehalt und die Menge an Tocopherolen bestimmt.

Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen war in den Blattproben nach Einwirkung von Eosin und zweistündiger Belichtung ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante eine 14 %ige Abnahme von  $F_v/F_m$  nachweisbar (Abb. 3-7A). Ein geringer

Abfall von  $F_v/F_m$  in den Kontrollproben war vermutlich durch die Verwundungsstellen an den Rändern der Blattscheiben bedingt.



**Abb. 3-7:** Auswirkungen von Eosin-Y auf den Wildtyp und die *vte1*-Mutante. **(A)** Relative Abnahme von  $F_v/F_m$  nach Belichtung mit  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für zwei Stunden. Für die Berechnung wurden die  $F_v/F_m$ -Werte der im Dunkeln inkubierten Blattscheiben auf 100 % gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. **(B)** Immunologischer Nachweis des D1-Proteins sowie eines N-terminalen D1-Proteinfragmentes ( $D1_{\text{SP-N}}$ ) nach zweistündiger Belichtung ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Es wurden jeweils  $10 \mu\text{g}$  Protein in einem 14 %igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. **(C)** Tocopherol- und Plastochinongehalt, Chlorophyll a/b Verhältnis sowie relativer Carotinoid- und Zeaxanthingehalt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils drei Blattscheiben  $\pm$  SD. LSU – große Untereinheit des Enzyms Rubisco, (-) ohne Eosin, Wasserkontrolle, (+) Zusatz von 5 mM Eosin-Y

Für den immunologischen Nachweis des D1-Proteins wurde ein Antikörper verwendet, der gegen einen Bereich am N-terminalen Ende des D1-Proteins gerichtet ist. Dieser Antikörper sollte es ermöglichen, ein N-terminales ca. 22-24 kDa großes Spaltprodukt des D1-Proteins zu detektieren, das infolge der Oxidation des D1-Proteins durch  $^1\text{O}_2$  entstehen kann (Okada *et al.* 1996). In Anwesenheit von Eosin war nach zweistündiger Belichtung nur in Blättern der *vte1*-Mutante eine Abnahme des D1-Proteingehaltes nachweisbar (Abb. 3-7B). Das N-terminale Spaltprodukt des D1-Proteins war in Wildtyp und *vte1*-Mutante gleichermaßen zu finden und wurde in der Menge nicht durch die Eosinbehandlung beeinflusst.

Um zu untersuchen, ob in Anwesenheit von Eosin auch andere Antioxidantien gebildet bzw. verbraucht werden, die wie die Tocopherole  $^1\text{O}_2$  inaktivieren können, wurde die Menge an

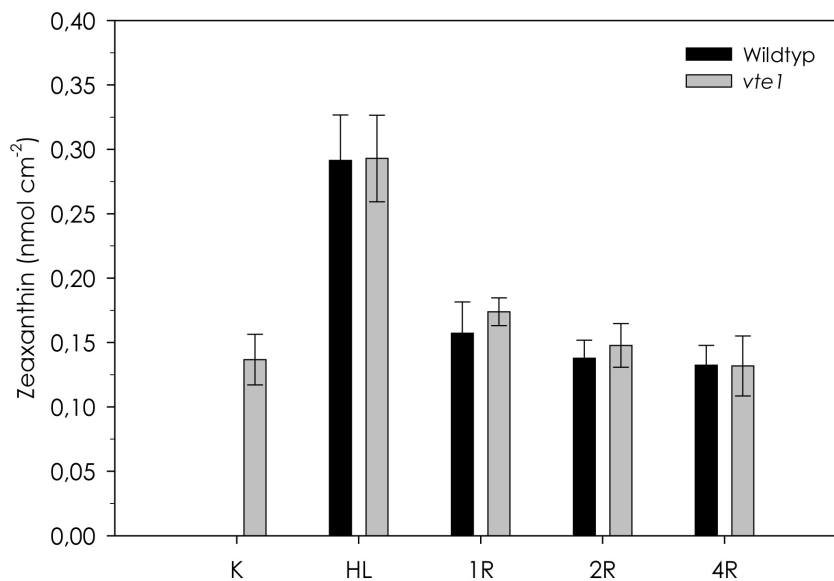
Zeaxanthin und Plastochinon-9 bestimmt. Es ist denkbar, dass in der *vte1*-Mutante Zeaxanthin oder Plastochinon-9 die fehlende antioxidative Wirkung der Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -Quencher kompensieren können (Havaux *et al.* 2005, Kruk & Trebst 2008). Nach zweistündiger Belichtung in Gegenwart von Eosin nahm im Wildtyp der Tocopherolgehalt ab. Zeitgleich sank sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante der Plastochinongehalt und die Menge an Zeaxanthin stieg an. Hierbei konnte in Eosinproben der *vte1*-Mutante eine deutlich höhere Menge an Zeaxanthin als im Wildtyp nachgewiesen werden. Es scheint, dass in Gegenwart von Eosin in der *vte1*-Mutante mehr Zeaxanthin zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  gebildet wird als im Wildtyp, weil Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -Quencher in diesen Pflanzen fehlen. Dies lässt vermuten, dass Zeaxanthin das Fehlen der Tocopherole in der *vte1*-Mutante ausgleichen kann.

### 3.3.2 Beseitigung von $^1\text{O}_2$ durch andere Antioxidantien

Die in Kapitel 3.3.1 dargelegten Befunde zeigen, dass bei einer erhöhten Bildung von  $^1\text{O}_2$  im Blattgewebe der D1-Proteinabbau in der *vte1*-Mutante verstärkt und der Bedarf an anderen verfügbaren Antioxidantien erhöht ist. Es bleibt jedoch unklar, ob in der *vte1*-Mutante die Abnahme der D1-Proteinmenge während der Erholungsphase nach einer Starklichtexposition (vgl. Abb. 3-5) durch die Anreicherung von  $^1\text{O}_2$  verursacht wird und ob die schädigenden Effekte bei einem Fehlen von Tocopherolen ebenso durch andere Antioxidantien ausgeglichen werden können. Um dies zu prüfen, wurden Starklichtversuche durchgeführt und die Mengen an Plastochinon-9 und Zeaxanthin in der Erholungsphase bestimmt. Falls diese Antioxidantien den Ausfall von Tocopherolen in der *vte1*-Mutante kompensieren können, wäre unter Starklichtbedingungen eine Änderung ihres Gehaltes zu erwarten.

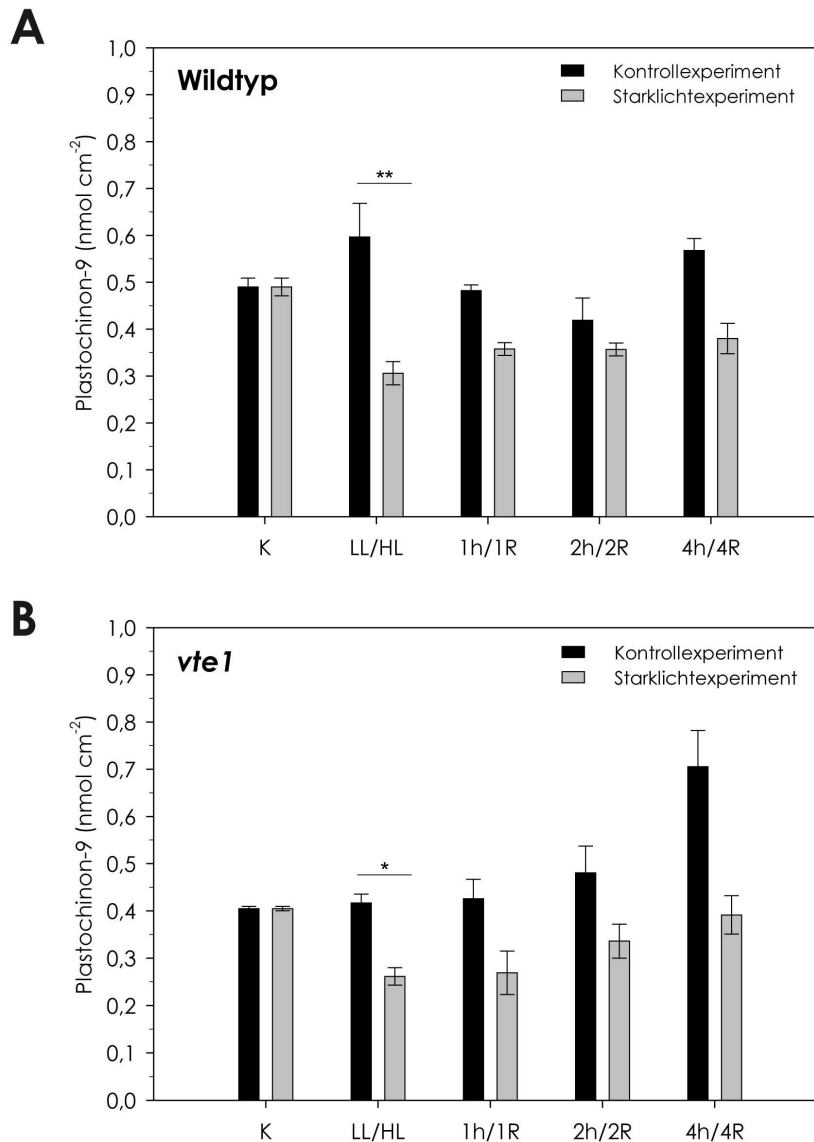
Im Vergleich zum Wildtyp war Zeaxanthin in Blättern der *vte1*-Mutante bereits vor Beginn der jeweiligen Lichtbehandlung (K), d. h. nach einer halben Stunde im Schwachlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), nachweisbar (Abb. 3-8). Das zeigt, dass es bei der *vte1*-Mutante bereits bei einem Wechsel aus der Dunkelphase in das Licht zur Bildung von Zeaxanthin kommt. Dieser Befund, der in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt wurde (s. A.4 und A.5) deutet darauf hin, dass Zeaxanthin auch während eines Dunkel-/Lichtüberganges das Fehlen von Tocopherolen kompensieren kann.

Da im Kontrollexperiment zu allen weiteren Versuchszeitpunkten sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante kein Zeaxanthin detektiert wurde (s. A.4 und A.5), ist im Folgenden nur der Zeaxanthingehalt für das Starklichtexperiment dargestellt (Abb. 3-8). Während der Starklichtexposition kam es in Wildtyp und *vte1*-Mutante gleichermaßen zur Anreicherung von Zeaxanthin, dessen Gehalt sich in der anschließenden Erholungsphase wieder verringerte. Abgesehen von den Unterschieden vor der Starklichtbehandlung (K) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge an gebildeten Zeaxanthin zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante beobachtet werden.



**Abb. 3-8:** Zeaxanthingehalt in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante bei Starklichtexposition und während der anschließenden Erholungsphase (R – Recovery). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von jeweils drei individuellen Blättern  $\pm$  SD. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht

Neben Zeaxanthin wurde die Menge an Plastochinon-9 bestimmt (Abb. 3-9). Plastochinon-9 kann sowohl in oxidiertem (PQ-9) als auch in reduzierter Form (Plastohydrochinon, PQH<sub>2</sub>) <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenchen (Gruszka *et al.* 2008, Kruk & Trebst 2008). Zunächst wurde festgestellt, dass Blätter der *vte1*-Mutante bereits vor Beginn der jeweiligen Lichtbehandlung (K) einen um ca. 20 % geringeren Plastochinongehalt als der Wildtyp aufweisen (Abb. 3-9). Während die Menge an Plastochinon-9 im Wildtyp nach zwei- (LL) und sechsstündiger Belichtung (4h) zunahm, war in Blättern der *vte1*-Mutante während der gesamten Schwachlichtexposition ein stetiger Anstieg des Plastochinongehaltes zu beobachten. Bei Starklichtexposition kam es sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante zu einer deutlichen Verringerung des Plastochinongehaltes. Im Verlauf der Erholungsphase stieg die Plastochinonmenge in beiden Pflanzentypen (WT, *vte1*) wieder an, erreichte aber nicht den Wert, der unter Schwachlichtbedingungen (Kontroll-experiment) gemessen wurde.



**Abb. 3-9:** Plastochinongehalt in Blättern des **(A)** Wildtyps und der **(B)** *vte1*-Mutante im Kontrollversuch sowie bei Starklicht und während der anschließenden Erholungsphase (R – Recovery). Die Daten entsprechen den Mittelwerten von jeweils drei individuellen Blättern  $\pm$  SD. \*\* signifikant,  $P=0,003$  und \* indifferent,  $P=0,014$  (t-Test, zweiseitig); K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Starklichtexposition sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante Plastochinon-9 verbraucht und Zeaxanthin gebildet wird. Dies deutet darauf hin, dass Plastochinon-9 wie auch Zeaxanthin das Fehlen der Tocopherole in der *vte1*-Mutante kompensieren und zur Beseitigung von  $^1O_2$  unter Starklichtbedingungen beitragen könnten.



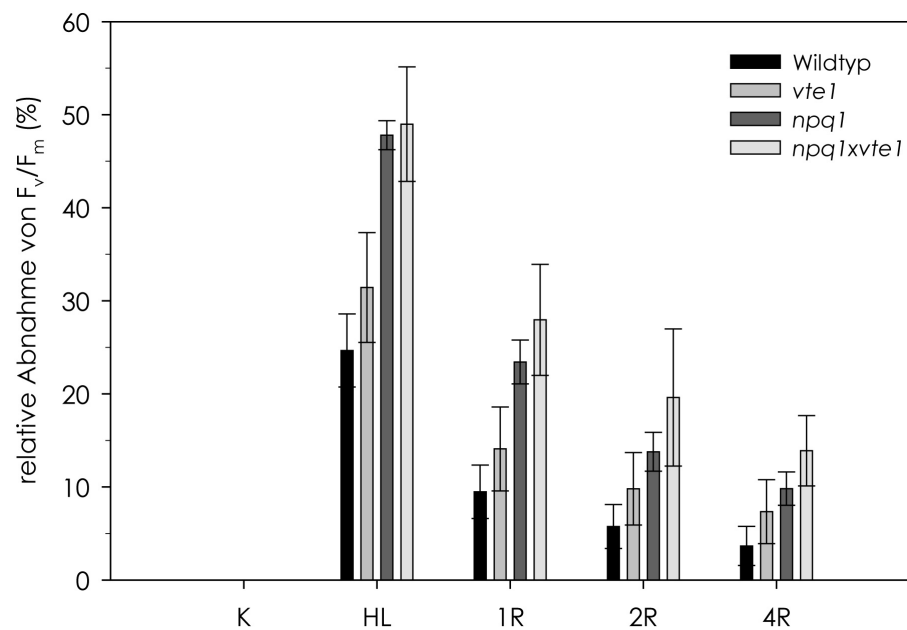
### 3.3.3 Starklichtbehandlung von Pflanzen ohne Zeaxanthin

Obwohl Zeaxanthin und Tocopherole bei der Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  im Photosystem II ähnliche Wirksamkeit haben (Triantaphylides & Havaux 2009), scheint Zeaxanthin in der *vte1*-Mutante während der Erholungsphase nach einer Exposition im Starklicht nicht verstärkt benötigt zu werden. Um umgekehrt zu prüfen, ob Tocopherole unter Starklichtbedingungen wichtig sind, wenn Zeaxanthin fehlt, wurden Starklicht- und Kontrollversuche an Blättern der *npq1*-Mutante und zusätzlich der *npq1xvte1*-Mutante durchgeführt. *npq1*- und *npq1xvte1*-Pflanzen können beide kein Zeaxanthin synthetisieren und die Doppelmutante zudem keine Tocopherole. Falls sich Zeaxanthin und Tocopherole in ihrer Funktion gegenseitig ersetzen können, wäre bei Starklichtexposition in der *npq1*- und *vte1*-Mutante eine ähnliche Abnahme der Effizienz des Photosystems II zu erwarten, die sich in der *npq1xvte1*-Mutante verstärkt. Haben Tocopherole hingegen einen spezifischen Einfluss auf das D1-Protein, wäre in Blättern der Doppelmutante, nicht aber in denen der *npq1*-Mutante, ein Abfall der D1-Proteinmenge zu erwarten, wie er während der Erholungsphase nach Starklichtexposition in *vte1*-Blättern beobachtet wurde.

#### 3.3.3.1 Effizienz des Photosystems II

Zunächst wurde die maximale Effizienz des Photosystems II zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und nach der Starklichtexposition bestimmt. Es wurde festgestellt, dass das Starklicht in beiden Mutanten zu einer mehr als 45 %igen Abnahme von  $F_v/F_m$  führt (Abb. 3-10). Damit war der Rückgang der PSII-Effizienz signifikant höher als beim Wildtyp und der *vte1*-Mutante. Auf eine im Vergleich zur *vte1*-Mutante stärkere Beeinträchtigung des Photosystems II in den beiden *npq*-Mutanten deutete auch hin, dass insbesondere Blätter der *npq1xvte1*-Mutante längere Zeit für die Wiederherstellung der Effizienz des Photosystems II benötigten. Selbst noch vier Stunden nach der Belichtung mit Starklicht waren in der Doppelmutante die  $F_v/F_m$ -Werte bis zu 14 % reduziert. Unter Schwachlichtbedingungen waren in beiden *npq*-Mutanten keine Änderungen der Effizienz des Photosystems II feststellbar (s. A.1).

Darüber hinaus wurde der Tocopherol- und Tocochinongehalt in Blättern der beiden *npq*-Mutanten bestimmt (s. A.6). Erwartungsgemäß konnten in Blättern der *npq1xvte1*-Mutante keine Tocopherole und keine Tocochinone nachgewiesen werden. In Blättern der *npq1*-Mutante war bereits vor Beginn der Starklichtbehandlung (K) der Tocopherolgehalt um ca. 35 % höher als der des Wildtyps zu diesem Zeitpunkt (vgl. Abb. 3-3). Während der Exposition im Starklicht sank der Tocopherolgehalt und stieg während der Erholungsphase nur geringfügig an. Wie im Wildtyp (vgl. Abb. 3-3) war auch in der *npq1*-Mutante bei Starklichtexposition eine Zunahme der  $\alpha$ -Tocochinonmenge zu beobachten, die auf die spezifische Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  durch  $\alpha$ -Tocopherol hindeutet.



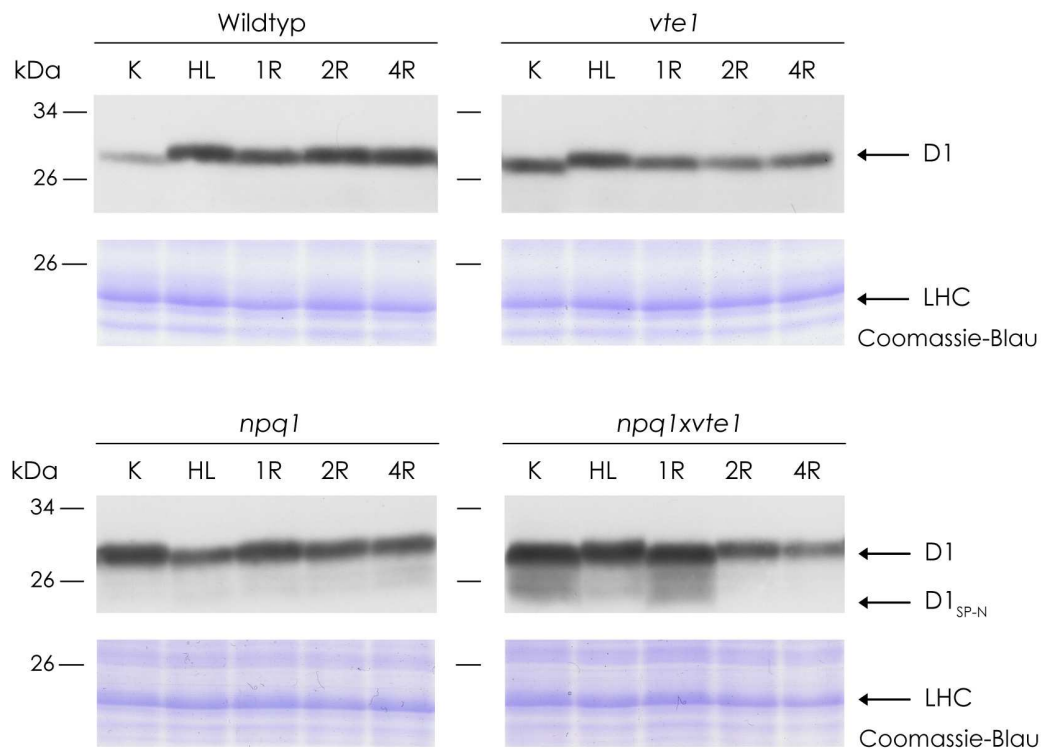
**Abb. 3-10:** Relative Abnahme von  $F_v/F_m$  in Wildtyp, *vte1*- und *npq1*-Mutante sowie der Doppelmutante *npq1xvte1* bei Starklichtexposition sowie während der nachfolgenden Erholungsphase. Die Werte für den Wildtyp und die *vte1*-Mutante sind aus Abb. 3-2 entnommen. Die Berechnung der Abnahme von  $F_v/F_m$  erfolgte relativ zu den  $F_v/F_m$ -Werten vor Beginn der Starklichtbehandlung (K). Diese Werte wurden auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils vier individuellen Blättern  $\pm$  SD. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht

In der Doppelmutante, die weder Zeaxanthin noch Tocopherole besitzt, konnte bei Starklicht keine stärkere Beeinträchtigung des Photosystems II als in der *npq1*-Mutante festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass Tocopherole für den Erhalt der Effizienz des Photosystems II unter Starklichtbedingungen keine große Rolle spielen. Allerdings war die Wiederherstellung der PSII-Effizienz in der Doppelmutante stärker verzögert als in der *npq1*-Mutante. Dies weist darauf hin, dass Tocopherole möglicherweise eine besondere Bedeutung für die Erholung des Photosystems II nach einer Starklichtexposition haben.

### 3.3.3.2 D1-Proteingehalt und Bildung von D1-Spaltprodukten bei Starklicht

Um zu klären, ob sich ein Fehlen von Zeaxanthin außer auf die Effizienz des Photosystems II auch auf das D1-Protein auswirkt, wurde der D1-Proteingehalt in Blättern der *npq1*- und *npq1xvte1*-Mutante sowie im Wildtyp und der *vte1*-Mutante zu verschiedenen Zeitpunkten eines Starklicht- und Kontrollexperimentes bestimmt. Die Ergebnisse des Kontrollexperimentes sind für den Wildtyp und alle Mutanten im Anhang A.7 dargestellt. Für die immunologische Analyse des D1-Proteins wurde der N-terminale D1-Antikörper verwendet, welcher zusätzlich ein ca. 22-24 kDa großes D1-Spaltprodukt detektiert, das nach Oxidation des D1-Proteins durch  $^1O_2$  entstehen kann (Okada *et al.* 1996). Falls die Abnahme der D1-Proteinmenge in der *vte1*-Mutante während der Erholungsphase nach Starklichtexposition durch  $^1O_2$  verursacht wird, wäre ein größeres Vorkommen dieses Spaltfragmentes zu erwarten.

Bei Verwendung des N-terminalen D1-Antikörpers war im Vergleich zu immunologischen D1-Proteinanalysen, bei denen der C-terminale D1-Antikörper eingesetzt wurde, eine geringere Signalintensität und –schärfe zu beobachten. Der N-terminale Antikörper ist gegen einen Bereich zwischen den Transmembranhelices A und B des D1-Proteins gerichtet (vgl. Abb. 1-3) und detektiert sowohl das phosphorylierte als auch nichtphosphoryliertes D1-Protein.



**Abb. 3-11:** Immunologischer Nachweis des D1-Proteins in Blättern des Wildtyps, der *vte1*- und *npq1*-Mutante sowie der *npq1xvte1*-Doppelmutante im Starklichtexperiment. Das erhaltene Signal entspricht der Summe aus phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem D1-Protein. Die Färbung der Proteingele mit Coomassie-Blau diente zur Kontrolle der Beladung. Die Ausschnitte aus Coomassie-Proteingelen für Wildtyp und *vte1*-Mutante entsprechen denen aus Abb. 3-5. LHC – Proteine der Lichtsammelkomplexe; D1<sub>SP-N</sub> – N-terminales Spaltprodukt des D1-Proteins, K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht

Im Vergleich zum Wildtyp wiesen sowohl die *vte1*-Mutante als auch noch stärker die *npq1*-Mutante höhere D1-Proteinmengen vor Beginn der Starklichtbehandlung (K) auf. Die höchste D1-Proteinmenge zu diesem Zeitpunkt war in der Doppelmutante nachweisbar (vgl. A.8). Während sich in der Erholungsphase nach der Starklichtbehandlung die D1-Proteinmenge im Wildtyp kaum veränderte, nahm bei der *vte1*-Mutante der D1-Proteingehalt ab (vgl. 3.2.4). In Blättern der *npq1*-Mutante war der D1-Proteingehalt am Ende der Erholungsphase (2R, 4R) nur geringfügig erniedrigt, wohingegen bei der Doppelmutante die D1-Proteinmenge deutlich abnahm. Dies zeigt, dass nur das Fehlen der Tocopherole mit einer Abnahme der D1-Proteinmenge in der Erholungsphase nach Starklichtexposition einhergeht (vgl. A.9). Das N-terminale Spaltprodukt des D1-Proteins konnte in größeren Mengen nur in der Doppelmutante sowohl vor als auch nach der Starklichtbehandlung nachgewiesen werden. Da es jedoch am

Ende der Erholungsphase (2R, 4R) weder in der *vte1*-Mutante noch in der Doppelmutante nachweisbar war, ist zu vermuten, dass in diesen Pflanzen die Abnahme des D1-Proteingehaltes zu diesen Zeitpunkten nicht durch einen Überschuss an  $^1\text{O}_2$  verursacht wird.

### **3.4 Untersuchungen zum Einfluss von Tocopherolen auf die Expression des *psbA*-Gens**

Die in Kapitel 3.3.3 dargelegten Untersuchungen zeigen, dass Tocopherole einen Einfluss auf die Menge an D1-Protein während der Erholungsphase nach einer Starklichtexposition haben, der nicht durch Zeaxanthin übernommen werden kann. Dies lässt vermuten, dass nicht einzig die antioxidative Wirksamkeit der Tocopherole für den Erhalt der Menge an D1-Protein in der Erholungsphase wichtig ist. Um die Wirkung der Tocopherole auf das D1-Protein besser zu verstehen, wurde zunächst nach einer möglichen Verbindung zwischen Tocopherolen und der Synthese des D1-Proteins im Chloroplasten gesucht. Das D1-Protein im Reaktionszentrum des Photosystems II wird durch das plastidäre Gen *psbA* kodiert. Die Transkription des *psbA*-Gens wird durch Sigmafaktoren der plastidären RNA-Polymerase gesteuert. Es wäre denkbar, dass Tocopherole entweder auf direktem Wege die Expression des *psbA*-Gens beeinflussen oder die Expression des *psbA*-Gens indirekt über die Regulation von Sigmafaktoren modulieren können. Falls in der *vte1*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte *psbA*-Transkriptmenge vorliegen würde, könnte dies die Neusynthese des D1-Proteins in der Erholungsphase nach einer Starklichtexposition begrenzen.

#### **3.4.1 Sigmafaktoren in *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Arabidopsis thaliana***

Ein Vergleich der Genome verschiedener Stämme von Cyanobakterien hatte ergeben, dass Tocopherole produzierende Stämme neben den Genen, die für Proteine der Tocopherolbiosynthese kodieren, zusätzliche Gene besitzen, die in den tocopheroldefizienten Stämmen nicht nachweisbar sind (s. Kapitel 1.3, Tab. 1-1). Eines dieser Gene (*sll1689*) kodiert für den Sigmafaktor SIGE. Sigmafaktoren sind Proteinuntereinheiten der bakteriellen RNA-Polymerase und für die Promotorerkennung notwendig. Höhere Pflanzen besitzen eine plastidär kodierte RNA-Polymerase (PEP) mit bakteriellen Ursprung. Für die PEP in *Arabidopsis thaliana* sind sechs verschiedene Sigmafaktoren bekannt (Schweer *et al.* 2010). Da nur in Cyanobakterien mit Tocopherolbiosynthese das Gen für SIGE vorhanden ist, wäre eine Beziehung zwischen den Sigmafaktoren und der Fähigkeit zur Bildung von Tocopherolen denkbar. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des SIGE-Proteins aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit bekannten Aminosäuresequenzen aus *A. thaliana* ergab, dass das kernkodierte SIG2-Protein der plastidären RNA-Polymerase (PEP) die höchste Homologie zum SIGE-Protein aufweist (s. A.10).

Bisherige Untersuchungen (Tab. 3-1) zur Funktion von SIG2 in *Arabidopsis thaliana* zeigten, dass SIG2 die Transkription verschiedener plastidär kodierter *tRNA*-Gene sowie des Gens *psbA* steuert, welches für das D1-Protein im Photosystem II kodiert. Daher wurde für die eigenen Untersuchungen von der Hypothese ausgegangen, dass ein Zusammenhang zwischen Tocopherolen und der Expression des *sig2*-Gens sowie dessen Zielgen *psbA* besteht.

**Tab. 3-1:** Zusammenfassende Darstellung zu den möglichen Funktionen der Sigmafaktoren SIGE von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und SIG2 von *Arabidopsis thaliana*. Angegeben sind die Zielgene, deren Transkription durch die entsprechenden Sigmafaktoren gesteuert werden kann.

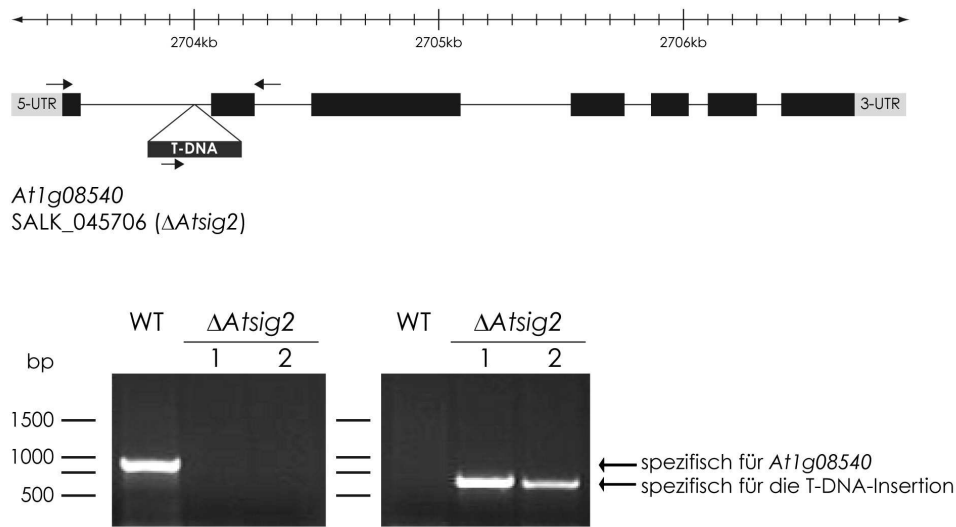
Gen	Protein	Mögliche Funktionen	Zielgene	Referenzen
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803				
<i>sll1689</i>	SIGE	Beteiligt an der Regulation der Transkription bei: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Stickstoffmangel</li> <li>– Änderungen des Zuckerkatabolismus</li> <li>– Akklimatisierung an Salzstress</li> </ul> Ein Ausfall von SIGE führt zu <ul style="list-style-type: none"> <li>– einer reduzierten Transkription von mit der Photosynthese assoziierten Genen in Reaktion auf Dunkel-/Lichtübergänge</li> </ul>	<i>glnN</i> <i>gap1</i>  <i>psbA2</i> <i>psaAB</i> <i>petBD</i>	Muro-Pastor <i>et al.</i> (2001) Osanai <i>et al.</i> (2005) Pollari <i>et al.</i> (2008) Yoshimura <i>et al.</i> (2007)
<i>Arabidopsis thaliana</i>				
<i>At1g08540</i>	SIG2	Die Transkription des <i>sig2</i> -Gens ist lichtabhängig. Ein Ausfall von SIG2 führt zu <ul style="list-style-type: none"> <li>– einer Abnahme der <i>trnE</i>-mRNA-Menge</li> <li>– einem verringerten Chlorophyllgehalt und blassgrünen Blättern</li> <li>– reduziertem Wachstum</li> <li>– kleineren Chloroplasten mit unterentwickelten Thylakoiden</li> </ul>	<i>psbA</i> <i>psbD</i>  <i>trnE</i> <i>trnV</i> <i>trnD</i>	Privat <i>et al.</i> (2003) Hanaoka <i>et al.</i> (2003)  Kanamaru <i>et al.</i> (2001) Nagashima <i>et al.</i> (2004a)  Shirano <i>et al.</i> (2000)

### 3.4.2 Analyse einer $\Delta$ Atsig2-Mutante von *A. thaliana*

Zunächst wurde geprüft, ob SIG2 die Expression des *psbA*-Gens beeinträchtigt und einen Einfluss auf die Tocopherolbiosynthese ausübt. Für diese Untersuchung wurden homozygote Pflanzen einer T-DNA-Insertionslinie von *A. thaliana* selektiert, die eine Inaktivierung des *sig2*-Gens aufweisen. Diese Pflanzen wurden für den Zeitraum von sechs Wochen bei 23 °C und einer Lichtintensität von 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in einem 12 h Licht-/12 h Dunkelrhythmus angezogen. Nach Beendigung der Anzucht wurde die Expression ausgewählter Gene, die Effizienz des Photosystems II und der Tocopherol- sowie Pigmentgehalt der Pflanzen analysiert.

