

Lichtschutzfunktion von Anthocyanen
in Blättern Höherer Pflanzen:
Abschirmung und antioxidative Wirkung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Lars Nichelmann

Kiel, 2014

Referent:	Prof. Dr. Wolfgang Bilger
Korreferent:	Prof. Dr. Karin Krupinska
Tag der mündlichen Prüfung:	21.07.2014
Zum Druck genehmigt:	21.07.2014

.....

Der Dekan

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Hypothesen zur Funktion von Anthocyanen in Blättern Höherer Pflanzen	1
1.2 Akkumulation von Anthocyanen in Blättern	2
1.2.1 Struktur und Biosynthese der Anthocyane	3
1.2.2 Regulation der Anthocyan-Biosynthese	6
1.2.3 Lokalisation der Anthocyane im Blatt	8
1.3 Lichtschuttfunktion der Anthocyane durch die Absorption photosynthetisch aktiver Strahlung	10
1.3.1 Akzeptorseitige Inhibition von Photosystem II	11
1.3.2 Donorseitige Inhibition von Photosystem II	12
1.3.3 Optische Eigenschaften der Anthocyane	14
1.3.4 Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane	15
1.3.5 Schutz vor Photoinhibition von PS II durch die optische Abschirmung der Anthocyane	16
1.4 Lichtschuttfunktion der Anthocyane durch die antioxidative Wirkung	18
1.4.1 Inhibition von Photosystem II durch reaktive Sauerstoffspezies	18
1.4.2 Antioxidative Kapazität der Anthocyane	20
1.4.3 Antioxidative Wirkung von Anthocyanen <i>in vivo</i>	21
1.5 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Pflanzenanzucht	24
2.2 Optische und physiologische Messmethoden	26
2.2.1 Fluorometrische Quantifizierung der Transmission photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) in Blättern	26
2.2.2 Messung von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren	27
2.2.3 Isolierung intakter Chloroplasten	28
2.2.4 Bestimmung der maximalen photochemischen Effizienz von PS II (F_v / F_m)	28
2.2.5 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung	29
2.3 Chemische Analytik und Messungen zur Enzymaktivität	31
2.3.1 Bestimmung des Anthocyangehaltes in Blättern	31
2.3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	32
2.3.3 Kalibration der HPLC für Carotinoide und Chlorophylle	32
2.3.4 Extraktion von Photosynthesepigmenten zur Quantifizierung mittels HPLC	35
2.3.5 Bestimmung des Gehaltes von Hydroxycinnamsäuren und Flavonolen in Blättern mittels HPLC	36
2.3.6 Bestimmung des Gehaltes von Tocopherolen in Blättern mit Hilfe der HPLC	38
2.3.7 Bestimmung des Gehaltes von Malondialdehyd (MDA) in Blättern mit Hilfe der HPLC	39
2.3.8 Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD)	40
2.3.9 Bestimmung der Aktivität der Ascorbat-Peroxidase (APX)	41

2.3.10	Bestimmung der niedrigmolekularen antioxidativen Kapazität von Blattproben mit dem TAC-Assay	43
2.4	Experimente zur Inhibition von Photosystem II.....	43
2.4.1	Hemmung der Reparatur des D1-Proteins durch Lincomycin	43
2.4.2	Inkubation von Blattscheiben mit Methylviologen	45
2.4.3	Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photoinhibition von PS II	46
2.4.4	Inhibition von Photosystem II durch verschiedene Lichtqualitäten	46
2.4.5	Photooxidative Inhibition von Photosystem II.....	47
2.5	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Quantifizierung der Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane	50
3.1.1	Etablierung der Methode zur Bestimmung des Abschirmungseffektes	50
3.1.2	Quantifizierung des Abschirmungseffektes von Anthocyanen	55
3.1.3	Abhängigkeit der Absorption photosynthetisch aktiver Strahlung vom Anthocyangehalt.....	57
3.1.4	Auswirkungen der Anthocyane auf die spektralen Verhältnisse in Blättern	58
3.1.5	Von den Transmissionsspektren zur effektiven Photonendichte (PPFD _{effect})...60	
3.1.6	Die apparente Quantenausbeute der photosynthetischen Sauerstoffevolution	63
3.2	Lichtakklimatisation des Photosyntheseapparates als Folge des Abschirmungseffektes durch Anthocyane.....	66
3.2.1	Photosynthetische Lichtfluss-Effekt-Kurven von <i>B. thunbergii</i> / <i>thunbergii atropurpurea</i> Blättern	67
3.2.2	Lichtakklimatisation der maximalen Photosynthesekapazität (P _{max}) in grünen und Anthocyane enthaltenden Blättern	70
3.2.3	Akklimatisation der Lichtsammelkomplexe durch die Abschirmung von Anthocyanen.....	71
3.3	Die Funktion von Anthocyanen in Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i> – Abschirmung oder antioxidative Wirkung?	76
3.3.1	Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane in Blättern von <i>A. thaliana</i>	77
3.3.2	Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photoinhibition in Blättern von <i>A. thaliana</i>	79
3.3.3	Photoinhibition der <i>Arabidopsis</i> -Phänotypen mit verschiedenen Lichtqualitäten ...81	
3.3.4	Effektive photosynthetische Photonendichten in Blättern des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyps und der transparent testa-Mutanten	82
3.3.5	Niedrigmolekulare antioxidative Kapazität von Blattextrakten der <i>Arabidopsis</i> -Genotypen	86
3.3.6	Induktion von photooxidativen Bedingungen in Blattproben des Wildtyps von <i>A. thaliana</i> (1er) und dessen Deletionsmutanten (<i>tt3</i> , <i>tt7</i>).....	87
3.3.7	Differenzierung zwischen dem Abschirmungseffekt der Anthocyane und deren antioxidativer Wirkung bei der photooxidativen Deaktivierung von PS II	89
3.3.8	Vergleich ausgewählter antioxidativer Schutzsysteme in den Blättern der <i>Arabidopsis</i> -Genotypen.....	91
3.3.9	Schutz der Thylakoidmembranen durch Anthocyane und Quercetin vor der photooxidativen Degradation ungesättigter Fettsäuren.....	93

4	Diskussion	97
4.1	Lichtschutzwirkung der Anthocyane durch die optische Abschirmung von Strahlung ..	97
4.1.1	<i>In vivo</i> -Absorption der Anthocyane	97
4.1.2	Die Bestimmung der Abschirmung mit Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen	98
4.1.3	Quantifizierung der Abschirmung mit Hilfe von isolierten Chloroplasten und grünen Blättern als Referenz	99
4.1.4	Das Ausmaß der Abschirmung von grünem Licht durch Anthocyane in Blättern	101
4.1.5	Photosynthetisch wirksame Photonenflussdichten in anthocyanhaltigen Blättern	104
4.2	Die Auswirkungen der Abschirmung durch Anthocyane auf die Photosyntheseaktivität ..	108
4.2.1	Die Wirkung der Abschirmung von Anthocyanen auf die Photosynthese.....	108
4.2.2	Photosynthetische Kapazität	109
4.2.3	Lichtakklimatisation der Antennenkomplexe	111
4.2.4	Lichtakklimatisation der Pigmentmenge des Xanthophyllzyklus	112
4.2.5	Einfluss der Anthocyane auf den Epoxidationsstatus des Xanthophyllzyklus	113
4.3	Lichtschutzwirkung der Anthocyane.....	116
4.3.1	Schutz vor Photoinhibition durch Anthocyane	116
4.3.2	Die Wirksamkeit von grünem Licht in der Photosynthese und bei der Photoinhibition	118
4.3.3	Schutz vor Photoinhibition durch Abschirmung grüner Strahlung.....	119
4.4	Lichtschutzwirkung der Anthocyane durch ihre antioxidative Wirkung	121
4.4.1	Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies in der Photoinhibition	121
4.4.2	Photooxidativer Stress erzeugt durch die Methylviologen-induzierte Bildung von H ₂ O ₂	123
4.4.3	Bestimmung der niedrigmolekularen antioxidativen Kapazität von Blattextrakten des <i>Arabidopsis</i> -Wildtyps und der beiden Transparent Testa-Mutanten	124
4.4.4	Strahlungsdosisabhängige Deaktivierung von Photosystem II im Methylviologen-Lincomycin-System	125
4.4.5	Gegenüberstellung des antioxidativen Systems zur Detoxifizierung von H ₂ O ₂ und Hydroxyl-Radikalen in den verschiedenen Genotypen.....	128
4.4.6	Schutz vor der über Malondialdehyd vermittelten Inhibition von Photosystem II durch Anthocyane und Quercetin.....	130
5	Zusammenfassung	134
6	Literaturverzeichnis.....	136

II. Abkürzungsverzeichnis

3GT	-	Anthocyanin-3-O-Glykosyltransferase
IV	-	Untereinheit des Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplexes
A	-	Polypeptid-Untereinheit von PS I
α	-	Quantenausbeute der Sauerstoffentwicklung
A ₀	-	Chlorophyll-Elektronenakzeptor im Reaktionszentrum von PS I
A1	-	Phyllochinon
Abb.	-	Abbildung
ABC	-	ATP binding cassette in Membrantransportproteinen
Abs	-	Absorption
ABTS	-	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure-Kation
ACE	-	ACGT-containig element, DNS-Bindestelle für Transkriptionsfaktoren
A _{max}	-	Maximale Photosyntheserate für CO ₂ -Aufnahme
<i>An11</i>	-	Gen in <i>Petunia axillaris</i> x <i>Petunia hybrida</i> cv. „Rose of Heaven“ für WD40-Protein kodierend
ANS	-	Anthocyanidin-Synthase
ANOVA	-	Analysis of variance
APX	-	Ascorbat-Peroxidase
ASE	-	Abschirmungseffekt
A _{SOD}	-	Aktivitätseinheit der Superoxiddismutase
AtTIP1	-	Tonoplast intrinsic protein 1, Aquaporin in <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
B	-	Polypeptid-Untereinheit von PS I
BG	-	Blaugrünläser
BF	-	Blattfläche
bHLH	-	Transkriptionsfaktor der Anthocyan-Biosynthese mit einer Helix-Loop-Helix-Domäne
bZIP	-	basic leucine zipper, Signalproteine
Bt	-	<i>Berberis thunbergii</i>
Bta	-	<i>Berberis thunbergii atropurpurea</i>
C	-	Polypeptid-Untereinheit von PS I
CA1P	-	2-Carboxy-D-Arabitinol 1-Phosphat, Inhibitor der Rubisco
CHI	-	Chalkonisomerase
CHS	-	Chalkonsynthase
Ci	-	Konfidenzintervall
CoA	-	Coenzym A
col	-	Columbia, Wildtyp von <i>A. thaliana</i>
CP24	-	Chlorophyllbindungsprotein des äußeren Antennensystems von PS II mit 24 kDa
CP26	-	Chlorophyllbindungsprotein des äußeren Antennensystems von PS II mit 26 kDa
CP29	-	Chlorophyllbindungsprotein des äußeren Antennensystems von PS II mit 29 kDa
CP43	-	Chlorophyllbindungsprotein des inneren Antennensystems

	-	von PS II mit 43 kDa
CP47	-	Chlorophyllbindungsprotein des inneren Antennensystems von PS II mit 47 kDa
Chl	-	Chlorophyll
¹ Chl	-	Chlorophyll im Singulettzustand
³ Chl	-	Chlorophyll im Triplettzustand
Chl a	-	Chlorophyll a
Chl b	-	Chlorophyll b
Chl _Z	-	Akzessorisches Chlorophyll im Reaktionszentrum von PS II
Cyt <i>b</i> ₆	-	Cytochrom <i>b</i> ₆ -Untereinheit des Cytochrom- <i>b</i> ₆ <i>f</i> -Komplexes
Cyt <i>b</i> ₆ <i>f</i>	-	Cytochrom- <i>b</i> ₆ <i>f</i> -Komplex
Cyt <i>f</i>	-	Cytochrom <i>f</i> -Untereinheit des Cytochrom- <i>b</i> ₆ <i>f</i> -Komplexes
DC	-	Dünnschichtchromatographie
DC.	-	Augustin-Pyramide de Candolle
D1	-	Protein des Reaktionszentrums von PS II
DCP	-	Diphenylcarbamid
DCIP	-	Dichlorophenolindophenol
DDC	-	Diethyldithiocarbamat
D2	-	Protein des Reaktionszentrums von PS II
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
DFR	-	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DHA	-	Dehydroascorbat
DPPH	-	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal
e ⁻	-	Elektron
ε _{ASC}	-	Extinktionskoeffizient von Ascorbat
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGL3</i>	-	Enhancer of glabrous3, Gen für bHLH-Protein kodierend
EGTA	-	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EW	-	Eichwert
EPS	-	Epoxidationsgrad
ETR	-	Elektronentransportrate
Φ	-	Maximale photosynthetische Quantenausbeute der Sauerstoffentwicklung
F3H	-	Flavonoid-3-Hydroxylase
F3'H	-	Flavonol-3'-Hydroxylase
F ₅₄₅	-	Chlorophyllfluoreszenz durch grünes Anregungslicht induziert
F ₆₅₀	-	Chlorophyllfluoreszenz durch rotes Anregungslicht induziert
F _A	-	Eisen-Schwefel-Zentrum im PS I
F _B	-	Eisen-Schwefel-Zentrum im PS I
F _{BG}	-	Chlorophyllfluoreszenz durch blaugrünes Anregungslicht induziert
Fd	-	Ferredoxin
Fe ₂ S ₂	-	Eisen-Schwefel-Cluster
FLS	-	Flavonolsynthase
F _m	-	Maximale Chlorophyllfluoreszenz
F _m '	-	Maximale Chlorophyllfluoreszenz im aktinischen Licht
F _{max}	-	Maximales Chlorophyll-Fluoreszenzverhältnis
FNR	-	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase

F_o	-	Chlorophyll-Grundfluoreszenz im Messlicht
F_v	-	Variable Chlorophyllfluoreszenz
F_v / F_m	-	Maximale photochemische Effizienz von PS II
F_x	-	Eisen-Schwefel-Zentrum im PS I
g	-	Schwerebeschleunigung
Gl.	-	Gleichung
GL3	-	Glabrous3, Gen für bHLH-Protein kodierend
Glc	-	Glykosid
h	-	Planck'sches Wirkungsquantum
H36860	-	Glutathion S-Transferase-Mutante von <i>A. thaliana</i>
HCA	-	Hydroxycinnamic acid, Hydroxyzimtsäure
Hepes	-	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Heynh.	-	Gustav Heynhold
HL	-	High light
HPLC	-	High performance liquid chromatography
HQI	-	Quecksilber-Halogen-Metaldampflampe
HY5	-	Long Hypokotyl5, bZIP-Transkriptionsfaktor in <i>A. thaliana</i>
I_K	-	Krümmungswert in photosynthetischen Lichtfluss-Effekt-Kurven
i.w.S.	-	Im weiteren Sinne
λ	-	Wellenlänge
λ_{em}	-	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	-	Exzitationswellenlänge
L.	-	Carl von Linné
LL	-	Low light
LAK	-	Lichtakklimatisationsstufe
LED	-	Light emitting diode
L_K	-	Lichtkompensationspunkt
LS	-	Lichtstufe
ler	-	Landsberg erecta, Wildtyp von <i>A. thaliana</i>
Lh	-	Lilia-Hybride
LhcI	-	Light harvesting complex, Lichtsammelkomplex von PS I
LhcII	-	Light harvesting complex, Lichtsammelkomplex von PS II
Linco.	-	Lincomycin
-log	-	Negativer dekadischer Logarithmus
m	-	Anstieg einer linearen Funktion
mAU	-	Milli absorption units
MDA	-	Malondialdehyd
Methylvio.	-	Methylviologen
MYB	-	Transkriptionsfaktor der Anthocyanbiosynthese, zur Myeloblastosis-Familie gehörend
n	-	Verschiebungskoeffizient
N	-	Stichprobenumfang
v	-	Wellenlängenabhängige Photonenfrequenz
NBT	-	Nitroblau-Tetrazolium
NG	-	Neutralgläser
NPK	-	Mineralischer Dünger

OEC	-	Oxygen evolving complex, Wasserspaltungsapparat am PS II
OEC17	-	OEC-Untereinheit mit 17 kDa
OEC23	-	OEC-Untereinheit mit 23 kDa
OEC33	-	OEC-Untereinheit mit 33 kDa
OGD	-	Oxoglutarat-Dioxygenase
p	-	Irrtumswahrscheinlichkeit
P680	-	Reaktionszentrum von PS II
P680 ⁺	-	Oxidiertes Reaktionszentrum von PS II
¹ [P680 ⁺ Phäo ⁻]	-	Rekombiniertes Radikalpaar im Singulettzustand im Reaktionszentrum von PS II
³ [P680 ⁺ Phäo ⁻]	-	Rekombiniertes Radikalpaar im Triplettzustand im Reaktionszentrum von PS II
P680 ⁺ Q _A ⁻	-	Erste stabile Ladungstrennung im Reaktionszentrum von PS II
P700	-	Reaktionszentrum von PS I
PAL	-	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
<i>PAP1</i>	-	Production of Anthocyanin Pigment 1, Gen für MYB-Protein kodierend
<i>PAP2</i>	-	Production of Anthocyanin Pigment 2, Gen für MYB-Protein kodierend
PAR	-	Photosynthetisch aktive Strahlung
PAM	-	Pulsamplitudenmodulation
PC	-	Plastocyanin
PCC	-	Pasteur Culture Collection
PDA	-	Photodiode array
Phäo	-	Phäophytin
Phäo ⁻	-	Reduziertes Phäophytin
PPFD	-	Photosynthetisch wirksame Photonenflussdichte
PPFD _{effect}	-	Effektive photosynthetisch wirksame Photonenflussdichte
PPFD _{ext}	-	Eingestrahlte photosynthetisch wirksame Photonenflussdichte
PS I	-	Photosystem I
PS II	-	Photosystem II
P _{max}	-	Maximale Photosyntheserate für Sauerstoffabgabe
Q _A	-	Primärer Elektronenakzeptor von PS II
Q _A ²⁻	-	Doppelt reduzierter primärer Elektronenakzeptor von PS II
Q _A H ₂	-	Protonierter primärer Elektronenakzeptor von PS II
Q _B	-	Sekundärer Elektronenakzeptor von PS II
q _P	-	Photochemische Löschung der Chlorophyllfluoreszenz
R	-	Funktionelle Gruppe am Phenylrest des Anthocyanmoleküls
R2R3	-	Strukturelle Ausprägung des MYB-Proteins in Pflanzen
R _D	-	Respirationsrate
rel.	-	relativ
REP	-	Rieske-Eisen-Protein als Untereinheit des Cytochrom- <i>b₆f</i> -Komplexes
RES	-	Reaktive elektrophile Spezies
RG	-	Rotgläser
Rubisco	-	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
SD	-	Standardabweichung

SEM	-	Standardfehler
SOD	-	Superoxiddismutase
Std	-	Standard
t	-	Zeit
T	-	Transmission
Tab.	-	Tabelle
TAC	-	Total antioxidative capacity
TBA	-	Thiobarbitursäure
TEP	-	Tetraethoxypropan
TKS	-	Torfkultursubstrat
t _R	-	Retentionszeit
TRIS	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tt	-	Transparent Testa
tt3	-	DFR-Mutante von <i>A. thaliana</i>
tt7	-	F3'H-Mutante von <i>A. thaliana</i>
TT8	-	Transparent Testa 8, Gen für bHLH-Protein kodierend
tt19	-	Glutathion S-Transferase-Mutante von <i>A. thaliana</i>
TTG1	-	Transparent Testa Glabra1, Gen für WD40-Protein kodierend
Tyr	-	Tyrosin
Tyr _D	-	Tyrosin gebunden an das D2-Protein
Tyr _Z	-	Tyrosin gebunden an das D1-Protein
Tyr _Z ⁺ (P680 ⁺)Q _A ⁻	-	Ladungsrekombination im Reaktionszentrum von PS II bei Verlust der Wasserspaltung
U	-	Spannung
UV	-	Ultraviolette Strahlung im Bereich von 280 bis 400 nm
UV-A	-	Ultraviolette Strahlung im Bereich von 315 bis 400 nm
UV-B	-	Ultraviolette Strahlung im Bereich von 280 bis 315 nm
VAZ	-	Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin als Pigmente des Xanthophyll-Zyklus
VDE	-	Violaxanthin-Deepoxidase
VF	-	Verdünnungsfaktor
v/v	-	Volumenanteil
v/w	-	Volumenanteil bezogen auf das Gewicht
WD40	-	Transkriptionsfaktor der Anthocyanbiosynthese, Protein mit wiederkehrenden Sequenzmotiven, die auf Tryptophan und Asparaginsäure enden (WD)
w/v	-	Gewichtsanteil bezogen auf das Volumen

1 Einleitung

1.1 Hypothesen zur Funktion von Anthocyanen in Blättern Höherer Pflanzen

Neben dem grünem Chlorophyll und gelben Carotinoiden bestimmen vor allem rot erscheinende Farbstoffe, die in der Regel zur Gruppe der Anthocyane gehören, das äußere Erscheinungsbild Höherer Pflanzen. Die Anthocyane werden sowohl in den generativen als auch in den vegetativen Organen gebildet. Während allgemein akzeptiert ist, dass durch die Pigmente Blüten für potentielle Bestäuber attraktiv erscheinen und sie in Früchten einen ausreichenden Reifegrad für die zoochore Verbreitung der Samen signalisieren, besteht in der derzeitigen Diskussion Uneinigkeit über die Rolle von Anthocyanen in Blättern. Auf der Suche nach einer Funktion der auffälligen Farbstoffe in den pflanzlichen Photosyntheseorganen sind bereits sehr unterschiedliche Hypothesen formuliert worden.

Ausgehend von deren molekularen Eigenschaften erstrecken sich die Überlegungen von Gedanken zur photoprotektiven Wirkung bis hin zu Ideen einer ökologischen Einbindung der Pigmente in Pflanze-Tier-Interaktionen. Besonders die in der Natur ausschließlich vorkommende Glykosylierung des Moleküls lässt sich mit mehreren Hypothesen verknüpfen. In ihren zusammenfassenden Darstellungen weisen Chalker-Scott (1999) und Steyn et al. (2002) unter anderem darauf hin, dass Anthocyane in Blättern ausdauernder Pflanzen akkumulieren, wenn die Umgebungstemperaturen ein kritisches Minimum unterschreiten. Als osmotisch wirksame Substanz wären Anthocyane in der Lage, den Gefrierpunkt des Gewebes abzusenken und die an den Kristallisationskeimen der Blattoberfläche einsetzende Frosteinwirkung zu verzögern (Chalker-Scott 1999). Andererseits wäre die durch die Phenole vermittelte Osmoregulation auch von Nutzen, wenn durch ein negatives Wasserpotential die Evapotranspiration bei Trockenstress minimiert wird (Chalker-Scott 1999). Die Photoinduktion der Anthocyan-Biosynthese durch UV-Strahlung hingegen führt zur Annahme, dass die Pigmente, obwohl sie oftmals nur vorübergehend gebildet werden und ihre UV-Absorption geringer ist als die farbloser Flavonole oder einfacher phenolischer Säuren (Steyn et al. 2002), als Schutzpigmente zur Vermeidung von Schäden an photosensitiven Strukturen in den Blättern eingelagert werden (Close und Beadle 2003). Die Absorption der kurzwelligeren UV-Strahlung basiert auf einer häufig auftretenden Acylierung des Moleküls mit Hydroxycinnamoyl-Derivaten (Chalker-Scott, 1999, Manetas 2006). Weiterhin bestehen auch gerade im Hinblick auf die stressinduzierte Synthese der Anthocyane Anzeichen dafür, dass die hohe antioxidative Kapazität der Anthocyane von den Pflanzen genutzt wird, um unter limitierenden Wachstumsbedingungen reaktive Sauerstoffspezies zu detoxifizieren (Gould 2004, Hughes 2011).

Die oben vorgestellten Erklärungsansätze berücksichtigen jedoch nicht die auffälligste Eigenschaft der Anthocyane, die Absorption von grünem Licht. In Anlehnung an Manetas (2006) ist es nicht plausibel, warum die Entwicklung von Frostresistenz, die Osmoregulation, die Etablierung eines UV-Schutzes oder die antioxidative Wirkung in Kombination mit der Absorption von sichtbarer Strahlung auftreten sollte. Die vakuoläre Einlagerung der Anthocyane könnte vielmehr dem Schutz vor Herbivoren und Phytophagen dienen. Im Sinne einer aposematischen Färbung könnten Anthocyane ein Warnsignal darstellen, das bei einer gleichzeitigen Einlagerung von einfachen Phenolen oder anderen Sekundärmetaboliten auf eine konkrete Toxizität der Blätter hinweist oder diese bei einem Fehlen der Substanzen nur vortäuscht (Gould 2004, Manetas 2006, Hughes 2011). Allerdings wäre das Signalisieren einer chemischen Abwehr gegenüber Insekten fragwürdig. Da die Photorezeptoren des Insektenauges

Einleitung

neben UV-A-Strahlung und blauem Licht vor allem für Strahlung aus dem grünen Spektralbereich eine maximale Sensitivität aufweisen, wäre die Maskierung von Chlorophyll zur Vermeidung von Phyllophagie und Oviposition ein effektiverer Fraßschutz (Manetas 2006, Ougham et al. 2008, Archetti 2009).

Im Hinblick auf die optischen Eigenschaften der Anthocyane lässt sich alternativ die Hypothese formulieren, dass die Pigmente eine photoprotektive Wirkung gegenüber den sensitiven Strukturen des Photosyntheseapparates besitzen könnten (Steyn et al. 2001, Close und Beadle 2003, Neill und Gould 2003).

Jedoch bestehen Zweifel an der schützenden Wirkung der Anthocyane (Manetas 2006). Als potentielle Lichtschutzpigmente sollten Anthocyane das Absorptionsspektrum von Chlorophyll nachzeichnen. Durch ihre maximale Absorption von grünem Licht, das aber zum einen im spektralen Anregungsminimum von Chlorophyll liegt und zum anderen hauptsächlich von Chloroplasten tief im Blattinneren, deren Bedarf an Strahlungsschutz aufgrund der zahlreichen vorgelagerten Chloroplasten aber fragwürdig erscheint, nur für eine relativ geringe Photosyntheserate genutzt wird (Manetas 2006), muss auch diese Hypothese kritisch betrachtet werden.

1.2 Akkumulation von Anthocyanen in Blättern

Interessanterweise ist die Rotfärbung von Blättern durch Anthocyane nicht nur im saisonalen Verlauf der Blattentwicklung zu erkennen. Sie tritt auch häufig dann auf, wenn sich diverse Wachstumsfaktoren außerhalb des Optimums befinden. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass Anthocyane in Blättern immer dann synthetisiert werden, wenn die enzymatische Carboxylierung beeinträchtigt wird und in der Folge das Gleichgewicht zwischen photosynthetischem Elektronentransport und dem Calvin-Benson-Zyklus gestört ist.

In Blättern von *Spirodela polyrhiza* und *Solanum lycopersicum* induzierte Stickstoffmangel die Synthese von Anthocyanen bereits unter moderaten Lichtverhältnissen, wobei die Synthese noch verstärkt werden konnte, wenn der Nährstoffmangel mit hohen Quantenflussmengen kombiniert wurde (Kumar und Sharma 1999, Løvdal et al. 2010). Ebenso förderte Phosphatmangel die Einlagerung dieser Pigmente, deren Erscheinen in den Blattzellen durch die Erhöhung des Gehaltes an inorganischem Phosphat aber reversibel war (Juszczuk et al. 2004, Müller et al. 2004). Neben Trockenheit, die auf der Organebene Anthocyane in ausgereiften und sich entwickelnden Blättern hervorbrachte (Taulavuori et al. 2010) und die auf submikroskopischen Niveau sogar den Grad der Hydroxylierung bzw. der Methoxylierung des Moleküls bestimmte (Castellarin et al. 2007), bewirkte überdies Kühle die Entstehung des Pigmentes. Schon nach wenigen Tagen stieg der Gehalt an Anthocyanen in Blättern von *Oenanthe stolonifera* um das Vierfache, wenn die Umgebungstemperatur von 25 °C auf 12 °C abgesenkt wurde (Hasegawa et al. 2001). Die gleichzeitige Behandlung von Pflanzen mit photosynthetisch aktiver Strahlung scheint für die temperaturabhängige Induktion aber eine Voraussetzung zu sein (Chalker-Scott 1999). Im Gegensatz dazu ist die Verwendung von hohen Photonenflussdichten aber auch als einzelner Faktor ausreichend, um die Anthocyan-Neubildung zu fördern (Kimura et al. 2003). Sie wird dabei hauptsächlich von der Strahlungs-dosis bestimmt (Beckwith et al. 2004).

Als erster Anhaltspunkt für eine Lichtschutzwirkung von Anthocyanen in Blättern kann somit jene Situation angesehen werden, dass dem zunehmenden Risiko einer Deaktivierung der Photosysteme die sekundäre Blattpigmentierung mit den roten Polyphenolen gegenübersteht.

1.2.1 Struktur und Biosynthese der Anthocyane

Anthocyane sind wasserlösliche Glykoside der Anthocyanidine, die zusätzlich noch in Verbindung mit aromatischen Säuren vorliegen können. Sie gehören innerhalb der Polyphenole zu den Flavonoiden und gehen aus dem Phenylpropanoid-Syntheseweg der Pflanzen hervor. Der Chromophor des Moleküls ist das Aglykon mit einer C6-C3-C6 Konfiguration, die aus zwei aromatischen Ringen besteht (Abb. 1.1 B). Die Grundstruktur bildet dabei ein Sauerstoff enthaltender Heterozyklus, an den ein Benzolring ankondensiert ist (Timmins et al. 2002). Das so formierte Benzopyrylium-Kation trägt an Position 2 einen Phenylrest, dessen Substituenten die verschiedenen Anthocyane entstehen lassen (Abb. 1.1 A und B). Die Monosaccharide Glucose, Arabinose, Xylose, Rhamnose und Galactose stabilisieren das Molekül auch als Di- und Trisaccharide über eine O-glykosidische Bindung an Position 3 und 5 des Benzopyrylium-Kations. Zu den phenolischen Säuren, die über eine acylierte Bindung an die Einfachzucker die Komplexität der möglichen Molekülstrukturen vergrößern, gehören Kaffeensäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und Cumarsäure. In der zytosolischen pH-Umgebung tritt das Molekül in seiner farblosen Form als Pseudobase (Abb. 1.1 C) auf und erlangt seine Farbausprägung erst nach dem Transfer in die Vakuole.

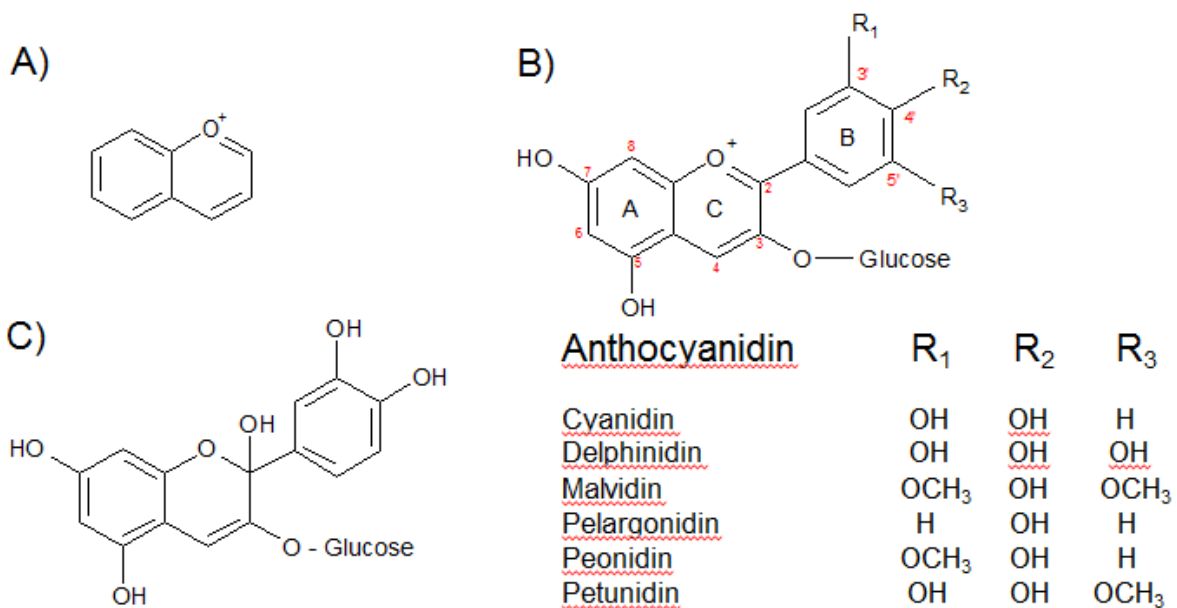


Abbildung 1.1: A) Die Grundstruktur der Anthocyane ist ein Benzopyrylium, das aus einem sauerstoffhaltigem Pyranring mit einem ankondensierten Benzolring besteht. B) Die Substituierung des Phenylrestes (Ring B) bestimmt die molekulare Struktur und die Farbausprägung der 6 häufigsten Anthocyane (vgl. Tabelle). C) Farblose Form des Moleküls, hier als Cyanidin-Carbinol-Pseudobase, die unter zytosolischen Bedingungen vor der Einlagerung der Pigmente in die Vakuole vorliegt.

Die Enzyme des Phenylpropanoid-Syntheseweges sind in einem globulären Multi-Enzym-Komplex angeordnet (Winkel-Shirley 2001). Vermutlich verankern Hydroxylasen der Cytochrom P450 Familie den Komplex in der Membran des endoplasmatischen Retikulums an dessen zytosolischer Seite (Winkel-Shirley 2001).

Einleitung

Zu Beginn der Anthocyanbiosynthese wird Phenylalanin, das aus dem Shikimi-Säure-Weg hervorgeht, über das Eingangsenzym des Phenylpropanoid-Syntheseweges, Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), in *trans*-Zimtsäure umgewandelt (Abb. 1.2). Die PAL-Aktivität, die den primären Stoffwechsel mit dem sekundären verknüpft, unterliegt beispielsweise der Kontrolle durch Stickstoffverfügbarkeit und Temperatur (Olsen et al. 2008). Der Ausfall des Enzyms hat weitreichende Folgen für das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen. In *Arabidopsis thaliana* trat eine reduzierte Lignifizierung des vaskulären Gewebes in Kombination mit einer ausbleibenden Pollenbildung und einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Strahlung auf (Huang et al. 2010). Im weiteren Verlauf katalysieren die Zimtsäure-4-Hydroxylase und die 4-Cumarat-CoA-Ligase mit dem 4-Cumaroyl CoA eine der beiden strukturgebenden Vorläufersubstanzen. Anschließend erzeugt das Schlüsselenzym des Syntheseweges, die Chalconsynthase (CHS), mit der Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA die Grundstruktur der Flavonoide (Abb. 1.2). Ebenso wie die Aktivität der PAL wird die Funktion der CHS durch Umwelteinflüsse stimuliert. Auf der Transkriptionsebene hat insbesondere Licht einen entscheidenden Einfluss auf den terminalen Abschnitt der Signaltransduktion (Sakuta 2000) und auf die Menge der Transkripte (Leyva et al. 1995). In ausdifferenzierten Blättern von *A. thaliana* regulierten blaues Licht / UV-A Strahlung über Cryptochrom 1 und der UV-B-Induktionsweg die Expression der CHS mit teilweise synergistischen Effekten (Wade et al. 2001).

Nach der Isomerisation des Chalkons zum farblosen Naringenin variieren Enzyme der 2-Oxoglutarat-Dioxygenase Familie (OGD) und der Cytochrom P450 Familie die Anzahl der Hydroxylgruppen am Phenylrest (Abb. 1.2) und bestimmen so die spätere Farbausprägung der Anthocyane (Tanaka et al. 2008). Die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR), die als essentiellen Cofaktor NADPH bindet, katalysiert im Anschluss daran die Bildung der farblosen, instabilen Leucoanthocyanidine mit einer hohen Substratspezifität gegenüber der jeweiligen Substituentenbelegung am Phenylrest (Holton und Cornish 1995, Martens et al. 2002). Aus der folgenden Reaktion mit der Anthocyanidin-Synthase (ANS), deren Transkription gegenüber der Expression der Eingangsenzyme des Flavonoid-Syntheseweges zeitlich versetzt ist (Pelletier et al. 1997), gehen die eigentlichen Vorstufen des farbigen Polyphenols hervor. Mit Hilfe von rekombinanter ANS konnte der Reaktionsweg dieses wichtigen Abschnittes in der Anthocyan-Biosynthese aufgeklärt werden (Saito et al. 1999). In einem ersten Schritt bindet die ANS Fe^{2+} , das als katalytisches Zentrum dient, und formt mit molekularem Sauerstoff und 2-Oxoglutarat den Initialkomplex der Reaktion. Unter der Abgabe von CO_2 und Succinylsäure wird das Enzym aktiviert. Vorstellbar erscheint dann eine Hydroxylierung von Leucoanthocyanidin (2-Flavan-3,4-diol) an Position 2 oder 3 mit der folgenden spontanen Bildung von 2-Flaven-3,4-diol und H_2O . Die Isomerisation der Hydroxylgruppe und die Verschiebung der Doppelbindung bringen das thermodynamisch stabilere 2-Flaven-2,3-diol Molekül hervor (Saito et al. 1999, Nakajima et al. 2001).

Im Vergleich mit der DFR weist die ANS, z. B. aus *A. thaliana*, eine flexiblere Substrataffinität auf (Martens et al. 2010). Neben der Bildung von Anthocyanidinen folgt sie in ihren Reaktionsmöglichkeiten der Funktion der Flavonolsynthase und vermittelt die Umwandlung von Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin zu Kämpferol und Quercetin. Als Ursache dafür werden die homologen Verhältnisse an den aktiven Seiten der Enzyme angesehen, die einheitliche Bindungsstellen für Fe^{2+} und 2-Oxoglutarat aufweisen (Martens et al. 2010).

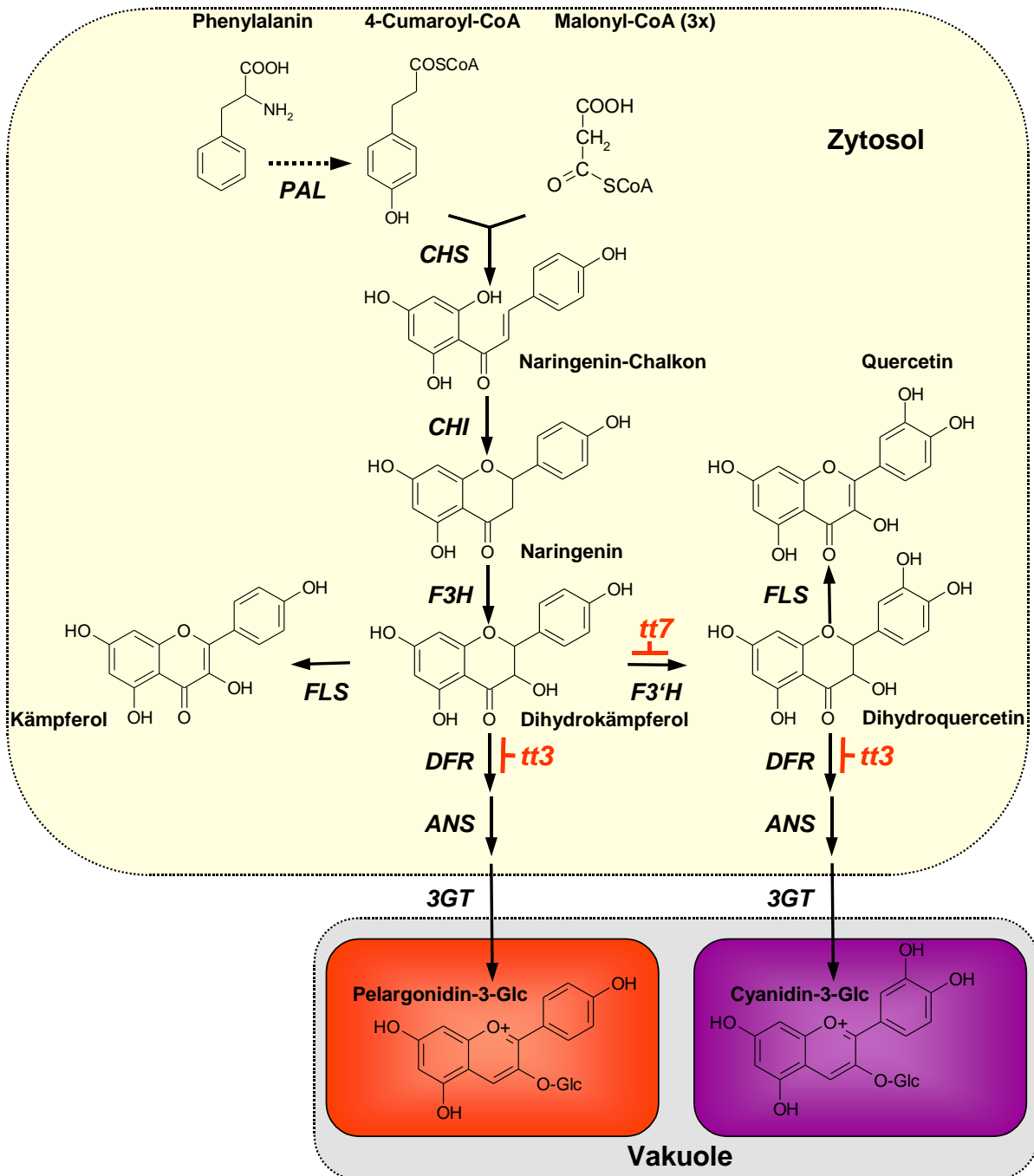


Abbildung 1.2: Biosyntheseweg der Anthocyane. Der überwiegende Teil der Reaktionen findet im Zytosol statt, während die stabilisierende Glykosylierung den Export der Anthocyane in die Vakuole einleitet. PAL - Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, CHS - Chalconsynthase, CHI - Chalconisomerase, F3H - Flavonoid-3-Hydroxylase, F3'H - Flavonol-3'-Hydroxylase, FLS - Flavonolsynthase, DFR - Dihydroflavonol-4-Reduktase, ANS - Anthocyanidin-Synthase, 3GT - Anthocyanin-3-O-Glycosyltransferase. Rot gekennzeichnet sind die Deletionsstellen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transparent Testa Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, *tt3* und *tt7*, die dadurch vom Aktivitätsverlust der DFR bzw. der F3'H betroffen sind.

Einleitung

Die Flavonoid 3-O-Glycosyltransferase (3-GT) stabilisiert das immer noch relativ labile 2-Flaven-2,3-diol Molekül durch die Anlagerung von Glucose an das zentrale Ringsystem unter den pH-neutralen Bedingungen des Zytosols (Saito und Yamazaki 2002). Die Reaktion ist gegenüber dem Zielsubstrat relativ unspezifisch. Sowohl die wichtigsten Anthocyanidine als auch die Hauptvertreter der Flavonole wurden vom Enzym *in vitro* akzeptiert (Yamazaki et al. 2002, Yoshihara et al. 2005). Hingegen besteht für die Donorseite der 3-GT eine strikte Präferenz für UDP-Glucose (Ford et al. 1998), deren funktioneller Bestandteil ausschließlich an Position 3 des Benzopyryliums gebunden wird (Kovinich et al. 2010).

Der abschließende Transport der Anthocyane wird durch Glutathion S-Transferasen eingeleitet. Durch die kovalente Bindung von Glutathion an die heterozyklischen Anthocyane entstehen Glutathion S-Konjugate, die über membranständige Glutathionpumpen in die Vakuole transferiert werden (Marrs et al. 1995). In transformierten Hefezellen konnte gezeigt werden, dass für den Transport des Pigmentes kein Protonengradient an der Membran notwendig war. Vielmehr übernehmen MgATP-getriebene ABC-Transporter die Einlagerung der Anthocyane in die Vakuole (Lu et al. 1997). In einer erweiterten Modellvorstellung bilden die Anthocyane keine Konjugate, sondern binden direkt an die Glutathion S-Transferase, die im Vergleich verschiedener Pflanzenarten hoch konservierte Bindungsstellen für bestimmte Anthocyane enthalten (Conn et al. 2008). Das Protein könnte als Carrier dienen und die Kompartimentierung des Polyphenols im Co-Transport mit reduziertem Glutathion vermitteln (Mueller et al. 2000). Die Analyse der *Arabidopsis*-Mutanten *tt19* und H36860 ergab, dass unabhängig davon, welcher Mechanismus der vakuolären Sequestrierung von Flavonoiden zugrunde liegt, verschiedene Transportwege nebeneinander existieren können und artspezifisch auftreten (Kitamura et al. 2004).

1.2.2 Regulation der Anthocyan-Biosynthese

Erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der Anthocyane am Lichtschutz lassen sich vor allem in der Regulation ihrer Synthese erkennen. Hier bestimmen photosynthetisch relevante Umweltfaktoren maßgeblich die Reaktion des Sekundärmetabolismus. Vorrangig auf transkriptionaler Ebene wird der Einfluss dieser Faktoren auf die Genexpression des Flavonoid-Biosyntheseweges deutlich. Es ist bekannt, dass an der Regulation des letzten Abschnittes, der die Struktur der Anthocyane festlegt, Polypeptide mit einer MYB-Domäne bzw. einer Helix-Loop-Helix-Domäne (bHLH) und WD40 Proteine beteiligt sind. Obwohl der MYB-Faktor direkt an den regulatorischen Bereich des Promotors binden kann, unterbleibt die Aktivierung der Transkription. Erst ein Komplex aus WD40-Protein, MYB-Faktor und bHLH-Polypeptid initiiert die Expression der jeweiligen Strukturgene (Mol et al. 1998, Koes et al. 2005). Die meisten MYB-Transkriptionsfaktoren des Phenylpropanoid-Syntheseweges besitzen zwei N-terminale Wiederholungssequenzen mit einer doppelten und einer dreifachen MYB-Domäne, sie sind demnach R2R3-Proteine. Der R2-Abschnitt stellt die DNS-Bindestelle dar, während der R3-Bereich mit der primären α -Helix des bHLH-Proteins interagiert. Über das C-terminale Ende regulieren die MYB-Proteine mit der Expression des Zielgens sehr spezifisch die einzelnen Zweige des Syntheseweges (Ramsay und Glover 2005, Hichri et al. 2011). Nicht katalytisch wirksame WD40-Proteine, deren β -Propellerstruktur aus der bis zu 16fachen Aneinanderreihung hoch konservierter Aminosäuresequenzen resultiert, stabilisieren den Komplex der Transkriptionsfaktoren. Bei ihrer Translokation aus dem Zytosol in den Zellkern sind die WD40-Proteine bereits mit bHLH-Proteinen assoziiert (Ramsay und Glover 2005, Hichri et al. 2011).

Einleitung

Für diverse Wachstumsfaktoren konnte bereits gezeigt werden, dass Signale aus veränderten Umweltbedingungen in der Lage sind, die einzelnen Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. In *A. thaliana* konnten unter Stickstoffmangel erhöhte Gen-Expressionslevel von *PAP1* bzw. *PAP2*, die für MYB-Proteine kodieren, und von *GL3* (bHLH-Protein) nachgewiesen werden (Lea et al. 2007). Überraschenderweise zeigte das *EGL3*-Gen, das zum *GL3* stark homolog ist, keine Induktion. Ebenso wenig war die Expression von *TTG1* betroffen, so dass die Abundanz des dazugehörigen WD40-Proteins unbeeinflusst war (Lea et al. 2007). Weitere Untersuchungen deuten auf Doppelfunktionen der regulativen Proteine hin. Aufgrund des Ausbleibens der Anthocyane in Blättern der *gl3*-Mutante bei Stickstoffmangel und der nachgewiesenen Interaktion zwischen dem *GL3*-Protein und einem inhibierenden MYB-Faktor (*MYBL2*) der Expression der Dihydroflavonol-Reduktase (*DFR*) ergibt sich die Vermutung, dass bei einem limitierten Stickstoffangebot *GL3* sowohl *MYBL2* bindet und damit den Inhibitor deaktiviert, als auch die Transkription der *DFR* einleitet (Feyissa et al. 2009).

Ein weniger differenziertes Expressionsmuster ergibt sich durch die Konfrontation von Pflanzen mit kühlen Umgebungstemperaturen. Nach 24 h unter hohen Photonenflussdichten in kühler Umgebung war mit *PAP1*, *TT8*, *EGL3* und *GL3* die Mehrzahl der Transkriptionsfaktorgene, die für die Regulation der Anthocyanbildung von Bedeutung sind, in den Blättern von *A. thaliana* hochreguliert (Rowan et al. 2009). Zeitlich versetzt folgte die zunehmende Expression des *TTG1*-Gens, das für WD40-Proteine kodiert (Rowan et al. 2009). Analogien dazu treten auf, wenn die Transkriptionsdynamik der einzelnen Gene in Bezug auf Temperaturänderungen analysiert wird. Sank die Temperatur kontinuierlich von 20 °C auf 5 °C, offenbarten *PAP1*, *PAP2* und *GL3* ein ähnliches Ansprechverhalten bei der Erhöhung der Transkriptmengen. Einzig *EGL3* reagierte erst bei 5 °C (Olsen et al. 2009).

Bemerkenswerterweise ist es jedoch hauptsächlich Licht, das den ternären Transkriptionskomplex entstehen lässt und so die Synthese der Anthocyane reguliert. Bis auf *TTG1*, das konstitutiv exprimiert wurde, nahm die Zahl der Transkripte aller Regulationsgene der Anthocyan-Biosynthese bei der Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit Weißlicht zu. Insbesondere die Expression der beiden MYB-Faktoren, *PAP1* und *PAP2*, ging der Transkription der bHLH-Proteine voraus (Cominelli et al. 2008). Auch bei der Verwendung von blauem Licht und UV-A Strahlung bestätigte sich diese Sensitivität. Unter UV-B Exposition reagierten nur noch *PAP1* und *EGL3* (Cominelli et al. 2008). Die essenzielle Bedeutung der MYB-Faktoren bei der lichtinduzierten Bildung von Anthocyanen unterstreichen Experimente mit transgenen Petunien. In Anwesenheit des zusätzlichen bHLH-Proteins *Lc* (*Lc* – Leaf color) aus Mais, das wie *An11* (WD40-Protein) in den Blättern konstitutiv exprimiert vorlag, konnte die durch hohe Quantenflussmengen hervorgerufene Akkumulation von Anthocyanen mit dem Einschleusen eines externen MYB-Faktors aus *Antirrhinum* in ihrem Umfang auch unter Schwachlichtbedingungen reproduziert werden (Albert et al. 2009). Dagegen ist die Relevanz der bHLH-Proteine bei der durch Licht hervorgerufenen Pigmentbildung nicht eindeutig bestimmbar. Zwar trat in Blättern von *Lilia*-Hybriden im Licht eine erhöhte Transkriptionsmenge der *LhbHLH1* und *LhbHLH2* Gene, die Sequenzen für bHLH-Faktoren enthalten, in Kombination mit einem retardierten Erscheinen der Anthocyane auf, jedoch blieb das Transkriptionsniveau auch bei bereits wieder degradierten Pigmenten bestehen (Nakatsuka et al. 2009).

Es ist auszuschließen, dass die Transkriptionsfaktoren an den primären Prozessen der Transduktion des Lichtsignals selbst beteiligt sind. Ein Kandidat für die direkte Wechselwirkung mit den Photorezeptoren ist *HY5*, ein konstitutiv gebildetes, nukleäres bZIP-Protein (basic leucine zipper). Über die Bindung an die G-Box aktiviert es den Promotor des Zielgens, offenbar

auch in Wechselwirkung mit anderen, lichtinduzierten Transkriptionsfaktoren, aus der regulative Heterodimere hervorgehen können (Chattopadhyay et al. 1998, Holm et al. 2002). Für „frühe“ und „späte“ Strukturgene der Flavonoid-Biosynthese wurde dieser Aktivierungsweg nachgewiesen. HY5 und weitere Polypeptide der Lichtsignalkette banden separat an den Promotor der Synthesegene, wobei HY5 in seiner Kopplungsaffinität *in vivo* nicht auf die G-Box beschränkt zu sein scheint, sondern verschiedene Motive innerhalb der ACE-Familie (ACGT-containing element) erkannte (Lee et al. 2007, Shin et al. 2007). Die lichtabhängige Aktivierung des Promotors setzt aber die gleichzeitige Anlagerung eines MYB-Proteins voraus. Erst durch die Interaktion beider Faktoren entfaltet sich die optimale Lichtwirkung auf den Promotor (Hartmann et al. 2005). Neuere Erkenntnisse bestätigen die Vermutung, dass die Transkriptionsfaktoren selbst dem HY5-Regulationsprinzip unterworfen sind. In *hy5* Mutanten von *A. thaliana* entfiel unter UV-B und photosynthetisch aktiver Strahlung der Transkriptmengenwuchs von MYB12, einem R2R3-Protein, das im Licht an der Genexpression der Chalkonsynthese, der Chalkonisomerase und der Flavonolsynthese beteiligt ist (Stracke et al. 2010).

Zusammengenommen ergibt sich für die Anthocyan-Biosynthese das Modell einer mehrstufigen Transkriptionsregulation, die lichtabhängig ist. Zuerst initiieren photoaktivierte Proteine, darunter HY5, durch die Bindung an den Promotor die Genexpression der Transkriptionsfaktoren. Anschließend kontrollieren aufgrund diverser Umweltsignale diese Faktoren, die vermutlich einen ternären Komplex bilden, gemeinsam mit homo- bzw. heterodimerem HY5 die Transkription der Strukturgene.

1.2.3 Lokalisation der Anthocyane im Blatt

Im Hinblick auf einen wirkungsvollen Lichtschutz ergeben sich in Anlehnung an Lee (2002) für die Anthocyane effektive und weniger wirkungsvolle Verteilungsmuster im Blattgewebe.

Die Analyse der Anthocyanverteilung in Blättern von 399 tropischen Pflanzenarten offenbarte für die Blattentfaltung und die Seneszenz ein variables Vorkommen der Pigmente. Neben der adaxialen und abaxialen Epidermis wurden Anthocyane auch in der Hypodermis, im Palisadenparenchym, im Schwammparenchym, in Bündelscheidenzellen und in Trichomen gefunden (Lee 2002). Von den 127 Einlagerungsmöglichkeiten im Blattgewebe traten während der beiden Entwicklungsstadien in 90 % der Fälle jedoch nur 9 bzw. 7 vor allem exponierte Pigmentakkumulationen auf (Lee 2002, Abb. 1.3). In tropischen Pflanzen werden während der Frühphase der Blattentwicklung, die mit der photosensiblen Chlorophyllsynthese und der Etablierung des Photosyntheseapparates einhergeht, Anthocyane gebildet. Sie wurden dann überwiegend in den Palisadenzellen und im Schwammparenchym synthetisiert (Woodall und Stewart 1998, Lee 2002). Auch Pflanzen der gemäßigten Klimazone lassen in juvenilen Blättern eine vergleichbare Pigmentverteilung erkennen. In Blättern von *Acer rubrum* und *Liquidambar styraciflua* waren Anthocyane solange präsent, bis 50 % des Chlorophyllgehaltes ausgereifter Blätter erreicht wurden und das bereits ausdifferenzierte Mesophyll eine photosynthetische Kapazität von 60 bzw. 40 % des in der Blattrife feststellbaren Maximalwertes aufwies (Hughes et al. 2007). Sogar über längere Zeiträume akkumulieren Anthocyane in bereits ausdifferenzierten Blättern. Es sind dann einzelne Gewebe oder Gewebekombinationen, die in den meisten Fällen photosynthetisch aktive Zellen besitzen (Gould und Quinn 1999). Oft zeigen mehrjährige Pflanzen in ihrer Überwinterungsphase die auffällige, relativ beständige Pigmentierung, die eine photoprotektive Wirkung aufweisen könnte. Wurden Blätter von *Galax urceolata*, die im Jahresverlauf bei kühler werdenden Temperaturen in ihren exponierten Mesophyllzellen

Einleitung

Anthocyane einlagerten, hohen Quantenflussmengen ausgesetzt, zeigten rote Blätter eine weniger ausgeprägte Deaktivierung von Photosystem II als die anthocyanfreien Vergleichspartner (Hughes et al. 2005, Hughes und Smith 2007a).

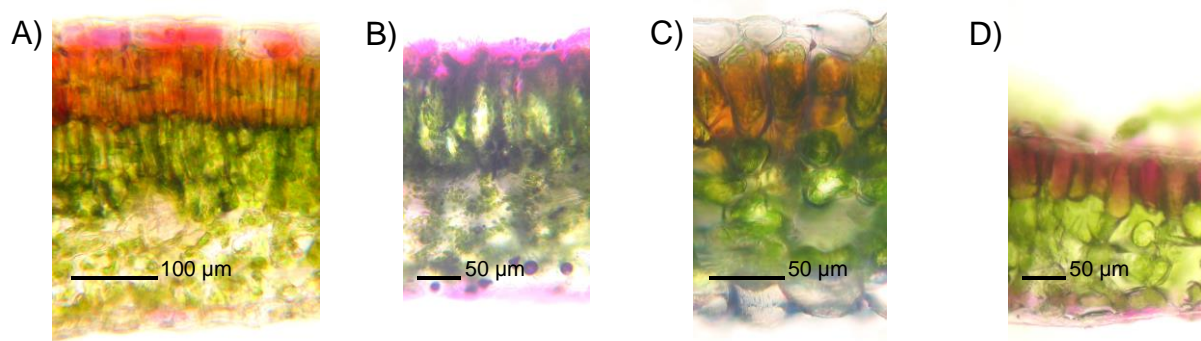


Abbildung 1.3: Lokalisation von Anthocyanen in Blättern ausdauernder und annueller Pflanzen. A) Blattquerschnitt eines sonnenexponierten Blattes von *Fagus sylvatica purpurea* (Fagaceae) aus dem Botanischen Garten der Universität Kiel mit der Akkumulation von Anthocyanen in der adaxialen Epidermis und der ersten Zellreihe des Palisadenparenchyms. B) Blattquerschnitt von *Ocimum basilicum* cv. „Dark Opal“, dessen Pflanzen bei 21 °C unter einer PPFD von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit einer Photoperiode von 16:8 h in Klimakammern kultiviert wurden, mit der Einlagerung von Anthocyanen in die Vakuolen der adaxialen und abaxialen Epidermis. C) Blattquerschnitt von *Berberis thunbergii atropurpurea*, bei dem die Synthese der roten Polyphenole auf das Palisadenparenchym begrenzt ist (gleiche Kultivierungsbedingungen wie unter 1.3 B). D) Blattquerschnitt des Wildtyps (ler) von *Arabidopsis thaliana* mit der Akkumulation von Anthocyanen in beiden Epidermen und dem Palisadenparenchym. Die Induktion der Anthocyan-Biosynthese erfolgte durch einen Transfer der Pflanzen von 21 °C nach 9 °C mit einer Verdopplung der Tageslänge auf 16 h unter Beibehaltung der PPFD in Höhe von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lichtmikroskopische Aufnahmen erstellt mit einem Mikroskop (SM-Lux, Leitz, Wetzlar, Deutschland) und einer Digitalkamera (Powershot 80A, Canon, Tokio, Japan).

Ein vielfach zu beobachtendes Phänomen ist die Rotfärbung von Blättern während der herbstlichen Seneszenz. Im letzten Stadium der Blattentwicklung ist die Umwandlung von Chloroplasten in Gerontoplasten mit dem Risiko verbunden, dass phototoxische Degradationsprodukte des Chlorophyllabbaus die enzymatische Resorption des Stickstoffs einschränken (Hoch et al. 2003). Bemerkenswerterweise lagen die Anthocyane, die mitten in der Seneszenz bei einem Chlorophyllverlust von etwa 30 % *de novo* synthetisiert wurden, dann fast ausschließlich in lichtexponierten, Chloroplasten enthaltenden Palisadenzellen vor (Lee et al. 2003). Für den optimalen Ablauf des mit der Seneszenz assoziierten Nährstoffexportes scheint ein Mindestmaß an intakten Photosystemen unerlässlich zu sein. Unter dem Pigmentschirm von Anthocyanen war die Ladungstrennung von Photosystem II im Vergleich mit gelben seneszierenden Blättern in der Spätphase der Seneszenz länger stabil, und PS II wurde unter hohen Photonenflussdichten weniger deaktiviert, so dass der Stickstofftransfer aus den Blattzellen effektiver voranschritt (Schaberg et al. 2003, Hoch et al. 2003, Feild et al. 2001).

1.3 Lichtschutzfunktion der Anthocyane durch die Absorption photosynthetisch aktiver Strahlung

Die oxygene Photosynthese der Pflanzen ist mit dem Risiko verbunden, dass bei einer übermäßigen Strahlungsabsorption der Photosyntheseapparat irreversibel geschädigt wird (Long et al. 1994). Besonders in der Sensitivität von Photosystem II gegenüber exzessivem Licht könnte die mögliche Lichtschutzwirkung von Anthocyanen begründet liegen. Exzessives Licht entsteht immer dann, wenn oberhalb einer bestimmten Strahlungsstärke der Photosyntheseapparat in den vom Licht unabhängigen Reaktionen die Anregungsenergie des Chlorophylls nur unzulänglich umsetzen kann (Björkman und Demmig-Adams 1994). Dieser Zustand kann sowohl durch die Steigerung der Photonenflussdichte erreicht werden als auch durch ein Absinken der Photosyntheserate bei konstanten Lichtbedingungen (Demmig-Adams und Adams 1992a).

Diverse Wachstumsfaktoren, die auch die Anthocyanbiosynthese induzieren, können die Photosynthese limitieren. Beispielsweise ist die Verfügbarkeit von Stickstoff für die Kohlenstofffixierung von essentieller Bedeutung. Eine Limitierung des Stickstoffangebotes kann zu einer Abnahme der maximalen Photosyntheserate (A_{\max}) (Ciompi et al. 1996) bzw. zum Rückgang der Carboxylierungsrate führen (Ferrar und Osmond 1986). Ausschlaggebend dafür ist wahrscheinlich eine begrenzte Aktivität der Rubisco und anderer Schlüsselenzyme der CO_2 -Fixierung (Chen und Cheng 2003) aufgrund der Verlagerung der Stickstoffbindung zugunsten der Proteine der Elektronentransportkette (Yamori et al. 2011).

Auch das Herabsetzen der Umgebungstemperatur führte zu einer Verringerung der Netto- CO_2 -Assimilation und einem Rückgang der maximalen Photosyntheserate (Antolin et al. 2005, Brüggemann et al. 1992). Neben der abnehmenden Reaktionsgeschwindigkeit der Rubisco kann eine direkte Schädigung des Enzyms bzw. dessen verzögerte Initialisierung als Ursache angesehen werden (Kingston-Smith et al. 1997). Während der Substratregeneration innerhalb des Calvin-Benson-Zyklus besteht aber auch die Möglichkeit, dass bei Kühle die Aktivierung der Fructosebisdiphosphatase über Thioredoxin vermindert ist und damit die Carboxylierung limitiert wird (Sassenrath et al. 1990, van Heerden et al. 2004, Hutchison et al. 2000). Auf regulativer Ebene könnten eine durch Kühle zeitlich versetzte Transkription der Rubisco-Aktivase (Martino-Catt und Ort 1992) oder die verzögerte Aktivität der Saccharosephosphatsynthase-Phosphatase (Jones et al. 1998), die in der Kohlenstoffmobilisierung regulativ wirksam ist, die CO_2 -Fixierung beeinträchtigen.

Werden in der Folge NADPH und ATP nur ungenügend umgesetzt und steht dadurch im Stroma nicht mehr ausreichend freies ADP zur Bildung von ATP zur Verfügung, verursacht die deaktivierte ATP-Synthase einen erhöhten Protonengradienten an den Thylakoiden, der den Elektronentransport limitiert (Walters et al. 2004, Takizawa et al. 2008). Im Licht entsteht dann bei der fortschreitenden Ladungstrennung in den PS II-Reaktionszentren ein Ungleichgewicht zwischen den reduzierten Photosystemen und den blockierten Redoxreaktionen der Elektronentransportkette (Huner et al. 1996). Zunächst ist die eingeschränkte photochemische Relaxation ohne Bedeutung für die Stabilität von PS II. Bei zunehmend geschlossen vorliegenden Reaktionszentren wird die Effizienz verringert, mit der Excitonen aus den Antennen von diesen übernommen werden. Alternativ geben dann in den Lichtsammelkomplexen Antheraxanthin und vor allem Zeaxanthin, die bei einer ausgeprägten Azidifizierung des Lumens aus dem Xanthophyll-Zyklus hervorgehen, überschüssige Anregungsenergie als Wärme ab (Demmig-Adams et al. 1996a, b, Niyogi 1999). Werden die Kapazitätsgrenzen des photosynthetischen

Elektronentransportes und der thermischen Dissipation überschritten, erreicht die Absorption von Licht ein exzessives, potentiell destruktives Niveau.

1.3.1 Akzeptorseitige Inhibition von Photosystem II

Die mögliche Lichtschutzfunktion von Anthocyanen durch Strahlungsabsorption wäre dann effektiv, wenn sich ein Schaden an den Photosystemen auf die Wirkung überzähliger, photosynthetisch nicht umgesetzter Photonen zurückführen ließe. In der Tat besteht die begründete Annahme, dass sichtbares Licht bei einer restriktiven CO₂-Fixierung die Inhibition von PS II akzeptorseitig einleiten kann.

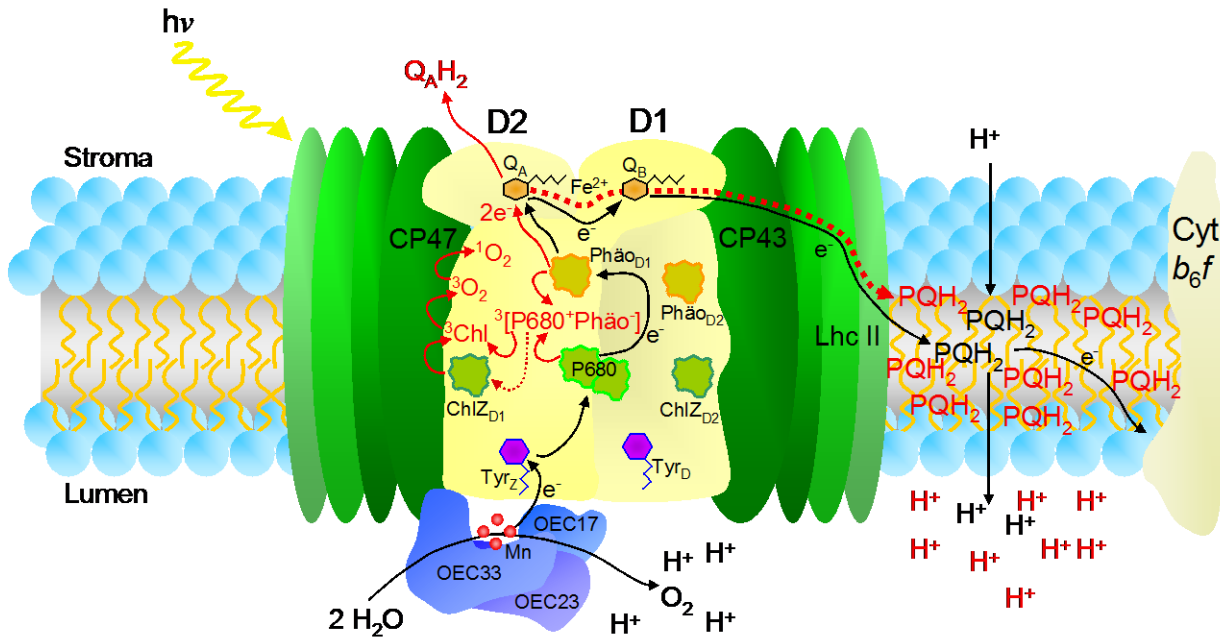


Abbildung 1.4: Akzeptorseitige Inhibition von Photosystem II. Unter fordernden Umweltbedingungen hemmt eine limitierte CO₂-Fixierung den ungehinderten Elektronenabfluss (schwarze Pfeile) aus Photosystem II und die akzeptorseitige PS II-Inhibition (rote Symbole) wird initiiert. Bei einer fortwährenden Anregung des Komplexes durch Strahlungsenergie und der damit verbundenen Überreduktion des Plastochinon-Pools fehlt im Elektronentransfer der sekundäre Chinonakzeptor Q_B. In der Folge verlässt doppelt reduziert und durch Protonen stabilisiertes Q_A seine Bindungstasche im D2-Protein. Dadurch ist die Oxidation des primären Elektronenakzeptors, Phäophytin D1, blockiert. Geht das sich im Anschluss bildende Radikalpaar ¹[P680⁺Phäo] in den Triplett-Zustand über, besteht das Risiko, dass bei einer Rekombination auch unter der Beteiligung der akzessorischen Chlorophyllmoleküle (ChlZ) Triplet-Chlorophyll entsteht. Ein Transfer der Energie auf molekularen Sauerstoff erzeugt den äußerst toxischen Singulett-Sauerstoff, der die photooxidative Degradation der Proteinuntereinheiten einleitet. D1, D2 – Zentrale Polypeptide von PS II, CP43 und CP47 – 43 bzw. 47 kDa Chlorophyllbindungsproteine, Lhc II – Lichtsammelkomplex, P680 – Reaktionszentrum von PS II, Tyr – Tyrosin, ChlZ – Akzessorische Chlorophyllmoleküle, Phäo - Phäophytin, Q_A – primärer Chinonakzeptor, Q_B – sekundärer Chinonakzeptor, Fe²⁺ - Nicht-Hämeisen-Komplex, PQH₂ – Plastohydrochinon, QA_H₂ – protonierter Chinonakzeptor, OEC – Wasserspaltungsapparat (oxygen evolving complex) mit den 17, 23 und 33 kDa Untereinheiten, Mn – Mangancluster, Cyt *b₆f* – Cytochrom-*b₆f*-Komplex. Darstellung entsprechend der Vorgaben in den ausgewählten Publikationen.

Exzessive Quantenflussmengen führen zu einer Überreduktion des Plastochinon-Pools, bei der die Bindungsstelle des sekundären Chinon-Akzeptors (Q_B) am D1-Protein zunehmend unbesetzt bleibt (Vass et al. 1992). Der primäre Chinon-Akzeptor (Q_A) akkumuliert dadurch in seiner reduzierten Form und wird nach einer erneuten Reduktion durch Protonen stabilisiert. In der Folge verlässt $[Q_A^{2-} 2H^+]$ die Bindungstasche im D2-Protein, die möglicherweise kollabiert (Vass et al. 1992, Abb. 1.4).

Im weiteren Verlauf induziert die blockierte Reoxidation des stabilen Q_A^- eine Ladungsrekombination von $P680^+$ und $Phäo^-$ zum primären Radikalpaar (Krieger-Liszkay 2004, Ohad et al. 2011). Insbesondere erhöht doppelt reduziertes Q_A im Vergleich mit der einfach reduzierten Form die Konzentration des primären Radikalpaares und stabilisiert dessen Lebensdauer (Gibasiewicz et al. 2001). Das in der Singulett-Spin-Konfiguration vorliegende Radikalpaar $^1[P680^+Phäo^-]$ kann durch Spinumkehr in den Triplett-Zustand übergehen ($^3[P680^+Phäo^-]$), der auch durch einen Elektronenrückfluss von der ersten stabilen Ladungstrennung ($P680^+Q_A^-$) zum primären Radikalpaar erreicht werden kann. Schließlich geht aus der Rekombination von $^3[P680^+Phäo^-]$ Triplett-Chlorophyll hervor (Vass 2011).

Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind in den Reaktionszentren akzessorische Chlorophyllmoleküle (Chl_1), die als Monomere vorliegen, an der Ladungsrekombination beteiligt und bilden den Hauptanteil der Triplett-Chlorophylle (Noguchi 2002). Liegt Q_A doppelt reduziert vor, ist die Lebensdauer von Triplett- Chl_1 mit 1-3 ms ausreichend, um durch den Energietransfer zum Triplett-Sauerstoff den hoch reaktiven Singulett-Zustand des Moleküls hervorzurufen (Noguchi 2002, Abb. 1.4). Die Bildung von Singulett-Sauerstoff erfolgt dabei vornehmlich in inaktivierten Photosystemen, bei denen der proteolytische Abbau des D1-Proteins noch nicht induziert wurde (Hideg et al. 1998). Die Wirkung der überschüssigen Photonen zeigt sich letztendlich in der oxidativen Degradation des D1-Proteins durch den aktivierten Sauerstoff. Ein so modifiziertes Molekül könnte anschließend einem beschleunigten Zugriff der Proteasen ausgesetzt sein (Lupinkova und Komenda 2004, Hideg et al. 2007).

1.3.2 Donorseitige Inhibition von Photosystem II

Die Strahlungsempfindlichkeit von Photosystem II beschränkt sich wahrscheinlich nicht nur auf die Akzeptorseite. Auch an der Donorseite kann mit dem Verlust der Wasserspaltung die Deaktivierung von PS II initiiert werden. Ist dabei der Mangan-Cluster im Wasserspaltungsapparat inaktiviert, wird der Elektronentransfer zum oxidierten Reaktionszentrum von PS II ($P680^+$) limitiert (Tyystjärvi 2008). Besonders UV-Strahlung ist in der Lage, die Photolyse des Wassers zu unterbrechen. In Zellen von *Synechocystis* PCC 6803 konnte nach einer Behandlung mit UV-B Strahlung die Ladungsrekombination von $Tyr_Z^+(P680^+)Q_A^-$ nachgewiesen werden, die nur entsteht, wenn oxidiertes Tyrosin nicht mehr ausreichend durch den Mangan-Cluster reduziert wird (Vass et al. 1999). Die Inaktivierung des Mangan-Komplexes durch UV-Strahlung beruht möglicherweise auf der Freisetzung von Manganionen ins Lumen, so dass der Verlust des kompletten Anregungszyklus und nicht der Ausfall eines spezifischen Anregungszustand des Clusters den Rückgang der photolytischen Kapazität begründet (Zsiros et al. 2006, Tyystjärvi 2008, Abb. 1.5). Da so eine erneute Reduktion von $P680^+$ durch die primären Elektronendonoren unterbunden ist und der alternative Reduktionsweg über Cyt b_{559} rasch seine Kapazitätsgrenze erreicht, interagiert das hoch reaktive Chlorophyllmolekül $P680^+$ mit dem D1-Protein und leitet durch die Oxidation von Aminosäuren dessen enzymatische Degradation ein (Jegerschöld und Styring 1996).

Einleitung

Anscheinend verfügt auch die energieärmere Strahlung aus dem sichtbaren Bereich des Spektrums über das Potential, den Mangan-Cluster auf der Donorseite von PS II zu deaktivieren (Tyystjärvi 2008). Wenn Blätter mit einer blockierten Neusynthese des D1-Proteins moderaten Photonenflussdichten ausgesetzt waren, wies blaues Licht im Vergleich mit grüner und roter Strahlung die höchsten Inaktivierungsraten von PS II auf, die mit den exzessiven Lichtmengen im Modell der akzeptorseitigen Photoinhibition nur unzulänglich erklärt werden können (Oguchi et al. 2009). An Thylakoidmembranen von *Pisum sativum* und *Cucurbita pepo* konnte demonstriert werden, dass durch sichtbares Licht die Inhibition des vom Mangan-Cluster vermittelten Elektronenübergangs von H₂O auf Dichlorophenolindophenol (DCIP) dem Elektronentransfer von Diphenylcarbazid (DCP) über die PS II-Reaktionszentren auf DCIP vorausgeht, wobei blaue

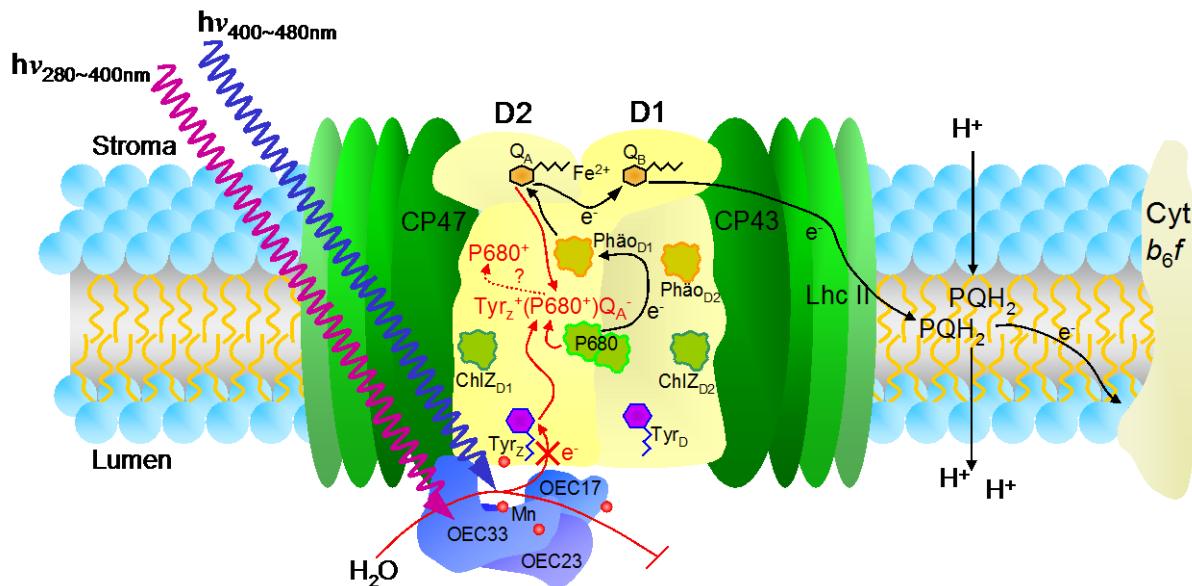


Abbildung 1.5: Donorseitige Inhibition von Photosystem II. Energiereiche UV-Strahlung und kurzwelliges Blaulicht unterbrechen den ungehinderten Elektronentransport (schwarze Pfeile) im Photosystem II, indem bei der donorseitigen Photoinhibition (rote Symbole) der Mangan-Cluster durch die Absorption deaktiviert wird und die Mangan-Ionen vermutlich ins Lumen freigesetzt werden. Nachdem die Elektronen aus dem PS II-Reaktionszentren infolge der Anregung durch photosynthetisch aktive Strahlung über Phäophytin und die beiden Chinon-Akzeptoren abgefließen sind, unterbleibt eine Reduktion von P680⁺, da eine erneute Reduktion von Tyr_Z⁺ ausgeschlossen ist. In der Folge tritt wahrscheinlich eine Ladungsrekombination in der Form von Tyr_Z⁺(P680⁺)Q_A⁻ auf. Als potentes Oxidationsmittel induziert P680⁺ schließlich die oxidative Schädigung seiner unmittelbaren Umgebung. D1, D2 – Zentrale Polypeptide von PS II, CP43 und CP47 – 43 bzw. 47 kDa Chlorophyllbindungsproteine, Lhc II – Lichtsammelkomplex, P680 – Reaktionszentrum von PS II, Tyr – Tyrosin, ChlZ – Akzessorische Chlorophyllmoleküle, Phäo – Phäophytin, Q_A – primärer Chinonakzeptor, Q_B – sekundärer Chinonakzeptor, Fe²⁺ – Nicht-Hämeisen-Komplex, PQH₂ – Plastohydrochinon, OEC – Wasserspaltungsapparat (oxygen evolving complex) mit den 17, 23 und 33 kDa Untereinheiten, Mn – Mangan-Cluster, Cyt *b₆f* – Cytochrom-*b₆f*-Komplex. Darstellung entsprechend der Vorgaben in den ausgewählten Publikationen.

Strahlung den H₂O-DCIP-Übergang wirksamer deaktiviert als rote Strahlung (Hakala et al. 2005, Ohnishi et al. 2005). Vermutlich werden Manganionen auch durch photosynthetisch aktive Strahlung angeregt und aus dem Cluster herausgelöst und zwar wesentlich schneller als der Verlust des D1-Proteins voranschreitet (Hakala et al. 2005). Zusammen mit der Erkenntnis, dass

in TRIS-behandelten Thylakoidmembranen ohne Mangan-Cluster die Inaktivierung der Photosysteme weitestgehend dem spektralen Verlauf der Chlorophyllabsorption folgte (Ohnishi et al. 2005), lässt sich daran anlehnend ein Zwei-Schritt-Modell der donorseitigen Photoinhibition formulieren, in dem UV-Strahlung und kurzwelliges Blaulicht primär die Wasserspaltung hemmen und sichtbares Licht im Anschluss zusätzlich die PS II-Reaktionszentren inaktiviert (Ohnishi et al. 2005).

1.3.3 Optische Eigenschaften der Anthocyane

Unabhängig davon, ob eine donorseitige oder akzeptorseitige Limitation die Inaktivierung von PS II einleitet, könnten Anthocyane die Photosysteme durch ihre optischen Eigenschaften schützen. Die photoprotektive Wirkung der Anthocyane könnte im Prinzip darauf beruhen, dass die Moleküle durch Absorption mit dem Chlorophyll oder mit dem Mangan-Cluster um die Anregung durch photosynthetisch aktive Strahlung konkurrieren.

Anthocyane aus pflanzlichem Gewebe absorbieren vor allem Licht aus dem grünen Bereich des Spektrums (Asen et al. 1972). Im extrahierten Zustand weisen sie jedoch innerhalb dieses Spektralbereiches eine sehr variable Absorption auf, die durch die Kombination verschiedener Einzeleffekte bestimmt wird. Zum einen folgt einer zunehmenden Hydroxylierung des B-Ringes durch die Flavonoid-3'-Hydroxylase bzw. die Flavonoid-3'5'-Hydroxylase eine erhöhte Elektronendichte am Chromophor, die eine bathochrome Verschiebung von Rot über Magenta zu Purpur bewirkte (Giusti et al. 1999). Zum anderen verursacht die Glykosylierung an den Positionen 3 oder 5 des Benzopyrylium-Ringes eine spektrale Verlagerung des Absorptionsmaximums hin zu kürzeren Wellenlängen (Giusti et al. 1999). Eine Acylierung der Anthocyane wirkt dieser Verschiebung entgegen, da mit einer zunehmenden Komplexierung durch phenolische Säuren die Absorption langwelliger wurde (Dangles et al. 1993, Figueiredo et al. 1996). Weitere Effekte treten auf intermolekularer Ebene auf. Interagieren Anthocyane mit Flavonolen bzw. Flavonen, absorbieren die Moleküle verhältnismäßig mehr Strahlung aus dem gelben Spektralbereich (Asen et al. 1972, Aida et al. 2000). In Petalen ist die bathochrome Verlagerung noch deutlicher sichtbar, wenn Metallionen supramolekulare Komplexe aus Flavonen und Anthocyanen stabilisieren. In ihrer chinoiden Form lassen die Anthocyane die Chelate dann blau erscheinen (Kondo et al. 1992, Moncada et al. 2003, Shiono et al. 2005).

Es ist bereits bekannt, dass sich mit den Anthocyanen die spektralen Verhältnisse im pflanzlichen Gewebe verändern. Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von Oliven und Weintrauben belegen für einen breiten Spektralbereich des Lichtes eine sinkende Fluoreszenzintensität und verorten ein Absorptionsmaximum bei 540-550 nm, wenn die roten Pigmente in das Mesokarp bzw. in die Hypodermis eingelagert wurden (Agati et al. 2005, Agati et al. 2007a). Reflexions- und Absorptionmessungen an Äpfeln (Merzlyak und Chivkunova 2000) und Hülsen von *Bauhinia variegata* (Smillie und Hetherington 1999) bestätigten die spektralen Veränderungen. Sowohl die epidermalen Anthocyane als auch ihre Synthese im Exokarp hinderten photosynthetisch aktive Strahlung aus dem Bereich von 500-600 nm daran, weiter in das Gewebe vorzudringen (Merzlyak und Chivkunova 2000, Smillie und Hetherington 1999).

Obwohl Blätter eine abweichende Anatomie besitzen und deutlich mehr Chlorophyll enthalten, dementsprechend veränderte Streuungs- und Reflexionsverhältnisse aufweisen, sind ähnliche Absorptionsmuster erkennbar. Bei vergleichbaren Chlorophyllkonzentrationen in roten und grünen Blättern, ab etwa 10 nmol cm^{-2} , bestimmte vor allem der Anthocyanengehalt den

Umfang der Absorption grüner Strahlung, deren Maximum *in vivo* ebenfalls bei etwa 550 nm auftrat (Gitelson et al. 2001). Für verschiedene Pflanzenarten konnte eine Korrelation zwischen dieser Absorption und der Anthocyankonzentration nachgewiesen werden (Gitelson et al. 2009). Eine Beteiligung der Anthocyane an der kurzwelligen Absorption von blauem Licht, die einer donorseitigen Photoinhibition entgegenwirken könnte, muss dagegen als kontrovers angesehen werden. Während bei moderaten Anthocyankonzentrationen die Pigmente insbesondere die Grünlichtabsorption dominierten und im blauen bzw. roten Spektralbereich nur geringe Veränderungen detektierbar waren (Gitelson et al. 2001), nahm bei hohen Anthocyan-Chlorophyll-Verhältnissen, die in der ungestörten Ontogenese des Blattes ausschließlich während der Ausdifferenzierung und der Seneszenz auftreten, der relative Anteil der Anthocyane an der Blaulichtabsorption zu (Merzlyak et al. 2008a). Unter diesen Bedingungen beeinflussten Anthocyane das Spektrum der photosynthetisch aktiven Strahlung im Blattinnern bis etwa 450 nm und überlagern somit sogar die Absorption von Chlorophyll b (Merzlyak et al. 2008b). Vermutlich kann die Absorption in diesem Spektralbereich aber nicht allein auf die Anthocyane zurückgeführt werden, da freie Carotinoide, die ihre Anregungsenergie nicht auf das Chlorophyll übertragen, gleichermaßen Strahlung unterhalb von 500 nm absorbieren könnten (Pfundel et al. 2007).

1.3.4 Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane

Aus den zuvor dargestellten Erkenntnissen geht hervor, dass Anthocyane im Blattgewebe photosynthetisch aktive Strahlung absorbieren. Im weitesten Sinne stellen sie auch gerade im Hinblick auf ihre exponierte Einlagerung damit eine permanente optische Barriere dar, die das sich anschließende Mesophyll gegen Strahlung abschirmen könnte. Nicht eindeutig geklärt ist, ob dieser Abschirmungseffekt *in vivo* besteht. Quantitative Analysen dazu, die den Umfang einer möglichen Abschwächung des einfallenden Lichtes durch Anthocyane erfassen, sind nicht vorhanden. Es bestehen allenfalls Hinweise darauf, dass zusammen mit der Einlagerung der roten Pigmente im Blatt eine Anpassung des Photosyntheseapparates auftritt.

Der Vergleich von Lichtfluss-Effekt-Kurven grüner und roter Blätter deutet auf eine Akklimatisation der photosynthetischen Kapazität letzterer an Schwachlichtbedingungen hin. Unter hohen Quantenflussdichten, bei denen die Photosynthese durch die begrenzte CO₂-Aufnahmekapazität die Sättigungsphase erreicht, zeigten Anthocyane enthaltende Blätter gegenüber ihren grünen Vergleichspartnern sowohl niedrigere Netto-Photosyntheseraten als auch einen herabgesetzten Elektronentransport von PS II bei einer gleichzeitig verringerten Effizienz, mit der offene PS II - Reaktionszentren Anregungsenergie aus den Lichtsammelkomplexen übernahmen (Zhang et al. 2011, Pomar und Barceló 2007). Vermutlich wird auch der Elektronentransport von Photosystem I angepasst, indem die Poolgröße der finalen Akzeptoren verkleinert wird (Zeliou et al. 2009). Allerdings wurden die photosynthetischen Veränderungen dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten von Extrakten roter und grüner Blätter bezugslos gegenübergestellt (Zhang et al. 2011, Pomar und Barceló 2007), oder es wurden nur saisonale Anthocyankonzentrationen ermittelt (Zeliou et al. 2009), wodurch ein Abschirmungseffekt der Anthocyane nicht näher quantifizierbar erscheint. Die Verminderung der Carboxylierungseffizienz betrug in roten Blättern von *Prunus cerasifera* bis zu 50 %, ohne dass Unterschiede in der stomatären Leitfähigkeit erkennbar waren (Kyparissis et al. 2007). Eingeschränkt wird die Aussage aber auch hier dadurch, dass in den Freilandexperimenten die individuelle lokale Lichtakklimatisation der Blätter im saisonalen Verlauf unberücksichtigt geblieben ist und

ebenfalls nur unzureichende Absorptionsmessungen am Blatt und im Extrakt die Anthocyane charakterisierten. Ferner ist bekannt, dass in Anthocyane synthetisierenden Blättern von *Quintinia serrata* neben der maximalen Photosyntheserate der Schwellenwert jener Photonenflussdichte sank, die den Eintritt der Carboxylierung in das Sättigungsniveau charakterisiert (Gould et al. 2002a). Zwar wiesen die Autoren an Querschnitten roter Blätter verringerte Fluoreszenz-Intensitäten im Mesophyll nach, wenn Chlorophyll ausgehend von der adaxialen Blattseite mit grünem Licht angeregt wurde, jedoch fehlte ein eindeutiger Bezug zwischen der Signalveränderung und der Beteiligung der Anthocyane an diesem Effekt.

Hinsichtlich einer möglichen Abschirmung durch die Anthocyane diskutieren einige Autoren eine Schwachlichtakklimatisation der Lichtsammelkomplexe in den Photosystemen. Da durch die permanente Absorption der Anthocyane wahrscheinlich nicht nur die nutzbare Photonenmenge des einfallenden Lichtes sinkt, sondern sich im anschließenden Mesophyll auch dessen spektrale Zusammensetzung verändert, wurde in den Lichtsammelkomplexen von PS II vermehrt Chlorophyll b eingebaut, um die Balance der Anregungszustände von Photosystem II und Photosystem I aufrecht zu erhalten (Manetas et al. 2003). Gleichzeitig nimmt jedoch bei hohen Photonenflussdichten der Anregungsdruck der Reaktionszentren von PS II ab. Dementsprechend wurde die Poolgröße des Xanthophyllzyklus den veränderten internen Lichtbedingungen angepasst (Manetas et al. 2003, Kytridis et al. 2008). Eine quantitative Analyse dieser Effekte in Bezug zu den Anthocyanen fehlt jedoch.

1.3.5 Schutz vor Photoinhibition von PS II durch die optische Abschirmung der Anthocyane

Die Induktion der Anthocyan-Biosynthese durch eine Veränderung jener Wachstumsbedingungen, die für die enzymatische CO₂-Fixierung kritisch sind, die strikt lichtabhängige Regulation dieser Synthese sowie die exponierte Einlagerung im Blatt und die Absorption photosynthetisch aktiver Strahlung stützen zusammengenommen die Vermutung, dass Anthocyane als Lichtschutzpigmente durch die Absorption überzähliger Photonen PS II vor einer Photodeaktivierung schützen könnten.

Ein akzeptorseitig eingeleiteter Funktionsverlust von PS II ist direkt proportional zur exzessiven Lichtmenge, unabhängig davon, in welchem Umfang die photochemischen Prozesse und die thermische Dissipation jeweils die destruktiven Quantenflussdichten begrenzen (Kato et al. 2003). Auch wenn die Vorstellungen von Park et al. (1995) und Anderson et al. (1997) berücksichtigt werden, wonach vermutlich die absolute Anzahl der absorbierten Photonen, etwa $10^6 - 10^7$ Photonen pro Photosystem II, und nicht exzessive Lichtquantitäten *per se* Photosystem II deaktivieren, wäre eine pigmentbasierte Abschirmung durch die roten Anthocyane in beiden Modellvorstellungen ein wirksamer Lichtschutz. Der absorptionsbedingte Schutzmechanismus sollte auch dann effektiv sein, wenn sichtbare Strahlung die primären und sekundären Prozesse einer donorseitigen Inhibition von Photosystem II initiiert.

Die Ergebnisse diverser Veröffentlichungen zur Lichtschutzwirkung widersprechen einander und erlauben daher keine eindeutige Aussage darüber, ob Anthocyane *in vivo* eine Inhibition von Photosystem II begrenzen oder sogar verhindern. Beispielsweise zeigten am Ende eines trockenen Sommers rote Blätter von *Prunus cerasifera* im Vergleich mit grünen Blättern von *Prunus domestica* eine leichte, chronische Inhibition von Photosystem II (Kyparissis et al. 2007). Diese konträren Inhibitionsraten waren auch bei der rot gefleckten, mediterranen Schattenpflanze *Erythronium dens-canis* innerhalb eines Blattes bestimmbar (Esteban et al.

2008). Unter moderaten Quantenflussdichten waren die Photosysteme unterhalb der lokal begrenzten Einlagerung von Anthocyanen in das Palisadenparenchym stärker inhibiert als die angrenzenden Photosysteme ohne Pigmentschirm (Esteban et al. 2008). Selbst hohe Anthocyankonzentrationen garantierten nicht unbedingt den Schutz der Photosysteme. Die massive Bildung von Anthocyanen während der Blattseneszenz von *Parthenocissus quinquefolia* verhinderte kaum bzw. nur marginal die Photoinhibition von PS II (Manetas und Buschmann 2011).

Andere Studien betonen hingegen die schützende Wirkung von Anthocyanen in Blättern. Freilandexperimente mit *Eucalyptus*-Setzlingen wiesen auf eine Wirksamkeit des Pigmentschirmes bei hohen Quantenflussdichten und kühlen Umgebungstemperaturen hin (Close et al. 2000). Sobald unbehandelte Pflanzen ähnliche Anthocyanengehalte zeigten wie Setzlinge, die aufgrund der Akklimatisation an Kühle und Nährstoffmangel bereits vor der Lichtstressbehandlung über die protektiven Phenole verfügten, war deren PS II ebenfalls weniger von der Photodeaktivierung betroffen (Close et al. 2000). Wenn in Maisblättern bei Kühle Anthocyane in der adaxialen Epidermis gebildet wurden, war bei niedrigen Temperaturen eine Verdopplung der Photonenflussdichte des Weißlichtes notwendig, um PS II im gleichen Umfang zu deaktivieren wie in den Blättern des grünen Genotyps (Pietrini et al. 2002). Wurde Strahlung des roten Spektralbereichs verwendet, deren Emissionsmaximum mit 650 nm außerhalb der *in vitro* Absorption der Anthocyane liegt, hoben sich die Unterschiede auf (Pietrini et al. 2002). Die schützende Abschirmung blieb sogar bestehen, wenn ausdauernde rote und grüne Winterblätter in ihrer photosynthetischen Kapazität übereinstimmten und somit die häufig diskutierte Restriktion der CO₂-Fixierung als Grund für einen Lichtschutz nicht oder nicht mehr in Erscheinung trat (Hughes und Smith 2007b). In jungen Blättern von *Vitis vinifera* konnte demonstriert werden, dass Anthocyane auch unter moderaten Umweltbedingungen das Risiko einer Inhibition der Photosysteme verminderten. Parallel dazu betonten kleinere Poolgrößen des Xanthophyllzyklus zusammen mit geringeren Deepoxidationsgraden die schwindende Notwendigkeit einer Ableitung exzessiver Quantenflussdichten (Liakopoulos et al. 2006).

Die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse resultiert insbesondere aus den doch recht unterschiedlichen experimentellen Ansätzen, in denen nicht nur die jeweilige Lichtakklimatisation variiert sondern auch die saisonalen Wachstumsbedingungen schwanken oder die Blattentwicklungsstadien voneinander abweichen. Eine vergleichende Datenanalyse wird dadurch weitestgehend erschwert. Vor allem gelingt es in den Studien nicht, bei einer protektiven Wirkung den kausalen Zusammenhang in der Lichtschutzfunktion der Anthocyane aufzudecken. Zum einen wird nur unzureichend beachtet, dass eine anhaltende Photoinhibition von PS II aus dem Ungleichgewicht zwischen der photooxidativen Degradation des D1-Proteins und der Kapazität des enzymatischen D1-Reparaturzyklus hervorgeht. Eine blockierte Neusynthese des D1-Proteins in anthocyanhaltigen und grünen Blättern, um etwaige Unterschiede in der Reparaturkapazität zu vermeiden, würde hingegen zu einem verlässlicheren Nachweis eines photoprotektiven Effektes der Anthocyane führen. Andererseits bleibt nach dem Vergleich der verschiedenen Resultate weiterhin offen, welcher Schutzmechanismus letztendlich die Entlastung der Photosysteme in roten Blättern herbeiführt. Es besteht nach wie vor Unklarheit darüber, ob Photosystem II allein durch die optische Abschirmung der Anthocyane vor einer photooxidativen Deaktivierung bewahrt wird, oder ob die roten Pigmente auch aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung die Inhibition von PS II verhindern könnten, indem sie reaktive Sauerstoffspezies detoxifizieren.

1.4 Lichtschutzfunktion der Anthocyane durch die antioxidative Wirkung

Extrahierte Polyphenole aus verschiedenen Pflanzenteilen zeigen *in vitro* eine hohe antioxidative Kapazität (Velioglu et al. 1998, Zheng und Wang 2001). Die berechnete Vermutung einer detoxifizierenden Wirkung von Cyanidin in Blättern basiert vorwiegend auf dem Wissen über Quercetin, das im Phenylpropanoid-Syntheseweg ein benachbartes Endprodukt der Anthocyane darstellt und ebenfalls aus Dihydroquercetin hervorgeht (Abb. 1.2). Neben der C2-C3-Doppelbindung in Konjunktion mit der 4-Oxo-Gruppe des zentralen Pyranringes und der Hydroxylierung an Position 3 bzw. 5 des Moleküls sind es insbesondere die Hydroxylgruppen des Phenylrestes, die zur antioxidativen Aktivität beitragen (Velioglu et al. 1998). Der Nachweis einer detoxifizierenden Wirkung lässt sich zunächst in Modellsystemen der Lipidoxidation führen. Quercetin verhinderte erfolgreich die Bildung von konjugierten Dienen, die aus der Fe²⁺ induzierten Oxidation von Linoleat hervorgingen (Saija et al. 1995). In einem Modell mit liposomalen Vesikeln aus Eigelb blockierten Quercetin, Quercetin-3-Glykosid und Quercetin-7-Glykosid über mehrere Stunden die Oxidation von Lecithin. Lag die Glykosylierung jedoch an der Position 4' vor, fehlte dem Phenylrest folglich eine OH-Gruppe, wurde Lecithin rasch oxidiert (Ioku et al. 1995).

Angesichts der Synthese des Flavonols in Blättern unter Wachstumsbedingungen, die photooxidativen Stress verursachen können, und seiner zellulären Lokalisation könnte Quercetin mit freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies interagieren. Eine Kombination aus Trockenstress und exzessivem Sonnenlicht ließ den Gehalt an Quercetin-3-Rutinosid in Blättern von *Ligustrum vulgare* um das 8fache steigen, während die Menge an phenolischen Säuren unverändert blieb (Tattini et al. 2004). Hingegen war mit Kühle auch ein einzelner Umweltfaktor ausreichend, um die Transkriptmenge früher und später Enzyme der Quercetin-Synthese und in der Folge auch die Menge des Flavonols im Blatt zu erhöhen. Dadurch nahm die antioxidative Wirkung der Blattextrakte gegenüber 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure-Kationen (ABTS) und DPPH-Radikalen zu (Oh et al. 2009, Toda et al. 2011). Fluoreszenzmikroskopische und –spektroskopische Messungen belegen, dass unter hohen Lichtstärken Quercetin auch in Abwesenheit von UV-Strahlung in den Palisadenzellen von *Ligustrum vulgare* akkumulierte (Agati et al. 2009). Auf subzellulärer Ebene wurde das Flavonol ebenfalls identifiziert. In Wurzelzellen konnte zytosolisches Quercetin in der Nähe des Nucleus und als Aglykon in Plasmamembranen nachgewiesen werden (Peer et al. 2001). Vermutlich gehört Quercetin sogar zu den Flavonoiden, die in den Chloroplasten photooxidativ erzeugten Singulett-Sauerstoff neutralisierten (Agati et al. 2007b).

1.4.1 Inhibition von Photosystem II durch reaktive Sauerstoffspezies

Wenn an der Photodeaktivierung von PS II vorzugsweise reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind, könnte das mobile Quercetin den Komplex vor einer oxidativen Degradation schützen. Es stellt sich die Frage, ob auch die vakuolären Anthocyane aktivierten Sauerstoff im Blattgewebe neutralisieren. Im Gegensatz zur optischen Abschirmung wäre bei einem vorwiegenden Funktionsverlust von Photosystem II durch reaktive Sauerstoffspezies mit der molekularen Reduktionskapazität der Anthocyane eine alternative, vielleicht sogar ausschließliche Lichtschutzwirkung notwendig.

Bei der Freisetzung von Elektronen durch die Photolyse des Wassers werden unter aeroben Bedingungen unweigerlich reaktive Sauerstoffspezies gebildet, insbesondere dann, wenn

Einleitung

der Verbrauch von Reduktionsäquivalenten bei der CO₂-Fixierung stagniert und die Elektronentransportkette deshalb einen hohen Reduktionsgrad aufweist. Vor allem am Photosystem I entstehen mit dem Superoxidanion (O₂⁻), mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und mit dem Hydroxylradikal (·OH) die verschiedenen Reduktionsintermediate des molekularen Sauerstoffs. Ist die antioxidative Kapazität einer pflanzlichen Zelle erschöpft, können die einzelnen Intermediate Lipide, Proteine oder DNS oxidativ schädigen (Latifi et al. 2009).

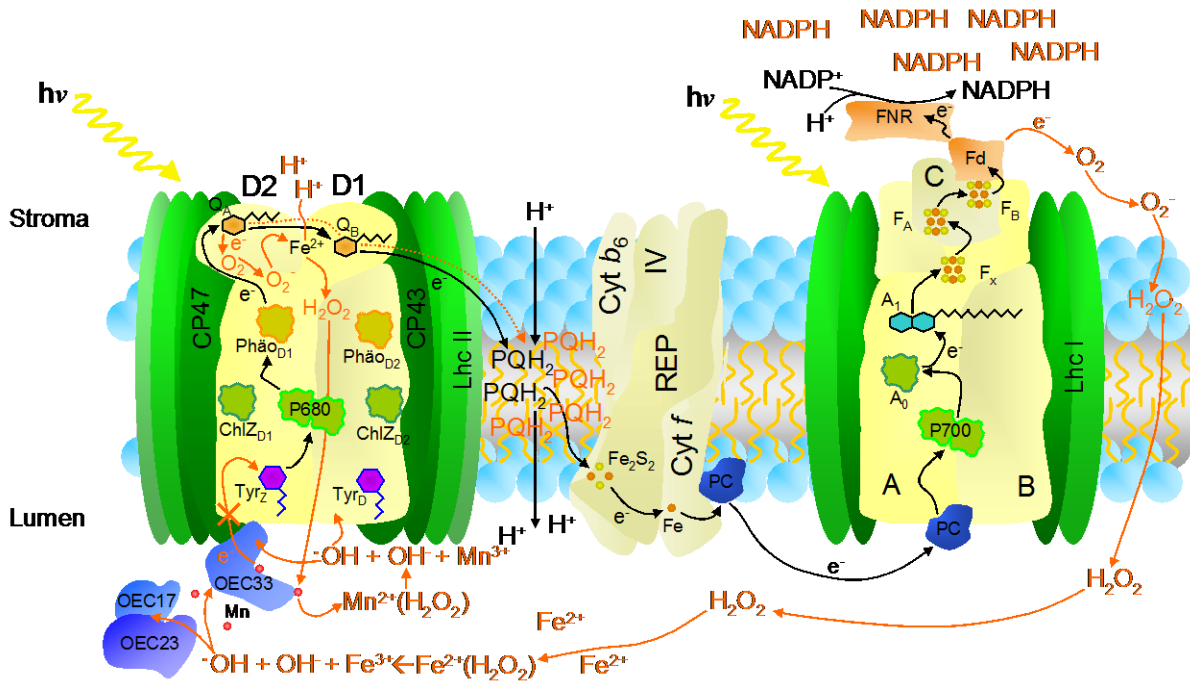


Abbildung 1.6: Ausgewählte Reaktionswege der PS II-Inhibition durch reaktive Sauerstoffspezies. Bei einer Restriktion der CO₂-Fixierung besteht ein erhöhtes Risiko, dass durch den sinkenden Verbrauch von NADPH-Reduktionsäquivalenten Superoxid-Anionen an der PS I-Akzeptorseite entstehen. Wird die Ascorbat-Peroxidase bei hohen H₂O₂-Konzentrationen deaktiviert, könnte Wasserstoffperoxid im Lumen akkumulieren und mit freien Eisen(II)-Ionen reagieren. Aus der Fenton-Reaktion würden Hydroxyl-Radikale hervorgehen, die in der Lage sind, den Wasserspaltungsapparat zu degradieren und die Metallionen des Mangan-Clusters freizusetzen. Zusätzlich könnten infolge eines gestörten Elektronenabflusses aus Photosystem II Elektronen vom primären Akzeptor (Q_A) auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Der benachbarte Eisen(II)-Komplex würde die Entstehung von Wasserstoffperoxid vermitteln. Einerseits wäre die Entstehung von Hydroxyl-Radikalen durch die Haber-Weiss-Reaktion vor Ort möglich, andererseits bilden sich OH-Radikale ebenfalls, wenn H₂O₂ zur Donorseite diffundiert und mit den freigesetzten Mangan-Ionen reagiert. Unabhängig vom Entstehungsort wären vor allem die strukturegebenden Polypeptide von PS II die bevorzugten Ziele einer oxidativen Degradation, die zur Inhibition der photochemischen Ladungstrennung führt. Cyt b₆, IV, REP (Rieske-Eisen-Protein mit dem Eisen-Schwefel-Zentrum), Cyt f mit dem katalytischen Eisen als Proteinuntereinheiten des Cyt b₆f-Komplexes, PC – Plastocyanin, Lhc I – Lichtsammelkomplex von PS I, A, B und C – Polypeptiduntereinheiten von PS I, P700 – Reaktionszentrum von PS I, A₀ – Chlorophyll-Elektronenakzeptor, A₁ – Phyllochinon, F_x, F_A und F_B – Eisen-Schwefel-Zentren, Fd- Ferredoxin, FNR – Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase. Darstellung entsprechend der Angaben in den zitierten Publikationen.

Viele Publikationen dokumentieren und analysieren die destruktive Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf den Photosyntheseapparat. Die beiden Photosysteme scheinen sich in ihrer Sensitivität gegenüber ROS zu unterscheiden. Wurde PS I in isolierten Thylakoiden mit Licht

oberhalb von 715 nm spezifisch angeregt, war die Inaktivierung von Photosystem I durch O_2^- geringer als die Schädigung von PS II durch H_2O_2 (Tjus et al. 2001). In diesem Zusammenhang ist nicht endgültig geklärt, ob Superoxidanionen bzw. H_2O_2 das D1-Protein oxidativ modifizierten (Krieger-Liszky et al. 2011) oder ob die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit akzeptorseitigem Fe^{2+} am PS II zur Fragmentierung des Polypeptides führte (Miyao et al. 1995). Die Bildung von H_2O_2 ist nicht auf PS I allein beschränkt. Der Elektronentransfer auf O_2 im PS II, der aus thermodynamischen Gründen vermutlich von $Ph\ddot{a}o^-$ oder Q_A^- ausgeht, brachte Superoxidanionen hervor, aus denen gebunden an Nicht-Häm-Eisen und in der Folge protoniert oder durch spontane Dismutation bei niedrigen pH-Werten H_2O_2 hervorging (Pospíšil 2009). Die für eine oxidative Degradation des D1-Proteins entscheidenden Hydroxylradikale, die am effektivsten 23 und 16 kDa große Fragmente hervorbrachten (Miyao 1994), entstehen im weiteren Verlauf bei der Reduktion von freiem H_2O_2 durch zweiwertige Eisen- bzw. Manganionen (Abb. 1.6) oder durch einen von Q_A^- initiierten internen Elektronentransfer im Eisenhydroperoxid-Komplex (Pospíšil 2009).

Auch auf der Donorseite von PS II können sich Hydroxylradikale bilden. Wenn die Matrix des Wasserspaltungsapparates instabil wird, beispielsweise durch die Abtrennung der extrinsischen 17 und 23 kDa Proteine, könnte H_2O unkontrolliert mit der terminalen Oxo-Gruppe des Mn-Clusters interagieren und Wasserstoffperoxid würde dadurch gebildet werden (Pospíšil 2009). Metallionen auf der Donorseite katalysieren anschließend die Reaktion von Wasserstoffperoxid, das auch von der Akzeptorseite dorthin diffundieren könnte, zu Hydroxylradikalen, die Manganionen aus dem Cluster freisetzen und damit die Wasserspaltung inaktivieren (Arató et al. 2004, Song et al. 2006) (Abb. 1.6). Neben dem Ausfall der photolytischen Reduktion von $P680^+$ forcierten Hydroxylradikale den Verlust intakter Photosysteme nicht nur durch Oxidation des D1-Proteins sondern parallel dazu auch über die Schädigung der strukturegebenden Proteine des Wasserspaltungsapparates. Dabei ist die Untereinheit OEC 33 aufgrund der ausgeprägten Bindungsaffinität für die freien Manganionen zugleich Entstehungsort und Wirkungsschwerpunkt der Radikale (Henmi et al 2004).

1.4.2 Antioxidative Kapazität der Anthocyane

Die Fähigkeit, photoaktivierten Sauerstoff zu detoxifizieren und damit eine potentielle Schutzwirkung für Photosystem II zu besitzen, leitet sich für Anthocyane im wesentlichen daraus ab, dass sie in Analogie zum Quercetin über die Hydroxylsubstitutionen am Phenylrest sehr leicht Elektronen abgeben bzw. deprotonieren und in der Folge als schwach reaktive Semichinone stabilisiert werden (Castaneda-Ovando et al. 2009). Daneben wird auch ein Wasserstoffatom-Transfer diskutiert, der bevorzugt von der Kation-Variante des Moleküls ausgeht (Estévez und Mosquera 2008).

Überwiegend für extrahierte Anthocyane ist die antioxidative Wirkung detailliert beschrieben worden. Beispielsweise ordneten coulometrische Messungen von Erdbeerextrakten und die Bestimmung der Fe^{3+} -Reduktionskapazität von Auszügen der Schwarzen Johannisbeere den Anthocyanen hohe antioxidative Kapazitäten zu (Aaby et al. 2007, Nielsen et al. 2003). Darüber hinaus detoxifizierten Anthocyane aus verschiedenen *Vaccinium*-Arten und aus *Aronia melanocarpa* (Zheng und Wang 2003) oder aus *Ipomoea batatas* (Kano et al. 2005) *in vitro* erzeugte Radikale sehr effektiv, besonders dann, wenn sie wie Delphinidin oder Cyanidin mit der Hydroxylierung von Position 3' und 4' am B-Ring als Katechol vorlagen (Zheng und Wang 2003). Zusätzlich beeinflusst die Glykosylierung des Moleküls über die Orientierung der OH-

Gruppen des jeweiligen Zuckers die antioxidative Kapazität (Zheng und Wang 2003, Wang et al. 1997). Durch Zugabe der Anthocyane verringerte deren antioxidative Wirkung die Bildung von Carbonylgruppen, die als Maß der oxidativen Degradation von Proteinen angesehen werden, sowohl in einem Lactalbumin-System (Viljanen et al. 2004) als auch bei der Oxidation von myofibrillären Proteinen (Estevéz et al. 2008). Außerdem unterbinden Anthocyane die Oxidation von Lipiden. Gemessen an der Freisetzung von Hexanal und der Entstehung von Malondialdehyd (MDA) hemmten die Phenole in erheblichem Maße die Kettenreaktion der Fettsäure-Perhydroxylradikale in Liposom- (Tsuda et al. 1996) und Methyl-Linoleat-Modellen (Kähkönen und Heinonen 2003).

Ferner sind Anthocyane in der Lage, die möglicherweise an der Inhibition von Photosystem II beteiligten reaktiven Sauerstoffspezies *in vitro* zu quenchen. Delphinidin, Cyanidin und Pelargonidin aus *Punica granatum* neutralisierten Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, sie waren allerdings wirkungslos gegenüber OH-Radikalen, die aus der Bestrahlung von H₂O₂ mit UV-Licht hervorgingen (Noda et al. 2002). Ihre antioxidative Wirkung gegenüber letzteren beruht wahrscheinlich darauf, dass Anthocyane mit Eisen und anderen Metallen Chelate bilden und so der Fenton-Reaktion die Katalysatoren nehmen (Noda et al. 2002).

1.4.3 Antioxidative Wirkung von Anthocyanen *in vivo*

Zurzeit liegen nur sehr wenige Publikationen vor, die eine antioxidative Lichtschutzfunktion von Anthocyanen in Blättern analysieren. In den Photosyntheseorganen erschwert die komplexe Matrix aus antioxidativ wirksamen Enzymen und schützenden niedrigmolekularen Verbindungen den eindeutigen Nachweis einer detoxifizierenden Wirkung. Darüber hinaus besteht für die Anthocyane im Vergleich zum Quercetin eine eingeschränkte Wirkungswahrscheinlichkeit. Aufgrund der ausschließlichen Einlagerung in die Vakuole ist es eher unwahrscheinlich, dass die Pigmente die kurzlebigen reaktiven Sauerstoffspezies in unmittelbarer Nähe zu den Photosystemen neutralisieren. Einzig das intra- und interzellulär mobile Wasserstoffperoxid könnte den Reaktionsradius der Polyphenole erreichen.

Grundsätzlich verfügen auch rot pigmentierte Blätter im Vergleich zu grünen mit den vegetativ gebildeten Polyphenolen über eine höhere antioxidative Kapazität, die außerhalb der natürlichen Umgebung im DPPH-Radikal-Test darstellbar ist (Neill et al. 2002, Zhang et al. 2010). Ferner ließen sich mit Blattextrakten des Wildtyps von *A. thaliana*, die nach einer Behandlung der Pflanzen mit γ -Strahlung erhöhte Ascorbatkonzentrationen und *de novo* synthetisierte Anthocyane enthielten, *in vitro* erzeugte Superoxid-Radikale effektiver neutralisieren als mit den Extrakten der jeweiligen Mutanten (Nagata et al. 2003). Über den spezifischen Anteil von Ascorbat oder den der Anthocyane an einem möglichen *in vivo*-Effekt lässt sich dabei aber nur spekulieren. Während sich eine *in vivo*-Neutralisation von Superoxid in paradermal geschnittenen Blättern von *Pseudowintera colorata* nicht bestätigte, sind die im Mesophyll vorliegenden roten Pigmente vermutlich an der Detoxifizierung des mobilen H₂O₂ beteiligt (Gould et al. 2002b). Allerdings konnte dies nur für die Freisetzung von Wasserstoffperoxid in mechanisch verletzten Blattgeweben nachgewiesen werden. Damit ist der Ansatz jedoch weit davon entfernt, in einem intakten Mesophyll den antioxidativen Schutz der Anthocyane vor einer Photodeaktivierung von PS II zu erfassen. Eine erste Annäherung an die Fragestellung gelang hingegen Kytridis und Manetas (2006) mit dem Vergleich der antioxidativen Wirksamkeit von epidermalen und mesophyllständigen Anthocyanen. Lagen die

Anthocyane in den Vakuolen von Mesophyllzellen vor, wurde PS II von photoinduziertem Wasserstoffperoxid weniger inhibiert. Jedoch stellten die Autoren in den Experimenten zur Photoinhibition teilweise junge Blätter ausdifferenzierten Vergleichspartnern gegenüber, ohne mögliche Unterschiede in der gesamten antioxidativen Kapazität der Blätter zu erfassen. Weiterhin blieben etwaige Differenzen im PS II-Reparaturzyklus unberücksichtigt, sodass die Resultate nur als ein Hinweis auf einen antioxidativen Schutz der Anthocyane vor Photoinhibition bewertet werden können.

1.5 Zielsetzung

Das Leitmotiv der Arbeit besteht darin, die Hypothese zu belegen, dass Anthocyane in Blättern eine Lichtschutzfunktion besitzen, aufgrund derer sie sensible Zellstrukturen vor den destruktiven Folgen von photooxidativem Stress bewahren. Es gilt, die dafür prädestinierten optischen und chemischen Eigenschaften des Pigmentes in einen funktionalen Kontext zu bringen und die einzelnen hypothetischen Wirkungsmechanismen *in vivo* zu testen.

Ausgehend von der häufig wiederkehrenden Lokalisation der Anthocyane in exponierten, photosynthetisch aktiven Zellen und den Erkenntnissen zu den optischen Eigenschaften roter Blätter wird vermutet, dass Anthocyane das Mesophyll gegen Strahlung abschirmen. Zur Beurteilung einer möglichen Schutzfunktion soll die Abschirmung der roten Pigmente quantifiziert werden, um auch im Anschluss beurteilen zu können, ob die Absorption des einfallenden Lichtes für eine Entlastung des Photosyntheseapparates überhaupt relevant ist. Basierend auf der Chlorophyllfluoreszenz soll überprüft werden, ob mit einem nicht invasiven, optischen Messverfahren die Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung reproduzierbar und mit geringem Aufwand nachgewiesen werden kann. Pflanzen des roten und grünen Phänotyps von *Berberis thunbergii* eignen sich in idealer Weise für die methodische Überprüfung, da innerhalb der Art unterschiedlich pigmentierte Blätter auftreten und sich der Anthocyangehalt durch die Veränderung der Wachstumsbedingungen variieren lässt. Des Weiteren soll die neue Methode verifiziert werden. Da Anthocyane wie Chlorophyll sichtbares Licht absorbieren, bietet es sich an, etwaige Auswirkungen auf die Photosynthese zu erfassen. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass die maximale Quantenausbeute der Sauerstoff-Evolution im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese in roten Blättern sinkt und von der Abschirmung der Anthocyane abhängig ist.

Von an Starklichtbedingungen und an Schatten angepassten Pflanzen ist bekannt, dass der Photosyntheseapparat in seiner Struktur und Leistungsfähigkeit den jeweiligen Lichtbedingungen angepasst wird. Prinzipiell bildet eine permanente Abschirmung des Mesophylls durch Anthocyane abgesehen von der Verringerung des grünen Anteils im Licht kleinräumig Bedingungen nach, wie sie für Pflanzen unterhalb eines mehr oder weniger geschlossenen Kronendaches auftreten. Es wird deshalb angenommen, dass die enzymatischen CO₂-Fixierung und der linearen Elektronentransport in roten Blättern angepasst wird. Die Gegenüberstellung photosynthetischer Lichtfluss-Effekt-Kurven von grünen und Anthocyane enthaltenden *Berberis* Blättern könnte die Auswirkungen einer anhaltenden Abschirmung belegen. Des Weiteren soll die Adaptation der Lichtsammelkomplexe näher untersucht werden. Es wird vermutet, dass die Stöchiometrie der Chlorophylle und Carotinoide von der effektiven Photonenflussdichte abhängt. Dem Modell liegt zugrunde, dass der Umfang der Antennenregulation im wesentlichen von jener Photonenflussdichte bestimmt werden müsste, die letztendlich den blattinternen Anthocyanfilter

Einleitung

passiert hat und als photosynthetisch wirksame Teilmenge der auftreffenden Photonen die Chloroplasten erreicht.

Mit *A. thaliana* steht eine Modellpflanze zur Verfügung, die sich aufgrund der vielfältigen Mutanten des Flavonoid-Biosyntheseweges eignet, den Schutzmechanismus der Anthocyane aufzuklären. Es soll die Hypothese überprüft werden, dass PS II in den roten Blättern des Wildtyps unter potentiell destruktiven Lichtbedingungen besser geschützt ist als in den Blättern der Anthocyan defizienten *tt3*-Mutante. Bei ausgeprägten Unterschieden, stellt sich die Frage nach dem konkreten Wirkungsprinzip, mit dem Anthocyane die Inhibition der Photosysteme verhindern. Durch die Anwendung von exzessiven Lichtmengen verschiedener Wellenlängenbereiche, die innerhalb und ausserhalb der Absorption von Anthocyanen liegen, soll nachgewiesen werden, dass Anthocyane durch Abschirmung eine Photodeaktivierung von PS II verhindern. In einem nächsten Schritt wird der antioxidative Effekt der Anthocyane untersucht. Es wird angenommen, dass Anthocyane durch ihre reduzierende Wirkung eine Deaktivierung von PS II durch reaktive Sauerstoffspezies einschränken. Dafür ist es erforderlich, die Blätter der Vergleichspartner einer Behandlung auszusetzen, in der gezielt reaktive Sauerstoffspezies akkumulieren und photooxidativen Stress hervorrufen. Um nachzuweisen, dass etwaige Schutzeffekte auf der antioxidativen Wirkung der Anthocyane beruhen, sollen die niedrigmolekulare sowie die enzymatische antioxidative Kapazität der verwendeten Genotypen analysiert und verglichen werden. Neben den Photosystemen und anderen Proteinkomplexen schädigen reaktive Sauerstoffspezies vor allem Membrankomponenten. Die Lipidoxidation ist deshalb als weiterer Parameter zur Abschätzung einer antioxidativen Wirkung ausgewählt worden. Da in der *tt3*-Mutante akkumulierendes Quercetin die Wirkung der Anthocyane kompensieren könnte, werden sämtliche Versuche um die *tt7*-Mutante erweitert, die aufgrund der fehlenden Flavonoid-3'-Hydroxylase kein Quercetin synthetisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Berberis thunbergii

Zwei Jahre alte Setzlinge von *Berberis thunbergii* (DC.) und ihrer roten Varietät, *Berberis thunbergii atropurpurea* (Nordflor, Pinneberg, Deutschland) wurden an Zweigen und Wurzeln auf ein Drittel der ursprünglichen Länge zurückgeschnitten und in Kunststofftöpfe mit einer Kantenlänge von 9 cm gepflanzt. TKS 2 (Floragard, Oldenburg, Deutschland) diente den Setzlingen als Substrat. Die Pflanzen wurden einmal pro Woche mit handelsüblichem Dünger (Mineralischer NPK-Dünger, Flora Frey, Solingen, Deutschland) versorgt. Die Kultivierung erfolgte in Klimakammern bei 21 °C unter Warmlicht-Fluoreszenzlampen (Lumilux 58 W Osram, München, Deutschland) bei Photonenflussdichten von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 2.1). Die unterschiedlichen Lichtquantitäten wurden durch das Verändern der Distanz zur Lichtquelle erreicht und mit einem Lichtmessgerät (LI-190, Licor, Lincoln, U.S.A.) kontrolliert. Weiterhin wurde eine 16-stündige Lichtperiode mit einer Dunkelphase von 8 Stunden kombiniert.



Abbildung 2.1: Typische Ausprägung des Phänotyps von *Berberis thunbergii atropurpurea* (links) und *Berberis thunbergii* (rechts) nach einer Anzucht der Pflanzen in der Klimakammer unter Fluoreszenzlampen bei 21 °C und einer PPF von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h.

Arabidopsis thaliana

Samen vom *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) Wildtyp Landsberg erecta (ler) und von dessen Mutanten *tt3* und *tt7* wurden in Kunststofftöpfe (Teku-Terra 130 ml, Pöppelmann, Lohne, Deutschland) ausgesät, die als Substrat TKS 2 enthielten. Nach einer Vorbehandlung des Saatgutes über 3 Tage in der Klimakammer bei 9 °C mit einer photosynthetisch wirksamen Photonenflussdichte (PPFD) von 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurden die Töpfe in einen Klimaschrank (CLF Plant Climatics, Emersacker, Deutschland), der in einer Klimakammer bei 21 °C stand, umgestellt. Der Klimaschrank war mit Fluoreszenzlampen (F32T8/TL 741 Hi-Vision, Philips, U.S.A.) ausgerüstet. Die Pflanzen wurden dort mit einer PPF von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Licht-Dunkel-Zyklus von 8:16 h bestrahlt. Nach 10 bis 12 Tagen wurden überzählige Keimlinge

Material und Methoden

entfernt, so dass nur eine Pflanze pro Topf erhalten blieb. Etwa 4 Wochen alte Pflanzen hatten die gewünschte Größe erreicht, um die Bildung von Anthocyanen zu induzieren (Abb. 2.2 A). Dazu wurden die Pflanzen in einen Klimaschrank überführt, der sich in einer auf 9 °C gekühlten Klimakammer befand. Die Ausstattung mit Fluoreszenzlampen war mit der des Schrankes in der auf 21 °C erwärmten Klimakammer identisch. Hingegen wurde die Photoperiode auf Langtagverhältnisse verändert, d.h. einer 16-stündigen Lichtphase folgten 8 h Dunkelheit. Nach etwa 10 bis 14 Tagen war der Zeitpunkt der maximalen Akkumulation der Anthocyane erreicht und die Blätter des Wildtyps und der beiden Mutanten konnten sowohl für die analytischen Messverfahren als auch für die verschiedenen Experimente verwendet werden (Abb. 2.2 B).

Tabelle 2.1: Auflistung der in den Analysen und Experimenten eingesetzten Wildtypen und Mutanten von *Arabidopsis thaliana*. Der Bezeichnung im Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC, University of Nottingham, Loughborough, UK) folgt in Klammern die in der Arbeit verwendete Benennung der Genotypen. Weiterhin wird für die Mutanten das betroffene Gen aufgeführt, das für das entsprechende Enzym des Phenylpropanoid-Syntheseweges codiert.