#### 3.4.2.1 Nachweis der T-DNA-Insertion

Für  $\Delta$ Atsig2-Pflanzen wurde die Linie SALK\_145706 ausgewählt, die eine Insertion des T-DNA Vektors im ersten Intron des Gens *At1g08540* aufweist (Abb. 3-12). Die zugehörigen Samen wurden über das 'European Arabidopsis Stock Centre' erhalten und zunächst für 3-4 Wochen vereinzelt auf Topfkultursubstrat angezogen. Danach wurde aus den Blättern genomische DNA isoliert und mittels PCR das Vorhandensein der T-DNA-Insertion überprüft (Abb. 3-12).



**Abb. 3-12:** Lage und experimenteller Nachweis der T-DNA-Insertion in der Nukleotidsequenz des Gens *At1g08540*, welches für den Sigmafaktor SIG2 in *Arabidopsis thaliana* kodiert. Es ist das Ergebnis für zwei individuelle  $\Delta$ Atsig2-Pflanzen (1, 2) im Vergleich zum Wildtyp (WT) dargestellt. Homozygote  $\Delta$ Atsig2-Pflanzen wiesen auf beiden Allelen des Zielgens *At1g08540* die T-DNA Insertion (DNA-Fragment, unterer Pfeil) auf, sodass in diesem Blattgewebe das sig2-Gen nicht amplifiziert wurde (DNA-Fragment, oberer Pfeil). In Blättern des Wildtyps war keine T-DNA-Insertion vorhanden und das sig2-Gen konnte amplifiziert werden.

Für alle weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich homozygote  $\Delta$ Atsig2-Pflanzen verwendet, welche die T-DNA-Insertion auf beiden Allelen des sig2-Gens aufweisen. Diese wurden zusammen mit Wildtyppflanzen für die Dauer von sechs Wochen unter den oben beschriebenen Bedingungen (s. 3.4.2) in einer Klimakammer angezogen.

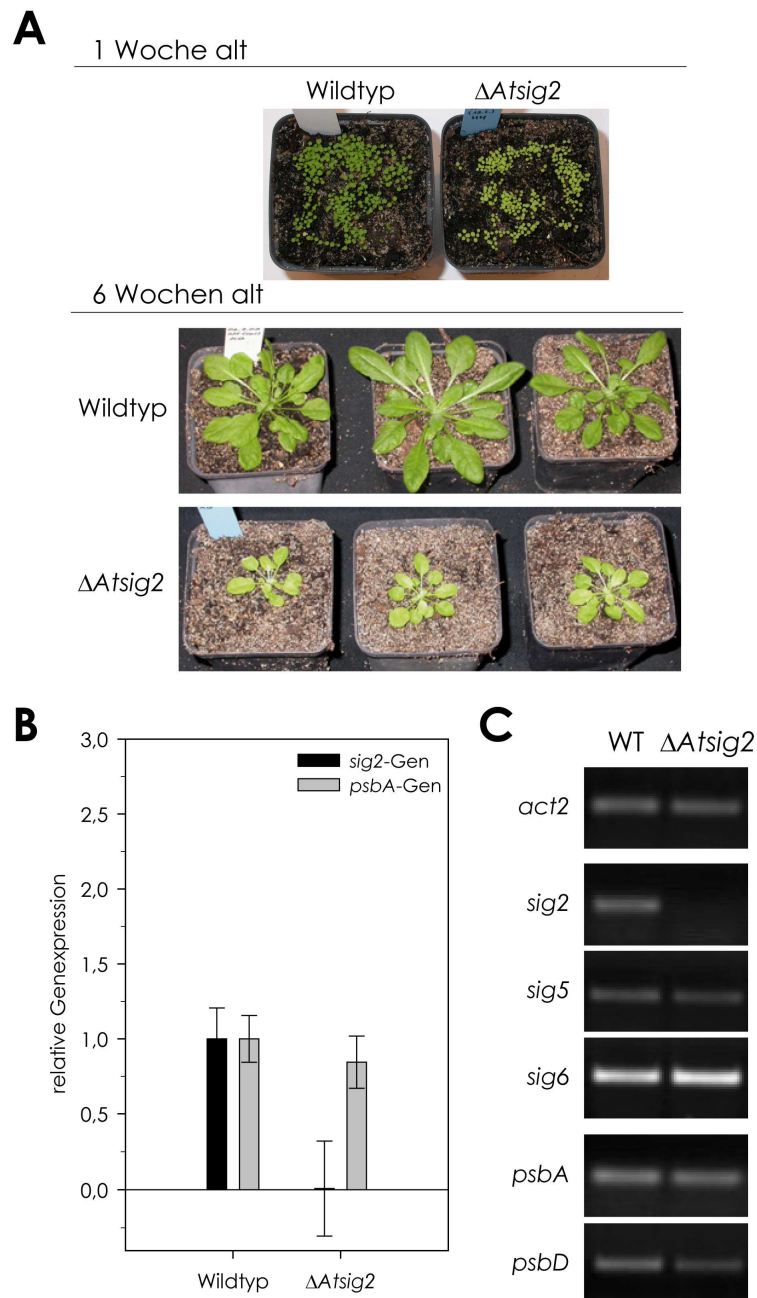
### 3.4.2.2 Phänotyp und Expression des sig2- und psbA-Gens

Bereits während der Anzucht der  $\Delta$ Atsig2-Mutante konnte beobachtet werden, dass die Pflanzen ein im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Wachstum zeigen (Abb. 3-13A). Sowohl Blätter von Keimlingen als auch von sechs Wochen alten Pflanzen der  $\Delta$ Atsig2-Mutante waren kleiner und deutlich hellgrüner als Wildtypblätter. Die helle Grünfärbung der  $\Delta$ Atsig2-Blätter ist vermutlich durch einen im Vergleich zum Wildtyp geringeren Chlorophyllgehalt bedingt.

Des Weiteren wurde der Transkriptgehalt des sig2-Gens sowie des psbA-Gens in Blättern des Wildtyps und der  $\Delta$ Atsig2-Mutante ermittelt (Abb. 3-13B/C). Erwartungsgemäß konnte in homozygoten  $\Delta$ Atsig2-Pflanzen infolge der T-DNA-Insertion keine funktionsfähige mRNA des sig2-Gens nachgewiesen werden. In der  $\Delta$ Atsig2-Mutante ging der Ausfall des sig2-Gens mit einer geringfügigen Abnahme des psbA-mRNA-Gehaltes einher.

Da beschrieben ist, dass die Expression des psbA-Gens außer durch SIG2 auch durch den Sigmafaktor SIG6 reguliert werden kann (Ishizaki *et al.* 2005, Schweer *et al.* 2010), wurde zusätzlich der Transkriptgehalt des sig6-Gens in der  $\Delta$ Atsig2-Mutante ermittelt. Falls der

Sigmafaktor SIG6 das Fehlen von SIG2 in der  $\Delta$ Atsig2-Mutante kompensieren kann, wäre ein höherer Transkriptgehalt des für diesen Sigmafaktor kodierenden Gens *sig6* als im Wildtyp zu erwarten. Es konnten jedoch kaum Unterschiede in der Menge an *sig6*-Transkript zwischen Wildtyp und  $\Delta$ Atsig2-Mutante festgestellt werden (Abb. 3-13C).



**Abb. 3-13: (A)** Fotografische Dokumentation des Phänotyps von Wildtyp und  $\Delta$ Atsig2-Mutante im Alter von einer bzw. sechs Wochen. **(B)** Quantitative *real-time* PCR zur Bestimmung der relativen Expression des *sig2*- und *psbA*-Gens in Wildtyp und  $\Delta$ Atsig2-Mutante. Die jeweiligen  $C_T$ -Werte wurden auf den Transkriptgehalt des *act2*-Gens normiert und anschließend in Bezug zum Wildtyp gesetzt (Wildtyp = 1, d. h. keine Änderung der Genexpression). **(C)** Transkriptgehalt des *sig2*-Gens, von Genen für andere Sigmafaktoren sowie der *psbA*- und *psbD*-Gene. Als Kontrolle für die in der semiquantitativen PCR eingesetzte cDNA-Menge dient der Transkriptgehalt des *act2*-Gens. WT – Wildtyp

Als Vergleich zum *psbA*-Gen wurde außerdem die Expression des *psbD*-Gens untersucht, welches für das D2-Protein im Reaktionszentrum des Photosystems II kodiert. Da das *psbD*-Gen hauptsächlich als ein Zielgen des Sigmafaktors SIG5 beschrieben ist (Nagashima *et al.* 2004b), wurde zusätzlich die Expression des *sig5*-Gens untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass Blätter der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte *psbD*-Transkriptmenge aufweisen (Abb. 3-13C). Da keine Unterschiede in der *sig5*-Transkriptmenge zwischen Wildtyp und  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante auftraten, deutet dies darauf hin, dass der Ausfall des *sig2*-Gens nicht nur die Expression des *psbA*-Gens sondern auch die des *psbD*-Gens beeinflusst.

### 3.4.2.3 Effizienz des Photosystems II, Chlorophyll- und Tocopherolgehalt

Um zu prüfen, ob der Ausfall des *sig2*-Gens zu Veränderungen im Tocopherolgehalt führt, wurden Wildtyp- und  $\Delta$ *Atsig2*-Pflanzen unter den zu Beginn des Kapitels 3.4.2 beschriebenen Anzuchtbedingungen untersucht. Außer der Menge an Tocopherolen wurde die Effizienz des Photosystems II sowie der Plastochinon- und Chlorophyllgehalt in Blättern des Wildtyps und der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante bestimmt (Tab. 3-2).

In Blättern der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante konnte im Vergleich zum Wildtyp ein um 50 % reduzierter Chlorophyllgehalt sowie eine verringerte Effizienz des Photosystems II festgestellt werden. Der verminderte Chlorophyllgehalt in der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante ist als Ursache für den in Abb. 3-13A dokumentierten hellgrünen Blattphänotyp dieser Pflanzen anzunehmen. Der Tocopherol- und Plastochinongehalt der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante unterschied sich nicht von dem des Wildtyps.

**Tab. 3-2:** Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ), Chlorophyll- und relativer Carotinoidgehalt sowie Mengen an Tocopherolen und Plastochinon-9 in Blättern des Wildtyps und der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante nach sechs-wöchiger Anzucht. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von jeweils drei individuellen Blättern  $\pm$  SD. Werte der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante sind grau unterlegt.

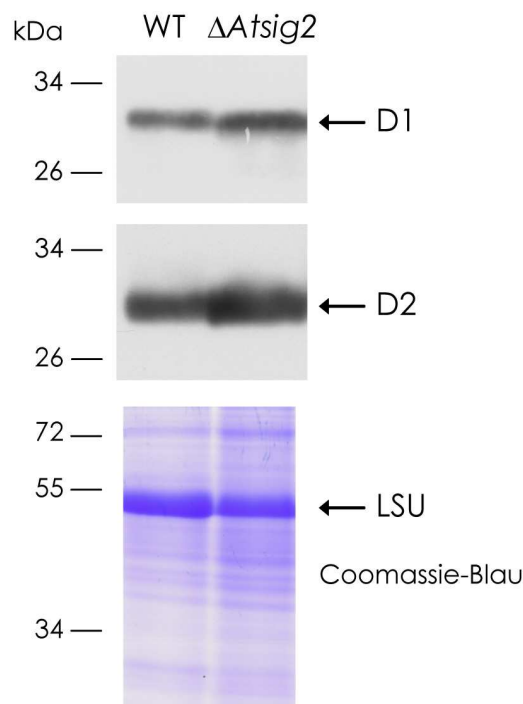
	Wildtyp	$\Delta$ <i>Atsig2</i>
$F_v/F_m$	0,80 $\pm$ 0,001	0,61 $\pm$ 0,067
Tocopherole (nmol cm <sup>-2</sup> )	0,32 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,05
Plastochinon-9 (nmol cm <sup>-2</sup> )	0,49 $\pm$ 0,06	0,52 $\pm$ 0,08
Chlorophyll a+b (nmol cm <sup>-2</sup> )	19,8 $\pm$ 2,2	9,7 $\pm$ 1,6
Chlorophyll a/b	2,8 $\pm$ 0,03	3,1 $\pm$ 0,05

Um abschließend zu überprüfen, ob der Ausfall des *sig2*-Gens die Synthese der Tocopherole auf Ebene der Genexpression beeinträchtigt, wurde die Expression ausgewählter Gene der Tocopherolbiosynthese im Wildtyp und in der  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante analysiert (s. A.11). Hierbei waren jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptmengen der untersuchten Gene zwischen Wildtyp und  $\Delta$ *Atsig2*-Mutante feststellbar. Es ist daher anzunehmen, dass der Sigmafaktor SIG2 keinen Einfluss auf die Synthese der Tocopherole hat.



### 3.4.2.4 D1-/D2-Proteingehalt

Um zu untersuchen, wie sich der Ausfall des *sig2*-Gens auf das D1-Protein im Reaktionszentrum des Photosystems II auswirkt, wurde die Menge an D1-Protein sowie zusätzlich an D2-Protein in der  $\Delta A\text{sig}2$ -Mutante und im Wildtyp bestimmt (Abb. 3-14). Nach einer Coomassiefärbung der Proteingele wurde festgestellt, dass Blätter der  $\Delta A\text{sig}2$ -Mutante eine andere Verteilung der Proteine als der Wildtyp aufweisen. So wurde zum Beispiel ein geringerer Anteil der großen Untereinheit der Rubisco (LSU) am Gesamtprotein in den  $\Delta A\text{sig}2$ -Blättern beobachtet.

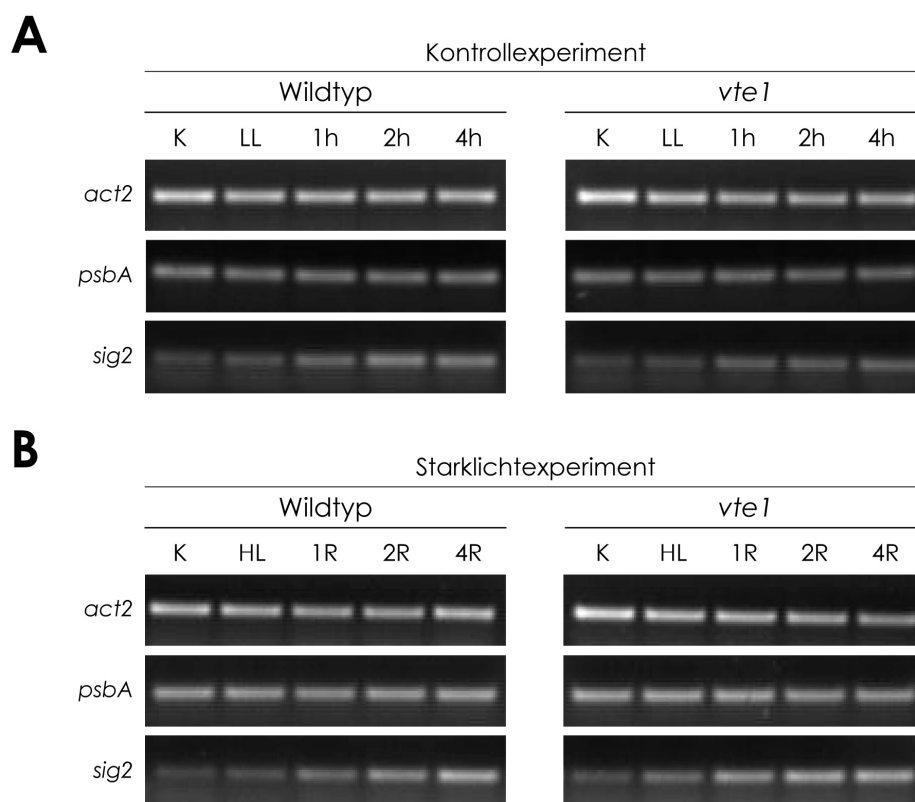


**Abb. 3-14:** Immunologischer Nachweis des D1- und des D2-Proteins in Blättern des Wildtyps (WT) und der  $\Delta A\text{sig}2$ -Mutante. Es wurden jeweils 10  $\mu\text{g}$  Protein in einem 14 %igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis des D1-Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte durch ECL-Detektion. Es wurde der C-terminale D1-Antikörper verwendet. Die mit Coomassie-Blau angefärbten Proteingele dienen zur Kontrolle der Beladung. LSU – große Untereinheit des Enzyms Rubisco

Im Vergleich zum Wildtyp war in der  $\Delta A\text{sig}2$ -Mutante sowohl ein höherer D1-Proteingehalt als auch mehr D2-Protein zu beobachten. Dies ist aber möglicherweise auf eine ungleichmäßige Beladung der Proteingele zurückzuführen. Es scheint, dass in der  $\Delta A\text{sig}2$ -Mutante der D1- und D2-Proteingehalt nicht über die Transkriptmenge des *psbA*- bzw. *psbD*-Gens reguliert werden.

### 3.4.3 Expression des *sig2*- und *psbA*-Gens in Wildtyp und *vte1*-Mutante bei Starklicht

Um nun noch zu überprüfen, ob die Abnahme der D1-Proteinmenge in der *vte1*-Mutante in der Erholungsphase nach einer Starklichtexposition (vgl. Abb. 3-5) über die Transkriptmenge des *psbA*-Gens oder darüber hinaus des *sig2*-Gens beeinflusst wird, wurden semiquantitative PCR-Ansätze durchgeführt und der Transkriptgehalt des *psbA*-Gens und des *sig2*-Gens in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante zu den verschiedenen Zeitpunkten eines Starklicht- und Kontrollexperimentes bestimmt (Abb. 3-15). Eine erhöhte Expression des *psbA*-Gens wäre unter Starklichtbedingungen zu erwarten, da dann eine verstärkte Neusynthese von verbrauchtem D1-Protein erforderlich ist.



**Abb. 3-15:** Transkriptgehalt des *psbA*-Gens und des *sig2*-Gens in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante im **(A)** Kontroll- und **(B)** Starklichtexperiment. Als Kontrolle für die eingesetzte cDNA-Menge dient der Transkriptgehalt des *act2*-Gens. Semiquantitative PCR-Ansätze zur Amplifikation des *psbA*-Gens wurden mit 16 Zyklen durchgeführt. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment

Unabhängig von der Lichtbehandlung und dem Versuchszeitpunkt konnten keine auffälligen Unterschiede in der Transkriptmenge des *psbA*-Gens zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt werden. Der *psbA*-Transkriptgehalt scheint jedoch unter Starklichtbedingungen geringfügig höher zu sein als bei Schwachlicht.

Unter Schwachlichtbedingungen nahm der Transkriptgehalt des *sig2*-Gens im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante mit fortwährender Belichtungszeit stetig zu. Ähnliches konnte auch unter

Starklichtbedingungen beobachtet werden, wobei jedoch während der Erholungsphase nach Starklichtexposition eine stärkere Zunahme der *sig2*-Transkriptmenge nachweisbar war. Hierbei konnten keine Unterschiede in der Menge an *sig2*-Transkript zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante beobachtet werden. Nur zu Beginn der Erholungsphase (1R) war in der *vte1*-Mutante eine geringfügig höhere *sig2*-Transkriptmenge als im Wildtyp feststellbar. Insgesamt jedoch schien sowohl der Transkriptgehalt des *sig2*-Gens als auch der des *psbA*-Gens nicht dadurch beeinflusst zu werden, ob Tocopherole in den Pflanzenzellen vorhanden waren oder nicht.

### 3.5 Einfluss von Tocopherolen auf den D1-Protein-turnover bei Starklicht

Weil die Untersuchungen aus Kapitel 3.4 darauf hindeuten, dass Tocopherole die Expression des *psbA*- bzw. *sig2*-Gens auf Transkriptebene nicht beeinflussen, wurde im Weiteren geprüft, ob Tocopherole eine Wirksamkeit auf die Neusynthese des D1-Proteins besitzen. Außerdem wurde analysiert, ob andere Vorgänge des D1-Protein-turnovers wie der D1-Proteinabbau durch Tocopherole beeinflusst werden könnten.

#### 3.5.1 Inhibierung der D1-Proteinsynthese durch Lincomycin

Um den Einfluss von Tocopherolen auf die Neusynthese des D1-Proteins zu untersuchen, wurden Blätter des Wildtyps und der *vte1*-Mutante während einer Starklichtbehandlung mit nachfolgender Erholungsphase Lincomycin ausgesetzt (s. 2.3.5). Lincomycin bindet an die 70S-Ribosomen in den Chloroplasten und hemmt dadurch die Translation des D1-Proteins (Vasquez *et al.* 1974). Um die Neusynthese des D1-Proteins nur bei Starklichtexposition und während der Erholungsphase zu hemmen, wurde Lincomycin erst vor Beginn der Starklichtexposition zugegeben. In einem zusätzlichen Experiment ohne Starklicht wurden die Auswirkungen von Lincomycin unter Schwachlichtbedingungen untersucht. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuche wurde die Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) und die Menge an D1-Protein bestimmt. Falls Tocopherole für die Neusynthese des D1-Proteins wichtig sind, wäre in Gegenwart von Lincomycin auch im Wildtyp in der Erholungsphase eine Änderung der D1-Proteinmenge zu erwarten, die derjenigen in *vte1*-Blättern ähnlich ist.

Bereits bei Schwachlichtexposition war in Gegenwart von Lincomycin eine Abnahme der  $F_v/F_m$ -Werte in Wildtyp und *vte1*-Mutante nachweisbar, die in vorangegangenen Versuchen ohne Lincomycin nicht beobachtet wurde (Tab. 3-3). Nach insgesamt sechs Stunden bei  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (4h) war  $F_v/F_m$  im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante gleichermaßen um 20 % reduziert. Nach einer Starklichtexposition (HL) trat in den Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante eine Verringerung der PSII-Effizienz um mehr als 40 % auf. Während der Erholungsphase nach Starklichtexposition erholte sich die PSII-Effizienz nicht wieder, sondern betrug

noch nach vierstündiger Erholungsphase (4R) nur 50 % des Ausgangswertes (Tab. 3-3). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt werden. Die fehlende Wiederherstellung der PSII-Effizienz lässt vermuten, dass Lincomycin in die Chloroplasten aufgenommen wurde und dort die Translation des D1-Proteins nachhaltig blockiert hat.

**Tab. 3-3:** Relative Abnahme von  $F_v/F_m$  in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante im Schwachlicht sowie bei Starklichtexposition und nachfolgender Erholungsphase (R – Recovery). Die Versuche wurden ohne (-) Zusatz von Lincomycin (s. 3.2.1 und A.1) und mit (+) Zugabe von Lincomycin durchgeführt. Der Zeitpunkt, von dem an die Blätter einer 1,5 mM Lincomycin-Lösung ausgesetzt waren, ist durch einen Pfeil markiert. Die Berechnung der Abnahme von  $F_v/F_m$  erfolgte relativ zu den  $F_v/F_m$ -Werten vor Beginn der Behandlung (K), welche auf 100 % gesetzt wurden. Es sind die Mittelwerte von jeweils fünf individuellen Blättern  $\pm$  SD dargestellt. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Schwachlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Schwachlichtversuch

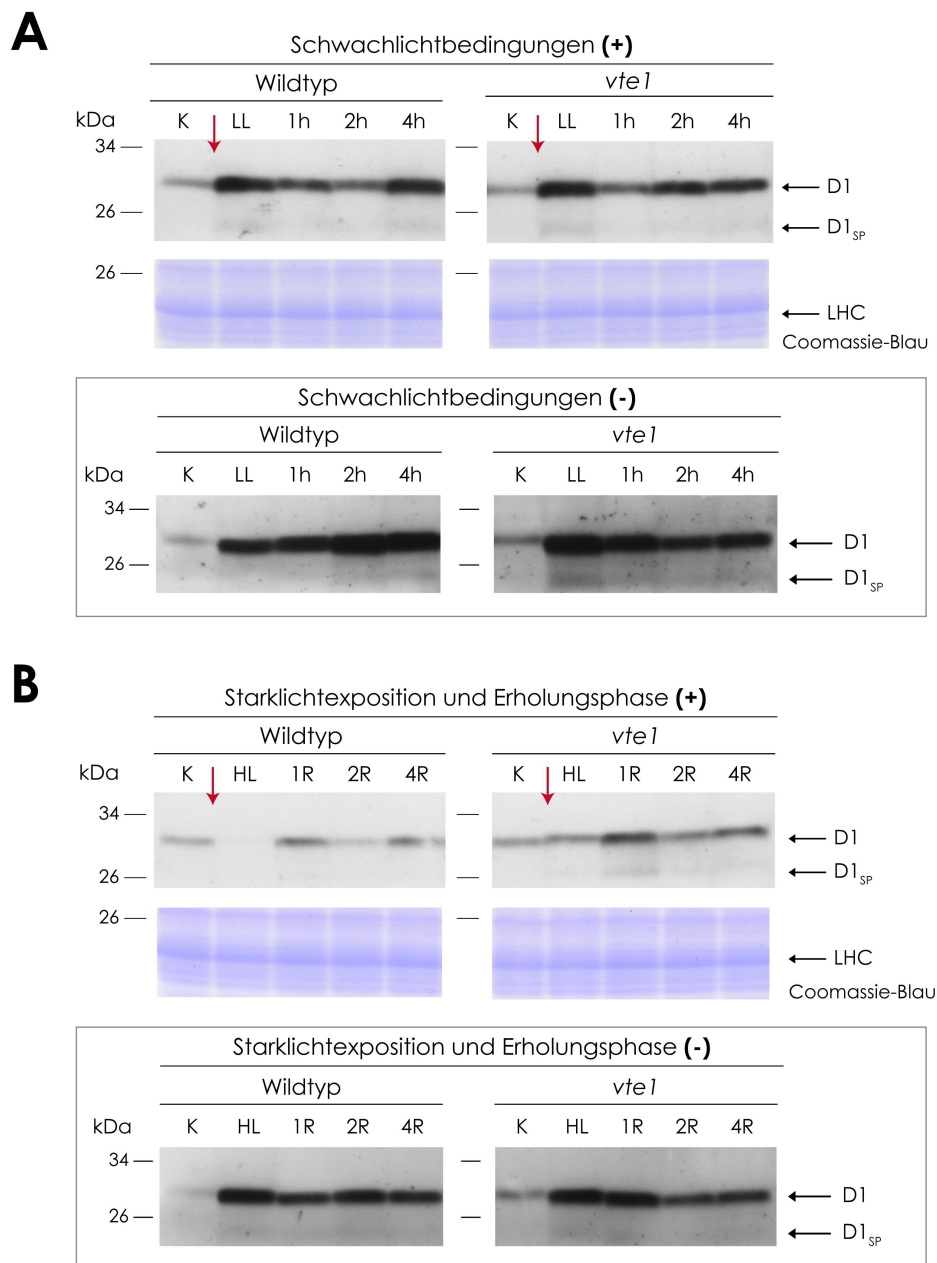
relative Abnahme von $F_v/F_m$ (%)	Schwachlichtbedingungen			
	Wildtyp (-)	Wildtyp (+)	<i>vte1</i> (-)	<i>vte1</i> (+)
K	0,0 $\pm$ 0,0	↓ 0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	↓ 0,0 $\pm$ 0,0
LL	0,4 $\pm$ 1,6	3,6 $\pm$ 1,5	0,4 $\pm$ 1,6	3,0 $\pm$ 1,7
1h	0,2 $\pm$ 1,8	6,9 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 1,8	6,7 $\pm$ 1,7
2h	0,9 $\pm$ 2,5	11,1 $\pm$ 1,3	0,2 $\pm$ 2,2	10,2 $\pm$ 1,3
4h	0,7 $\pm$ 2,3	19,3 $\pm$ 2,3	0,6 $\pm$ 2,5	18,5 $\pm$ 0,7
<hr/>				
relative Abnahme von $F_v/F_m$ (%)	Starklichtexposition und Erholungsphase			
	Wildtyp (-)	Wildtyp (+)	<i>vte1</i> (-)	<i>vte1</i> (+)
K	0,0 $\pm$ 0,0	↓ 0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	↓ 0,0 $\pm$ 0,0
HL	24,7 $\pm$ 3,9	42,1 $\pm$ 4,0	31,4 $\pm$ 5,9	46,6 $\pm$ 1,3
1R	9,5 $\pm$ 2,9	42,3 $\pm$ 4,1	14,1 $\pm$ 4,5	45,9 $\pm$ 1,4
2R	5,7 $\pm$ 2,4	44,9 $\pm$ 2,4	9,8 $\pm$ 3,9	47,9 $\pm$ 1,7
4R	3,7 $\pm$ 2,1	52,0 $\pm$ 3,1	7,3 $\pm$ 3,4	52,5 $\pm$ 2,3

(-) Versuche ohne Zugabe von Lincomycin

(+) Versuche mit Zugabe von Lincomycin

↓ Zeitpunkt der Zugabe von Lincomycin

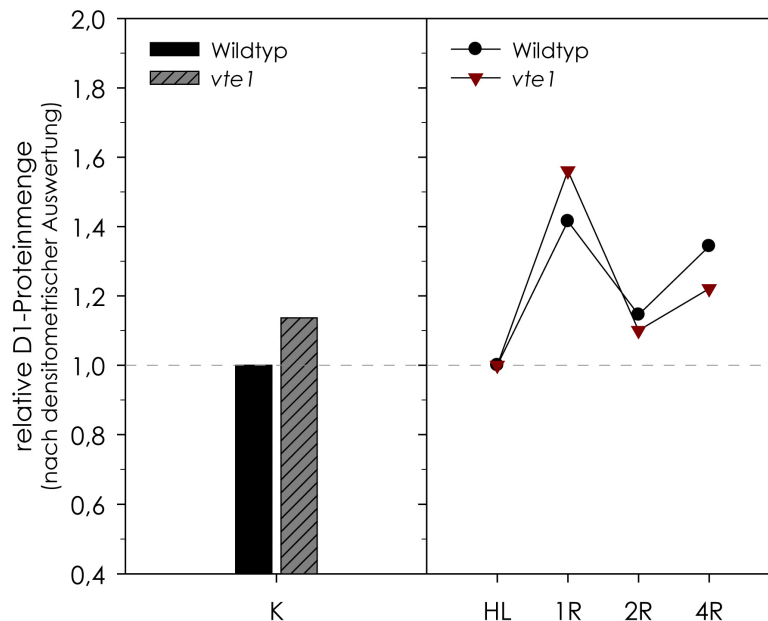
In Blättern der *vte1*-Mutante war bereits vor Beginn der jeweiligen Lichtbehandlung (K) eine höhere D1-Proteinmenge als in Blättern des Wildtyps vorhanden (Abb. 3-17, vgl. A.8). Unter Schwachlichtbedingungen erfolgte im Wildtyp nach insgesamt drei bis vier Stunden Belichtung (1h, 2h) ein stetiger Abfall der D1-Proteinmenge (Abb. 3-16A). In der *vte1*-Mutante war eine Abnahme der Menge an D1-Protein nur nach insgesamt dreistündiger Inkubation im Schwachlicht (1h) zu beobachten. Erst zum Ende der Belichtungszeit (4h) nahm im Wildtyp die D1-Proteinmenge wieder zu. Es wurde festgestellt, dass die Veränderungen der D1-Proteinmenge im Wildtyp denen der *vte1*-Mutante in Schwachlichtversuchen ohne Lincomycin ähnlich sind (Abb. 3-16A).