Bezeichnung	Betroffenes Gen / Enzym	Ökotyp	Quelle / ID
Columbia (col)	Wildtyp	Col-0	NASC / N1092
Landsberg erecta (ler)	Wildtyp	Ler-0	NASC / NW20
tt3-1 (tt3)	AT5G42800 / Dihydroflavonol-4-Reduktase	Ler-0	NASC / N84
tt7-1 (tt7)	AT5G07990 / Flavonoid-3'-Hydroxylase	Ler-0	NASC / N88

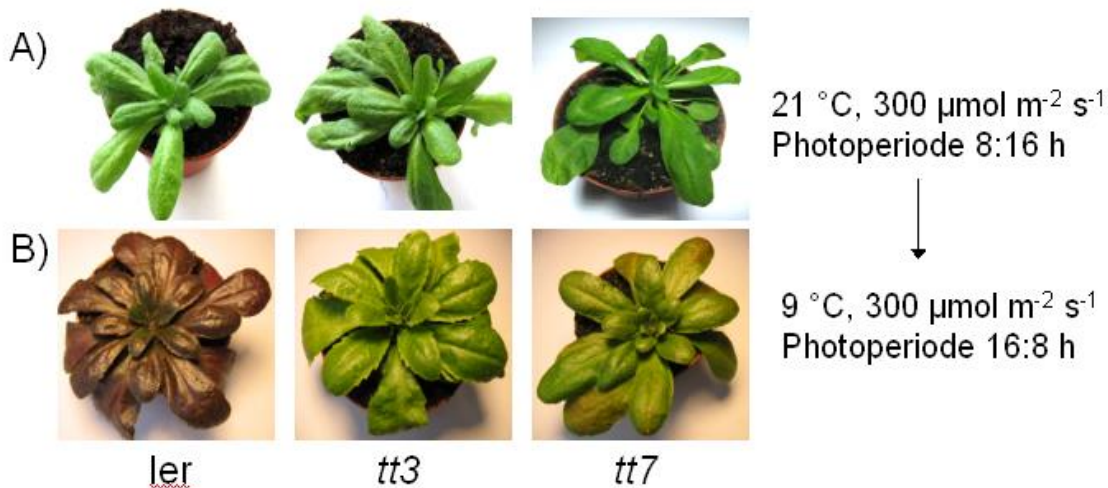


Abbildung 2.2: Charakteristisches Erscheinungsbild des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) und der Transparent Testa-Mutanten (*tt3*, *tt7*) nach A) einer Anzucht über 4 Wochen bei 21 °C unter einer PPFD von 300 µmol m⁻² s⁻¹ im 8:16 h Hell-Dunkel-Zyklus und B) nach einer sich anschließenden Behandlung der Pflanzen mit einer PPFD von 300 µmol m⁻² s⁻¹ innerhalb einer 16:8 h Photoperiode bei 9 °C über 10-14 Tage.

2.2 Optische und physiologische Messmethoden

2.2.1 Fluorometrische Quantifizierung der Transmission photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) in Blättern

Die Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane wurde mit Hilfe von Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen ermittelt. Für die Induktion der Chlorophyllfluoreszenz wurden drei verschiedene Anregungsstrahlen eines Xe-PAM Fluorometer (Walz, Effeltrich, Deutschland) verwendet. Ganze Blätter oder Blattscheiben (0,63 oder 0,85 cm²) von *B. thunbergii* / *atropurpurea* und *A. thaliana* wurden mit doppelseitigem Klebeband auf dem Probenhalter fixiert. Der Probenhalter war so ausgefräst, dass der Fluoreszenz induzierende Lichtstrahl die Blattfläche in einem Winkel von 45 ° traf und die erzeugte Chlorophyllfluoreszenz im selben Winkel von der Photodiode detektiert wurde. Die Anregungswellenlängen und deren Intensitäten wurden durch drei verschiedene Filterkombinationen vor der Lichtquelle (Xenon Blitzlichtlampe, L4641, Hamamatsu, Japan) definiert: 1. Blaugrünes Anregungslicht: BG 39, 5 mm (Schott, Mainz, Deutschland), UV-Block Filter (Balzers, Liechtenstein), NG3 1 mm (Schott), NG5 2 mm (Schott), 2. Grünes Anregungslicht: 550 FS40-25 (Andover, Salem, U.S.A.), 544 FS10-25 (Andover), Neutralfilterfolie mit 75 % Transmission (Lee Filters, Hampshire, England), 3. Rotes Anregungslicht, 650 FS40-25 (Andover), 650 FS10-25 (Andover), Neutralfilterfolie mit 50 % Transmission (Lee Filters). Die optimale Detektion der emittierten Chlorophyllfluoreszenz wurde durch eine Filterkombination bestehend aus einem UV-Block Filter (Balzers), DT-red (Balzers), RG 9 2 mm (Schott) und RG 695 2 mm (Schott) vor dem Photodetektor gewährleistet. Die Xenonlampe hatte eine Pulsrate von 4 Hz und beleuchtete eine Fläche von etwa 1 cm².

Anthocyane absorbieren hauptsächlich blaues und grünes Licht (Feild et al. 2001). Deshalb wurde das Verhältnis von durch Grünlicht (F₅₄₅) bzw. von durch blaugrünes Licht (F_{BG}) induzierter Chlorophyllfluoreszenz zur Fluoreszenz, die mit rotem, von Anthocyanen nicht absorbiertem Licht erzeugt wurde (F₆₅₀), verwendet, um die relative Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung zu bestimmen. Die Signale wurden mit einem fluoreszierenden Standard (blau std, Walz) normalisiert. Eine nicht fluoreszierende grüne Folie (grün std, Gademann Instruments, Würzburg, Deutschland) diente zur Nullkorrektur der Werte.

$$(F_{BG} / F_{650})_{rel.} = \frac{(F_{BG} \text{ Probe} - F_{BG} \text{ grün std}) / (F_{BG} \text{ blau std} - F_{BG} \text{ grün std})}{(F_{650} \text{ Probe} - F_{650} \text{ grün std}) / (F_{650} \text{ blau std} - F_{650} \text{ grün std})} \quad [\text{Gl. 1}]$$

$$(F_{545} / F_{650})_{rel.} = \frac{(F_{545} \text{ Probe} - F_{545} \text{ grün std}) / (F_{545} \text{ blau std.} - F_{545} \text{ grün std})}{(F_{650} \text{ Probe} - F_{650} \text{ grün std}) / (F_{650} \text{ blau std.} - F_{650} \text{ grün std})} \quad [\text{Gl. 2}]$$

Die Gleichungen 1 und 2 erfassen die Transmission von photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane enthaltende Zellschichten nur als relatives Maß. Für die Bestimmung der absoluten Transmission war deshalb ein Bezugswert notwendig. Dieser Wert ließ sich durch zwei verschiedene Verfahrensansätze ermitteln. Einerseits eigneten sich isolierte Chloroplasten, um von Anthocyanen unbeeinflusste Fluoreszenzverhältnisse zu messen, da das Anregungslicht nicht

durch epidermale Anthocyane oder Anthocyane im Palisadenparenchym absorbiert wird. Andererseits boten anthocyanfreie Blätter die Möglichkeit, diese Fluoreszenzverhältnisse in einem System zu erfassen, das den Einfluss der Blattstruktur auf die optische Variabilität der Streuung und Reflexion des Anregungslichtes und der Reabsorption der induzierten Fluoreszenz berücksichtigt.

Für die Ermittlung des Maximalwertes beider Fluoreszenzverhältnisse wurden isolierte Chloroplasten verschiedener Pflanzenarten auf Filterpapier (Nr. 1, Whatman, Maidstone, England) aufgetragen. Anschließend wurden die jeweiligen Fluoreszenzverhältnisse mit der Xenon-PAM-Methode ermittelt. Als unabhängige Kontrollgröße diente die aufgetragene Chlorophyllkonzentration. Zusätzlich wurden zur Bestimmung des maximalen Verhältnisses anthocyanfreie Blätter von *Hedera helix*, *Sambucus nigra*, *Avena sativa*, *Berberis thunbergii* und *Arabidopsis thaliana* im 5-Blatt-Stadium und im 20-Blatt-Stadium verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass nur an Schwachlichtbedingungen akklimatisierte Blätter verwendet wurden. Ein Merkmal dieser Blätter ist ein niedriges Carotinoid / Chlorophyll-Verhältnis. Dadurch war die Absorption von blaugrünem Anregungslicht durch die Carotinoide vernachlässigbar, und ein maximales Fluoreszenzsignal war somit detektierbar. Mit dem maximalen Fluoreszenzverhältnis (F_{\max}) ließ sich anschließend die Transmission von blaugrünem [Gl. 3] und grünem [Gl. 4] Anregungslicht durch anthocyanhaltige Zellschichten berechnen:

$$T_{BG} = F_{BG} / F_{650} * F_{\max}^{-1} \quad [\text{Gl. 3}] \quad \text{bzw.} \quad T_{545} = F_{545} / F_{650} * F_{\max}^{-1} \quad [\text{Gl. 4}]$$

Aus der Transmission des Anregungslichtes konnte die Absorption des anthocyanhaltigen Gewebes von blaugrüner [Gl. 5] und grüner Strahlung [Gl. 6] berechnet werden. Dazu wurde der negativ dekadische Logarithmus der jeweiligen Transmission gebildet:

$$\text{Abs}_{BG} = -\log(T_{BG}) \quad [\text{Gl. 5}] \quad \text{bzw.} \quad \text{Abs}_{545} = -\log(T_{545}) \quad [\text{Gl. 6}]$$

2.2.2 Messung von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren

Für die Bestimmung des Abschirmungseffektes durch Anthocyane, der den gesamten Spektralbereich photosynthetisch aktiver Strahlung umfasst, wurden Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von Blattscheiben beider *Berberis*-Varietäten und der *Arabidopsis*-Genotypen gemessen. Die einzelnen Spektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrophotometer (F 4500, Hitachi, Tokyo, Japan) aufgezeichnet. Der Bereich der Anregungswellenlängen lag zwischen 380 und 710 nm. In Schritten von 1 nm aufsteigend wurde die variable Chlorophyllfluoreszenz bei 720 nm detektiert. Die Änderungsgeschwindigkeit der Anregungswellenlängen lag bei 2400 nm min^{-1} . Auf der Anregungsseite wurde ein spektrales Auflösungsvermögen von 2,5 nm verwendet, auf der Detektorseite betrug dieses 10 nm. Die bei der Verwendung von optischen Gittern auftretenden Nebenmaxima wurden auf der Detektorseite durch einen RG 715-Filter (Schott, Mainz, Deutschland) verhindert. Aufgrund der relativ hohen Intensität des Anregungslichtes würde in dunkeladaptierten Blättern nichtphotochemische Fluoreszenz-Löschung induziert werden, daher sind die Blattscheiben vor der Messung mit einer Weißlichtlampe (KI 2500, Schott, Mainz, Deutschland) entsprechend ihrer Anzuchtbedingungen für 15 min bestrahlt worden. So konnte gewährleistet werden, dass die Photosynthese ausreichend aktiviert war um einen Fluoreszenzanstieg durch den Messlichtstrahl zu verhindern. Erst danach erfolgten die

jeweiligen Messungen. Bei einigen Blattscheiben wurde stichprobenartig das Anregungsspektrum wiederholt, um mögliche Änderungen in der Löschung der Chlorophyllfluoreszenz ausschließen zu können.

Da die Intensität des Fluoreszenzsignals direkt abhängig vom Chlorophyllgehalt der Blattscheibe ist, wurden die Anregungsspektren zur besseren Vergleichbarkeit mit der mittleren Fluoreszenzausbeute zwischen 672-678 nm normalisiert. Zur Abschätzung der Transmission von photosynthetisch aktiver Strahlung durch anthocyanhaltige Zellschichten wurden einerseits die normierten Spektren in Relation zu normierten Anregungsspektren von intakten, isolierten Chloroplasten gesetzt. Dadurch war es möglich, mit den Unterschieden im kompletten Spektralbereich das Absorptionsverhalten der Anthocyane näher zu charakterisieren. Andererseits wurden die normierten Spektren von rot pigmentierten Blattscheiben ins Verhältnis zu normierten Spektren der grünen, gleichbehandelten Varietäten gesetzt, um die spezifischen Transmissionsänderungen in den Spektren im gleichen optischen System und bei einer annähernd übereinstimmenden Ausstattung der Chloroplasten mit akzessorischen Pigmenten erfassen zu können.

2.2.3 Isolierung intakter Chloroplasten

Von jeder Pflanzenart wurden 5-10 g Blattmaterial zur Isolation intakter Chloroplasten verwendet. Während der Isolierung wurde darauf geachtet, dass alle Extraktionsschritte im Dunkeln abliefen und die Zwischenprodukte mit Eis gekühlt wurden. Die Blätter wurden in einem gekühlten Mörser mit 20 ml Extraktionspuffer (0,3 M Sorbitol, 10 mM NaHCO₃, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 20 mM HEPES/NaOH [pH 7,8] und 5 mM MgCl₂) zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenat durch eine doppelte Schicht Nylongaze mit einer Maschenweite von 10 µm gefiltert. Der erste Zentrifugationsschritt von 500 x g über 5 min bei 4 °C diente der Trennung von Chloroplasten und Zellbruchstücken. Im folgenden Schritt mit 5000 x g für 5 min wurden die Chloroplasten dem Überstand entzogen. Das chloroplastenhaltige Pellet wurde dann mit 1 ml Isolationspuffer resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung der Chloroplasten diente ein zweistufiger Percoll-Gradient nach Aronsson und Jarvis (2002). Die angereicherten Chloroplasten wurden der Grenzschicht zwischen den beiden Percollphasen entnommen und in Reaktionsgefäße mit 1 ml Isolationspuffer überführt. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei 5000 x g und 5 min wurden die pelletierten Chloroplasten nochmals mit 2 ml Isolationspuffer resuspendiert. Mit einem Lichtmikroskop erfolgte die qualitative Bewertung der Chloroplasten. Sofern sie turgeszent waren und sich kaum Bruchstücke wiederfanden, wurden die Chloroplasten für die Fluoreszenzmessungen auf Whatman-Filterpapier übertragen. Mit Hilfe der Gleichungen von Porra et al. (1989) konnte nach einer Extraktion mit 80 %igem Aceton der Chlorophyllgehalt der Chloroplastensuspension ermittelt werden.

2.2.4 Bestimmung der maximalen photochemischen Effizienz von PS II (F_v / F_m)

Für die Abschätzung der photochemischen Effizienz von Photosystem II wurde die Chlorophyllfluoreszenz von Blättern und Blattscheiben gemessen. Zur Anwendung kam dabei das Chlorophyllfluorometer Maxi-Imaging-PAM (Walz). Um die maximale photochemische Quantenwirksamkeit in vollem Umfang erfassen zu können, war es notwendig, dass der primäre Elektronenakzeptor Q_A vollständig oxidiert vorlag und der Protonengradient an den Thylakoidmembranen abgebaut war. Die Blattproben wurden deshalb für 20 min vorverdunkelt.

Die Dunkeladaptation ermöglichte die Bestimmung der minimalen Fluoreszenz F_0 im Messlicht. Mit einem Sättigungslichtpuls, der eine PPFd von $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aufwies, wurde der Maximalwert F_m bestimmt. Die Differenz zwischen F_0 und F_m wird als variable Fluoreszenz F_v bezeichnet. Im dunkeladaptierten Zustand spiegelt das Verhältnis zwischen variabler Fluoreszenz und maximaler Fluoreszenz (F_v / F_m) die optimale Quantenausbeute von PS II wider (Kitajima und Butler 1975).

In Blättern diverser Pflanzenarten liegt dieser Wert in einem relativ schmalen Bereich von 0,8-0,83 (Björkman und Demmig 1987). Werte darunter können auf eine Inhibition von Photosystem II auch aufgrund einer oxidativen Degradation hinweisen. Um die Folgen von Experimenten, die eine Inhibition von PS II zum Ziel haben, quantifizieren zu können, wurde die prozentuale Verringerung des Fluoreszenzverhältnisses F_v / F_m relativ zur Kontrolle als Maß der Schädigung von Photosystem II festgelegt (Gl. 7). Sowohl Blattproben vor bzw. zu Beginn der Experimente stellten die Kontrollen dar, als auch Proben, die während der jeweiligen Behandlungen von der Lichteinwirkung ausgeschlossen waren.

$$\text{Schädigung von PS II:} \quad (\%) = 100 \% - ((F_v / F_m)_{\text{exp}} * 100 \% * (F_v / F_m)_{\text{kon}}^{-1}) \quad [\text{Gl. 7}]$$

2.2.5 Messung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung

Zur Bestimmung der maximalen Quantenausbeute der Sauerstoffevolution, für die Erstellung von photosynthetischen Lichtfluss-Effekt-Kurven und zur Ermittlung der maximalen Photosyntheserate (P_{max}) wurde ein Sauerstoffelektroden-System (LD2, Hansatech, Norfolk, England) verwendet. Als Lichtquelle diente eine Halogenlampe (LS 2, Hansatech) ausgerüstet mit einem 100 W Halogen Strahler (Xenophot, Osram, Augsburg, Deutschland). Zur Reduzierung der Wärmestrahlung kam ein Hitzeschutzfilter (Balzers) zum Einsatz. Verschiedene Kombinationen von absorbierenden Neutralglasfiltern (Schott, Mainz, Deutschland) und reflektierenden Neutralglasfiltern (Melles Griot, Irvine, USA) definierten die photosynthetischen Photonenflussdichten. Mit Hilfe eines Kühlaggregates (F3, Haake, Karlsruhe, Deutschland) wurde die Temperatur im Innern der Blattkammer auf $20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingestellt.

Die polarographische Detektion des freigesetzten Sauerstoffs erfolgte mit einer Clark-Elektrode (Hansatech). Für die Verbindung von Platin-Kathode und Silberanode wurde handelsübliches Zigarettenpapier verwendet, das als Matrix für den Elektrolyt diente. Im Elektrolyt waren 0,4 M Boratpuffer (pH 9,0), 1,0 M Natriumhydrogencarbonat, eingestellt mit equimolarem Natriumcarbonat auf pH 9,0, und eine gesättigte Kaliumchlorid-Lösung im Verhältnis von 1:2:1 gemischt (Walker 1987). Über der Platinkatode wurde die Elektrolytmatrix mit einer für Sauerstoff durchlässigen Teflonmembran (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) abgedeckt. Die vorbereitete Elektrode polarisierte an einer Gleichstromquelle (CB1D, Hansatech), so dass nach etwa 2 h eine stabile Polarisationsspannung in Höhe von 500-600 mV vorlag. Die zu untersuchenden *Berberis*-Pflanzen wurden vor den Messungen mit einer 50 W Halogenlichtquelle (Osram) Photonenflussdichten ausgesetzt, die den Lichtbedingungen der Kultivierung entsprachen, um die Photosynthese auf einem konstanten, vergleichbaren Ausgangsniveau zu halten.

2.2.5.1 Bestimmung der maximalen Quantenausbeute der Sauerstoffentwicklung

Die maximale Quantenausbeute der photosynthetischen O₂-Evolution von Blättern beider *Berberis*-Varietäten wurde bei für die Photosynthese limitierenden PPF_D's bestimmt. Weißlicht-Bestrahlung der Pflanzen durch eine Halogenlichtquelle (Osram) über mindestens 30 min mit PPF_D's von 30, 130 und 300 μmol m⁻² s⁻¹ sollte sicherstellen, dass vor der Messung in den Blattproben der Calvin-Benson-Zyklus aktiviert war.

Nach dem Einbringen der Blätter in die Messapparatur, die zur Vermeidung eines Mangels an Luftfeuchtigkeit eine angefeuchtete Filzscheibe enthielt, wurden die Proben den zuvor festgelegten Photonenflussdichten ausgesetzt. Um einen limitierenden Einfluss der CO₂-Fixierung zu vermeiden, enthielt die Blattkammer eine auf 5 % erhöhte Kohlendioxidkonzentration (SL 5, Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland). Das durch die Sauerstoffentwicklung hervorgerufene Spannungssignal wurde mit einem Schreiber (Modell 3021, Yokogawa Electric, Musashino, Japan) aufgezeichnet. Nach der Erfassung der mitochondrialen Dunkelatmung erfolgte die Bestrahlung der Blattproben mit einer Photonenflussdichte von 10, 16 und 22 μmol m⁻² s⁻¹. Die Dauer der jeweiligen Bestrahlung betrug 5 min. Zur Eichung der Elektrode wurde 1 ml Umgebungsluft in die Messkammer injiziert. Der Eichwert entsprach der Differenz zwischen dem Spannungswert zum Zeitpunkt der Injektion und dem Signal, das sich nach dem Konzentrationsausgleich in der Apparatur einstellte. Die Messwerte wurden um die Eigendrift der Elektrode ohne Blattprobe korrigiert. Die Berechnung der Sauerstoffrate erfolgte durch:

$$O_2 [\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}] = (\Delta U_{\text{Probe}} / \Delta t_{\text{Probe}}) - (\Delta U_{\text{Drift}} / \Delta t_{\text{Drift}}) / 60 * 10000 / \text{BF} * 8,73 / \text{EW} \quad [\text{Gl. 8}]$$

wobei U für das Spannungssignal in mm steht, t die Zeit in s darstellt, BF die Blattfläche in cm² ist, der Wert 8,73 der Stoffmenge von Sauerstoff bei 20 °C in 1 ml Umgebungsluft entspricht (Walker 1987) und EW den Eichwert in mm wiedergibt. Für die um die Atmung korrigierten Sauerstoffraten wurden lineare Regressionen erstellt. Der Anstieg der Funktion entsprach der maximalen Quantenausbeute der O₂-Evolution am Photosystem II.

2.2.5.2 Erstellung photosynthetischer Lichtfluss-Effekt-Kurven

Für die Erstellung photosynthetischer Lichtfluss-Effekt-Kurven wurden ganze Blätter von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* aus den drei Lichtakklimatisationsstufen verwendet. Die Vorbehandlung der Blätter und die Messbedingungen entsprachen den Vorgaben, die unter 2.2.5.1 dargestellt sind. Die Tabelle 2.2 stellt Reihenfolge und Höhe der applizierten Lichtstärken dar.

Für die Bestimmung der O₂-Evolution im lichtgesättigten Bereich der Photosynthese wurde das Sauerstoffelektroden-System mit ca. 30 ml synthetischer Luft geflutet (SL 5, Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland), um mit einem Anteil von 5 % CO₂ der Rubisco ausreichend Substrat für die Fixieraktivität unter hohen Photonenflussdichten zur Verfügung zu stellen. Die Eichung der Elektrode erfolgte ebenfalls mit 1 ml Umgebungsluft.

Tabelle 2.2: Reihenfolge und Höhe der Quantenflussdichten, die zur Erstellung von photosynthetischen Lichtfluss-Effekt-Kurven für Blätter beider *Berberis*-Varietäten verwendet wurden. LAK = Lichtakklimatisationsstufe der Pflanzen ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), LS = Lichtstufe für die Bestimmung der Sauerstoffevolution ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

LAK	LS 1	LS 2	LS 3	LS 4	LS 5	LS 6	LS 7	LS 8	LS 9	LS 10	LS 11
30	0	116	218	338	516	836					
130	0	6,2	11,3	25,8	50,4	98	195	405	850	1350	1560
300	0	6,2	11,3	25,8	50,4	98	195	405	850	1350	1560

Die Gleichung 8 diente der Berechnung der Sauerstoffrate. Zur Analyse der Lichtfluss-Effekt-Kurven wurde der Regressionsassistent von Sigma Plot 11.0 (Systat, Chicago, USA) benutzt. Die Gleichungen 9 mit dem Verschiebungskoeffizienten (n) und der Quantenausbeute der Sauerstoffentwicklung (α) und 10 mit der maximalen Photosyntheserate (P_{\max}) repräsentieren die Berechnungsgrundlagen des Lichtkompensationspunktes (L_K) und des I_K -Wertes, die als zusätzliche Parameter zur Beschreibung der Lichtakklimatisation Verwendung fanden.

$$L_K = -n / \alpha \quad [\text{Gl. 9}] \quad \text{und} \quad I_K = P_{\max} / \alpha \quad [\text{Gl. 10}]$$

2.2.5.3 Ermittlung der maximalen Photosyntheserate P_{\max}

Mit den Blättern der roten und grünen *Berberis*-Phänotypen, die an die verschiedenen Lichtbedingungen der Anzucht adaptiert waren, wurde die maximale Photosynthesekapazität (P_{\max}) ermittelt. Unter den gleichen Voraussetzungen, die unter 2.2.5.1 beschrieben sind, erfolgte die Messung des photosynthetisch freigesetzten Sauerstoffs im Sättigungsbereich der Lichtfluss-Effekt-Kurven. Zu Beginn der Messreihe wurde die Apparatur mit ca. 30 ml synthetischer Luft (Air Liquide) begast, die 5 % CO_2 enthielt. Die Photonflussdichte für die Blätter der Schwachlichtakklimatisation betrug $516 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Für Blätter der beiden anderen Akklimatisationsstufen lag sie bei $1538 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Es folgte die Bestimmung der mitochondrialen Atmung und im Anschluss die Eichung der Elektrode mit 1 ml Umgebungsluft. Zur Berechnung der Sauerstoffrate wurde die Gleichung 8 verwendet. Die Sauerstoffrate wurde um die Dunkelatmung korrigiert.

2.3 Chemische Analytik und Messungen zur Enzymaktivität

2.3.1 Bestimmung des Anthocyangehaltes in Blättern

Pro Blatt wurden jeweils 2 Blattscheiben mit einer Fläche von $0,63 \text{ cm}^2$ ausgestanzt, in Reaktionsgefäße überführt, die Glaskugeln enthielten, und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blattscheiben wurden in einer Zelmühle (MM 2, Retsch, Haan, Deutschland) über 5 min mit 90 % der maximalen Schwingintensität aufgeschlossen. Das Homogenat der ersten Blattscheibe wurde mit $1000 \mu\text{l}$ 25 mM KCl (pH 1,0, eingestellt mit HCl) im Probenschüttler für 5 min extrahiert, während die zweite Blattscheibe mit $1000 \mu\text{l}$ 400 mM Natriumacetat (pH 4,5) extrahiert wurde. Nach der Zentrifugation bei $13000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min wurde die Extinktion der jeweiligen Überstände bei 510 nm im Spektrophotometer gemessen. Die

Berechnung des Anthocyangehaltes erfolgte entsprechend der Methode von Rapisarda et al. (2000).

2.3.2 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Blattscheiben (0,85 cm²) von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* aus den drei Lichtaklimatisationsstufen wurden nach dem Ausstanzen in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, die Silikatglaskugeln (3 Stück 1,7-2 mm, 3 Stück 3-4 mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland) enthielten. Mit Hilfe einer Zelmühle (Retsch) wurde das tiefgefrorene Blattmaterial bei 90 % der maximalen Schwingintensität über 5 min zerkleinert. Im ersten Extraktionsschritt erhielten die Proben 350 µl gekühlten Extraktionspuffer, der aus 20 % (v/v) 100 mM Hepes (pH 7,8) und 80 % (v/v) Aceton (Promochem, Wesel, Deutschland) zusammengesetzt war. Die Proben wurden unter mehrfachem Schütteln in einem auf 4 °C gekühlten Aluminiumblock extrahiert und anschließend bei 12000 x g (Biofuge *fresco*, Heraeus, Osterode, Deutschland) und 4 °C für 5 min sedimentiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Pellet wurde nochmals mit 350 µl des Extraktionspuffers aufgenommen. Nach der gleichen Vorgehensweise bei der Extraktion und der Zentrifugation schloss sich ein letzter Extraktionsschritt mit 300 µl 100 %igem Aceton an. Nach einer letztmaligen Zentrifugation wurde für 100 bzw. 200 µl der vereinigten Überständen die Absorption der Extrakte bei 663,6 nm, 646,6 nm und 750 nm im Spektrophotometer (Uvikon 922, Kontron Instruments, Mailand, Italien) gemessen. Da nach der Extraktion die Konzentration des Acetonanteils der Lösung bei 86 % lag, wurden auf der Grundlage der Gleichungen von Porra et al. (1989) zur Berechnung des Chlorophyllgehaltes in 80 % Aceton und 100 % Aceton neue Gleichungen aufgestellt.

$$\text{Chl a } [\mu\text{g ml}^{-1}] = (11,62 (\text{Abs}_{663,6} - \text{Abs}_{750})) - (2,038 (\text{Abs}_{646,6} - \text{Abs}_{750})) \quad [\text{Gl. 11}]$$

$$\text{Chl b } [\mu\text{g ml}^{-1}] = (22,11 (\text{Abs}_{646,6} - \text{Abs}_{750})) - (5,418 (\text{Abs}_{663,6} - \text{Abs}_{750})) \quad [\text{Gl. 12}]$$

2.3.3 Kalibration der HPLC für Carotinoide und Chlorophylle

Für die Kalibration der Photosynthesepigmente wurden an Schatten angepasste Blätter von *Hedera helix* aus dem Botanischen Garten der Universität Kiel verwendet. Etwa 5 g gefrorenes Blattmaterial wurde in einem vorgekühltem Mörser zerkleinert. Unter der Zugabe von Extraktionspuffer (20 % 10 mM Hepes (pH 7,8), 80 % Aceton, MgHCO₃) wurden die Pigmente aus den Blättern gelöst. Das Homogenat wurde in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C mit 4600 x g für 10 min zentrifugiert (Megafuge 1.0R Kendro, Hanau, Deutschland). Der Überstand diente zur Auftrennung der Photosynthesepigmente mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Dafür wurde der Extrakt im abgedunkelten Labor in mehreren Schichten auf DC-Alufolien Kieselgel 60 (Merck 5553, Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen und für ca. 1,5 h in Glaskammern entwickelt, die mit einem Laufmittel aus 50 ml Petrolether (100-140 °C) (Merck), 15 ml Isopropanol (Roth) und 62,5 µl H₂O gefüllt waren. Die unteren drei Banden, die die Pigmente Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein enthielten, wurden mit einem Spatel abgenommen und noch im feuchten Zustand durch einen Trichter in Zentrifugengläser mit 100 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Extrakte über 10 min bei 4 °C und 4600 x g. Die Überstände wurden in auf Eis stehende Reagenzgläser gegeben und als Stammlösungen für die Verdünnungsreihen verwendet. Für die Detektion der

Pigmente wurden 400 µl der entsprechenden Verdünnung mit 100 µl d_dH_2O in Einwegspritzen gemischt, durch 0,45 µm Filter (National Scientific, Rockwood, USA) in HPLC-Probengefäße überführt und mit dem HPLC-System analysiert. Die Carotinoide Zeaxanthin und β -Carotin wurden als Reinsubstanzen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für die Kalibrierung verwendet.

Parallel dazu wurde für alle Verdünnungen die Absorption zwischen 350 und 700 nm im Spektralphotometer Uvikon 922 (Kontron Instruments, Mailand, Italien) gemessen. Die Pigmentkonzentrationen dieser Standardlösungen konnten mit den Extinktionskoeffizienten von Davies (1976) bestimmt werden. Der Mittelwert aus den Extinktionskoeffizienten von Violaxanthin und Zeaxanthin bildete den Koeffizient für Antheraxanthin. Als Eichkoeffizienten wurden die Anstiege jener Funktionen verwendet, die aus der Regressionsanalyse der absorptionsbasierten Peakflächen (gemessen bei 445 nm im HPLC-PDA-Detektor) und der spektrophotometrisch ermittelten Pigmentmenge hervorgingen (Abb. 2.3).

Für die Eichung von Chl a und Chl b wurden die Pigmente aus *Berberis* Blättern beider Varietäten extrahiert (s. 2.3.2). Die spektrophotometrisch bestimmten Absorptionen der Extraktionslösungen bildeten die Grundlage für die Bestimmung der Chlorophyllkonzentrationen, die nach den Gleichungen 11 und 12 berechnet wurden. Die Ermittlung der Eichkoeffizienten folgte der Vorgehensweise bei den Carotinoiden.

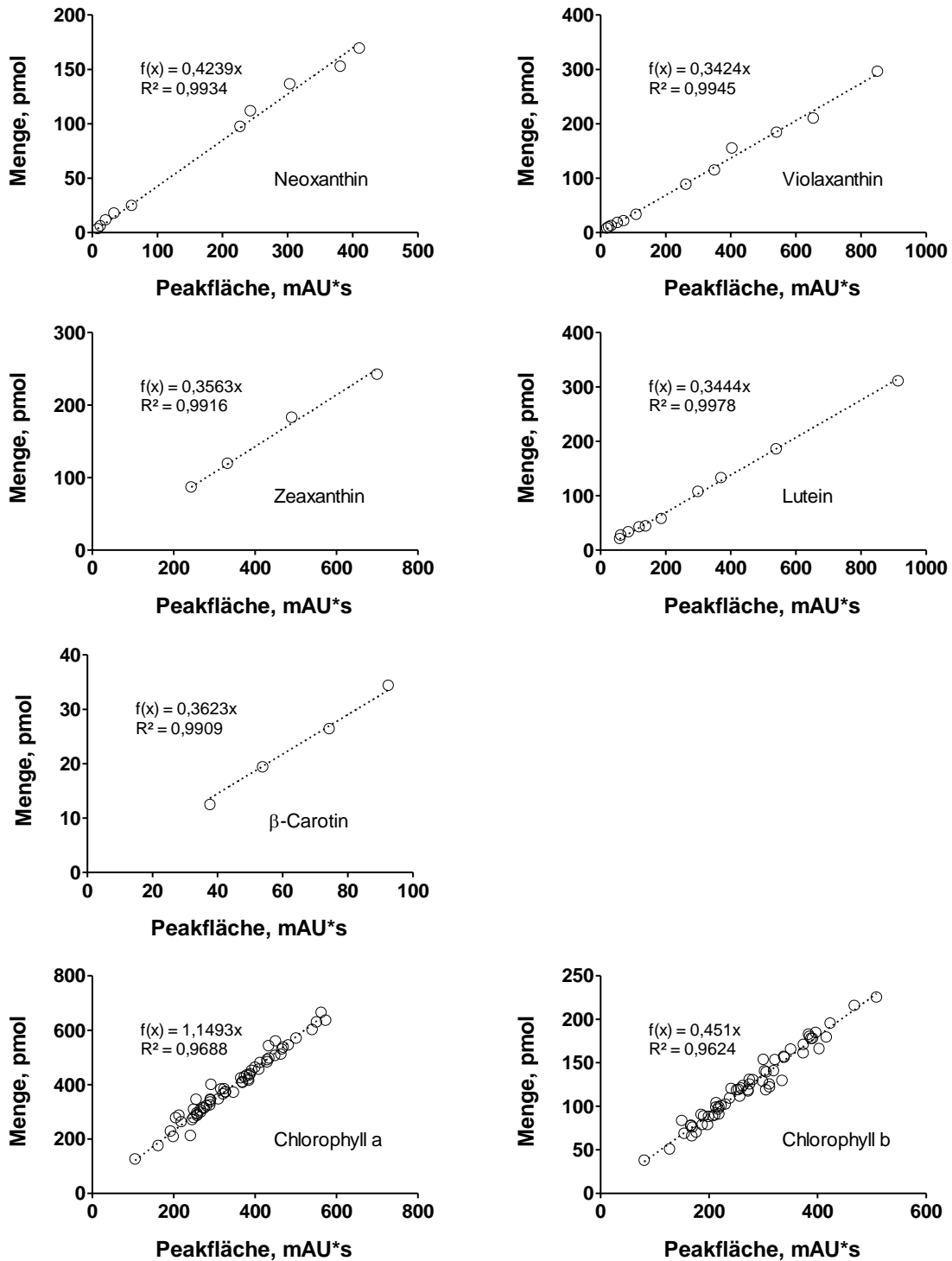


Abbildung 2.3: Lineare Regressionen mit den dazugehörigen Funktionen ermittelt für Carotinoide und Chlorophylle auf der Grundlage der absorptionsbedingten Peakflächen (Abszisse, gemessen bei 445 nm im PDA-Detektor der HPLC) und der spektrophotometrisch bestimmten Pigmentmenge (Ordinate). Der Anstieg der Funktionsgleichung gibt den Eichkoeffizienten wieder, der für die Berechnung der jeweiligen Pigmentkonzentration in den Blattproben die Grundlage bildete.

2.3.4 Extraktion von Photosynthesepigmenten zur Quantifizierung mittels HPLC

Die tiefgefrorenen Blattscheiben wurden mit der Zelmühle (Retsch) für 5 min homogenisiert. In einem ersten Extraktionsschritt wurde den Proben 500 µl gekühlter Extraktionspuffer (30 % (v/v) 30 mM TRIS (Roth) mit pH 7,8, 70 % (v/v) Aceton) zugesetzt. Bei der Extraktion von *Berberis* Blättern wurde 100 mM HEPES (Roth) mit einem pH-Wert von 7,8 verwendet. Die Proben wurden unter mehrfachem Schütteln in einem auf 4 °C gekühlten Aluminiumblock extrahiert und anschließend bei 12000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes erfolgte ein zweiter, identischer Extraktionsschritt. Im sich anschließenden 3. Extraktionsschritt wurde das Pellet mit 250 µl 100 %igem Aceton resuspendiert. Der 4. und finale Extraktionsschritt, der mit dem dritten übereinstimmte, führte letztendlich dazu, dass sämtliche Pigmente in einer Lösung mit 80 % Aceton vorlagen und so die Gleichungen von Porra et al. (1989) zur spektrophotometrischen Bestimmung des Chlorophyllgehaltes Anwendung finden konnten.

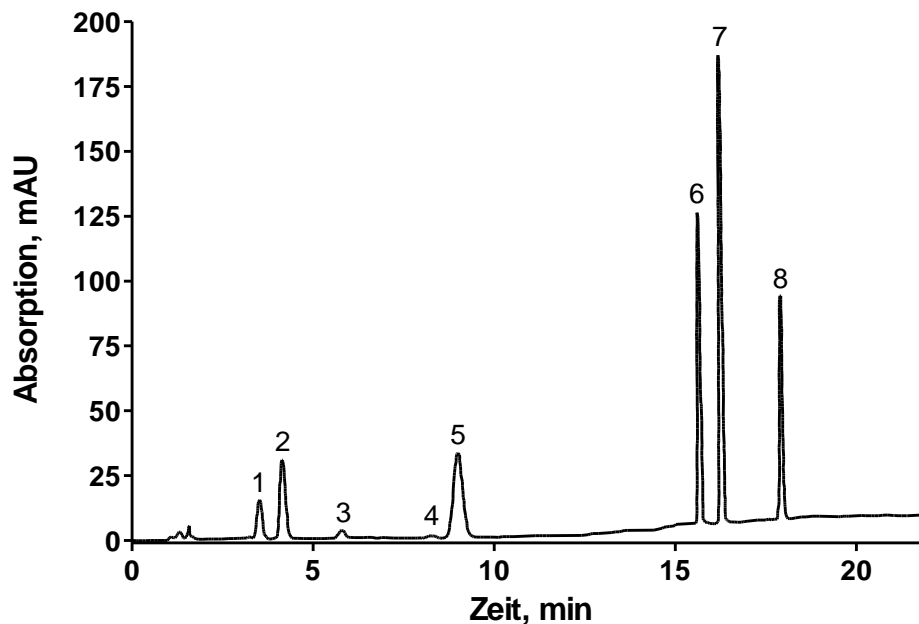


Abbildung 2.4: Chromatogramm der Photosynthesepigmente eines Blattextraktes von *B. thunbergii atropurpurea*, die an eine PFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16:8 h Photoperiode) akklimatisiert war. Dem 1. Pigment (Neoxanthin, Retentionszeit (t_R) = 3,47 min) folgen: 2. Violaxanthin t_R = 4,12 min; 3. Antheraxanthin t_R = 5,65 min; 4. Zeaxanthin t_R = 8,14 min; 5. Lutein t_R = 8,95 min; 6. Chlorophyll b t_R = 15,61 min; 7. Chlorophyll a t_R = 16,16 min und 8. β -Carotin t_R = 17,87 min. Dargestellt ist die vom PDA-Detektor erfasste Absorption bei 445 nm.

Zur Quantifizierung der Pigmente in einem Agilent 1100 HPLC-System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurden 400 µl des gefilterten (0,45 µm, National Scientific) Überstandes in HPLC-Probengefäße überführt. Als mobile Phase fand ein Gradient aus 10 mM Tris (pH 7,8) und 100 % Aceton Anwendung (Tab. 2.3). Die Trennung der Pigmente erfolgte mit einer Hypersil ODS-Säule (4,6 x 250 mm, Partikelgröße 5 µm, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei einer Durchflussrate von 2 ml min^{-1} . Die Abbildung 2.4 zeigt exemplarisch die Trennungsschärfe des Messsystems für die einzelnen Pigmente bei einem Injektionsvolumen von 50 µl. Mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors aus der Agilent-1100-Serie (Agilent) wurde die Absorption der Pigmente

bei 655 nm, 445 nm und für Phäophytin bei 407 nm detektiert. Zur weiteren Identifizierung der Substanzen diente ein Abgleich mit bekannten Retentionszeiten und mit den aufgezeichneten Absorptionsspektren der Pigmente. Der Gehalt von Carotinoiden und Chlorophyll a und b in den Proben wurde auf der Grundlage der Eichkoeffizienten berechnet, die nach der chromatographischen Trennung der Carotinoide in den Verdünnungsreihen und durch die spektrophotometrische Bestimmung der Chlorophyllkonzentration in *Berberis*-Blättern ermittelt wurden (Abschnitt 2.3.3).

Tabelle 2.3: Gradient der mobilen Phase zur Auftrennung von Photosynthesepigmenten aus Blättern von *A. thaliana* und *B. thunbergii* / *atropurpurea* in der Reverse-Phasen-Chromatographie mit dem Eluent A = 10 mM Tris (pH 7,8) und mit dem Eluent B = 100 % Aceton.

<i>Zeit in min</i>	<i>Eluent A (%)</i>	<i>Eluent B (%)</i>
0	25	75
7,5	25	75
17	0	100
20	0	100
22	25	75

2.3.5 Bestimmung des Gehaltes von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen in Blättern mittels HPLC

Die Analyse der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Flavonole und Hydroxyzimtsäuren in Blattscheiben (0,63 cm²) der drei Genotypen von *A. thaliana* erfolgte mittels HPLC. Für die Pigmentextraktion wurden tiefgefrorene Blattscheiben in der Zelmühle (Retsch) für 5 min homogenisiert. Danach wurde das Blattpulver mit 250 µl Extraktionspuffer, der aus 50 % (v/v) Methanol (T. J. Baker, Deventer, Niederlande), 50 % (v/v) ddH₂O und 1 % (v/v) konzentrierter Salzsäure bestand, extrahiert. Zusätzlich erhielt die Extraktionslösung 20 µl der Naringenin-Stammlösung (Roth), um bei der Berechnung der Stoffkonzentrationen die Wiederfindungsrate des internen Standards einbeziehen zu können. Die Proben wurden mit Hilfe des Schüttlers gemischt und für 5 min in einem auf 4 °C gekühlten Aluminiumblock inkubiert. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 8400 x g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen, und das Pellet wurde zwei weitere Male der Extraktion unterzogen. Der vereinigte Überstand durchlief nochmals einen Zentrifugationsschritt über 10 min bei 4 °C und 14000 x g. Anschließend wurden 400 µl des Extraktes durch einen 0,45 µm Filter (National Scientific) in HPLC-Probengefäße gefüllt.

Das verwendete HPLC-System stammte aus der Agilent 1100 Serie (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und bestand aus einem Entgaser, einem binären Pumpensystem, einem Autosampler, einem Säulenofen und einem DAD-Detektor. Die Bedienung des Systems, die Datenaquisition und die Datenauswertung erfolgten mit der Agilent ChemStation Software. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl. Der DAD-Detektor erfasste die einzelnen Flavonoide, deren Zusammensetzung exemplarisch für Blätter des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) in Abb. 2.5 dargestellt ist. Die Chromatogramme wurden bei 280, 314 und 360 nm aufgezeichnet. Als mobile Phase diente ein Gradient aus 0,01 % (v/v) Phosphorsäure (Laufmittel A) und 90 % (v/v) Methanol - 0,1 % (v/v) Phosphorsäure (Laufmittel B). Die Tabelle 2.4 zeigt den prozentualen

Anteil der Eluenten im Gradienten. Die Trennsäule war eine Agilent LiChrospher-100 RP-18 Säule mit einem Durchmesser von 4 mm, einer Länge von 250 mm und einer Partikelgröße von 5 μm . Die Temperatur des Säulenofens betrug 20 °C, und die Flussrate der mobilen Phase war 0,75 ml min^{-1} . Der Berechnung der Stoffkonzentrationen in den Extrakten lagen die Eichkoeffizienten von Schultze (2011) zugrunde.

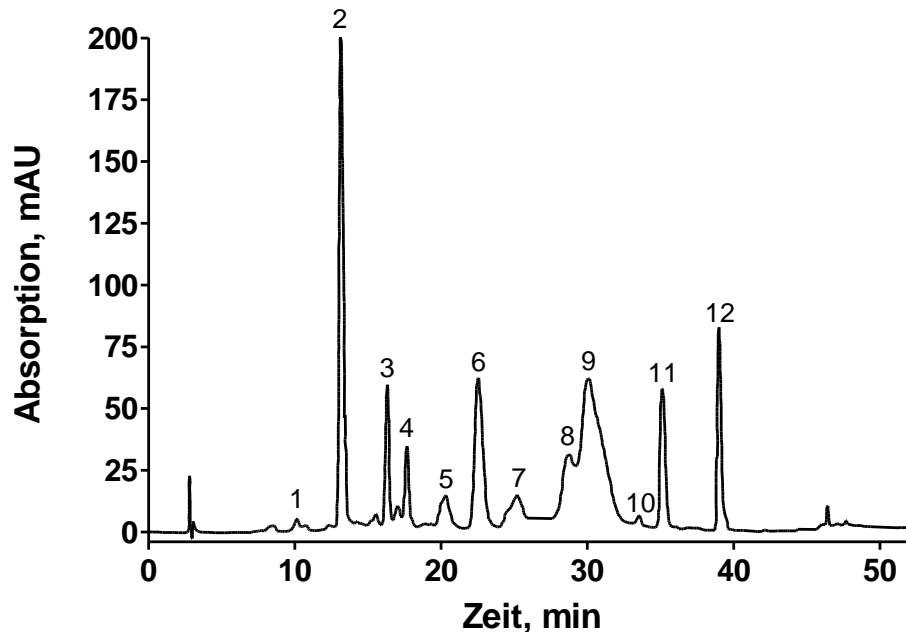


Abbildung 2.5: Chromatogramm eines Blattextraktes des Wildtyps (ler) von *A. thaliana* mit den löslichen Hydroxyzimtsäuren und Flavonolen, deren Synthese überwiegend durch eine 14-tägige Behandlung von 4 Wochen alten Pflanzen mit einer hohen Photonenflussdichte ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 9 °C induziert wurde. Nach Schultze (2011) handelte es sich dabei vermutlich um: 1. unbekannte Hydroxyzimtsäure $t_R = 10,01$ min; 2. Sinapoyl-Glykosid $t_R = 13,09$ min; 3. Quercetin-Dirhamno-Glykosid $t_R = 16,29$ min; 4. Kämpferol-Dirhamno-Glykosid $t_R = 17,59$ min; 5. Sinapoyl-Malat $t_R = 20,11$ min; 6. Quercetin-Glyko-Rhamnosid $t_R = 22,49$ min; 7. Kämpferol-Rhamno-Diglykosid $t_R = 24,98$ min; 8. Kämpferol-Glyko-Rhamnosid $t_R = 28,49$ min; 9. Quercetin-Dirhamnosid $t_R = 29,92$ min; 10. unbekannte Hydroxyzimtsäure $t_R = 33,21$ min; 11. Kämpferol-Dirhamnosid $t_R = 35,07$ min und 12. Naringenin $t_R = 38,94$ min als interner Standard. Dargestellt ist die Absorption bei 314 nm im DAD-Detektor.

Tabelle 2.4: Gradient der mobilen Phase für die chromatographische Bestimmung von Hydroxyzimtsäuren und von Flavonolen in Blättern des Wildtyps von *A. thaliana* und der Transparent Testa-Mutanten (*tt3*, *tt7*) in einem Reverse-Phasen-System. Eluent A = 0,01 % (v/v) Phosphorsäure, Eluent B = 90 % (v/v) Methanol - 0,1 % (v/v) Phosphorsäure.

Zeit in min	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	80	20
12	55	45
25	55	45
40	25	75
42	0	100
50	0	100
52	80	20

2.3.6 Bestimmung des Gehaltes von Tocopherolen in Blättern mit Hilfe der HPLC

Die Tocopherole wurden aus tiefgefrorenen Blättern des *Arabidopsis*-Wildtyps und der beiden Transparent Testa-Mutanten extrahiert, in denen durch eine PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $9 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h die Flavonoid-Biosynthese induziert war. Dafür wurden Blattscheiben (0.63 cm^2) in der Zelmühle (Retsch) für 5 min mit 90 % der verfügbaren Schwingintensität zermahlen. Das gefrorene Blattpulver wurde danach mit $120 \mu\text{l}$ Heptan (Roth) versetzt und vollständig resuspendiert. Die Extraktion erfolgte anschließend über Nacht bei $-22 \text{ }^\circ\text{C}$. Zur Trennung der löslichen Tocopherole von den Zellbruchstücken wurden die Proben für 20 min bei $14000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Für die quantitative Bestimmung wurden aus dem Überstand jeweils $40 \mu\text{l}$ in HPLC-Mikroprobengefäße überführt.

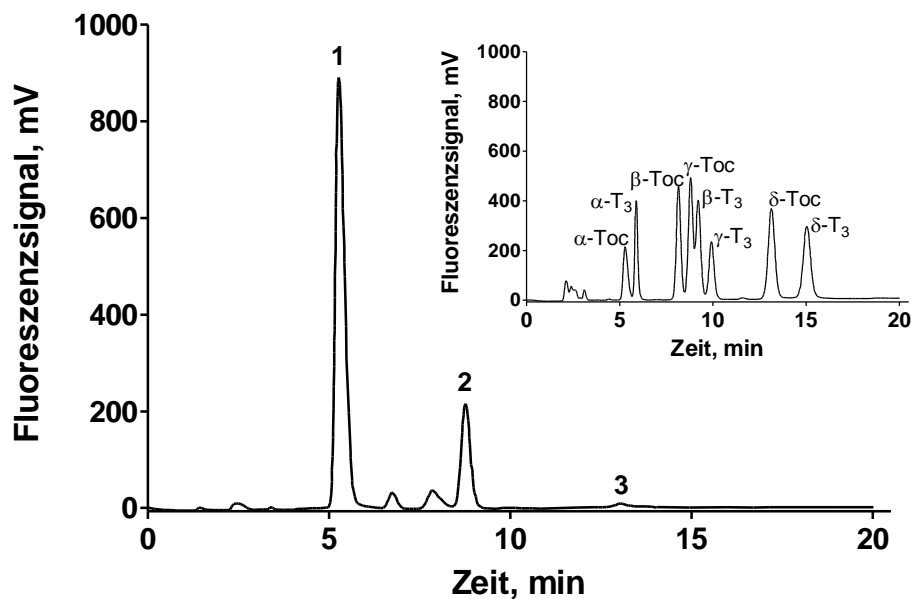


Abbildung 2.6: Chromatogramm eines Blattextraktes des Wildtyps (ler) von *A. thaliana* mit den in Heptan gelösten Tocopherolen. Die Pflanzen wurden nach einer 4-wöchigen Anzucht unter einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Photoperiode 8:16 h) bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ über 14 Tage mit einer PFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Kombination mit einer veränderten Photoperiode (16:8 h) bei $9 \text{ }^\circ\text{C}$ behandelt. Abgebildet ist das Fluoreszenzsignal des Detektors bei 328 nm nach einer Anregung bei 290 nm. Dem Verlauf des Signals konnten als Substanzen 1. α -Tocopherol $t_R = 5,24 \text{ min}$; 2. γ -Tocopherol $t_R = 8,72 \text{ min}$ und 3. δ -Tocopherol $t_R = 12,98 \text{ min}$ zugeordnet werden. Das eingefügte Chromatogramm beinhaltet die Fluoreszenzsignale des Standards (Merck) entsprechend der Retention der einzelnen Tocopherole (Toc) und Tocotrienole (T₃).

Die Trennung und die Detektion der Tocopherole erfolgten mit einem Shimadzu HPLC-System der 10er-Serie (Shimadzu, Kyoto, Japan). Die Tocopherole im Injektionsvolumen von $20 \mu\text{l}$ wurden isokratisch mit einem Eluenten aus 99 % (v/v) Heptan und 1 % (v/v) Isopropanol (Roth) über eine LiChrospher Si 60 Säule (250 mm, 4 mm Durchmesser, Partikelgröße $5 \mu\text{m}$, Merck) separiert. Die Flussrate des Eluenten betrug 1 ml min^{-1} . Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (RF-10XL, Shimadzu). Dafür wurde der Chromanring der Tocopherole mit 290 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz bei 328 nm detektiert. Wie aus der Abb. 2.6 hervorgeht, basierte die Identifizierung der einzelnen Tocopherole auf dem Vergleich mit den Retentionszeiten des externen Standards (Merck). Zur Auswertung der Chromatogramme und zur

Bestimmung der Peakflächen wurde die Software Class VP 7.4 SP 1 (Shimadzu) benutzt. Die Berechnung der Tocopherolgehalte in den Proben erfolgte mit Hilfe des Eichkoeffizienten, der aus der Kalibration mit unterschiedlichen Verdünnungen des externen Standards resultierte.

2.3.7 Bestimmung des Gehaltes von Malondialdehyd (MDA) in Blättern mit Hilfe der HPLC

Blattscheiben (0,63 cm²) der drei Genotypen von *A. thaliana* aus der Starklicht-Kühle-Induktion, die photooxidativem Stress (Abschnitt 2.4.2) ausgesetzt waren, wurden unverzüglich in 2 ml-Reaktionsgefäße, gefüllt mit Silikatglaskugeln (3 Stück 1,7-2 mm, 3 Stück 3-4 mm, Roth), überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss der gefrorenen Proben erfolgte in einer Zelmühle (Retsch) mit 90 % der möglichen Schwingintensität über einen Zeitraum von 5 min. Dem Homogenat wurde das Extraktionsmedium bestehend aus 80 % (v/v) Ethanol, 20 % (v/v) ddH₂O und 0,5 % (w/v) Butylhydroxytoluol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis von 1:10 (w/v) zum Frischgewicht der Blattscheiben zugegeben. Danach wurden die Proben für 5 min im Schüttler (Vortex Genius3, IKA, Staufen, Deutschland) extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bei 14200 x g für 10 min bei Raumtemperatur wurden 100 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Initiierung der Adduktbildung wurden dem Extrakt 400 µl 45 mM H₃PO₄ und 100 µl 50 mM Thiobarbitursäure (TBA) (AppliChem) zugefügt. Im folgenden Schritt wurden die Proben mittels Schüttler für 1 min homogenisiert. Die eigentliche Adduktbildung des Fluorophors erfolgte im Wasserbad bei 90 °C über einen Zeitraum von 60 min. Das kurze Abkühlen der Proben erfolgte in einem auf -22 °C gekühlten Aluminiumblock. Durch Zugabe von 300 µl Butanol (Merck) und dem sich anschließenden Mischen für 3 min im Schüttler gingen die MDA-TBA-Fluorophore in die hydrophobe Phase über. Die Auftrennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugieren bei 14000 x g für 3 min bei Raumtemperatur. Aus der oberen Butanol-Phase wurden 100 µl entnommen und in HPLC-Mikroprobengefäße überführt.

Zur Analyse des MDA-Gehaltes wurde die Methode von Agarwal und Chase (2002) leicht modifiziert. Der Autosampler (SIL-10ADVP, Shimadzu) entnahm jeweils 20 µl je Probe. Die Pumpenflussrate (LC-10ATVP, Shimadzu) der mobilen Phase, die aus einem Gemisch von 30 % (v/v) Methanol und 70 % (v/v) 50 mM KH₂PO₄ eingestellt auf pH 6,8 bestand, betrug 1 ml min⁻¹. Der Fluoreszenz-Detektor (RF-10XL, Shimadzu) regte die Fluoreszenz bei 515 nm an und erfasste sie bei 553 nm. Als stationäre Phase diente eine 125 x 4 mm ODS Hypersil Säule (Thermo Scientific, Waltham, USA) mit einer Partikelgröße von 5 µm. Die für die Analyse wichtige thermische Stabilität der Trennsäule garantierte ein Säulenofen (CTO-10AS, Shimadzu), der auf 37 °C eingestellt wurde. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit der einer Standardsubstanz diente zur Identifizierung von Malondialdehyd. In diesem Fall wurde Tetraethoxypropan (TEP) (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Der Standard wurde der oben beschriebenen Adduktbildung unterzogen. Verdünnungen des Standard-TBA-Produktes dienten zur Erstellung einer Eichgeraden und damit zur Berechnung eines Korrelationskoeffizienten, mit dem der MDA-Gehalt in den Proben bestimmt werden konnte (Abb. 2.7). Zur Auswertung der Peakflächen in den Chromatogrammen kam die Software Class VP 7.4 SP 1 (Shimadzu) zur Anwendung.

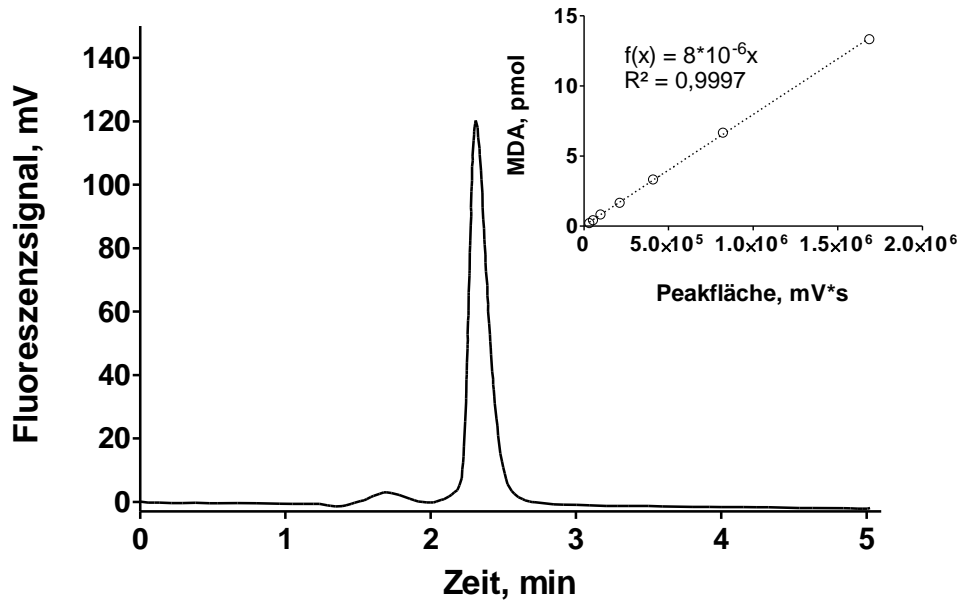


Abbildung 2.7: Chromatogramm eines Blattextraktes des Wildtyps (1er) von *A. thaliana* mit den in Butanol aufgenommenen MDA-TBA-Addukten. Die Pflanzen wurden nach einer 4-wöchigen Anzucht unter einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Photoperiode 8:16 h) bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ über 14 Tage mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Kombination mit einer veränderten Photoperiode (16:8 h) bei $9 \text{ }^\circ\text{C}$ behandelt. Nach einer Inkubation mit 4 mM Lincomycin und $100 \mu\text{M}$ Methylviologen wurden in den Blattscheiben mit photosynthetisch aktiver Strahlung oberhalb von 645 nm (PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) über 40 min photooxidative Bedingungen erzeugt. Dargestellt ist das mit 515 nm angeregte und bei 553 nm detektierte Signal des Fluoreszenzdetektors. Die eingefügte Kalibrierfunktion für das Fluoreszenzsignal des TEP-MDA-Adduktes zeigt den Eichkoeffizienten zur Berechnung des MDA-Gehaltes.

2.3.8 Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase (SOD)

Für die Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität wurden Blattscheiben des Wildtyps (1er) von *A. thaliana* und der beiden Transparent Testa-Mutanten aus der Starklicht-Kühle-Behandlung in Silikatglaskugeln enthaltende Reaktionsgefäße (2 ml) überführt und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden in der Zelmühle (Retsch) bei 90 % der maximalen Schwingkapazität homogenisiert und anschließend mit 1 ml 100 mM KH_2PO_4 (pH 7,8) versetzt. Nach dem Mischen für 5 min im Probenschüttler sedimentierte der Zellbruch in einem Zentrifugationsschritt über 30 min bei $1300 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Zusammen mit den notwendigen Reagenzien vervollständigten $50 \mu\text{l}$ der Überstände die Zusammensetzung der Messproben zur Bestimmung der Superoxiddismutase-Aktivität (Tab. 2.5):

Material und Methoden

Tabelle 2.5: Reaktionspartner zur adäquaten Photoaktivierung von Riboflavin und zum spektrophotometrischen Nachweis der Superoxiddismutase-Aktivität *in vitro* mit dem dazugehörigen Volumenanteil in den Null- und Messproben.

Reagenzien zur Bestimmung der SOD-Aktivität	Nullprobe	Messprobe
1 mM Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	50 µl	50 µl
1 mM Riboflavin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	25 µl	25 µl
100 mM Methionin (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	100 µl	100 µl
100 mM KH ₂ PO ₄	50 µl	50 µl
Pflanzenextrakt	-	50 µl
Wasser	775 µl	725 µl

Die Photoaktivierung von Riboflavin und die dadurch verursachte Superoxid-Radikalbildung *in situ* erfolgten mit einer Weißlichtquelle (KI 2500, Schott, Mainz, Deutschland). Mess- und Nullproben waren für 3 min einer Photonenflussdichte von 300 µmol m⁻¹ s⁻² ausgesetzt. Die Referenz und die Kontrollproben verblieben im Dunklen. Bei 560 nm und 750 nm wurden im Spektrophotometer die Extinktionen der Mess- und Nullproben sowie der Kontrollen ermittelt. Die Aktivität der Superoxiddismutase entsprach:

$$A_{\text{SOD}} = \frac{0,5 \times (\text{Nullprobe}_{560\text{nm}} - \text{Nullprobe}_{750\text{nm}})}{(\text{Messprobe}_{560\text{nm}} - \text{Messprobe}_{750\text{nm}}) - (\text{Kontrolle}_{560\text{nm}} - \text{Kontrolle}_{750\text{nm}})} \quad [\text{Gl. 13}]$$

Als Aktivitätseinheit (A_{SOD}) wurde eine Inhibition der Formazan-Bildung um 50 % definiert. Der Chlorophyllgehalt in den Blattscheiben der Genotypen bildete die Bezugsgröße für die Enzymaktivität.

2.3.9 Bestimmung der Aktivität der Ascorbat-Peroxidase (APX)

Induzierte Blattproben des Wildtyps von *A. thaliana* und der beiden Mutanten des Phenylpropanoid-Syntheseweges, *tt3* und *tt7*, dienten der vergleichenden Bestimmung der Ascorbat-Peroxidase-Aktivität. Dafür wurden Blattscheiben (0,63 cm²) der Genotypen, die sich zusammen mit Silikatglaskugeln in 2 ml-Reaktionsgefäßen befanden, in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss des Blattmaterials erfolgte mit einer Zelmühle (Retsch) bei 90 % der maximalen Schwingrate über 5 min. Die Zugabe von 1 ml des eisgekühlten 50 mM KH₂PO₄-Na₂HPO₄-Puffers mit pH 7,8, der zusätzlich 1 mM EDTA (Roth) und 1 mM Ascorbinsäure (Merck) enthielt, initiierte die Extraktion. Die nachfolgende Zentrifugation mit 1350 x g über 30 min bei 4 °C trennte die Enzyme vom Zellbruch, sodass sie dem Überstand entnommen werden konnten. Zur Vorbereitung der Messung wurden 10 ml des KH₂PO₄-Na₂HPO₄-Puffers mit pH 6,8 auf 0,6 mM Ascorbinsäure (Messpuffer) eingestellt.