**Abb. 3-16:** Immunologischer Nachweis des D1-Proteins in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante im **(A)** Schwachlicht sowie bei **(B)** Starklichtexposition und anschließender Erholungsphase (R – Recovery) in Versuchen mit **(+)** und ohne **(-)** Zugabe von Lincomycin. Die Ergebnisse der Versuche ohne Zusatz von Lincomycin entsprechen denen aus Kapitel 3.2.4. Der Zeitpunkt, von dem an die Blätter einer 1,5 mM Lincomycin-Lösung ausgesetzt waren, ist durch einen roten Pfeil markiert. Für den immunologischen Nachweis des D1-Proteins wurde der C-terminale Antikörper verwendet. Es wurden jeweils 15 µg Protein aufgetragen und die gleichmäßige Beladung durch Anfärbung der Proteingele mit Coomassie-Blau überprüft. LHC – Proteine der Lichtsammelkomplexe, K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Schwachlichtversuch

Wenn Lincomycin unter Starklichtbedingungen zugegen war, konnte ein drastischer Abfall der D1-Proteinmenge im Wildtyp festgestellt werden (Abb. 3-16B). Bei Starklichtexposition (HL) war im Wildtyp erst nach längerer Exposition des ECL-Films (Daten nicht gezeigt) eine sehr

geringe D1-Proteinmenge nachweisbar. Im Vergleich dazu war in der *vte1*-Mutante nach Starklichtexposition noch mehr D1-Protein vorhanden. Dies lässt vermuten, dass in der *vte1*-Mutante ein verzögerter D1-Proteinabbau vorliegt. Nach einer einstündigen Erholungsphase (1R) nahm sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante die Menge an D1-Protein zu. Hierbei konnte ein ähnlicher Anstieg der Menge an D1-Protein zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt werden (Abb. 3-17). Dies weist darauf hin, dass die eingesetzte Menge an Lincomycin noch eine geringe D1-Proteinsynthese zulässt.



**Abb. 3-17:** Relative D1-Proteinmenge (nach densitometrischer Auswertung) in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante vor Versuchsbeginn (K) sowie in Anwesenheit von Lincomycin während der Erholungsphase nach Starklichtexposition. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von zwei densitometrisch ausgewerteten Autoradiogrammen. Die D1-Proteinmenge wurde relativ zum D1-Proteingehalt im Wildtyp bzw. der *vte1*-Mutante bei Starklicht (HL) berechnet, welcher auf den Wert 1 gesetzt wurde. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht

Im weiteren Verlauf der Erholungsphase (2R, 4R) konnten keine Unterschiede in der Änderung der D1-Proteinmenge zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt werden (Abb. 3-17). In der *vte1*-Mutante scheint der bereits bei Starklichtexposition vermutlich verzögerte Abbau des D1-Proteins dazu geführt zu haben, dass die D1-Proteinmenge in den *vte1*-Blättern sowohl eine Stunde nach der Starklichtexposition (1R) als auch weitere drei Stunden später (4R) noch geringfügig höher war als im Wildtyp (Abb. 3-16B).

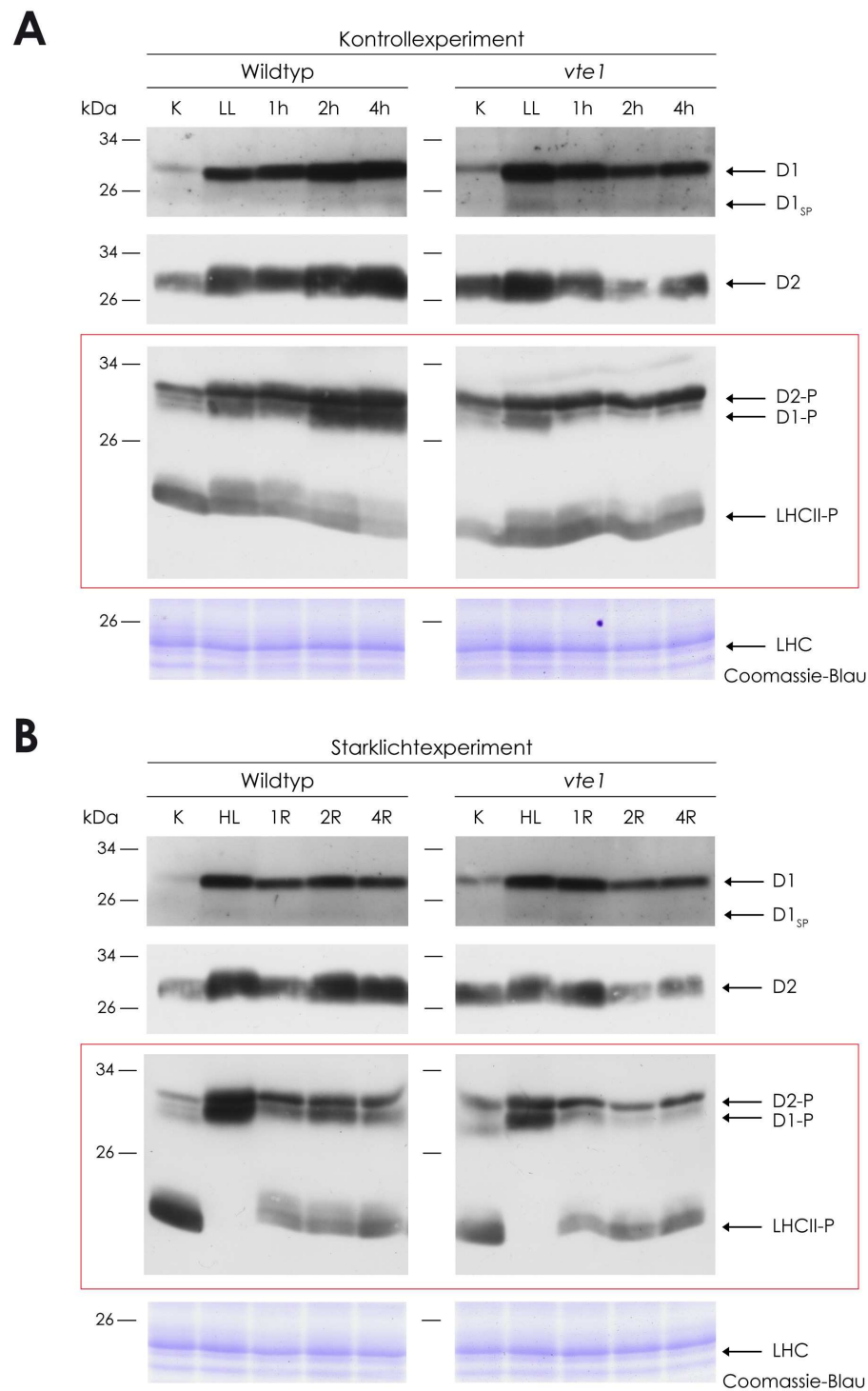
Da in der *vte1*-Mutante die Änderung der D1-Proteinmenge in der Erholungsphase nach Starklichtexposition der in *vte1*- und Wildtypblättern des Lincomycinversuches (Abb. 3-16B) sehr ähnlich war, ist zu vermuten, dass in der *vte1*-Mutante die Neusynthese des D1-Proteins beeinträchtigt ist.

### 3.5.2 Reversible Phosphorylierung des D1-Proteins

Unter dem Einfluss von Lincomycin wurde beobachtet, dass in der *vte1*-Mutante der Abbau des D1-Proteins insbesondere bei Starklichtexposition langsamer erfolgt als im Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass Tocopheroldefizienz nicht wie zunächst vermutet (s. 3.2.4) mit einem verstärkten D1-Proteinabbau einhergeht, sondern die Neusynthese beeinträchtigt und den Abbau des D1-Proteins vermindert. Denkbar ist auch, dass die *vte1*-Mutante den fehlenden Einfluss von Tocopherolen auf das D1-Protein durch andere Mechanismen kompensieren kann, die einen schnellen Abbau des D1-Proteins verhindern können. Ein Mechanismus, von dem angenommen wird, dass er die Abbaurate des D1-Proteins reguliert, ist die reversible Phosphorylierung des D1-Proteins (Rintamäki *et al.* 1996, Koivuniemi *et al.* 1995). Da phosphoryliertes D1-Protein kaum proteolytisch abgebaut werden kann, ist für eine schnelle Proteolyse die Dephosphorylierung des D1-Proteins erforderlich (Rintamäki *et al.* 1996). Es wäre möglich, dass beschädigtes D1-Protein durch Phosphorylierung im Photosystem II erhalten bleibt, wenn wenig Kapazität zur Proteolyse und Neusynthese des D1-Proteins besteht. Falls in der *vte1*-Mutante der D1-Proteinabbau durch Phosphorylierung verhindert werden kann, wäre unter Starklichtbedingungen in diesen Pflanzen eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Menge an phosphoryliertem D1-Protein zu erwarten.

Um zu überprüfen, ob in der *vte1*-Mutante die Abbaurate des D1-Proteins durch dessen Phosphorylierung beeinflusst wird, wurde der Anteil an phosphoryliertem D1-Protein (D1-P) für die in Kapitel 3.2 dargelegten Versuchsbedingungen bestimmt. Das D1-Protein besitzt eine Phosphorylierungsstelle an der N-terminal lokalisierten Aminosäure Threonin (Vener *et al.* 2001). Für den Nachweis von D1-P wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen Proteine mit phosphoryliertem Threonin gerichtet ist (Bergo *et al.* 2002, Pokorska *et al.* 2009). Mithilfe des Antikörpers war es außerdem möglich, die phosphorylierte Form des D2-Proteins und die der Lhcb1/Lhcb2-Proteine zu detektieren, da diese auch Threonin-Phosphorylierungsstellen besitzen (Vener *et al.* 2001). Zusätzlich wurde das D2-Protein immunologisch nachgewiesen. Zusammen mit der Analyse phosphorylierter Proteine sollte dies einen Einblick in die Reparatur von geschädigten Reaktionszentren des Photosystems II ermöglichen.

Während der Belichtung mit Schwachlicht war im Wildtyp eine kontinuierliche Zunahme der Mengen an phosphoryliertem D1- und D2-Protein feststellbar (Abb. 3-18A). Im Vergleich dazu war in Blättern der *vte1*-Mutante die Menge an phosphoryliertem D1-Protein nur nach zwei Stunden im Schwachlicht (LL) erhöht. Im Verlauf der Schwachlichtexposition konnten keine Unterschiede in der Menge an phosphorylierten LHCII-Proteinen zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt werden.



**Abb. 3-18:** Immunologischer Nachweis des D1- und D2-Proteins sowie der phosphorylierten Form (P) der D1-, D2- und LHCII-Proteine (Lhcb1/Lhcb2) in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante im **(A)** Kontroll- und **(B)** Starklichtexperiment. Die Autoradiogramme des D1-Proteins und die Ausschnitte aus Coomassie-Proteingelen entsprechen denen aus Abb. 3-5. Um die Phosphoproteine elektrophoretisch aufzutrennen, wurden 16 %ige (w/v) SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Der immunologische Nachweis der Phosphoproteine erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers, der für Threonin-Phosphorylierungsstellen spezifisch ist (s. 2.7.6). LHC – Proteine der Lichtsammelkomplexe, K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment



Bei Starklicht (HL) kam es sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante zu einer Zunahme der Gehalte an phosphorylierten D1- und D2-Proteinen (Abb. 3-18B). Gleichzeitig war eine deutliche Abnahme phosphorylierter LHCII-Proteine zu beobachten. Dies kann auf eine Hemmung der LHCII-Proteinkinase bei Starklicht zurückgeführt werden (Rintamäki *et al.* 1997). Während nach einer Stunde Erholungsphase im Wildtyp der Gehalt phosphorylierter D1- und D2-Proteine linear mit dem der D1- und D2-Proteinmenge abfiel, blieb in der *vte1*-Mutante die Gesamtmenge an D1- und D2-Protein vergleichsweise konstant, obwohl die Mengen an D1-P und D2-P sanken. Dies deutet darauf hin, dass der Hauptanteil der zu diesem Zeitpunkt in der *vte1*-Mutante vorliegenden D1-Proteinmenge dephosphoryliert vorliegt. Des Weiteren scheint im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante neben dem D1-Protein auch das D2-Protein durch die Starklichtexposition beschädigt zu werden und zusammen mit dem D1-Protein einem *turnover* zu unterliegen.

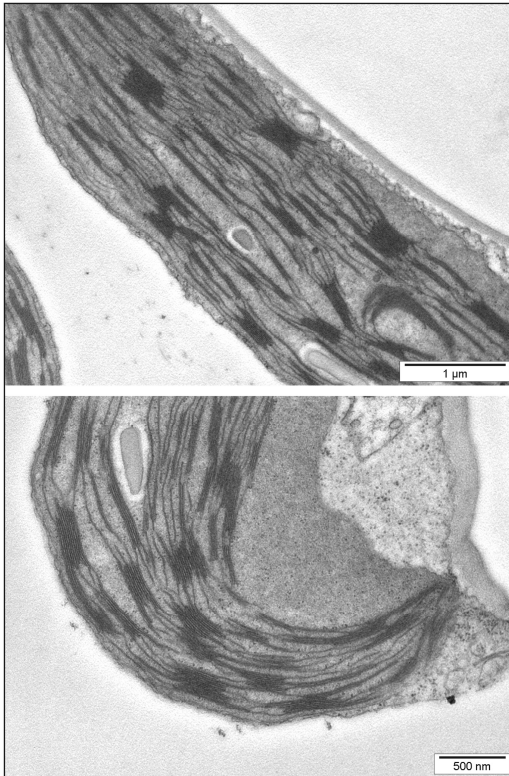
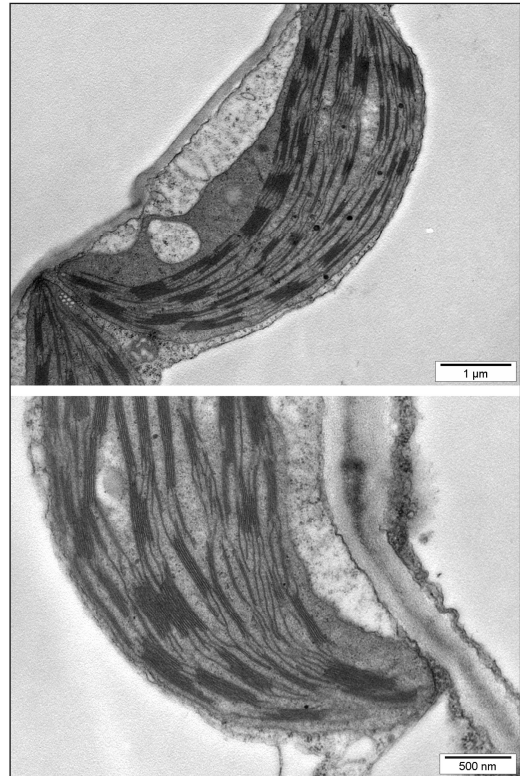
Während in der weiteren Erholungsphase (2R) im Wildtyp der D1- und D2-Proteingehalt sowie die Mengen an D1-P und D2-P wieder zunahm, fielen diese in der *vte1*-Mutante deutlich ab. Dies lässt vermuten, dass in der *vte1*-Mutante der proteolytische Abbau des D1- und D2-Proteins erst später als im Wildtyp erfolgen kann. Erst am Ende der Erholungsphase (4R) war in der *vte1*-Mutante wieder eine Zunahme der D1- und D2-Proteingehalte sowie der Mengen an D1-P und D2-P nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass in Blättern der *vte1*-Mutante sowohl ein verzögerter Abbau des D1-Proteins als auch des D2-Proteins vorliegt, der nicht auf eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte oder längeranhaltende Phosphorylierung dieser Proteine zurückgeführt werden kann. Es ist zu vermuten, dass Tocopheroldefizienz nicht nur die Neusynthese sondern auch den Abbau des D1-Proteins und darüber hinaus des D2-Proteins beeinträchtigt.

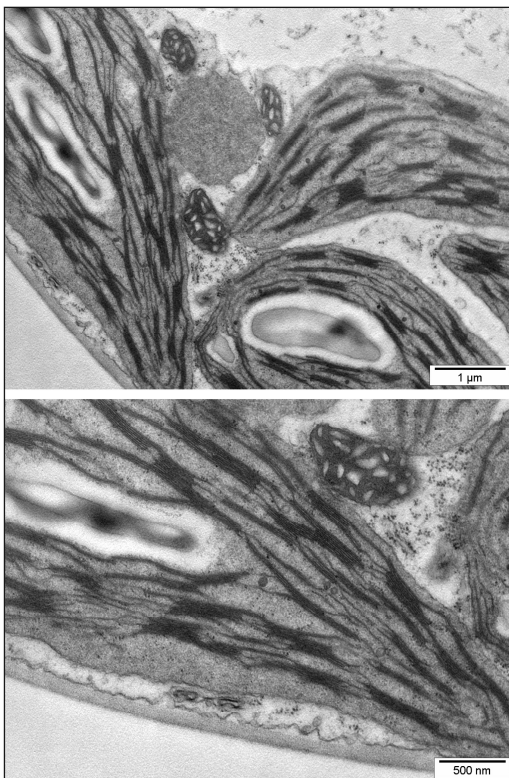
### 3.5.3 Ultrastruktur der Chloroplasten

Weil vermutet wird, dass der *turnover* des D1-Proteins auch durch strukturelle Änderungen der Granathylakoide bei Starklicht beeinflusst werden kann (Khatoon *et al.* 2009), wurde getestet, ob in den eigenen Versuchen unter Starklichtbedingungen eine veränderte Granastuktur in den Chloroplasten vorhanden ist. Dafür wurden TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten einzelner Blattsegmente des Wildtyps und der *vte1*-Mutante zu ausgewählten Zeitpunkten des Starklichtexperimentes angefertigt (Abb. 3-19).

Wildtyp-Kontrolle (K)

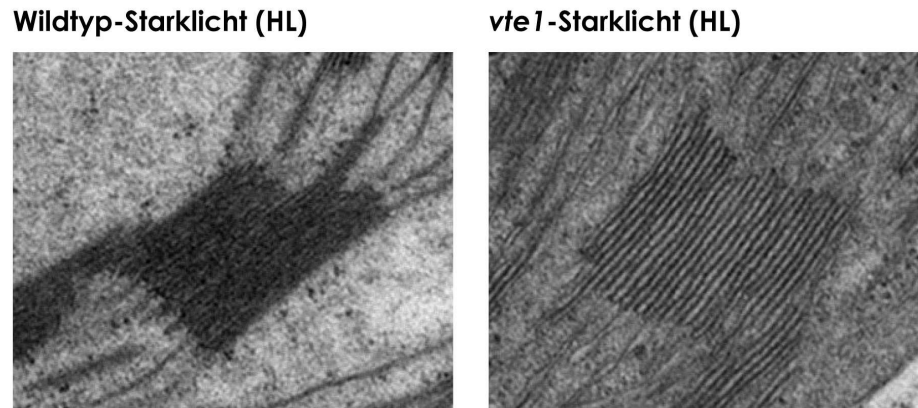
*vte1*-Kontrolle (K)

Wildtyp-Starklicht (HL)

*vte1*-Starklicht (HL)

**Abb. 3-19:** Transmissionselektronenmikroskopische Dokumentation der Ultrastruktur von Chloroplasten in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante vor Beginn des Starklichtexperimentes (K) und nach Starklichtexposition (HL). Dargestellt sind jeweils zwei Aufnahmen je Pflanzenlinie und Versuchszeitpunkt (TEM-Auflösung 1 µm und 500 nm).

In den TEM-Aufnahmen von Chloroplasten waren vor Beginn der Starklichtbehandlung (K) keine Unterschiede in der Struktur und Anordnung von Stroma- und Granathylakoiden des Wildtyps und der *vte1*-Mutante erkennbar.



**Abb. 3-20:** Detailansicht eines Granastapels in Chloroplasten des Wildtyps und der *vte1*-Mutante nach Starklichtexposition (vergrößerter Bildausschnitt, TEM-Auflösung 500 nm).

Während im Wildtyp durch die Starklichtexposition keine erkennbaren Veränderungen der Thylakoidstruktur hervorgerufen wurden, waren in Chloroplasten der *vte1*-Mutante häufig aufgeblähte Granastapel zu beobachten (Abb. 3-20). Obwohl diese Granastapel eine ähnliche Anzahl parallel aufeinanderliegender Thylakoidmembranen wie die Granastapel des Wildtyps bzw. der *vte1*-Mutante vor Beginn des Versuches (K) aufwiesen, waren die Abstände der einzelnen Thylakoidmembranen zueinander größer. Diese erkennbar unterschiedlichen Granastrukturen in Wildtyp und *vte1*-Mutante waren allerdings nach einer zweistündigen Erholungsphase nach Starklichtexposition nicht mehr nachweisbar (A.12). Möglicherweise kann in der *vte1*-Mutante die stärkere Abstandsvergrößerung einzelner Thylakoidmembranen in den Granastapeln, die transient nach Starklichtexposition auftritt, den *turnover* des D1-Proteins in diesen Pflanzen beeinflussen.

### 3.5.4 Fettsäurezusammensetzung in Wildtyp und *vte1*-Mutante

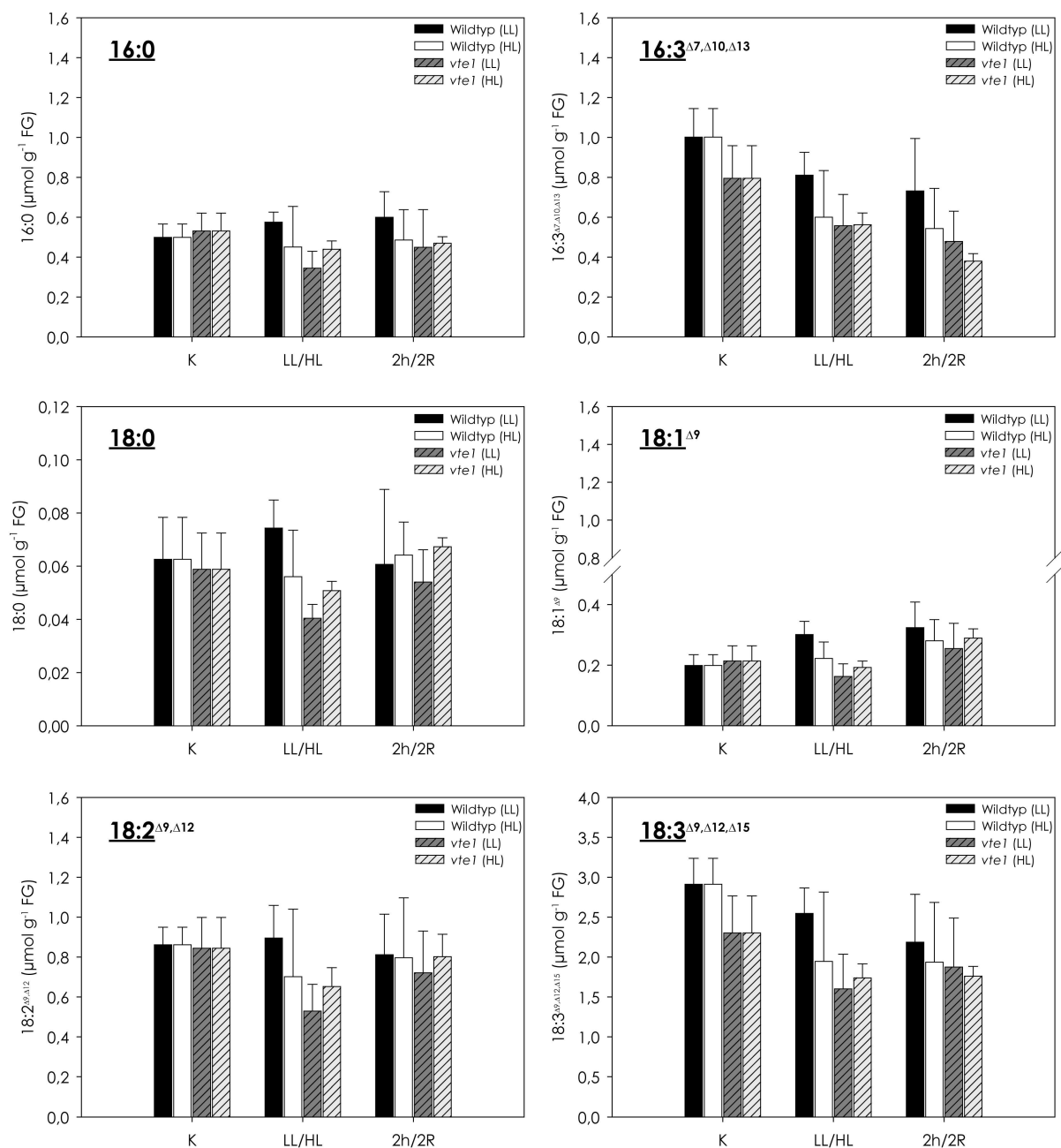
Um zu klären, auf welche Weise Tocopherole den *turnover* des D1-Proteins während einer Erholungsphase nach Starklichtexposition beeinflussen könnten, wurde im Folgenden deren Eigenschaft als Membranbestandteil untersucht. Die Reparatur des Photosystems II durch den *turnover* des D1-Proteins findet an bzw. innerhalb der Thylakoidmembran statt und erfordert eine laterale Wanderung von Proteinen in der Thylakoidmembran (s. 1.2.3). Dadurch könnte die Effizienz des D1-Protein-*turnovers* auch von der Fluidität der Thylakoidmembran abhängig sein.

Die Fluidität einer Membran wird durch die Zusammensetzung und jeweiligen Eigenschaften von Lipiden und Fettsäuren beeinflusst. Um zu testen, ob das Fehlen von Tocopherolen in den Membranen der *vte1*-Mutante mit Änderungen in deren Fettsäurezusammensetzung einhergeht, wurde der Gehalt verschiedener veresterter Fettsäurespezies in Blättern der *vte1*-Mutante und des Wildtyps zu ausgewählten Zeitpunkten eines Starklicht- und Kontrollversuchs analysiert.

Während im Wildtyp unter Kontrollbedingungen die Mengen an 16:0, 18:0 und 18:2 Fettsäuren nur wenig variierten, konnte mit zunehmender Belichtungszeit eine Zunahme der 18:1 sowie eine Abnahme an 16:3 und 18:3 Fettsäuren festgestellt werden (Abb. 3-21). Diese zeitlichen Veränderungen der Fettsäuregehalte des Wildtyps waren mit ähnlicher Tendenz auch nach Starklichtexposition und während der anschließenden Erholungsphase zu beobachten. Im Vergleich zum Wildtyp konnten in der *vte1*-Mutante vor Beginn der Lichtbehandlung (K) bis zu 20 % geringere Gehalte an 18:3 und 16:3 Fettsäuren festgestellt werden. Während der nachfolgenden Belichtung (LL/HL) kam es in der *vte1*-Mutante zu einer deutlichen Abnahme der Gehalte an 16:0, 18:0, 18:1 und 18:2 Fettsäuren. Diese Abnahme war bei Schwachlicht (LL) stärker ausgeprägt als bei Starklicht (HL). Die beobachteten Unterschiede zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante traten nur nach den ersten zwei Stunden Belichtung (LL/HL) auf und waren nach weiteren zwei Stunden im Licht (2h/2R) nicht mehr nachweisbar.

Um die Veränderungen in den Gehalten der 16:3 und 18:3 Fettsäuren besser zu verdeutlichen, wurden die Fettsäuregehalte des Wildtyps und der *vte1*-Mutante vor Beginn der Experimente (K) auf jeweils 100 % gesetzt. Dadurch wurden die anfänglichen Unterschiede in den Mengen an 16:3 und 18:3 Fettsäuren zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante ausgeglichen. Anschließend wurde in Relation zu diesem normierten Ausgangswert der prozentuale Anteil der Gehalte der Fettsäuren im Wildtyp bzw. in der *vte1*-Mutante während der Lichtbehandlung (LL/HL/2h/2R) ermittelt (4-1) (Abb. 3-22). Für die Berechnung wurden die Mittelwerte der Fettsäuregehalte (FS-Gehalt) eingesetzt.

$$\text{relativer Fettsäuregehalt} = \left( \frac{(\text{FS-Gehalt})_{\text{LL/HL/2h/2R}} \times 100\%}{(\text{FS-Gehalt})_{\text{WT-K bzw. vte1-K}}} \right) \quad (\text{Gl. 4-1})$$

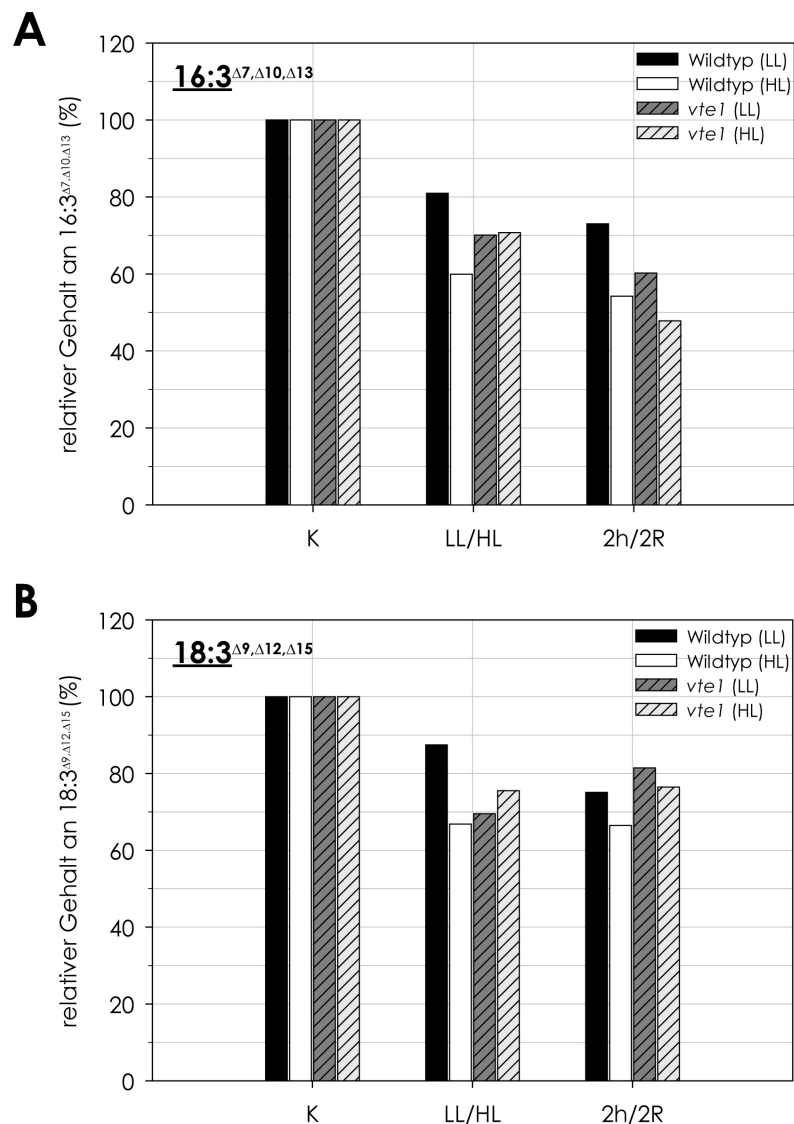


**Abb. 3-21:** Gehalte verschiedener veresterter Fettsäurespezies in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante unter Schwachlichtbedingungen sowie im Starklichtexperiment. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von jeweils drei individuellen Blattproben (je Probe fünf Blätter vereinigt)  $\pm$  SD. K – Kontrolle, HL – Starklicht ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 2R – nach zwei Stunden Erholung vom Starklicht, 2h – nach zwei weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment

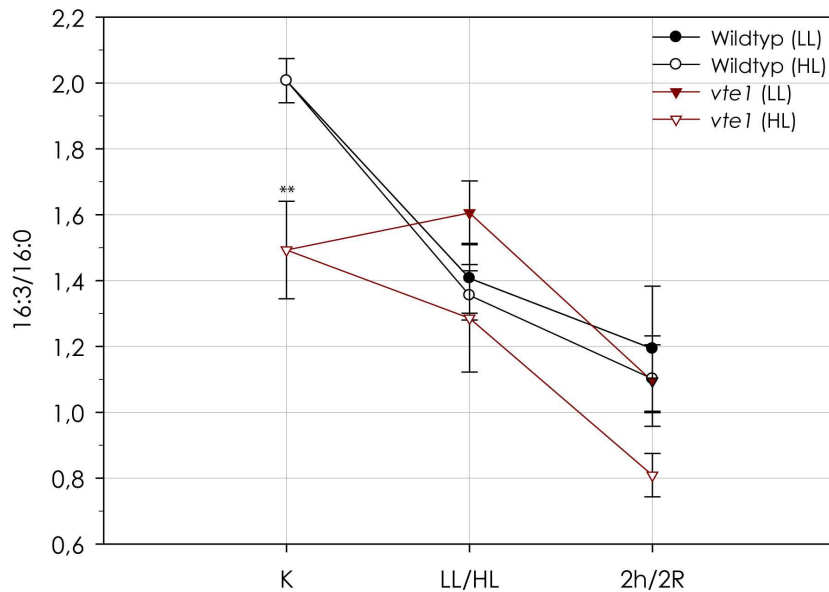
Es konnte festgestellt werden, dass sich die Mengen an 16:3 und 18:3 Fettsäuren unabhängig von der Lichtintensität in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante mit zunehmender Belichtungszeit verringerten (Abb. 3-22). Im Wildtyp war der 16:3 und 18:3 Fettsäuregehalt nach insgesamt vier Stunden im Schwachlicht (2h) auf 75 % des jeweiligen Ausgangswertes vor Beginn der Lichtbehandlung (K) gesunken. Nach Starklichtexposition fiel die Menge an 16:3 und 18:3 Fettsäuren im Wildtyp auf Werte zwischen 60 bis 65 % des Anfangsgehaltes (K)

ab und war damit deutlich stärker reduziert als bei Schwachlichtexposition (LL). Während der Erholungsphase nach der Starklichtexposition erfolgte im Wildtyp keine weitere Abnahme in der Menge dieser Fettsäuren.

In der *vte1*-Mutante waren nach insgesamt zwei Stunden im Licht (LL/HL) die Gehalte der dreifach ungesättigten 18:3 und 16:3 Fettsäuren unabhängig von der Lichtintensität auf ca. 70 % des Anfangswertes (K) gesunken. Nach zwei weiteren Stunden Belichtung (2h/2R) war nur für 16:3 Fettsäuren eine erneute Abnahme um 10 % unter Schwachlichtbedingungen (2h) bzw. um 20 % bei vorangegangener Starklichtexposition (2R) feststellbar. Während im Wildtyp in der Erholungsphase nach Starklichtexposition (2R) nur 75 % des anfänglichen 18:3 Gehaltes detektiert wurden, stieg zeitgleich in der *vte1*-Mutante der Gehalt an 18:3 Fettsäuren wieder auf ca. 80 % des Fettsäuregehaltes vor Beginn der Lichtbehandlung (*vte1*-K) an.



**Abb. 3-22:** Relativer **(A)** 16:3 und **(B)** 18:3 Fettsäuregehalt in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante bei Starklicht und nachfolgender Erholungsphase sowie im Kontrollexperiment. K – Kontrolle, HL – Starklicht ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 2R – nach zwei Stunden Erholung vom Starklicht, 2h – nach zwei weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment



**Abb. 3-23:** Verhältnis von 16:3 zu 16:0 Fettsäuren in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante unter Kontrollbedingungen sowie im Starklichtexperiment. \*\* Unterschied wt-K/*vte1*-K signifikant,  $P=0,01$  (t-Test, zweiseitig). K – Kontrolle, HL – Starklicht ( $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 2R – nach zwei Stunden Erholung vom Starklicht, 2h – nach zwei weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrolleexperiment

Um die Fluidität der plastidären Membranen einschätzen zu können, wurde das Verhältnis der dreifach ungesättigten 16:3 Fettsäuren zu den ungesättigten 16:0 Fettsäuren bestimmt (Abb. 3-23). Während 16:3 Fettsäuren ausschließlich im Chloroplasten synthetisiert werden und dort hauptsächlich in der Thylakoidmembran an MGDG verestert vorliegen, sind 16:0 Fettsäuren sowohl in der Thylakoid- als auch in der Hüllmembran zu finden und zumeist mit DGDG oder Phosphatidylcholin verestert (Dörmann 2005).

Es wurde festgestellt, dass Blätter der *vte1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp bereits vor Beginn der Lichtbehandlung (K) weniger ungesättigte 16:3 Fettsäuren als gesättigte 16:0 Fettsäuren aufweisen. Während im Blattgewebe des Wildtyps anteilmäßig doppelt so viele ungesättigte 16:3 als gesättigte 16:0 Fettsäuren vorhanden waren, konnten in *vte1*-Blättern nur um die Hälfte mehr 16:3 als 16:0 Fettsäuren gefunden werden. Mit zunehmender Belichtungszeit sank im Wildtyp bei annähernd konstanten 16:0 und sinkenden 16:3 Fettsäuremengen (vgl. Abb. 3-21) erwartungsgemäß auch das 16:3/16:0 Verhältnis ab. Wenn die *vte1*-Mutante für zwei Stunden dem Schwachlicht ausgesetzt (LL) wurde, konnte im Vergleich zum Versuchsbeginn (*vte1*-K) und dem Wildtyp kaum eine Änderung des 16:3/16:0-Verhältnisses festgestellt werden. Erst bei weiterer Schwachlichtexposition (2h) sank das 16:3/16:0-Verhältnis ab und erreichte Werte ähnlich denen des Wildtyps zu diesem Zeitpunkt. Hingegen verringerte sich das Verhältnis von 16:3 zu 16:0 Fettsäuren in der *vte1*-Mutante nach einer Starklichtexposition und während der anschließenden Erholungsphase stetig. Nach zwei Stunden Erholung vom Starklicht (2R) lag in *vte1*-Blättern der Anteil gesättigter 16:0 Fettsäuren deutlich über dem von ungesättigten 16:3 Fettsäuren.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der tocopheroldefizienten *vte1*-Mutante eine veränderte Fettsäurezusammensetzung vorliegt, die bereits unter Kontrollbedingungen nachweisbar ist. Bereits vor Beginn der Lichtbehandlung (K) waren in *vte1*-Blättern im Vergleich zum Wildtyp weniger der für die Thylakoidmembran charakteristischen ungesättigten 16:3 und 18:3 Fettsäuren nachweisbar. Des Weiteren wird am Beispiel des 16:3/16:0-Verhältnisses deutlich, dass Membranen der *vte1*-Mutante anteilmäßig mehr gesättigte als ungesättigte Fettsäuren aufweisen. Es ist daher zu vermuten, dass das Fehlen von Tocopherolen in der Membran zu Veränderungen in deren Fettsäurezusammensetzung führt, die eine verminderte Membranfluidität bewirken.



## 4. Diskussion

### 4.1 Subzelluläres Vorkommen der Tocopherole

Bisher wurden Tocopherole hauptsächlich in Plastiden gefunden, wo auch ihre Biosynthese stattfindet und ihnen eine antioxidative Funktion bei der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Lipidperoxyradikalen zugesprochen wird (Munne-Bosch & Alegre 2002). Darüber hinaus ist postuliert worden, dass Tocopherole am Lipidstoffwechsel im ER beteiligt sind (Maeda *et al.* 2008), wobei auch ein extraplastidäres Vorkommen von Tocopherolen erwartet werden könnte. Um daher Hinweise auf Funktionen der Tocopherole zu erhalten, die über ihre antioxidative Wirkung hinausgehen könnten, wurde zunächst ihr subzelluläres Vorkommen in Pflanzenzellen untersucht. Dabei war insbesondere von Interesse, ob Tocopherole außerhalb der Plastiden zu finden sind. Die hier vorgestellten Analysen zur subzellulären Verteilung der Tocopherole ergaben allerdings keine Hinweise darauf, dass Tocopherole außerhalb der Plastiden vorkommen (s. 3.1). Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass mit der angewandten Methode zur Zellfraktionierung nach GIBEAUT und CARPITA (1994) keine ausreichende Abtrennung plastidärer Membranen möglich war. Es ist deshalb nicht möglich gewesen, etwaige Spuren von Tocopherolen außerhalb der Plastiden nachzuweisen.

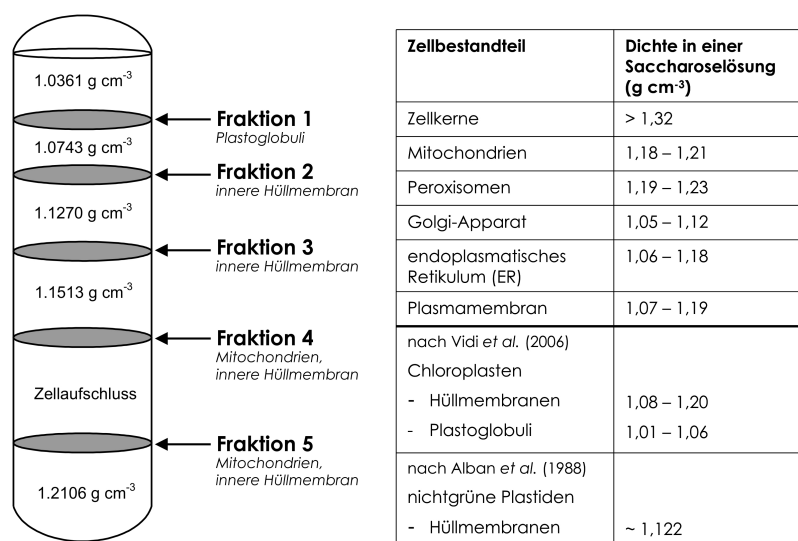
Chloroplastenmembranen können bis zu 73 % der Gesamtfläche aller Biomembranen einer photosynthetisch aktiven Mesophyllzelle repräsentieren, wohingegen nur etwa 7 % davon mitochondriale und Endomembranen sind (Forde & Steer 1976). Dieses ungünstige Verhältnis und die ähnlichen Dichten von nichtplastidären und plastidären Zellkompartimenten (Abb. 4-1) zeigen, dass bei einer Zellfraktionierung Verunreinigungen mit plastidären Membranen nicht zu verhindern sind. Um das Ausmaß zu begrenzen, wurde zwar das nichtgrüne Infloreszenzgewebe von *Brassica oleracea botrytis* verwendet, aber auch in diesem Gewebe ist die Menge farbloser Plastiden (Leukoplasten) hoch und es ist daher mit einem hohen Anteil an plastidären Hüllmembranen zu rechnen (Alban *et al.* 1988, Journet & Douce 1985). So waren in allen Fraktionen Tocopherole nachweisbar und bis auf Fraktion 1, die hauptsächlich Bestandteile von Plastoglobuli enthielt, auch in allen Fraktionen Verunreinigungen mit plastidären Hüllmembranen vorhanden. Es liegt nahe, dass die in diesen Zellfraktionen detektierten Tocopherole vorwiegend aus den plastidären Hüllmembranen stammen. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass in diesen Fraktionen der Tocopherolgehalt mit der Menge an E37-Protein korreliert. Das E37-Protein bezeichnet das Enzym MPBQ/MSBQ-Methyltransferase (VTE3 in *A. thaliana*), welches an der Tocopherolbiosynthese an der inneren Hüllmembran der Plastiden beteiligt ist (Cheng *et al.* 2003). Hierbei ist unklar, warum nach dem immunologischen Nachweis des E37-Proteins in den Zellfraktionen zwei Proteinbanden und in Hüllmembranfraktionen aus farblosen Plastiden bzw. Chloroplasten von *Brassica*

*oleracea botrytis* nur eine Proteinbande detektiert wurde. Es wäre möglich, dass es sich bei der oberen der beiden Proteinbanden um die Vorstufe des E37-Proteins mit einem Molekulargewicht von 37,9 kDa handelt und die untere Bande das in die Plastiden importierte E37-Protein darstellt, das ohne Transitpeptid ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa hätte (IPSORT-Analyse). Hüllmembranfraktionen, die noch vermehrt Cytosol enthalten, könnten in der Tat zusätzlich die Vorstufe des E37-Proteins aufweisen, während in Hüllmembranfraktionen aus isolierten Plastiden nur die reife Form des E37-Proteins überwiegen sollte.

In Fraktion 1 war hauptsächlich das Fibrillin-Protein vorhanden, welches ein Bestandteil von Plastoglobuli ist (Austin *et al.* 2006, Ytterberg *et al.* 2006). Da bereits nachgewiesen ist, dass Plastoglobuli sowohl Tocopherole als auch die Tocopherolzyklase (VTE1) enthalten (Vidi *et al.* 2006), liegt es nahe, dass die in Fraktion 1 detektierten Tocopherole aus den in dieser Fraktion vorhandenen Plastoglobuli stammen.

Den einzigen Hinweis auf ein mögliches extraplastidäres Vorkommen ergab die Analyse der Fraktionen 4 und 5, die neben plastidären Hüllmembranen vermehrt mitochondriale Membranen aufweisen. In diesen Fraktionen war der Tocopherolgehalt ähnlich dem in den Fraktionen 2 und 3, jedoch die Menge an plastidären Hüllmembranen geringer. Daher ist denkbar, dass die in Fraktion 4 und 5 detektierten Tocopherole auch aus mitochondrialen Membranen stammen. Bereits frühere Untersuchungen zum subzellulären Vorkommen der Tocopherole zeigten, dass sie in einer subzellulären Fraktion zu finden sind, die mit Mitochondrien angereichert ist (Hughes *et al.* 1971, Newton & Pennock 1971).

Die Art der Verteilung von Mitochondrien, plastidären Hüllmembranen und Plastoglobuli im Saccharosedichtegradienten entspricht den Dichteangaben dieser Zellbestandteile in einer Saccharoselösung und anderen Saccharosedichtegradienten ähnlichen Aufbaus (Vidi *et al.* 2006, Alban *et al.* 1988) (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1:** Diskontinuierlicher Saccharosedichtegradient nach GIBEAUT und CARPITA (1994) mit Zuordnung der Fraktionen 1 – 5 sowie Angaben zur Dichte verschiedener Zellkompartimente bzw. –membranen in einer Saccharoselösung nach GRAHAM und HIGGINS (1998).

## 4.2 Auswirkungen einer Starklichtbehandlung auf die *vte1*-Mutante

Bereits die erste Untersuchung einer tocopheroldefizienten *vte1*-Mutante von *A. thaliana* zeigte, dass das Fehlen von Tocopherolen unter normalen Wachstumsbedingungen eine untergeordnete Rolle spielt, aber die Anfälligkeit des Photosyntheseapparates gegenüber Starklichtbedingungen erhöht (Porfirova *et al.* 2002). Darauf folgende Untersuchungen an der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* durch TREBST *et al.* (2002) und KRUK *et al.* (2005) zeigten, dass hauptsächlich das Photosystem II, speziell das D1-Protein, von der Tocopheroldefizienz betroffen sind. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Tocopherole eine zentrale Rolle zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  im Photosystem II einnehmen und dadurch das D1-Protein vor Schäden schützen. Obwohl das D1-Protein eines der wichtigsten Proteine des Photosystems II ist und besonders anfällig gegenüber einer Starklichtexposition ist, sind erstaunlicherweise bis jetzt keine nennenswerten Analysen zur Bedeutung der Tocopherole für die Stabilität des D1-Proteins gegenüber Starklichtbedingungen in Höheren Pflanzen bekannt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Tocopherole für den Erhalt und die Regeneration des D1-Proteins und somit für die Reparatur des Photosystems II wichtig sind. Dies kann insbesondere dann wichtig sein, wenn Höhere Pflanzen eine kurzzeitige Starklichtexposition erfahren und während einer nachfolgenden Erholungsphase (s. 3.2).

### *Photoinhibierung und Schäden am D1-Protein*

Wenn Blätter der *vte1*-Mutante für 1,5 Stunden einer gegenüber den Anzuchtbedingungen 15fach höheren Lichtintensität ausgesetzt waren, konnte im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant stärkere Abnahme von  $F_v/F_m$ , einem Parameter für die Effizienz des Photosystems II, festgestellt werden (s. 3.2.1). Es ist generell anerkannt, dass ein Abfall von  $F_v/F_m$  unter Starklichtbedingungen auf eine Photoinhibierung im Photosystem II schließen lässt (Hikosaka *et al.* 2004, Baker 2008). Eine Photoinhibierung kann von einer vorübergehenden Inaktivierung von Reaktionszentren bis hin zu deren längerfristigen Unwirksamkeit führen, wobei letzteres dann auftritt, wenn Schäden am D1-Protein vorliegen (Aro *et al.* 1993). Demzufolge führt die Starklichtbehandlung in der *vte1*-Mutante zu einer stärkeren Photoinhibierung als im Wildtyp. Gegenüber der Exposition im Schwachlicht nahm bei Starklicht mit  $F_v/F_m$  auch der D1-Proteingehalt in Wildtyp und *vte1*-Mutante ab (s. 3.2.4). Hierbei war in der *vte1*-Mutante nicht nur die Effizienz des PSII stärker beeinträchtigt als im Wildtyp, sondern auch der Verlust der Menge an D1-Protein größer. Dies zeigt, dass Photoinhibierung mit einem stärkeren Abbau des D1-Proteins einhergeht, wenn Tocopherole in den Pflanzen fehlen. Der Befund ist vergleichbar mit den Ergebnissen von TREBST *et al.* (2002).

Während einer mehrstündigen Erholungsphase nach Starklichtexposition zeigte sich, dass die *vte1*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte und zeitlich verzögerte Reparatur des Photosystems II aufweist. So war in der *vte1*-Mutante am Ende der Erholungsphase weder

die Effizienz des Photosystems II noch die Menge an D1-Protein vollständig wiederhergestellt. Geht eine Photoinhibierung mit Schäden am D1-Protein einher, so werden Reaktionszentren dauerhaft inaktiviert und können erst wieder nach einem *turnover* des D1-Proteins reaktiviert werden (Aro *et al.* 1993). Daneben kann Photoinhibierung aber auch zu inaktiven Reaktionszentren führen, die in der Erholung wieder reaktiviert werden ohne dass ein D1-*turnover* notwendig ist (Leitsch *et al.* 1994). Nach LEITSCH *et al.* (1994) erfolgt die Wiederherstellung der Effizienz des Photosystems II während einer Erholungsphase nach Starklichtexposition in zwei Phasen. Einer zunächst schnellen Zunahme von  $F_v/F_m$ , die auf die Reaktivierung von inaktiven, aber unbeschädigten Reaktionszentren zurückgeht, folgt ein mehrere Stunden andauernder, langsamer Anstieg der PSII-Effizienz bis auf den Ausgangswert vor der Starklichtbehandlung. Diese Verzögerung wird hauptsächlich auf geschädigte Reaktionszentren zurückgeführt, da für deren Reaktivierung der *turnover* des D1-Proteins geschwindigkeitsbestimmend wird. Wenn in der *vte1*-Mutante unter Starklichtbedingungen mehr D1-Protein geschädigt wurde und/oder der Ablauf des D1-*turnovers* gestört ist, könnte dies erklären, warum im Vergleich zum Wildtyp die Erholung der Effizienz des Photosystems II in der *vte1*-Mutante verzögert ist.

#### *Bedarf an Tocopherolen und Bildung von $^1O_2$*

Gemäß dem Modell von TREBST *et al.* (2002), nach welchem Tocopherole  $^1O_2$  beseitigen und dadurch das D1-Protein vor oxidativen Schäden schützen, wurde angenommen, dass die stärkere Beeinträchtigung des D1-Proteins in der *vte1*-Mutante darauf zurückzuführen ist, dass in diesen Pflanzen mehr  $^1O_2$  als im Wildtyp akkumuliert. So war im Wildtyp infolge der kurzzeitigen Starklichtexposition nicht nur eine Abnahme des Tocopherolgehaltes sondern auch eine Anreicherung von  $\alpha$ -Tocochinon ( $\alpha$ -TQ) nachweisbar (s. 3.2.2). Die Anreicherung von  $\alpha$ -TQ unter Starklichtbedingungen lässt vermuten, dass die Starklichtexposition zur verstärkten Bildung von  $^1O_2$  führt und dass eben jener  $^1O_2$  spezifisch durch  $\alpha$ -Tocopherol inaktiviert wird. Bereits an Bohnenblättern und Zellen von *Chlamydomonas reinhardtii* wurde gezeigt, dass  $\alpha$ -TQ unter Starklichtbedingungen akkumuliert und dies auf eine Reaktion von  $\alpha$ -Tocopherol mit  $^1O_2$  zurückgeht (Kruk *et al.* 2008). Wieviel  $^1O_2$  durch  $\alpha$ -Tocopherol in einer chemischen Reaktion zu  $\alpha$ -TQ *gequencht* wird, kann nicht bestimmt werden. Zum einen ist die Menge des gebildeten  $^1O_2$  nicht bekannt und zum anderen wird  $^1O_2$  neben der chemischen Reaktion zu  $\alpha$ -TQ hauptsächlich über einen Energietransfer durch Tocopherole beseitigt (physikalisches *Quenching*). Obwohl beide Mechanismen gleichzeitig auftreten, wird davon ausgegangen, dass  $\alpha$ -Tocopherol bis zu 120  $^1O_2$ -Moleküle physikalisch *quenchen* kann, bevor es überhaupt in einer chemischen Reaktion zu  $\alpha$ -TQ reagiert (Kamal-Eldin & Appelqvist 1996). Da die höchsten Mengen an  $\alpha$ -TQ im Wildtyp bei Starklichtexposition gemessen wurden, ist denkbar, dass zu diesem Zeitpunkt  $^1O_2$  akkumuliert und nicht mehr allein durch physikalisches *Quenching* beseitigt werden kann.

Während Tocopherole bei der Reaktion mit  $^1\text{O}_2$  zu Tocoquinon irreversibel verbraucht werden, liegen sie nach einem physikalischen *Quenching* von  $^1\text{O}_2$  unverändert vor und stehen erneut als  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* zur Verfügung. Dies kann bedeuten, dass  $^1\text{O}_2$  durch Tocopherole inaktiviert wird ohne dass Veränderungen in der Menge an Tocopherolen im Blattgewebe nachweisbar sind. Erst wenn Tocopherole irreversibel verbraucht werden und diese Menge nicht mehr durch die Tocopherolbiosyntheserate kompensiert werden kann, ist eine Verringerung des Tocopherolgehaltes zu erwarten (Kruk & Trebst 2008). Dies scheint im Wildtyp nur während der kurzzeitigen Starklichtexposition der Fall zu sein, nicht aber während der daran anschließenden Erholungsphase. In der Erholungsphase sank der  $\alpha$ -TQ-Gehalt, während der Tocopherolgehalt wieder bis auf den der Pflanzen im Kontrollexperiment anstieg. Das deutet darauf hin, dass während der Erholungsphase weniger  $^1\text{O}_2$  im Blattgewebe vorhanden ist als bei Starklichtexposition und zu  $\alpha$ -TQ verbrauchtes  $\alpha$ -Tocopherol in ausreichender Menge durch Neusynthese ersetzt werden kann.

Um Hinweise auf die Tocopherolsyntheseleistung im Wildtyp zu erhalten, wurde die Expression ausgewählter Gene des Tocopherolbiosyntheseweges zu den verschiedenen Zeitpunkten eines Starklicht- und Kontrollexperimentes bestimmt (s. 3.2.3). Es konnten jedoch sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante keine Unterschiede in der Expression von Genen der Tocopherolbiosynthese zwischen den beiden Lichtbehandlungen festgestellt werden. Zudem unterschied sich die Expression der jeweiligen Gene in der *vte1*-Mutante nicht von der des Wildtyps. Dies lässt vermuten, dass in der *vte1*-Mutante weiterhin Vorstufen der Tocopherole wie z. B. DMPBQ gebildet werden (Porfirova *et al.* 2002, Sattler *et al.* 2003). Unter Starklichtbedingungen war in beiden Pflanzentypen nur der Transkriptgehalt des *vte2*-Gens, das für das Enzym Homogentisatprenyltransferase (VTE2) kodiert, geringfügig erhöht. Bereits eine andere Studie zeigte, dass bei Starklicht erhöhte *vte2*-Transkriptmengen auftreten können und die Aktivität der VTE2 die Bildung von Tocopherolen beeinflussen kann (Collakova & DellaPenna 2003b).

Obwohl während der Erholungsphase nach Starklichtexposition der Tocopherolgehalt zunahm, war die Expression der *vte1*- und *vte4*-Gene, die für wichtige Enzyme zur Bildung von  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Tocopherol kodieren, nicht verändert. Ähnliches ist aus einer Untersuchung bekannt, bei der ein dauerhaftes Wachstum von Wildtyppflanzen bei Starklicht zwar zur Steigerung des Tocopherolgehaltes im Blattgewebe führte, aber die Transkriptgehalte der *vte1*- und *vte4*-Gene unverändert blieben (Collakova & DellaPenna 2003b). Dies deutet darauf hin, dass die an der Synthese der Tocopherole beteiligten Enzyme entweder sehr stabil sind oder eine hohe Aktivität aufweisen.

Weil keine Methode zur direkten Bestimmung der  $^1\text{O}_2$ -Menge zur Verfügung stand, wurde die Expression des *wrky33*-Gens untersucht, welche von der Menge an  $^1\text{O}_2$  abhängt (op den Camp *et al.* 2008). Entgegen der Erwartung konnte bei Starklichtexposition jedoch nur eine

geringe *wrky33*-Transkriptmenge im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante nachgewiesen werden (s. 3.2.3). Falls die Expression des *wrky33*-Gens tatsächlich von  $^1\text{O}_2$  abhängt, würde das bedeuten, dass es bei Starklichtexposition zu keiner Anreicherung von  $^1\text{O}_2$  kommt und keine Unterschiede in der  $^1\text{O}_2$ -Menge zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante bestehen. Beide Pflanzentypen wiesen nur vor Beginn der Lichtbehandlung (K), d. h. nach der ersten halben Stunde Belichtung nach dem Wechsel aus der Dunkelphase, eine erhöhte Menge an *wrky33*-Transkript auf. Auch in der *flu*-Mutante, welche  $^1\text{O}_2$  akkumuliert, war zu diesem Zeitpunkt eine Steigerung der *wrky33*-Transkriptmenge feststellbar (op den Camp *et al.* 2008). Es ist denkbar, dass die Expression des *wrky33*-Gens nicht nur von  $^1\text{O}_2$  abhängig ist sondern zusätzlich durch andere Faktoren beeinflusst werden kann. So kann die Expression des *wrky33*-Gens auch durch Abscisinsäure (ABA) induziert werden (Jiang & Deyholos 2009). Abscisinsäure wird in Tabakblättern kurz nach Beginn der täglichen Lichtperiode vorübergehend stärker gebildet (Novakova *et al.* 2005).

Obwohl in der *vte1*-Mutante die Expression des *wrky33*-Gens keinen Hinweis darauf liefert, dass diese Pflanzen bei Starklichtexposition und in der nachfolgenden Erholungsphase eine erhöhte Belastung durch  $^1\text{O}_2$  erfahren, so deuten doch der im Vergleich zum Wildtyp stärkere Verlust der Effizienz des Photosystems II und der Menge an D1-Protein darauf hin. Weil der *vte1*-Mutante Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -Quencher fehlen, könnte  $^1\text{O}_2$  in diesen Pflanzen über längere Zeit und in höheren Mengen akkumulieren.

## 4.3 Bedeutung der Tocopherole für das D1-Protein im Photosystem II

### 4.3.1 Tocopherole – Notwendige $^1\text{O}_2$ -Quencher zum Schutz des D1-Proteins?

War die *vte1*-Mutante in bisherigen Studien von Starklichtbedingungen stärker beeinträchtigt als der Wildtyp, so wurde dies damit begründet, dass Tocopherole in diesen Pflanzen fehlen und dadurch verstärkt photooxidative Schäden entstehen (Havaux *et al.* 2005). In TREBST *et al.* (2002) wurde postuliert, dass Tocopherole insbesondere das D1-Protein vor photooxidativen Schäden bei Starklicht schützen können, indem sie  $^1\text{O}_2$  beseitigen. Ob in der eigenen Arbeit die in der *vte1*-Mutante beobachteten Auswirkungen einer Tocopheroldefizienz auf das D1-Protein tatsächlich mit der Funktion von Tocopherolen als  $^1\text{O}_2$ -Quencher in Zusammenhang stehen, wird im Folgenden diskutiert.

Wenn Blätter der *vte1*-Mutante mit Eosin behandelt und dadurch bereits im Schwachlicht vermehrt  $^1\text{O}_2$  ausgesetzt wurden, führte dies zu einer stärkeren Abnahme der Menge an D1-Protein als im Wildtyp (s. 3.3.1). Dies zeigt, dass  $^1\text{O}_2$  den Abbau des D1-Proteins verstärkt, wenn Tocopherole fehlen und ist mit dem Modell von TREBST *et al.* (2002) vergleichbar. Zugleich könnte dieser Befund darauf hinweisen, dass in *vte1*-Blättern bei Starklichtexposition mehr  $^1\text{O}_2$  als im Wildtyp vorhanden ist und den zu diesem Zeitpunkt stärkeren Abbau des D1-Proteins in diesen Pflanzen verursacht.