Material und Methoden

In Einmal-Küvetten wurden zweimal 900 µl des Messpuffers und jeweils 100 µl des Überstandes, deren jeweilige Temperatur bei etwa 25 °C lag, mit Hilfe einer Pipette gemischt. Ein Ansatz fand als Referenz Verwendung, der zweite Ansatz war die Messprobe. Diese Probe erhielt 10 µl 20 mM H₂O₂, das nach dem Zufügen über einen Zeitraum von 3 s mit einem Spatel in der Küvette verteilt wurde. Die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 290 nm zur Bestimmung der Aktivität der Peroxidase erfolgte bei Raumtemperatur. Wie der Abb. 2.8 zu entnehmen ist, bestand die Abnahme der Extinktion aus zwei Phasen. Zur Bestimmung der APX-Aktivität eignete sich die Steigung ($\Delta A / \Delta t$) in der linearen Initialphase der Messung, die nachfolgend eine Sättigungsphase innerhalb der Gesamtdauer von 3 min aufwies. Die Grundlage zur Berechnung der Enzymaktivität (Gleichung 14), in der VF für den Verdünnungsfaktor steht, bildete der Extinktionskoeffizient von Ascorbat (ϵ_{ASC}) bei 290 nm, der für diese Wellenlänge 2,8 l mM⁻¹ cm⁻¹ beträgt (Nakano und Asada 1981):

$$A_{APX} = (\Delta A / \Delta t)_{\text{linear}} / \epsilon_{ASC} * VF \quad [\text{Gl. 14}]$$

Die Umsatzrate der APX für Ascorbinsäure wurde abschließend in Relation zum Chlorophyllgehalt der jeweiligen Blattscheiben gesetzt.

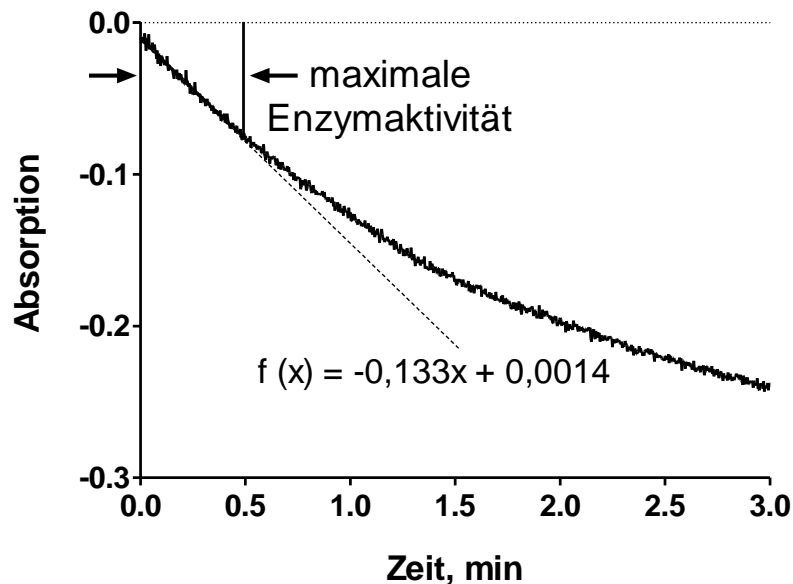


Abbildung 2.8: Änderung der Absorption von Ascorbat bei 290 nm aufgrund der Ascorbat-Peroxidase-Aktivität bei Raumtemperatur. Exemplarisch dargestellt ist der Verlauf der Enzymaktivität in einer Messlösung, die neben 0,6 mM Ascorbat, 10 µl 20 mM H₂O₂ auch die Ascorbat-Peroxidase aus einer Blattprobe des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) enthielt, der zur Induktion der Anthocyan-Biosynthese mit einer PPFD von 300 µmol m⁻² s⁻¹ (Photoperiode 16:8) bei 9 °C für 14 Tage behandelt wurde. Ausgewiesen ist der Anfangsbereich der Reaktion, in dem über etwa 30 s eine konstante Absorptionsänderung bestand. Die angegebene Funktionsgleichung der Form $f(x) = mx + n$ beschreibt diesen Zusammenhang. Der Anstieg der Funktion (m) spiegelt die Absorptionsänderung im Zeitverlauf ($\Delta A / \Delta t$) wider.

2.3.10 Bestimmung der niedrigmolekularen antioxidativen Kapazität von Blattroben mit dem TAC-Assay

Basis des Assays ist die Oxidation von Luminol durch H_2O_2 unter alkalinen Bedingungen zu Aminophthalat, die zur Emission von blauem Licht (420 nm) führt. Die Chemilumineszenzreaktion wird dabei durch die Meerrettich-Peroxidase und Phenole mit einer OH-Gruppe in der *para*-Position katalysiert. In Anwesenheit einer antioxidativ wirksamen Substanz mit einem niedrigen Reduktionspotential wird das Luminol-Radikal durch einen Elektronentransfer neutralisiert und die Lumineszenz erzeugende Reaktion blockiert (Saleh und Plieth 2010).

Jeweils 300 mg Blattmaterial der drei *Arabidopsis*-Genotypen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit Hilfe der Schwingmühle über 5 min aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Extraktion des Homogenats in einer Stickstoffatmosphäre mit 1,5 ml 100 mM TRIS-HCl Puffer (pH 8,6), der auf 2 mM CaCl_2 eingestellt war. Die Zentrifugation des Extraktes in Filtergefäßen mit einer Trenngröße von 10 kDa (Roche, Risch, Schweiz) bei 16500 x g (5417C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) über 90 min trennte die niedrigmolekularen, antioxidativ wirksamen Verbindungen vom enzymatischen Komplex. Die Extrakte wurden danach mit dem TRIS-HCl-Puffer im Verhältnis von 1:200 verdünnt. Nachdem ein Luminometer-Probengefäß (Sarstedt), das 5 ml eines Reaktionsgemisches aus 2 μM 4-Iodphenol (Sigma-Aldrich), 1 mM Luminol (Sigma-Aldrich), ca. 200 mU ml^{-1} Meerrettich-Peroxidase (Sigma-Aldrich), 1,1 mM Triton X-100 und 100 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 8,6) enthielt, im Luminometer (PMT 9829A, Electron Tubes, Uxbridge, Großbritannien) platziert war, detektierte der Photomultiplier bei einer Spannung von 1380 Volt zunächst das Hintergrundsignal über 12 s. Die Zugabe von 500 μl 2,2 mM H_2O_2 initiierte die Lichtreaktion. Nach 36 s war das Signal stabil und 500 μl der verdünnten Blattextrakte wurden zugesetzt. Erst nachdem die Lumineszenz ihr Ausgangsniveau erreichte, wurde die Detektion des Lichtsignals beendet. Die vergleichende Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte auf der Grundlage der berechneten Anstiege in der exponentiellen Phase des Signalverlaufes.

2.4 Experimente zur Inhibition von Photosystem II

2.4.1 Hemmung der Reparatur des D1-Proteins durch Lincomycin

Die für die Reparatur von Photosystem II notwendige Synthese des D1-Proteins lässt sich durch Lincomycin hemmen, das an die ribosomalen Untereinheiten bindet und so die Translation blockiert (Champney und Tober 2000). Für den Nachweis der Wirksamkeit dieser Methode wurden Blattscheiben (0,63 cm^2) von Pflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* (col), die über 4 Wochen bei 21 °C unter einer PPFD von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Hell-Dunkel-Zyklus von 8:16 h wuchsen und danach der gleichen PPFD bei 9 °C und einer veränderten Photoperiode (16:8 h) ausgesetzt waren, mit Lincomycin (AppliChem) inkubiert. Bevor die Blattproben auf unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors verteilt wurden, erfolgte die Bestimmung der maximalen Quantenausbeute von PS II (F_v / F_m) nach einer Dunkeladaptation von 20 min mit dem Imaging-PAM-System (Walz). Zur Aufnahme des Wirkstoffs lagen die Blattscheiben in Kunststoff-Petrischalen (Sarstedt 94 x 16 mm, Nümbrecht, Deutschland) auf gefalteten Papiertüchern (SCA Tork Advanced, Mannheim, Deutschland), die mit 20 ml 0 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM oder 8 mM Lincomycin getränkt waren. Die Inkubation erfolgte im Tageslicht unter

einer PPFD von $3\text{--}4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über 240 min bei Raumtemperatur. Nach dem Verstreichen der Inkubationszeit wurde der F_v / F_m -Wert erneut bestimmt. Zur Inhibition von PS II waren die Blattproben im Anschluss einer PPFD von $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erzeugt durch eine HQI-Lampe (Powerstar Daylight 400 W, Osram, München, Deutschland) über einen Zeitraum von 180 min ausgesetzt. Um den negativen Einfluss hoher Temperaturen aufgrund der Bestrahlung zu vermeiden, lagen die Blattscheiben mit den getränkten Papiertüchern auf einer mit Wasser gefüllten Kühlbox (Kunststoffgehäuse mit Aluminiumdeckel, $8 \times 20 \times 30 \text{ cm}$, Werkstatt im Biozentrum, CAU Kiel), die an ein Kühlaggregat (RK 8 CP, Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland) angeschlossen war. Die Temperatur des zugeführten Wassers betrug $7 \text{ }^\circ\text{C}$, sodass die Oberflächentemperatur der Blattscheiben (Tastotherm D 700, Gulton-Statham, Rochester, USA) auf der Aluminiumfläche in einem Bereich von $15\text{--}18 \text{ }^\circ\text{C}$ stabilisiert werden konnte. Die Kontrollproben befanden sich ebenfalls unter der Lichtquelle, wurden aber mit einer Messingkappe abgedeckt.

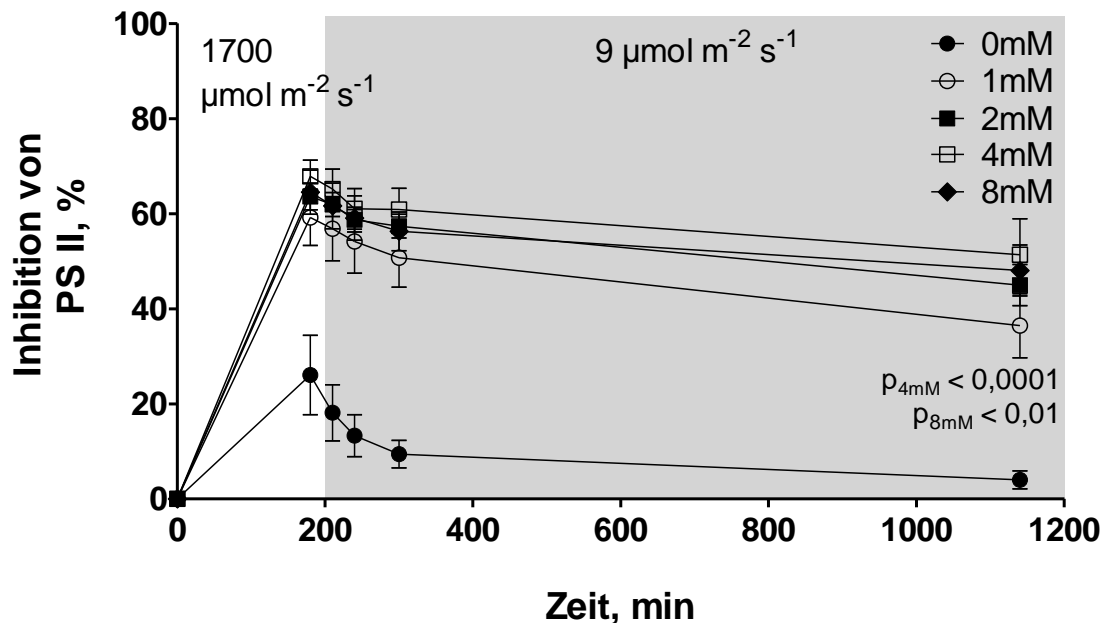


Abbildung 2.9: Verlauf der Inhibition von Photosystem II in Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (col), der zur Induktion der Anthocyan-Biosynthese mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $9 \text{ }^\circ\text{C}$ im 16:8 h Hell-Dunkel-Zyklus behandelt wurde. Die mit den unterschiedlichen Lincomycin-Konzentrationen inkubierten Blattproben waren über 180 min einer PPFD von $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt. Für den sich anschließenden Vergleich der enzymatischen Instandsetzung der Photosysteme wurde die Quantenflussmenge auf $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ abgesenkt. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der maximalen Quantenausbeute von PS II in Bezug zum Wert, den die Kontrollproben nach 180 min aufwiesen. Die Daten wurden im Hinblick auf statistische Unterschiede zwischen den Wirkstoffkonzentrationen mit einer zweifaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni Post hoc-Test überprüft. Angegeben sind weiterhin die Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) für die signifikanten Unterschiede zwischen der 1 mM-Konzentration und der 4 bzw. 8 mM-Konzentration nach 960 min Photoregeneration. $N = 5$, SD

Eine erneute Messung der Quantenausbeute von PS II nach einer Vorverdunklung von 20 min dokumentierte die Auswirkungen der Behandlung. Während der Reparaturphase wurden die Blattscheiben mit einer PPFD von $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erzeugt durch Fluoreszenzlampen (Universal-Weiß, Osram) in einem Klimaschrank (Rumed, Rubarth, Laatzen, Deutschland) bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$

bestrahlt. Die Regenerationskinetiken von Photosystem II ergaben sich aus der Bestimmung des F_v / F_m -Wertes nach 30, 60, 120 und 960 min in Bezug zur photochemischen Effizienz der Kontrollproben bei 180 min. Die Abbildung 2.9 stellt den Verlauf der PS II-Schädigung für die unterschiedlichen Lincomycin-Konzentrationen dar.

2.4.2 Inkubation von Blattscheiben mit Methylviologen

Mit Hilfe synthetischer Elektronenakzeptoren lassen sich *in vivo* Bedingungen erzeugen, bei denen photosynthetisch aktive Strahlung in Blattproben die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren kann. Beispielsweise wird vom dritten Eisen-Schwefel-Zentrum (F_B) des Photosystem I ausgehend das Herbizid Methylviologen radikalisiert, das in der Folge molekularen Sauerstoff reduziert (Fujii et al. 1990). Das so entstandene Superoxid ist in der Lage, unmittelbar oder über H_2O_2 sensible Zellstrukturen zu beschädigen.

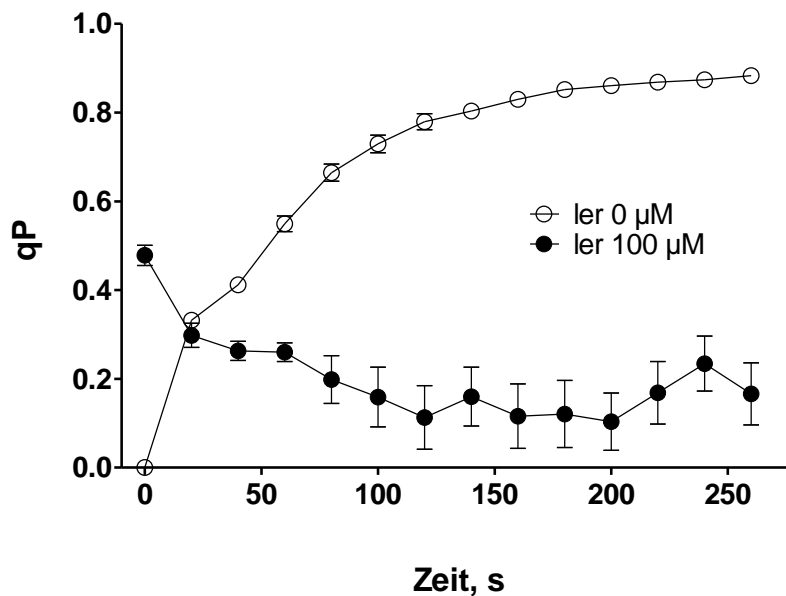


Abbildung 2.10: Kinetiken der photochemischen Fluoreszenz-Löschung (qP) bei einer PPFD von $146 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für Blattproben des Wildtyps (ler) von *A. thaliana*, in denen durch die Behandlung mit hohen Photonendichten ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 9°C die Akkumulation von Anthocyanen induziert war. Die Blattscheiben wurden über 240 min entweder mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ oder mit $100 \mu\text{M}$ Methylviologen im Tageslicht unter einer PPFD bei $3\text{-}4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert. Die Berechnung von qP erfolgte nach Schreiber et al. (1986). $N = 5$, SEM

Um zu überprüfen, ob sich Blätter wie mit Lincomycin in gleicher Weise auch mit Methylviologen inkubieren lassen, wurden Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) aus der Starklicht-Kühle-Behandlung mit Methylviologen inkubiert. Dafür lagen Blattscheiben ($0,63 \text{ cm}^2$) im Tageslicht unter einer PPFD von $3\text{-}4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Polystyrol-Petrischalen (Sarstedt) auf gefalteten Papiertüchern (SCA), die mit 20 ml $100 \mu\text{M}$ Methylviologen (Sigma Aldrich) getränkt waren. Die durch Vorexperimente bestätigte wirksame Inkubationszeit betrug 240 min bei Raumtemperatur. Die Kontrollproben wurden mit 20 ml $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ inkubiert.

Im Anschluss wurden für die Blattproben mit dem Imaging-PAM-System (Walz) Chlorophyllfluoreszenzkinetiken erstellt, um die Wirkung des Herbizids nachzuweisen. Als Maß dafür wurde die photochemische Fluoreszenz-Löschung (qP) am Photosystem II benutzt, die in diesem Fall vom eingeschränkten Elektronentransport am PS I abhängig ist. Durch die Gabe von sättigenden Lichtpulsen (PPFD $2400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) während einer Bestrahlung mit aktinischem Licht (PPFD $146 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) wurde nach Schreiber et al. (1986) die photochemische Fluoreszenzlöschung bestimmt. Niedrige qP-Werte in Abb. 2.10 zeigen, dass in den Blättern hohe Methylviologenkonzentrationen erreicht wurden, die den Elektronenfluss deutlich hemmten.

2.4.3 Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photoinhibition von PS II

Um die photoprotektive Wirkung von Anthocyanen und Quercetin beurteilen zu können, wurde die photochemische Stabilität von PS II unter exzessiven Photonenflussdichten getestet. Die Blattproben stammten vom *A. thaliana* Wildtyp (Ier) sowie von den beiden Deletionsmutanten *tt3* und *tt7* aus der bereits beschriebenen Starklicht-Kühle-Behandlung. Am Vortag des Experimentes wurden jeweils 10 Pflanzen der drei Genotypen ausgewählt und in Schwachlichtbedingungen ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $9 \text{ }^\circ\text{C}$) überführt, um in den Blättern durch einen effektiven D1-Protein-Reparaturzyklus ein vergleichbares Ausgangsniveau der photochemischen Effizienz von PS II zu etablieren. Die Entnahme der Proben aus ausdifferenzierten Blättern erfolgte ca. 3 h nach Einschalten des aktinischen Lichtes. Vor der Verteilung der Blattscheiben ($0,63 \text{ cm}^2$) auf die einzelnen Petrischalen, die entweder mit $20 \text{ ml } \text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ befeuchtete oder mit $20 \text{ ml } 4 \text{ mM}$ Lincomycin getränkte Papiertücher (SCA) enthielten, wurde die maximale PS II-Quantenausbeute (F_v / F_m) der Proben bestimmt. Die Inkubationsverhältnisse der Proben entsprachen den unter 2.4.1 dargestellten Bedingungen. Im Fall der Lincomycin-Behandlung schloss sich dem Ende der Inkubationszeit eine erneute Bestimmung des F_v / F_m -Wertes an. Zur Inhibition von PS II waren die Blattscheiben anschließend verschiedenen Quantenflussmengen ausgesetzt, die aus der Kombination einer HQI-Lampe (Osram) mit unterschiedlichen Neutralfiltern (Schott, Mainz, Deutschland) hervorgingen. Die Weißlicht-Neutralfilter-Kombinationen definierten Photonenflussdichten von 100, 500, 1000, 1500 und $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Lichteinwirkung auf die Kontrollproben konnte durch einen Messingdeckel über den Blattscheiben vermieden werden. Ein Überhitzen der Blattproben verhinderte das unter 2.4.1 beschriebene Kühlsystem. Nach der Behandlung über 180 min wurden die Proben zur Relaxation der Elektronentransportkette und zum Abbau des thylakoidalen Protonengradienten für 20 min dunkeladaptiert. Danach erfolgte die abschließende Messung der maximalen Quantenausbeute von PS II. Die Werte der Kontrollproben dienten als Bezugsgröße zur Berechnung der prozentualen Inhibition von Photosystem II.

2.4.4 Inhibition von Photosystem II durch verschiedene Lichtqualitäten

In einem weiteren Experiment zur Photoinhibition von PS II wurden Blattscheiben der drei induzierten *Arabidopsis*-Genotypen verschiedenen Lichtqualitäten ausgesetzt.

Die Probenahme folgte dem Vorgehen, das unter 2.4.3 beschrieben wurde. Vor der Behandlung dokumentierte die Messung der maximalen Quantenausbeute von PS II (F_v / F_m , Imaging-PAM-System, Walz) die Homogenität der photochemischen Effizienz in den Blattproben. Die sich anschließende Inkubation der Blattscheiben in Petrischalen mit 4 mM

Lincomycin über 240 min fand im Tageslicht unter einer PPFD von $3\text{-}4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ statt. Eine erneute Messung des F_v / F_m -Wertes nach der Inkubation legte für jede Probe den individuellen Kontrollwert fest.

Zur Erzeugung von blauem Licht wurde die Strahlung eines Weißlicht-LED-Panels (Psi, Brno, Tschechien) durch einen dichroitischen Blaulichtfilter (DT Blue, Balzers) geleitet. Grünes und rotes Licht gingen aus der Kombination eines dichroitischen Grünlichtfilters (DT Green, Balzers) bzw. eines 645 nm-Langpassfilters (RG 645, Schott) mit einer HQI-Lampe (Osram) hervor. Im Überblick werden die Transmissionsspektren der verwendeten Filter in Abbildung 2.11 aufgeführt. Die Fläche der Filter war mit 25 cm^2 ausreichend, um jeweils fünf Blattscheiben je Genotyp zu überdecken. Während der Inhibitionsbehandlung betrug die Photonenflussdichte in jedem Spektralbereich $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nach einer Starklichtexposition über 300 min entsprach die Bestimmung der Photodeaktivierung von PS II dem bereits beschriebenen Vorgehen.

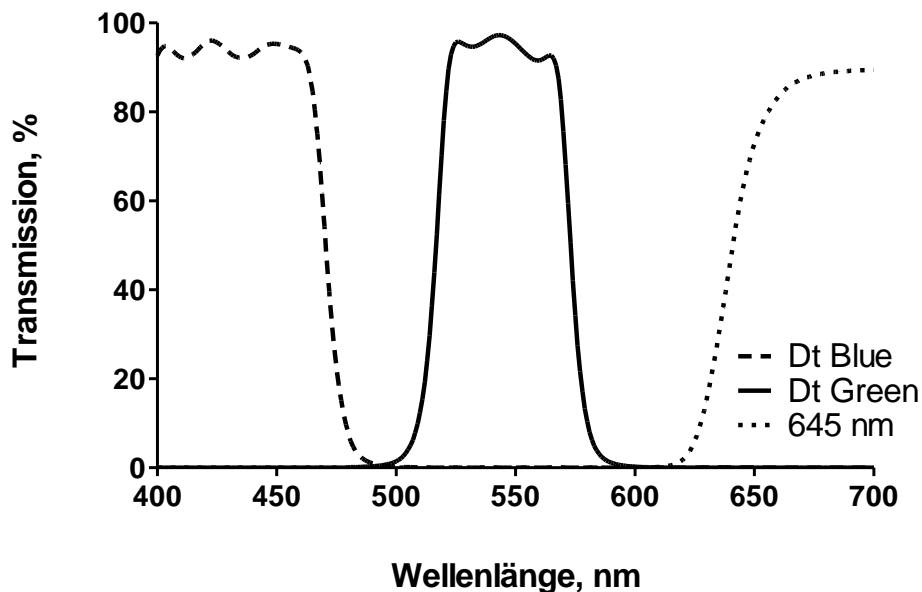


Abbildung 2.11: Transmissionsspektren der Filter, die zusammen mit einem Weißlicht-LED-Panel (Psi) und einer HQI-Lampe (Osram) zur Erzeugung von photosynthetisch aktiver Strahlung im blauen, grünen und roten Spektralbereich verwendet wurden. Die Messung der Transmission erfolgte in einem Spektrophotometer (Uvikon) in 1 nm-Schritten gegen Luft als Referenz.

2.4.5 Photooxidative Inhibition von Photosystem II

Für den experimentellen Vergleich der antioxidativen Wirkung von Anthocyanen und Quercetin auf die funktionale Integrität von PS II in Blättern von *A. thaliana* wurden Pflanzen des Wildtyps und der beiden Deletionsmutanten des Phenylpropanoid-Syntheseweges, *tt3* und *tt7*, die keine Anthocyane bzw. Quercetin akkumulierten, im Kurztag (8:16 h Photoperiode) unter einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert. Nach 4 Wochen bewirkte das Absenken der Umgebungstemperatur auf $9 \text{ }^\circ\text{C}$ in Kombination mit einer verlängerten Photoperiode (16:8 h) bei gleichbleibender Photonenflussdichte die Induktion des Phenylpropanoid-Syntheseweges.

Maximalgehalte von Anthocyanen in Blättern des Wildtyps und von Quercetin in der *tt3*-Mutante waren nach ca. 14 Tagen detektierbar (Xe-PAM-Methode, HPLC-Analytik).

Pflanzen der drei Genotypen, die dieses Stadium erreicht hatten, fanden in den verschiedenen Versuchen zur Beurteilung der antioxidativen Wirksamkeit der Polyphenole Verwendung. Die Entnahme der Proben entsprach den Modalitäten, die unter 2.4.3 aufgeführt sind. Vor der Inkubation stellte die Messung der maximalen Quantenausbeute von PS II sicher, dass die Blattproben eine vergleichbare photochemische Effizienz aufwiesen. Die Inkubation der Blattscheiben mit d_4H_2O , Lincomycin und Methylviologen entsprach dem bereits erwähnten Vorgehen. Zur Induktion von photooxidativen Bedingungen in den Zellen lagen die Blattscheiben entweder unter 645 nm-Langpassfiltern (Schott), die bei einer Größe von 5 x 5 cm pro Genotyp 5 Blattscheiben abdeckten, oder sie befanden sich unterhalb eines Grünlichtfilters, der mit einer Fläche von 200 cm² gleichzeitig Platz für drei getrennte Ansätze bot. Das Transmissionsspektrum des Grünlichtfilters ist in Abb. 2.12 dargestellt. Als Lichtquelle diente jeweils eine HQI-Lampe (Osram). Während der Behandlung stabilisierte das unter 2.4.1 beschriebene Kühlsystem die Temperatur der Blattproben bei 15-18 °C.

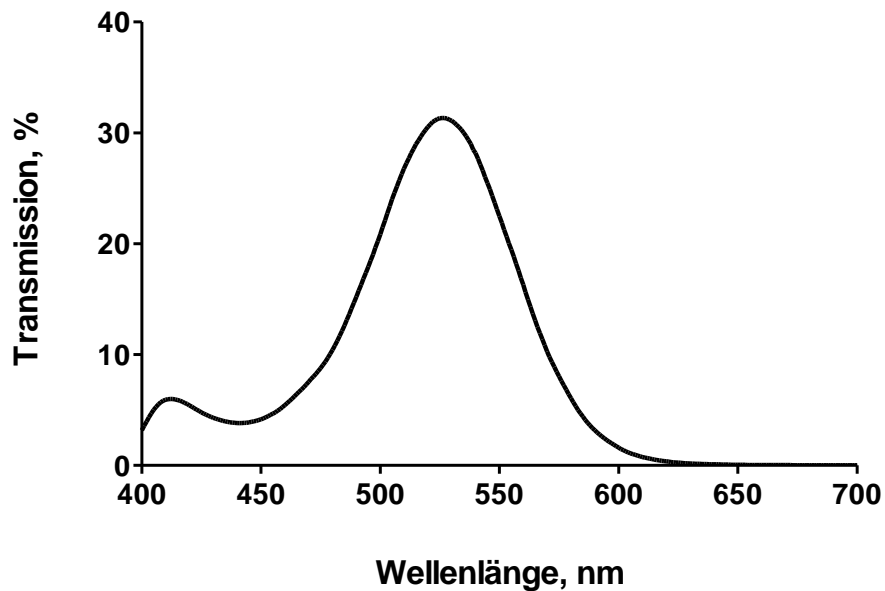


Abbildung 2.12: Transmissionsspektrum des Glasfilters, der in Kombination mit einer HQI-Lampe (Osram) photosynthetisch aktive Strahlung auf den grünen Spektralbereich beschränkte. Die Strahlung wurde genutzt, um in Blattscheiben des Wildtyps (*ler*) und der Transparent Testa Mutanten (*tt3*, *tt7*) von *A. thaliana* unter photooxidativen Bedingungen zwischen der antioxidativen Wirkung der Anthocyane und deren Abschirmungseffekt auf PS II differenzieren zu können. Das Spektrum wurde in 1 nm-Schritten im Spektrophotometer (Uvikon) gegen Umgebungsluft als Referenz aufgenommen.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten aus den Experimenten und deren graphische Darstellung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Software, San Diego, USA). Bevor parametrische Testverfahren zur Anwendung kamen, wurde mit Normalitäts-Tests

Material und Methoden

das Verteilungsmuster der Datensätze verifiziert und mit dem Bartlett-Test überprüft, ob gleiche Varianzen vorlagen. Bei einer bestätigten Normalverteilung bildeten der t-Test und ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalysen die Grundlage der statistischen Überprüfung. Weitere Prüfgrößen erbrachten paarweise Mittelwertvergleiche mit Hilfe von Post-hoc Tests. Nichtlineare und lineare Regressionsanalysen dienten zur quantitativen Beschreibung von Dosis-Effekt-Korrelationen.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung der Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane

3.1.1 Etablierung der Methode zur Bestimmung des Abschirmungseffektes

Vor allem die optischen Eigenschaften der Anthocyane stützen die Vermutung, dass sie in Blättern als Lichtschutzpigmente wirken könnten. Ihre Akkumulation in adaxialen Geweben des Blattes erlaubt die Anwendung eines auf Chlorophyllfluoreszenz basierenden Verfahrens, um ihre Abschirmung zu quantifizieren. Dabei lässt sich ausnutzen, dass der vermutete Abschirmungseffekt die Anregung von Chlorophyllfluoreszenz im Mesophyll beeinflussen sollte.

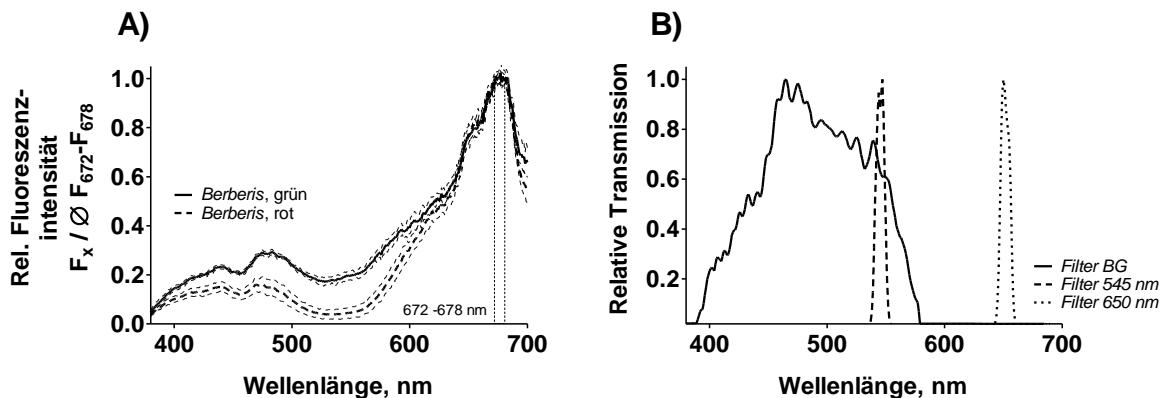


Abb. 3.1: A) Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von grünen und roten, anthocyanhaltigen Blättern der Berberitze (*Berberis thunbergii* / *thunbergii atropurpurea*). Die Pflanzen wurden mit einer PPFD von 130 (grüner Phänotyp) und $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (roter Phänotyp) bei 21°C kultiviert. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem Mittelwert der Signale des Bereiches von 672 bis 678 nm normalisiert. Mittelwerte von jeweils 10 gemessenen Blättern mit dem Konfidenzintervall $Ci = 95\%$. B) Relative spektrale Transmissionen der Filter, die zur Erzeugung des Chlorophyllfluoreszenz-Anregungslichtes zusammen mit einer Xenon-Lampe Verwendung fanden.

Für die Etablierung eines auf Chlorophyllfluoreszenz basierenden Messverfahrens, das vorzugsweise mit nur zwei Anregungsstrahlen, die innerhalb bzw. außerhalb der Absorption von Anthocyanen liegen, den Abschirmungseffekt gegen photosynthetisch aktive Strahlung quantifizieren soll, war es notwendig, die spektralen Verhältnisse *in situ*, d.h. in roten, Anthocyane enthaltenden Blättern zu erfassen.

Es wurden Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von grünen und roten *Berberis*-Blättern erstellt, um die optimale Wellenlänge der Anregungsstrahlen festzulegen. In Abb. 3.1 A ist der spektrale Verlauf der Chlorophyllfluoreszenz von Blättern der beiden *Berberis*-Phänotypen dargestellt. Ab einer Wellenlänge von 390 nm trennten sich die Signale der Vergleichspartner und erst bei ca. 650 nm lagen die Datenpunkte wieder aufeinander. Über das Fluoreszenzmaximum hinaus, das bei 672 bis 678 nm gemessen wurde, traten bis 690 nm vergleichbare Fluoreszenzausbeuten auf. Im grünen Abschnitt des Spektrums von 520 bis 570 nm, wo auch das Absorptionsmaximum von Anthocyanen liegt, ergaben sich die größten

Ergebnisse

Unterschiede zwischen den Anregungsspektren. Dort erreichte das Signal der roten Blätter nur noch 20 % des Wertes der grünen Blätter. Auf der Grundlage dieses spektralen Musters ergaben sich zwei verschiedene Ansätze zur Auswahl geeigneter Wellenlängen des Anregungslichtes. Einerseits kann, wie Abb. 3.1 B zeigt, ein Grünfilter mit schmaler Bandbreite benutzt werden, der direkt im Absorptionsmaximum der Anthocyane und im Bereich des maximalen Unterschiedes der beiden Anregungsspektren liegt. Andererseits ist es möglich, einen Filter zu verwenden, der mit seiner breiten Transmission einen großen Teil der spektralen Unterschiede zwischen roten und grünen Blättern abdeckt. Als Referenzstrahl empfiehlt sich rotes Licht, welches Chlorophyll außerhalb der Absorption von Anthocyanen anregt.

Wie der Abb. 3.2 A entnommen werden kann, bewirkte eine Anzucht unter Schwachlichtbedingungen die Ausprägung vergleichbarer Phänotypen. In beiden Varietäten war eine Synthese von Anthocyanen nicht erkennbar. Eine Vervierfachung der Photonenflussdichte führte dazu, dass in der roten Varietät im überwiegenden Teil der Blattspreite die Anthocyane akkumulierten, während der grüne Phänotyp nach der Ausdifferenzierung weiterhin Blätter ohne eine sekundäre Pigmentierung aufwies. Die Kultivierung unter Starklichtbedingungen verstärkte in den Blättern von *B. thunbergii atropurpurea* die Einlagerung der Anthocyane, sodass die Blätter dunkelrot aussahen. In der grünen Varietät traten unter Starklichtbedingungen ebenfalls Anthocyane auf. Allerdings war ihre Verteilung sehr heterogen und bedeckte nicht die komplette Blattspreite.

Erwartungsgemäß führte die lichtinduzierte Bildung der Anthocyane dazu, dass die Fluoreszenzausbeuten des grünen und des blaugrünen Anregungslichtes sanken (Abb. 3.2 B und C). Die deutlichsten Einbußen traten beim roten Phänotyp im Vergleich zu den grünen Blättern seiner Schwachlichtkontrolle auf, wenn Chlorophyllfluoreszenz mit grüner Strahlung induziert wurde. Der Effekt war bei der Verwendung von blaugrünem Anregungslicht geringer, rotes Licht brachte nahezu übereinstimmende Fluoreszenzausbeuten hervor (Abb. 3.2 B). Die grüne *Berberis*-Varietät zeigte ein vergleichbares Verhalten. Die höchsten Fluoreszenzausbeuten der drei Anregungsstrahlen wurden in den grünen Blättern der an Schwachlicht angepassten Blätter ermittelt. Wie schon beim roten Phänotyp beobachtet wurde, verringerten sich diese mit steigender Lichtakklimatisierung (Abb. 3.2 C). Die Fluoreszenzeinbußen erreichten jedoch nicht das Niveau der roten Blätter. Interessanterweise verringerte sich die durch grünes und blaugrünes Licht hervorgerufene Fluoreszenz in den grünen Blättern aus der moderaten Lichtakklimatisierungsstufe, obwohl Anthocyane noch nicht sichtbar waren (Abb. 3.2 C).

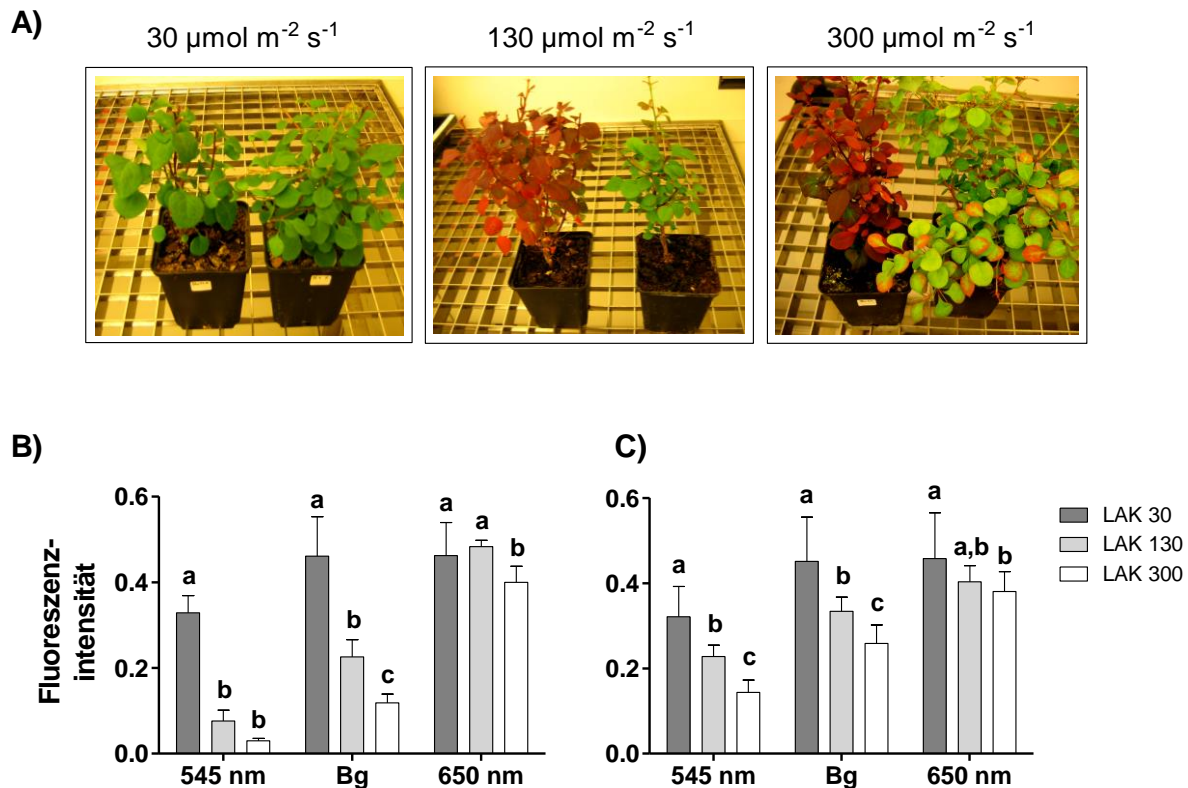


Abb. 3.2 A) Unterschiedliche Anthocyanbildung in Blättern von *B. thunbergii atropurpurea* (jeweils links im Bild) und *B. thunbergii* als Folge der Kultivierung unter der jeweils genannten PPFD bei 21 °C in einem Licht-Dunkel-Zyklus von 16:8 h. B) Ausmaß der durch grünes (545 nm), blaugrünes (Bg) und rotes (650 nm) Licht angeregten Chlorophyllfluoreszenz in den Blättern des an Schwachlicht (LAK 30), an moderates Licht (LAK 130) und an Starklicht angepassten roten Phänotyps von *B. thunbergii* C) Ausmaß der Chlorophyllfluoreszenz wie unter B für Blätter des grünen Phänotyps von *B. thunbergii*. Mittelwerte (N = 12 je Phänotyp und Lichtaklimatisationsstufe). Die signifikanten Unterschiede resultierten aus der Überprüfung der Daten mit einer zweifaktoriellen ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Post-hoc Test und sind für $p < 0,05$ angegeben. Sie sind innerhalb einer Anregungswellenlänge als unterschiedliche Buchstaben dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Basierend auf den Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen sollte die Transmission von photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane enthaltende Zellschichten ermittelt werden. Dafür waren anthocyanfreie Referenzverhältnisse notwendig, die mit Hilfe von isolierten Chloroplasten ermittelt wurden. Allerdings induzieren die verwendeten Anregungswellenlängen Fluoreszenz vollständig bzw. teilweise im grünen Absorptionsminimum von Chlorophyll. Um zu klären, ob die jeweiligen Fluoreszenzverhältnisse von der exponierten Chlorophyllmenge abhängen, wurden isolierte, intakte Chloroplasten in verschiedenen Verdünnungen auf Filterpapier aufgetragen und die Chlorophyllfluoreszenz bestimmt. Aufgrund der hohen Konzentration von organischen Säuren in den Blättern von *B. thunbergii* bestand während der Extraktion die Möglichkeit, dass Chlorophyll zu Phäophytin degradiert würde. Das Abbauprodukt könnte im fluorometrischen Messverfahren das Fluoreszenzverhältnis beeinflussen. Alternativ wurden deshalb Chloroplasten aus *Spinacia oleracea*, *Brassica napus*, *Hordeum vulgare* sowie *Vicia faba* isoliert.

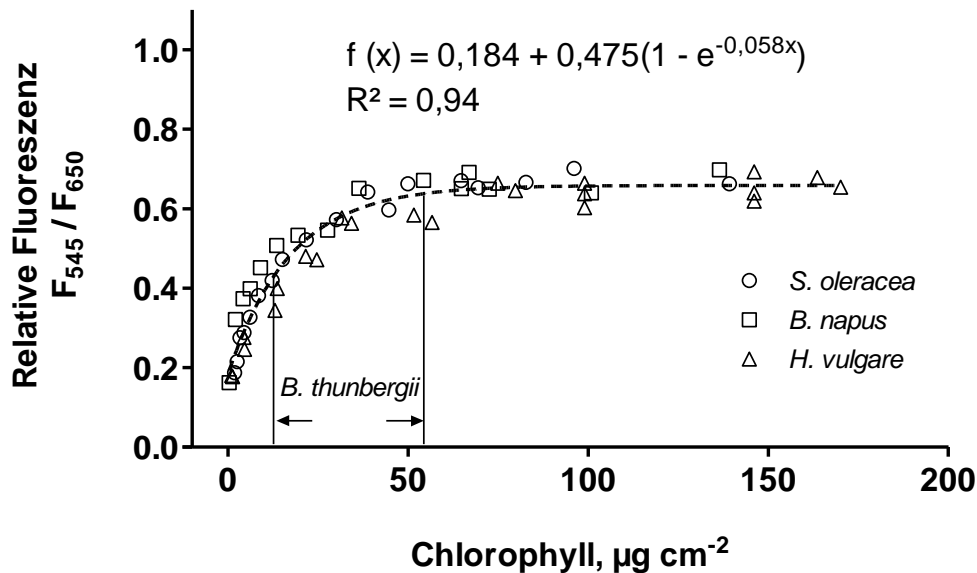


Abb. 3.3: Abhängigkeit des Verhältnisses von durch grünes Licht (F_{545}) und durch rotes Licht (F_{650}) induzierter Chlorophyllfluoreszenz von der auf ein Filterpapier aufgetragenen Chlorophyllmenge. Die Daten sind Einzelwerte für verschiedene Verdünnungen von isolierten Chloroplasten aus *Spinacia oleracea*, *Brassica napus* und *Hordeum vulgare*. Zusätzlich dargestellt ist der entsprechende Bereich der Chlorophyllkonzentration in Blättern der beiden *Berberis*-Varietäten. Die Pflanzen von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* wurden bei 21 °C unter einer PPFD von 30 bzw. 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einer Photoperiode von 16:8 h kultiviert.

Wie der Abb. 3.3 entnommen werden kann, führte die Verwendung von Anregungslicht mit einer Wellenlänge von 545 nm bzw. 650 nm dazu, dass das Verhältnis der Fluoreszenz beider Anregungsstrahlen in einem breiten Bereich von der exponierten Chlorophyllmenge abhängig war. Zwischen $5 \mu\text{g cm}^{-2}$ und $70 \mu\text{g cm}^{-2}$ stieg der Wert des Verhältnisses von 0,2 auf 0,6. Bis zu einer Chlorophyllmenge von etwa $70 \mu\text{g cm}^{-2}$ war dieser Anstieg sehr variabel. Erst oberhalb von $70 \mu\text{g cm}^{-2}$ stellte sich ein stabiles Niveau von etwa 0,7 ein. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzverhältnisses konnte mit einer einfachen Exponentialfunktion mit zwei Variablen beschrieben werden. Da das Fluoreszenzverhältnis F_{545} / F_{650} in Abhängigkeit vom Chlorophyllgehalt in einem Bereich variabel war, der die mittleren Chlorophyllgehalte von *Berberis*- und auch von *Arabidopsis*-Pflanzen widerspiegelte, ist das Referenzverhältnis für die Quantifizierung des Abschirmungseffektes tendenziell mit einem nicht unerheblichen Fehler belastet.

Um zu überprüfen, ob die Abhängigkeit des Fluoreszenzverhältnisses vom Chlorophyllgehalt geringer wird, wenn sich die spektralen Eigenschaften des Anregungsstrahls verändern, wurde das grüne Anregungslicht um den blauen Bereich des Lichtspektrums erweitert. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von blaugrünem Anregungslicht schon bei geringen Chlorophyllmengen ein Fluoreszenzsignal erreicht wurde, das ein maximales Verhältnis von durch Messlicht und Referenzlicht induzierter Chlorophyllfluoreszenz ergab. Etwa 12 - 15 $\mu\text{g Chlorophyll cm}^{-2}$ waren ausreichend, um diesen Maximalwert zu erreichen. Dieses Verhältnis blieb bei zunehmender Chlorophyllmenge konstant. Am Besten wurde dieser Zusammenhang, wie in Abb. 3.4 gezeigt wird, durch eine einfache exponentielle Funktion mit zwei Parametern beschrieben. Beide Anregungsstrahlen erzeugten Chlorophyllfluoreszenz mit fast identischer

Ergebnisse

Signalstärke, so dass sich ein mittleres Verhältnis von blaugrün zu rot erzeugter Fluoreszenz von 0,949 ergab.

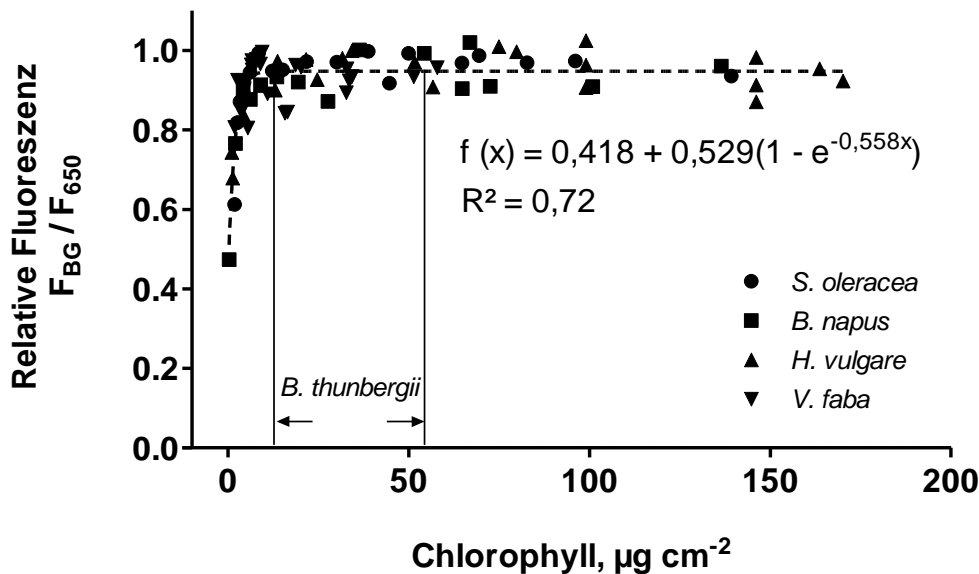


Abb. 3.4: Abhängigkeit des Verhältnisses von durch blaugrünes Licht (F_{BG}) und durch rotes Licht (F_{650}) induzierter Chlorophyllfluoreszenz von der auf ein Filterpapier aufgetragenen Chlorophyllmenge. Die Daten sind Einzelwerte für verschiedene Verdünnungen von isolierten Chloroplasten aus *Spinacia oleracea*, *Brassica napus*, *Hordeum vulgare* und *Vicia faba*. Zusätzlich dargestellt ist der entsprechende Bereich der Chlorophyllkonzentration in Blättern der beiden *Berberis*-Varietäten. Die Pflanzen von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* wurden bei 21 °C unter einer PPFD von 30 bzw. 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in einer Photoperiode von 16:8 h kultiviert.

Inwieweit die ermittelten Chlorophyllfluoreszenzverhältnisse für isolierte Plastiden die *in situ* Verhältnisse von Pflanzen wiedergeben, wurde mit Blättern unterschiedlicher Pflanzenarten überprüft (Abb. 3.5). Dabei wurde darauf geachtet, dass nur an Schwachlicht akklimatisierte Blätter Verwendung fanden. Da bei Schattenblättern von einem niedrigen Carotinoid-Chlorophyll-Verhältnis ausgegangen werden kann (Thayer und Björkman 1990), sollte die Beeinflussung der Fluoreszenzverhältnisse durch freie Carotinoide, die ihre Anregungsenergie nicht auf Chlorophyll übertragen und so mit den Photosynthesepigmenten um blaues Anregungslicht konkurrieren, minimiert worden sein (s. Kapitel 4.2.4).

An Schatten akklimatisierte Blätter von *Hedera helix* und *Sambucus nigra* wurden Pflanzen aus dem Botanischen Garten der Universität Kiel an ihrer nordexponierten Seite entnommen. Die übrigen Pflanzenarten wurden unter Schwachlichtbedingungen mit Photonenflussdichten zwischen 30-80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Klimakammern kultiviert. Die Anwendung der Fluoreszenzmethode zeigte insbesondere beim Gebrauch des grünen Anregungsstrahls abweichende Fluoreszenzverhältnisse. Der Quotient war bei *Berberis*-Blättern identisch mit dem von isolierten Chloroplasten, wohingegen in Blättern von *H. helix* und *S. nigra* Fluoreszenzverhältnisse ermittelt wurden, die signifikant über den Chloroplasten-Referenzverhältnissen lagen. Auffallend sind die niedrigen Werte der bei 9 und 21 °C kultivierten Pflanzen von *A. thaliana*. Mit Verhältnissen von 0,45 bzw. 0,42 lagen sie etwa 30 % unterhalb des Wertes, der für isolierte Chloroplasten notiert wurde. Um zu klären, ob die verringerten

Fluoreszenzverhältnisse in den *Arabidopsis*-Blättern dem Einfluss der Chlorophyllkonzentration unterlagen, wurden die Pigmentgehalte bestimmt.

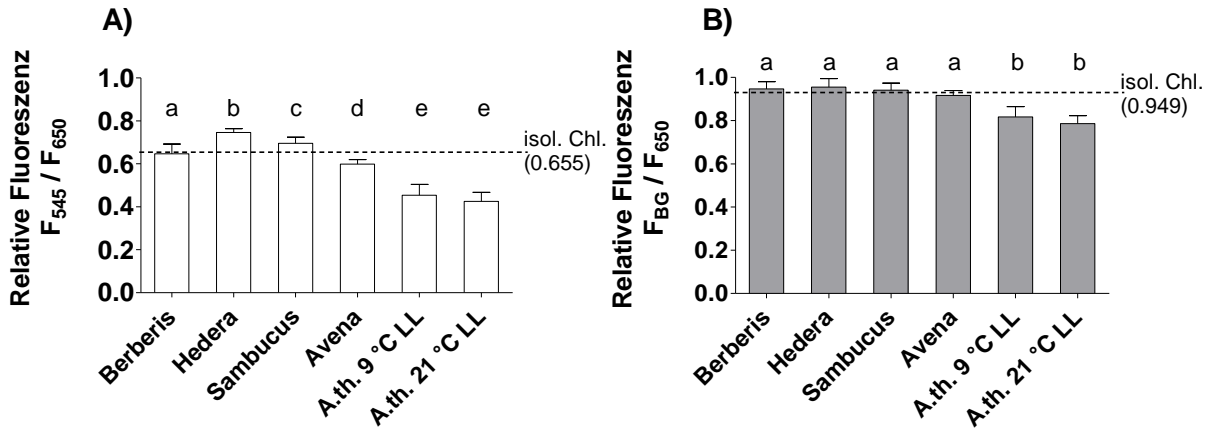


Abb. 3.5: Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnisse für A) durch Grün- und Rotlicht induzierte Fluoreszenz und B) durch blaugrünes Licht und Rotlicht induzierte Fluoreszenz von ausdifferenzierten Blättern, die an Schatten bzw. Schwachlichtbedingungen akklimatisiert waren. Es wurden Blätter von *B. thunbergii*, *Hedera helix*, *Sambucus nigra*, *Avena sativa* und *A. thaliana* (*A.th.*, kultiviert bei 9 bzw. 21 °C und Schwachlicht [LL]) verwendet. Mittelwerte für *Berberis* (N = 26) und für die anderen Arten (N = 10). Die Daten wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni-Post-hoc Test auf signifikante Unterschiede überprüft, die für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ dargestellt sind. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

In der Tat zeigte sich, dass den Fluoreszenzverhältnissen der Blätter, die sich bei 9 °C und 21 °C entwickelten, mit $24 \mu\text{g cm}^{-2}$ bzw. $16 \mu\text{g cm}^{-2}$ ($n = 9$) Chlorophyllgehalte zugrunde lagen, wie sie für isolierte Plastiden mit ähnlichem Signalverhältnissen dokumentiert wurden (Abb. 3.3). Dagegen lassen sich die größeren Verhältnisse in den Blättern von *H. helix* und *S. nigra* bei der Verwendung von grünem Anregungslicht nicht auf höhere Chlorophyllgehalte zurückführen. Eine ausgeprägtere Streuung von grünem Licht an den intra- und interzellulären Grenzschichten könnte zunehmende absolute Fluoreszenzausbeuten verursacht haben. Die Verwendung von blaugrünem Anregungslicht zog demgegenüber eine Nivellierung der Unterschiede in den Fluoreszenzverhältnissen nach sich (Abb. 3.5 B). Außer bei *A. thaliana* lagen die Werte aller Pflanzen auf dem Niveau der Chloroplasten-Referenz. Vergleichbar mit den an isolierten Plastiden ermittelten Signalverhältnissen von F_{BG} / F_{650} (Abb. 3.4) befanden sich die für *A. thaliana* bestimmten Chlorophyllgehalte in jenem Bereich, in dem beim Übergang vom exponentiellen Anstieg das Sättigungsniveau des Fluoreszenzverhältnisses noch nicht vollständig erreicht war. Die Werte 0,82 bzw. 0,79 spiegelten die Abhängigkeit von der Chlorophyllkonzentration wider.

3.1.2 Quantifizierung des Abschirmungseffektes von Anthocyanen

Blätter von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* wurden verwendet, um mit den Referenzwerten den Nachweis zu führen, dass exponierte Anthocyane in Blättern Anregungslicht durch Absorption abschirmen und so den Umfang der emittierten Chlorophyllfluoreszenz aus dem sich anschließenden Mesophyll verringern. Pflanzen der beiden Varietäten wurden dafür bei

Ergebnisse

21 °C unter einer PPFD von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Hell-Dunkel-Zyklus von 16:8 h kultiviert, um den Gehalt an Anthocyanen in den Blättern zu variieren.

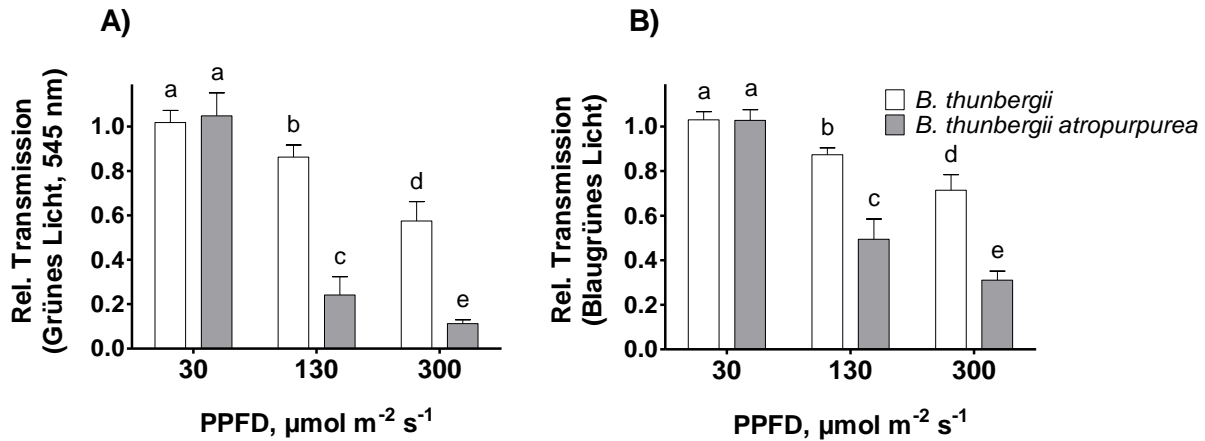


Abb. 3.6: Relative Transmissionen von A) grünem (545 nm) Chlorophyllfluoreszenz-Anregungslicht und B) blaugrünem Chlorophyllfluoreszenz-Anregungslicht in Blättern von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* mit der Angabe der in der Kultivierung verwendeten Lichtstärke. Zur Berechnung der relativen Transmission wurden die jeweiligen Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnisse, F_{545} / F_{650} und F_{BG} / F_{650} , in Bezug zu den Referenzwerten isolierter Chloroplasten ($F_{545} / F_{650} = 0,655$; $F_{BG} / F_{650} = 0,949$) gesetzt. Mittelwerte (N = 25 je Phänotyp und Lichtakklimationsstufe). Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit einer einfaktoriellem ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Post-hoc Test ($p < 0,05$) überprüft. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Bei der Induktion von Chlorophyllfluoreszenz mit grünem Anregungslicht zeigte sich, dass in den Blättern beider Phänotypen, die unter Schwachlichtbedingungen kultiviert wurden, Strahlung aus diesem Spektralbereich im Verhältnis zum 645 nm-Referenzstrahl die Chlorophyllmoleküle des Mesophylls in ähnlichen Umfang anregte wie in isolierten Chloroplasten. Demnach wurde kein Licht abgeschirmt. Es stellten sich sogar teilweise Fluoreszenzverhältnisse ein, die oberhalb der Chloroplasten-Referenz lagen. Dadurch ergab sich in der Berechnung eine scheinbar um etwa 2 bzw. 5 % erhöhte Transmission für grüne Strahlung in den Blattproben der Vergleichspartner (Abb. 3.6 A). Wurden die Pflanzen in der mittleren Lichtakklimationsstufe unter einer PPFD von 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert, traten deutliche Veränderungen in den Transmissionsverhältnissen auf. Im Zusammenhang mit einer deutlich sichtbaren Anthocyanenschicht in den Blättern der roten Varietät sank die Transmission von grüner Strahlung um über 70 %. Interessanterweise verringerte sich auch in den Blättern des grünen Phänotyps das Verhältnis von F_{545} / F_{650} , obwohl eine sichtbare Synthese von Anthocyanen ausblieb. Die Transmission von grünem Anregungslicht sank hier um ca. 15 %. Eine im Vergleich mit der Schwachlicht-Akklimationsstufe um das Zehnfache erhöhte Photonenflussdichte in der Kultivierung bewirkte eine weitere Steigerung des Abschirmungseffektes. Etwa neun von zehn Photonen aus dem relativ schmalen Spektralbereich des 545 nm-Anregungslichtes blieben für das Auslösen der Chlorophyllfluoreszenz in den Blattproben des roten Phänotyps wirkungslos. Auch in Anwesenheit der Anthocyane in den Proben der grünen *Berberis*-Varietät, die sich in der Starklicht-Akklimationsstufe bildeten, verringerte sich die Wirksamkeit der induzierenden

Strahlung. Vergleichsweise erreichten nur etwa 60 % der auftreffenden Photonen das Mesophyll (Abb. 3.6 A).

Die Verwendung von blaugrünem Anregungslicht hatte zur Folge, dass die Unterschiede in der Abschirmungswirksamkeit zwischen den Varietäten an Deutlichkeit verloren. Während in den grünen Blättern beider Varietäten, die sich unter Schwachlichtbedingungen entwickelten, keine Abschirmung auftrat, sank der Effekt in den roten Blättern aus der mittleren Lichtakklimatisationsstufe von 75 % ermittelt für grünes Anregungslicht auf 50 % bei blaugrüner Bestrahlung. Wurden die Pflanzen unter einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert, betrug die Durchlässigkeit für blaugrünes Anregungslicht etwa 70 % in den Blattproben von *B. thunbergii*. In den Blättern der roten Varietät induzierte unter diesen Bedingungen nur jedes dritte Photon des Anregungslichtes Fluoreszenz im Mesophyll (Abb. 3.6 B).

3.1.3 Abhängigkeit der Absorption photosynthetisch aktiver Strahlung vom Anthocyangehalt

Es stellte sich die Frage, ob und in welchem Umfang die in den Blättern beobachtete Abschirmung gegen grünes bzw. blaugrünes Licht durch die Absorption der Anthocyane bestimmt wurde. Zur Überprüfung des Abhängigkeitsverhältnisses wurden Pflanzen von *B. thunbergii atropurpurea*, die bei einer moderaten PPFD von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen wurden, Blätter mit unterschiedlich ausgeprägter Rotfärbung entnommen. Zusätzlich wurden Pflanzen aus dieser Population über mehrere Tage mit einer auf $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erhöhten PPFD behandelt, um die Akkumulation von Anthocyanen zu maximieren.