Um herauszufinden, ob Tocopherole für die Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  überhaupt notwendig sind, wurde die Beteiligung weiterer Antioxidantien untersucht, welche wie die Tocopherole  $^1\text{O}_2$  inaktivieren können und sie dadurch in ihrer Funktion als  $^1\text{O}_2$ -Quencher ersetzen könnten. Der Schwerpunkt lag hierbei auf Zeaxanthin und Plastochinon-9, da für beide schon in anderen Untersuchungen postuliert wurde, dass sie in der *vte1*-Mutante die Funktion von Tocopherolen als  $^1\text{O}_2$ -Quencher übernehmen können (Havaux *et al.* 2005, Kruk & Trebst 2008).

#### *Versuchsbeginn und Starklichtexposition*

Sowohl in Anwesenheit von Eosin als auch bei Starklichtexposition ging die Bildung von  $^1\text{O}_2$  mit einer Anreicherung von Zeaxanthin und dem Verbrauch von Plastochinon-9 einher. Dies zeigt, dass beide Antioxidantien in der *vte1*-Mutante am *Quenching* von  $^1\text{O}_2$  beteiligt sein können. Während Zeaxanthin in Blättern des Wildtyps nur unter Starklichtbedingungen auftrat, konnte es in *vte1*-Blättern bereits eine halbe Stunde nach dem Wechsel aus der Dunkelphase in das Schwachlicht detektiert werden. Die Bildung von Zeaxanthin lässt vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt bereits  $^1\text{O}_2$  in der *vte1*-Mutante vorhanden war. Außerdem könnte die Bildung von Zeaxanthin in der *vte1*-Mutante auf ein zu diesem Zeitpunkt höheres nichtphotochemisches *Quenching* der Anregungsenergie (NPQ) als im Wildtyp hindeuten. Bereits in HAVAUX *et al.* (2005) finden sich Hinweise darauf, dass in der *vte1*-Mutante mehr NPQ als im Wildtyp auftreten kann.

Schon vor Beginn der jeweiligen Lichtbehandlung konnte festgestellt werden, dass *vte1*-Blätter eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Menge an D1-Protein und darüber hinaus an D2-Protein aufweisen. Dies stimmt überein mit einer anderen Untersuchung, die auch zeigte, dass unter normalen Wachstumsbedingungen in der *vte1*-Mutante mehr D1-Protein als im Wildtyp vorliegt (Havaux *et al.* 2005). Möglicherweise ist dies eine Anpassung daran, dass in diesen Pflanzen der oxidative Schaden am D1-Protein und damit der Ausfall photochemisch aktiver Reaktionszentren höher sein wird als im Wildtyp, weil ihnen Tocopherole fehlen.

Bei Starklichtexposition kam es in Wildtyp und *vte1*-Mutante gleichermaßen zu einer Anreicherung von Zeaxanthin, wobei jedoch keine Unterschiede in der Menge an Zeaxanthin zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt wurden. Da in der *vte1*-Mutante Zeaxanthin bereits vor der Starklichtbehandlung gebildet wird, könnte bei Starklichtexposition in diesen Pflanzen keine weitere Anreicherung von Zeaxanthin als im Wildtyp erforderlich sein. Weil Zeaxanthin mit  $^1\text{O}_2$  reagiert, ohne verbraucht zu werden (Triantaphylides & Havaux 2009), sind kaum Änderungen im Gehalt zu erwarten. Deshalb lässt sich auch nicht bestimmen, wieviel Zeaxanthin tatsächlich bei der Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  eingesetzt wird. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass Zeaxanthin auch durch seine Beteiligung am nichtphotochemischen *Quenching* (NPQ) die Bildung von  $^1\text{O}_2$  begrenzen kann.

Plastochinon-9 kann in seiner reduzierten (Plastohydrochinon ( $\text{PQH}_2$ )) und oxidierten Form (Plastochinon-9 (PQ-9)) zum  $^1\text{O}_2$ -*Quenching* beitragen (Gruszka *et al.* 2008). Allerdings wird dem Plastohydrochinon insbesondere unter Starklichtbedingungen eine höhere antioxidative Wirksamkeit als dem Plastochinon-9 zugeschrieben (Kruk & Trebst 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte nur der Gehalt an PQ-9 bestimmt werden, dessen Menge bei Starklichtexposition sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante abnahm. Es sind mehrere Vorgänge denkbar, die zu einer Abnahme des PQ-9-Gehaltes geführt haben können. Erstens kann PQ-9 beim *Quenching* von  $^1\text{O}_2$  verbraucht worden sein. Diese Reaktion wurde bereits *in vitro* nachgewiesen und führt zur Bildung von Hydroxyplastochinon (PQ(OH)-9) (Gruszka *et al.* 2008). Zweitens könnte PQ-9 während einer Starklichtexposition vermehrt zu  $\text{PQH}_2$  reduziert werden, sodass im Blattgewebe eine verminderte Menge an PQ-9 detektiert wird. Wenn drittens der Verbrauch von PQ-9 bzw.  $\text{PQH}_2$  beim *Quenching* von  $^1\text{O}_2$  die Plastochinon-syntheserate übersteigt, ist ebenso eine Abnahme der PQ-9-Menge zu erwarten. Darüber hinaus kann  $\text{PQH}_2$  durch die Tocopherolzyklase (VTE1) zu Plastochromanol-8 (PC-8) umgesetzt werden (Zbierzak *et al.* 2010), wodurch eine Verminderung der PQ-9-Menge eintreten würde. Es wird angenommen, dass unter Starklichtbedingungen auch PC-8 zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  beitragen kann (Szymanska & Kruk 2010). Diese Reaktion wäre allerdings nur im Wildtyp möglich, da die *vte1*-Mutante keine funktionsfähige Tocopherolzyklase besitzt.

Vergleichende Untersuchungen zwischen der *vte1*-Mutante und *npq*-Mutanten zeigten, dass Tocopherole und Zeaxanthin zwar ähnliche antioxidative Eigenschaften besitzen, sich aber



nicht gegenseitig vollständig ersetzen können (s. 3.3.3). Zum einen wurde festgestellt, dass Pflanzen der zeaxanthindefizienten *npq1*-Mutante bereits unter Schwachlichtbedingungen höhere Tocopherolmengen als der Wildtyp aufweisen. Die Anreicherung von Tocopherolen in Blattgeweben, denen Zeaxanthin fehlt, und umgekehrt die Anreicherung von Zeaxanthin in Blättern, denen Tocopherole fehlen, ist bekannt (Havaux *et al.* 2000, 2005). Wie im Wildtyp führte eine Starklichtexposition auch in den *npq1*-Pflanzen zur Verringerung der Menge an Tocopherolen und einer Anreicherung von  $\alpha$ -TQ. Dies spricht dafür, dass *npq1*-Pflanzen bei Starklichtexposition vermehrt Tocopherole zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  einsetzen. Zum anderen zeigten *npq1*-Pflanzen bei Starklichtexposition eine im Vergleich zur *vte1*-Mutante deutlich stärkere Beeinträchtigung der Effizienz des Photosystems II. Wenn *npq1*-Pflanzen Starklicht ausgesetzt sind, scheinen Tocopherole allein zum Erhalt der Effizienz des Photosystems II nicht auszureichen. Das könnte daran liegen, dass Zeaxanthin außer an der Abwehr von  $^1\text{O}_2$  auch am nichtphotochemischen *Quenching* von Anregungsenergie beteiligt ist und somit zusätzlich die Bildung von  $^1\text{O}_2$  und das Ausmaß einer Photoinhibierung begrenzen kann (Niyogi *et al.* 1998). Eine vergleichbare Funktion beim NPQ ist hingegen für Tocopherole nicht bekannt.

Studien der *npq1xvte1*-Mutante deuten darauf hin, dass Tocopherole bei Starklicht eine dem Zeaxanthin untergeordnete Rolle spielen. Obwohl in der *npq1xvte1*-Mutante Zeaxanthin und Tocopherole fehlen, war bei einer Starklichtexposition die Effizienz des Photosystems II nicht niedriger als in der *npq1*-Mutante, aber deutlich geringer als in der *vte1*-Mutante. Dennoch ist es fraglich, ob Zeaxanthin bei Starklicht die antioxidative Wirksamkeit der Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* vollständig übernehmen und dadurch das D1-Protein vor photooxidativen Schäden schützen kann. Zum einen spricht dagegen, dass in der *vte1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sowohl bei Starklichtexposition als auch in Anwesenheit von Eosin noch eine Abnahme der D1-Proteinmenge erfolgt, obwohl in diesen Pflanzen Zeaxanthin akkumuliert. Zum anderen ist Zeaxanthin hauptsächlich in den Antennenkomplexen aktiv, wo es häufig erst unter Starklichtbedingungen gebildet wird (Jahns *et al.* 2009). Daher ist unwahrscheinlich, dass das in der *vte1*-Mutante gebildete Zeaxanthin am  $^1\text{O}_2$ -*Quenching* im Reaktionszentrum beteiligt ist.

Obwohl in der *vte1*-Mutante bei Starklicht bzw. Eosinbehandlung verstärkt PQ-9 verbraucht wurde, erfolgte eine Abnahme der D1-Proteinmenge. Daher scheint auch PQ-9 nicht dafür in Frage zu kommen, die Tocopherole in ihrer Funktion als  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* vollständig ersetzen zu können. Bereits *in vitro* wurde gezeigt, dass PQ-9 mit einer im Vergleich zu den Tocopherolen geringeren Effizienz  $^1\text{O}_2$  *quenchen* kann (Gruszka *et al.* 2008). Eine andere Studie zeigte, dass die Zugabe löslicher Plastochinonderivate zu Grünalgen, die Starklicht ausgesetzt sind und bei denen die Tocopherolbiosynthese gehemmt ist, den verstärkten Abbau des D1-Proteins nicht verhindert (Kruk *et al.* 2005). Daher ist anzunehmen, dass die Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -*Quencher* notwendig sind, um das D1-Protein vor oxidativen Schäden durch  $^1\text{O}_2$  zu schützen.

### Erholungsphase

Es konnte gezeigt werden, dass während der Erholungsphase die D1-Proteinmenge in der *vte1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich abnimmt (s. 3.2.4). Es liegt nahe zu vermuten, dass in *vte1*-Blättern noch während der Erholungsphase  $^1\text{O}_2$  vorhanden ist, der nicht beseitigt werden kann und zu Schäden am D1-Protein führt. In der Folge könnte die Schädigung am D1-Protein zu einem verstärkten Abbau des D1-Proteins geführt haben, was dem Modell nach TREBST *et al.* (2002) entspricht. Entgegen dieser Vermutung steht zum einen, dass während der Erholungsphase sowohl im Wildtyp als auch in der *vte1*-Mutante gleichermaßen die Menge an Zeaxanthin abnahm und der PQ-9-Gehalt wieder anstieg. Falls  $^1\text{O}_2$  in *vte1*-Blättern noch während der Erholungsphase eine Rolle spielt, wären ähnliche Gehalte dieser  $^1\text{O}_2$ -Quencher wie bei Starklichtexposition zu erwarten gewesen. Zum anderen ist denkbar, dass in der *vte1*-Mutante aufgrund der Wirksamkeit dieser  $^1\text{O}_2$ -Quencher und der kurzen Lebensdauer von  $^1\text{O}_2$  kaum mit einem Überschuss an  $^1\text{O}_2$  in der Erholungsphase gerechnet werden kann, der einen solchen Abbau an D1-Protein erklären könnte. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen an *npq1*-Blättern, dass diese in der Erholungsphase zwar noch eine gegenüber *vte1*-Blättern verminderte Effizienz des PSII aufweisen, aber kein verstärkter Abbau des D1-Proteins erfolgt (s. 3.3.3). Da in der *npq1*-Mutante Zeaxanthin nicht nur als  $^1\text{O}_2$ -Quencher sondern auch als Vermittler des NPQ fehlt, wäre in diesen Pflanzen eine noch höhere Belastung durch  $^1\text{O}_2$  als im Wildtyp und der *vte1*-Mutante zu erwarten gewesen. Es ist denkbar, dass Zeaxanthinmangel auch in der Erholungsphase teilweise durch verstärkte Bildung von Tocopherolen kompensiert wird oder Tocopherole, nicht aber Zeaxanthin, einen spezifischen Einfluss auf die Menge an D1-Protein in der Erholungsphase ausüben. Letzteres wird dadurch bestätigt, dass in der *npq1xvte1*-Mutante, die wie die *vte1*-Mutante keine Tocopherole aufweist, eine Abnahme der D1-Proteinmenge in der Erholungsphase nachweisbar war.

Die hier erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass Tocopherole spezifisch den Erhalt und die Wiederherstellung der Menge an D1-Protein beeinflussen. Diese Wirkung der Tocopherole kann nicht allein durch ihre Funktion als  $^1\text{O}_2$ -Quencher erklärt werden und daher auch nicht durch Zeaxanthin übernommen werden. Es ist anzunehmen, dass diese Wirksamkeit der Tocopherole nicht mit deren antioxidativen Eigenschaften zusammenhängt.

#### 4.3.2 D1-Proteinsynthese in der *vte1*-Mutante

Da in der Erholungsphase  $^1\text{O}_2$  nicht die Ursache für die Abnahme der Menge an D1-Protein in tocopheroldefizienten Pflanzen zu sein scheint, wurde untersucht, ob Tocopheroldefizienz möglicherweise die D1-Proteinsynthese beeinträchtigt. Eine Störung der Neusynthese des D1-Proteins könnte dazu führen, dass in der Erholungsphase die abgebaute Menge an D1-Protein nicht hinreichend ersetzt werden kann und sich dadurch die Reparatur des Photosystems II verzögert.

#### 4.3.2.1 Expression des *psbA*-Gens

Um herauszufinden, ob Tocopherole einen Einfluss auf die D1-Proteinsynthese haben, wurde zunächst die Expression des *psbA*-Gens untersucht, das für das D1-Protein im Photosystem II kodiert (s. 3.4). Die Befunde im Genom tocopherolproduzierender Cyanobakterien (Bakasch 2008, s. 1.3) und das Wissen über den Sigmafaktor SIG2 in Höheren Pflanzen ließen es denkbar erscheinen, dass Tocopherole die Expression des *psbA*-Gens entweder direkt beeinflussen oder indirekt über den Sigmafaktor SIG2 modulieren können.

##### *Direkte Beeinflussung der psbA-Transkriptmenge durch Tocopherole?*

Sowohl im Schwachlicht als auch unter Starklichtbedingungen konnten über die gesamte Versuchszeit keine signifikanten Unterschiede in der *psbA*-Transkriptmenge zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante festgestellt werden (s. 3.4.3). Lediglich war unter Starklichtbedingungen in beiden Pflanzentypen die Menge an *psbA*-Transkript erhöht. Dies ähnelt den Ergebnissen einer anderen Untersuchung, bei der unter ähnlichen Versuchsbedingungen wie die der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die *psbA*-mRNA-Menge infolge einer Starklichtexposition zunimmt (Kettunen *et al.* 1997). Diese Studie zeigte auch, dass sich der *psbA*-mRNA-Gehalt während einer täglichen Lichtperiode kaum verändert, was auch im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante unter Schwachlichtbedingungen beobachtet wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression des *psbA*-Gens sowohl im Schwachlicht als auch unter Starklichtbedingungen nicht davon abhängt, ob Tocopherole in den Pflanzen zu finden sind oder nicht. Es ist daher anzunehmen, dass Tocopherole die Expression des *psbA*-Gens nicht beeinflussen können.

##### *SIG2-vermittelte (indirekte) Beeinflussung der psbA-Transkriptmenge durch Tocopherole?*

Wenn Wildtyp und *vte1*-Mutante Schwachlicht- und Starklichtbedingungen ausgesetzt waren, konnte festgestellt werden, dass die Menge an *sig2*-Transkript in beiden Pflanzentypen mit fortwährender Belichtungszeit zunimmt (s. 3.4.3). Es waren allerdings keine Unterschiede in der Menge an *sig2*-Transkript zwischen Wildtyp und *vte1*-Mutante nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass nicht nur die Expression des *psbA*-Gens sondern auch die des *sig2*-Gens nicht vom Vorhandensein von Tocopherolen abhängt. Daher ist unwahrscheinlich, dass Tocopherole die Expression des *psbA*-Gens modulieren können, indem sie die Expression des *sig2*-Gens und damit möglicherweise den Sigmafaktor SIG2 beeinflussen.

Darüber hinaus ergab die Analyse einer *sig2*-Mutante von *A. thaliana*, dass der Ausfall des *sig2*-Gens mit einer im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügigen Abnahme der *psbA*-mRNA-Menge einhergeht (s. 3.4.2). Dies lässt vermuten, dass SIG2 nicht der einzige Sigmafaktor ist, der die Transkription des *psbA*-Gens vermitteln kann. So ist bekannt, dass der Promotor des *psbA*-Gens auch durch die Sigmafaktoren SIG1 und SIG3 erkannt wird (Privat *et al.* 2003). Daher scheint SIG2 bei der Regulation der Expression des *psbA*-Gens ersetzbar zu sein.

Da weder in den Transkriptmengen von Genen, die für Proteine der Tocopherolbiosynthese kodieren, noch in der Menge an Tocopherolen signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *sig2*-Mutante nachweisbar waren, ist anzunehmen, dass SIG2 keinen Einfluss auf Tocopherolbiosynthese und -gehalt hat.

Obwohl die *sig2*-Mutante niedrigere mRNA-Mengen des *psbA*- und darüber hinaus des *psbD*-Gens aufwies, war der D1- bzw. D2-Proteingehalt in diesen Pflanzen nicht beeinträchtigt. Dies könnte daran liegen, dass die D1- und D2-Proteinsynthese translational reguliert werden und nicht ausschließlich von einer Anreicherung an *psbA*- bzw. *psbD*-mRNA abhängen (Zhang *et al.* 2000, Zhang & Aro 2002). Das könnte auch erklären, warum in Wildtyp und *vte1*-Mutante die *psbA*-Transkriptmenge bei beiden Lichtbehandlungen und über die gesamte Versuchszeit annähernd konstant bleibt, obwohl sich der D1-Proteingehalt fortwährend ändert.

Schlußfolgernd scheinen Tocopherole und SIG2 unabhängig voneinander zu wirken sowie nicht ausschlaggebend für die Regulation der Expression des *psbA*-Gens zu sein. Daher liegt in der *vte1*-Mutante zumindest keine erkennbare Einschränkung der Expression des *psbA*-Gens vor, die eine Störung der Neusynthese des D1-Proteins während der Erholungsphase nach Starklichtexposition verursachen könnte.

#### 4.3.2.2 Translation des D1-Proteins

Um Hinweise darauf zu bekommen, ob in der *vte1*-Mutante die Translation des D1-Proteins beeinträchtigt ist, wurden Starklichtexperimente in Anwesenheit von Lincomycin durchgeführt (s. 3.5.1). Lincomycin hemmt die Translation des D1-Proteins, sodass keine Reparatur beschädigter Reaktionszentren des PS II durch den *turnover* des D1-Proteins erfolgen kann. Dies stellt eine ähnliche Situation dar, wie sie in der *vte1*-Mutante aufgrund der fehlenden Wirksamkeit von Tocopherolen vermutet wird.

Die Analyse ergab, dass eine Starklichtexposition in Anwesenheit von Lincomycin zu einer drastischen Verminderung der D1-Proteinmenge und Effizienz des Photosystems II in Wildtyp und *vte1*-Mutante führt. Erstaunlich hierbei war, dass in der *vte1*-Mutante nach Exposition im Starklicht noch mehr D1-Protein vorhanden ist als im Wildtyp. Es scheint, dass im Wildtyp bei Starklichtexposition die gesamte Menge an beschädigtem D1-Protein unaufhörlich abgebaut wird, während in der *vte1*-Mutante ein verzögerter D1-Proteinabbau stattfindet. Weil aber bei Starklichtexposition in der *vte1*-Mutante die Effizienz des PSII geringfügig niedriger war als im Wildtyp, könnte es sein, dass das zurückbleibende D1-Protein größtenteils beschädigt vorliegt. Wenn beschädigtes D1-Protein noch phosphoryliert ist, kann es nicht proteolytisch abgebaut werden (Rintamäki *et al.* 1996). Auch falls es sich um beschädigtes D1-Protein handelt, das bereits dephosphoryliert vorliegt, wäre denkbar, dass eine Störung des Abbauvorganges in der *vte1*-Mutante dazu führen kann, dass es im Photosystem II zurückbleibt.

Im Vergleich mit den Versuchen ohne Lincomycin fällt auf, dass während der Erholungsphase nach Starklichtexposition die zeitliche Änderung der D1-Proteinmenge in der *vte1*-Mutante der des Wildtyps und *vte1*-Blättern in Anwesenheit von Lincomycin sehr ähnlich ist (vgl. Abb. 3-16). Dies trifft teilweise auch im Schwachlicht zu, wobei jedoch mit Lincomycin behandelte *vte1*-Blätter eine andere zeitliche Änderung der D1-Proteinmenge als unbehandelte *vte1*-Blätter zeigten. Anscheinend sind die zeitlichen Veränderungen der D1-Proteinmenge in der *vte1*-Mutante eine Reaktion auf Störungen der D1-Proteinsynthese in diesen Pflanzen, die weitestgehend unabhängig von der Lichtbehandlung auftritt. Jedoch ist hierbei unklar, ob tatsächlich die Translation des D1-Proteins beeinträchtigt ist oder eher Vorgänge, die sich der Proteinsynthese anschließen bzw. ihr vorausgehen. So war in Versuchen ohne Lincomycin in der *vte1*-Mutante bereits nach insgesamt zwei Stunden im Schwachlicht (LL) mehr D1-Protein vorhanden als im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt. Wenn in der *vte1*-Mutante die Translation des D1-Proteins beeinträchtigt ist, wäre eine derartige Zunahme nicht zu erwarten gewesen. Des Weiteren war in der *vte1*-Mutante nach der einstündigen Erholungsphase nach Starklicht tendenziell ein geringfügiger Anstieg der D1-Proteinmenge zu beobachten (vgl. Abb. 3-6, A.3). Dies weist darauf hin, dass D1-Proteinsynthese stattgefunden hat. Auch in Gegenwart von Lincomycin nahm in der *vte1*-Mutante die D1-Proteinmenge zu diesem Zeitpunkt zu und dies sogar noch mit einem ähnlichen Anstieg wie im Wildtyp (vgl. Abb. 3-17). Daher scheint unwahrscheinlich, dass in der *vte1*-Mutante zu diesem Zeitpunkt außer durch Lincomycin noch eine zusätzliche Beeinträchtigung der Translation des D1-Proteins vorgelegen hat.

Inwiefern eine Hemmung des D1-Proteinabbaus vorliegt, ist unklar. Die schnelle Abnahme der D1-Proteinmenge, die in den mit Lincomycin behandelten *vte1*-Blättern nach der zweistündigen Erholungsphase auftritt, deutet eher darauf hin, dass in der *vte1*-Mutante der Abbau und die Proteolyse des D1-Proteins ähnlich effizient wie im Wildtyp erfolgen kann. Eine Verzögerung des D1-Proteinabbaus, wie sie in *vte1*-Blättern bei Starklicht unter dem Einfluss von Lincomycin auftrat, könnte statt einer Blockade auch eine Folge von Störungen einzelner Vorgänge des *turnovers* sein, die sich der D1-Proteinsynthese anschließen. Hierbei ist denkbar, dass Beeinträchtigungen *post*-translationaler Vorgänge bis hin zur Reassemblierung eine Rolle spielen. So ist anzunehmen, dass unter dem Einfluss von Lincomycin nicht nur die Translation des D1-Proteins sondern auch die weiterer Photosyntheseproteine wie des D2-Proteins gehemmt ist. Obwohl das D2-Protein eine niedrigere *turnover*-Rate als das D1-Protein besitzt, kann es von einer Starklichtexposition gleichermaßen betroffen sein (Jansen *et al.* 1999, Koivuniemi *et al.* 1995). Daher kann die Gegenwart von Lincomycin dazu führen, dass zusätzlich andere wichtige Proteine für die Zusammensetzung funktionaler Reaktionszentren fehlen. Möglicherweise sind die Reaktionen auf solche Störungen denjenigen sehr ähnlich, die bei einer Hemmung der D1-Translation auftreten können. So wurde bereits in Cyanobakterien festgestellt, dass es während einer Starklichtexposition in Anwesenheit des

Translationsinhibitors Chloramphenicol zu deutlichen Verzögerungen im D1-Proteinabbau kommt (Nishiyama *et al.* 2004).

### 4.3.3 D1-Proteinabbau in der *vte1*-Mutante

Um näher zu untersuchen, ob in der *vte1*-Mutante der D1-Proteinabbau beeinträchtigt ist, weil Tocopherole in diesen Pflanzen fehlen, und welche Vorgänge des D1-Proteinabbaus von einer Tocopheroldefizienz betroffen sein könnten, wurde die Phosphorylierung des D1-Proteins und das Auftreten von D1-Spaltprodukten analysiert.

#### 4.3.3.1 Reversible Phosphorylierung

Zunächst wurde überprüft, ob ein verzögerter D1-Proteinabbau mit der Tocopheroldefizienz zusammenhängt oder durch andere Mechanismen verursacht wird, die einen schnellen Abbau des D1-Proteins verhindern. Dafür wurde die Menge an phosphoryliertem D1-Protein bestimmt (s. 3.5.2). Es ist bekannt, dass beschädigtes, phosphoryliertes D1-Protein zunächst dephosphoryliert werden muss, damit es proteolytisch abgebaut werden kann (Rintamäki *et al.* 1996). Daher sollten vergleichende Untersuchungen zur Gesamtmenge an D1-Protein und der Menge an phosphoryliertem D1-Protein (D1-P) einen Einblick in den zeitlichen Verlauf des D1-Proteinabbaus in Wildtyp und *vte1*-Mutante ermöglichen.

Falls in der *vte1*-Mutante, wie bereits diskutiert (s. 4.3.2.2), post-translationale Vorgänge oder die Reassemblierung gestört sind, wäre eine negative Rückwirkung auf den D1-Proteinabbau und die D1-Proteinsynthese zu erwarten. Es ist denkbar, dass beschädigtes D1-Protein durch Phosphorylierung solange im Photosystem II festgehalten wird, bis die Kapazität zur Proteolyse, Neusynthese und einem Zusammenbau zum Photosystem II wieder ausreicht (Rintamäki *et al.* 1996). Dies würde zu Verzögerungen im D1-Proteinabbau führen.

Um zu klären, ob in der *vte1*-Mutante neben dem D1-Protein auch das D2-Protein von der Tocopheroldefizienz betroffen ist, wurde ebenso dessen Gesamtgehalt und Menge an D2-P analysiert. Auch das D2-Protein muß dephosphoryliert vorliegen, damit es proteolytisch abgebaut werden kann (Koivuniemi *et al.* 1995).

Im Schwachlicht konnte im Wildtyp eine stetige Zunahme der Gesamtmenge an D1-Protein sowie des D1-P-Gehaltes festgestellt werden, wie bereits in einer anderen Studie beschrieben (Booij-James *et al.* 2002). Darin wird zusätzlich gezeigt, dass schon zwei Stunden nach Beginn der Lichtperiode bis zu 60 % der dann vorhandenen Menge an D1-Protein phosphoryliert vorliegen können. Für das D2-Protein wurden ähnliche zeitabhängige Veränderungen in der Phosphorylierung beschrieben (Fristedt *et al.* 2010). In der *vte1*-Mutante nahm hingegen die D1- und D2-Proteinmenge bereits nach drei bis vier Stunden im Schwachlicht wieder ab. Dies könnte bedeuten, dass in tocopheroldefizienten Pflanzen bereits unter den Lichtbedingungen der Anzucht die Reparatur von Reaktionszentren des Photosystems II beeinträchtigt ist.

Bei Starklichtexposition war sowohl im Wildtyp als auch in der *vte 1*-Mutante eine deutliche Zunahme der Gehalte an D1-P- und D2-P nachweisbar. Auch andere Studien ergaben, dass unter Starklichtbedingungen bis zu 85% der Menge an D1-Protein phosphoryliert vorliegen können (Rintamäki *et al.* 1995, 1996). Die verstärkte Phosphorylierung schließt sowohl intaktes als auch beschädigtes D1-Protein ein und betrifft zudem das D2-Protein (Rintamäki *et al.* 1996, Fristedt *et al.* 2010). Weil aber bei Starklichtexposition keine Unterschiede in der Menge an D1-P und D2-P zwischen Wildtyp und *vte 1*-Mutante festgestellt wurden, ist anzunehmen, dass beschädigte D1- und D2-Proteine in der *vte 1*-Mutante nicht stärker durch Phosphorylierung im Photosystem II festgehalten werden als im Wildtyp.

Nach einstündiger Erholungsphase war im Wildtyp eine Abnahme der D1-P und D2-P Menge nachweisbar, die mit einer Abnahme der Gesamtmenge dieser Proteine einherging. Dies lässt vermuten, dass im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt nicht nur beschädigte D1- und D2-Proteine dephosphoryliert wurden, sondern diese auch bereits proteolytisch abgebaut sind. Das zeigt auch, dass die vorangegangene Starklichtexposition ebenso zur Schädigung des D2-Proteins geführt hat, das wie das D1-Protein abgebaut und durch Neusynthese ersetzt werden muß (Schuster *et al.* 1988).

Im Vergleich zum Wildtyp nahm in *vte 1*-Blättern nach einstündiger Erholungsphase zwar auch die Menge an D1-P und D2-P ab, wurde aber nicht von einer Abnahme der Gesamtmenge dieser Proteine begleitet. Dies könnte bedeuten, dass die beschädigten Proteine zwar bereits dephosphoryliert vorliegen, aber noch nicht proteolytisch abgebaut sind. So wäre möglich, dass in der *vte 1*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp gestörte Proteolyse vorliegt.

Starklichtversuche ohne bzw. in Gegenwart von Lincomycin deuten darauf hin, dass in *vte 1*-Blättern nach einstündiger Erholungsphase bereits Proteinsynthese stattgefunden hat (vgl. Abb. 3-6, Abb. 3-18). Daher scheinen in der *vte 1*-Mutante nach einer Stunde Erholung doch bereits D1- und D2-Proteine abgebaut und durch Neusynthese ersetzt worden zu sein, aber möglicherweise Störungen bei der Reassemblierung oder dem Einbau in die Granathylakoide rückwirkend den D1-/D2-Proteinabbau zu vermindern. So ist zu vermuten, dass die Phosphorylierung neu gebildeter D1- und D2-Proteine erst wieder nach deren Einbau in die Granathylakoide erfolgt (Baena-Gonzalez *et al.* 1999).

Wenn die Reparatur von bei Starklichtexposition beschädigten Reaktionszentren mit einer Halbwertszeit von ca. einer Stunde erfolgt (Melis 1999) und Proteinabbau und -neusynthese nicht beeinträchtigt sind, wäre nach einer zweistündigen Erholungsphase wieder eine Zunahme des D1- und D2-Proteingehaltes zu erwarten. Nach zwei Stunden Erholung von der Starklichtexposition trifft dies nur im Wildtyp zu, nicht aber in der *vte 1*-Mutante. In der *vte 1*-Mutante war die Menge an D1-P und D2-P niedriger als noch eine Stunde zuvor und ging mit einer Abnahme der Gesamtmenge dieser Proteine einher. Das weist darauf hin, dass eine Proteolyse der D1-/D2-Proteine stattgefunden hat. Erst am Ende der Erholungsphase war in

der *vte1*-Mutante wieder ein Anstieg der Menge an D1- und D2-Protein bzw. entsprechend D1-P und D2-P erkennbar. Hierbei lag die Gesamtmenge an D1- und D2-Protein aber noch deutlich unter dem Niveau, das in *vte1*-Blättern unmittelbar nach der Starklichtexposition detektiert wurde.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in *vte1*-Blättern ein gegenüber dem Wildtyp verzögerter Abbau sowohl des D1-Proteins als auch des D2-Proteins stattfindet. In *vte1*-Blättern scheint der proteolytische Proteinabbau erst eine Stunde später als im Wildtyp zu erfolgen. Weil dies nicht darauf zurückgeführt werden kann, dass in *vte1*-Blättern die D1-/D2-Proteine in der Erholungsphase stärker oder über eine längere Zeit phosphoryliert werden als im Wildtyp, ist anzunehmen, dass in Abwesenheit der Tocopherole der D1- und D2-Proteinabbau beeinträchtigt ist. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Tocopheroldefizienz zu Störungen *post*-translationaler Vorgänge bis hin zum Einbau des D1-Proteins in die Granathylakoide führen kann.

#### 4.3.3.2 Proteolyse und D1-Spaltprodukte

Unabhängig von den Lichtbedingungen waren zu den verschiedensten Versuchszeitpunkten sowohl in der *vte1*-Mutante als auch im Wildtyp D1-Proteinfragmente von ca. 22-24 kDa nachweisbar, deren Gehalt sich meist linear mit der Gesamtmenge an D1-Protein änderte. Allerdings bleibt unklar, ob diese D1-Proteinfragmente überhaupt durch Photoinhibierung oder Oxidation durch  $^1\text{O}_2$  entstanden. So führte die Behandlung mit Eosin, das bei Belichtung zur Bildung von  $^1\text{O}_2$  beiträgt, entgegen der Erwartung zu keiner Anreicherung von D1-Spaltprodukten, die infolge einer Oxidation durch  $^1\text{O}_2$  entstehen können (Okada *et al.* 1996). Eine Erklärung hierfür könnte die Diskrepanz zwischen *in vitro* detektierten D1-Spaltprodukten und denen, die tatsächlich *in vivo* auftreten, sein. Die Entstehung von D1-Proteinfragmenten, die eine molekulare Masse von 22-24 kDa aufweisen und C-terminalen oder N-terminalen Ursprungs sind, kann auf die Wirksamkeit von nicht nur  $^1\text{O}_2$ , sondern auch auf die von  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie zugleich auf die Wirkung von Proteasen hindeuten (Abb. 4-2). Die Entstehung der hier in beiden Pflanzentypen (WT, *vte1*) detektierten D1-Spaltfragmente kann demzufolge viele Ursachen haben, scheint aber nicht durch Tocopherole beeinflusst zu werden.

Wie reaktive Sauerstoffspezies auf das D1-Protein einwirken, wurde hauptsächlich *in vitro* und in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren untersucht (Okada *et al.* 1996, Lupinkova & Komenda 2004). Dennoch ist denkbar, dass eine oxidative Schädigung des D1-Proteins durch ROS auch *in vivo* zur Spaltung von Peptidbindungen des D1-Proteins führen kann, aber dies erst eine Rolle spielt, wenn die Menge an ROS die antioxidative Abwehr und die enzymatische Aktivität der Proteasen übersteigt. Indem reaktive Sauerstoffspezies einzelne Aminosäuren des D1-Proteins oxidieren und dadurch eine Konformationsänderung des D1-Proteins auslösen, könnten sie aber dazu beitragen, dass das D1-Protein für die Proteasen zugänglicher wird.



<u>Deg-Proteasen</u>	Deg1 (C-terminal) 24 kDa, 16 kDa, 5,2 kDa
Huesgen <i>et al.</i> 2009	Deg2 (N-terminal) 23 kDa; (C-terminal) 10 kDa
Sun <i>et al.</i> 2010	Deg7 (C-terminal) 20 kDa
Haußühl <i>et al.</i> 2001	Deg5/Deg8 (N-terminal) 16 kDa; (C-terminal) 18 kDa
<u>FtsH-Proteasen</u>	FtsH1, FtsH5, FtsH2, FtsH8
Lindahl <i>et al.</i> 2000	proteolytischer Abbau eines N-terminalen 23 kDa D1-Fragmentes
<u>ROS</u>	$^1\text{O}_2$ (N-terminal) 22 kDa, 24 kDa; (C-terminal) 16 kDa, 7,9 kDa
Okada <i>et al.</i> 1996	$\text{H}_2\text{O}_2$ (N-terminal) 24 kDa
Lupinkova & Komenda 2004	

**Abb. 4-2:** D1-Proteinfragmente, die aufgrund der Wirksamkeit von Proteasen oder der Oxidation durch ROS entstehen können. ROS – reaktive Sauerstoffspezies

Es ist bekannt, dass an der Proteolyse des D1-Proteins hauptsächlich Deg- und FtsH-Proteasen beteiligt sind (Kato & Sakamoto 2009, Huesgen *et al.* 2009). So wurde an isolierten Thylakoiden aus Erbsen gezeigt, dass die Hemmung von FtsH-Proteasen zur Anreicherung eines 23 kDa N-terminalen D1-Proteinfragmentes führt (Lindahl *et al.* 2000). Zwar traten auch in der *vte1*-Mutante N-terminale D1-Spaltprodukte auf, aber es ist dennoch unwahrscheinlich, dass hier eine Hemmung der Proteolyse vorliegt. Zum einen traten auch im Wildtyp D1-Spaltprodukte auf und zum anderen war in der *vte1*-Mutante weder während der Lichtbehandlungen noch in Gegenwart von Lincomycin eine gegenüber dem Wildtyp stärkere oder über längere Zeit anhaltende Anreicherung von D1-Spaltprodukten nachweisbar.

#### 4.3.4 Membranbestandteil Tocopherol und der turnover des D1-Proteins

Es scheint also, dass Tocopherole sowohl den Abbau des D1- und D2-Proteins als auch post-translationale Prozesse bis hin zum Einbau in die Granathylakoide beeinflussen können. Daher besteht die Frage, auf welche Weise die Tocopherole Einfluss auf mehrere Vorgänge des D1-/D2-turnovers haben können. Da der D1-/D2-turnover unmittelbar an und innerhalb der Thylakoidmembran stattfindet, ist denkbar, dass deren Membranfluidität den effizienten Ablauf dieser Vorgänge entscheidend mitbestimmen kann. So ist bekannt, dass Tocopherole in der Thylakoidmembran vorkommen und die Membranfluidität beeinflussen können (Block *et al.* 2007, s. 1.4.3). Es wäre möglich, dass die Wirkung der Tocopherole auf die Vorgänge des D1-/D2-turnovers mit ihrem Einfluss auf die Fluidität der Thylakoidmembran zusammenhängt.

Anhand von Messungen an *in vitro* hergestellten Membranen, deren Lipidzusammensetzung ähnlich der von plastidären Membranen ist, wurde postuliert, dass, wenn  $\alpha$ -Tocopherol in der Membran fehlt, der innere, hydrophobe Membranbereich zunehmend flüid wird und die Membranoberfläche für Moleküle leichter zugänglich ist (Hincha 2008). Falls somit auch die Membranen der *vte1*-Mutante eine erhöhte Fluidität aufweisen, wäre denkbar, dass diese Pflanzen dem entgegenwirken, indem sie ihre Fettsäurezusammensetzung verändern.

Außerdem wurde vermutet, dass Tocopherole die Entsättigung von 18:2 zu 18:3 Fettsäuren im ER fördern (Maeda *et al.* 2008). Demzufolge könnte in der *vte1*-Mutante ein verminderter 18:3 Fettsäuregehalt vorliegen. Beides würde zu einer veränderten Membranfluidität führen, die den Ablauf des D1-/D2-*turnovers* beeinträchtigen könnte. Um zu klären, ob in der *vte1*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Membranfluidität vorliegt, wurde die Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass bereits vor Versuchsbeginn in *vte1*-Blättern die Menge an 16:3 und 18:3 Fettsäuren um 20 % geringer ist als im Wildtyp (s. 3.5.4). Während 16:3 Fettsäuren nur in den Membranen der Chloroplasten auftreten, sind 18:3 Fettsäuren auch in nichtplastidären Membranen zu finden (Dörmann 2005). Da die Thylakoidmembran hauptsächlich 16:3 und 18:3 Fettsäuren enthält, ist anzunehmen, dass in den Thylakoiden der *vte1*-Mutante der Anteil dieser ungesättigten Fettsäuren geringer ist und der Anteil gesättigter Fettsäuren überwiegt. Tatsächlich zeigt das Verhältnis von 16:3 zu 16:0 Fettsäuren, dass die plastidären Membranen der *vte1*-Mutante gesättigter sind als die des Wildtyps (vgl. Abb. 3-23). Daher ist anzunehmen, dass die Thylakoidmembran der *vte1*-Mutante eine gegenüber den Wildtypthylakoiden verminderte Membranfluidität aufweist.

Unabhängig von der Lichtintensität, der die *vte1*-Blätter ausgesetzt waren, sank nach zwei Stunden Belichtung die Menge an 16:3 und 18:3 Fettsäuren auf 70 % der jeweiligen Menge vor Versuchsbeginn, wohingegen im Wildtyp bei Starklichtexposition eine deutlich stärkere Abnahme beider Fettsäurespezies nachweisbar war (vgl. Abb. 3-22). Da auch während der Erholungsphase nur in *vte1*-Blättern der 18:3-Fettsäuregehalt wieder anstieg, scheinen diese Pflanzen während der täglichen Belichtung ein bestimmtes Niveau dreifach ungesättigter Fettsäuren, insbesondere 18:3 Fettsäuren, in der Membran aufrecht zu erhalten. Dies könnte erfolgen, indem verstärkt Vorstufen dieser Fettsäuren durch Fettsäuredesaturasen umgesetzt werden. Das kann erklären, warum in *vte1*-Blättern bereits nach zwei Stunden im Schwachlicht der Gehalt an 16:0, 18:0, 18:1 und 18:2 Fettsäuren deutlich abnimmt, während dies im Wildtyp nur nach einer Starklichtexposition auftritt (vgl. Abb. 3-21). Es ist denkbar, dass die *vte1*-Mutante aufgrund ihrer verminderten Membranfluidität eine bestimmte Menge dreifach ungesättigter Fettsäuren erhalten muss, um den Ablauf membrangebundener Prozesse wie dem D1-/D2-*turnover* in diesen Pflanzen zu gewährleisten. So wurde bereits an *fad3fad7fad8*-Mutanten von *A. thaliana* gezeigt, dass ein Fehlen von 18:3 und 16:3 Fettsäuren in diesen Pflanzen während einer Erholungsphase nach einer Starklichtexposition mit einer verzögerten Wiederherstellung der Effizienz des PSII und Wiederaufnahme der O<sub>2</sub>-Produktion einhergeht (Vijayan & Browse 2002). Daher wäre möglich, dass in der *vte1*-Mutante der im Vergleich zum Wildtyp veränderte D1-/D2-*turnover* auftritt, weil diese Pflanzen geringere Mengen dreifach ungesättigter Fettsäuren in ihren Membranen besitzen, die dadurch eine verminderte Fluidität aufweisen.

Es ist für mehrere Vorgänge des D1-/D2-*turnovers* denkbar, dass sie durch eine verminderte Membranfluidität beeinträchtigt werden. Zum einen wäre möglich, dass durch eine geringe Membranfluidität die laterale Diffusion von Proteinen in der Membran eingeschränkt ist. Als eine Folge davon könnte sowohl die Wanderung von PSII-Monomeren zwischen den Grana- und Stromathylakoiden als auch die der Proteasen, welche am proteolytischen Abbau des D1- und D2-Proteins beteiligt sind, verlangsamt sein. Beides könnte den D1-/D2-Proteinabbau und den Einbau neu gebildeter D1-/D2-Reaktionszentren in die Granathylakoide verzögern. Zum anderen erscheint möglich, dass eine geringe Membranfluidität die C-terminale Prozessierung der Vorstufe des D1-Proteins (pD1) beeinträchtigen kann. So zeigten Untersuchungen der *Fad6/DesA::Km*-Mutante von *Synechocystis*, die keine 18:2 und 18:3 Fettsäuren bilden kann, dass in der Mutante bei Starklichtexposition auch noch dann pD1 akkumuliert, wenn im Wildtyp bereits eine Prozessierung stattgefunden hat (Kanervo *et al.* 1995, 1997). Es wurde vermutet, dass der geringe Anteil ungesättigter C18-Fettsäuren in der Thylakoidmembran dieser Mutante zu einer Abnahme der Membranfluidität und Versteifung der Membran führt, wodurch sowohl die Diffusion der Protease, welche an der Prozessierung beteiligt ist, als auch deren Zugang zum C-Terminus des pD1 behindert werden. Des Weiteren könnte eine geringe Membranfluidität den Einbau von Thylakoidproteinen in die Membran beeinflussen. So wurde in einer Studie der *fad6*-Mutante von *A. thaliana*, welche im Blattgewebe eine bis zu 50 % geringere Menge an 16:3 und 18:3 Fettsäuren als der Wildtyp aufweist, festgestellt, dass die Einbaurate des PsbQ-Proteins, das ein Bestandteil des wasserspaltenden Apparates ist und über einen vom pH-Gradienten abhängigen Vorgang in die Thylakoidmembran integriert wird, in diesen Pflanzen reduziert ist (Ma & Browse 2006). Diese Studie zeigte auch, dass die Einbaurate des PsbO-Proteins, welches ähnlich wie das D1-Protein über einen cpSecY-Transmembrankanale in die Thylakoidmembran eingebaut wird (Zhang *et al.* 2002), nicht beeinträchtigt ist. Daher wäre zwar unwahrscheinlich, dass eine verminderte Membranfluidität den co-translationalen Einbau des D1-Proteins begrenzt, aber möglich, dass die Verfügbarkeit von Proteinen, die über einen  $\Delta$ pH-abhängigen Vorgang importiert werden, begrenzt ist. Dadurch könnte die Zusammensetzung und Reaktivierung des betreffenden Photosystems II mit neu gebildetem D1- und D2-Protein verzögert werden. Dies würde auch die Annahme stützen, dass in der *vte 1*-Mutante nicht die Synthese des D1-Proteins beeinträchtigt ist, sondern Vorgänge des *turnovers*, die der D1-Proteinsynthese folgen.

Eine andere Möglichkeit ist, dass geringe 16:3 und 18:3 Fettsäuremengen mit Veränderungen der Grana- und Stromathylakoidstruktur einhergehen könnten, die sich auf den Ablauf des D1-/D2-*turnovers* auswirken. So zeigte eine Studie der *fad6*-Mutante von *A. thaliana*, dass in Chloroplasten dieser Mutante weniger Grana- und Stromathylakoidmembranen vorhanden sind als in denen des Wildtyps (Tsvetkova *et al.* 1994). In TEM-Aufnahmen von Chloroplasten der *vte 1*-Mutante konnte aber nichts Vergleichbares festgestellt werden (s. 3.5.3).

Einzig bei Starklichtexposition waren in der *vte1*-Mutante Veränderungen in der Struktur der Granastapel zu erkennen, deren Entstehungsursache jedoch unklar ist. Einige Studien zeigten, dass sich der Abstand einzelner Granathylakoidmembranen zueinander vergrößern kann, wenn eine Phosphorylierung der LHCII-Proteine erfolgt oder Starklichtbedingungen vorliegen (Khatoon *et al.* 2009, Rozak *et al.* 2002). Da im Wildtyp und in der *vte1*-Mutante bei Starklichtexposition keine phosphorylierten LHCII-Proteine nachweisbar waren (s. 3.5.2) und bekannt ist, dass die LHCII-Kinase unter Starklichtbedingungen gehemmt wird (Rintamäki *et al.* 1997), ist unwahrscheinlich, dass dies als Ursache für die Änderung der Granastapelstruktur in der *vte1*-Mutante in Frage kommt.

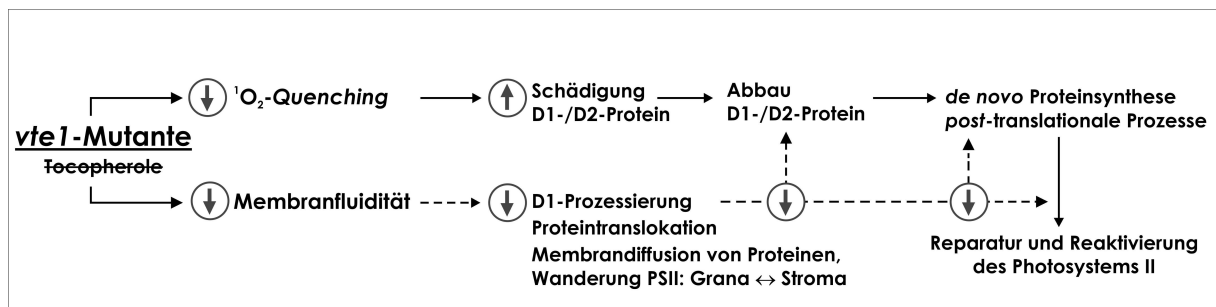
Ob die verminderten 16:3 und 18:3 Fettsäuremengen in der *vte1*-Mutante auf eine Störung des Lipidstoffwechsels im ER (Maeda *et al.* 2008) zurückgehen, ist unklar. Zum einen erfolgt die Bildung der 16:3 Fettsäuren ausschließlich im Chloroplasten und hängt nicht davon ab, ob Vorstufen zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) aus dem ER in die Chloroplasten importiert werden können (Benning 2009). Zum anderen nahm in der *vte1*-Mutante nach vierstündiger Belichtung der 18:3 Fettsäuregehalt wieder zu, was gegen eine mögliche Störung der Desaturasen spricht, die eine Entsättigung von 18:2 zu 18:3 Fettsäuren katalysieren (ER: FAD3, Chloroplast: FAD7, FAD8). Darüber hinaus scheint in der *vte1*-Mutante keine gegenüber dem Wildtyp verstärkte Lipidperoxidation stattzufinden. Im Gegenteil verringerte sich die Menge an 16:3 und 18:3 Fettsäuren nach Starklichtexposition im Wildtyp stärker als in der *vte1*-Mutante. Weil der *vte1*-Mutante Tocopherole als *Quencher* von Lipidperoxyradikalen fehlen, wäre aber insbesondere bei Starklicht eine stärkere Oxidation von 16:3 und 18:3 Fettsäuren als im Wildtyp zu erwarten gewesen. Auch in anderen Studien konnte weder in Keimlingen noch in älteren Pflanzen der *vte1*-Mutante, welche dauerhaften Starklichtbedingungen ausgesetzt waren, eine signifikant höhere Lipidperoxidation als im Wildtyp nachgewiesen werden (Sattler *et al.* 2004, Havaux *et al.* 2005). Es wäre möglich, dass in der *vte1*-Mutante verstärkt andere Antioxidantien bei der Abwehr von Lipidperoxyradikalen mitwirken oder die verminderte Membranfluidität dazu führt, dass sich die Durchlässigkeit für Sauerstoff verringert und damit ein besserer Schutz vor Lipidperoxidation besteht (Havaux 1998).

Zusammenfassend weisen die erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass Tocopheroldefizienz mit einer Verminderung der Membranfluidität einhergehen könnte, die zu einem verzögerten Ablauf, nicht aber zum vollständigen Ausfall des membrangebundenen D1-/D2-*turnovers* führt. Dies scheint sich bereits unter Schwachlichtbedingungen auf den D1-Proteingehalt auszuwirken, spielt aber insbesondere bei Starklicht und während einer nachfolgenden Erholungsphase eine geschwindigkeitsbestimmende Rolle bei der Reparatur des Photosystems II. Daher ist anzunehmen, dass tatsächlich die Wirkung der Tocopherole auf die Fluidität einer Membran der Grund dafür ist, dass in der *vte1*-Mutante mehrere Vorgänge des D1-/D2-*turnovers* beeinträchtigt sind.

#### 4.4 Modell zur Rolle der Tocopherole bei der Reparatur des Photosystems II

Schlußfolgernd aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird angenommen, dass die duale Funktion der Tocopherole als  $^1\text{O}_2$ -Quencher und als integrativer Membranbestandteil die Effizienz des D1-/D2-turnovers mitbestimmt und damit die Reparatur des Photosystems II beeinflusst. Diese duale Wirkung der Tocopherole scheint bereits während der täglichen Lichtperiode wichtig zu sein und geschwindigkeitsbestimmend bei der Reparatur des PSII zu werden, wenn Pflanzen für kurze Zeit unerwartet hohen Lichtintensitäten ausgesetzt sind.

Fehlen Tocopherole in den Pflanzen, kommt es zu einer verminderten Fluidität der Thylakoidmembran, die den schnellen Ablauf einzelner Vorgänge des D1-/D2-turnovers beeinträchtigen kann (Abb. 4-3). So könnte sich eine verminderte Membranfluidität auf den Proteinabbau sowie auch auf post-translationale Prozesse auswirken und dadurch die Reparatur des Photosystems II verzögern. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt hauptsächlich für den veränderten D1-/D2-turnover in der *vte1*-Mutante unter Schwachlichtbedingungen verantwortlich ist.



**Abb. 4-3:** Modellvorstellung zu den Auswirkungen der Tocopheroldefizienz in der *vte1*-Mutante. Es sind die einzelnen Vorgänge markiert, die infolge einer Tocopheroldefizienz vermindert (Pfeil nach unten) bzw. gefördert werden (Pfeil nach oben).

Zum anderen ist denkbar, dass in der *vte1*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Menge an  $^1\text{O}_2$  auftritt, weil Tocopherole in diesen Pflanzen fehlen und ihre Wirksamkeit als  $^1\text{O}_2$ -Quencher durch andere Antioxidantien, die auch  $^1\text{O}_2$  inaktivieren können, nicht kompensiert werden kann. Dadurch wäre in diesen Pflanzen insbesondere unter Starklichtbedingungen eine höhere Menge an beschädigten D1- und D2-Proteinen als im Wildtyp zu erwarten (Abb. 4-3). Weil bei Starklicht die Rate der Schädigung von Reaktionszentren ohnehin die einer Neusynthese übersteigen kann (Aro *et al.* 1993) und der Ablauf des D1-/D2-turnovers in der *vte1*-Mutante aufgrund einer verminderten Membranfluidität zusätzlich verzögert sein kann, ist anzunehmen, dass unter Starklichtbedingungen die Reparatur des Photosystems II in diesen Pflanzen noch stärker beeinträchtigt ist als bei Schwachlicht.

## 4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bieten eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen zum Einfluss der Tocopherole auf die Zusammensetzung und die Eigenschaften plastidärer Membranen im Hinblick auf die Funktion des Photosystems II.

Zunächst müsste bestätigt werden, dass der veränderte D1-/D2-*turnover* in der *vte1*-Mutante mit dem geringen Anteil ungesättigter Fettsäuren in diesen Pflanzen und einer verminderten Membranfluidität zusammenhängt. Darüber könnten Starklicht- und Kontrollexperimente Aufschluss geben, die an *fad*-Mutanten von *A. thaliana*, die keine oder nur geringe Mengen dreifach ungesättigter 16:3 und 18:3 Fettsäuren bilden können, durchgeführt werden. Hierfür wären beispielsweise *fad3*-Mutanten, die keine 18:3 Fettsäuren aus dem ER aufweisen, und *fad7fad8*-Doppelmutanten, welche im Chloroplasten keine 16:3 und 18:3 Fettsäuren bilden können, geeignete Untersuchungsmodelle. Wenn ein geringer Anteil dreifach ungesättigter Fettsäuren in der Membran die Reparatur des Photosystems II beeinträchtigt, wären die Veränderungen in den Mengen an D1- und D2-Protein ähnlich wie in der *vte1*-Mutante.

In diesen Zusammenhang wäre es weiterhin wichtig, die Fettsäurezusammensetzung in den *fad*-Mutanten im Vergleich zur *vte1*-Mutante zu analysieren. Um zu überprüfen, welche Wirkung Tocopherole und Änderungen in der Menge an ungesättigten Fettsäuren auf die Membranfluidität haben, wäre ein Verfahren zur Bestimmung der Membranfluidität hilfreich. Hierfür würde sich beispielsweise eine FRAP-Analyse anbieten, bei der mithilfe von Fluoreszenzmessungen die Diffusionsgeschwindigkeit von Proteinen oder Lipiden in einer Membran bestimmt werden kann. Um tiefergehend zu analysieren, wie in der *vte1*-Mutante sowie in *fad*-Mutanten der Proteinabbau, die Translation und C-terminale Prozessierung des D1-Proteins beeinflusst ist, könnten *in vitro* Translationsansätze durchgeführt werden.

Des Weiteren wäre interessant zu untersuchen, inwiefern andere Proteine des Photosystems II von einer Tocopheroldefizienz betroffen sein können. Diese Analyse sollte auch die Proteine des wasserspaltenden Apparates sowie die CP43- und CP47-Proteine einschließen, um den Einfluss der Tocopherole auf die Reassemblierung des Photosystems II zu verdeutlichen.

Um den Befund zu stützen, dass in der *vte1*-Mutante bei beiden Lichtbehandlungen und zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten eine höhere Menge an  $^1\text{O}_2$  gebildet wird als im Wildtyp, sollten für künftige Untersuchungen Verfahren zur Quantifizierung der  $^1\text{O}_2$ -Menge im Blattgewebe etabliert werden.

## 5. Zusammenfassung / Summary

Tocopherole kommen in den Plastiden der Pflanzen vor, wo sie synthetisiert werden und ihnen eine antioxidative Funktion zugesprochen wird. Ob Tocopherole noch andere Funktionen in Pflanzen haben, ist unbekannt. Untersuchungen zum Tocopherolgehalt von membranhaltigen Fraktionen ergaben keine Hinweise auf ein extraplastidäres Vorkommen der Tocopherole. In den Chloroplasten von Grünalgen scheinen Tocopherole an der Entgiftung von Singulett-Sauerstoff im Photosystem II beteiligt zu sein. Dies scheint das D1-Protein im Photosystem II vor Schäden bei Lichtstress zu schützen. Um zu klären, ob Tocopherole auch in Höheren Pflanzen eine Entgiftungsfunktion gegenüber  $^1\text{O}_2$  haben, welche Folgen sich daraus für das D1-Protein im Photosystem II ergeben und ob sie noch weitere Funktionen besitzen, wurde die *vte1*-Mutante von *Arabidopsis thaliana*, die keine Tocopherole bildet, charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine kurze Starklichtexposition zu einer stärkeren Abnahme der Effizienz des Photosystems II und Menge an D1-Protein führt, wenn Tocopherole in den Pflanzen fehlen. Versuche mit Eosin zeigten, dass in Gegenwart von  $^1\text{O}_2$  nur in der *vte1*-Mutante eine Abnahme der D1-Proteinmenge erfolgt. Da diese schädigenden Effekte in der *vte1*-Mutante durch die Wirksamkeit anderer  $^1\text{O}_2$ -Quencher nicht aufgehoben werden konnten, scheinen Tocopherole zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  wichtig zu sein und in Höheren Pflanzen bei Starklicht eine Schutzfunktion für das D1-Protein zu haben.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Tocopherole einen Einfluss auf die Regeneration der D1-Proteinmenge während einer Erholungsphase nach Starklichtexposition haben. So war in der *vte1*-Mutante während der Erholungsphase eine Abnahme der D1-Proteinmenge feststellbar, die mit einer im Vergleich zum Wildtyp verzögerten Erholung des Photosystems II einherging. Weil ein ähnlicher Effekt nur noch in der *npq1xvte1*-Mutante, nicht aber in der *npq1*-Mutante, auftrat, scheint ein tocopherolspezifischer Effekt auf das D1-Protein vorzuliegen, der nicht durch Zeaxanthin kompensiert werden kann.

Starklichtversuche in Gegenwart von Lincomycin zeigten auf, dass Tocopherole sowohl für den Abbau als auch für die Neusynthese des D1-Proteins wichtig sind. Die Beeinträchtigung der Neusynthese bei Tocopheroldefizienz war nicht auf eine verminderte Expression des *psbA*-Gens zurückzuführen.

Durch Analyse der Fettsäurezusammensetzung wurde festgestellt, dass in den Membranen der *vte1*-Mutante der Anteil dreifach ungesättigter 16:3 und 18:3 Fettsäuren verringert ist. Es ist anzunehmen, dass in der *vte1*-Mutante die Membranfluidität geringer ist als im Wildtyp.

Schlußfolgernd zeigt diese Arbeit zum einen, dass Tocopherole zum Schutz des D1-Proteins gegenüber einer Lichtschädigung dienen, indem sie zur Beseitigung von  $^1\text{O}_2$  beitragen. Zum anderen scheinen Tocopherole die Membranfluidität zu beeinflussen, wovon der effiziente Ablauf des D1-/D2-Protein-*turnovers* und damit die Reparatur des Photosystems II abhängt.

## Summary

Tocopherols are localised and synthesized in the plastids of plants where they are supposed to act as antioxidants. It is not known whether tocopherols have additional functions in plants. By analysis of the tocopherol content of subcellular membrane fractions no indications for an extraplastidial localization were obtained. In chloroplasts of green algae tocopherols were specifically shown to act as quenchers of singlet oxygen thereby protecting the D1 protein and maintaining photosystem II function under high light intensity. To investigate whether tocopherols also act as  $^1\text{O}_2$  quenchers in higher plants, the tocopherol deficient *vte1* mutant of *Arabidopsis thaliana* was investigated with respect to photosystem II function and turnover at high light intensity.

A decrease in photosystem II efficiency and D1 protein content caused by exposure to high light became more intense in the absence of tocopherols. In addition, singlet oxygen generated by the photosynthesizer Eosin accelerated D1 protein degradation in the *vte1* mutant. The effects were not abolished in the *vte1* mutant despite of the action of other antioxidants with singlet oxygen quenching activity. Therefore tocopherols seem to play an important role as  $^1\text{O}_2$  quenchers in higher plants under high light intensity thereby protecting the D1 protein.

Furthermore tocopherols affect the regeneration of the D1 protein during recovery from photoinhibition. While recovery the *vte1* mutant exhibited a significant decrease in D1 protein content concomitant with a delay in the restoration of photosystem II efficiency. Similar effects were observed in the *npq1xvte1* mutant lacking both zeaxanthin and tocopherols but were absent in the *npq1* mutant lacking zeaxanthin only. Hence there seems to exist a specific effect of tocopherols on the D1 protein that cannot be compensated by zeaxanthin. Exposure to high light in the presence of the protein synthesis inhibitor lincomycin indicated that tocopherols possess a crucial role for both the degradation and the resynthesis of the D1 protein. Inefficient resynthesis of D1 in the *vte1* mutant was not caused by a disturbance in expression of the *psbA* gene.

By analysis of leaf fatty acid composition a lower portion of polyunsaturated 16:3 and 18:3 fatty acids was detected in the membranes of *vte1* mutant. Therefore, in the *vte1* mutant thylakoids are likely to have a reduced membrane fluidity.