Nach Bestimmung der Fluoreszenzverhältnisse und der Anthocyangehalte ergab sich, wie in Abb. 3.7 A dargestellt ist, eine sehr gute Korrelation zwischen dem Anthocyangehalt und der Absorption des grünen Anregungslichtes. Im Anstieg der Funktion bis zu einem Anthocyangehalt von $15 \mu\text{g cm}^{-2}$ konnte eine hohe Sensitivität der Messmethode nachgewiesen werden. Im Bereich der Absorptionssättigung, der bei etwa $25 \mu\text{g cm}^{-2}$ einsetzte, schwankten die Werte um ca. 10 % um $f(x)$. Hier war der Abschirmungseffekt unabhängig von der Anthocyankonzentration. Die maximale Absorption von grünem Anregungslicht wurde mit Werten von 1,2 bei Anthocyangehalten von $35 \mu\text{g cm}^{-2}$ erreicht.

Demgegenüber kam es beim Einsatz von blaugrünem Anregungslicht zu einer deutlichen Verminderung der Absorption, sodass die Anthocyane scheinbar weniger effektiv abschirmten. In der Signalsättigung wurden mit 0,62 nur noch halb so hohe Werte ermittelt (Abb. 3.7 B). Die Streuung um den Funktionswert nahm in diesem Bereich zu und erreichte nahezu 20 %. Die zuvor festgestellte Genauigkeit bei geringen Anthocyangehalten konnte nicht mehr in vollem Umfang erreicht werden. Insgesamt zeigte sich aber auch bei der Applikation des blaugrünen Messtrahls eine sehr gute Korrelation, die nur 5 % unter der mit grünem Anregungslicht erzielten Funktion lag.

Aufgrund der in der Abb. 3.7 C dargestellten linearen Korrelation zwischen der Absorption von grünem und blaugrünem Anregungslicht erschien es trotz der deutlichen Abhängigkeit des Fluoreszenzverhältnisses F_{545} / F_{650} von der Chlorophyllkonzentration gerechtfertigt, für weitere Analysen zum Abschirmungseffekt der Anthocyane ausschließlich das sensitivere Absorptionsmaximum der Pigmente und somit die effektivere Abschirmung des grünen Spektralbereiches zu verwenden.

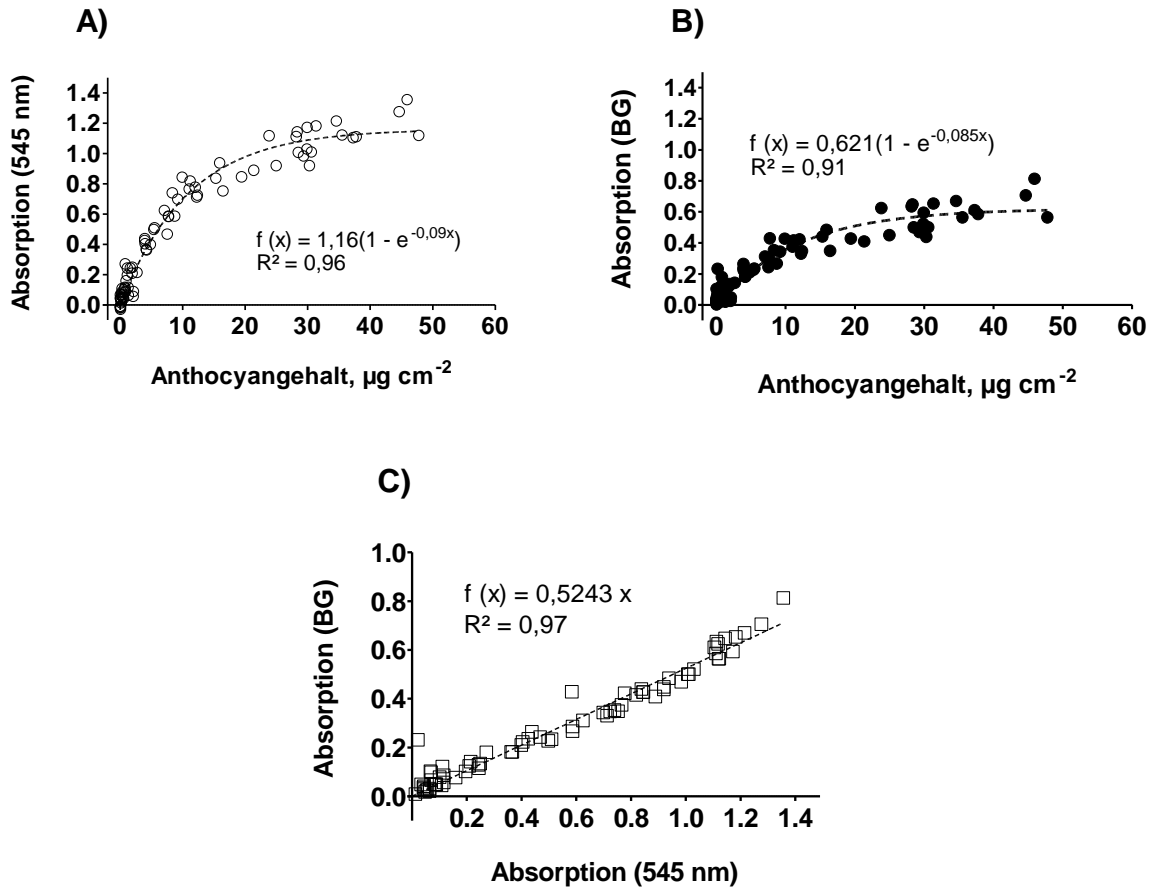


Abb. 3.7: Verhältnis von Anthocyanengehalt in *B. thunbergii atropurpurea* Blättern und Absorption von Chlorophyllfluoreszenz induzierendem Anregungslicht für A) mit grünem Licht (545 nm) erzeugte Fluoreszenz und B) mit blaugrünem Licht erzeugte Fluoreszenz. C) Verhältnis der Absorption von grünem (545 nm) zur Absorption von blaugrünem (BG) Anregungslicht. Die Datenpunkte stellen Werte einzelner Blätter von *Berberis*-Pflanzen dar, die sich einerseits unter einer PPFD von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelten, andererseits mit einer PPFD von $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16:8 h Hell - Dunkel - Zyklus) über mehrere Tage behandelt wurden, um die Bildung von Anthocyanen zu maximieren. Die Fluoreszenz wurde an den adaxialen Blattseiten detektiert. Aus den einzelnen Fluoreszenzverhältnissen wurden mit Hilfe der Referenzwerte isolierter Chloroplasten die Transmissionen (T) bestimmt, mit denen die Absorptionen berechnet werden konnten ($\text{Abs}_{545} = -\log [T_{545}]$ bzw. $\text{Abs}_{\text{BG}} = -\log [T_{\text{BG}}]$).

3.1.4 Auswirkungen der Anthocyane auf die spektralen Verhältnisse in Blättern

Für rote und grüne *Berberis*-Blätter konnten bereits deutliche Unterschiede in den Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren gezeigt werden (Abb. 3.1 A). Rotpigmentierte Blätter wiesen *in vivo* interessanterweise noch bis weit oberhalb einer Anregungswellenlänge von 600 nm signifikant geringere Fluoreszenzintensitäten auf (Abb. 3.1 A). Mit dem Ziel, auch die Abschirmung der Anthocyane bei allen Wellenlängen im photosynthetisch aktiven Bereich zu erfassen und mit der Xe-PAM-Methode quantifizieren zu können, ergab sich daher die Notwendigkeit, den methodischen Ansatz spektral zu erweitern. Es galt zu klären, welcher Zusammenhang zwischen der Transmission von grünem Licht und der Abschirmung des gesamten photosynthetisch aktiven Spektralbereiches besteht.

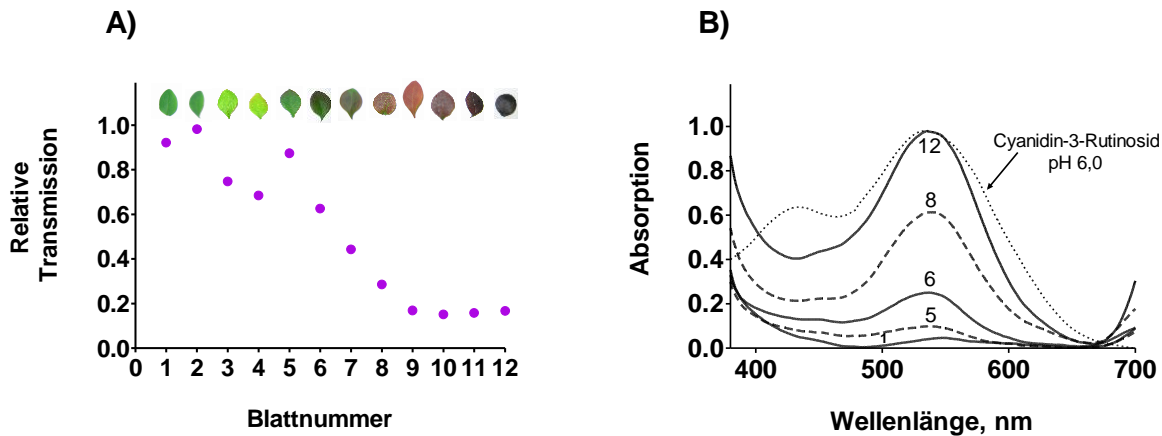


Abb. 3.8: A) Transmissionen für grünes Anregungslicht zur Induktion von Chlorophyllfluoreszenz in Blättern von *B. thunbergii* / *thunbergii atropurpurea* aufgereiht nach einem visuell erstellten Gradienten der Rotfärbung durch Anthocyane. Die Daten sind Einzelwerte und wurden auf der Grundlage des mittleren Fluoreszenzverhältnisses isolierter Chloroplasten (0,655) berechnet. B) Absorptionsspektren der photosynthetisch aktiven Strahlung für die Blätter 1, 5, 6, 8 und 12 aus Abbildung A. Normalisierte Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren der *Berberis*-Blätter wurden dafür mit den Referenzwerten isolierter Chloroplasten von *Phaseolus coccineus* verrechnet, die das von Anthocyanen unbeeinflusste Anregungsspektrum darstellten. Die Blätter stammten von Pflanzen, die unter einer PPFD von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ im Langtag kultiviert wurden. Zusätzlich dargestellt ist das Absorptionsspektrum von Cyanidin-3-Rutinosid in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 6,0.

Um von der Abschirmung gegen grünes Anregungslicht auf die Abschwächung des gesamten Spektrums der jeweiligen Strahlungsquelle schließen zu können, wurden Pflanzen von *B. thunbergii* / *thunbergii atropurpurea*, die ihre Blätter unter einer PPFD von 30, 130 oder 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelt hatten, Blattproben mit einer unterschiedlich ausgeprägten Rotfärbung entnommen. Für die einzelnen Blätter wurde das Verhältnis von durch grünes und durch rotes Licht erzeugter Chlorophyllfluoreszenz ermittelt. Damit konnten die einzelnen Transmissionswerte berechnet werden. Zusätzlich wurden von allen Blättern Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren aufgezeichnet.

Mit den ausgewählten Blättern war es möglich, einen Gradienten für die Transmission von grünem Anregungslicht zu erstellen (Abb. 3.8 A). In den anthocyanfreien Blättern erreichte der grüne Induktionsstrahl fast ungehindert die Chloroplasten. Kaum visuell wahrnehmbare Anthocyanengehalte in Blatt Nr. 5 traten zusammen mit einer Herabsetzung der Transmission um etwa 10 % auf. Über mehrere Zwischenstufen hinweg sank die Transmission dunkelroter Blätter schließlich auf Werte von etwa 20 %, wie sie bereits unter 3.1.2 beschrieben wurden. Der graduellen Verminderung der Transmission stand eine zunehmende Absorption der Blätter gegenüber, die sich im Spektrum mit der Absorption von gelösten Anthocyanen vergleichen ließ (Abb. 3.8 B). Wie aus dem Absorptionsspektrum Nr. 1 in Abb. 3.8 B hervorgeht, ergaben sich bereits für grüne Blätter im Vergleich mit isolierten Chloroplasten spektrale Unterschiede, die im grünen Bereich jedoch nur geringfügig waren. Die Absorption im kurzwelligen blauen Bereich, die bei den stärker induzierten Blättern noch deutlicher wurde, geht vermutlich auf Flavonole in den Epidermen der Blätter zurück. Quercetin- und Kämpferol-Glykoside zeigen eine schwache Absorption in diesem Spektralbereich.

Die auffälligsten Veränderungen zeigten sich jedoch im grünen Spektralbereich. Der in grünen Blättern im Vergleich mit isolierten Chloroplasten zunächst bei 550 nm auftretende

Ergebnisse

Absorptionszuwachs wurde mit dem Einsetzen der Anthocyan-Biosynthese spektral überlagert und verschoben. Mit zunehmender Rotfärbung der Blätter stieg die Absorption mit einem Maximum bei 535 nm an. Das Absorptionsmaximum entsprach damit dem von gelöstem Cyanidinrutosid unter annähernd vakuolären pH-Bedingungen (Abb. 3.8 B). Cyanidin-Glykoside stellen in der Natur und so auch in *B. thunbergii* (Lehrer und Brand, 2010) die häufigsten Vertreter der Anthocyane dar.

3.1.5 Von den Transmissionsspektren zur effektiven Photonendichte (PPFD_{effect})

Die Höhe der Abschirmung von grünem Licht mit einer Wellenlänge von 545 nm sagt noch nichts darüber aus, in welchem Umfang die gesamte photosynthetisch aktive Strahlung durch Anthocyane abgeschirmt wird. Um die Auswirkungen auf den Photosyntheseapparat in Abhängigkeit von der Abschirmung durch Anthocyane darstellen zu können, war es notwendig, die Quantifizierung entsprechend zu erweitern.

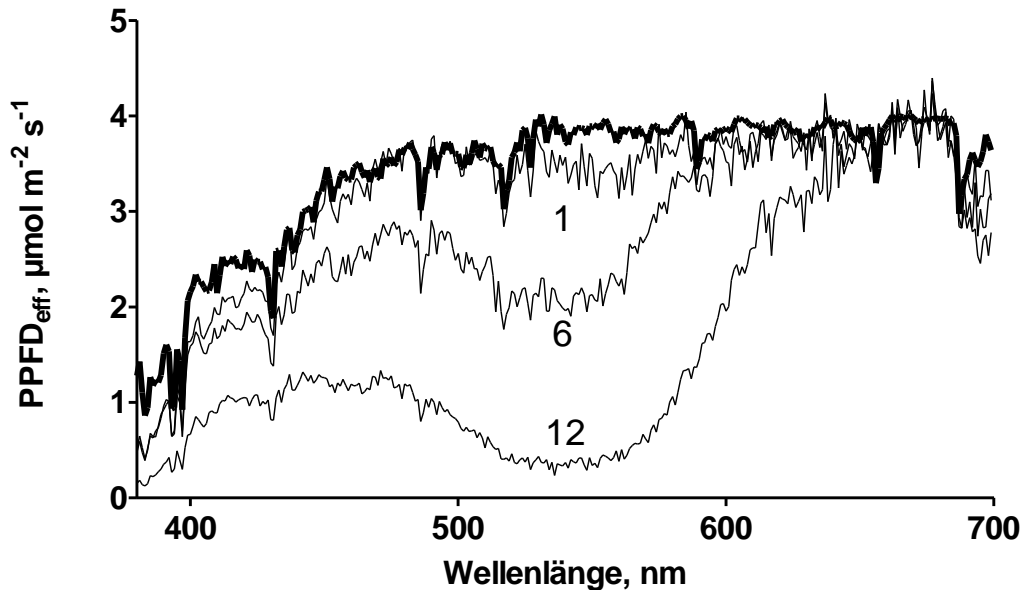


Abb. 3.9: Sonnenlichtspektren der wirksamen photosynthetischen Photonendichte (PPFD_{effect}) für die Blätter 1, 6 und 12 aus Abb. 3.8. Das solare Spektrum (hervorgehobene Linie) wurde im August 2007 bei wolkenlosem Himmel am Botanischen Institut aufgenommen. Durch Multiplikation des photosynthetisch aktiven Teils des solaren Spektrums mit den zuvor ermittelten Transmissionsspektren der einzelnen Blätter ergaben sich die PPFD_{effect}-Spektren. Die Blatt-spezifischen Transmissionsspektren resultierten aus dem relativen Verhältnis der normalisierten Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von Blattproben und der Referenzspektren isolierter Chloroplasten.

Für die Ermittlung der effektiven Photonendichte (PPFD_{effect}) wurde die Strahlung deshalb spektral gewichtet, d.h. das Spektrum der jeweiligen Lichtquelle wurde mit den Blatt-spezifischen Transmissionsspektren multipliziert. Abbildung 3.9 zeigt exemplarisch für das Sonnenlicht die Veränderungen in roten Blättern. Da das solare Spektrum eine relativ gleichmäßige Verteilung der Quantenmengen über den gesamten Bereich aufwies, war im Verlauf der PPFD_{effect}-Spektren der Einfluss der zuvor dargestellten Anthocyanabsorption

Ergebnisse

deutlich erkennbar. Eine zunehmende Rotfärbung der Blätter führte zu massiven Änderungen in der spektralen Verteilung der effektiven Photonendichte. Beispielsweise sank in dunkelrot gefärbten Blättern vor allem im langwelligen Blaulichtabschnitt die Menge der photosynthetisch wirksamen Photonen. Für den Bereich der blauen Strahlung zwischen 400 und 480 nm ergab sich ein maximaler Rückgang der wirksamen Photonendichte von $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf etwa $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 3.9, Spektrum 12).

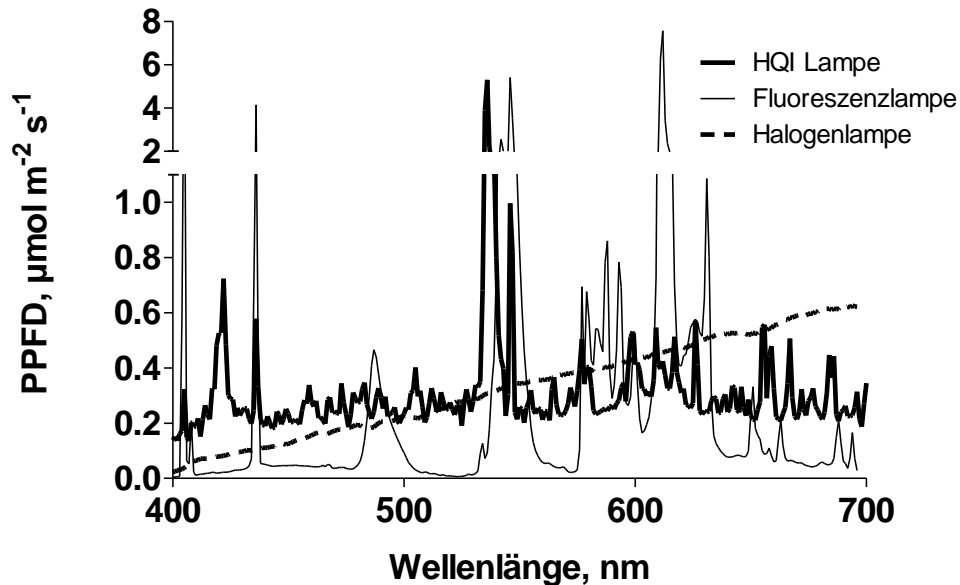


Abb. 3.10: Emissionsspektren der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lichtquellen. Unter Fluoreszenzlampen wurden die beiden *Berberis*-Varietäten kultiviert. Die HQI Lampe diente zur Maximierung der Anthocyanbiosynthese unter hohen Photonendichten. Mit der Halogenlampe wurden Photosyntheseraten ermittelt, mit denen die Quantenausbeute der O_2 -Evolution von Photosystem II bestimmt werden konnte. Dargestellt ist jeweils eine Photonendichte von $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ des photosynthetisch aktiven Spektralbereiches.

Umfangreicher stellte sich der Abschirmungseffekt im grünen Abschnitt des Sonnenspektrums dar. Zwischen 500 und 580 nm ging die effektive Lichtstärke von 300 auf bis zu $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zurück. Im Spektralbereich von 580 bis 630 nm, der gelbe und kurzwellige rote Strahlung umfasst, stand dagegen bei geringen Anthocyankonzentrationen einer emittierten Photonendichte von $193 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine vergleichbare effektive Photonendichte von $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gegenüber. Erreichte der Anthocyangehalt wie in dunkelroten Blättern allerdings eine Konzentration von $25 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Abb. 3.7 A), war mit einer berechneten effektiven PPF von $113 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nur etwa die Hälfte der auftreffenden Strahlung im Mesophyll wirksam.

Um von der Abschirmung gegen grünes Licht auch auf die Verringerung der gesamten photosynthetisch aktiven Strahlung schließen zu können, wurde in einem nächsten Schritt mit der Gegenüberstellung der Transmission von grünem Anregungslicht, die nur das *in vivo*-Absorptionsmaximum der Anthocyane erfasst, und den effektiven Photonendichten der quantitative Zusammenhang zwischen beiden Abschirmungseffekten analysiert.

Dafür wurden die Emissionsspektren von verschiedenen Lichtquellen (Abb. 3.10) mit den Transmissionsspektren der Blätter des Anthocyangradienten multipliziert. Aus der

Ergebnisse

Aufsummierung der wirksamen Quantenmenge in den einzelnen Wellenlängen ergab sich schließlich die effektive Photonenflussdichte, aus der wiederum die Gesamttransmission berechnet werden konnte. Für die in dieser Arbeit benutzten Lichtquellen (Abb. 3.10) wird die Gesamttransmission in Abb. 3.11 mit der Transmission von grünem Licht verglichen.

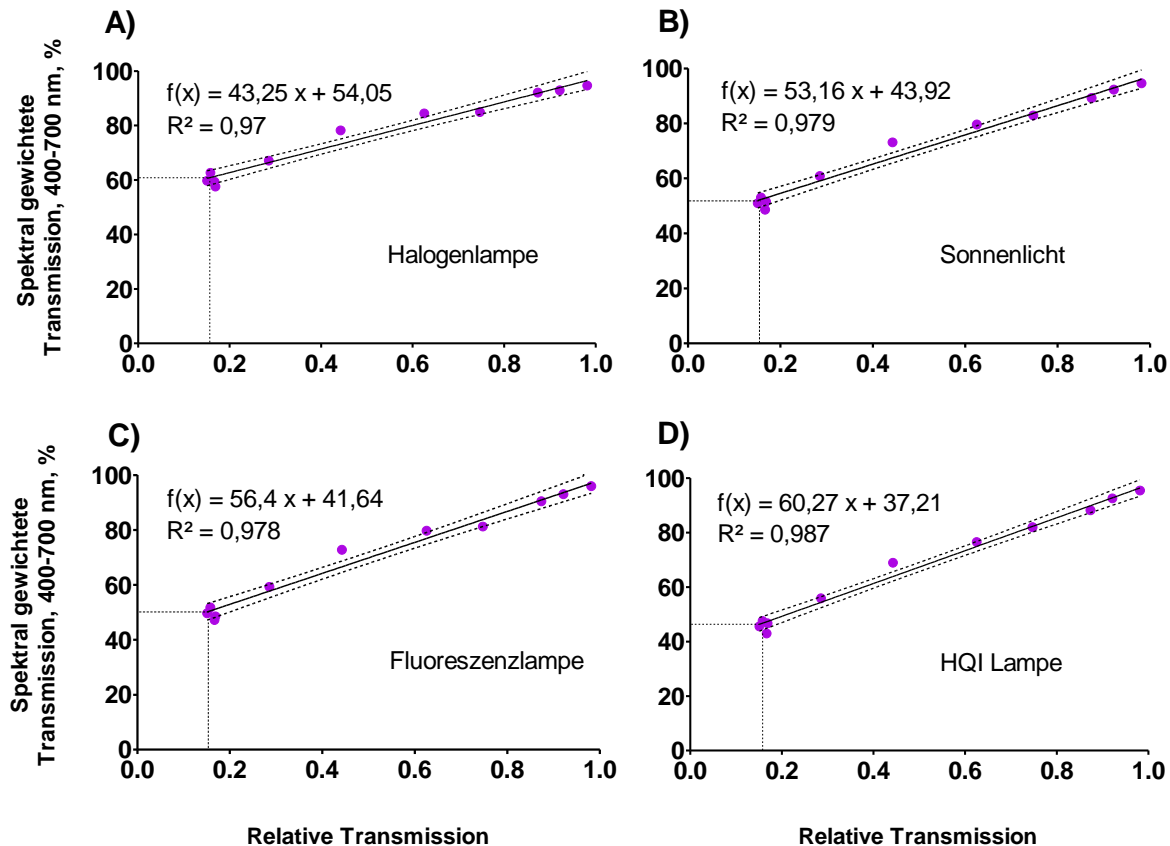


Abb. 3.11: Korrelation zwischen der Transmission von grünem, Chlorophyllfluoreszenz anregendem Licht und der von 400 bis 700 nm spektral gewichteten Transmission der jeweiligen Lichtquelle in *Berberis*-Blättern mit unterschiedlichem Anthocyangehalt für A) Halogenlampe, B) Sonnenlicht, C) Fluoreszenzlampe und D) HQI Lampe. Für jedes einzelne Blatt wurden auf der Basis der Referenzwerte isolierter Chloroplasten die Anregungslichttransmissionen und Transmissionsspektren berechnet. Mit den Transmissionsspektren wurden die Emissionsspektren der Lichtquellen multipliziert. Im Ergebnis konnte die effektive Photonenflussdichte als prozentualer Anteil der auftreffenden Photonenmenge ermittelt werden. Dargestellt sind neben den Einzelwerten die Regressionsgeraden mit dem 95 %-Konfidenzintervall.

In Abhängigkeit von den Spektren der Lampen wiesen die Anthocyane in Blättern von *B. thunbergii* / *thunbergii atropurpurea* recht unterschiedliche Wirksamkeiten in der Abschirmung auf. Bei den verwendeten Halogenlampen, die zur Bestimmung der Quantenausbeute bei der Sauerstoffevolution von Photosystem II eingesetzt wurden, wurde die geringste Abschirmung ermittelt (Abb. 3.11 A). Eine maximale Abschirmung von 85 % des grünen Anregungslichtes des Xe-PAM Fluorometers war gleichbedeutend mit einer 40 % umfassenden Abschirmung des gesamten photosynthetisch relevanten Bereichs der Halogenlampe. Die Ursache für die geringe Wirksamkeit liegt in der Besonderheit des emittierten Spektrums begründet, das von 400 bis 700 nm kontinuierlich ansteigt, so dass die Photonenflussrate des roten Spektralbereiches, der

außerhalb der Absorption von Anthocyanen liegt, fast das Vierfache der PPF_D im blauen Bereich beträgt. Für die Fluoreszenzlampen, die zur Kultivierung der Pflanzen verwendet wurden, ergaben sich aufgrund der prominenten Emissionsmaxima bei 487 nm und 547 nm sowie des breiten Emissionsbereich um 580 nm deutlich höhere Abschirmungswerte. In der Korrelationsanalyse zeigte die Auswertung der Daten, dass über 50 % der auftreffenden Strahlung abgeschirmt wurde. Die umfangreichste Abschwächung photosynthetisch aktiver Strahlung konnte für eine Halogen-Metalldampflampe (HQI-Lampe), die in den Experimenten zur Maximierung der Anthocyanbildung verwendet wurde, dargestellt werden (s. Abb. 3.11 D). Resultierend aus der gleichmäßigen Aufteilung des Spektrums verbunden mit dem ausgeprägten Emissionsmaximum bei 536 nm und dem Rückgang der Intensität ab 630 nm wurde eine Transmission von nur noch 40 % für Blätter mit hohen Anthocyangehalten ermittelt. Abschließend sei auf die Auswirkungen des blattinternen Filters auf das Sonnenspektrum verwiesen. Im Maximum schirmten hier Anthocyane das Mesophyll gegen die solare Strahlung zu etwa 50 % ab (Abb. 3.11 B).

3.1.6 Die apparente Quantenausbeute der photosynthetischen Sauerstoffevolution

Die Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane sollte einen unmittelbaren Einfluss auf die Photosyntheserate ausüben. Bei geringen Photonenflussdichten ist die Photosyntheserate direkt proportional zur eingestrahnten Lichtmenge und die Quantenausbeute erreicht ihr Maximum. Zur Abschätzung eines möglichen Rückganges der Quantenausbeute durch die Anthocyane wurden Photosyntheseraten von Blättern der grünen und roten *Berberis*-Varietät bestimmt, die sich unter einer PPF_D von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelt hatten. Die polarographische Erfassung der Sauerstoffevolution diente zusammen mit der eingestrahnten Photonenmenge in der Regressionsanalyse der Ermittlung der maximalen Quantenausbeute.

Um im linearen Bereich der Lichtfluss-Effekt-Kurven zu bleiben, wurden bei der Bestimmung der Sauerstoffevolution nur geringe Quantenflussmengen verwendet. Eine CO₂-Konzentration von 5 % hemmte die Photorespiration. Die Netto-Photosyntheserate wurde um die mitochondriale Dunkelatmung korrigiert, so dass zur Quantifizierung des vermuteten Abschirmungseffektes die Brutto-Photosyntheserate verwendet wurde. Für sämtliche Messungen konnte der lineare Zusammenhang zwischen der eingestrahnten PPF_D und der apparenten Sauerstoffevolution (Abb. 3.12) statistisch belegt werden. Der F-Test zeigte mit Werten von $p < 0,0001$ eine signifikante Abweichung der einzelnen Anstiege von Null. Durch die Anwendung des Runs-Tests, der für die gesamten Datenreihen Werte von $p = 0,67$ ergab, wurde eine Abweichung von der Linearität ausgeschlossen. Für die an Schwachlicht adaptierten Blätter beider Varietäten, die keine Anthocyane enthielten, wurden die höchsten Photosyntheseraten ermittelt. Die durch die Regressionsanalyse berechnete Steigung für die Blattpaare ergab einen Wert von 0,101, der den von Björkman und Demmig (1987) entsprach. Allerdings ergab sich in der Publikation der Wert in Bezug zur absorbierten Lichtstärke. Damit war der hier ermittelte Wert, der aus dem Verhältnis zur eingestrahnten Photonenflussdichte hervorging, etwas zu hoch. Die gleiche Quantenwirksamkeit ergab sich für Blätter der grünen Varietät, die sich bei einer mittleren PPF_D von 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelt hatten. Obwohl für Blätter von *B. thunbergii*, die bei einer Anzucht mit einer PPF_D von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine beginnende Synthese von Anthocyanen zeigten, ein Absinken der Steigung und damit der PS II-Quantenausbeute von 16 % bestimmt wurde, war dieser Unterschied nicht signifikant (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni-Post-hoc Test, $p > 0,05$). Blätter der roten Varietät hingegen, die bei einer Anzucht mit einer

Ergebnisse

PPFD von 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine deutliche Akkumulation von Anthocyanen erkennen ließen, produzierten mit Steigungen von 0,076 und 0,064 weniger Sauerstoff als anthocyanfreie bzw. wenig Anthocyane enthaltende Blätter.

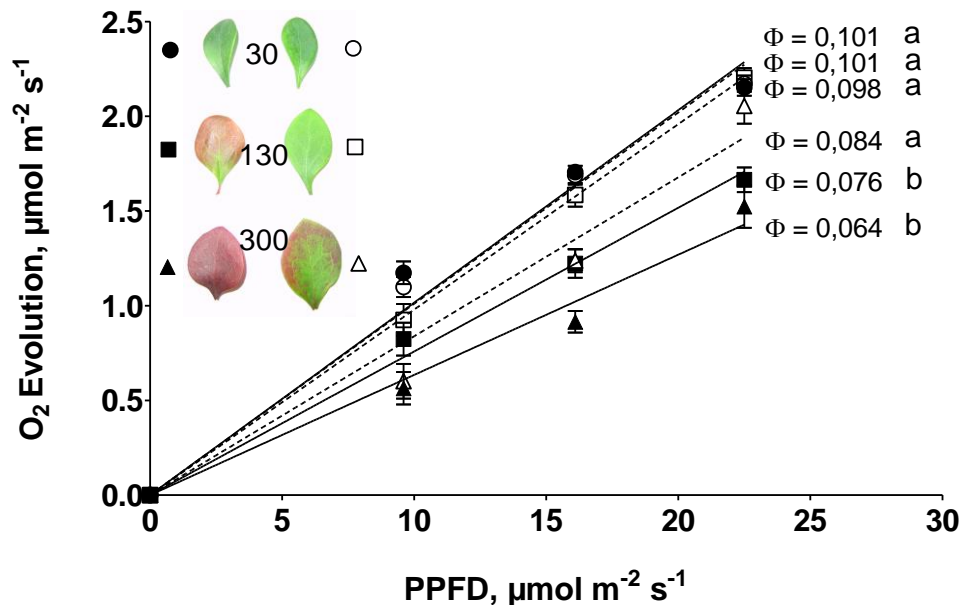


Abb. 3.12: Lichtfluss-Effekt-Kurven (linearer Anteil) für die Sauerstoffevolution von *B. thunbergii* / *thunbergii atropurpurea* Blättern. Dargestellt ist die apparente Sauerstoffevolution im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese, die aus der Differenz von Nettophotosyntheserate und Dunkelatmung hervorgeht. Die Linien zeigen das Ergebnis der Regressionsanalyse mit den dazugehörigen Anstiegen der Funktionen, die den maximalen photosynthetischen Quantenausbeuten von PS II (Φ) entsprechen. Weiterhin sind exemplarisch die verwendeten Blätter beider Varietäten mit der in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angegebenen Lichtstärke ihrer Kultivierung abgebildet. Die einzelnen Steigungen wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni-Post-hoc Test auf signifikante Unterschiede überprüft, die ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ dargestellt sind. +/- SEM, N = 8

Da eine enge Beziehung zwischen der Transmission von grünem Licht durch exponierte, Anthocyane enthaltende Zellschichten und der effektiven Photonenflussdichte des gesamten photosynthetisch aktiven Spektralbereiches bestand, stellte sich die Frage, ob die Abschirmung der Anthocyane gegen grünes Licht auch die Quantenausbeute der Sauerstoffevolution von Photosystem II im weißen Licht bestimmte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden für sämtliche Blätter von *B. thunbergii* / *thunbergii atropurpurea* aus den drei Anzuchtbedingungen nach der Bestimmung der Sauerstoffevolution die Transmissionen für grünes Anregungslicht mit der Xenon-PAM-Methode bestimmt. Wie aus der Abb. 3.13 A hervorgeht, bestand zwischen der Abschirmung gegen grünes Licht und der Sauerstofffreisetzung am Photosystem II ein linearer Zusammenhang. Blätter beider Varietäten, die aufgrund der geringen PPFD in der Anzucht keine Anthocyane akkumulierten und damit keine den Photosystemen vorgelagerte Absorptionsbarriere besaßen, zeigten die höchsten Quantenausbeuten. Die bereits in Abb. 3.12 beschriebene maximale Quantenwirksamkeit von 0,098 stellte sich tatsächlich nur ein, wenn kein Abschirmungseffekt bestand. Obwohl bei den Blättern der grünen Varietät aus den moderaten Anzuchtbedingungen die Transmission für grünes Licht ohne eine erkennbar induzierte Anthocyanbiosynthese um 20

Ergebnisse

% auf Werte um 0,8 zurückging, blieb die Effektivität, mit der Licht im Photosystem II umgesetzt wurde, auf dem Niveau der an Schwachlicht adaptierten Pflanzen. Erst mit der einsetzenden Bildung von Anthocyanen in den Blättern der grünen Varietät aus den Starklichtbedingungen, die unregelmäßig über die Blätter verteilt war, zeigte sich eine deutliche Herabsetzung der Quantenausbeute. Eine Abschirmung des grünen Lichtes von bis zu 50 % zog eine Reduzierung der Photonenwirksamkeit von ca. 20 % nach sich.

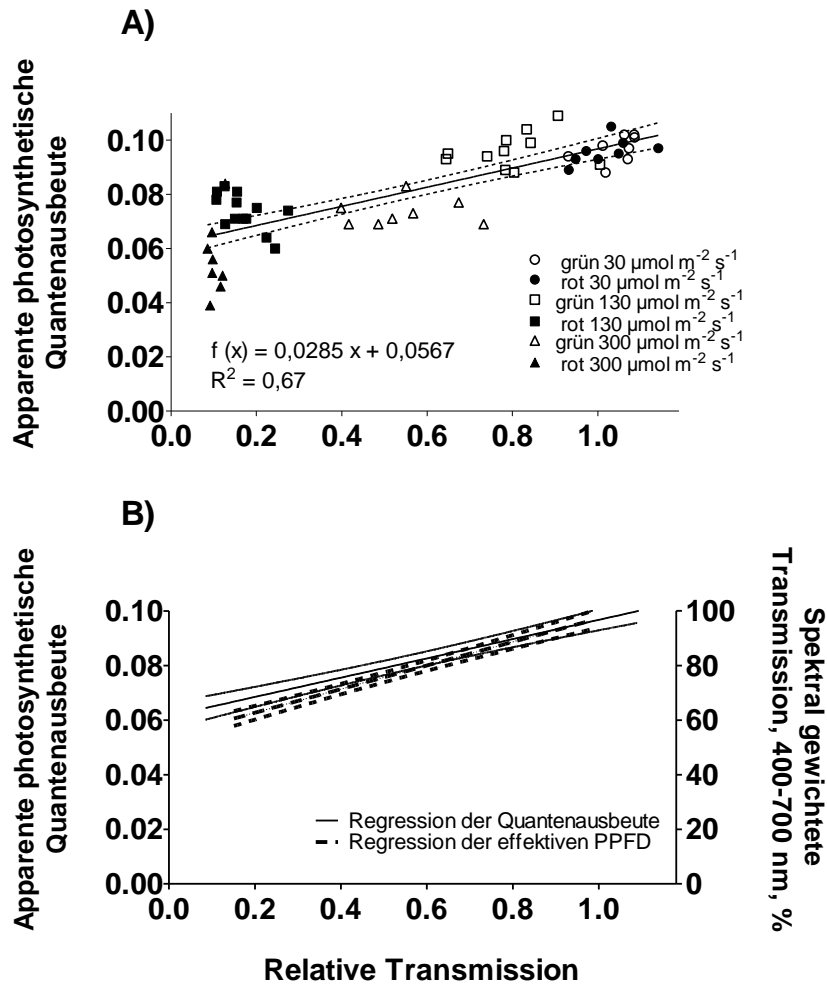


Abb. 3.13: A) Abhängigkeit der apparenten Quantenausbeute der PS II-Sauerstoffevolution von der Transmission grünen Lichtes für Blätter von *B. thunbergii* (grün) / *B. thunbergii atropurpurea* (rot). Die Datenpunkte sind Messwerte einzelner Blätter, die sich bei einer PPFD von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelt hatten. B) Vergleich der Regressionen, die sich im Hinblick auf den Abschirmungseffekt der Anthocyane einerseits durch das Absinken der apparenten PS II-Quantenausbeute und andererseits durch die Verringerung der auftreffenden PPFD der verwendeten Halogenlampe in Abhängigkeit zur Transmission von grünem Licht ergaben. Regressionsgeraden mit 95 %-Konfidenzintervallen.

Für die Gesamtheit der Datenpunkte konnte in der Regressionsanalyse der lineare Zusammenhang zwischen der Transmission von grüner Strahlung und der apparenten photosynthetischen Quantenausbeute statistisch bestätigt werden. Es bestand die Tendenz, dass Blätter, die sich bei einer PPFD von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelten, eine niedrigere Quantenausbeute aufwiesen als Blätter aus der mittleren Lichtakklimatisierungsstufe. Das könnte

eine Folge von Photoinhibition sein. Der F-Test zeigte mit einer sehr geringen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,0001$ eine signifikante Abweichung des Anstiegs von Null. Mit $p = 0,56$ verifizierte der Runs-Test die Linearität der Beziehung.

Mit der Transmission von grünem Anregungslicht und dem Modell der effektiven Photonenflussdichte ließ sich die optische Abschirmung der Anthocyane eher als potenziell wirksam darstellen. Dadurch war es jedoch nicht möglich, die photosynthetische Abschirmung von weißem Licht zu erfassen.

Zur Validierung der effektiven Photonenflussdichte wurden deshalb die Regressionen der apparenten photosynthetischen Quantenausbeute und der spektral gewichteten Transmission für die photosynthetisch aktive Strahlung einer Halogenlampe in Abhängigkeit zur Transmission des grünen Anregungslichtes dargestellt (s. Abb. 3.13 B). In der Regressionsanalyse ergaben sich für die beiden Funktionen überlagernde Konfidenzintervalle. Weiterhin bestätigte die statistische Überprüfung, dass zwischen den Anstiegen der beiden Regressionsfunktionen kein signifikanter Unterschied bestand. Somit kann weitestgehend von einer Übereinstimmung zwischen der bei 545 nm ermittelten und der photosynthetisch wirksamen Abschirmung ausgegangen werden. Erst bei sehr hohen Anthocyangehalten in den Blättern, wenn ca. 90 % des grünen Anregungslichtes absorbiert wurden, sank die Quantenausbeute weniger stark ab als die effektive Photonenflussdichte der Halogenlampe. Aus der berechneten, optischen Abschirmung resultierte dann eine tendenzielle Überschätzung des Effektes, wenn die Photosynthesemessungen als Maß für die Abschirmung angesehen wurden. Die Fehleinschätzung der Abschirmung lag hier bei etwas über 10 %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass über die optische Abschirmung von grünem Licht, die mit der Xe-PAM-Methode bestimmt wurde, auch die photosynthetisch wirksame Abschirmung von Anthocyanen im Blattgewebe quantifiziert werden konnte.

3.2 Lichtakklimatisation des Photosyntheseapparates als Folge des Abschirmungseffektes durch Anthocyane

Pflanzen sind in der Lage, ihren Photosyntheseapparat den gegebenen Lichtbedingungen anzupassen. Zur Lichtakklimatisation gehören die variierende Pigment- und Photosystem-Stöchiometrie und die sich ändernde enzymatischen Ausstattung der Carboxylierung, deren jeweilige Dynamik im Gegensatz zur kurzfristigen Wärmedissipation von überschüssigem Licht durch den Xanthophyllzyklus mehrere Tage umfasst (Walters 2005). Die Reaktionen widerspiegeln die enorme Plastizität des Photosyntheseapparates, die notwendig ist, um die Energiebereitstellung durch die Ladungstrennung auf den Energieverbrauch der Kohlenstoff-fixierung bei quantitativen und qualitativen Fluktuationen der Lichtverhältnisse abzustimmen (Anderson et al. 1995).

Eine permanente Abschirmung photosynthetischer Strahlung seitens der Anthocyane, wie sie durch die in Abschnitt 3.1 dargestellten Ergebnisse nachgewiesen wurde, sollte die Voraussetzung erfüllen, eine photosynthetische Lichtakklimatisation zu induzieren. Den Überlegungen von Gould et al. (2002b) und Manetas et al. (2003) folgend betrifft die Reduzierung der PPFD in Anthocyane enthaltenden Blättern die Anpassung der photosynthetischen Kapazität und die Zusammensetzung der Antennenpigmente in den Lichtsammelkomplexen. Im folgenden Abschnitt soll es darum gehen, die Auswirkungen einer ständigen

Abschwächung des Lichtes durch Anthocyane auf die Leistungsfähigkeit des Photosyntheseapparates zu beurteilen. Des Weiteren gilt es zu überprüfen, ob hinsichtlich einer Lichtakklimatisation die Menge und Stöchiometrie der Photosynthesepigmente von der effektiven Photonenflussdichte bestimmt wird.

3.2.1 Photosynthetische Lichtfluss-Effekt-Kurven von *B. thunbergii* / *thunbergii atropurpurea* Blättern

Um eine mögliche Adaptation der photosynthetischen Leistungsfähigkeit an unterschiedliche Lichtbedingungen, die aus der permanenten optischen Abschirmung durch Anthocyane resultieren könnte, zu erfassen, wurden von Blättern der Varietäten *B. thunbergii* bzw. *B. thunbergii atropurpurea* photosynthetische Lichtfluss-Effekt-Kurven bestimmt.

Dafür wurde für Blätter, die an eine PPF_D von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ akklimatisiert waren, die jeweilige Sauerstoffevolution in Abhängigkeit von der eingestrahlten Lichtmenge polarographisch bestimmt. Da bereits vorher die lichtlimitierte Rate der Sauerstoffevolution bestimmt worden war (Abb. 3.12), stand hier die Analyse des lichtgesättigten Bereichs im Vordergrund. Wie aus der Abb. 3.14 A hervorgeht, ergaben sich für die photosynthetischen Lichtfluss-Effekt-Kurven der anthocyanfreien Pflanzen aus der Schwachlichtakklimatisationsstufe vergleichbare Kurvenverläufe mit tendenziell niedrigeren Sauerstoffbildungsraten in *B. thunbergii atropurpurea*. Übereinstimmend gingen die Photosyntheseraten beider Varietäten jedoch bereits bei einer PPF_D unterhalb von 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in die Sättigung über.

Im Gegensatz dazu zeigten Blätter, die sich bei einer PPF_D von 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gebildet hatten, erst bei höheren Photonenflussdichten eine Sättigung. Durch ein früheres Einsetzen der Limitation in der roten Varietät zwischen 100 und 195 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ stellte sich im Vergleich zur grünen Varietät ein niedrigeres Sättigungsniveau ein. Ab einer PPF_D von 850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestätigte der Bonferroni Post-hoc Test mit $p < 0,001$ für den lichtgesättigten Bereich ein hoch signifikantes Divergieren beider Funktionen.

Im Vergleich damit brachte die Bestimmung der lichtabhängigen Sauerstoffevolution für Pflanzen, die in den Anzuchtsbedingungen mit 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ den höchsten Photonenflussdichten ausgesetzt waren, ähnliche Unterschiede zwischen den Lichtfluss-Effekt-Kurven von roten und grünen Blättern hervor. Die Sauerstoffraten unterschieden sich bereits bei einer Photonenflussdichte von 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Signifikante Unterschiede bestanden ab einer Lichtstärke von 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Aufgrund einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ ergab der Post-hoc Test nur noch ein mittleres Signifikanzniveau für unterschiedliche Sauerstoffraten.

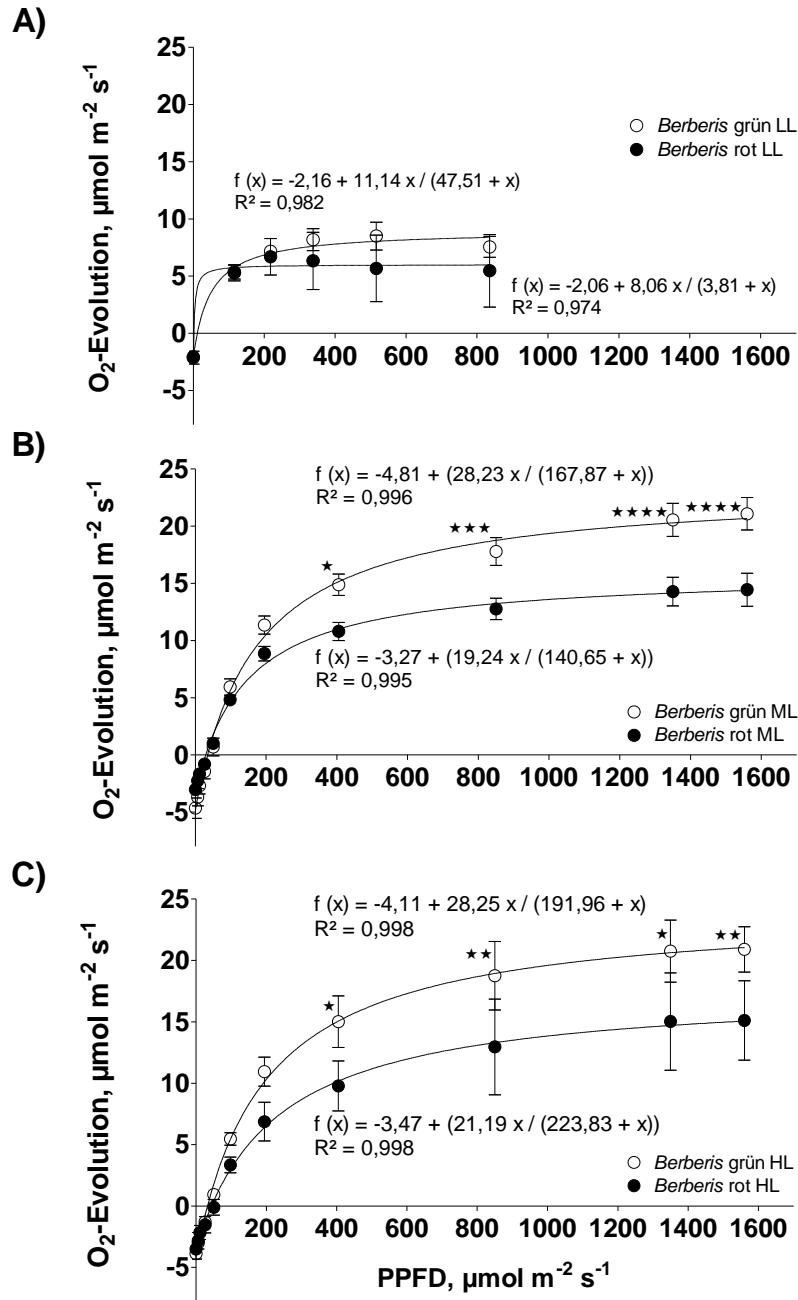


Abb. 3.14: Photosynthetische Lichtfluss-Effekt-Kurven für Blätter der Varietäten *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea*, die an eine PPFD von 30 (A, LL-low light), 130 (B, ML-moderate light) und 300 (C, HL-high light) $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ akklimatisiert waren. Ermittelt wurde die Sauerstoffevolution in Abhängigkeit von der eingestrahlenen Lichtmenge. Vor den Messungen wurde in den Blättern mit der jeweiligen PPFD der Kultivierung die Photosynthese induziert. Bei den an 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ adaptierten Pflanzen fand die Bestimmung der Respiration am Anfang der Messreihe statt. Nach der Feststellung der Sauerstoffevolution bei 48 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wurde der CO_2 -Partialdruck in der Kammer auf 5 kPa erhöht. Bei den an Schwachlicht angepassten Pflanzen erfolgte die Ermittlung der Respirationsrate am Ende der Lichtreihe. Die statistische Analyse der Daten basierte auf einer zweifaktoriellen ANOVA in Verbindung mit einem Bonferroni Post-hoc Test. Die Sternsymbole stellen die Irrtumswahrscheinlichkeiten der signifikanten Unterschiede dar (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). $N = 4-9$, +/- SEM.

Ergebnisse

Mit weiteren variablen Merkmalen von Lichtfluss-Effekt-Kurven kann die Lichtakklimatisation von Pflanzen erfasst werden. Zum einen bietet sich der Vergleich der Respirationsraten (R_D) an. Zum anderen sind dies der Lichtkompensationspunkt (L_K) und die Photonenflussdichte bei einsetzender Lichtsättigung der Photosyntheserate (I_K). In Tabelle 3.1 wurden die jeweiligen Werte für beide Varietäten aus der photosynthetischen Akklimatisation an eine PFD von $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einander gegenübergestellt.

Tabelle 3.1: Respirationsrate (R_D), Lichtkompensationspunkt (L_K) und Photonenflussdichte bei minimaler Sättigung der Photosyntheserate (I_K) für Blätter von *Berberis thunbergii* (Bt) und *Berberis thunbergii atropurpurea* (Bta), die an eine PFD von $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LAK 130) bzw. an eine PFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LAK 300) akklimatisiert waren. Die Daten entsprechen den Mittelwerten resultierend aus $N = 7-8$, +/- SD. Die Daten wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni Post-hoc Test auf signifikante Unterschiede überprüft, die durch Buchstabenkombinationen dargestellt sind.

	Bt LAK 130	Bta LAK 130	Bt LAK 300	Bta LAK 300
R_D $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-3,94 a +/- 1,67	-2,70 a +/- 0,32	-3,89 a +/- 0,96	-3,51 a +/- 0,82
L_K $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	34,87 a +/- 10,06	32,15 a +/- 6,52	39,56 a, b +/- 10,12	48,79 b +/- 9,21
I_K $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	218,03 a +/- 57,62	203,73 a +/- 22,36	232,91 a +/- 51,90	233,69 a +/- 57,57

Wenn durch die Absorption von Anthocyanen die geringeren effektiven Photonenflussdichten eine mittelfristige Adaptation des Photosyntheseapparates bewirkten, müsste einem sinkenden Verbrauch von Energieäquivalenten eine Anpassung der mitochondrialen Atmung folgen, d.h. für den Erhalt einer verringerten Proteinmenge im Calvinzyklus muss weniger Energie aufgewendet werden. Wie aus der Tabelle 3.1 hervorgeht, besaßen Blätter von *B. thunbergii*, die an mittlere Lichtbedingungen angepasst waren, im Durchschnitt eine Respiration von etwa $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Relativ betrachtet wiesen die Blätter der roten Varietät eine geringere Rate auf, die im Mittel 25 % unter den Werten der grünen Varietät lag. Wurde die Lichtintensität in den Anzuchtbedingungen mit $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mehr als verdoppelt, ergaben sich unterschiedliche Reaktionen. Die Dissimilationsrate der grünen Blätter blieb unverändert, in den Anthocyane enthaltenden Blättern kam es bezogen auf Blätter der mittleren Adaptationsstufe zum Anstieg der Respirationsrate um 30 %. Die beobachteten Unterschiede besaßen allerdings nur einen formalen Charakter, da die verwendeten statistischen Tests Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p > 0,05$ ergaben.

Ein weiterer Parameter, um die Auswirkungen der Lichtakklimatisation auf die Photosynthese zu erfassen, ist der Lichtkompensationspunkt. Die Lage des Punktes wird durch die respiratorische Sauerstoffaufnahme und die Steigung der Sauerstoffabgabe im linearen Abschnitt der Photosynthese bestimmt. Demnach sollten an Starklicht adaptierte Blätter ohne eine optische Abschirmung durch Anthocyane einen höheren Lichtkompensationspunkt besitzen, da relativ viel Licht gebraucht wird, um die Atmung auszugleichen. Umgekehrt müssten Blätter, die Anthocyane enthalten und damit während der Etablierung der photosynthetischen Komponenten weniger effektives Licht zur Verfügung hatten, diesen Punkt bei geringeren Photonenflussdichten erreichen. Die Ergebnisse in Tabelle 3.1 stützen diese Vermutung nicht.

Bei tendenziell geringeren Atmungsraten wiesen rote Blätter aus den beiden höheren Lichtakklimationsstufen übereinstimmende bzw. deutlich höhere Lichtkompensationspunkte auf. Somit scheint die Abschirmung der Anthocyane, die eine flachere Steigung im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese zur Folge hatte, eine Schwachlichtakklimation zu kompensieren bzw. zu überlagern.

Als dritter Parameter zur Analyse der Lichtfluss-Effekt-Kurven diente die Photonenflussdichte, die den Eintritt in die Lichtsättigung der Photosynthese markiert (I_K -Wert). Blätter des grünen Phänotyps ohne die permanente Abschirmung durch die Anthocyane sollten eine höhere Aufnahme- und Bindungskapazität für CO_2 besitzen als ihr roter Vergleichspartner. Die Daten (Tab. 3.1) weisen für die an eine mittlere PPFD adaptierten Pflanzen jedoch nur tendenzielle Unterschiede auf. In der Starklichtakklimation kam es zur Verschiebung des I_K -Wertes. Die höhere CO_2 -Bindungskapazität in beiden Varietäten führte zwar zu einem Anstieg von I_K , jedoch waren die beobachteten Unterschiede nicht signifikant.

3.2.2 Lichtakklimation der maximalen Photosynthesekapazität (P_{\max}) in grünen und Anthocyane enthaltenden Blättern

Mit Hilfe der photosynthetischen Lichtfluss-Effekt-Kurven in Abbildung 3.14 konnte der Sättigungsbereich festgelegt werden. Zum Teil war der Stichprobenumfang jedoch sehr gering. Um zu überprüfen, ob die anhaltende Abschirmung von photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane tatsächlich eine Adaptation der maximalen Photosynthesekapazität verursachte, wurden für die Blätter der beiden *Berberis*-Varietäten aus den bekannten Lichtakklimationsstufen in einem vergrößerten Stichprobenumfang die lichtgesättigten Sauerstoffraten bei erhöhtem CO_2 -Partialdruck ermittelt.

Die hohe Plastizität des Photosyntheseapparates wurde durch die ermittelten Sauerstoffraten belegt (Abb. 3.15). Beide Phänotypen zeigten, wenn sie an Schwachlicht akklimatisiert waren, die gleiche maximale Photosynthesekapazität. Eine Verdreifachung der Photonenflussdichte auf $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ während der Kultivierung führte nicht nur zur einer Induktion der Anthocyanbiosynthese in der roten Varietät, sondern beide Varietäten zeichneten sich auch durch eine offensichtliche Zunahme in der photosynthetischen Leistungsfähigkeit aus. Beim grünen Phänotyp konnte mit einer Sauerstoffevolution von circa $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ eine Verdreifachung beobachtet werden. Für die rote Varietät konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg der abgegebenen Sauerstoffmenge im Sättigungsbereich der Photosynthese detektiert werden. Allerdings stieg die Rate hier nur auf etwa $18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Der Unterschied, der sich daraus zum grünen Phänotyp ergab, konnte mit $p < 0,01$ als hoch signifikant eingestuft werden.

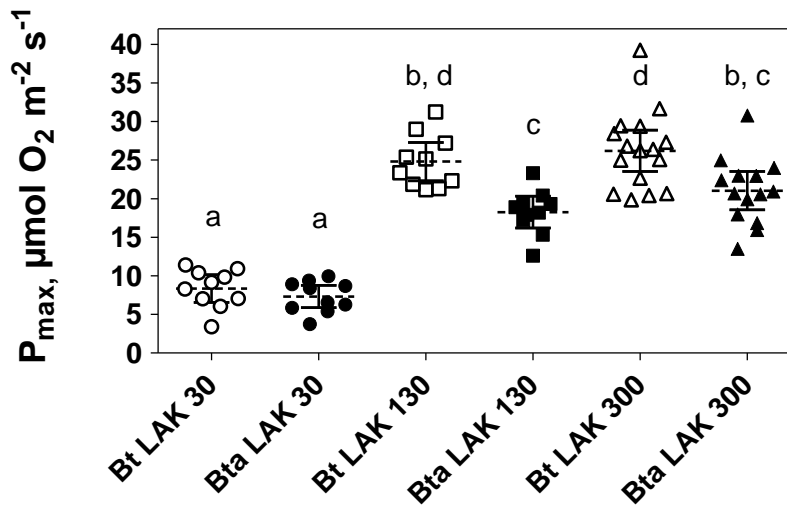


Abb. 3.15: Die maximale Photosynthesekapazität für Blätter von *B. thunbergii* (Bt) und *B. thunbergii atropurpurea* (Bta), die bei photosynthetischen Photonendichten von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LAK 30, LAK 130, LAK 300) kultiviert wurden. Nach der Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes in der Messkammer auf 5 kPa wurde zuerst die lichtgesättigte Sauerstoffrate bei einer PPFD von 516 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (LAK 30) und 1538 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ermittelt, danach erfolgte die Messung der Respiration. Einzelwerte (N = 10-16), Mittelwerte (gestrichelt) und das Konfidenzintervall (Ci = 95 %). Statistische Unterschiede beruhend auf einer einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni Post-hoc-Test wurden durch Buchstaben dargestellt.

Eine weitere Verdopplung der Lichtmenge in der Kultivierung hatte bei der gleichen eingestrahlten Photonendichte während der Sauerstoffbestimmung nur geringfügige Änderungen zur Folge. Die Sauerstoffrate des grünen Phänotyps stieg um 5 %, was gleich bedeutend mit einer auch statistisch bestätigten Restriktion der maximalen Photosynthesekapazität unter den gewählten Bedingungen war. Blätter von *B. thunbergii atropurpurea* wiesen hingegen mit einer Steigerung der Sauerstoffrate um 20 % eine noch nicht ausgeschöpfte Plastizität des Photosyntheseapparates auf. Der Wert lag nominell zwischen den beiden Varietäten der mittleren Lichtaklimatisationsstufe. Die statistische Überprüfung bestätigte, dass nur relative Unterschiede bestanden.

3.2.3 Akklimatisation der Lichtsammelkomplexe durch die Abschirmung von Anthocyanen

Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob die permanente Absenkung der photosynthetisch wirksamen Photonendichte durch die Anthocyane einen Einfluss auf die Pigmentausrüstung der Lichtsammelkomplexe besaß. Das Augenmerk lag hier vor allem darauf, ob die Zusammensetzung der primären und die Menge der akzessorischen Photosynthesepigmente der effektiven Photonendichte folgten.

Es ist bekannt, dass im Schwachlicht Blätter an das Photosystem II mehr Lichtsammelkomplexe (Lhc II) koppeln, die mit einer vermehrten Einbindung von Chlorophyll b noch vergrößert werden. D.h., ein niedriges Chl a / b Verhältnis bei einer Anpassung an Schwachlicht bedeutet beispielsweise mehr Lhc II verbunden mit einer höheren Chlorophyllmenge im PS II und niedrigeren Chlorophyllmengen im PS I (Leong und Anderson

1984). Eine Zunahme der photosynthetisch aktiven Strahlung verringert das Verhältnis von Lhc II / PS II und bewirkt eine Verkleinerung des Absorptionsquerschnittes (Anderson et al. 1995).

Lichtabhängig vollzieht sich auch die quantitative Anpassung der akzessorischen Antennenpigmente. Die Poolgröße des für die thermale Energiedissipation von exzessiven Photonenflussdichten in den Chloroplasten verwendeten Xanthophyllzyklusses (Violaxanthin + Antheraxanthin + Zeaxanthin) unterliegt ebenfalls der Adaptation an unterschiedliche Lichtbedingungen und kann dabei in Sonnenblättern mit einem Anteil von 30 % am Gesamtgehalt der Carotinoide den der Schattenblätter um das Dreifache überschreiten (Demmig-Adams und Adams 1992b).

Eine weitere Möglichkeit, um eine Lichtakklimatisation von Pflanzen mit Hilfe eines kurzfristigen Effektes zu analysieren, liegt in den Umwandlungsreaktionen innerhalb des Xanthophyllzyklusses begründet. Eine Erhöhung der PPFD verursacht innerhalb von mehreren Minuten in den Blättern eine De-Epoxidation von Violaxanthin und damit einhergehend eine Akkumulation von Zeaxanthin. Blätter mit einer hohen Photosyntheserate zeigen in diesem Zusammenhang einen hohen Epoxidationsgrad, d.h. sie bilden relativ wenig Zeaxanthin. Dagegen weisen an Schwachlicht adaptierte Blätter bei der gleichen PPFD einen niedrigeren Epoxidationsgrad auf mit entsprechend mehr Zeaxanthin (Demmig-Adams und Adams 1992b).

3.2.3.1 Das Chlorophyll a / b Verhältnis – Akklimation der Größe der Lichtsammelkomplexe

Aufgrund der vorangestellten Zusammenhänge lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Bildung von Anthocyanen mit der damit verbundenen Abschirmung zu einer Absenkung des Chl a / b Verhältnisses führt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden für Blätter des grünen und roten Phänotyps von *B. thunbergii* aus den drei Lichtakklimatisationsstufen die Chlorophyllkonzentrationen bestimmt. Für alle Blätter wurden die jeweils auftreffenden Photonenflussdichten und die Transmissionen für grünes Anregungslicht ermittelt. Aus beiden Faktoren konnte schließlich für jedes einzelne Blatt die effektive Photonenflussdichte berechnet werden, der ebenso wie der eingestrahnten PPFD das jeweilige Chlorophyllverhältnis gegenübergestellt wurde.