In conclusion, tocopherols fulfill at least two different functions related to the maintenance of D1 protein and photosystem II function. Firstly, by quenching  $^1\text{O}_2$  they protect the D1 protein from photooxidative damage and in addition they promote D1-/D2-turnover by enhancing membrane fluidity.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abbasi A. R.**, Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U., Voll L. M. (2007). Specific roles for  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143: 1720-1738.
- Alban C.**, Joyard J., Douce R. (1988). Preparation and characterization of envelope membranes from nongreen plastids. *Plant Physiology* 88: 709-717.
- Altschul S. F.**, Thomas L., Madden A. A., Schaffer J. Z., Zheng Z., Webb M., David J. L. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Anderson J. M.**, Aro E. M. (1994). Grana stacking and protection of photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: An hypothesis. *Photosynthesis Research* 41: 315-326.
- Apel K.**, Heribert H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Aro E. M.**, Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N., Rintamäki E. (2004). Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *Journal of Experimental Botany* 56: 347-356.
- Aro E. M.**, Virgin I., Andersson B. (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134.
- Atkinson J.**, Eppand R. F., Eppand R. M. (2008). Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. *Free Radical Biology & Medicine* 44: 739-764.
- Austin J. R.**, Frost E., Vidi P. A., Kessler F., Staehelin L. A. (2006). Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Backasch N.** (2008). Untersuchungen zur Biosynthese und Funktion von Tocopherol und Plastochinon im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Baena-Gonzalez E.**, Barbato R., Aro E. M. (1999). Role of phosphorylation in the repair cycle and oligomeric structure of photosystem II. *Planta* 208: 196-204.
- Baier J.**, Maier M., Engl R., Landthaler M., Bäuml W. (2005). Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *The Journal of Physical Chemistry B* 109: 3041-3046.
- Baker N. R.** (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *The Annual Review of Plant Biology* 59: 89-113.
- Benning C.** (2009). Mechanism of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25: 71-91.
- Bergo E.**, Pursiheimo S., Paakkarinen V., Giacometti G. M., Donella-Deana A., Andreucci F., Barbato R., Aro E. M. (2002). Rapid and highly specific monitoring of reversible thylakoid protein phosphorylation by polyclonal antibody to phosphothreonine-containing proteins. *Journal of Plant Physiology* 159: 371-377.

- Block M. A.**, Douce R., Joyard J., Rolland N. (2007). Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynthesis Research* 92: 225-244.
- Booij-James I. S.**, Swegle W. M., Edelmann M., Mattoo A. K. (2002). Phosphorylation of the D1 photosystem II reaction center protein is controlled by an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiology* 130: 2069-2075.
- Bonaventure G.**, Salas J. J., Pollard M. R., Ohlrogge J. B. (2003). Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *The Plant Cell* 15: 1020-1033.
- Bomhoff G. H.**, Spencer M. (1977). Optimum pH and ionic-strength for the assay of cytochrome-c oxidase from pea cotyledon mitochondria. *Canadian Journal of Biochemistry* 55: 1114-1117.
- Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Browse J.**, Roughan P. G., Slack C. R. (1981). Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. *Biochemical Journal* 196: 347-354.
- Browse J.**, Somerville C. R. (1994). Glycerolipids. In: *Arabidopsis* (Editoren: Meyerowitz E. M., Somerville C. R.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA: 881-936.
- Cheng Z.**, Sattler S., Maeda H., Sakuragi Y., Bryant D. A., DellaPenna D. (2003). Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes. *The Plant Cell* 15: 2343-2356.
- Chow W. S.**, Kim E. H., Horton P., Anderson J. M. (2005). Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochemical and Photobiological Science* 4: 1081-1090.
- Collakova E.**, DellaPenna D. (2003a). Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 632-642.
- Collakova E.**, DellaPenna D. (2003b). The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology* 133: 930-940.
- DellaPenna D.**, Last R. L. (2006). Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 126: 356-368.
- DellaPenna D.**, Pogson BJ (2006). Vitamin E Synthesis in Plants: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 711-738.
- De Las Rivas J.**, Andersson B., Barber J. (1992). Two sites of primary degradation of the D1-protein induced by acceptor or donor side photo-inhibition in photosystem II core complexes. *FEBS Letters* 301: 246-252.
- Dörmann P.** (2005). Membrane lipids. In: *Plant Lipids – Biology, Utilisation and Manipulation* (Editor: Murphy D. J.). CRC Press, Boca Raton, USA: 123-161.
- Douce R.**, Christensen E. L., Bonner W. D. (1972). Preparation of intact plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 275: 148-160.
- Douce R.**, Holtz R. B., Benson A. A. (1973). Isolation and properties of the envelope of spinach chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry* 248: 7215-7222.

- Edelmann M.**, Mattoo A. K. (2008). D1-protein dynamics in photosystem II: the lingering enigma. *Photosynthesis Research* 98: 609-620.
- Edwards K.**, Johnstone C., Thompson C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349.
- Evans H. M.**, Bishop K. S. (1922). On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56: 650-651.
- Falcone D. L.**, Ogas J. P., Somerville C. R. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of Arabidopsis with alterations in membrane lipid composition. *BioMed Central Plant Biology* 4.
- 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 Letters* 540: 35-40.
- Favory J. J.**, Kobayashi M., Tanaka K., Peltier G., Kreis M., Valay J. G., Lerbs-Mache S. (2005). Specific function of a plastid sigma factor for *ndhF* gene transcription. *Nucleic Acids Research* 33: 5991-5999.
- Fischer B. B.**, Krieger-Liszkay A., Hideg E., Snyrychova I., Wiesendanger M., Eggen R. I. L. (2007). Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 581: 5555-5560.
- Forde J.**, Steer M. W. (1976). The use of quantitative electron microscopy in the study of lipid composition of membranes. *The Journal of Experimental Botany* 27: 1137-1141.
- Foyer C. H.** (1997). Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses* (Editor: Scandalios J.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA: 587-621.
- Fristedt R.**, Granath P., Vener A. V. (2010). A protein phosphorylation threshold for functional stacking of plant photosynthetic membranes. *PLoS ONE* 5.
- Fryer M. J.** (1992). The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant, Cell and Environment* 15: 381-392.
- Fufezan C.**, Rutherford A. W., Krieger-Liszkay A. (2002). Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters* 532: 407-410.
- Gibeaut D. M.**, Carpita N. C. (1994). Improved recovery of (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan synthase activity from golgi apparatus of *Zea mays* (L.) using differential flotation centrifugation. *Protoplasma* 180: 92-97.
- Gomez-Fernandez J. C.**, Villalain J., Aranda F. J., Ortiz A., Micol V., Coutinho A., Berberan-Santos M. N., Prieto M. J. E. (1989). Localization of  $\alpha$ -tocopherol in membranes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 570: 109-120.
- Graham J. M.**, Higgins J. A. (1998). Molekularbiologische Membrananalyse. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Gruszka J.**, Pawlak A., Kruk J. (2008). Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers – determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* 45: 920-928.
- Häder D. P.** (1999). Photosynthese. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Hanaoka M.**, Kanamaru K., Fujiwara M., Takahashi H., Tanaka K. (2005). Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO Reports* 6: 545-550.
- Hanaoka M.**, Kanamaru K., Takahashi H., Tanaka K. (2003). Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* 31: 7090-7098.
- Haußühl K.**, Andersson B., Adamska I. (2001). A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The EMBO Journal* 20: 713-722.
- Havaux M.** (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3: 147-151
- Havaux M.**, Bonfils J. P., Lütz 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 Physiology* 124: 273-284.
- Havaux M.**, Dall'Osto L., Bassi R. (2007). Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiology* 145: 1506-1520.
- Havaux M.**, Eymery F., Porfirova S., Rey P., Dörmann P. (2005). Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17: 3451-3469.
- Hess J. L.** (1993). Vitamin E,  $\alpha$ -Tocopherol. In: *Antioxidants in Higher Plants* (Editor: Alscher R. G.). CRC Press, Boca Raton, USA: 112-134.
- Hideg E.**, Kalai T., Hideg K., Vass I. (1998). Photoinhibition of photosynthesis *in vivo* results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry* 37: 11405-11411.
- Hideg E.**, Kos P. B., Vass I. (2007). Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum* 131: 33-40.
- Hikosaka K.**, Kato M. C., Hirose T. (2004). Photosynthetic rates and partitioning of absorbed light energy in photoinhibited leaves. *Physiologia Plantarum* 121: 699-708.
- Hincha D. K.** (2008). Effects of  $\alpha$ -Tocopherol (vitamin E) on the stability and lipid dynamics of model membranes mimicking the lipid composition of plant chloroplast membranes. *FEBS Letters* 582: 3687-3692.
- 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 Physiology* 135: 1256-1268.
- Horvath G.**, Wessjohann L., Bigirimana J., Jansen M., Guisez Y., Caubergs R., Horemans N. (2006). Differential distribution of tocopherols and tocotrienols in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. *Phytochemistry* 67: 1185-1195.
- Huesgen P. F.**, Schuhmann H., Adamska I. (2009). Deg/HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. *Research in Microbiology* 160: 726-732.

- Hughes C. T.**, Gaunt J. K., Laidman D. L. (1971). The subcellular distribution of tocopherols in the green leaves of *Pisum sativum*. *Biochemical Journal* 124: 9-10.
- Ishizaki Y.**, Tsunoyama Y., Hatano K., Ando K., Kato K., Shinmyo A., Kobori M., Takeba G., Nakahira Y., Shiina T. (2005). A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *The Plant Journal* 42: 133-144.
- Jahns P.**, Latowski D., Strzalka K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 3-14.
- Jansen M. A. K.**, Mattoo A. K., Edelman M. (1999). D1-D2 protein degradation in the chloroplast. *European Journal of Biochemistry* 260: 527-532.
- Jiang Y.**, Deyholos M. K. (2009). Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Molecular Biology* 69: 91-105.
- Journet E. P.**, Douce R. (1985). Enzymatic capacities of purified cauliflower bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 79: 458-467.
- Kamal-Eldin A.**, Appelqvist L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.
- Kanamaru K.**, Nagashima A., Fujiwara M., Shimada H., Shirano Y., Nakabayashi K., Shibata D., Tanaka K., Takahashi H. (2001). An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 42: 1034-1043.
- Kanamaru K.**, Tanaka K. (2004). Roles of chloroplast RNA polymerase sigma factors in chloroplast development and stress response in higher plants. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68: 2215-2223.
- Kanervo E.**, Aro E. M., Murata N. (1995). Low unsaturation of thylakoid membrane lipids limits turnover of the D1 protein of photosystem II at high irradiance. *FEBS Letters* 364: 239-242.
- Kanervo E.**, Tasaka Y., Murata N., Aro E. M. (1997). Membrane lipid unsaturation modulates processing of the photosystem II reaction-center protein D1 at low temperatures. *Plant Physiology* 114: 841-849.
- Kato Y.**, Sakamoto W. (2009). Protein quality control in chloroplasts: A current model of D1 protein degradation in the photosystem II repair cycle. *The Journal of Biochemistry* 146: 463-469.
- Kettunen R.**, Pursiheimo S., Rintamäki E., van Wijk K. J., Aro E. M. (1997). Transcriptional and translational adjustments of *psbA* gene expression in mature chloroplasts during photoinhibition and subsequent repair of photosystem II. *European Journal of Biochemistry* 247: 441-448.
- Khatoun M.**, Inagawa K., Pospisil P., Yamashita A., Yoshioka M., Lundin B., Horie J., Morita N., Jajoo A., Yamamoto Y., Yamamoto Y. (2009). Quality control of photosystem II. Thylakoid unstacking is necessary to avoid further damage to the D1 protein and to facilitate D1 degradation under light stress in spinach thylakoids. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 25343-25352.
- Kim C.**, Meskauskiene R., Apel K., Laloi C. (2008). No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO reports* 9: 435-439.

- Klein R. R.**, Mullet J. E. (1987). Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of psbA, psaA-psaB, and rbcL in dark-grown and illuminated barley seedlings. *The Journal of Biological Chemistry* 262: 4341-4348.
- Knox J. P.**, Dodge A. D. (1985). The photodynamic action of eosin, a singlet-oxygen generator. Some effects on leaf tissue of *Pisum sativum* L.. *Planta* 164: 22-29.
- Koivuniemi A.**, Aro E. M., Andersson B. (1995). Degradation of the D1- and D2-proteins of photosystem II in higher plants is regulated by reversible phosphorylation. *Biochemistry* 34: 16022-16029.
- Krieger-Liszkay A.**, Fufezan C., Trebst A. (2008). Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Research* 98: 551-564.
- Kruk J.**, Holländer-Czytko H., Oettmeier W., Trebst A. (2005). Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* 162: 749-757.
- Kruk J.**, Szymanska R., Krupinska K. (2008). Tocopherol quinone content of green algae and higher plants revised by a new high-sensitive fluorescence detection method using HPLC – Effects of high light stress and senescence. *Journal of Plant Physiology* 165: 1238-1247.
- Kruk J.**, Trebst A. (2008). Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 154-162.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leipner J.**, Stamp P., Fracheboud Y. (2000). Artificially increased ascorbate content affects zeaxanthin formation but not thermal energy dissipation or degradation of antioxidants during cold-induced photooxidative stress in maize leaves. *Planta* 210: 964-969.
- Leitsch J.**, Schnettger B., Critchley C., Krause G. H. (1994). Two mechanism of recovery from photoinhibition *in vivo*: Reactivation of photosystem II related and unrelated to D1-protein turnover. *Planta* 194: 15-21.
- Liere K.**, Börner T. (2006). Transcription of plastid genes. In: *Regulation of Transcription in Plants* (Editor: Grasser K. D.). Blackwell Publishing, Oxford, UK: 184-224.
- Lindahl M.**, Spetea C, Hundal T, Oppenheim A. B., Adam Z., Andersson B. (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *The Plant Cell* 12: 419-431.
- Lowry O. H.**, Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Lupinkova L.**, Komenda J. (2004). Oxidative modifications of the photosystem II D1 protein by reactive oxygen species: from isolated protein to cyanobacterial cells. *Photochemistry and Photobiology* 79: 152-162.
- Ma X.**, Browse J. (2006). Altered rates of protein transport in *Arabidopsis* mutants deficient in chloroplast membrane unsaturation. *Phytochemistry* 67: 1629-1636.
- Maeda H.**, Sage T. L., Isaac G., Welti R., DellaPenna D. (2008). Tocopherols modulate extraplastidic polyunsaturated fatty acid metabolism in *Arabidopsis* at low temperature. *The Plant Cell* 20: 452-470.
- Maeda H.**, Song W., Sage T. L., DellaPenna D. (2006). Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaption and phloem loading in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 2710-2732.

- Melis A.** (1999). Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plant Science* 4: 130-135.
- Mene-Saffrane L.**, Davoine C., Stolz S., Majcherczyk P., Farmer E. E. (2007). Genetic removal of tri-unsaturated fatty acids suppresses developmental and molecular phenotypes of an *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutant. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 35749-35756.
- Müller P.**, Li X. P., Niyogi K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566.
- Munne-Bosch S.**, Alegre L. (2002). The functions of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 31-57.
- Muro-Pastor A. M.**, Herrero A., Flores E. (2001). Nitrogen-related group 2 sigma factor from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 involved in survival under nitrogen stress. *Journal of Bacteriology* 183: 1090-1095.
- Nagashima A.**, Hanaoka M., Motohashi R., Seki M., Shinozaki K., Kanamaru K., Takahashi H., Tanaka K. (2004a). DNA Microarray analysis of plastid gene expression in an *Arabidopsis* mutant deficient in a plastid transcription factor sigma, SIG2. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68: 694-704.
- Nagashima A.**, Hanaoka M., Shikanai T., Fujiwara M., Kanamaru K., Takahashi H., Tanaka K. (2004b). The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45: 357-368.
- Navarro-Marin J.**, Manuell A. L., Wu J., Mayfield S. P. (2007). Chloroplast translation regulation. *Photosynthesis Research* 94: 359-374.
- Neidhardt J.**, Benemann J. R., Zhang L., Melis A. (1998). Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynthesis Research* 56: 175-184.
- Nishiyama Y.**, Allakhverdiev S. I., Yamamoto H., Hayashi H., Murata N. (2004). Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43: 11321-11330.
- Niyogi K. K.** (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 333-359.
- Niyogi K. K.**, Grossmann A. R., Björkmann O. (1998). *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *The Plant Cell* 10: 1121-1134.
- Norris S. R.**, Barette T. R., DellaPenna D. (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *The Plant Cell* 7: 2139-2149.
- Norris S. R.**, Shen X., DellaPenna D. (1998). Complementation of the *Arabidopsis pds1* mutation with the gene encoding *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiology* 117: 1317-1323.
- Novakova M.**, Motyka V., Dobrev P. I., Malbeck J., Gaudinova A., Vankova R. (2005). Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* 56: 2877-2883.

- Newton R. P.**, Pennock J. F. (1971). The intracellular distribution of tocopherols in plants. *Phytochemistry* 10: 2323-2328.
- Okada K.**, Ikeuchi M., Yamamoto N., Ono T., Miyao M. (1996). Selective and specific cleavage of the D1 and D2 proteins of photosystem II by exposure to singlet oxygen: factors responsible for the susceptibility to cleavage of the proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1274: 73-79.
- Onda Y.**, Yagi Y., Saito Y., Takenaka N., Toyoshima Y. (2008). Light induction of *Arabidopsis* *SIG1* and *SIG5* transcripts in mature leaves: differential roles of cryptochrome 1 and cryptochrome 2 and dual function of *SIG5* in the recognition of plastid promoters. *The Plant Journal* 55: 968-978.
- op den Camp R. G. L.**, Przybyla D., Ochsenein C., Laloi C., Kim C., Danon A., Wagner D., Hideg E., Göbel C., Feussner I., Nater M., Apel K. (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 15: 2320-2332.
- Osanai T.**, Ikeuchi M., Tanaka K. (2008). Group 2 sigma factors in cyanobacteria. *Physiologia Plantarum* 133: 490-506.
- Osanai T.**, Kanesaki Y., Nakano T., Takahashi H., Asayama M., Shirai M., Kanehisa M., Suzuki I., Murata N., Tanaka K. (2005). Positive regulation of sugar catabolic pathways in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the group 2  $\sigma$  factor SigE. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 30653-30659.
- Pfaffl M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Pokorska B.**, Zienkiewicz M., Powikrowska M., Drozak A., Romanowska E. (2009). Differential turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 1161-1169.
- Pollari M.**, Gunnelius L., Tuominen I., Ruotsalainen V., Tyystjärvi E., Salminen T., Tyystjärvi T. (2008). Characterization of single and double inactivation strains reveals new physiological roles for group 2  $\sigma$  factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology* 147: 1994-2005.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 12495-12500.
- Porra R. J.**, Thompson W. A., Kriedemann P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384-394.
- Privat I.**, Hakimi M. A., Buhot L., Favory J. J., Lerbs-Mache S. (2003). Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors *SIG1*, *SIG2* and *SIG3*. *Plant Molecular Biology* 55: 385-399.
- Provencher L. M.**, Miao L., Sinha N., Lucas W. J. (2001). *Sucrose Export Defective 1* encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *The Plant Cell* 13: 1127-1141.
- Rimbach G.**, Moehring J., Huebbe P., Lodge J. K. (2010). Gene-regulatory activity of  $\alpha$ -tocopherol. *Molecules* 15: 1746-1761.



- Rintamäki E.**, Kettunen R., Aro E. M. (1996). Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centres. Dephosphorylation is a prerequisite for degradation of damaged D1\*. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 14870-14875.
- Rintamäki E.**, Kettunen R., Tyystjärvi E., Aro E. M. (1995). Light-dependent phosphorylation of D1 reaction centre protein of photosystem II: hypothesis for the functional role *in vivo*. *Physiologia Plantarum* 93: 191-195.
- Rintamäki E.**, Salonen M., Suoranta U. M., Carlberg I., Andersson B., Aro E. M. (1997). Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 30476-30482.
- Rozak P. R.**, Seiser R. M., Wacholtz W. E., Wise E. E. (2002). Rapid, reversible alterations in spinach thylakoid appression upon changes in light intensity. *Plant, Cell and Environment* 25: 421-429.
- Sambrook J.**, Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- 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 Physiology* 132: 2184-2195.
- Sattler S. E.**, Gilliland L. U., Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell* 16: 1419-1432.
- Schreiber U.**, Schliwa U., Bilger W. (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62.
- Schuster G.**, Timberg R., Ohad I. (1988). Turnover of thylakoid photosystem II proteins during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry* 177: 403-410.
- Schweer J.**, Türkeri H., Kolpack A., Link G. (2010). Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription – Recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Cell Biology* 89: 940-946.
- Serbinova E.**, Kagan V., Han D., Packer L. (1991). Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxidant properties of alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol. *Free Radical Biology & Medicine* 10: 263-275.
- Shen Y.**, Danon A., Christopher D. A. (2001). RNA binding-proteins interact specifically with the *Arabidopsis* chloroplast *psbA* mRNA 5' untranslated region in a redox-dependent manner. *Plant and Cell Physiology* 42: 1071-1078.
- Shiina T.**, Tsunoyama Y., Nakahira Y., Khan M. S. (2005). Plastid RNA Polymerases, promoters and transcription regulators in Higher Plants. *International Review of Cytology* 244: 1-67.
- Shirano Y.**, Shimada H., Kanamaru K., Fujiwara M., Tanaka K., Takahashi H., Unno K., Sato S., Tabata S., Hayashi H., Miyake C., Yokota A., Shibata D. (2000). Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor Sigma B. *FEBS Letters* 485: 178-182.
- Soll J.**, Schultz G., Joyard J., Douce R., Block M. A. (1985). Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 238: 290-299.

- Somerville C.** (1995). Commentary on direct tests of the role of membrane lipid composition in low-temperature-induced photoinhibition and chilling sensitivity in plants and cyanobacteria. *PNAS* 92: 6215-6218.
- Song W.**, Maeda H., DellaPenna D. (2010). Mutations of the ER to plastid lipid transporters *TGD1*, 2, 3 and 4 and the ER oleate desaturase *FAD2* suppress the low temperature-induced phenotype of *Arabidopsis* tocopherol-deficient mutant *vte2*. *The Plant Journal* 62: 1004-1018.
- Sun X.**, Fu T., Chen N., Guo J., Ma J., Zou M., Lu C., Zhang L. (2010). The stromal chloroplast Deg7 protease participates in the repair of photosystem II after photoinhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152: 1263-1273.
- Szymanska R.**, Kruk J. (2008). Tocopherol content and isomers' composition in selected plant species. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 29-33.
- Szymanska R.**, Kruk J. (2010). Plastoquinol is the main prenyl lipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant and Cell Physiology* 51: 537-545.
- Tikkanen M.**, Nurmi M., Kangajärvi S., Aro E. M. (2008). Core protein phosphorylation facilitates the repair of photodamaged photosystem II at high light. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 1432-1432.
- Trebst A.**, Depka B., Holländer-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 Letters* 516: 156-160.
- Triantaphylides C.**, Havaux M. (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* 14: 219-228.
- Tsvetkova N. M.**, Brain A. P. R., Quinn P. J. (1994). Structural characteristics of thylakoid membranes of *Arabidopsis* mutants deficient in lipid fatty acid desaturation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1192: 263-271.
- Tyystjärvi E.** (2008). Photoinhibition of photosystem II and photodamage of the oxygen evolving manganese cluster. *Coordination Chemistry Reviews* 252: 361-376.
- Tyystjärvi E.**, Aro E. M. (1996). The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 2213-2218.
- Upchurch R. G.** (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30: 967-977.
- Valentin H. E.**, Lincoln K., Moshiri F., Jensen P. K., Qi Q., Venkatesh T. V., Karunanandaa B., Baszis S. R., Norris SR, Savidge B., Gruys K. J., Last R. L. (2006). The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene *5-1* mutant reveals a critical role for phytol kinase in seed tocopherol biosynthesis. *The Plant Cell* 18: 212-224.
- van der Kooij T. A. W.**, Krupinska K., Krause K. (2005). Tocochromanol content and composition in different species of the parasitic flowering plant genus *Cuscuta*. *Journal of Plant Physiology* 162: 777-781.
- 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 II repair. *Biochemistry* 36: 6178-6186.

**Vazquez D.** (1974). Inhibitors of protein synthesis. *FEBS Letters* 40: 63-84.

**Vener A. V.,** Harms A., Sussman M. R., Vierstra R. D. (2001). Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 6959-6966.

**Vidi P. A.,** Kanwischer M., Baginsky S., Austin J. R., Csucs G., Dörmann P., Kessler F., Brehelin C. (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 11225-11234.

**Vijayan P.,** Browse J. (2002). Photoinhibition in mutants of *Arabidopsis* deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiology* 129: 876-885.

**Yoshimura T.,** Imamura S., Tanaka K., Shirai M., Asayama M. (2007). Cooperation of group 2  $\sigma$  factors, SigD and SigE for light-induced transcription in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Letters* 581: 1495-1500.

**Ytterberg A. J.,** Peltier J. B., van Wijk K. J. (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiology* 140: 984-997.

**Zbierzak A. M.,** Kanwischer M., Wille C., Vidi P. A., Giavalisco P., Lohmann A., Briesen I., Porfirova S., Brehelin C., Kessler F., Dörmann P. (2010). Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochemical Journal* 425: 389-399.

**Zingg J. M.** (2007). Modulation of signal transduction by vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine* 28: 481-506.

**Zhang L.,** Aro E. M. (2002). Synthesis, membrane insertion and assembly of the chloroplast-encoded D1 protein into photosystem II. *FEBS Letters* 512: 13-18.

**Zhang L.,** Paakkarinen V., van Wijk K. J., Aro E. M. (2000). Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: Regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II. *The Plant Cell* 12: 1769-1781.

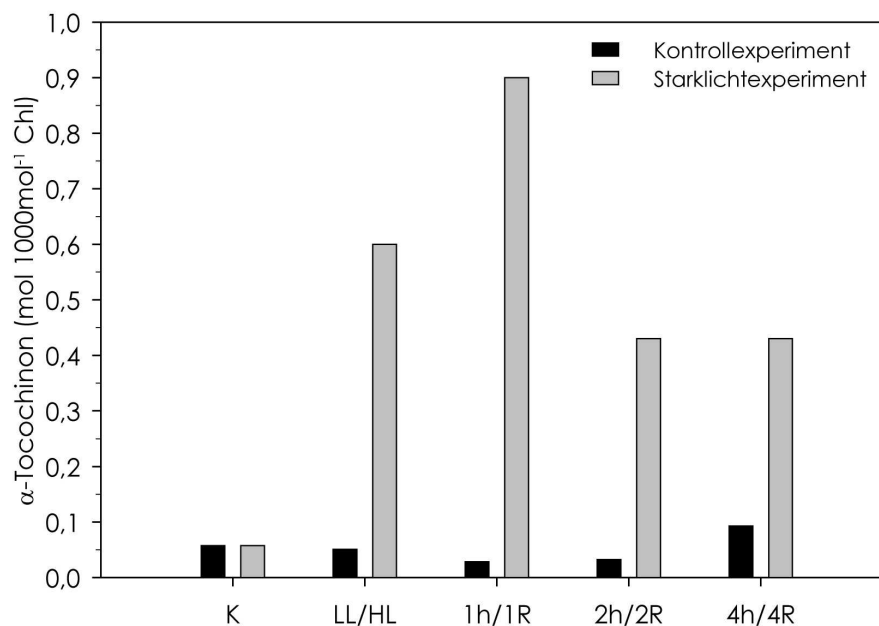
**Zhang L.,** Paakkarinen V., van Wijk K. J., Aro E. M. (1999). Co-translational assembly of the D1-protein into photosystem II. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (23): 16062-16067.