Die Blätter beider Phänotypen, die an Schwachlichtbedingungen adaptiert waren, wiesen mit einem Chl a / Chl b Verhältnis von etwa 3,2 sowohl in Bezug zur eingestrahnten als auch in Relation zur effektiven PPFD identische Werte auf (Abb. 3.16 A und B).

Mit zunehmender eingestrahelter Photonenflussdichte konnte ein Abweichen der Verhältnisse zwischen den Varietäten beobachtet werden, das ab einer eingestrahnten PPFD von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ für beide Funktionen getrennt verlaufende Konfidenzintervalle hervorbrachte. Bei den höchsten Photonenflussdichten stieg das Verhältnis im grünen Phänotyp weiter auf Werte von über 3,8 an, während die Pigmentkomposition in den Antennensystemen der roten Blätter unverändert blieb (Abb. 3.16 A). Wurden die Chl a / b Verhältnisse in Bezug zur effektiven PPFD betrachtet, fielen die Datenpunkte der roten und grünen Varietät weitgehend aufeinander.

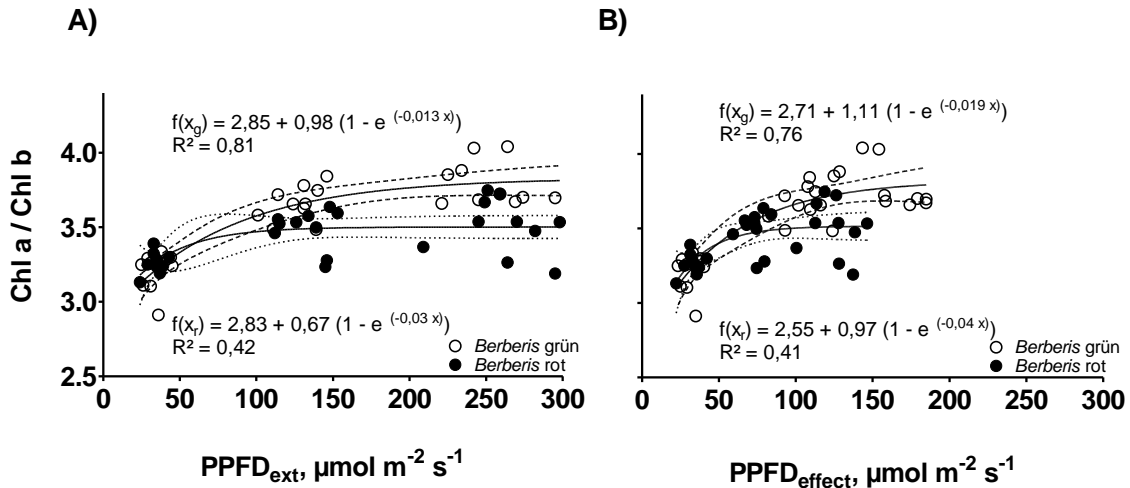


Abb. 3.16: Die Chlorophyll a (Chl a) / Chlorophyll b (Chl b) Verhältnisse für Blätter von *B. thunbergii* (*Berberis grün*) und *B. thunbergii atropurpurea* (*Berberis rot*), die bei Photonendichten von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert wurden. A) Abhängigkeit des Chl a / Chl b Verhältnisses von der eingestrahlten photosynthetisch aktiven Photonendichte (PPFD_{ext}) B) Abhängigkeit des Chl a / Chl b Verhältnisses von der effektiven Photonendichte (PPFD_{effect}). Werte einzelner Blätter, für die jeweils die auftreffende PPFD und die Transmission für grünes Anregungslicht ermittelt wurden, woraus PPFD_{effect} berechnet werden konnte. Neben den durchgezogenen Linien der Regressionsfunktionen wurden mit gestrichelten Linien die jeweiligen Konfidenzintervalle (Ci = 95 %) abgebildet.

Für Anthocyane enthaltende Blätter führte die Korrektur der Lichtstärke zu einer erheblichen Verschiebung der einzelnen Chlorophyllverhältnisse. Die Mehrzahl der Blätter, die aus der mittleren und höchsten Akklimatisationsstufe stammten, besaßen Pigmentverhältnisse, die denen der grünen Varietät aus der mittleren Akklimatisationsstufe mit 75 bis 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ effektiver PPFD entsprachen, und fügten sich in den Kurvenverlauf der grünen Blätter ein (Abb 3.16 B). Die Übereinstimmung war statistisch aber nur bis zu einer effektiven PPFD von 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ abgesichert, da bei höheren PPFDs die Konfidenzintervalle divergierten und somit die Verhältnisse kleiner als die des grünen Phänotyps waren.

3.2.3.2 Mittelfristige Lichtakklimatisation der Größe des VAZ-Pools

Die Pigmente Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin bilden in Blättern den Xanthophyll-Pool, in dem sie zur dissipativen Ableitung von exzessivem Licht zyklisch umgesetzt werden. Die Poolgröße passen Pflanzen innerhalb weniger Tage der täglichen Strahlungsdosis an (Thayer und Björkman 1990).

Im Folgenden soll geklärt werden, ob die Abschirmung durch Anthocyane eine Verkleinerung der Poolgröße bewirkte. Dazu wurden den beiden *Berberis*-Varietäten aus den drei Akklimatisationsstufen unter Wachstumsbedingungen Blattproben entnommen und die Pigmentgehalte mittels HPLC bestimmt. Die Poolgrößen der Pigmente wurden sowohl der eingestrahlten als auch der effektiven Photonendichte gegenübergestellt.

Bei Pflanzen beider Phänotypen stiegen die Mengen an Xanthophyllzykluspigmenten mit der eingestrahlten Photonendichte an. Unterschiede zwischen den Phänotypen traten, entgegen der Annahme, dass die Strahlungsabschirmung durch die Anthocyane eine kleinere

VAZ-Poolgröße hervorbringen sollte, erst bei einer Quantenflussdichte von 250 bis 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf.

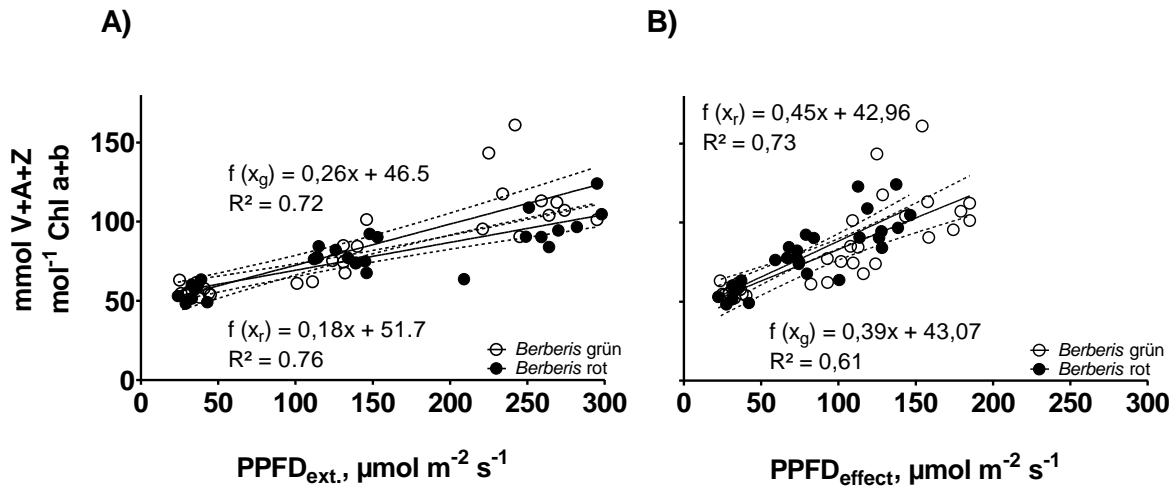


Abb. 3.17: Die Poolgröße der Xanthophylle Violaxanthin (V), Antheraxanthin (A) und Zeaxanthin (Z) für Blätter von *B. thunbergii* (*Berberis grün*, [$f(x_g)$]) und *B. thunbergii atropurpurea* (*Berberis rot*, [$f(x_r)$]), die an photosynthetisch Photonendichten von 30, 130 und 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ adaptiert waren. A) Abhängigkeit der Poolgröße von der eingestrahlt photosynthetisch aktiven Photonendichte (PPFD_{ext.}) B) Abhängigkeit der Poolgröße von der effektiven Photonendichte (PPFD_{effect.}). Werte einzelner Blätter, für die jeweils die eingestrahlte PPFD und die Transmission für grünes Anregungslicht ermittelt wurden, woraus PPFD_{effect.} berechnet werden konnte. Neben den Funktionen (durchgezogene Linien) wurden mit gestrichelten Linien die jeweiligen Konfidenzintervalle ($C_i = 95\%$) abgebildet.

Während die grüne Varietät eine VAZ-Poolgröße von 120 mmol / mol Chl erreichte, stieg sie in der roten Varietät nur auf etwa 100 mmol / mol Chl (Abb. 3.17 A). Die Signifikanz des Unterschieds ist durch die ab 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD getrennt verlaufenden Konfidenzintervalle gegeben. Für beide Funktionen, deren Linearität mit dem Runs-Test ($p = 0,101$; $p = 0,13$) verifiziert wurde, konnte eine Abhängigkeit der Xanthophyllpoolgröße von der eingestrahlt PPFD auf einem ähnlich hohen Korrelationsniveau ($R^2 = 0,72$; $R^2 = 0,76$) ermittelt werden. Der F-Test bestätigte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,02$ einen signifikanten Unterschied zwischen den Anstiegen beider Funktionen. Wurde die Menge der akzessorischen Pigmente in Relation zur effektiven Photonendichte gesetzt, konnte dagegen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,15$ im F-Test kein Unterschied in der Steigung der Regressionsgeraden in Abb. 3.17 B nachgewiesen werden. Bei den Blättern des roten Phänotyps, die an Starklichtbedingungen adaptiert waren, konnte eine deutliche Verschiebung in der Lichtabhängigkeit der Poolgröße im Vergleich zu Abb. 3.17 A beobachtet werden. Etwa die Hälfte der auftreffenden Photonen war für die Regulation der Xanthophyllmenge bedeutungslos. So verfügten die roten Blätter aus Starklichtbedingungen über eine ähnliche Pigmentausrüstung wie der grüne Phänotyp aus der mittleren Lichtakklimatisationsstufe. Tendenziell lagen hier die Poolgrößen der roten Blätter etwas über denen der grünen Varietät. Unter Umständen zeigte sich hier die leichte Überschätzung der Abschirmungseffizienz von Anthocyanen im Modell der effektiven Photonendichte (Abb. 3.13 B).

3.2.3.3 Kurzfristige Akklimation des Epoxidationsgrades im Xanthophyllzyklus

Überschüssiges Licht, das nicht vollständig in der Photosynthese genutzt werden kann, führt zu einer Deepoxidierung von Violaxanthin zu Zeaxanthin. Dadurch ist der Epoxidationsgrad der Xanthophyllzykluspigmente ein Maß für den exzessiven Anteil der photosynthetisch aktiven Strahlung. Schwächeres Licht unterhalb des blattinternen Anthocyanfilters sollte den Epoxidationsgrad erhöhen. Auf der anderen Seite erreichen Pflanzen mit einer geringeren photosynthetischen Kapazität exzessive Lichtbedingungen schon bei geringeren Quantenflussdichten als Pflanzen mit einer höheren Kapazität (Bilger et al. 1995). Daher könnte eine Absenkung der Photosynthesekapazität, wie sie in roten Blättern beobachtet wurde (Abb. 3.15), wiederum zu einer gegenläufigen Reaktion führen, d.h. einer Absenkung des Epoxidationsgrades.

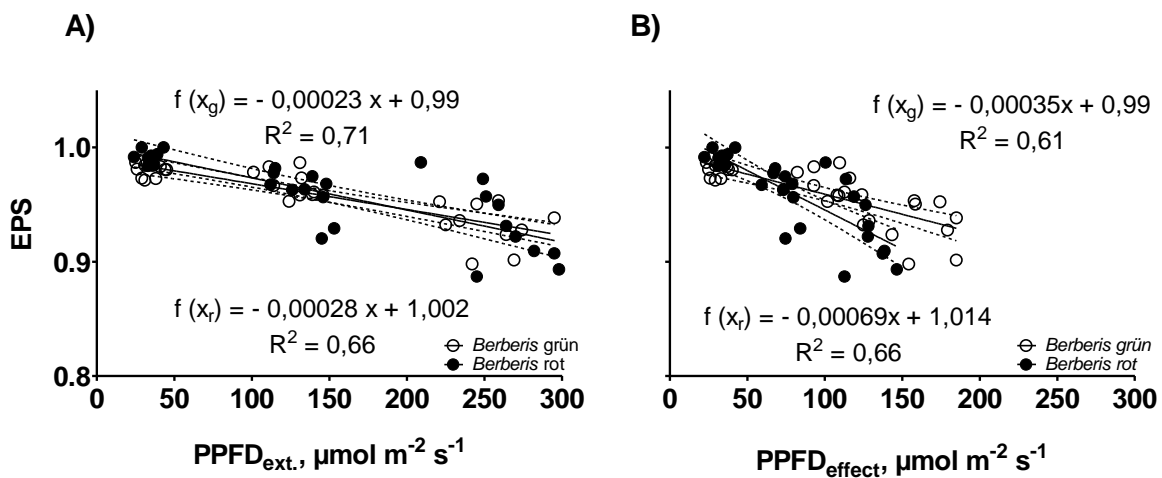


Abb. 3.18: Epoxidationsgrad des Xanthophyllzyklusses berechnet mit $EPS = (V + 0,5A) / (V + A + Z)$ für Blätter von *B. thunbergii* (*Berberis grün*) und *B. thunbergii atropurpurea* (*Berberis rot*), die an photosynthetische Photonendichten von ca. 30, 130 und 300 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ adaptiert waren. A) Abhängigkeit des Epoxidationsgrades von der eingestrahlt photosynthetisch aktiven Photonendichte ($PPFD_{ext}$) B) Abhängigkeit des Epoxidationsgrades von der effektiven Photonendichte ($PPFD_{effect}$). Werte einzelner Blätter, für die jeweils die auftreffende PPFD und die Transmission für grünes Licht ermittelt wurden, woraus $PPFD_{effect}$ berechnet werden konnte. Neben den Funktionen (durchgezogene Linien) wurden mit gestrichelten Linien die 95 % Konfidenzintervalle abgebildet.

Zur Klärung dieser Überlegung wurde für die Blattproben beider Phänotypen der Epoxidationsgrad (EPS) berechnet. Wie aus der Abb. 3.18 A hervorgeht, lag der EPS in der Schwachlichtakklimationsstufe nahe bei 1,0, so dass Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die Absorption von Licht, der Elektronentransport und der reduktive Pentosephosphatweg im Gleichgewicht standen und somit keine überzähligen Quanten die Photosysteme anregten. Der Vergleich von Bestrahlungsstärke und Reaktion des Xanthophyllzyklusses ergab, dass in den Blättern der beiden *Berberis*-Varietäten eine lineare Abhängigkeit des Epoxidationsgrades von der eingestrahlt Photonendichte bestand (Abb. 3.18 A). Das Ausmaß dieses Effektes muss für beide Phänotypen als gleich groß angesehen werden, da der F-Test aufgrund einer sehr hohen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,24$ keine Unterschiede zwischen den Anstiegen nachweisen konnte.

Wurde der Epoxidationsgrad der effektiven Photonenflussdichte gegenübergestellt, verschob sich das Ansprechverhalten des Xanthophyllzyklusses für beide Phänotypen unterschiedlich. Für den roten Phänotyp konnte eine ausgeprägtere Reaktion festgestellt werden. Folglich bedingte eine Verdreifachung des Anstieges einen im Vergleich zur grünen Varietät differierenden Verlauf der Regressionsfunktion, der mit $p < 0,001$ als höchst signifikant eingestuft werden konnte (Abb. 3.18 B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Anthocyane durch ihren Abschirmungseffekt eine Lichtakklimatisation der Photosynthesepigmente in roten Blättern verursachten. Entsprechend den geringeren effektiven Lichtstärken wurde einerseits das Chl a / b Verhältnis verkleinert und andererseits wurde die Poolgröße der Xanthophylle verringert sowie deren Epoxidationsgrad angepasst.

3.3 Die Funktion von Anthocyanen in Blättern von *Arabidopsis thaliana* – Abschirmung oder antioxidative Wirkung?

Im folgenden Kapitel steht die Frage im Mittelpunkt, ob in Pflanzen unter Bedingungen einer eingeschränkten Photosyntheseaktivität, bei denen eine Diskrepanz zwischen der PS II-Ladungstrennung und der Umsatzrate von Reduktions- und Energieäquivalenten im Calvin-Benson-Zyklus auftritt und zu oxidativen Stress führen kann, Anthocyane als Schutzpigmente fungieren (Steyn et al. 2002, Gould 2004, Manetas 2006). Wie bereits in Teil 3.1 und 3.2 untersucht, könnte die in der Literatur beschriebene photoprotektive Wirkung von Anthocyanen einerseits darauf beruhen, dass ein Teil des eingestrahlt Lichtes von den Pigmenten absorbiert und somit der exzessive Anteil der auftreffenden Strahlung verringert wird. Andererseits verfügen Anthocyane aber auch aufgrund ihrer antioxidativen Kapazität über das Potential, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften. Bei extremen Wachstumsbedingungen könnten demnach sowohl die optischen als auch die chemischen Eigenschaften der Anthocyane für die Lichtschutzwirkung in Blättern höherer Pflanzen relevant sein.

Um zu klären, welcher Mechanismus *in situ* seine protektive Wirkung entfaltet, wurde die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* benutzt. Mit der Akkumulation von Anthocyanen in Blättern von *B. thunbergii*, die sich unter Starklichtbedingungen entwickelten, konnte nämlich gezeigt werden, dass die letzten katalytischen Schritte des Phenylpropanoid-Syntheseweges ausnahmslos auch im grünen Phänotyp hervorzurufen waren. Für einen experimentellen Ansatz, bei dem Anthocyane enthaltende Pflanzen mit grünen Genotypen unter Bedingungen verglichen werden sollen, die diesen Syntheseweg induzieren könnten, erwies sich die Verwendung dieses Varietätenpaares deshalb als unzureichend.

Aufgrund der vielfältigen molekularbiologischen Arbeiten mit der komplett sequenzierten Modellpflanze *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000) stehen mit den „transparent-testa“-Mutanten (*tt*) Phänotypen zu Verfügung, die dem experimentellen Ansatz gerecht werden. Eine Kombination aus dem Wildtyp *Landsberg erecta* (*ler*) und der Deletionsmutante *tt3*, bei der ein Fehlen der Dihydroflavonol-4-Reduktase die Bildung von Leucoanthocyanidinen verhindert (Abb. 1.2) und damit den weiteren Ablauf des Flavonoid-Biosyntheseweges zu den Anthocyanen als Endprodukt vorzeitig beendet, wurde ausgewählt, um im direkten Vergleich unter photooxidativen Bedingungen zwischen den möglichen Schutzmechanismen differenzieren zu können. Erweitert wurde der Ansatz durch die Verwendung der *tt7*-Mutante, die aufgrund der Deletion der Flavonoid-3'-Hydroxylase nicht mehr in der Lage ist, Quercetin und in

der Folge auch Cyanidin zu synthetisieren. Da Quercetin bedingt durch seine mit den Anthocyanen vergleichbare molekulare Struktur ebenfalls eine relativ hohe antioxidative Kapazität besitzt (Sughara et al. 1999), sollte in den Experimenten überprüft werden, ob das Fehlen der antioxidativen Wirkung der Anthocyane durch Quercetin kompensiert werden könnte bzw. ob sich die Abwesenheit von Quercetin auf die Entstehung von oxidativen Schäden auswirkt.

3.3.1 Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane in Blättern von *A. thaliana*

Zur Induktion der Anthocyan-Biosynthese wurden in einem ersten Schritt der Wildtyp (*ler*) und die beiden Deletionsmutanten (*tt3*, *tt7*) von *A. thaliana* unter einer Photonenflussdichte von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert. Nach etwa 4 Wochen erfolgte unter Beibehaltung der Lichtstärke die Behandlung der Pflanzen mit einer deutlich kühleren Umgebungstemperatur von $9 \text{ }^\circ\text{C}$. Durch Vorexperimente konnte beobachtet werden, dass eine gleichzeitige Verdopplung der Tageslänge von 8 auf 16 h die rote Pigmentierung im Wildtyp und in abgeschwächter Form auch in der *tt7*-Mutante maximierte.

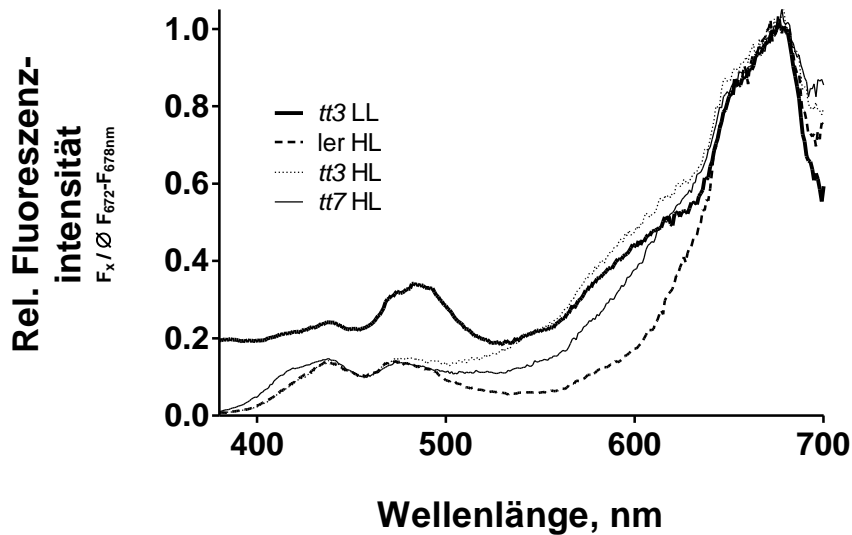


Abb. 3.19: Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (*ler*) und der Deletionsmutanten *tt3* und *tt7*. Die Blätter der anthocyanfreien *tt3*-Mutante entwickelten sich über 8 Wochen im Schwachlicht (LL) unter einer PPF von $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (8:16 h Licht-Dunkel-Zyklus) bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Ihre Spektren stellen die Referenz dar. Des Weiteren sind die Spektren von Blattproben der drei Vergleichspartner dargestellt, in denen die Behandlung mit Starklicht (HL) in kühler Umgebung die Flavonol- bzw. Anthocyanbiosynthese induzierte. Die Spektren wurden bei 672-678 nm normalisiert. Mittelwerte ($N = 5$)

Den Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren in Abb. 3.19 kann entnommen werden, dass die Behandlung der drei Genotypen mit einer verlängerten Tageslänge in kühler Umgebung ausgeprägte Veränderungen in den optischen Eigenschaften der Blätter hervorbrachte. Im Vergleich zur anthocyanfreien *tt3*-Mutante, die an Schwachlichtbedingungen (LL) bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$

Ergebnisse

akklimatisiert war und somit als Referenz diente, sank die Fluoreszenzausbeute durch das Wachstum im Starklicht (HL) bei 9 °C zwischen 400 und 480 nm deutlich. Alle drei Genotypen zeigten in diesem Spektralbereich, in dem neben Chlorophyll und den Anthocyanen vor allem Carotinoide absorbieren, nahezu identische Signalintensitäten. Ähnlich wie in den Anregungsspektren von *B. thunbergii* und *B. thunbergii atropurpurea* (Abb. 3.1 A) trennten sich anschließend infolge der Rotfärbung die Signalverläufe. Während die kombinierte Starklicht- und Kühle-Behandlung des *tt3*-Genotyps im Spektralbereich oberhalb von 520 nm keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle im Schwachlicht (LL) verursachte, wurden für den Wildtyp zwischen 480 und 640 nm maximale Fluoreszenzrückgänge und für die *tt7*-Mutante im Bereich von 480 bis 610 nm intermediäre Fluoreszenzeinbußen detektiert. Die Verwendung der *tt3*-Mutante als Referenz sowie deren Einbeziehung in die Behandlung erwiesen sich hinsichtlich der blattoptischen Veränderungen als vorteilhaft, da der Absorptionsbereich der Anthocyane damit *in situ* eindeutig abzugrenzen war.

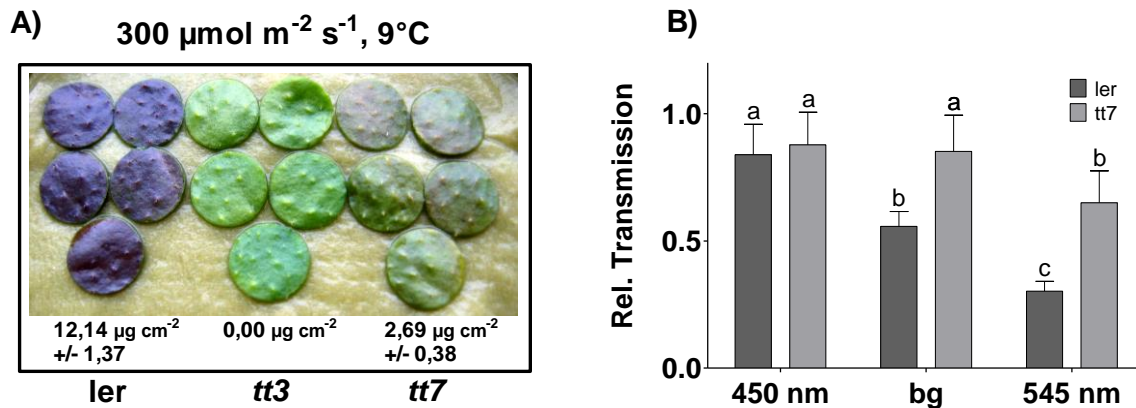


Abb. 3.20: A) Charakteristische Pigmentierung der Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (*ler*) und der beiden Deletionsmutanten (*tt3*, *tt7*), die in den folgenden Experimenten photooxidativem Stress ausgesetzt wurden. Die Anthocyanbildung im Wildtyp und in der *tt7*-Mutante war durch eine 2-wöchige Behandlung mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h Tageslänge) bei 9 °C induziert worden. Unter den Blattscheiben sind die mittleren Anthocyangehalte und deren Standardabweichungen angegeben. Der t-Test ergab höchst signifikante Unterschiede zwischen *ler* und *tt7*. N = 5 B) Relative Transmissionen für blaues (450 nm), blaugrünes (bg) und grünes (545 nm) Chlorophyllfluoreszenz induzierendes Anregungslicht in Blattscheiben von *ler* und *tt7*, die in Bezug zu den Fluoreszenzverhältnissen der anthocyanfreien *tt3*-Mutante, die als Referenz diente, berechnet wurden. Die Unterschiede wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni Post-hoc Test überprüft. N = 10, +SD

Aus der Abb. 3.20 A wird die Färbung der Blätter nach der Kühlebehandlung ersichtlich. Den deutlichsten Rückgängen in den Fluoreszenzausbeuten beim Wildtyp (Abb. 3.19) steht die höchste Konzentration von Anthocyanen gegenüber. Da die *tt7*-Mutante Kämpferol synthetisieren kann, könnte ihre abgeschwächte Rotfärbung auf die Einlagerung des Anthocyan Pelargonidin zurückzuführen sein. Die Konzentrationen der Vergleichspartner wurden für den aus dem Extraktionsverfahren resultierenden Wert der anthocyanfreien *tt3*-Referenz ($0,391 \mu\text{g cm}^{-2}$ für N = 5) korrigiert.

Basierend auf der Chlorophyllfluoreszenz sollte mit der Xe-PAM-Methode anschließend überprüft werden, ob sie als Standardmethode die Abschirmung der induzierten Anthocyane nicht nur in *B. thunbergii atropurpurea* sondern auch in *A. thaliana* erfasst. Da davon ausgegangen werden konnte, dass die *tt3*-Mutante in der Behandlung keine Anthocyane akkumulierte, wurden

die für diesen Genotyp ermittelten Fluoreszenzverhältnisse als Referenz benutzt. Für die Fluoreszenzverhältnisse, die sich für Anthocyane enthaltende Blätter des Wildtyps und der *tt7*-Mutante ergaben, standen dadurch Bezugswerte zur Verfügung, mit denen anschließend die relativen Transmissionen der verschiedenen Lichtqualitäten berechnet wurden.

Wie aus den Abb. 3.19 und 3.20 B hervorgeht, absorbierten die Anthocyane *in vivo* nur sehr wenig blaue Strahlung. Die Transmission für blaues Anregungslicht, das durch die Verwendung eines 450 nm Filters mit schmaler Bandbreite verfügbar war, sank in den roten Blättern des Wildtyps um etwa 16 % im Vergleich zur anthocyanfreien *tt3*-Mutante. Eine vergleichbare Abschirmung gegen Licht dieser Wellenlänge wurde mit den Fluoreszenzsignalen der *tt7*-Mutante berechnet. Eine Verringerung der Transmission um etwa 12 % beinhaltete dabei keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp, obwohl mit einem Gehalt von $3 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Abb. 3.20 A) im Vergleich zum Wildtyp nur ein Viertel der Menge an Anthocyanen gebildet wurde. Induzierte dagegen Strahlung mit einer Wellenlänge von 545 nm Chlorophyllfluoreszenz im Absorptionsmaximum der Anthocyane, zeigte sich für die verwendeten Wellenlängen in den Blättern von *A. thaliana* der größte Abschirmungseffekt. Etwa ein Drittel des eingestrahnten grünen Lichtes wurde im *tt7*-Genotyp abgeschirmt. Im Wildtyp stieg für diesen schmalen Spektralbereich der photosynthetisch aktiven Strahlung die Abschirmung auf 70 %. Breitbandiges blaues und grünes Licht wurde hingegen weniger absorbiert. Die Abschirmung lag hier zwischen beiden Extremen.

3.3.2 Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photoinhibition in Blättern von *A. thaliana*

In Abschnitt 3.3.1 konnte somit auch für Blätter von *A. thaliana* gezeigt werden, dass aufgrund der Absorption durch die sekundär gebildeten Anthocyane ein beachtenswerter Teil der photosynthetisch aktiven Strahlung nicht mehr für die Anregung von Chlorophyll in den Photosystemen zur Verfügung stand.

Unabhängig von ihrem Abschirmungseffekt oder der antioxidativen Kapazität stellt sich zunächst die Frage, ob die durch Kühle hervorgerufene Akkumulation von Anthocyanen eine photoprotektive Wirkung besitzen könnte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photoinhibition für die drei Genotypen erstellt. Dafür wurden Blattscheiben des Wildtyps und der beiden Mutanten über mehrere Stunden unterschiedlich hohen Photonenflussdichten ausgesetzt. Als Lichtquelle für die photosynthetisch aktive Strahlung kam eine Halogen-Metall dampflampe (HQI, Abb. 3.10) zum Einsatz. Die Verringerung der maximalen Quantenausbeute von PS II, erfasst als F_v / F_m -Wert, diente in Relation zu den Kontrollmessungen als Maß für die Inhibition der Photosysteme.

Die Starklichtexposition führte bei den drei Genotypen zu einer Abnahme der Effizienz, mit der im Photosystem II Elektronen umgesetzt wurden. Während unter einer Photonenflussdichte von $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei Abwesenheit von Lincomycin keine nennenswerten Differenzen auftraten, verursachten die höheren Photonenflussdichten signifikante Unterschiede. Die Photosysteme in der *tt7*-Mutante, die kein Quercetin bilden kann, zeigten die höchsten Inhibitionsraten, während der PS II-Elektronentransfer in den Blattproben des Wildtyps am geringsten beeinträchtigt war (Abb. 3.21 A). Das mittlere Inhibitionsniveau lag etwa 25 % unterhalb der Werte der anthocyanfreien *tt3*-Referenz. Die Rangfolge der drei Vergleichspartner war bis zu den höchsten PS II-Deaktivierungsraten unter einer PPFD von $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ konstant.

Um Differenzen in den Inhibitionsraten von PS II zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten auszuschließen, die aufgrund unterschiedlicher Reparatur dieses

Ergebnisse

Proteinkomplexes entstehen könnten, wurden in einem Parallel-Experiment die Blattscheiben vor der Starklichtexposition mit Lincomycin inkubiert. Lincomycin verhindert unter anderem die plastidäre Translation des D1-Proteins (Mueh Bachmann et al. 2004). Durch die Blockierung des Reparaturmechanismus von PS II kam es zu einem ausgeprägten Anstieg der Inhibitionsraten. Bereits bei einer Lichtstärke von $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war die Effizienz des Elektronentransfers im PS II der beiden Mutanten um etwa 60 % reduziert (Abb. 3.21 B).

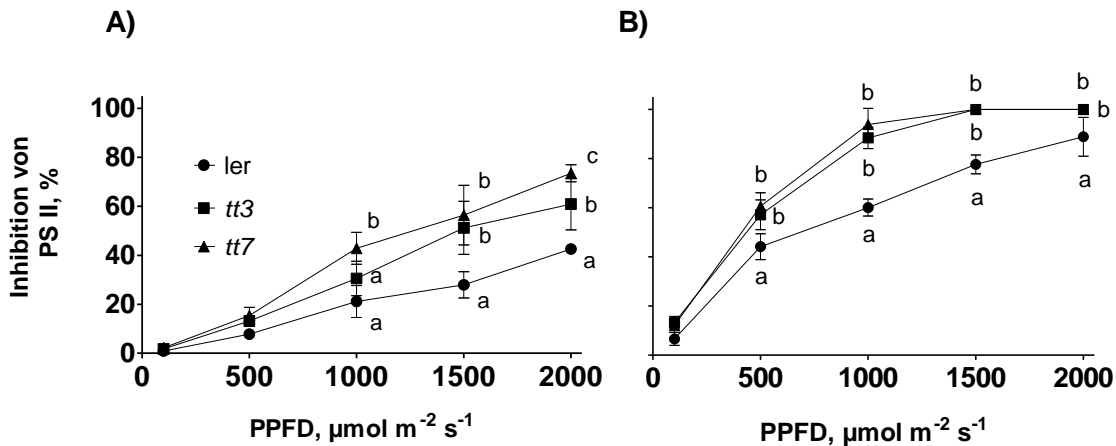


Abb. 3.21: Lichtfluss-Effekt-Kurven der Inhibition von Photosystem II in Blattscheiben des Wildtyps (*ler*) und der beiden Transparent-Testa-Mutanten (*tt3*, *tt7*), die zuvor A) mit D_2O oder B) mit einer 4 mM Lincomycinlösung unter einer schwachen PPFd ($4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) über 4 h inkubiert worden waren. Die Blattscheiben waren über 180 min den angegebenen Photonenflussdichten ausgesetzt. Als Strahlungsquelle diente eine Halogen-Metall-dampfampe (HQI). Die Photoinhibition von PS II ergab sich aus der Abnahme der maximalen Quantenausbeute gegenüber den jeweiligen Dunkelkontrollen umgerechnet in Prozent. Die Blattscheiben wurden auf 15-17 °C gekühlt. Die Unterschiede wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni Post-hoc Test überprüft. Mittelwerte ($N = 5$ je Lichtintensität), \pm SD

Nahezu identische Funktionsverluste zeigten die Mutanten auch bei den folgenden, höheren Photonenflussdichten, obwohl für die Anthocyane enthaltende *tt7*-Mutante gezeigt werden konnte, dass blaues und grünes Licht auch mit einem relativ geringen Anthocyanengehalt abgeschirmt wurden. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass unter Bestrahlung mit weißem Licht dieser Abschirmungseffekt für eine Verringerung der Inhibitionsrate nicht ausreichend war. Hingegen konnte für den Wildtyp bei jeder eingestrahlt Photonenflussdichte eine im Vergleich zu den Mutanten niedrigere Inhibitionsrate von PS II berechnet werden. Bei einer Photonenflussdichte von $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ trat mit einer um ein Drittel abgesenkten Inhibitionsrate der größte Unterschied auf (Abb. 3.21 B). Während in den Mutanten Photosystem II mit den beiden höchsten Lichtstärken vollständig deaktiviert wurde, zeigten die Photosysteme des Wildtyps weiterhin einen signifikanten wenn auch eingeschränkten Elektronentransfer. Die Daten lassen die Vermutung zu, dass in den Blättern des Wildtyps die Anwesenheit von Anthocyanen als Ursache für die geringere Photodeaktivierung von PS II angesehen werden kann.

3.3.3 Photoinhibition der *Arabidopsis*-Phänotypen mit verschiedenen Lichtqualitäten

Um zu überprüfen, ob sich nach der Behandlung der Proben mit dem gesamten photosynthetisch aktiven Spektrum die verminderte Inhibition von Photosystem II in den Blättern des Wildtyps tatsächlich auf die Abschirmung gegen grünes Licht als Ursache zurückführen ließ, wurden im folgenden Experiment Blattscheiben des Wildtyps und der „transparent-testa“-Mutanten verschiedenen Lichtqualitäten ausgesetzt. Der Reparaturzyklus von Photosystem II wurde in den Blattscheiben ebenfalls mit Lincomycin blockiert. Die zuvor erstellten Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren der drei Genotypen dienten im Bezug zur *tt3*-Referenz, die keine Anthocyane synthetisierte, der Berechnung von Transmissionsspektren für die Blätter des Wildtyps und der *tt7*-Mutante. Mit Hilfe der Spektren konnten jene kritischen Wellenlängenbereiche festgelegt werden, in denen einerseits der Abschirmungseffekt wirksam sein müsste oder in denen mangels Absorption seitens der Anthocyane vergleichbare Funktionsverluste auftreten sollten.

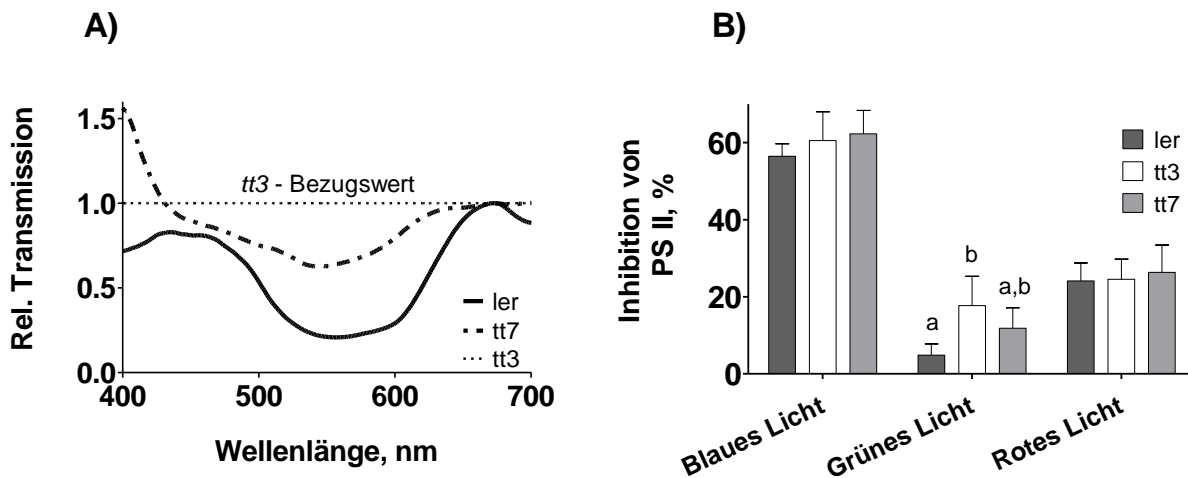


Abb. 3.22: A) Relative Transmissionsspektren für Blattscheiben des Wildtyps (*ler*) und der *tt7*-Mutante von *A. thaliana*, die eine durch Kühle und Starklicht induzierte Akkumulation von Anthocyanen aufwies. Berechnet wurden die Spektren auf der Grundlage von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren im Verhältnis zu Spektren der anthocyanfreien *tt3_{HL}*-Mutante (unter Starklicht kultiviert bei 9 °C). Mittelwerte (N = 10) B) Inhibitionsraten von Photosystem II in mit Lincomycin inkubierten Blattproben der drei *Arabidopsis*-Phänotypen aufgrund der Verwendung von blauer, grüner und roter Strahlung mit einer jeweiligen PPFD von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Starklichtexposition erfolgte über 300 min bei permanenter Kühlung der Blattscheiben. Die Inhibitionsrate wurde durch den Vergleich der F_v / F_m -Werte vor und nach der Behandlung ermittelt. Eine zwei-faktorielle ANOVA zusammen mit dem Bonferroni Post-hoc Test diente zur statistischen Analyse der Daten. Mittelwerte (N = 10 aus 2 Experimenten), +SD

Die Umrechnung der Daten aus Abb. 3.19 zeigte, dass Anthocyane in den Blättern des Wildtyps blaues Anregungslicht absorbierten und dessen Transmission im Vergleich zur *tt3*-Referenz um 20 % verringerten (Abb. 3.22 A). Als komplexer erwiesen sich die spektralen Verhältnisse in der *tt7*-Mutante. Im kurzwelligem blauen Bereich, bis etwa 430 nm, erreichten im Verhältnis zur *tt3*-Mutante bis zu 50 % mehr Photonen das Mesophyll. Möglicherweise lag das an der fehlenden Absorption von kurzwelligem Blaulicht durch Flavonole (Havaux und Kloppstech 2001). Im anschließenden Abschnitt bis etwa 470 nm war ein Viertel der Anthocyankonzentration des Wildtyps ausreichend, um im gleichen Maße abschirmen zu können. Pelargonidin-Glycosid in

den Blättern der *tt7*-Mutante könnte an diesem Effekt beteiligt sein, da dieses Pigment blaues Licht besser absorbiert als Cyanidin-Glycosid (Andersen et al. 2004). Die Anthocyane können aber wahrscheinlich nicht als einzige Ursache für die geringere Transmission angesehen werden. Unter Umständen verursachte eine kompensatorische Absorption von Strahlung durch die Carotinoide eine Angleichung der Transmissionswerte zwischen dem Wildtyp und der *tt7*-Mutante. Ab 470 nm bis etwa 620 nm wurden für die beiden Genotypen die stärksten Fluoreszenzeinbußen detektiert. Angesichts der Transmissionsspektren kamen für die Experimente zur Photoinhibition diverse Filter zum Einsatz, und zwar solche, die entweder bis etwa 470 nm blaue Strahlung passieren lassen, die von 510 nm bis 590 nm ihr spektrales Fenster besitzen oder die für rote Strahlung oberhalb von 645 nm durchlässig sind.

Blaues Licht inhibierte PS II, dessen Reparaturzyklus mit Lincomycin gehemmt war, in den Blattscheiben der drei Genotypen in gleichem Maße (Abb. 3.22 B). Die maximale Quantenausbeute lag nach der Behandlung etwa 60 % unterhalb des Ausgangswertes. Eine Bestrahlung mit rotem Licht rief ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten hervor. Im Gegensatz zu blauer Strahlung war die Deaktivierung von PS II aber nur halb so stark, obwohl bei allen Wellenlängenbereichen die gleichen Photonenflussdichten benutzt worden waren. Die Behandlung der Blattscheiben mit grünem Licht hatte bei den Genotypen unterschiedlich hohe Inhibitionsraten zur Folge. Während die Deaktivierung von PS II in den Blattscheiben der grünen *tt3*-Mutante mit etwa 18 % ähnlich hoch ausfiel wie bei der Verwendung von rotem Licht, sank die Inhibitionsrate von *tt7*-Blattscheiben auf 12 %. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz stellte dieser Unterschied jedoch keine Abweichung dar. Als in hohem Maße auffällig hingegen kann die geringe Deaktivierung von PS II in den roten Blättern des Wildtyps angesehen werden. Die PS II-Quantenausbeute war nur zu etwa 5 % eingeschränkt. Der nahezu ausgebliebene Funktionsverlust von Photosystem II kann als starker Hinweis darauf bewertet werden, dass im Vergleich mit der *tt3*-Mutante Anthocyane durch ihre *in vivo* nachgewiesene Absorption von grünem Licht die Absenkung der Inhibitionsrate um 75 % verursacht haben.

3.3.4 Effektive photosynthetische Photonenflussdichten in Blättern des *Arabidopsis*-Wildtyps und der transparent testa-Mutanten

Zur Beurteilung der schützenden Wirkung von Anthocyanen vor der PS II-Inhibition ist es hilfreich, unter Einbeziehung ihrer abschirmenden Wirkung die Photonenflussdichten zu berechnen, die tatsächlich in den Blättern der verschiedenen Genotypen wirksam waren. Wie bereits im Methodenteil und in der Anwendung für die *Berberis*-Phänotypen dargestellt wurde, ergab sich die effektive Photonenflussdichte, wenn die jeweiligen Emissionsspektren der Lichtquellen mit dem Transmissionsspektren der Genotypen, die aus dem Bezug zur *tt3*-Referenz resultierten, multipliziert wurden. Das Integrieren der Spektren ergab schließlich die effektive Photonenflussdichte.

Die Berechnungen zeigten, dass beispielsweise für die Blätter der *tt7*-Mutante im Weisslicht eine Abschirmung von ca. 18 % bestand (Abb. 3.23 A, Tab. 3.3), die jedoch wirkungslos blieb (Abb. 3.21 A und B). Wesentlich umfangreicher war die Abschirmung des Weisslichtes in den roten Blättern des Wildtyps. Im Vergleich zu den Blattscheiben der *tt3*-Mutante erreichte mit etwa 47 % nur die Hälfte der von der Halogenlampe emittierten Photonen das Mesophyll (Abb. 3.23 A, Tab. 3.3). Zwar verringerte dieser Effekt die Deaktivierung von PS II in signifikanter Weise, jedoch blieben die Inhibitionsraten mit 25-30 % (Abb. 3.21 A und B)

Ergebnisse

deutlich unter dem Niveau, das sich aus der Abschirmung ergeben könnte. Den dargestellten Zusammenhängen liegt wahrscheinlich die spektrale Abhängigkeit der Photoinhibition zugrunde. Blaues Licht inhibierte stärker als grünes und wurde weniger abgeschirmt (Abb. 3.22 A und B).

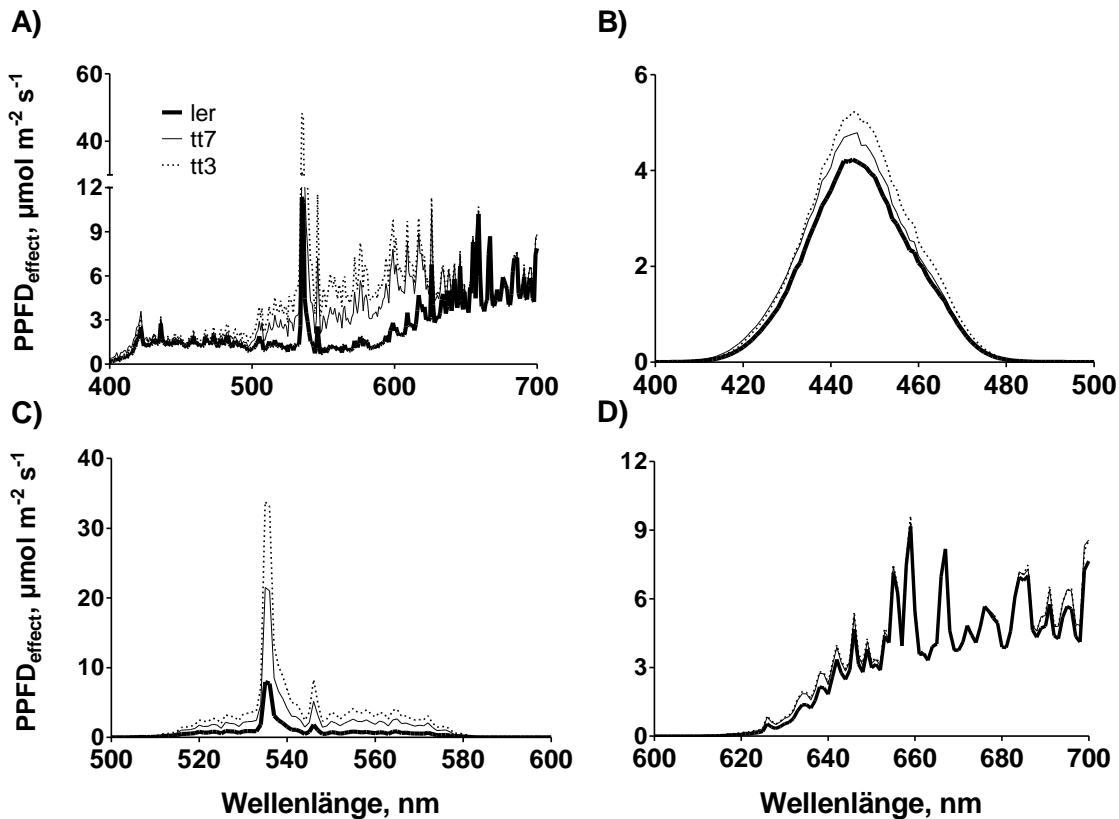


Abb. 3.23: Spektren der Photonenflussdichten, die bei der Inhibition von PS II in den Blättern des Wildtyps und der beiden Deletionsmutanten wirksam waren. A) Halogen-Metall dampflampe (HQI) B) Blaues Licht, erzeugt durch die Kombination von weißen LEDs mit einem dichroitischen Blaufilter. C) Grünes Licht, HQI-Lampe mit dichroitischem Grünfilter. D) Rotes Licht, HQI-Lampe mit einem RG 645 nm Longpass-Filter. Die zur Berechnung der effektiven Photonenflussdichten benutzten Transmissionsspektren der drei bei Starklicht ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 9°C) angezogenen Genotypen wurden in Referenz zu den Anregungsspektren einer bei Schwachlicht kultivierten *tt3*-Mutante erstellt (N = 5). Mittelwerte für *tt3* (N = 5), für *ler* und *tt7* (N = 10)

Um den Schutz vor Photoinhibition durch die Abschirmung der Anthocyane belegen zu können, wurden für die in Abb. 3.22 B verwendeten Lichtqualitäten die effektiven Photonenflussdichten ermittelt. Für die korrekte Berechnung der Abschirmung erschien es notwendig, bereits jenen Effekt zu berücksichtigen, der sich aus der Behandlung der *tt3*-Referenzpflanzen mit Kühle und Starklicht ergab. Die effektiven Photonenflussdichten in Tabelle 3.2 weisen zunächst darauf hin, dass in den Blättern der *tt3*-Referenz vor allem eine Abschirmung gegen blaues Licht induziert wurde.

Ergebnisse

Tabelle 3.2: Effektive Photonendichten ($PPFD_{\text{effect}}$) unterschiedlicher Lichtqualitäten sowie der Abschirmungseffekt (ASE) gegen diese in Blättern der *tt3*-Mutante (*tt3_{HL}*), nachdem die unter Standardbedingungen kultivierten Pflanzen über 14 Tage einer $PPFD$ von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 9°C ausgesetzt waren. Als Referenz dienten Blätter der *tt3*-Mutante (*tt3_{LL}*), die sich über 4 Wochen unter Schwachlichtbedingungen ($PPFD = 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 21°C entwickelt hatten. Blaufilter – DtBlue, Grünfilter – DtGreen, Rotfilter – RG 645

Strahlungsquelle	$PPFD_{\text{ext}} =$ $PPFD_{\text{eff}}$ für <i>tt3_{LL}</i> in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$PPFD_{\text{eff}}$ für <i>tt3_{HL}</i> in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ASE in %
HQI-Lampe (weißes Licht)	1500	1300,3	13,4
Weißlicht-LED + Blaufilter (blaues Licht)	300	149,4	50,4
HQI-Lampe + Grünfilter (grünes Licht)	300	288,1	4
HQI-Lampe + Rotfilter (rotes Licht)	300	325,3	-8,3

Tabelle 3.3: Effektive Photonendichten ($PPFD_{\text{effect}}$) unterschiedlicher Lichtqualitäten sowie der Abschirmungseffekt (ASE) gegen diese in Blättern von Starklichtpflanzen des Wildtyps von *A. thaliana* (*ler_{HL}*) und der *tt7*-Mutante (*tt7_{HL}*). Als Referenz dienten Blätter der *tt3*-Mutante (*tt3_{HL}*), die ebenfalls mit Starklicht bei Kühle behandelt wurden. Lampen und Filterkombinationen wie unter Tab. 3.2

Strahlungsquelle	$PPFD_{\text{eff}}$ für <i>tt3_{HL}</i> in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$PPFD_{\text{eff}}$ für <i>ler_{HL}</i> in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ASE in %	$PPFD_{\text{eff}}$ für <i>tt7_{HL}</i> in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	ASE in %
HQI-Lampe (weißes Licht)	1300,3	688,9	47,1	1073,4	17,5
Weißlicht-LED + Blaufilter (blaues Licht)	149,4	121,3	18,8	137,8	8,1
HQI-Lampe + Grünfilter (grünes Licht)	288,1	68,69	76,4	186,6	35,5
HQI-Lampe + Rotfilter (rotes Licht)	325,3	299,8	8	321,4	1,3

Sie lag bei etwa 50 %, wenn *tt3*-Pflanzen, die unter Schwachlichtbedingungen kultiviert worden waren, den Bezugswert lieferten. In den Blättern des Wildtyps und der *tt7*-Mutante nahm im Verhältnis zu den *tt3_{HL}*-Blättern der Abschirmungseffekt (ASE) nur geringfügig zu. Das Integrieren der Spektren in Abbildung 3.23 B ergab für den Wildtyp und die *tt7*-Mutante eine Verringerung der wirksamen Strahlungsmenge von blauem Licht um 18 bzw. um 9 % (Tab. 3.3). Allerdings wiesen die drei Genotypen in diesem Spektralbereich eine übereinstimmende Inhibition von PS II auf (Abb. 3.22 B). Als sehr umfangreich kann hingegen der Abschirmungseffekt der Anthocyane gegenüber grüner Strahlung angesehen werden. In den Blättern des Wildtyps und der *tt7*-Mutante wurden 76 bzw. 36 % des auftreffenden Lichtes abgeschirmt (Tab

Ergebnisse

3.3). Nur in diesem Spektralbereich traten im Experiment zur Photoinhibition Unterschiede zwischen den drei Genotypen auf (Abb. 3.22 B).

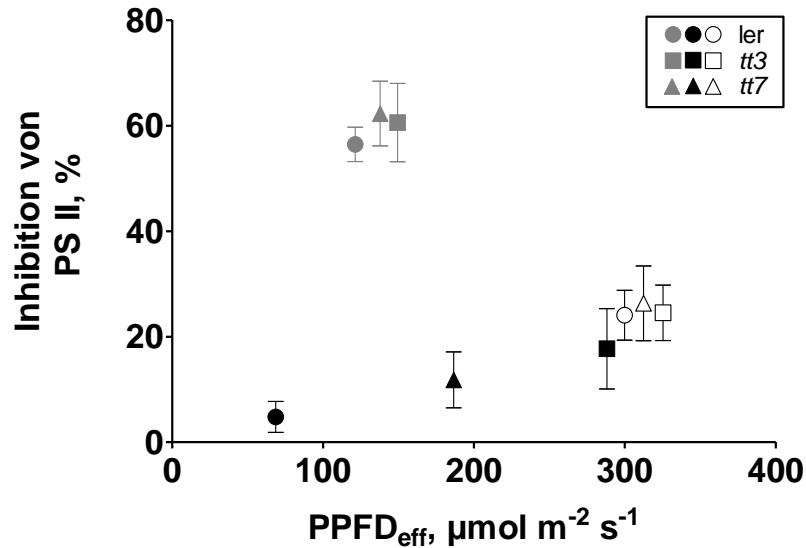


Abbildung 3.24: Photodeaktivierung von PS II in Blättern des Wildtyps von *A. thaliana* und der Deletionsmutanten *tt3* und *tt7* in Abhängigkeit von der effektiven Photonenflussdichte. Die Darstellung basiert auf der Gegenüberstellung der Daten aus Abbildung 3.22 B und der Tabelle 3.3. Dabei entsprechen die grauen Symbole der Behandlung mit blauem Licht, die schwarzen Zeichen der Bestrahlung mit grünem Licht und die offenen Symbole der Photodeaktivierung mit rotem Licht. N = 10 (zusammengesetzt aus 2 Experimenten), +SD

In Abb. 3.24 wird die Photodeaktivierung von PS II mit der effektiven Photonenflussdichte verglichen. Wenn die wirksame Lichtstärke die Photoinhibition bestimmen würde, sollte ein linearer Zusammenhang zwischen beiden auftreten. Für grüne Strahlung konnte diese Relation bestätigt werden. Die Werte der durch rotes Licht hervorgerufenen Photodeaktivierung setzten diese Beziehung fort. Im Kontrast dazu liegen die Werte der durch blaue Strahlung induzierten Photoinhibition deutlich darüber. Obwohl die effektive Photonenflussdichte des blauen Lichtes sich als nur halb so hoch erwies wie die des roten Lichtes, war die Photoinhibition im Blaulicht doppelt so hoch. Offenbar war die Quantenausbeute der Photoinhibition im blauen Spektralbereich deutlich erhöht.

3.3.5 Niedrigmolekulare antioxidative Kapazität von Blattextrakten der *Arabidopsis*-Genotypen

Neben der Abschirmung von sichtbarem Licht könnten Anthocyane das Ausmaß der Inhibition von PS II auch durch ihre antioxidative Wirkung reduzieren (Abschn. 1.4.2 und 1.4.3). Um zu überprüfen, ob die Akkumulation von Anthocyanen in den Blättern des Wildtyps überhaupt ein erhöhtes antioxidatives Potential darstellte, wurden *in vitro* von Blattextrakten des Wildtyps und der beiden transparent testa Mutanten die niedrigmolekularen antioxidativen Kapazitäten bestimmt (Tac-Assay, Saleh und Plieth 2010).

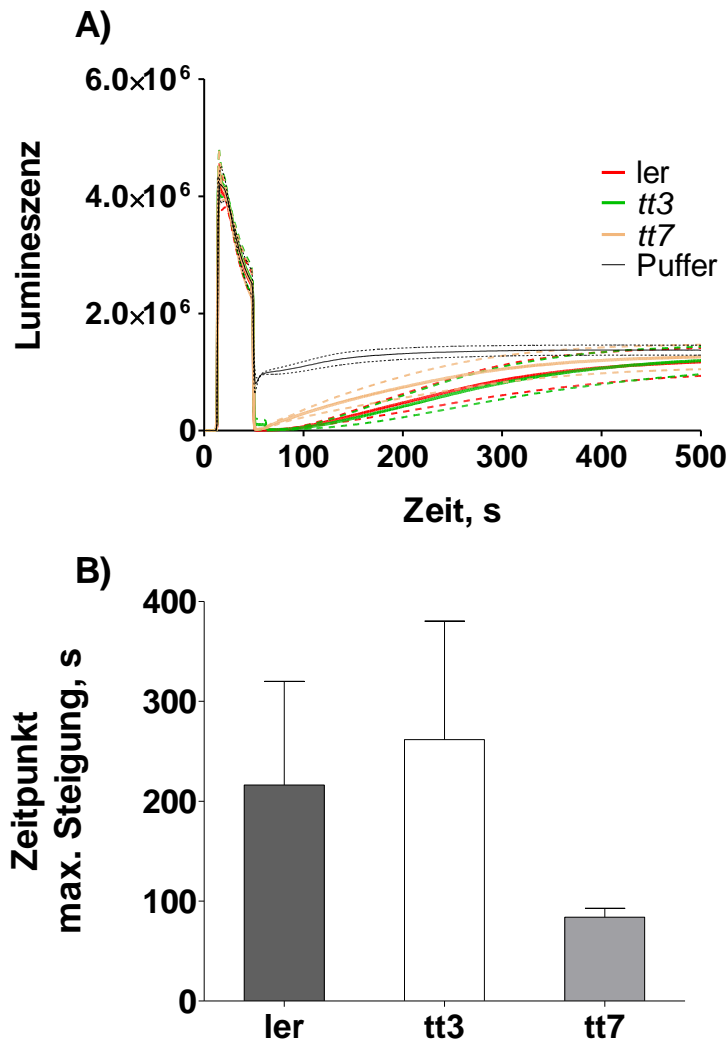


Abb. 3.25: Vergleich der antioxidativen Kapazitäten von Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) und der Deletionsmutanten *tt3* und *tt7* bestimmt mit dem Tac-Assay für niedrigmolekulare Substanzen. A) Intensität der Lumineszenz des Luminol-Peroxidase-Systems in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 50 s wurden 500 μ l des jeweiligen Blattextraktes bzw. der Pufferkontrolle in das Detektionssystem injiziert. Mittelwerte für N = 3 mit jeweils 4-10 technischen Wiederholungen, +/- SEM B) Zeitpunkte im exponentiell ansteigenden Abschnitt der Signalverläufe von 3.26 A, an denen die reduzierende Wirkung der Blattextrakte nachließ und dadurch den höchsten Signalanstieg der wiedereinsetzenden Lumineszenz verursachte. Die Daten wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA überprüft. N = 3, +SD

In diesem Test entstehen mit der Oxidation aromatischer Verbindungen durch die Meerrettich-Peroxidase Luminolradikale, die oxidiert durch H_2O_2 als angeregte Aminophtalate blaues Licht emittieren. Wird ein Extrakt dazu gegeben, der antioxidativ wirksame Substanzen enthält, reduzieren die Verbindungen die Luminolradikale und die Lichtemission wird unterbunden. Ist die antioxidative Kapazität eines Extraktes erschöpft, emittiert das Luminol-Peroxidase-System erneut Photonen. Als Maß für die antioxidative Wirkung wird dabei die Dauer der Verzögerung dieser Emission angesehen.