## A. Anhang

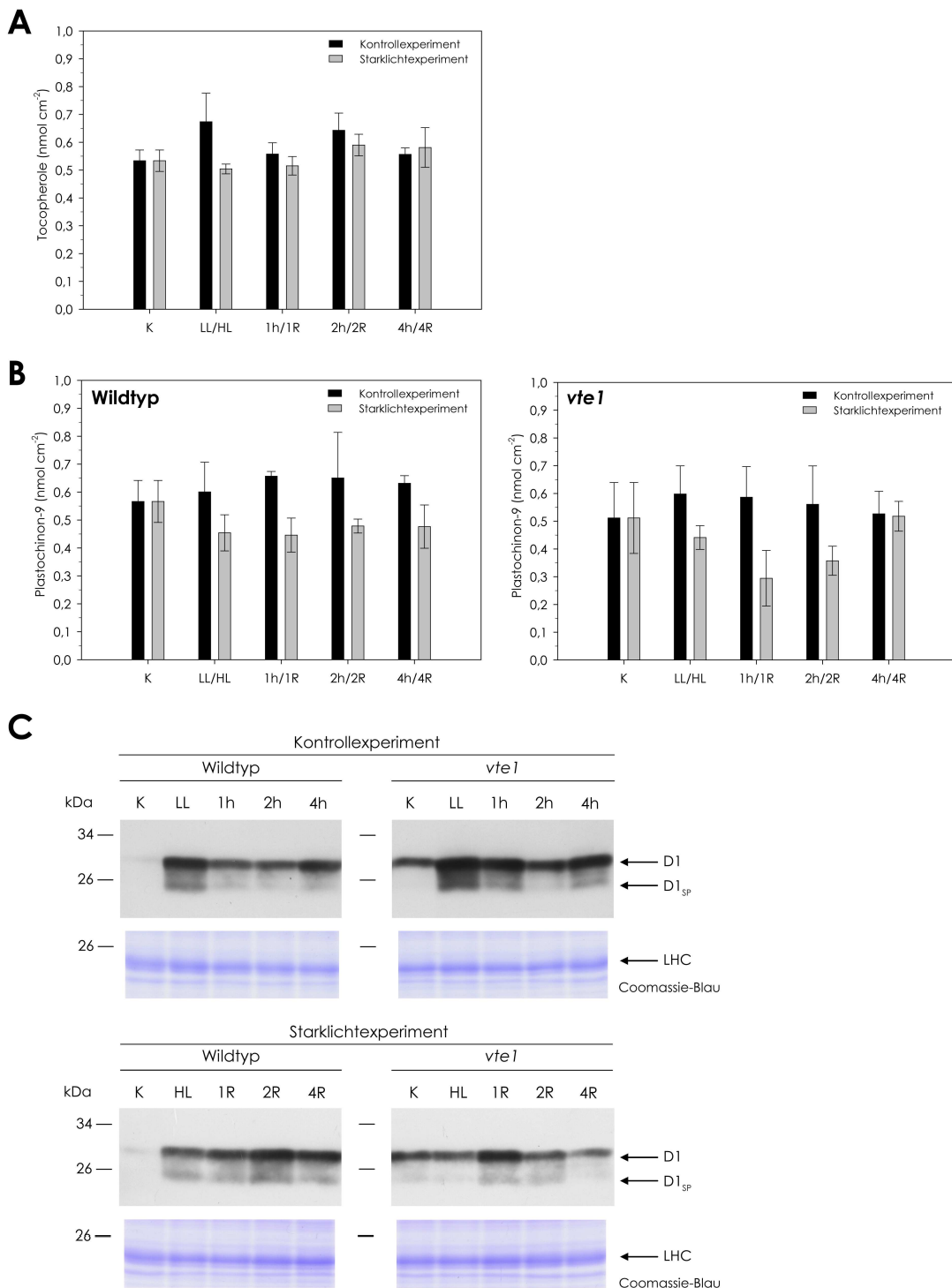
**A.1:** Effizienz des Photosystems II ( $F_v/F_m$ ) in Blättern des Wildtyps, der *vte1*- und *npq1*-Mutante sowie der *npq1xvte1*-Doppelmutante bei Belichtung mit Schwachlicht (Kontrollexperiment). Angegeben sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. K – Kontrolle, LL – Belichtung mit Kontroll- bzw. Schwachlicht ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht

	$F_v/F_m$ im Kontrollexperiment			
	Wildtyp	<i>vte1</i>	<i>npq1</i>	<i>npq1xvte1</i>
K	$0,76 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,02$
LL	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
1h	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,01$
2h	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,01$
4h	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,01$

**A.2:**  $\alpha$ -Tocochinongehalt in Blättern des Wildtyps während eines Kontroll- und Starklichtexperimentes. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment



**A.3: (A)** Tocopherol- und **(B)** Plastochinongehalt sowie **(C)** D1-Proteinmenge in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante während eines Starklicht- und Kontrollexperimentes. Für den immunologischen Nachweis des D1-Proteins wurde ein Antikörper verwendet, der gegen einen Bereich am C-Terminus des D1-Proteins gerichtet ist. Es wurden jeweils 15 µg Protein in einem 14 %igen (w/v) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Um eine gleichmäßige Beladung der Gele zu überprüfen, wurden diese mit Coomassie-Blau angefärbt. Davon ist ein Ausschnitt dargestellt, der u. a. Proteine der Lichtsammelkomplexe (LHC) zeigt. D1<sub>SP</sub> – C-terminales D1-Proteinfragment, K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment



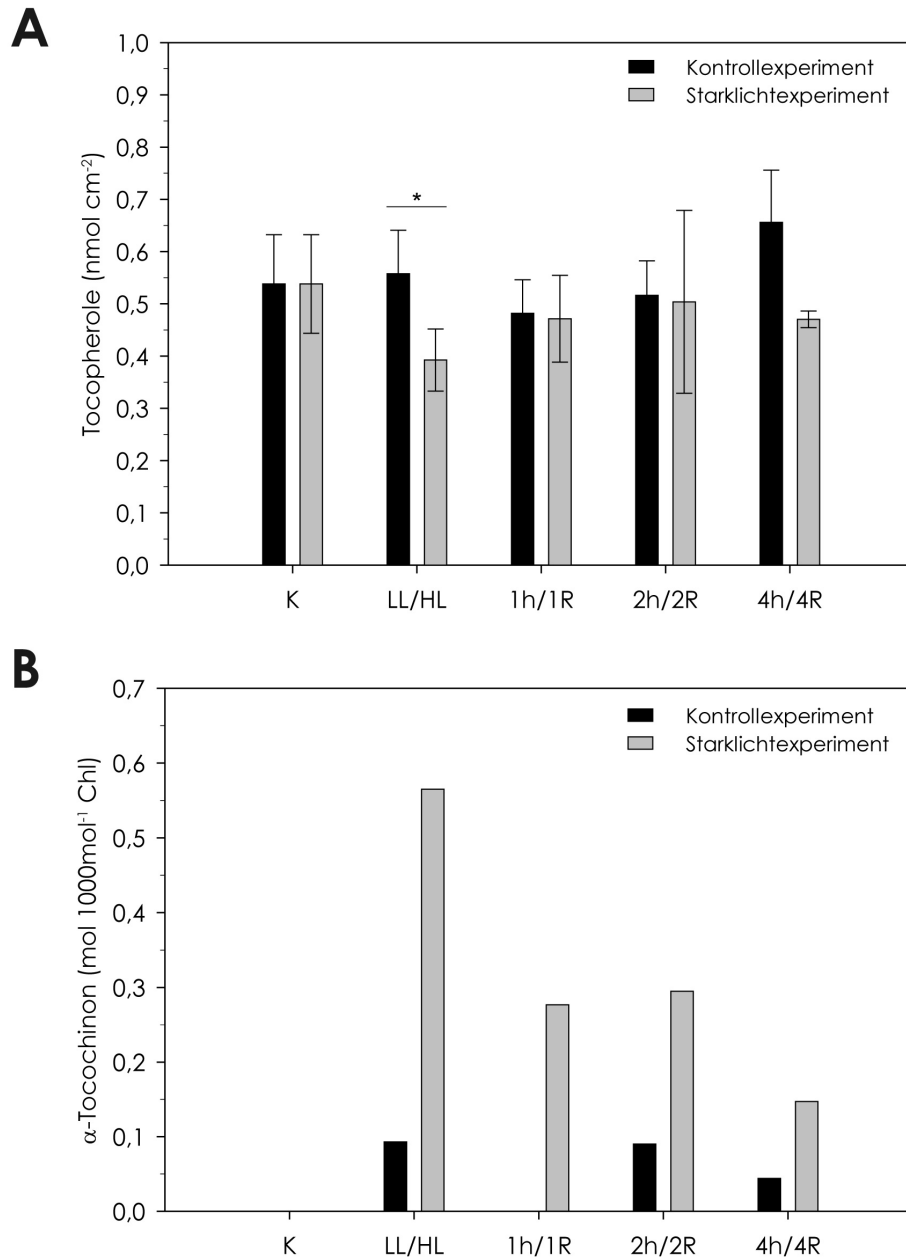
**A.4:** Chlorophyllgehalt, Chlorophyll a/b Verhältnis und relativer Carotinoidgehalt in Blättern des Wildtyps im Kontroll- und Starklichtexperiment. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Zeaxanthingehalte sind grau unterlegt. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment; <sup>a</sup> nur stark vereinzelt Zeaxanthin detektiert, bei der Berechnung vernachlässigt <sup>b</sup> nur Daten aus einem Experiment

Wildtyp	Kontrollexperiment				
	K	LL	1h	2h	4h <sup>b</sup>
Chlorophyll a+b (nmol cm <sup>-2</sup> )	25,5 $\pm$ 2,1	23,9 $\pm$ 2,0	24,4 $\pm$ 3,8	25,3 $\pm$ 3,9	26,1 $\pm$ 4,7
Chlorophyll a/b	3,1 $\pm$ 0,05	3,2 $\pm$ 0,08	3,1 $\pm$ 0,06	3,1 $\pm$ 0,11	3,0 $\pm$ 0,12
Carotinoide (mmol mol <sup>-1</sup> Chl)					
VAZ	37,6 $\pm$ 3,1	42,8 $\pm$ 7,5	39,3 $\pm$ 3,1	41,5 $\pm$ 3,1	37,1 $\pm$ 4,2
Zeaxanthin	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
Lutein	177,7 $\pm$ 4,4	179,6 $\pm$ 7,8	177,7 $\pm$ 3,6	176,7 $\pm$ 5,6	179,3 $\pm$ 3,1
$\beta$ -Carotin	100,5 $\pm$ 4,1	102,2 $\pm$ 2,8	97,5 $\pm$ 10,2	99,5 $\pm$ 6,4	101,4 $\pm$ 11,1
Wildtyp	Starklichtexperiment				
		HL	1R	2R	4R <sup>b</sup>
Chlorophyll a+b (nmol cm <sup>-2</sup> )		24,1 $\pm$ 2,3	24,5 $\pm$ 2,0	24,2 $\pm$ 2,1	25,6 $\pm$ 1,6
Chlorophyll a/b		3,1 $\pm$ 0,05	3,0 $\pm$ 0,03	3,1 $\pm$ 0,04	3,1 $\pm$ 0,07
Carotinoide (mmol mol <sup>-1</sup> Chl)					
VAZ		37,1 $\pm$ 4,7	42,2 $\pm$ 3,3	42,6 $\pm$ 2,4	60,0 $\pm$ 1,0
Zeaxanthin		14,1 $\pm$ 2,5	6,9 $\pm$ 0,8	6,8 $\pm$ 2,1	5,2 $\pm$ 0,3
Lutein		178,4 $\pm$ 7,7	172,0 $\pm$ 5,6	175,0 $\pm$ 7,2	182,8 $\pm$ 2,0
$\beta$ -Carotin		99,6 $\pm$ 1,6	92,7 $\pm$ 2,8	95,8 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	81,5 $\pm$ 1,7

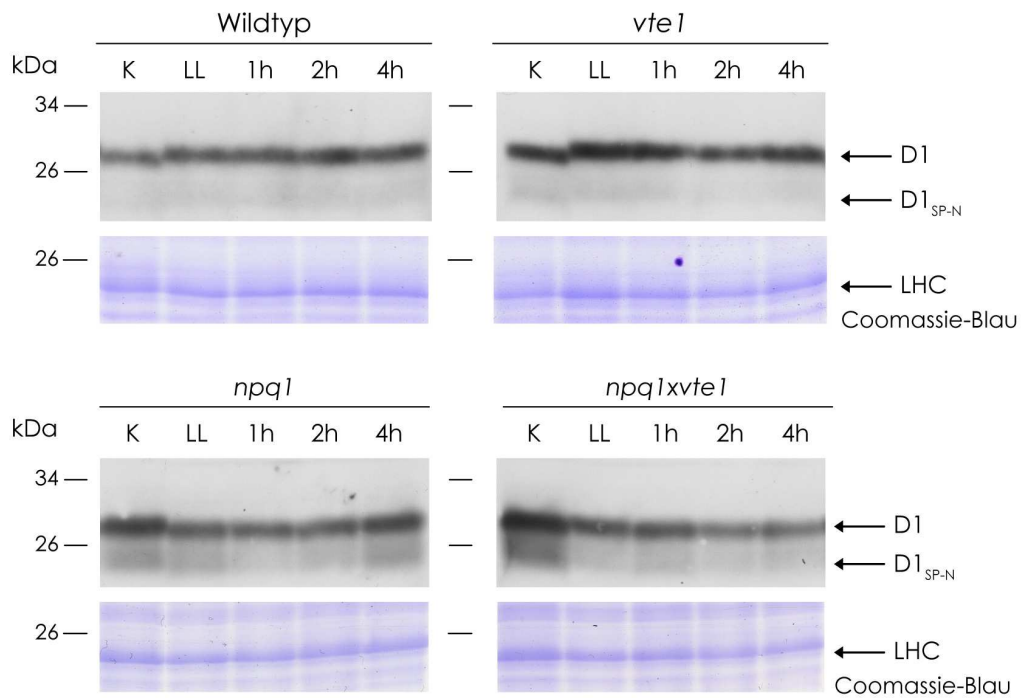
**A.5:** Chlorophyllgehalt, Chlorophyll a/b Verhältnis und relativer Carotinoidgehalt in Blättern der vte1-Mutante im Kontroll- und Starklichtexperiment. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus zwei unabhängigen Experimenten  $\pm$  SD. Zeaxanthingehalte sind grau unterlegt. <sup>a</sup> nur stark vereinzelt Zeaxanthin detektiert, bei der Berechnung vernachlässigt

vte1-Mutante	Kontrollexperiment				
	K	LL	1h	2h	4h
Chlorophyll a+b (nmol cm <sup>-2</sup> )	26,3 $\pm$ 1,0	25,2 $\pm$ 0,9	24,3 $\pm$ 2,6	25,4 $\pm$ 2,3	24,5 $\pm$ 2,1
Chlorophyll a/b	3,1 $\pm$ 0,06	3,1 $\pm$ 0,07	3,1 $\pm$ 0,07	3,1 $\pm$ 0,06	3,1 $\pm$ 0,04
Carotinoide (mmol mol <sup>-1</sup> Chl)					
VAZ	39,9 $\pm$ 4,5	38,9 $\pm$ 4,1	41,6 $\pm$ 4,5	43,0 $\pm$ 5,0	42,1 $\pm$ 3,4
Zeaxanthin	5,0 $\pm$ 1,5	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>
Lutein	172,4 $\pm$ 6,9	173,7 $\pm$ 6,7	177,3 $\pm$ 7,9	184,8 $\pm$ 5,7	180,8 $\pm$ 8,9
$\beta$ -Carotin	99,2 $\pm$ 4,1	102,2 $\pm$ 1,7	100,7 $\pm$ 3,7	101,7 $\pm$ 4,0	100,3 $\pm$ 4,1
vte1-Mutante	Starklichtexperiment				
		HL	1R	2R	4R
Chlorophyll a+b (nmol cm <sup>-2</sup> )		25,7 $\pm$ 2,5	24,1 $\pm$ 1,7	23,4 $\pm$ 2,1	24,7 $\pm$ 2,4
Chlorophyll a/b		3,1 $\pm$ 0,03	3,1 $\pm$ 0,06	3,1 $\pm$ 0,10	3,1 $\pm$ 0,06
Carotinoide (mmol mol <sup>-1</sup> Chl)					
VAZ		34,6 $\pm$ 0,3	41,0 $\pm$ 3,8	47,0 $\pm$ 4,1	49,7 $\pm$ 6,5
Zeaxanthin		13,8 $\pm$ 1,9	6,7 $\pm$ 0,9	6,6 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 1,1
Lutein		168,3 $\pm$ 7,3	167,3 $\pm$ 5,9	173,6 $\pm$ 8,5	176,9 $\pm$ 12,4
$\beta$ -Carotin		96,2 $\pm$ 1,4	95,5 $\pm$ 2,2	90,8 $\pm$ 4,0	89,6 $\pm$ 9,3

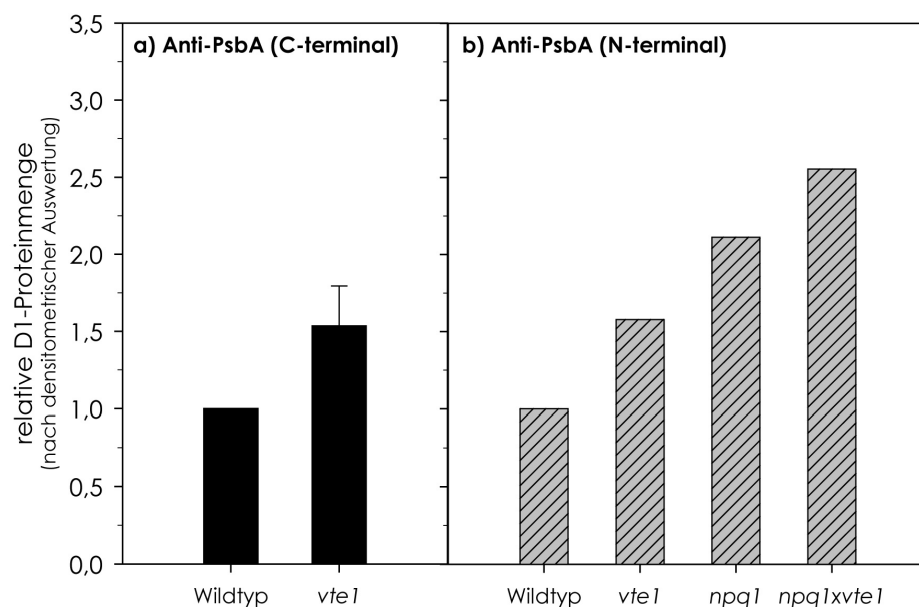
**A.6:** (A) Tocopherol- und (B)  $\alpha$ -Tocochinongehalt in Blättern der *npq1*-Mutante im Kontrollexperiment und bei Starklichtexposition mit anschließender Erholungsphase. Die Tocopheroldaten repräsentieren die Mittelwerte von jeweils drei individuellen Blättern  $\pm$  SD. \* indifferent,  $P=0,05$  (t-Test, zweiseitig).  $\alpha$ -Tocochinongehalte stammen aus einer Versuchsreihe. K – Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment



**A.7:** Immunologischer Nachweis des D1-Proteins sowie eines N-terminalen D1-Proteinspaltproduktes in Blättern des Wildtyps, der *vte1*- und *npq1*-Mutante sowie in der *npq1xvte1*-Doppelmutante. Abgebildet sind Autoradiogramme nach ECL-Detektion. Um die gleichmäßige Beladung der Gele zu kontrollieren, wurden die Proteingele mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Ausschnitte aus Coomassie-Proteingelen für den Wildtyp und die *vte1*-Mutante entsprechen denen aus Abb. 3-5. LHC – Proteine der Lichtsammelkomplexe, D1<sub>SP-N</sub> – N-terminales D1-Spaltprodukt, K – Kontrolle, LL – Kontroll- bzw. Schwachlicht, 1h/2h/4h – nach einer, zwei bzw. vier weiteren Stunden im Schwachlicht, Kontrollexperiment

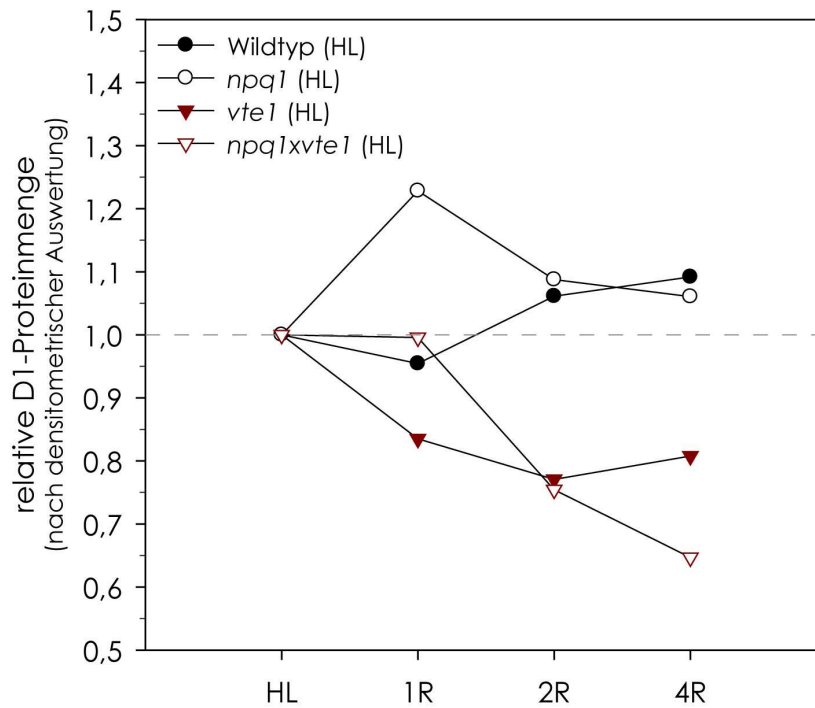


**A.8:** Relative D1-Proteinmenge (nach densitometrischer Auswertung) in Blättern des Wildtyps, der *vte1*-Mutante sowie beider *npq*-Mutanten vor Beginn der Starklichtbehandlung (K). Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus der densitometrischen Auswertung von jeweils zwei Autoradiogrammen des D1-Proteins. Die Menge an D1-Protein in den Mutanten wurde relativ zu der des Wildtyps berechnet, die dafür auf den Wert 1 gesetzt wurde. Im Fall des Antikörpers Anti-PsbA (C-terminal) wurden zwei unabhängige Experimente zusammengefasst.





**A.9:** Relative D1-Proteinmenge (nach densitometrischer Auswertung) in Blättern des Wildtyps sowie der *vte1*- und beider *npq*-Mutanten während der Erholungsphase nach Starklichtexposition. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei densitometrisch ausgewerteten Autoradiogrammen. Die D1-Proteinmenge wurden relativ zum D1-Proteingehalt im Wildtyp bzw. der Mutanten bei Starklicht (HL) berechnet. Diese wurden auf den Wert 1 gesetzt. Damit wurde deutlich, wie sich der D1-Proteingehalt während der Erholungsphase verändert. K- Kontrolle, HL – Starklicht, 1R/2R/4R – nach einer, zwei bzw. vier Stunden Erholung vom Starklicht



**A.10:** Vergleich der Aminosäuresequenzen des Sigmafaktors SIGE aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit Aminosäuresequenzen von Sigmafaktoren aus *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Tabellarische Darstellung der Ergebnisse einer Identitätsanalyse der Proteinsequenzen mithilfe der Software BLASTP 2.2.19 (siehe Altschul *et al.* 1997). Der Score beschreibt den Grad der Übereinstimmung der Suchsequenz mit bekannten Sequenzen einer Datenbank. E-Werte dienen als Parameter zur Einordnung der Signifikanz der Ergebnisse aus der Datenbankrecherche. Je niedriger der E-Wert, desto signifikanter ist die Übereinstimmung zweier Sequenzen. **(B)** Lokales Alignment zur Beschreibung konservierter Bereiche der Aminosäuresequenzen des SIGE Proteins aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 und des SIG2-Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Das Alignment wurde mithilfe der Software Sequence Manipulation Suite 2.0 erstellt. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt und Aminosäuren mit vergleichbaren Eigenschaften durch einen grauen Hintergrund gekennzeichnet.

**A**

Genlokus	Protein	score (bits)	E-Wert
At1g08540.1	SIG2	202	$3 \times 10^{-52}$
At2g36990.1	SIG6	201	$5 \times 10^{-52}$
At1g64860.1	SIG1	170	$1 \times 10^{-42}$
At5g13730.1	SIG4	165	$4 \times 10^{-41}$
At3g53920.1	SIG3	149	$3 \times 10^{-36}$
At5g24120.1	SIG5	123	$2 \times 10^{-28}$

**B**

```

SynSIGE ----- 0
AtSIG2  MSSCLLPQFKCPPDSFSIHFRTSFCAPKHNKGSVFFQPQCAVSTSPALLTSMLDVAKLRL 60

SynSIGE ----- 0
AtSIG2  PSFDTSDSLISDRQWYTRPDGSPTEAKYLEALASETLLTSDEAVVVAAAEEAVALARA 120

SynSIGE -----MSDMSL 7
AtSIG2  AVKVAKDATLFKNSNNTNLLTSSTADKRSKWQFTEKERAGILGH LAVSDNGIVSDKITA 180

SynSIGE  STPNTSAVDWQALDG-----LADGQAIANDDPPEAEV 40
AtSIG2  SASNKESIGGLESEKQEEVELLEEQPSVSLAVRSTRQTERKARRAKGLEKTASGIPSVKT 240

SynSIGE  TLGDGQQGSFNKAVSEITVCAFFKEMARYP-LLSAAEEVELARQIRLLVSAEDVRRQOLTQ 99
AtSIG2  GSSPKKKRLVAQEVDHNDPLRYLRMTTSSSKLLTVREHHELSAGIQDLLKLERIQTELTE 300

SynSIGE  QLERTPSLQEWQALEFFQVRQFEIWLYOIRAAKRMRIRSNLRLVVSIAKRYLNRGVVPL 159
AtSIG2  RSCROPTFAQWASAAQVDC-SLRQRIHHCITCKDKMIKSNIRLVTIYAKNYQAGCMNLQ 359

SynSIGE  DLIQEGAIQLNRAAEKFDPKGYKFSTYAYWWIROAITRTIANDARTIRLPITVVEKLNK 219
AtSIG2  DLVQEGCRGLVRCAEKFDATKGFKFSTYAHWWIKQAVRKSLSDCSRMIRLPITVVEATYR 419

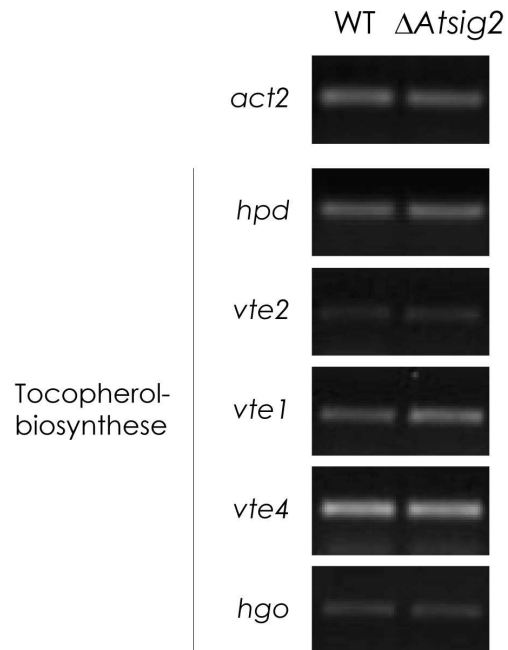
SynSIGE  IKRQORSIKQELKRNPNFGLAAALDITPAQIRQLIQLRQSLSNHRVKGEDTELVDL 279
AtSIG2  VKEARKQLYSETGKHPKNEETAEATGLSMKRLMAVLLSPKPPRSLDQKIGMNONLKPSEV 479

SynSIGE  LEQQQLQLPEDLMNESMLRREIVEVLAEVLTREMEVICLRYGIAHQSYTLEEVGNMFN 339
AtSIG2  IADPEAVTSEDLILIKEFMRODLDRVLDLGLTR-EKQVIRWRFCMEDGRMKTLOEIGEMMG 538

SynSIGE  LSREVRQIQSKAMRKLRRPQVAREIKGWL---- 369
AtSIG2  VSRERVRQIESSAFRKLKNNKRNNEHQOYLVAQS 572

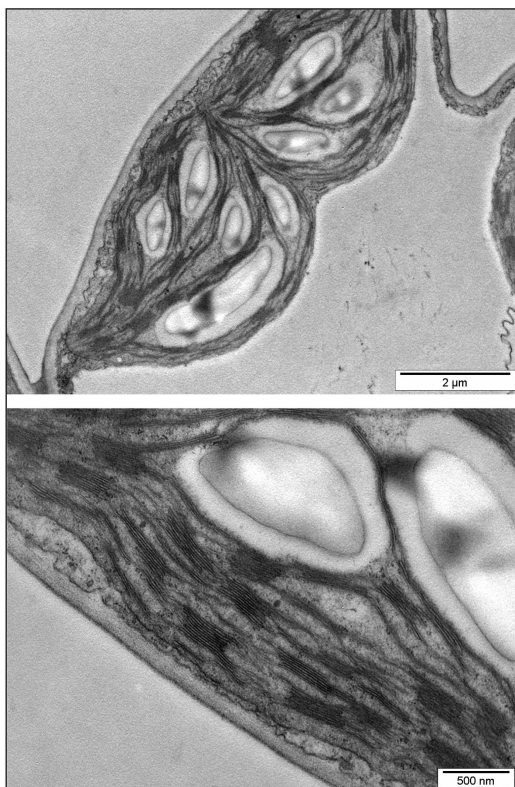
```

**A.11:** Transkriptgehalte ausgewählter Gene der Tocopherolbiosynthese in Blättern des Wildtyps (WT) und der  $\Delta$ Atsig2-Mutante. Zur Kontrolle der für alle Proben gleichermaßen eingesetzten cDNA-Menge dient der Transkriptgehalt des *act2*-Gens. Die Gene kodieren für folgende Proteine in *A. thaliana*: *hpd* – *p*-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, *vte2* – Homogentisat-Prenyltransferase, *vte1* – Tocopherolzyklase, *vte4* –  $\gamma$ -Tocopherol-Methyltransferase, *hgo* – Homogentisat-1,2-Dioxygenase

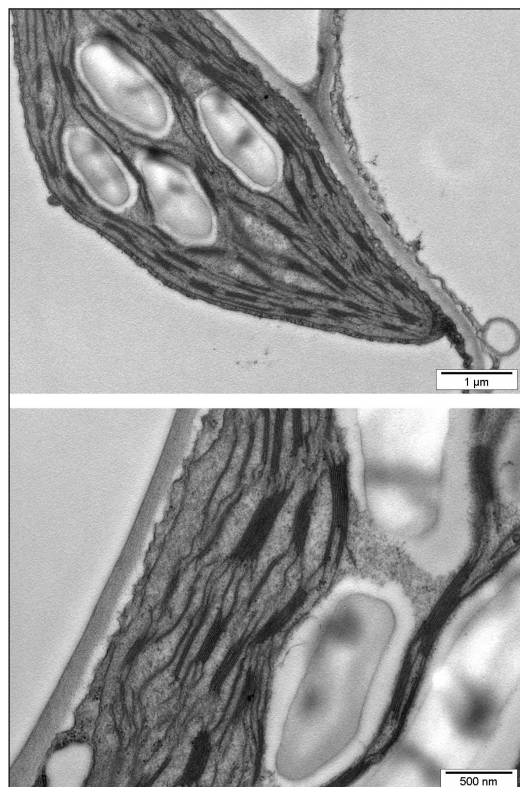


**A.12:** Ultrastruktur von Chloroplasten in Blättern des Wildtyps und der *vte1*-Mutante nach zwei Stunden Erholung vom Starklicht (2R). Für jede Pflanzenlinie sind zwei TEM-Aufnahmen dargestellt.

**Wildtyp** (zwei Stunden Erholung vom Starklicht (2R))



***vte1*** (zwei Stunden Erholung vom Starklicht (2R))



## Beiträge in Mitteilungsbänden von Tagungen

Brückner K. (2006). Distribution and function of Vitamin E in plant cells. *SPPS PhD Conference*, Lycksele (Schweden).

Brückner K., Krupinska K., Falk J. (2007). Distribution and subcellular localisation of Vitamin E in plant cells. *Tagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung - Pflanzliche Nahrungsmittel – (DGQ)*, Kiel.

Brückner K., Krupinska K., Falk J. (2007). Distribution and subcellular localisation of tocochromanols in plant cells. *Botaniker Tagung*, Hamburg.

Brückner K., Krupinska K., Falk J. (2007). Distribution and subcellular localisation of Vitamin E in plant cells. *TERPNET International Meeting - Biosynthesis and Function of Isoprenoids in Plants, Microorganism and Parasites*, Strasbourg (Frankreich).

Brückner K., Falk J., Krupinska K. (2009). Evidence for a signalling role of tocopherols in adjustments of the photosynthetic performance of plants under stress conditions. *Conference on Plant Abiotic Stress Tolerance*, Wien (Österreich).

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die Bereitstellung des Themas und für die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft bei der Bearbeitung des Themas bedanken. Ich danke ihr ausdrücklich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, ihr unaufhörliches Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die dafür gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jon Falk für die Betreuung bei der Bearbeitung des Themas in den ersten drei Jahren und für seine bis heute andauernde Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Seine stete Motivation haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Bilger und seiner gesamten Arbeitsgruppe, darunter besonders Jens Hermann und Lars Nichelmann, danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, in ihrer Abteilung HPLC- und PAM-Messungen durchführen zu können.

Des Weiteren danke ich der FAZIT-Stiftung für die Bereitstellung eines Promotionsstipendiums, dass mir eine finanzielle Grundsicherung bei der Fertigstellung dieser Arbeit gewährt hat.

Dr. Christine Desel danke ich für ihre wertvollen Tipps und Anregungen.

Herrn Prof. Ivo Feussner, Herrn Prof. Jerzy Kruk und Frau Dr. Maria Mulisch danke ich für die Bereitschaft zur Durchführung von Analysen, die zu wesentlichen Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Krupinska für die gute Arbeitsatmosphäre und eine gute Zeit im Labor.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden dafür, dass sie mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Holger, der mir trotz der 400 km Entfernung zwischen uns stets mit viel Verständnis und Geduld zur Seite stand und mir mit seiner Liebe den Mut und die Ruhe geben konnte, diese nicht immer leichte Zeit der Promotion durchzustehen.

# Lebenslauf

## Kathleen Brückner

### Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Kathleen Brückner  
Geburtsdatum: 05. September 1983  
Geburtsort: Gotha  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Schulausbildung

1990 – 1994 Adolf von Trütschler Grundschule, Wölfis  
1994 – 2002 Staatliches Gymnasium Gleichense, Ohrdruf  
Abschluss: Abitur

### Studium

2002 – 2005 duales Studium der Biotechnologie an der Staatlichen Studienakademie Riesa,  
in Kooperation mit dem Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e. V. Heilbad Heiligenstadt  
Abschluss: Diplom-Ingenieurin (BA) Biotechnik

seit Januar 2006 Arbeiten zur Promotion am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Betreuung von Prof. Dr. Karin Krupinska

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit – abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer – nach Inhalt und Form meine Arbeit ist und unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde.

Diese Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Ferner erkläre ich, dass von mir noch keine früheren Promotionsversuche unternommen wurden.

Für die mündliche Prüfung wird die Form der Disputation gewählt. Der Zulassung von Zuhörern / Zuhörerinnen bei der mündlichen Prüfung wird nicht widersprochen.

Kiel, den .....

.....

Kathleen Brückner