Die Zugabe der Blattextrakte rief eine starke Erniedrigung der Lumineszenz hervor, die nach einigen Minuten wieder nachließ (Abb. 3.25 A). Aus dem Vergleich der Daten lässt sich entnehmen, dass der Anthocyane enthaltende Extrakt aus den Blättern des Wildtyps in gleichem Maße Luminol-Radikale reduzierte wie der Extrakt der grünen *tt3*-Mutante. Beide Genotypen zeigten bei den Lumineszenzintensitäten von Beginn der Messung nahezu übereinstimmende Signalverläufe. Quantitativ bestätigt wurde das vergleichbare Reaktionsverhalten durch die Gegenüberstellung der Zeitpunkte, an denen mit dem maximalen Wiedereinsetzen der Lumineszenz die antioxidative Wirkung deutlich nachließ. Nach ca. 220 und 250 s stellten sich untereinander vergleichbare Lichtemissionen ein (Abb. 3.25 B), die in etwa dem 50 %-Wert der Pufferkontrolle entsprachen. Hingegen folgte der Injektion des *tt7*-Blattextraktes ein abweichender Signalverlauf. Die maximale Reduktionskapazität gegenüber den Luminol-Radikalen war bereits früher erschöpft als in den beiden Vergleichspartnern. Erst ab 180 s konnte mit den überlagernden Fehlerbereichen (Abb. 3.25 A) von gleichen antioxidativen Wirkungspotentialen der drei Genotypen ausgegangen werden. Die Berechnungen ergaben, dass die reduzierende Wirkung des Blattextraktes ausreichte, die Emission der Photonen aus der Luminol-Peroxidase-Reaktion für ca. 100 s zu unterbinden (Abb. 3.25 B). Mit der statistischen Analyse wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.3.6 Induktion von photooxidativen Bedingungen in Blattproben des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) und dessen Deletionsmutanten (*tt3*, *tt7*)

Unabhängig davon, welcher Prozess in den Experimenten zur Inhibition von Photosystem II letztendlich den Elektronentransport im Komplex eingeschränkt hat, ist es sehr wahrscheinlich, dass photoaktivierte Chlorophyll- und/oder Sauerstoffmoleküle maßgeblich an der oxidativen Deaktivierung von PS II beteiligt waren. Insbesondere angeregtes Chlorophyll, Singulett-Sauerstoff im $^1\text{D}_g$ -Zustand und OH-Radikale besitzen eine hohe Reaktivität und interagieren mit ihrer unmittelbaren Umgebung (Abschnitt 1.3.1, 1.3.2 und 1.4.1). Auch Superoxidanionen können Membranen nicht passieren (Song et al. 2006). Es ist daher fragwürdig, ob aufgrund der räumlichen Diskrepanz zwischen dem Entstehungsort der oxidativ wirksamen Molekülzustände in den Thylakoiden und den Quercetin-Derivaten bzw. den vakuolär vorliegenden Anthocyanen die antioxidative Wirkung der beiden Verbindungen überhaupt relevant ist. Einzig das mobile Wasserstoffperoxid könnte den Reaktionsradius der Polyphenole erreichen. Deshalb wurden in den folgenden Experimenten durch die Inkubation der Blattscheiben mit Methylviologen gezielt Bedingungen geschaffen, bei denen H_2O_2 gebildet wurde

Um die photoprotektive Funktion der Anthocyane und des Quercetins zu testen, die sich allein aus der antioxidativen Kapazität ergeben müsste, wurden die Blattscheiben der drei Genotypen mit Lincomycin, mit Methylviologen oder mit einer Kombination aus beiden Substanzen inkubiert. Die Induktion von photooxidativem Stress erfolgte anschließend durch eine

Behandlung der Blattscheiben mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ über mehrere Stunden (Abb. 3.26 A). Dabei kam rotes Licht mit Wellenlängen oberhalb von 645 nm zur Anwendung. Es sollte dadurch sichergestellt werden, dass die durch Anthocyane hervorgerufene Abschirmung für die photooxidative Deaktivierung von Photosystem II wirkungslos blieb. Während rotes Licht mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Photosystem II in den Blattproben der drei Genotypen, die zur Kontrolle mit destilliertem Wasser inkubiert waren, nur geringfügig deaktiviert (Abb. 3.26 A), verdoppelte die Blockierung der Neusynthese von PS II durch Lincomycin die Inhibitionsraten auf 15 bis 17 %.

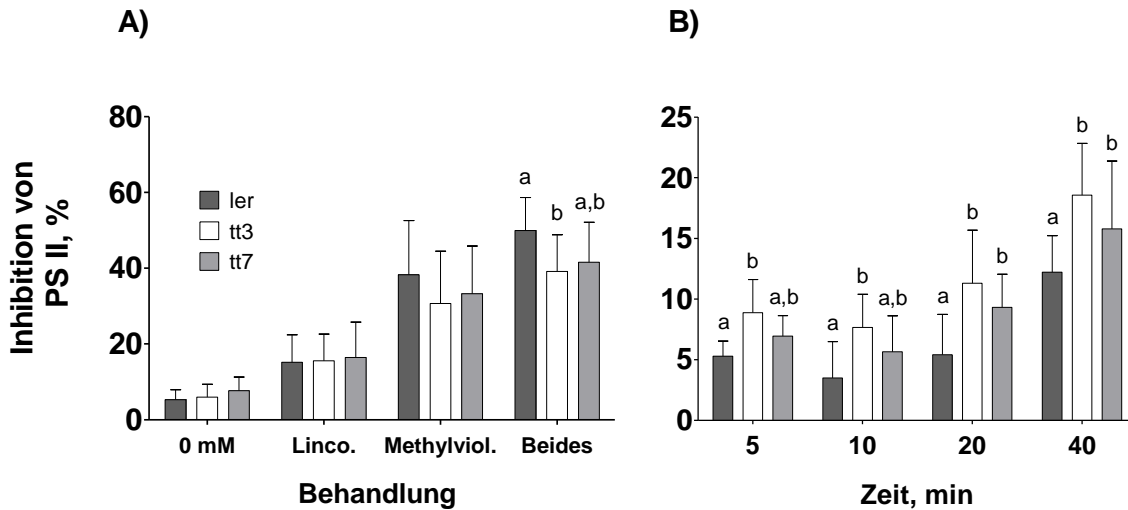


Abb. 3.26: Inhibitionsraten von Photosystem II in Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) und der beiden Deletionsmutanten *tt3* und *tt7* verursacht durch photooxidativen Stress. A) Nach der Inkubation mit $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ (0 mM), 4 mM Lincomycin (Linco.), 100 μM Methylviologen (Methylviol.) und beiden Reagenzien unter Weißlicht mit einer PPFD von $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (240 min) erfolgte über 240 min die Behandlung mit rotem Licht ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mit Wellenlängen oberhalb von 645 nm. B) Zeitreihe der Photoinhibition in den Blattproben der drei Genotypen, die bei gleichen Bedingungen wie unter A mit 4 mM Lincomycin und 100 μM Methylviologen inkubiert wurden. Danach waren die Blattscheiben ebenfalls roter Strahlung oberhalb von 645 nm mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt. Die Unterschiede wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA in Verbindung mit dem Bonferroni-Post-hoc Test geprüft und sind für die einzelnen Behandlungen oder die einzelnen Zeitpunkte dargestellt worden. N = 15 aus 3 unabhängigen Experimenten, +SD

Interessanterweise verstärkte die durch Methylviologen gezielt hervorgerufene Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies am PS I die Inhibition von PS II in den Blättern des Wildtyps und der beiden Mutanten. Bei einem intakten D1-Reparaturzyklus verdoppelte sich hier die Deaktivierungsrate. Eine Kombination der beiden Wirkstoffe rief erwartungsgemäß eine weitere Zunahme der Inhibitionsraten hervor, die aber etwa 10-20 % unterhalb der Werte lagen, die sich aus der Addition der jeweiligen Einzeleffekte ergeben würden. Entgegen der Vermutung zeigten der Wildtyp und die *tt7*-Mutante unter diesen Bedingungen die höchsten PS II-Funktionsverluste.

Wie bereits der Abb. 3.25 A entnommen werden konnte, verbraucht sich die Wirkung von Antioxidantien mit der Zeit. Aufgrund der mehrstündigen Konfrontation der Blattproben mit photooxidativen Bedingungen, ergab sich deshalb die Vermutung, dass die antioxidative Wirkung von Anthocyanen und Quercetin deutlich vor Ende der Behandlung erschöpft gewesen sein könnte.

Darum wurden Zeitreihen der Inhibition von PS II durch photooxidativen Stress erstellt. Wie aus der Abbildung 3.26 B hervorgeht, führte die photoinhibierende Behandlung in den mit Lincomycin und Methylviologen inkubierten Blattscheiben dazu, dass bereits nach 5 min in den grünen Blattscheiben der *tt3*-Mutante der Funktionsverlust von PS II im Verhältnis zum Wildtyp ein signifikant höheres Ausmaß annahm. Mit steigender Behandlungsdauer zeigten auch die Quercetin-freien Blattproben der *tt7*-Mutante gegenüber dem Wildtyp signifikant höhere Funktionsverluste in Photosystem II.

Die Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass Anthocyane in den Blättern des Wildtyps unter photooxidativen Bedingungen einen abschirmungsfreien Schutzeffekt besitzen, der im Vergleich zu den grünen Blättern der *tt3*-Mutante die Deaktivierung von Photosystem II maßgeblich verringerte. Unklar bleibt hingegen der Umfang der Beteiligung von Quercetin an dieser Schutzwirkung, da anzunehmen ist, dass in den Blättern der *tt7*-Mutante aus Dihydrokämpferol wahrscheinlich das zu den Anthocyanen zählende Pelargonidin, das nur eine Hydroxygruppe am B-Ring besitzt, entstanden ist und somit das fehlende Reduktionspotential von Quercetin teilweise kompensiert wurde.

3.3.7 Differenzierung zwischen dem Abschirmungseffekt der Anthocyane und deren antioxidativer Wirkung bei der photooxidativen Deaktivierung von PS II

Die Resultate aus den unterschiedlichen Inhibitionsexperimenten deuten darauf hin, dass der Lichtschutz der Anthocyane auf einem dualen Wirkungsprinzip basieren könnte. Eine geringere Inhibition von Photosystem II in den Blattscheiben des Wildtyps wirft die Frage auf, wie hoch die relativen Anteile der Abschirmung und der antioxidativen Kapazität am Schutz von PS II sind.

Um eine mögliche Wirkungsverteilung ermitteln zu können, wurden Blattscheiben der drei Genotypen mit Lincomycin und Methylviologen bei Schwachlicht inkubiert und anschließend über 40 min grüner Strahlung mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt und die resultierende PS II-Inhibition mit der durch Rotlicht induzierten verglichen (40 min-Behandlung in Abb. 3.26 B). Die Verwendung von grünem Licht mit einer eingestrahelten Photonenflussdichte von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ führte in den Blattproben des Wildtyps zu einer tendenziell bzw. zu einer signifikant geringeren Deaktivierung von PS II als in den Blättern der Mutanten (Abb. 3.27 A). Jedoch war es nicht möglich, zwischen dem Abschirmungseffekt und einer antioxidativen Wirkung zu unterscheiden. So deaktivierte rote Strahlung in den Anthocyane enthaltenden Blättern des Wildtyps Photosystem II in gleichem Maße. Überraschenderweise manifestierte sich unter grünem Licht in den Blattproben des *tt7*-Phänotyps mit etwas über 15 % sogar das ausgeprägteste Schadensniveau, obwohl im Mesophyll mit den Anthocyanen ebenfalls ein Pigmentschirm, wenn auch in abgeschwächter Form, vorlag. Die Diskrepanz zwischen den Erwartungen und den Resultaten wird deutlicher, wenn die Inhibition von PS II im Kontext der effektiven Photonenflussdichten betrachtet wird. Die Berechnungen ergaben exemplarisch für die Blattproben des Wildtyps, dass unter grünem Licht mit $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ weniger als ein Drittel der auftreffenden PPFD die Chloroplasten erreichte und zur Deaktivierung von PS II führte. Da eine Verdreifachung der effektiven Photonenflussdichte durch die Verwendung von rotem Licht kaum nennenswerte Unterschiede im PS II-Schadensniveau hervorbrachte, deutete sich eine Sättigung der photooxidativen Bedingungen an.

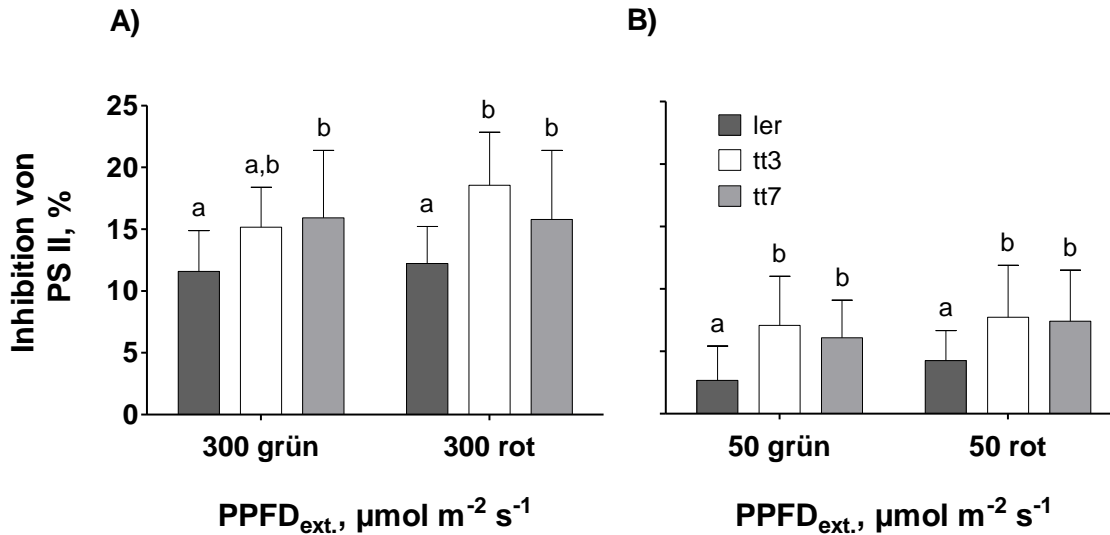


Abb. 3.27: Inhibitionsraten von Photosystem II in Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) und der beiden Deletionsmutanten *tt3* und *tt7* verursacht durch photooxidativen Stress. A) Nach der Inkubation mit 4 mM Lincomycin und 100 μM Methylviologen unter Weißlicht mit einer PPFD von $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (240 min) erfolgte die Behandlung mit grünem Licht (PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) über 40 min. Die Resultate wurden denen aus Abb. 3.27 B gegenübergestellt. B) Induktion photooxidativer Bedingungen in den Blattproben durch grünes und rotes Licht mit Photonenflussdichten von $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei gleichen Voraussetzungen wie unter A). Die Daten wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA in Kombination mit dem Bonferroni-Post-hoc Test auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Für A) $N = 15$ (zusammengesetzt aus 3 Experimenten), +SD, Für B) $N = 45$ (zusammengesetzt aus 3 Experimenten), +SD

Um eine mögliche Lichtsättigung des Reduktionsweges über Methylviologen zum Sauerstoff zu verhindern, wurde die eingestrahelte Photonenflussdichte reduziert. Sowohl grüne als auch rote Strahlung mit einer externen Photonenflussdichte von $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bewirkten in den Blättern der Mutanten eine ausgeprägtere Deaktivierung von PS II als in den Blattproben des Wildtyps. Mit einem Absinken der PS II-Deaktivierung um ca. 46 % in Relation zur *tt3*-Mutante unter rotem Licht stellte sich in den Blattscheiben des Wildtyps ein signifikant niedrigeres Niveau ein (Abb. 3.27 B). Unter diesen Lichtbedingungen konnte eine antioxidative Wirkung der Anthocyane gegenüber den reaktiven Sauerstoffspezies als in hohem Maße wahrscheinlich angesehen werden. Hingegen bewirkte das Fehlen von Quercetin im *tt7*-Genotyp keine höhere Schädigung.

Mit den geringen Photonenflussdichten des grünen Spektralbereiches sollte sich neben der antioxidativen Wirkung der Anthocyane auch der gleichzeitig auftretende Schutz durch die Abschirmung darstellen lassen. In den Blattproben der *tt7*-Mutante war im Vergleich zur *tt3*-Mutante die Stärke des auftretenden Grünlichtes von $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf eine effektive PPFD von $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ abgesenkt. Die Abschirmung verursachte eine Verringerung des relativen PS II-Funktionsverlustes von 94 % auf 86 %, die jedoch nach statistischer Überprüfung nur als tendenzieller Unterschied in Erscheinung trat (Abb. 3.27 B). Die relativ hohe Anthocyankonzentration in den Blättern des Wildtyps verringerte dagegen die auftretende Lichtmenge sogar um 70 % auf ein wirksames Maß von $12,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und vergrößerte erwartungsgemäß mit einem um 62 % abgesenkten Schadensniveau den Unterschied zur *tt3*-Mutante bei der Bestrahlung mit grünem Licht. Als aufschlussreich erwies sich der Vergleich von

photoinhibierten Blättern des Wildtyps aus beiden Lichtbedingungen. Bei photooxidativem Stress konnten Anthocyane zusätzlich zur Halbierung der Inhibitionsraten durch ihre antioxidative Wirkung das PS II-Schadensniveau nochmals um nahezu 40 % absenken, wenn wie bei der Konfrontation der Blattproben mit grünem Licht auch die optische Abschirmung eine Rolle spielte (Abb. 3.27 B).

3.3.8 Vergleich ausgewählter antioxidativer Schutzsysteme in den Blättern der *Arabidopsis*-Genotypen

Um entscheiden zu können, ob mögliche Abweichungen in anderen antioxidativen Systemen die beobachteten Unterschiede zwischen den Genotypen hervorriefen, und so eine potentielle Wirkung von Anthocyanen überdeckten, wurde das in den Blättern der drei Genotypen konstitutiv etablierte antioxidative Schutzsystem exemplarisch miteinander verglichen. Bei den Analysen standen niedrigmolekulare Komponenten des lipophilen und des hydrophilen Systems bzw. Vertreter des höhermolekularen enzymatischen Systems im Mittelpunkt, die jeweils in der Lage sind, die Wirkung von Superoxid bzw. Wasserstoffperoxid und die ihrer Reaktionsprodukte zu neutralisieren. Zunächst wurden deshalb mit Hilfe von HPLC-Analytik in den Blattextrakten die Gehalte von Tocopherolen und die Konzentrationen von Flavonoiden bestimmt, die jeweils lipo- bzw. hydrophile niedermolekulare Antioxidantien repräsentieren und im Fall der Flavonoide auch Reduktionsmittel der Guajacol-Peroxidasen darstellen. Weiterhin wurde die Aktivität der Superoxiddismutase ermittelt, um einen Anhaltspunkt für den Umfang der enzymatischen Detoxifizierung von Superoxid zu erhalten. Der folgende Schritt in der enzymatischen Entgiftung von ROS wurde durch die Aktivitätsbestimmung der Ascorbat-Peroxidase abgedeckt. Die Gehalte der beiden Hauptgruppen von Flavonoiden, die Blattkonzentrationen von Kämpferol- und Quercetinglykosiden, sind zusammen mit denen der Hydroxyzimtsäurederivate (HCA's) in Abb. 3.28 A dargestellt. Einerseits synthetisierten die drei Genotypen Hydroxyzimtsäuren, deren niedriges Redoxpotential beispielsweise die Detoxifizierung von Superoxidradikalen zuließe (Lin et al. 1998), in gleichem Maße. Zum anderen konnten beim Kämpferol, dessen Vermögen zur Reduzierung von DPPH-Radikalen *in vitro* nachgewiesen wurde (Villano et al. 2007), signifikante Unterschiede festgestellt werden. Eine Kühlebehandlung der Pflanzen mit einer auf 9 °C abgesenkten Temperatur in Kombination mit einer verlängerten Lichtperiode induzierte in den Blättern der *tt7*-Mutante im Vergleich mit den anderen Genotypen eine Verdopplung des Kämpferolgehaltes. Dies ist umso erstaunlicher, da eine Umsetzung des Dihydrokämpferols zu Dihydroquercetin durch das Fehlen der Flavonol-3'-Hydroxylase zwar blockiert ist, grundsätzlich aber mit der Reaktion von Dihydrokämpferol zu Pelargonidin im Phenylpropanoid-Syntheseweg (Abb. 1.2) jedoch ein alternativer Abfluss für die Zwischenprodukte zur Verfügung steht. Erwartungsgemäß unterblieb hingegen die Bildung von Quercetin in den Blättern der *tt7*-Mutante.

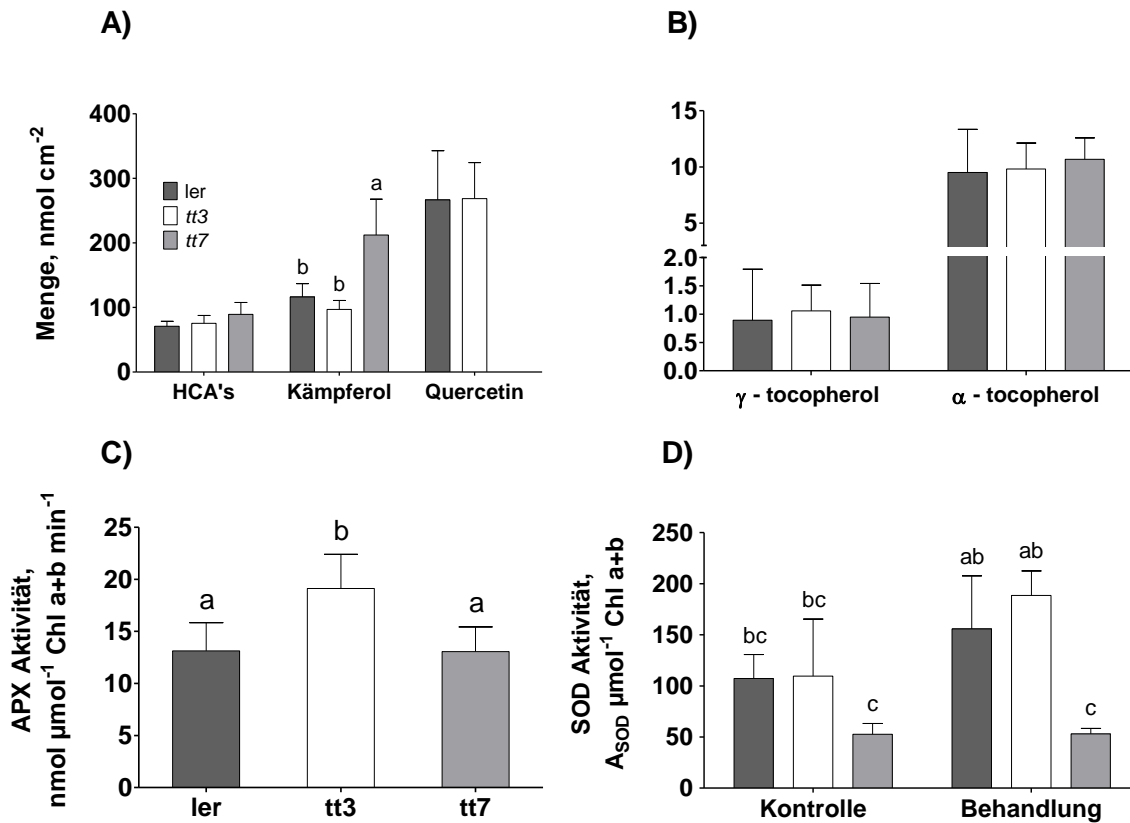


Abb. 3.28: Ausgewählte Vertreter des antioxidativen Schutzsystems in den Blättern des Wildtyps von *A. thaliana* und der beiden Deletionsmutanten *tt3* und *tt7*. A) Durch HPLC bestimmter Gehalt an Flavonoiden in den Blattextrakten einzelner Blattscheiben. B) Mittels HPLC-Analytik bestimmte α -Tocopherol- und γ -Tocopherolgehalte in den Extrakten der Blattscheiben. C) Aktivität der Ascorbat-Peroxidase bestimmt durch die enzymatische Umsetzung von Ascorbat durch Blattextrakte, bevor die Proben photooxidativem Stress ausgesetzt waren. D) Spektrophotometrisch (Absorption bei 560 nm) bestimmte Superoxiddismutase-Aktivität in den Extrakten der Blattscheiben definiert als Inhibition der Formazanbildung um 50 % induziert durch Superoxid in einem Riboflavin-Methionin-NBT System. Gemessen wurden Blattproben vor (Kontrolle) und nach der Behandlung mit photooxidativem Stress. Die Daten wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA und dem Bonferroni-Post-hoc Test auf signifikante Unterschiede hin überprüft. N = 5 bzw. N = 4 (SOD-Aktivität), +SD

Das dadurch tendenziell bestehende Defizit in der antioxidativen Kapazität könnte, so ließe es sich in Anbetracht der gleichen PS II-Inhibitionsraten von *tt7* und *tt3* nach der Behandlung mit photooxidativem Stress vermuten, durch die gemeinsame Wirkung eines gestiegenen Kämpferolgehaltes und des vermutlich gebildeten Pelargonidins ausgeglichen worden sein. Obwohl der *tt3*-Mutante durch die Deletion der Dihydroflavonol-Reduktase die Bildung von Anthocyanen verwehrt ist und somit eine Barriere im Stoffwechsel vorliegt, wurden entgegen der Erwartung im Vergleich mit dem Wildtyp keine erhöhten Quercetinmengen ermittelt. Im Hinblick auf die hohe Konzentration von Anthocyanen in den Blättern des Wildtyps war das Ausbleiben einer gesteigerten Quercetinbildung in der *tt3*-Mutante eine unerwartete Adaptation des Flavonoid-Syntheseweges.

Wesentlich homogener erschien die Verteilung der Tocopherolgehalte in den Blättern des Wildtyps und der beiden Mutanten. Aufgrund fehlender Unterschiede in den Gehalten des

verhältnismäßig abundanten α -Tocopherols, das mit etwa 10 nmol cm^{-2} akkumulierte (Abb. 3.28 B), lagen in diesem Fall gleiche Ausgangsniveaus für eine mögliche Neutralisation von reaktiven Sauerstoffspezies vor. Ebenso wenig differierten die γ -Tocopherolgehalte der drei Genotypen.

Zur Abschätzung der SOD-Aktivität musste Superoxid aufgrund seiner Kurzlebigkeit *in vitro* erzeugt werden. Dabei bewirkte die Oxidation von Methionin durch photoaktiviertes Riboflavin einen Elektronenübergang auf Sauerstoff, der als Superoxid Nitroblau-Tetrazolium (NBT) reduzierte und zur Formazan-Bildung führte. Wie der Abb. 3.28 D entnommen werden kann, wurden in den Blättern der drei Genotypen Unterschiede bei den Aktivitätsraten der Superoxiddismutase festgestellt. In den Kontrollproben, die das Ausgangsniveau vor der Induktion photooxidativer Bedingungen widerspiegelten, besaßen sowohl die Blattextrakte des Wildtyps als auch der *tt3*-Mutante gegenüber denen des *tt7*-Genotyps eine doppelt so hohe Kapazität zur Neutralisation von Superoxid. Photooxidativer Stress hervorgerufen durch rotes Licht und Methylviologen hob die zunächst nur tendenziell vorhandenen Unterschiede auf ein signifikantes Niveau. So wiesen nach der Behandlung die Blattproben des Wildtyps und der *tt3*-Mutante eine Wirksamkeit gegenüber Superoxid auf, die in Bezug zur Aktivität in den *tt7*-Extrakten um das Dreifache erhöht war.

Weiterhin unterschieden sich die Genotypen in der Möglichkeit, Wasserstoffperoxid über die enzymatische Reaktion der Ascorbat-Peroxidase zu reduzieren. Jedoch stellten sich im Gegensatz zur Superoxiddismutase-Aktivität veränderte Verhältnisse im Reaktionsvermögen ein. Während die Enzyme aus den extrahierten Blattproben der *tt3*-Mutante in signifikanter Weise mit ca. $19 \text{ nmol Ascorbat pro } \mu\text{mol Chlorophyll a+b}$ in einer Minute die größte Substratmenge zu Dehydroascorbat umsetzten, lagen in den Proben des Wildtyps und der *tt7*-Mutante die Aktivitätsraten etwa 30 % unterhalb dieses Maximums (Abb. 3.28 C).

Zusammengenommen erlauben die Daten die Schlussfolgerung, dass abgesehen von den Anthocyanen in den Blättern der *tt3*-Mutante ein mit dem Wildtyp durchaus vergleichbares antioxidatives Potential vorlag. Dahingegen muss es offen bleiben, ob das Fehlen von Quercetin und das Defizit in der SOD-Aktivität in den Blättern der *tt7*-Mutante durch einen erhöhten Gehalt an Kämpferol aufgewogen werden konnte.

3.3.9 Schutz der Thylakoidmembranen durch Anthocyane und Quercetin vor der photooxidativen Degradation ungesättigter Fettsäuren

Anthocyane und Quercetin könnten die Aktivität von Photosystem II schützen, indem sie primär nicht nur die diversen Sauerstoffspezies neutralisieren, sondern auch die nachfolgende Bildung von weiteren toxischen Reaktionsprodukten einschränken. Zu diesen Verbindungen zählt Malondialdehyd (MDA). Das relativ stabile Endprodukt der Lipidoxidation, das bei der Oxidation von Linolensäure aus 5-Ring-Hydroperoxiden hervorgehen kann (Esterbauer et al. 1991) ist nicht nur ein Marker für oxidativen Stress, sondern es steht auch im Verdacht, an der Photodeaktivierung von PS II beteiligt zu sein. Wahrscheinlich bindet MDA an die Lysinreste der PS II-Kernproteine sowie der 33 kDa Proteine (OEC 33) des Wasserspaltungsapparates und könnte über die Entkopplung beider Komplexe den Elektronentransfer unterbinden (Yamauchi und Sugimoto 2010).

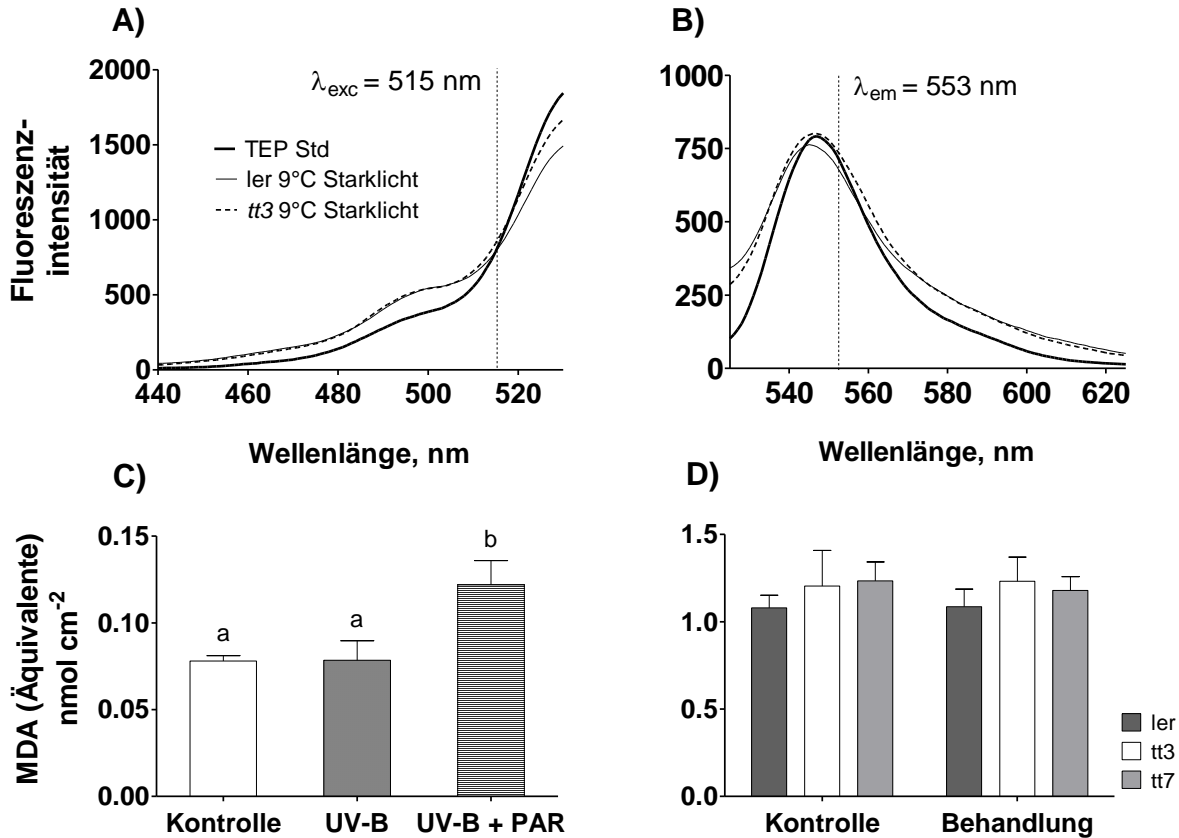


Abb. 3.29: A) Fluoreszenz-Anregungsspektren des Standards Tetraethoxypropan (TEP, $4 \mu\text{mol l}^{-1}$, Verdünnung 1:6) und von Extrakten einzelner Blattscheiben des Wildtyps (ler) und der *tt3*-Mutante (Verdünnung 1:10) nach der Adduktbildung mit Thiobarbitursäure mit der Position der Anregungswellenlänge des HPLC-Fluoreszenzdetektors, gemessen bei $553 \text{ nm} \pm 2,5 \text{ nm}$ B) Fluoreszenz-Emissionsspektren der gleichen Proben mit der Lage der Emissionswellenlänge des HPLC-Fluoreszenzdetektors, angeregt mit einer Wellenlänge von $515 \text{ nm} \pm 1,5 \text{ nm}$ C) Malondialdehyd-Gehalt in Blättern des Wildtyps von *A. thaliana* (ler, kultiviert unter einer PPFD von $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$, 16:8 h Photoperiode) nach einer Behandlung mit UV-B Strahlung (2 W m^{-2} , 30 min) bzw. nach einer zusätzlichen Bestrahlung mit PAR über 120 min (PPFD $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), $N = 3$, einfaktorielle ANOVA mit Tukey's Post-hoc Test, +SD D) Malondialdehyd-Gehalt in Blattscheiben der drei Genotypen, die mit 4 mM Lincomycin und $100 \mu\text{M}$ Methylviologen bei $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ Weißlicht (240 min) inkubiert wurden und anschließend rotem Licht ($\lambda > 645 \text{ nm}$) mit einer PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ über 40 min ausgesetzt waren. $N = 5$, +SD

Zum Nachweis von Malondialdehyd diente die Reaktion mit Thiobarbitursäure (TBA), die ein fluoreszierendes Addukt hervorbringt, das mit HPLC durch Fluoreszenz-Detektion quantifiziert wurde. Da TBA nicht nur mit Aminosäuren und Kohlenhydraten interagieren kann (Gutteridge 1981), sondern auch mit DNS Verbindungen bildet (Rao 1991), erschien es zur Bewertung des Nachweisverfahrens notwendig, zunächst Fluoreszenz-Anregungsspektren und Fluoreszenz-Emissionsspektren von vermuteten MDA-TBA-Addukten aus Blattextrakten des mit Kühle behandelten Wildtyps und der *tt3*-Mutante zu erstellen. Um anschließend die Spezifität der Reaktion beurteilen zu können, wurden die Spektren mit denen des als Standard verwendeten Tetraethoxypropan verglichen, das ebenfalls mit TBA ein Fluorophor bildete (Abb. 3.29 A und B). Die Anregungsspektren offenbarten ein nahezu übereinstimmendes spektrales Verteilungsmuster der emittierten Fluoreszenz. Sowohl das kontinuierliche Ansteigen der

Ergebnisse

Fluoreszenzintensität bis etwa 480 nm, gefolgt von einem Signalplateau bei 500 nm, als auch der ausgeprägte Anstieg bis zum Maximum bei über 530 nm waren identisch. Ebenfalls als in hohem Maße übereinstimmend konnten die Emissionsspektren angesehen werden. Einzig eine marginale Verschiebung des Emissionsmaximums hin zu kürzeren Wellenlängen im Vergleich zum TEP-TBA-Addukt war auffällig. Dennoch wurden die Übereinstimmungen der Spektren als ausreichend angesehen, um den Empfehlungen von Yin (1995) zur Festlegung der Anregungs- und Emissionswellenlänge für die Detektion des TBA-MDA-Adduktes folgen zu können. Dabei wurde mit einer Anregungswellenlänge von 515 nm zugunsten einer reduzierten Rayleigh-Streuung auf ein Höchstmaß an Sensitivität verzichtet.

Zunächst sollte geklärt werden, ob das Hervorrufen von oxidativen Bedingungen, insbesondere durch die Restriktion des linearen Elektronentransportes, überhaupt zu einer Bildung von Malondialdehyd aufgrund der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren führt. Dafür wurde der Photosyntheseapparat in den Blattscheiben des Wildtyps UV-B Strahlung und photosynthetisch aktiver Strahlung ausgesetzt, um mit dem Verlust der Wasserspaltung gezielt die Bildung des oxidativ wirksamen P680⁺-Chlorophylls zu ermöglichen. In unmittelbarer Umgebung dieses starken Oxidationsmittels könnte unter anderem auch die Lipidoxidation in den Thylakoiden eingeleitet werden.

Für die Behandlung wurden Blätter verwendet, die aufgrund der moderaten Lichtbedingungen während der Anzucht ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16:8 h) kaum Hydroxyzimtsäuren und Flavonole als potentielle UV-Schutzpigmente synthetisierten. Wie der Abb. 3.29 C entnommen werden kann, brachte die Bestrahlung der Blattscheiben mit UV-B im Vergleich zur Kontrolle keine nennenswerte Akkumulation von Malondialdehyd hervor, obwohl nach 30 min durch das Absinken des F_v / F_m -Wertes von im Mittel 0,77 auf 0,45 (Daten nicht gezeigt) mit über 40 % ein deutlicher Effizienzverlust bei der Ladungstrennung im Photosystem II festgestellt wurde. Sowohl die Kontrollproben als auch die UV-B exponierten Blattscheiben enthielten etwa $0,08 \text{ nmol cm}^{-2}$ MDA-Äquivalente. Folgte der Behandlung mit UV-B Strahlung jedoch eine Belichtung der Proben mit Wellenlängen aus dem gesamten photosynthetisch aktiven Bereich, nahm der Gehalt von Malondialdehyd zu. So führte die nachfolgende Anregung der Photosysteme über 120 min mit einer Photonenflussdichte von $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ neben einer rapiden Deaktivierung von PS II, die in einem Funktionsverlust von über 90 % gipfelte, zu höheren MDA-Konzentrationen. Sie lagen ca. 50 % über denen der UV-B Behandlung und der Kontrollgruppe.

Im Anschluss sollte die Hypothese überprüft werden, ob Anthocyane oder Quercetin die Photodeaktivierung von PS II verhindern, indem sie bei zunehmender Aktivierung von Sauerstoff am Photosystem I die Bildung von MDA einschränken oder das hochreaktive Endprodukt der Lipidoxidation neutralisieren. Zu diesem Zweck wurden Blattscheiben der drei Genotypen nach der Inkubation mit Lincomycin und Methylviologen über 40 min langwelligem Rotlicht mit einer externen PPFD von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ausgesetzt, um durch eine übermäßige Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies die mögliche Entstehung von MDA zu fördern. Zunächst wurden in den Kontrollproben des Wildtyps und der Mutanten mit etwa $1,2 \text{ nmol cm}^{-2}$ annähernd gleich hohe MDA-Gehalte ermittelt, die interessanterweise die Werte in den Blättern der an Schwachlicht akklimatisierten Pflanzen des Wildtyps bereits um das bis zu 15fache übertrafen (Abb. 3.29 C und 3.29 D). Der durch Methylviologen erzeugte oxidative Stress in Kombination mit der blockierten Protein-Biosynthese setzte die maximale Quantenausbeute von PS II im Wildtyp um 7 %, in der *tt3*-Mutante um 14 % und in der *tt7*-Mutante um 9 % herab (N = 5 mit signifikanten Unterschieden zwischen *ler* und *tt7* gegenüber *tt3*, einfaktorielles ANOVA mit

Ergebnisse

Tukey's Post-hoc Test, Daten nicht gezeigt). Letztendlich ergaben sich dabei weder erhöhte MDA-Gehalte in den exponierten Blattscheiben im Vergleich zu den Kontrollproben, noch brachte die Induktion von photooxidativem Stress Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen hervor. Eine Beteiligung von Malondialdehyd an der Deaktivierung von Photosystem II erschien daher unter den gewählten Bedingungen als unwahrscheinlich. Es ist deshalb auch denkbar, dass die mögliche antioxidative Wirkung der Anthocyane und/oder des Quercetins eher gegen reaktive Sauerstoffspezies gerichtet war.

4 Diskussion

Die Akkumulation von Anthocyanen in Blättern unter Stressbedingungen stellt neben ihrer saisonalen Bildung ein in der Natur weitverbreitetes Phänomen dar. Unklarheit besteht jedoch über ihre Funktion in den Blättern. Im Hinblick auf ihre häufig adaxiale Einlagerung ergibt sich die Vermutung, dass sie als Schutzpigmente dienen könnten. Ziel dieser Arbeit war es daher, in Blättern eine Lichtschutzfunktion von Anthocyanen nachzuweisen. Dabei sollte u. a. geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß sie photosynthetisch aktive Strahlung abschirmen und inwieweit diese Abschirmung gegen Inhibition der Photosynthese schützt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob Anthocyane auch über ihre antioxidative Wirkung eine Schutzfunktion ausüben.

4.1 Lichtschutzwirkung der Anthocyane durch die optische Abschirmung von Strahlung

Die Synthese von Anthocyanen in Blättern bewirkt, dass die Photosyntheseorgane rot eingefärbt werden. Mit diesem Pigment akkumuliert ein weiterer Chromophor im Blatt, der neben dem Chlorophyll Strahlung aus dem sichtbaren Bereich des Spektrums absorbiert. Die Anregung von Chlorophyllmolekülen im Mesophyll könnte deshalb verringert sein. Gestützt wird die Vorstellung dadurch, dass Anthocyane in der Vakuole akkumulieren. Demnach ist ein Energietransfer der absorbierten Strahlung auf Chlorophyll ausgeschlossen. Somit konkurrieren die Anthocyane mit dem Chlorophyll sogar um Anregungsenergie. Daraus resultiert schließlich die Schlussfolgerung, dass Anthocyane eine Lichtschutzfunktion besitzen und durch die Abschirmung von Strahlung Schäden am Photosyntheseapparat verhindern könnten. Photosynthetisch aktive Strahlung wird von Blättern unterschiedlich stark absorbiert. Strukturelle Faktoren wie veränderliche Pfadlängen im Blatt und die Streuung an den intra- und interzellulären Grenzschichten lassen die optischen Eigenschaften variieren. Weiterhin akkumuliert in Blättern eine Vielzahl von strahlungsabsorbierenden Substanzen. Die Absorptionsmuster der Chromophore zeigen dabei überlagernde Spektralbereiche (Gitelson et al. 2001, Merzlyak et al. 2008b). Es stellt sich daher die Frage, in welchem Spektralbereich die Abschirmung von Strahlung eindeutig den Anthocyanen zugeordnet werden kann.

4.1.1 *In vivo*-Absorption der Anthocyane

Gelöstes Cyanidin-Glykosid, das in der Natur eines der häufigsten Anthocyane ist und sowohl in Blättern von *B. thunbergii* (Lehrer und Brand 2010) als auch in *A. thaliana* (Bloor und Abrahams 2002) vorkommt, absorbiert vor allem grünes Licht mit einem Maximum bei 540 nm aber auch blaue Strahlung in geringerem Umfang (Abb. 3.8 B). Reflexionsmessungen an verschiedenen Blattpfunden und Früchten bestätigen dieses Absorptionsverhalten der Anthocyane. Die Spektren anthocyanhaltiger Kronblätter von *Rhododendron indicum*, bei denen der Einfluss von Chlorophyll auf die Absorption fehlt, konnten zeigen, dass die roten Pigmente in blattähnlichen Strukturen hauptsächlich grünes Licht mit einem Maximum bei 530 nm absorbierten (Iriel und Lagorio 2009). Zunächst ändern moderate Chlorophyllkonzentrationen nur wenig an dieser spektralen Signatur. Im Exokarp von Äpfeln lag das verbreiterte Absorptionsmaximum der Anthocyane in der Region von 535-545 nm bei Chlorophyllgehalten, die mit 1 bis 8 nmol cm⁻²

teilweise nur etwa 5 % des Gehaltes in Blättern erreichten (Merzlyak et al. 2003). Jedoch ist Chlorophyll bereits mit den geringen Konzentrationen in signifikanter Weise am Umfang der variablen Reflexion in diesem Spektralbereich beteiligt (Merzlyak et al. 2003). Weiterführende Untersuchungen an Laubblättern ausdauernder Pflanzenarten belegten, dass auch bei hohen Chlorophyllkonzentrationen das Absorptionsmaximum der Anthocyane nicht verschoben wurde (Gitelson et al. 2001). Der Vergleich von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von *Berberis*-Blättern bestätigt dies, da im Vergleich zur grünen Varietät in den roten Blättern die Fluoreszenzausbeute im Bereich von 530-540 nm am niedrigsten war (Abb. 3.1 A). Das Absorptionsverhalten wurde bereits benutzt, um die Anthocyankonzentration in Blättern abzuschätzen. Verschiedene Reflexionsindices verwenden dafür Spektralbereiche, in denen Anthocyane absorbieren und lichtdurchlässig sind (Gamon und Surfus 1999, Gitelson et al. 2006, Vina und Gitelson 2011).

4.1.2 Die Bestimmung der Abschirmung mit Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen

Ein optischer Lichtschutz durch die Absorption von grünem Licht könnte bestätigt werden, wenn Anthocyane photosynthetisch aktives Gewebe im Sinne einer filternden Barriere gegen Strahlung abschirmen und dieser Effekt konzentrationsabhängig ist und damit auch quantifizierbar wäre.

Ziel dieser Arbeit war es, alternativ zu den relativ aufwendigen und störungsanfälligen Reflexionsmessungen eine zuverlässige Methode zu etablieren, mit der sich nicht nur die Konzentration von Anthocyanen abschätzen, sondern darüber hinaus auch ihre optische Abschirmung in Laubblättern bestätigen bzw. quantifizieren lässt. Der Ansatz des Zwei-Band-Modells in den Reflexionsindices sollte dabei auf ein Messverfahren übertragen werden, dem die Autofluoreszenz von Chlorophyll zugrunde liegt. Hierbei dient Chlorophyll als blattinterner Photosensor, der unterhalb eines Anthocyanfilters auf sich verändernde Lichtstärken reagieren müsste. Für UV-Strahlung absorbierende Substanzen konnte dieser Ansatz bereits in einem Messverfahren umgesetzt werden, das auf relativen Fluoreszenzausbeuten basiert (Bilger et al. 1997). Nachdem Blättern die Epidermis, in der UV-Strahlung absorbierende Hydroxyzimtsäure-Derivate und Flavonole akkumulieren, entfernt wurde, stiegen die Verhältnisse von UV-A- bzw. UV-B-induzierter Chlorophyllfluoreszenz zur hervorgerufenen Fluoreszenz des blaugrünen Referenzstrahls an (Bilger et al. 1997). In der Anwendung ergaben sich letztendlich gute Korrelationen zwischen der Konzentration phenolischer Säuren in den Vakuolen der Epidermis und dem Logarithmus des Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnis $\Phi F_{532\text{nm}} / \Phi F_{355\text{nm}}$ (Ounis et al. 2001) sowie zwischen dem Gehalt an epidermalen Flavonoiden und der UV-A- bzw. der UV-B-Absorption in den Blattproben, deren Berechnung auf den Verhältnissen $F_{366\text{nm}} / F_{400-550\text{nm}}$ bzw. $F_{314\text{nm}} / F_{400-550\text{nm}}$ basierte (Burchard et al. 2000). Es muss allerdings hinterfragt werden, ob im Gegensatz zu den epidermal eingelagerten Flavonolen Anthocyane im Palisadenparenchym abschirmen können und ob der Effekt mit Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen erfasst werden kann.

Für Anthocyane in Blättern sollten ebenfalls zwei Anregungsstrahlen ausreichend sein, um die Abschirmung zu erfassen. Der grüne 545 nm-Induktionsstrahl mit seiner relativ schmalen Bandbreite sowie das blaugrüne Anregungslicht (Abb. 3.1 B) lösen dabei Chlorophyllfluoreszenz im Absorptionsbereich der Anthocyane aus, während sich aus dem Vergleich der Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren der *Berberis*-Varietäten (Abb. 3.1 A) die Lage des Referenzstrahls ableitete. Mit einer Wellenlänge von 650 nm (Abb. 3.1 B) sollte Chlorophyll ungehindert durch die Absorption der Anthocyane angeregt werden. In Anlehnung an die UV-

abhängigen Fluoreszenzverhältnisse könnte die Absorption von grünem Licht mit der relativen Fluoreszenzausbeute von absorbiertem Anregungslicht und Referenzlicht (F_{545} / F_{650} bzw. F_{Bg} / F_{650}) erfasst werden. Die Daten in Abb. 3.2 C und B belegen, dass mit zunehmender Einlagerung der Anthocyane in den Blättern von *B. thunbergii* die Ausbeute der grün- und blaugrüninduzierten Fluoreszenz abnahm, während die durch rotes Licht hervorgerufene Fluoreszenz nahezu konstant blieb. Bislang wurden derartige Fluoreszenzverhältnisse nur genutzt, um in Früchten die Konzentration hypodermal eingelagerter Anthocyane zu bestimmen (Hagen et al. 2006, Cerovic et al. 2008).

4.1.3 Quantifizierung der Abschirmung mit Hilfe von isolierten Chloroplasten und grünen Blättern als Referenz

Für die Quantifizierung des Abschirmungseffektes waren anthocyanfreie Referenzen notwendig. Dementsprechend wurden Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnisse von isolierten Chloroplasten und von an Schwachlicht angepassten Blättern diverser Pflanzenarten ermittelt. Wichtige optische Eigenschaften der Referenzen sollten dabei mit denen der Messobjekte übereinstimmen. Dies ist jedoch nicht immer gegeben. Optische Phänomene können die Fluoreszenzausbeute für grünes und rotes Anregungslicht unterschiedlich beeinflussen, sodass die Referenzwerte variieren und eine Quantifizierung der Abschirmung erschwert ist. So bestand für das Verhältnis F_{545} / F_{650} eine Abhängigkeit von der Chlorophyllkonzentration. Sie kann vor allem als Folge des geringen Extinktionskoeffizienten von Chlorophyll für grüne Strahlung angesehen werden.

Weiterhin würde eine Reabsorption der emittierten Fluoreszenz dazu führen, dass die Referenzwerte schwanken. Insbesondere ist für an Schwachlicht adaptierte Blätter und zum Teil auch für hohe Chloroplastenkonzentrationen denkbar, dass durch die zunehmende optische Pfadlänge von grünem Anregungslicht die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Fluoreszenz von vorgelagerten Chlorophyllmolekülen absorbiert wurde. In der Tat ist in Blättern die Eindringtiefe blauer oder roter Strahlung wesentlich geringer als die von grünem Licht (Vogelmann und Han 2000, Koizumi et al. 1998). Die eher zylindrische Erstreckung der parallel angeordneten Palisadenzellen begünstigt zusammen mit der lichtinduzierten Ausrichtung der Plastiden an der Zellwand das Eindringen photosynthetisch aktiver Strahlung bis weit in das Blattinnere. Zwischen den verstreuten Zellen im Schwammparenchym hingegen entsteht durch die ausgeprägten Interzellularräume eine Vielzahl von Grenzflächen, an denen infolge der verschiedenen Brechungsindices zwischen der Umgebungsluft (1,0) und den Zellwänden (1,48) Streueffekte auftreten können (Wooley 1971). Besonders für grünes Licht ist dieses Phänomen von Bedeutung. Beispielsweise betrug die Reflexion von Strahlung mit 550 nm an einem exponierten Schwammparenchym 20 % der eingestrahnten Photonenflussdichte im Vergleich zu etwa 10 % bei rotem Licht (Terashima und Saeki 1983). Für bifaziale Laubblätter, die an Schwachlichtbedingungen akklimatisiert waren, dokumentierten Cui et al. (1991), dass im Vergleich mit starklichtadaptierten Blättern nahe der unteren Epidermis deutlich erhöhte Streuwerte für grüne Strahlung auftraten. Ebenso vermitteln Fluoreszenzmessungen an der abaxialen Seite von *Spinacia oleracea*- und *Rhododendron catawbiense*-Blättern das Bild einer vermehrten Streuung von grünem Licht im Schwammparenchym (Vogelmann und Evans 2002, Johnson et al. 2005). Obwohl der Absorptionskoeffizient von Chlorophyll für grünes Licht (550 nm) wesentlich geringer ist als jener für Strahlung aus dem blauen Spektralbereich (450 nm), wurden bei der Bestrahlung der Blattunterseite mit blauem, grünem und rotem Licht ähnliche Absorptionswerte der verschiedenen Lichtqualitäten für das Schwammparenchym berechnet bzw.

traten nahezu übereinstimmende Fluoreszenzgradienten in diesem Abschnitt des Mesophylls auf (Vogelmann und Evans 2002, Johnson et al. 2005). Eine Beteiligung der Streuvorgänge daran erscheint glaubhaft, da parallel zu den relativ hohen Absorptionswerten für grüne Strahlung eine Zunahme der optischen Pfadlänge für grünes Licht um 25-30 % auftrat (Vogelmann und Evans 2002). Damit könnte die Reabsorption von durch grünes Licht induzierter Chlorophyllfluoreszenz ansteigen. Ein daraus resultierendes zu niedriges Fluoreszenzverhältnis von F_{545} / F_{650} in der Referenz könnte die Abschirmungseffizienz der Anthocyane unterschätzen.

Bei einer Schwachlichtakklimatisation roter Blätter könnte Photosystem I an der Reabsorption der langwelligen Chlorophyllfluoreszenz beteiligt sein. Aufgrund der Fluoreszenzdetektion in einem Bereich oberhalb von 700 nm, würden Reabsorptionseffekte von Photosystem II unerheblich sein, da trimerisierte Lhc II-Komplexe nur bis etwa 700 nm absorbieren (Hemmelrijk et al. 1992, Nussberger et al. 1994). Untersuchungen an isolierten Photosystemen belegen für eine Schwachlichtakklimatisation die Absorptionsverschiebung durch PS I bis in den Bereich von etwa 720 nm (Rivadossi et al. 1999), so dass sich die Absorption von langwelligem Rotlicht bei solchen Blättern fast verzehnfachen könnte (Rivadossi et al. 1999). Insbesondere absorbieren die 4 Untereinheiten des peripheren Antennensystems von Photosystem I als Heterodimere fernrotes Licht (Croce et al. 2002, Passarini et al. 2010, Wientjes und Croce 2011). Experimente mit rekonstitutiven Lhca4-Komplexen belegen die Bedeutung von Chlorophyll b an der langwelligen Absorption (Schmid et al. 2001). Eine Änderung der Orientierung von Chlorophyll b führte im Vergleich mit den Monomeren zu einem Zuwachs in der langwelligen Absorption von etwa 30 % (Croce et al. 2002).

Einige Phänomene wirken den zuvor genannten Effekten entgegen. In an Schwachlicht angepassten Blättern ist aufgrund des gestiegenen Anteils der fernroten Strahlung während der Blattentwicklung die Stöchiometrie zwischen den Photosystemen zugunsten von PS II verschoben (Chow et al. 1990, Pfannschmidt et al. 1999). Eine Reabsorption durch PS I wird damit unwahrscheinlicher. Die Streuung von grünem Licht ist wahrscheinlich noch an einem weiteren Effekt beteiligt, der die Fluoreszenzverhältnisse in den grünen Referenz-Blättern beeinflusst. In an Schwachlichtbedingungen adaptierten Blättern ist das Palisadenparenchym reduziert, so dass bei der Ausbildung des Schwammparenchyms eine relative Verschiebung hin zur adaxialen Seite auftritt und somit Strahlungsstreuung nahe der Epidermis auftreten kann. Wegen der Streuzunahme des von den Chlorophyllmolekülen nur schwach absorbierten 545 nm-Anregungsstrahles steigt mit der optischen Pfadlänge deshalb nahe der Epidermis die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten Fluoreszenzausbeute von grünem Licht, ohne dass vermehrte Reabsorptionseffekte im verkürzten Palisadenparenchym auftreten. Die Folge wäre im Vergleich mit der verdichteten Chloroplastensuspension ein erhöhtes Verhältnis von F_{545} / F_{650} . Inwieweit diese Effekte die Reabsorption kompensieren, muss offen bleiben. Allerdings rechtfertigen die annähernd gleichen Fluoreszenzverhältnisse von isolierten Chloroplasten und an Schwachlicht adaptierten Blättern (Abb. 3.5) die Verwendung von Chloroplastensuspensionen als Referenz. Sie können in Anlehnung an die Modellvorstellungen von Terashima und Saeki (1985) zur schichtweisen Lichtausnutzung in Blättern somit als eine Abfolge von Absorptionsvorgängen angesehen und den Blättern gleichgestellt werden. Die Schwachlichtakklimatisation beider Referenzen ist unter Umständen nicht geeignet das Bezugssystem für an Starklicht angepasste Blätter darzustellen, da sich in letzteren neben zunehmenden Gewebstärken auch die Zusammensetzung der Photosynthesepigmente ändert. Die Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von an Schwachlicht und an Starklicht angepassten Blättern der *tt3*-Mutante

belegen dagegen, dass der für die Absorption der Anthocyane relevante Spektralbereich um 540 nm (Abb. 3.19) davon nicht betroffen war.

Als Konsequenz zeigte sich für das Chlorophyllfluoreszenz-Emissions-Verhältnis F_{545} / F_{650} der Referenzen neben der Abhängigkeit von der Chlorophyllkonzentration auch eine Beeinflussung durch Änderungen in der Blattstruktur. Dominieren wie in an Schatten angepassten, grünen Blättern im Schwammparenchym Interzellularräume das Gewebe, sollte die Pfadlängenerweiterung für grüne Strahlung zu einer relativ erhöhten Fluoreszenzausbeute führen. Werden solche Blätter als Referenz verwendet, könnte der Streueffekt zu einer Überschätzung der Abschirmung führen, da in roten Blättern die Absorption von grünem Licht die Streuung im Schwammparenchym einschränkt. Im Kontrast dazu würden sich in den kompakteren Chloroplastenschichten der Referenzsuspension, in denen die Zahl der Grenzflächen reduziert ist, Fluoreszenzverhältnisse ergeben, die hauptsächlich Reabsorptionsprozessen der durch grünes Licht induzierten Fluoreszenz unterliegen. Infolgedessen könnte die Abschirmungseffizienz der Anthocyane unterschätzt werden. In der Anwendung zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem Anthocyangehalt im Blatt und der Absorption, die auf F_{Bg} / F_{650} basierte (Abb. 3.7 B). Die Korrelation konnte verbesserte werden, wenn der Anregungsstrahl mit einer Wellenlänge 545 nm in das Absorptionsmaximum der Anthocyane verlagert wurde (Abb. 3.7 A). Der lineare Zusammenhang zwischen beiden Absorptionen (3.7 C) rechtfertigte die Verwendung von grünem Anregungslicht, obwohl die Abhängigkeit von F_{545} / F_{650} von der Chlorophyllkonzentration deutlich ausgeprägt war.

4.1.4 Das Ausmaß der Abschirmung von grünem Licht durch Anthocyane in Blättern

Mit Hilfe der Referenzverhältnisse von isolierten Chloroplasten konnte über Transmissionsberechnungen die Abschirmung für blaugrünes und grünes Anregungslicht quantifiziert werden. In der Anwendung zeigten die Anthocyane, die in *Berberis*-Blättern in den Vakuolen des Palisadenparenchyms akkumulierten, unterschiedliche Abschirmungseffekte (Abb. 3.6 A und B). Lediglich 30 % des eingestrahlt grünen Lichtes mit einer Wellenlänge von 545 nm erreichte in den Blättern aus der moderaten Lichtakklimatisationsstufe das Mesophyll. Bei maximaler Abschirmung, wenn sich die Blätter unter Starklichtbedingungen entwickelten, passierten sogar nur 10 % der auftreffenden Photonen den Anthocyanfilter. Hingegen war der Abschirmungseffekt für blaugrünes Anregungslicht, das die kurzwellige Hälfte der photosynthetisch aktiven Strahlung fast vollständig abdeckte, geringer und ließ sich je nach Lichtadaptationsstufe auf 50 bzw. 70 % quantifizieren. Die Anthocyane in den Blättern des *Arabidopsis*-Wildtyps schienen dagegen weniger abzuschirmen. In Bezug zu den grünen Blättern der *tt3*-Referenz wurden 40 % des blaugrünen und 70 % des grünen Anregungslichtes abgeschirmt (Abb. 3.20 B). Wie schon die Fluoreszenz-Anregungsspektren in Abb. 3.19 andeuteten, zeigten die Anthocyane in den Blättern der beiden Genotypen keinen Effekt, wenn blaues Licht Chlorophyll anregte (Abb. 3.20 B). Obwohl der Anthocyangehalt in der *tt7*-Mutante bei 20 % des Wildtyps lag, war im Vergleich zur *tt3*-Referenz im blauen Spektralbereich kein Abschirmungseffekt erkennbar. Erst im Absorptionsmaximum der Anthocyane trat mit etwa 30 % eine moderate Abschirmung gegen grüne Strahlung auf.

Ein direkter Vergleich der ermittelten Abschirmungswerte mit Literaturdaten erscheint zunächst einzig für die Resultate von Pfündel et al. (2007) zulässig, da in Übereinstimmung mit dem in dieser Arbeit verfolgtem Ansatz den Transmissionsberechnungen Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnisse von Laubblättern zu Grunde lagen. Mit Hilfe des

Diskussion

Fluoreszenzverhältnisses von $F_{470\text{nm}} / F_{655\text{nm}}$ ließen sich apparente Transmissionen berechnen, die für unterschiedlich lokalisierte Anthocyane eine maximale Abschirmung von 50-60 % der eingestrahnten Photonenflussdichte bedeuteten. Obwohl mit dem 470 nm-Anregungsstrahl monochromatisches Licht verwendet wurde, das auch von den Carotinoiden absorbiert werden kann, traten im Bezug zum spektral weiter gefassten blaugrünen Induktionsstrahl vergleichbare Transmissionen auf. Die Konzentration der roten Pigmente in den Blättern könnte deshalb auf einem Niveau gelegen haben, bei dem eine Absorptionssättigung unterschiedliche Fluoreszenzausbeuten der unterschiedlichen Anregungsstrahlen ausschloss. Weiterhin könnte zwischen den Gehalten an Anthocyanen und Carotinoiden eine Korrelation bestehen, die eine eindeutige Zuordnung der Abschirmung in diesem Spektralbereich erschwert. Als konträr müssen die 80 %-Transmissionen für Blättern von *Parthenocissus tricuspidata* (Pfundel et al. 2007) angesehen werden, da bei einer übereinstimmenden zellulären Lokalisation in *Berberis*-Blättern Anthocyane 70 % des auftreffenden blaugrünen Lichtes abschirmten. Allerdings fehlen nicht nur genauere Angaben zum Anthocyangehalt in *P. tricuspidata*, sondern es gibt auch keine Gegenüberstellung von Anthocyankonzentration und Fluoreszenzverhältnissen. Generell scheint die konzentrationsabhängige Abschirmungseffizienz variabel zu sein. Tatsächlich beeinflussen neben den Schichtdicken der beteiligten Gewebe vor allem die Wellenlänge des Anregungslichtes sowie das Verhältnis von Anthocyanen und Chlorophyll die Wirksamkeit der roten Pigmente. Hohe Anthocyan-Chlorophyll-Verhältnisse in Äpfeln verzögerten zum Beispiel die einsetzende Absorptionssättigung des Anregungslichtes, wenn blaue Strahlung verwendet wurde (Hagen et al. 2006). Die zunehmende Absorption der epidermalen und hypodermalen Zellschichten, die in Äpfeln die Hauptmasse der roten Pigmente einlagern (Bae et al. 2006), schränkten vermutlich mit steigendem Anthocyangehalt die Anregungswahrscheinlichkeit der im Mesokarp relativ weit verstreuten Chlorophyllmoleküle ein. Wurde in roten Weintrauben, die sehr geringe Chlorophyllkonzentrationen ($0,025\text{-}0,06 \mu\text{g Chl a+b mg}^{-1}$ Trockengewicht, Giovanelli und Brenna, 2007) in einem breiten Mesokarp aufwiesen, mit grünem Licht Chlorophyllfluoreszenz induziert, zeigte sich eine mit Blättern vergleichbare Abschirmung. Etwa $10\text{-}15 \mu\text{g cm}^{-2}$ (ca. $20\text{-}30 \text{ nmol cm}^{-2}$, Cyanidin-3-Glycosid-Äquivalente mit einer molaren Masse von $484,8 \text{ g mol}^{-1}$) waren ausreichend, um die Hälfte des Absorptionseffektes für Licht mit Wellenlängen von $540\text{-}550 \text{ nm}$ zu bewirken (Agati et al. 2008, Agati et al. 2007a). Jedoch suggerierte $\log[F_{635\text{nm}} / F_{540\text{nm}}]$ bzw. $\log[F_{650\text{nm}} / F_{550\text{nm}}]$ eine Absorption von Strahlung aus dem grünen Spektralbereich, obwohl die Synthese der Anthocyane noch nicht induziert war (Agati et al. 2008, Agati et al. 2007a).

Die mangelnde Vergleichbarkeit der Ergebnisse offenbart aber, dass es für den Nachweis einer Abschirmung unbedingt notwendig erscheint, die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenz von der Anthocyankonzentration zu bestimmen. Die Korrelation in der Abb. 3.7 A lässt die Schlussfolgerung zu, dass bis zu einer Konzentration von etwa $12 \mu\text{g cm}^{-2}$ (ca. 24 nmol cm^{-2}) für das Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnis $F_{545\text{nm}} / F_{650\text{nm}}$ ein linearer Zusammenhang zwischen der Absorption, die sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus der Transmission ($-\log [T]$) (Burchard et al. 2000) ableitet, und der Konzentration der Anthocyane bestand. Wurde das Anregungsspektrum um den blauen Spektralbereich erweitert (Abb. 3.7 B), nahm die Abschirmungseffizienz ab. Zum einen erstreckte sich der lineare Zusammenhang nur bis zu einer Konzentration von etwa $8 \mu\text{g cm}^{-2}$ (16 nmol cm^{-2}), zum anderen sank die Absorption des Anregungslichtes um ca. 50 %. Weiterhin ist ersichtlich, dass sowohl für monochromatisches, grünes Anregungslicht als auch für den breiten Induktionsstrahl des blaugrünen Wellenlängenbereiches $8 \mu\text{g cm}^{-2}$ (16 nmol cm^{-2}) der Anthocyane genügte, um 50 % des Abschirmungseffektes zu realisieren. Darüber hinaus war ab etwa $20 \mu\text{g cm}^{-2}$ (40 nmol cm^{-2}) der

Zuwachs der Abschirmung gegen blaugrünes Anregungslicht in Abhängigkeit vom Anthocyangehalt sehr gering, während dieser Zusammenhang bei grünem Anregungslicht erst bei etwa $30 \mu\text{g cm}^{-2}$ (60 nmol cm^{-2}) auftrat.

Verschiedene Absorptions- und Reflexionsindices untermauern zumindest die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Abschirmung gegen grünes Licht und die konzentrationsabhängige Wirkung. Sie setzen den grünen Spektralbereich in Bezug zum fernroten (van den Berg und Perkins 2005) bzw. zum roten Abschnitt (Gitelson et al. 2001, Merzlyak et al. 2003) oder kombinieren die drei spektralen Teilbereiche (Gitelson et al. 2009, Steele et al. 2009). Ihre Sensitivität betraf vor allem Anthocyankonzentrationen zwischen $20\text{-}50 \text{ nmol cm}^{-2}$ (Gitelson et al. 2009, Steele et al. 2009) und darüber hinaus (Gitelson et al. 2001), bei denen Anthocyane die Reflexion in einem vergleichbaren Ausmaß absenkten wie die Chlorophyllfluoreszenz. In nur ungenügender Weise spiegeln die Indices die Effekte der Anthocyane unterhalb von 10 nmol cm^{-2} wider. Bei dieser Konzentration war das Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnis F_{545} / F_{650} sensitiver als die Indices (Abb. 3.7 A). Zusätzlich reagierten die Indices sehr empfindlich auf das Anthocyan-Chlorophyll-Verhältnis. Da Chlorophyllmoleküle ebenfalls grünes Licht absorbieren, konnte den Anthocyanen ein konkreter Abschirmungseffekt aber nur zugeordnet werden, wenn die Konzentration der Anthocyane anstieg und der Chlorophyllgehalt sank (Steele et al. 2009). Speziell bei der Ausdifferenzierung von juvenilen Blättern oder bei der Chlorophylldegradation in seneszierendem Blattgewebe könnten die Indices daher den Abschirmungseffekt der Anthocyane charakterisieren. Allerdings offenbart sich so auch die Schwäche der Indices. Unter Umständen könnten die sinkenden Chlorophyllgehalte eine Abschirmung suggerieren, ohne dass die Anthocyane in vollem Umfang daran beteiligt sind. Auch der reflexionsbasierte Abschirmungsindex von Merzlyak et al. (2008a), der eine lineare Korrelation zwischen der Anthocyankonzentration und der Abschirmung bis etwa 40 nmol cm^{-2} aufwies, zeigte den größten Abschirmungseffekt mit bis zu 90 % für grüne Strahlung, wenn der Absorptionsanteil von Chlorophyll bei niedrigen Blattkonzentrationen besonders gering ausfiel (Merzlyak et al. 2008a).

In Anlehnung an die Argumentation von Agati et al. (2005) kann die Sättigung der Absorption in den *Berberis*-Blättern und damit die sinkende Abschirmungseffizienz der Anthocyane zum einen als Folge der unvollständigen Separation zwischen Chlorophyll und Anthocyanen angesehen werden. Die Autoren begründen entsprechend die Abnahme der Abschirmung, die in Oliven bis etwa 40 nmol cm^{-2} in direkter Proportionalität zum Pigmentgehalt stand, mit der hypodermal einsetzenden Absorption der roten Pigmente, die sich über etwa $200 \mu\text{m}$ in das Mesokarp fortsetzte. Mit der vertikalen Erstreckung der anthocyanhaltigen Zellen im Palisadenparenchym von *Berberis*-Blättern lagen analoge Verhältnisse vor, die eine quantitative Analyse der Abschirmung erschweren könnten. Für den Sättigungsbereich der Beziehung ist es hingegen auch denkbar, dass die parallele Ausrichtung der Palisadenzellen den Siebeffekt begünstigte, bei dem Anregungslicht entlang der Zellwände die optische Barriere der vakuolären Pigmente umging und Chlorophyll durch Streuungseffekte am angrenzenden Zytosol die Strahlung absorbierte und letztendlich Fluoreszenz emittierte. Packeffekte der Anthocyanmoleküle bei hohen Konzentrationen sollten indes bedeutungslos für die Quantifizierung der Abschirmung sein. Die vorgestellte Methode misst nicht die Anthocyankonzentration *per se*, sondern die Abschirmung, da sie nur von der Lichtmenge beeinflusst wird, die im Mesophyll die Chloroplasten erreicht und Fluoreszenz hervorruft. Das heißt, lokal verdichtete Anthocyangehalte in der Vakuole, die keine zusätzliche Abschirmung mehr verursachen, werden auch nicht berücksichtigt.

Die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Referenz-Verhältnisse von isolierten Chloroplasten und grünen Blättern stellten sich vor diesem Hintergrund als vorteilhaft dar, um die Abschirmung zu quantifizieren. Bei den Transmissionsberechnungen waren die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten von Chlorophyll für grünes und rotes Anregungslicht für die Ermittlung der Absorption irrelevant. So konnte auch für niedrige Anthocyangehalte eine konkrete Abschirmung ohne Offset nachgewiesen werden. Weiterhin kann ein variables Anthocyan-Chlorophyll-Verhältnis, das die konzentrationsabhängige Abschirmung schwanken lässt, aufgrund der Referenz-Werte vernachlässigt werden. Einzig die Chlorophyllgehalte der Blätter müssen beachtet werden, da das Fluoreszenzverhältnis F_{545} / F_{650} davon abhängt und bei niedrigen Chlorophyllgehalten unter $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ eine Abschirmung ermittelt werden könnte, ohne dass Anthocyane gebildet wurden.

4.1.5 Photosynthetisch wirksame Photonenflussdichten in anthocyanhaltigen Blättern

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlauben das Fazit, dass Anthocyane im Blatt grüne Strahlung absorbieren und das Mesophyll gegen diesen schmalen Wellenlängenbereich abschirmen. Dieser Effekt konnte mit der Hilfe von Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen erfasst und in Bezug zu anthocyanfreien Referenzen quantifiziert werden.

Da Anthocyane in einem deutlich breiteren Spektralbereich absorbieren, als der, in dem hier die Abschirmung bestimmt wurde, muss für die Erfassung der gesamten Abschirmung ein entsprechend breiterer Bereich betrachtet werden. Dafür empfiehlt es sich, grüne und rote Blätter im Bereich der photosynthetisch aktiven Strahlung zu vergleichen. Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren von Blättern der *Berberis*-Varietäten (Abb. 3.1 A) und des *Arabidopsis*-Wildtyps bzw. der *tt*-Mutanten (Abb. 3.19) zeigten Unterschiede bis zu einer Wellenlänge von 640 nm, die vermutlich auf die Absorption der Anthocyane zurückzuführen waren. Die effektive Photonflussdichte, die das Mesophyll erreicht, sollte sich aus dem Vergleich der Spektren ableiten lassen. Für verschiedene Pigmente konnte bereits dokumentiert werden, dass nach ihrer Einlagerung die Fluoreszenzausbeuten zurückgingen. In der Tat gelang es Cerovic et al. (2002), mit dem logarithmierten Verhältnis von adaxialen und abaxialen Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren die *in vitro*-Absorption von epidermalen Hydroxyzimtsäure-Derivaten und diversen Kämpferol- bzw. Quercetin-Glykosiden nachzuzeichnen. Im sichtbaren Bereich des Lichtes stehen Xanthophylle im Verdacht, die Fluoreszenzausbeuten im blauen Spektralbereich abzusenken. In Dinoflagellaten zeigten Fluoreszenz-Anregungsspektren einen Abschirmungseffekt von ungebundenem Diadinoxanthin für den Bereich von 400-540 nm von 25 % (Johnsen et al. 1997). Auch bei stickstofflimitierten *Chlamydomonas sp.*-Zellen wurde mit einem eingeschränkten Energietransfer auf Chlorophyll a in Anwesenheit von Astaxanthin für diesen Bereich der Strahlung bereits eine ausgeprägte Fluoreszenzabsenkung festgestellt (Bidigare et al. 1993).

Unterschiedlich rot gefärbte *Berberis*-Blätter boten die Möglichkeit, über Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren die Abschirmungseffizienz der Anthocyane gegen das gesamte Spektrum zu erfassen. Anregungsspektren isolierter Chloroplasten stellten die Referenz dar, mit der den variierenden Anthocyangehalten die jeweiligen Absorptionswirksamkeiten zugeordnet werden konnten. Die auf diesem Weg spektral abgeleiteten *in vivo*-Transmissionsspektren bildeten die Grundlage, um zwischen den auf der Blattoberfläche auftreffenden Lichtstärken und den Photonenflussdichten, die bis ins Mesophyll vordrangen, unterscheiden zu können. So ließen sich für jede Lichtquelle die einzelnen photosynthetisch wirksamen Photonenflussdichten in

spektral gewichtete Transmissionen übertragen und mit dem entsprechenden Chlorophyllfluoreszenz-Emissions-Verhältnis $F_{545} / F_{650\text{nm}}$, das von der jeweiligen Anthocyankonzentration abhängt, in einer Korrelationsanalyse gegenüberstellen. Damit beruhte der Berechnungsansatz für die effektive Photonenflussdichte auf der Annahme einer kontinuierlichen Absorption der Anthocyane in den Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren. Das heißt, dass bei steigenden Anthocyankonzentrationen das Absorptionmuster erhalten bleibt und der spezifische Absorptionskoeffizient der Anthocyane in den überlagerten Wellenlängenbereichen zum überwiegenden Teil die Fluoreszenzausbeute determiniert. Die Daten in Abb. 3.8 B erfüllen die Voraussetzung. In Bezug zu den Anregungsspektren isolierter Chloroplasten bestätigte sich die Annahme, da umfangreiche Absorptionseffekte sichtbar wurden. Unterhalb von 410 nm dominierten wahrscheinlich epidermale Flavonole die spektralen Unterschiede. Mit zunehmendem Anthocyanengehalt zeigte sich in den benachbarten Spektralbereichen eine relativ konstante Absorptionssignatur, so dass die Annahme über einen weiten Bereich des Konzentrationsgradienten wiederum erfüllt wurde. Während bei steigenden Polyphenolgehalten der verhältnismäßige Absorptionenzuwachs zwischen 410 und 490 nm nur gering ausfiel, sank die Transmission für Anregungslicht im Absorptionsmaximum der Anthocyane bei etwa 535-540 nm kontinuierlich. Auffällig war hingegen der unverhältnismäßig hohe Absorptionenzuwachs im blauen Spektralbereich und der gleichzeitig auftretende geringe Transmissionsverlust für grünes Licht bei der Gegenüberstellung von Blatt 8 und Blatt 12. Offenbar bewegte sich die Anthocyankonzentration hier im Grenzbereich des Lambert-Beerschen-Gesetzes, während zwischen 410 nm und 490 nm zusätzlich ungebundene Carotinoide am Absorptionenzuwachs beteiligt waren und die geforderte eindeutige Absorption der Anthocyane einschränkten.

Mit diesem Ansatz konnte für jede Lichtquelle die Abschirmung bestimmt werden, nachdem sie mit den relativen Anregungsspektren spektral geeicht wurde. Sie stand in einem linearen Zusammenhang zur Transmission von grünem Anregungslicht. Im konkreten Fall gab ein Transmissionsrückgang von über 80 % für grüne Strahlung an, dass in dunkelroten *Berberis*-Blättern jedes zweite Photon aus dem Sonnenlichtspektrum das Mesophyll nicht erreichte (Abb. 3.11 B) oder während Kultivierung 50 % des Lichtes der Fluoreszenzlampen abgeschirmt wurden. Allerdings bestehen aufgrund der wellenlängenabhängigen Besonderheiten von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren und des Bezugssystems der isolierten Chloroplasten Unsicherheiten über das absolute Ausmaß der Abschirmung. Von den beiden Emissionsbanden der Chlorophyllfluoreszenz, die bei etwa 685 nm und 735 nm ihre maximale Ausprägung erreicht, unterliegt vor allem die kurzwelligere Emission den Reabsorptionsprozessen im Blatt. Die Überlagerung mit der Chlorophyllabsorption war besonders dann effektiv, wenn grüne oder rote Strahlung (514 nm und 633 nm, Agati et al. 1993) bzw. oranges Anregungslicht (600 nm, Ramos und Lagorio 2004) tief im Mesophyll durch die streuungsbedingte Erweiterung der optischen Pfadlänge Fluoreszenz induzierten. Um eine daraus resultierende Überschätzung der Abschirmung durch die Anthocyane zu vermeiden, beschränkte sich die Detektion mit Hilfe eines 715 nm-Langpassfilter auf die langwellige Emissionsbande der Chlorophyllfluoreszenz. Hingegen sollten Differenzen in der Fluoreszenz-Löschung nach dem Einsetzen der photosynthetischen Aktivität (Kautsky-Effekt), die bei roten und grünen Blättern unterschiedlichen Kinetiken haben könnten, keinen Einfluss auf die Quantifizierung der Abschirmung besitzen, da davon hauptsächlich die 685 nm-Emission während der Initialphase des Effektes betroffen ist (Buschmann 2007).

Die Anpassungsfähigkeit des Photosyntheseapparates könnte sich ebenfalls auf die Fluoreszenzausbeute der Anregungsspektren und somit auf die Abschirmungsbestimmung auswirken. Eine relative Abreicherung von kurzwelliger Strahlung durch die Absorption der exponierten Anthocyane hätte in Anlehnung an die Erkenntnisse von Pfannschmidt et al. (1999) zur Folge, dass im Anthocyangradienten der roten Blättern der Anteil von PS I an der langwelligen Fluoreszenz-Emission, der bis zu 35 % umfassen kann (Pedrós et al. 2008), kontinuierlich abnimmt. Eine Normalisierung der Chlorophyllfluoreszenz-Emissionsspektren sollte diese Einbußen in der Signalintensität allerdings kompensieren.

Der Vergleich der Fluoreszenz-Anregungsspektren des an Starklichtbedingungen angepassten *Arabidopsis*-Wildtyps und der *tt3*-Mutante mit dem der *tt3*-Schwachlichtkontrollen offenbart, dass zwar die durch blaue Strahlung hervorgerufene Fluoreszenz sank, aber zwischen 400 und 500 nm Anthocyane nicht allein abschirmten. Damit könnte die spektral weiter gefasste Abschirmung der Anthocyane überschätzt werden. Zu niedrige effektive Photonenflussdichten wären die Folge. Vor allem Carotinoide könnten den Effekt hervorgerufen haben. Wären sie in den Lichtsammelkomplexen vom Transfer der Anregungsenergie auf die Chlorophyllmoleküle entkoppelt, könnten sie mit dem Chlorophyll um die Absorption von Strahlung aus dem blauen Spektralbereich konkurrieren. Damit könnte bei einem absorptionsbasierten Lichtschutz die Wirksamkeit der Anthocyane im blauen Spektralbereich überschätzt werden. Als Carotinoide akkumulieren neben dem sauerstofffreien β -Carotin dessen Derivate, die Xanthophylle Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin, sowie das vom α -Carotin abgeleitete Lutein in nennenswerten Konzentrationen in den Thylakoidmembranen. Den langkettigen Chromophoren können *in vitro* Absorptionsmaxima im blauen Spektralbereich zwischen 420 und 495 nm zugeordnet werden (Wellburn 1994). Freie Carotinoide, die blaue Strahlung absorbieren können und die Anregungsenergie nicht weitergeben, treten unter moderaten Lichtbedingungen in Blättern kaum auf. Eingebunden in die Proteinmatrizen der Lichtsammelkomplexe sind die Carotinoide neben dem Energietransfer auch an deren struktureller Stabilisierung sowie an ihrer energetischen Entlastung über die thermische Dissipation beteiligt. In der Hauptkomponente der Lichtsammelkomplexe, im Lhcb, liegen neben den 14 Chlorophyllmolekülen (8 Chl a, 6 Chl b) zwei Bindungsstellen (L1 und L2) für Lutein und jeweils eine Aufnahmeposition für Neoxanthin und für ein Molekül des VAZ-Pools vor (Barros und Kühlbrandt 2009), während in den Untereinheiten CP29, CP26 und CP24 leichte Verschiebungen in den Chlorophyll-Xanthophyll-Verhältnissen auftreten (Barros und Kühlbrandt 2009). Die Bindung von Lutein an L1 ist essentiell für die funktionale Proteinfaltung (Formaggio et al. 2001) und zusammen mit L2-Bindung wahrscheinlich auch die Voraussetzung für die stabilisierende Trimerisierung der Lichtsammelkomplexe (Jahns und Holzwarth 2012). Vornehmlich in der Peripherie von LhcII besteht eine qualitative Variabilität an der Bindungsstelle der Xanthophylle, die an der thermischen Dissipation von Anregungsenergie beteiligt sind. Allerdings bleibt beim Austausch des nur schwach gebundenen Violaxanthins gegen Zeaxanthin die Stöchiometrie der akzessorischen Pigmente im Bezug zum Chlorophyll unverändert (Ruban et al. 1999).

Im Vergleich mit Blättern, die an Schwachlicht adaptiert sind, können hohe Lichtstärken, mit denen in der vorliegenden Arbeit auch die *Berberis*-Varietäten und die *Arabidopsis*-Genotypen behandelt wurden, die Gesamtmenge der zyklischen Xanthophylle erhöhen. So ließ das Wechselspiel zwischen einer höheren täglichen Photonenmenge, der vorhandenen photosynthetischen Kapazität und dem Anteil an exzessivem Licht die Poolgröße in Relation zu den Chlorophyllen um das Vierfache ansteigen (Thayer und Björkman 1990, Demmig-Adams und Adams 1992b), obwohl dafür Bindungsstellen in den Antennenkomplexen fehlen. Eine

variable Xanthophyllzyklus-Poolgröße belegen Pigmentanalysen entlang verschiedener Lichtgradienten in Kronendächern. Gegenüber dem graduellen Anstieg der Lichtmenge wies der VAZ-Pool die höchste Empfindlichkeit auf (Logan et al. 1996) und reagierte in Abhängigkeit von der eingestrahnten Photonenflussdichte innerhalb weniger Tage (Niinemets et al. 1998). Unter fordernden Umweltbedingungen, wenn bei hohen Photonenflussdichten zusammen mit kühlen Umgebungstemperaturen die photosynthetische Aktivität sinkt, maximierte der gestiegene Anteil des exzessiven Lichtes neben dem Konzentrationszuwachs von Lutein ebenfalls in erster Linie die Poolgröße des Xanthophyllzyklus (Haldimann et al. 1995, Adams und Demmig-Adams 1994). Solche Bedingungen ließen auch in den verwendeten *Arabidopsis*-Genotypen die VAZ-Poolgröße des an Schwachlicht akklimatisierten Wildtyps (1er) von 36 mmol mol⁻¹ Chl a+b auf 160 (1er) bzw. auf 190 mmol mol⁻¹ Chl a+b in der *tt3*-Mutante ansteigen (n = 9, Daten nicht gezeigt). Vor allem wird nach Lichtstress in der Fraktion der CP-Untereinheiten mehr schwach gebundenes Zeaxanthin detektiert, als die Anzahl der dort lokalisierten Violaxanthin-Aufnahmepositionen vermuten lässt (Verhoeven et al. 1999), so dass bei einem Sinken des Xanthophyll-Chl a-Verhältnis von 1/20 auf 1/12 eine Einlagerung von neu synthetisierten Xanthophyllen oder der Zufluss aus einem bereits bestehenden Reservoir nicht ausgeschlossen werden kann (Verhoeven et al. 1999). Zwar binden die CP-Untereinheiten im Lichtsammelkomplex somit zusätzliche akzessorische Pigmente, jedoch wird auch ersichtlich, wie die sterischen Vorgaben der Chlorophyll-Proteinmatrizen die komplette Einbindung eines großen Teils des Poolgrößenzuwachses blockieren.

Alternative Lokalisationen der Carotinoide ermöglichen ebenfalls eine mit den Chlorophyllen konkurrierende Absorption von blauem Licht. Die Molekülgröße und die polare Natur der endständigen Ringe prädestinieren Zeaxanthin für eine Eingliederung in die Phospholipiddoppelschicht der Membranen. Diskutiert wird eine dadurch einsetzende thermostabile Verdichtung der Membranen (Tardy und Havaux 1997, Havaux 1998) als auch eine erhöhte Viskosität bei Kühle (Varkonyi et al. 2002) als Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies. Zwangsläufig sollte bei der Neusynthese der Carotinoide an einem membranständigen Multienzymkomplex, der Phytoen desaturiert und zyklisiert (Cunningham und Gantt 1998), wie auch bei der nachfolgenden enzymatischen Hydroxylierung von α - und β -carotin an den Thylakoiden zu Zeaxanthin und Lutein (Davison et al. 2002) ein Reservoir an ungebundenen Zwischen- und Endprodukten entstehen. Ebenfalls freie Xanthophylle erfordert die Eingangsreaktion der Abscisinsäure-Biosynthese. Die Epoxycarotinoid-Dioxygenase benötigt als Ausgangssubstrat Violaxanthin und Neoxanthin in der cis-Konfiguration. Sie spaltete im Stroma einen terminalen β -Ionon-Ring vom Molekül ab, der als Xanthoxin ins Zytosol exportiert wird (Nambara und Marion-Poll 2005, Tan et al. 2001). Darüber hinaus wird vermutet, dass an der Doppelmembran von Plastiden Violaxanthin gebunden an Apoproteine bzw. an Proteinkomplexe ein integrierter Bestandteil weiterer Synthesewege ist (Markwell et al. 1992, Lichtenthaler 2007). Weiterhin wurden während der Blattseneszenz in Plastoglobuli veresterte Xanthophylle gefunden (Biswal 1995, Suzuki und Shioi 2004) und in unveränderter Form in Süßwasseralgen als Bestandteile von Lipidvesikeln identifiziert (Grünwald et al. 2001, Collins et al. 2011).

4.2 Die Auswirkungen der Abschirmung durch Anthocyane auf die Photosyntheseaktivität

Die Abschirmung von sichtbarem Licht durch Anthocyane müsste sich unmittelbar auf die Photosynthese auswirken. Als Vergleichsgröße bietet sich dabei die maximale Quantenausbeute (Φ) der Photosynthese an. Neben den verringerten Fluoreszenzausbeuten von Chlorophyllmolekülen könnte mit einer abgesenkten Quantenausbeute in der photosynthetischen Freisetzung von Sauerstoff die Abschirmung der Anthocyane ebenfalls quantifiziert werden. Pflanzen sind jedoch auch in der Lage, Lichtstärken selbst wahrzunehmen und als Reaktion ihren Photosyntheseapparat anzupassen. Die permanente Verringerung der eingestrahnten Photonenflussdichte durch die Anthocyane sollte daher eine Lichtakklimatisation hervorrufen. Daher stellen die Messungen der Quantenausbeute und der Lichtakklimatisation unabhängige Parameter dar, die die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen bestätigen könnten.

4.2.1 Die Wirkung der Abschirmung von Anthocyanen auf die Photosynthese

Unter der Annahme, dass D-Glucose das erste stabile Produkt der CO_2 -Fixierung ist, die eingestrahlte Quantenflussmenge mit Wellenlängen unterhalb von 700 nm direkt in den Photosystemen umgesetzt wird und dass 8 Photonen für die Evolution eines Sauerstoffmoleküls ausreichen, ergibt sich eine theoretische Quantenwirksamkeit von $0,125 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ (Bolton und Hall 1991). Um den ganzen Calvin-Benson-Zyklus laufen zu lassen, ist jedoch mehr ATP erforderlich, als der lineare Elektronentransport liefern kann. Die Elektronen sind nur für zwei NADPH_2 und für zwei statt der benötigten drei ATP ausreichend, so dass die Quantenausbeute sinkt. Im lichtlimitierten Abschnitt der Photosynthese ist Φ direkt proportional zu den verwendeten Photonenflussdichten und erwies sich mit $0,106 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ bezogen auf die absorbierte Strahlung in der Praxis als Konstante, die unabhängig von der Taxonomie höherer Pflanzen und von der Lichtakklimatisation der Blätter in Erscheinung tritt (Björkman und Demmig 1987, Öquist und Chow 1992).

Eine Absorption von photosynthetisch aktiver Strahlung durch Pigmente, die wie die Anthocyane nicht mit den Lichtsammelkomplexen assoziiert sind, sollte die Anzahl der Photonen verringern, die im PS II umgesetzt werden. Wie der Abb. 3.12 entnommen werden kann, führten Anthocyane in Bezug zur eingestrahnten Photonenflussdichte zu einer Verringerung der Quantenwirksamkeit um etwa 35 % von $0,101 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ auf $0,064 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$. Allerdings ist die Quantenausbeute nicht so konstant wie angenommen und kann durch das Emissionsspektrum der Strahlungsquelle geringfügig variieren. Wenn mit rotem Licht die unterschiedliche Absorption von PS II und PS I im Bereich von 450-520 nm umgangen (Evans 1987) und so ein ausgeglichener Elektronentransport ermöglicht wurde, ließen sich in grünen Blättern von C_3 -Pflanzen mit $0,111 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ (Evans 1987) und $0,125 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ (Osborne 1994) Quantenausbeuten beobachten, die relativ nah an das theoretische Maximum heranreichten. Das bedeutet für anthocyanhaltige Blätter, dass in den Photosynthesemessungen mit der Verwendung einer Halogenlampe mit einem relativ hohen roten Spektralanteil nicht nur die absolute Photonenwirksamkeit im PS II anstieg, sondern das beinhaltete ebenfalls, dass die relative Abschirmungseffizienz der Anthocyane sank. Wäre das Sonnenlicht, das spektral ausgeglichener ist, die treibende Quelle der Sauerstoffevolution, würde dagegen der Abschirmungseffekt der Anthocyane in roten Blättern im Vergleich mit der grünen Varietät zunehmen. Die mit Hilfe von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren berechnete Abschirmung der Halogenlampe lag bei

etwa 40 % (3.11 A). So zeigte sich im Vergleich zur abgesenkten Quantenausbeute der Sauerstoffevolution der zuvor geschilderte Zusammenhang.

Die für anthocyanhaltige *Berberis*-Blätter ermittelten Quantenausbeuten offenbarten im Literaturvergleich enorme Unterschiede bei der Bewertung der Abschirmungseffizienz. Während Zhang et al. (2011) zwischen roten und grünen Blättern von *Begonia semperflorens* bis zu einer eingestrahler PPFD von $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ keine Unterschiede bei der CO_2 -Fixierung in der Netto-Photosyntheserate sahen, verzeichneten Burger und Edwards (1996) in roten *Coleus*-Blättern ein Absinken der Quantenausbeute von $0,083 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ auf $0,061 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$, wenn Strahlung aus dem gesamten photosynthetisch aktiven Bereich die Sauerstoffevolution hervorrief. Allerdings erscheint es fragwürdig, den Abschirmungseffekt, der in diesem Fall bei etwa 25 % lag, auf der Grundlage von absorbierten Photonenflussdichten zu quantifizieren. Zwangsläufig würde die zusätzliche Absorption durch die Anthocyane eine erhöhte Photonenverfügbarkeit für die Ladungstrennung suggerieren, obwohl die Quanten durch die Trennung von Chlorophyll und Anthocyanen photochemisch unwirksam sind. Der Ansatz führt demnach zu einer Überschätzung der Abschirmungseffizienz. Eine Übertragung der Vorgehensweise auf die quantitative Analyse der Abschirmung in *Berberis*-Blättern hätte einen erkennbaren Anstieg zur Folge. Die Absorption in roten Blättern steigt um etwas über 20 % (Daten nicht gezeigt). Damit würde die Quantenausbeute in dunkelroten Blättern von 0,064 (Abb. 3.12) auf 0,054 absinken. Im Verhältnis zur Quantenausbeute der Sauerstoffevolution mit $0,101 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ in grünen Blättern aus der Schwachlichtakklimatisation ergäbe sich dadurch eine Abschirmung von 46 % mit einem scheinbaren Zuwachs von etwa 30 % in den dunkelroten Blättern.

In den bekannten Publikationen fehlen Hinweise zur Abhängigkeit der photosynthetischen Quantenausbeute von der Anthocyankonzentration, die eine optische Abschirmung belegen würde. Um zu überprüfen, ob die Bildung von Anthocyanen tatsächlich die Photonenwirksamkeit im PS II bestimmte, wurde die Transmission für grünes Anregungslicht der jeweiligen Quantenausbeute von Photosystem II gegenübergestellt. Die Regressionsanalyse bestätigte in guter Annäherung die Abhängigkeit der Sauerstoffevolution im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese von der Abschirmung grüner Strahlung (Abb. 3.13 A).

Wurden abschließend die Regressionsanalysen der spektral gewichteten Transmission der Halogenlampe, die für die photosynthetische Sauerstoffevolution verwendet wurde, und der apparenten Quantenausbeuten miteinander verglichen (Abb. 3.13 B), zeigten sich quantitative Abweichungen in der Abschirmungseffizienz der Anthocyane. Ausgehend von einer photosynthetischen Quantenwirksamkeit in den Photosystemen von $0,101 \text{ O}_2 \text{ Photon}^{-1}$ als Bezugsgröße zeigten die Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnisse eine höhere Abschirmung. Speziell bei hohen Anthocyankonzentrationen gaben die Fluoreszenz-Verhältnisse vor, dass in Bezug zur auftreffenden Lichtstärke ca. 10 % mehr Photonen abgeschirmt wurden, als es die photosynthetischen Quantenausbeuten vermuten lassen. Diese Diskrepanz könnte als Saldo jener eingehend diskutierten Teilprozesse verstanden werden, die aufgrund optischer Disparitäten zwischen isolierten Chloroplasten und ausdifferenzierten Blättern bzw. durch die anatomisch-morphologischen Anpassungen und die variable Chromophorzusammensetzung die Fluoreszenzausbeuten schwanken ließen.

4.2.2 Photosynthetische Kapazität

Die photosynthetische Kapazität von Blättern ist variabel und wird den vorherrschenden Lichtstärken angepasst (Sims und Pearcy 1991, Seemann 1989, Evans und Poorter 2001). Bei

einer Akklimation an Schwachlichtbedingungen sinkt die Aktivität der Rubisco und damit die lichtgesättigte Photosyntheserate (Boardman 1977, Anderson et al. 1995). Aufgrund der Abhängigkeit der photosynthetischen Kapazität vom Stickstoffgehalt des Blattes (Evans 1989) basiert diese Akklimation unter anderem auf dem zunehmenden Einbau des Stickstoffs in die Proteine der Lichtsammelkomplexe von PS II und dem sinkenden N-Verbrauch durch verringerte Rubisco-Gehalte (Anderson et al. 1995, Evans und Poorter 2001). Damit unterscheidet sich die Anpassung von einer Abschirmung im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese. Die dauerhafte Strahlungsabschirmung durch die Anthocyane müsste eine Schwachlichtakklimation der Photosynthese verursachen. Das heisst, in roten Blättern sollte die flächenbasierte Photosyntheserate die des grünen Phänotyps unterschreiten.

Die Blätter beider *Berberis*-Genotypen, die sich unter einer PPF von $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ entwickelten, wiesen erwartungsgemäß in Abwesenheit der roten Pigmente identische Photosyntheseraten auf, die mit weniger als $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ freigesetztem Sauerstoff (Abb. 3.14 A und 3.15) die Schwachlichtakklimation widerspiegelten und damit den Photosyntheseraten von Blättern in simuliertem Schatten entsprachen (Murchie und Horton 1997). Infolge der lichtinduzierten Anthocyan-Biosynthese in den beiden höheren Lichtakklimationsstufen traten Differenzen im Kurvenverlauf und in der maximalen Kapazität auf (Abb. 3.14 B und C, Abb. 3.15). Die nach einer Anzucht bei $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ abgegebene maximale Sauerstoffmenge grüner *Berberis*-Blätter entsprach mit $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ der Kapazität von anthocyanfreien Arten wie *Silene dioica*, *Festuca rubra* und *Urtica dioica*, die einer vergleichbaren Lichtakklimationsstufe entstammten (Murchie und Horton 1997). Die Photosyntheseraten roter Blätter aus der moderaten Lichtstufe als auch aus der Starklichtakklimationsstufe unterschritten signifikant diese Kapazität (Abb. 3.14 B und C, Abb. 3.15).

Wurde die spektrale Abschirmung der Fluoreszenzlampen berücksichtigt, die in der Kultivierung der Pflanzen Verwendung fanden, konnten die signifikant niedrigeren Sauerstoffraten in den roten Blättern aus der mittleren Akklimationsstufe als Ergebnis der von $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf etwa $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reduzierten effektiven Photonendichte angesehen werden. Analog dazu wurde in der roten Varietät aus der Starklichtakklimation die eingestrahlte Lichtstärke von $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf eine wirksame PPF von etwa $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ abgesenkt. Zwischen beiden Behandlungen bestanden nur tendenzielle Unterschiede in den lichtgesättigten Photosyntheseraten. Bei einer Gegenüberstellung der effektiven Photonendichten mit den maximalen Photosyntheseraten aus Abb. 3.15 ergab sich eine logarithmische Beziehung (Daten nicht gezeigt), die die Abhängigkeit des Gehaltes der großen Rubisco-Untereinheit von vergleichbaren Photonendichten bei der Kultivierung von *A. thaliana* nachzeichnete (Bailey et al. 2001). Vergleichbare Kapazitätsanpassungen sehen Nielsen und Simonsen (2011) für anthocyanhaltige *Oxalis triangularis*-Blätter und Gould et al. (2002b) für rote *Quintinia serrata*-Blätter. Letztere vermuten aufgrund photoakustischer O_2 -Messungen an Blattquerschnitten, dass insbesondere die Photosyntheserate des Schwammparenchyms angepasst wurde. Ein alternativer Erklärungsansatz zu den adaptiven Folgen einer Abschirmung, der die bisher dargestellten Überlegungen zu einer reduzierten Carboxylierung erweitert, erschließt sich aus der Arbeit von Kyparissis et al. (2007) über die photosynthetische Akklimation in roten Blättern von *Prunus cerasifera atropurpurea*. Die Autoren gehen davon aus, dass die Abschirmung grüner Strahlung weniger zu einer Anpassung der Photosyntheserate führte sondern vielmehr die Anzahl von Chloroplastenlagen im Sinne einer effektiven Lichtausnutzung reduzierte (Kyparissis et al. 2007). Die Blätter wären somit dünner und die flächenbasierte CO_2 -Fixierung würde dementsprechend abnehmen.

Übereinstimmende lichtgesättigte Photosyntheseraten von grünen und roten Blättern sind möglich und treten bevorzugt dann auf, wenn wie bei winterharten Pflanzen die anthocyanfreien Kontrollen stärker durch kühle Umgebungstemperaturen und hohe Quantenflussdichten vom Verlust der photochemischen Effizienz betroffen waren als ihre roten Vergleichspartner (Hughes und Smith 2007b) oder mit der kühleinduzierten Anthocyanakkumulation in Mais zwar eine potentiell schützende Abschirmung etabliert war, jedoch der Zeitrahmen mit einer zweitägigen Synthese der Anthocyane zu eng bemessen war, um eine Akklimatisation des Photosyntheseapparates zu bewirken (Pietrini et al. 2002).

An Starklicht angepasste Blätter verfügen über relativ hohe Rubisco-Gehalte (Boardman 1977, Seemann 1989). Die Aufrechterhaltung der damit verbundenen photosynthetischen Kapazität ist mit hohen Atmungsraten verbunden. Als ein weiteres, charakteristisches Merkmal einer Anpassung an Schwachlicht können demzufolge niedrigere Respirationsraten angesehen werden. Es wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die stetige Lichtabschirmung der Anthocyane im Zusammenhang mit einer reduzierten Photosyntheserate die mitochondriale Atmung verringert. Die in der Tabelle 3.1 aufgeführten Ergebnisse stützten diese Annahme jedoch nicht. Unabhängig von der jeweiligen Lichtakklimatisation wiesen beide *Berberis*-Varietäten einheitliche Respirationsraten auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei einem Transfer von an Schwachlicht adaptierten *Alocasia macrorrhiza*-Pflanzen in eine Starklichtumgebung die Respirationsrate innerhalb von nur 2-3 Tagen das Niveau der unter hohen Photonenflussdichten kultivierten Kontrollpflanzen erreichte, obwohl die photosynthetische Kapazität noch nicht erhöht wurde. Daher dient die Respiration nicht nur der Aufrechterhaltung einer bestimmten photosynthetischen Kapazität, sondern sie ist auch ein Abbild der Verarbeitung des lichtabhängigen Kohlenstoffzuwachses bzw. reflektiert eine verstärkte Nitratreduktion innerhalb eines gesteigerten Proteinumsatzes (Sims und Percy 1991). Ausgehend von einem unwahrscheinlichen erhöhten Energiebedarf für die Saccharose-Synthese und deren Export in roten *Berberis*-Blättern könnte dies bedeuten, dass die hohen Atmungsraten die energieverbrauchenden Aufbau der Anthocyan-Biosynthese und deren Aktivität repräsentierten. Zusätzlich würde sich bei einem permanenten Turnover der Anthocyane mit der über β -Glykosidasen und Peroxidasen vermittelten Degradation der Pigmente (Oren-Shamir 2009) der enzymbasierte Energiekonsum noch erweitern. Weniger spekulativ erscheint die Möglichkeit, dass die relativ geringen Abweichungen in den lichtgesättigten Photosyntheseraten nicht auf dramatischen Unterschieden im Rubiscopehalt beruhen. In diesem Zusammenhang stellt die Sauerstoffelektrode eine eher unpräzise Technik dar, um geringe Differenzen in den Atmungsraten zu erfassen.

4.2.3 Lichtakklimatisation der Antennenkomplexe

Besonders sensibel reagieren die Photosysteme auf Veränderungen in der Lichtverfügbarkeit. Das Verhältnis von Chlorophyll a / Chlorophyll b, das in seiner Variabilität die langfristigen Anpassungsreaktionen in den Antennensystemen erfasst, könnte auf die optische Abschirmung der Anthocyane reagieren. In Anwesenheit der Anthocyane konnte sowohl für die Frühphase der Blattentwicklung (Manetas et al. 2003, Hughes et al. 2007) als auch für ausdifferenzierte Blätter (Kyparissis et al. 2007) gezeigt werden, dass in roten Blättern das Chl a / b Verhältnis kleiner wurde. Jedoch fehlen Angaben darüber, inwieweit die Abschirmung der Anthocyane diesen Effekt bestimmte.

Um die Abschirmungswirkung nachzuweisen, wurden den drei Lichtakklimationsstufen Blattproben der beiden *Berberis*-Varietäten entnommen, nachdem die individuell eingestrahlte Lichtstärke entsprechend der Blattausrichtung bestimmt worden war. Basierend auf dem in dieser Arbeit vorgestellten Berechnungsansatz konnten für die einzelnen Blätter die photosynthetisch wirksamen Photonenflussdichten ermittelt werden. In Abbildung 3.16 A und B wurden die probenspezifischen externen und internen Photonenflussdichten den jeweiligen Chl a / Chl b-Verhältnissen gegenübergestellt. Erst der Bezug zur effektiven Photonenflussdichte hob die Unterschiede auf und die Mehrzahl der Datenpunkte vereinigte sich in einem weitestgehend gemeinsamen Funktionsverlauf, d.h. die Abschirmungseffizienz der Anthocyane könnte die beobachteten Unterschiede im Chlorophyll a/b-Verhältnis erklären. So spiegelten die Chlorophyll-Verhältnisse in den roten Blättern die etwa auf 50 % bezifferbare Abschirmung (Abb. 3.11 C) der Fluoreszenzlampen wider, die in den Lichtakklimationsstufen verwendet wurden. Unter Berücksichtigung der effektiven Photonenflussdichten bestätigten die nahezu übereinstimmenden Trendlinien der beiden Genotypen die Abschirmung der Anthocyane und folgen der vorrausgesetzten Lichtabhängigkeit der Anpassung. Allerdings bestanden vor allem in dunkelroten Blättern niedrigere Chl a / Chl b-Verhältnisse als die effektiven Photonenflussdichten vermuten lassen. Sie könnten durch die spektrale Überlagerung der Chl b-Absorption mit dem *in-vivo*-Absorptionsmuster der Anthocyane auf einer Überkompensation in der Umstrukturierung der LhcII-Komplexe beruhen.

4.2.4 Lichtakklimation der Pigmentmenge des Xanthophyllzyklus

Die Lichtakklimation berührt mit der Regulation der Antennengröße nicht nur die Stöchiometrie der primären Photosynthesepigmente, sondern setzt sich in der Verfügbarkeit der Xanthophylle fort, die in der Form von Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin (VAZ-Pool) an der thermischen Dissipation von überschüssiger Anregungsenergie beteiligt sind. Aufgrund der Lichtabhängigkeit erschien es folgerichtig, von einer Anpassung der Pigmentmenge als Ergebnis einer permanenten Verringerung der eingestrahlten Photonenflussdichten durch die Anthocyane auszugehen. Unverkennbar illustriert die Abbildung 3.17 A die lineare Abhängigkeit der VAZ-Pigmentmenge von der eingestrahlten Photonenflussdichte während der Kultivierung beider *Berberis*-Varietäten. Mit unveränderten 50 mmol VAZ mol⁻¹ Chlorophyll bezogen auf die eingestrahlte und die effektive Lichtstärke (Abb. 3. 17 B) bestätigt sich die Schwachlichtakklimation beider Phänotypen in ihrer grünen Blättern, die mit 30-50 mmol mol⁻¹ Chlorophyll auch für natürliche Schattenbedingungen beschrieben wurde (Demmig-Adams 1998). Konsequenterweise näherten sich die Pigmentmengen von Blättern aus der mittleren und der Starklichtakklimationsstufe mit etwa 70 und ca. 100 mmol mol⁻¹ Chlorophyll (Abb. 3.17 B) überraschend deutlich den Maximalwerten an, die bei ungehinderter Sonneneinstrahlung in verschiedenen Gehölzen und vasculären Pflanzen einen Gehalt von 80-150 mmol mol⁻¹ Chlorophyll erreichten (Demmig-Adams 1998), obwohl mit kontinuierlichen Lichtstärken während der Kultivierung Tagesspitzen von bis zu 2000 μmol m⁻² s⁻¹ nicht auftraten.

Die Anpassung der Pigmentmenge des Xanthophyllzyklus folgte sehr genau der Abschirmung durch die Anthocyane. In den roten Blättern aus der Starklichtakklimationsstufe stellten sich ziemlich genau jene Xanthophyllgehalte ein, die bei einer Abschirmung der Fluoreszenzlampen von etwa 50 % (Abb. 3. 11 C) bei einer effektiven Photonenflussdichte von 130-140 μmol m⁻² s⁻¹ auftreten sollten. Ein vergleichbarer Abschirmungseffekt war auch für die

roten Blätter aus der moderaten Lichtakklimatisation erkennbar. Die Pigmentmenge von etwa 80 $\mu\text{mol VAZ mol}^{-1} \text{Chl}$ gab in etwa die Abschirmung von 40 % wieder. Die strikte Abhängigkeit der Größe des Xanthophyllzyklus von den verfügbaren Lichtstärken unterstreicht die Arbeit von Bilger et al. (1995). Die Autoren belegen für Blätter von *Solanum tuberosum* für den weiten Bereich von 100 bis 1700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ die lineare Antwort der Xanthophyllsynthese und gehen aufgrund der Gegenüberstellung des Wildtyps und einer Fructose-Bisphosphatase-Mutante davon aus, dass exzessive Photonenflussdichten die Pigmentmenge regulierten. Nicht ohne weiteres können die Modellvorstellungen auf die Lichtakklimatisation des VAZ-Pools in den *Berberis*-Varietäten übertragen werden. Bei I_k -Werten, die den Eintrittsbereich in die Limitation der photosynthetischen Kapazität bei einer PPF von über 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verorteten, muss das Wirkungspotential der relativ geringfügigen exzessiven Lichtstärke kritisch betrachtet werden. Die Ausschließlichkeit einer Regulation der VAZ-Gesamtmenge durch überschüssige Photonen stellen ebenfalls die Ergebnisse von Demmig-Adams und Adams (1992b) in Frage, die für *Helianthus annuus*, *Cucumis sativus* und *Malva neglecta* die größten VAZ-Pigmentmengen bei Pflanzen mit der höchsten photosynthetischen Kapazität beobachteten. Vermutlich ist die Anpassungskapazität artspezifisch und abhängig von der bereits vorhandenen Lichtakklimatisation der Blätter. So passten periphere Blätter von *Tilia cordata* ihre Poolgrößen an zusätzliche, exzessive Photonenflussdichten an, und Blätter aus dem Inneren der Baumkrone mit der geringsten photosynthetischen Leistungsfähigkeit zeigten keine Reaktion, während Blätter von *Populus tremula* mit einer täglichen PPF von 10 $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ bzw. 40 $\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$ annähernd übereinstimmende VAZ-Poolgrößen aufwiesen (Niinemets et al. 2003). Grundsätzlich kann eine Beteiligung exzessiver Photonenflussdichten demzufolge nicht ganz ausgeschlossen werden, zumal an Schatten adaptierte Blätter nach einer täglichen Kurzbelichtung durch Lichtflecke intermediäre Poolgrößen zwischen Schattenblättern und ganztägig exponierten Blättern aufwiesen (Demmig-Adams 1998).

Die unmittelbaren VAZ-Anpassungen nach einer vorübergehenden Einlagerung von Anthocyanen sind auch für die Frühphase der Blattentwicklung und für saisonale Pigmentierungen bestätigt worden. Solange die roten Polyphenole präsent waren, war in sich entwickelnden Blättern von *Ricinus communis* und *Rosa spec.* ($\mu\text{mol VAZ cm}^{-2}$, Manetas et al. 2002) sowie in jungen Blättern von *Vitis vinifera* (VAZ Chl $a+b^{-1}$, Liakopoulos et al. 2006) oder in winterharten, anthocyanhaltigen Pflanzen (VAZ Chl $a+b^{-1}$, Hughes et al. 2012) die Xanthophyllmenge um bis zu 50 % geringer. Mangels Daten zur Abschirmungseffizienz der Anthocyane in den Publikationen ist die vergleichende Einordnung der *Berberis*-VAZ-Pigmentmengen in Relation zur blattinternen Lichtakklimatisation auch im Hinblick auf die eigentliche Regulation erschwert. Defizite in der Xanthophyll-Biosynthese scheinen unwahrscheinlich, da im Vergleich mit grünen Phänotypen nach dem Abbau von Anthocyanen übereinstimmende Pigmentmengen in grünen und roten Blättern auftraten (Liakopoulos et al. 2006, Hughes et al. 2012).

4.2.5 Einfluss der Anthocyane auf den Epoxidationsstatus des Xanthophyllzyklus

Neben der mittelfristigen Akklimatisation der VAZ-Poolgröße an veränderte Lichtbedingungen reflektiert der Epoxidationsgrad der Xanthophylle innerhalb weniger Minuten die Effizienz der Photosynthese bei variierenden Lichtstärken. Unter zunehmender Auslastung der Elektronentransportkette infolge steigender Photonenflussdichten bindet im azidifizierten Lumen bei pH-Werten $< 6,5$ die Violaxanthin-Deepoxidase (VDE) an die Thylakoidmembran. Für die

enzymatische Entfernung der beiden Violaxanthin-Epoxygruppen dient Ascorbinsäure als Substrat, das als Dehydroascorbat im Stroma durch Glutathion und NADPH recycelt wird (Gilmore 1997, Eskling et al. 1997). Liegen in den Antennenproteinen protonierte Carboxylgruppen vor, kann Zeaxanthin peripher an die Lichtsammelkomplexe binden und die Voraussetzungen für die thermische Dissipation von Anregungsenergie sind erfüllt (Gilmore 1997, Eskling et al. 1997).

Die entschiedene Lichtabhängigkeit der Deepoxidation, die sich als lineare Korrelation zwischen der photochemisch umgesetzten Anregungsenergie und der relativen Konzentration des noch nicht deepoxidierten Violaxanthin darstellen lässt (Demmig-Adams und Adams 1996), lässt den Xanthophyllzyklus geeignet erscheinen, die Abschirmungseffizienz der Anthocyane auch auf einer kurzfristigen Ebene zu erfassen. Zur Charakterisierung des Effektes wurden beiden *Berberis*-Varietäten Blattproben entnommen, nachdem die Pflanzen in den drei Lichtakklimatisationsstufen über 2 h den jeweiligen Photonenflussdichten ausgesetzt waren. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen der eingestrahnten Photonenflussdichten und dem Epoxidationsgrad des Xanthophyllzyklus, der ein Maß für exzessives Licht ist, eine lineare Korrelation bestand. Beide Genotypen wiesen bei Schwachlicht kaum eine VDE-Aktivität auf, bei moderaten Lichtbedingungen wurden ca. 3-5 % des Violaxanthins umgesetzt und die zwei Varietäten aus der Starklichtakklimatisationsstufe hatten im Maximum 10 % des Violaxanthin-Pools enzymatisch transformiert (Abb 3.18 A). Die sich fortsetzende Linearität dieser Beziehung und das geringe Ausmaß der VDE-Aktivität in den *Berberis*-Blättern, i.w.S. geringe exzessive Lichtstärken, belegen die Ergebnisse von Bilger et al. (1995), die für *Solanum tuberosum*-Blätter bis zu einer PPFD von $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ einen Violaxanthin-Umsatz detektierten, der in einem Anteil von 60 % gipfelte. Auch unter natürlichen Lichtverhältnissen lassen sich vergleichbare Umsatzraten ermitteln. In simulierten Kronendachlücken werden innerhalb von 1-4 h unter Photonenflussdichten, die bis zu $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erreichen, in Abhängigkeit von der bereits adaptierten Xanthophyll-Poolgröße und der Bestrahlungsdauer 60-80 % des verfügbaren Violaxanthins deepoxidiert (Krause et al. 2001).

Wurde der Epoxidationsgrad des Xanthophyllzyklus zu den photosynthetisch effektiven Photonenflussdichten ins Verhältnis gesetzt (Abb. 3.18 B), wird ersichtlich, dass sich zum einen die diversen Epoxidationzustände der roten *Berberis*-Blätter aus der mittleren Lichtakklimatisationsstufe in den generellen Funktionsverlauf der grünen Varietäten einordnen ließen und entsprechend die Abschirmung der Anthocyane widerspiegeln. Im Kontrast dazu folgten die Werte der roten Varietät aus der Starklichtakklimatisationsstufe nicht der linearen, inversen Korrelation zwischen wirksamer Photonenflussdichte und Epoxidationsgrad. Obwohl der Funktionsverlauf bei photosynthetisch wirksamen Photonenflussdichten von $100-120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Epoxidationsniveaus zwischen 0,97 und 0,95 vorgab, wurde in den Blättern von *B. thunbergii atropurpurea* bereits doppelt so viel Violaxanthin enzymatisch umgesetzt, als eigentlich aus der Lichtabhängigkeit hervorgehen dürfte. Das heißt, entgegen der Erwartung war der Anteil von exzessivem Licht an der eingestrahnten PPFD in den roten Blättern höher als in den grünen Vergleichspartnern. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Überlegungen von Eskling et al. (1997), deren Argumentation eine bessere Verfügbarkeit von Violaxanthin in der Peripherie der kleiner werdenden Antennenkomplexe bei Pflanzen einer höheren Lichtakklimatisationsstufe, vergleichbar mit dem grünen *Berberis*-Genotyp aus der Starklichtakklimatisationsstufe, plausibel erscheinen lässt. Unterstützt wird die Annahme zur notwendigen Freisetzung von Violaxanthin durch die Resultate von Verhoeven et al. (1999), die davon ausgehen, dass in Pflanzen einer höheren Lichtakklimatisationsstufe mehr peripheres

Violaxanthin schwach assoziiert mit den LhcII-Polypeptiden vorliegt und unter exzessiven Lichtbedingungen seine transiente Bindungsstelle verlassen kann. Nach Ansicht der Autoren ist es vor allem im Anschluss dieses freie Violaxanthin, das von der VDE-Aktivität erfasst wird und als Zeaxanthin einer bevorzugten Redistribution in die LhcII-Untereinheiten (CP29 und CP26) unterliegt.

Demzufolge basiert das vergleichsweise niedrigere Epoxidationsniveau in den Blättern des roten *Berberis*-Phänotyps höchstwahrscheinlich nicht auf einer gesteigerten Verfügbarkeit von Violaxanthin und auch nicht aufgrund veränderter Enzymaktivitäten, da der Xanthophyll-Zyklus nicht durch den plastidären Gehalt der Violaxanthin-Deepoxidase und der Zeaxanthin-Epoxidase limitiert wird (Jahns et al. 2009).

Zunächst wird auf der Grundlage der einfallenden PPFd deutlich, dass beide Phänotypen den gleichen EPS aufwiesen und somit von vergleichbaren Mengen überschüssigen Lichtes ausgegangen werden kann. Durch die Abschirmung der Anthocyane erreicht weniger Licht die Chloroplasten im Mesophyll. Allerdings wird aufgrund die permanente Abschirmung auch die Kapazität der Dunkelreaktionen verringert. Als Folge könnten die Licht- und Dunkelreaktionen wieder im Gleichgewicht sein und übereinstimmende Epoxidationsgrade wären die Folge. Im Bezug zur effektiven PPFd treten in den roten Blättern allerdings etwas höhere exzessive Lichtmengen auf. Unter Umständen war die Balance der photosynthetischen Teilreaktionen nicht gegeben, da die Kapazität der Dunkelreaktion geringer war oder zum relativ frühen Zeitpunkt der Probennahme die optimale Aktivität der einzelnen Enzyme im Tagesverlauf noch nicht auftrat.

Als Fazit für die beiden ersten Teile der Arbeit lässt sich feststellen, dass Anthocyane in Blättern das Mesophyll gegen photosynthetisch aktive Strahlung abschirmten. Vor allem grünes Licht wurde effektiv darin gehindert, die Chloroplasten zu erreichen. Dagegen konnte die Abschirmung für Strahlung aus dem blauen Spektralbereich nicht eindeutig bestimmt werden. Vielmehr schienen Anthocyane in hohen Konzentrationen auch gelbes und oranges Licht zu absorbieren. Die Abschirmung der Anthocyane verringerte die maximale Quantenausbeute der photosynthetischen Sauerstoffevolution mit 35 % in etwa in einem Umfang, der für die benutzte Halogenlampe auch mit den Chlorophyllfluoreszenzmessungen zur Berechnung der effektiven Photonenflussdichten bestimmt wurde. Die permanente Abschirmung durch Anthocyane führte auch zur Anpassung des Photosyntheseapparates. In roten Blättern konnte neben der abgesenkten Photosyntheseaktivität vor allem eine Akklimatisation der Lichtsammelkomplexe beobachtet werden. Die verringerten Chlorophyll a / b-Verhältnisse in roten Blättern unterstützen den zuvor festgestellten Abschirmungseffekt in seiner Größenordnung. Dunkelrote *Berberis*-Blätter aus der Starklichtakklimatisationsstufe zeigten Verhältnisse, die sich bei einer Abschirmung von 50 % ergaben. Das entsprach der berechneten Abschirmung von Fluoreszenzlampen, die in den Experimenten zur Lichtakklimatisation verwendet wurden. Auch in den Blättern aus der moderaten Lichtakklimatisation gab das Chlorophyll a / b –Verhältnis die Abschirmung wieder. Ebenso bestätigen die Pigmentmengen des Xanthophyllzyklus den Umfang der Lichtabschwächung. Rote und grüne Blätter zeigten eine gemeinsame Abhängigkeit der Pigmentmenge von der effektiven Photonenflussdichte. Gemäß der Lichtakklimatisationsstufe setzten die jeweils geringeren Pigmentkonzentrationen in den roten Blättern den linearen Funktionsverlauf entsprechend der Abschirmung fort. Allerdings ist fraglich, ob im Weißlicht allein die Anthocyane die Quantenausbeute der photosynthetischen Sauerstoffevolution verringerten und durch die dauerhafte Abschirmung die Lichtakklimatisation verursachten. Die Ergebnisse zur Abschirmung in Blättern von *A. thaliana* belegen, dass im blauen Spektralbereich

vor allem Carotinoide Licht abschirmen und eine Anpassung induzieren könnten. Inwieweit hohe Anthocyankonzentrationen in dunkelroten Blättern diesen Effekt überlagerten, muss offen bleiben.

4.3 Lichtschutzwirkung der Anthocyane

Anthocyane werden häufig unter Bedingungen gebildet, bei denen die Photosynthese beeinträchtigt ist. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Abschirmung könnte eine Lichtschutzwirkung der Pigmente darstellen, bei der Strahlungsschäden am Photosystem II durch die Absorption von überschüssigem Licht vermieden werden. Zum anderen zeigen Anthocyane *in vitro* eine hohe antioxidative Wirkung (Wang et al. 1997). Damit wären sie unter Umständen in der Lage, die Photosysteme bei Stressbedingungen zu schützen, indem sie photoaktivierten Sauerstoff neutralisieren.

4.3.1 Schutz vor Photoinhibition durch Anthocyane

Unabhängig vom eigentlichen Schutzmechanismus der Anthocyane kann die Hypothese formuliert werden, dass rote Blätter unter hohen Lichtstärken besser vor der Deaktivierung der Photosysteme geschützt sind als ihre grünen Vergleichspartner. Um die photoprotektive Wirkung der roten Pigmente *in vivo* nachzuweisen, wurden Blattscheiben des Wildtyps von *A. thaliana* (ler) und der anthocyanfreien Transparent-Testa-Mutante (*tt3*) bzw. der quercetinfreien und im Anthocyan Gehalt reduzierten Mutante (*tt7*) unterschiedlichen Lichtstärken ausgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass speziell bei hohen Photonenflussdichten aus dem gesamten Spektralbereich photosynthetisch aktiver Strahlung anthocyanhaltige Blätter des Wildtyps in signifikanter Weise weniger von der PS II-Deaktivierung betroffen waren als die Blätter der beiden *tt*-Mutanten (Abb. 3.21 A). Es traten dabei Unterschiede in den Inhibitionsraten von etwa 35-40 % auf. Jedoch scheint die geringe Konzentration der Anthocyane in den Blättern der *tt7*-Mutante (Abb. 3.20 A) wirkungslos gewesen zu sein. Vielmehr könnte das fehlende Quercetin, das wie die Anthocyane zwei Hydroxygruppen am B-Ring besitzt, als Ursache der relativ deutlichen Photoinhibition angesehen werden.

Die Inhibition von Photosystem II kann als Netto-Ergebnis zweier gegenläufiger Prozesse betrachtet werden. Aufgrund der permanenten Reparatur von Photosystem II durch den Einbau neu synthetisierter D1-Proteine werden die Folgen einer photooxidativen Deaktivierung der Reaktionszentren so lang minimiert, bis die Kapazität der enzymatischen Instandsetzung überschritten wird. Um etwaige Unterschiede in der Kapazität des Reparaturzyklus zwischen dem Wildtyp und der Transparent Testa-Mutanten auszuschließen, wurden in weiteren Experimenten die drei Genotypen mit dem Inhibitor Lincomycin inkubiert. In Anwesenheit von Lincomycin ist die plastidäre Synthese des D1-Proteins blockiert, so dass inhibierte Photosysteme akkumulieren, deren beschädigte D1-Proteine zwar degradiert, aber nicht ersetzt werden, und im Zuge des D1-Nettoverlustes die photochemische Quantenausbeute weiter sinkt (Tyystjärvi und Aro 1996, Mueh Bachmann et al. 2004). Die Auswirkungen eines gehemmten Reparaturzyklus spiegelten sich unmittelbar in den veränderten Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photoinhibition wider. Die lineare Abhängigkeit der PS II-Inhibition von der eingestrahelten Quantenflussmenge wich einer Sättigungsfunktion (Abb. 3.21 B). Unter Beibehaltung der eingestrahelten Photonenflussdichten verdreifachte sich die PS II-Deaktivierungsrate in den Blättern der *tt*-Mutanten schon unter

moderaten Lichtstärken und erreichte bereits bei $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ihr Maximum in einem vollständigem Verlust der photochemischen Effizienz. Allein die anthocyanhaltigen Blattproben des Wildtyps tolerierten hohe Photonenflussdichten, so dass eine umfassende Deaktivierung der Photosysteme erst bei $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Erscheinung trat. Auch bei einer inhibierten Neusynthese des D1-Proteins blieben die relativen Unterschiede in den Lichtfluss-Effekt-Kurven der Photodeaktivierung zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten weitestgehend erhalten.

Eine allgemeingültige Aussage zum Zusammenhang zwischen der Einlagerung von Anthocyanen und dem Lichtschutz von PS II wird dadurch erschwert, dass in den Publikationen konträre Ergebnisse zu finden sind und Angaben zum Absorptionsverhalten der Anthocyane oft auf uneinheitlichen bzw. in der Sensitivität eingeschränkten Methoden beruhen. Auch vergleichen die Analysen zum Lichtschutz der Anthocyane oft Blätter verschiedener Entwicklungsstadien. Weiterhin berücksichtigen spektrophotometrische Messungen an den extrahierten Anthocyanen unter Umständen weder deren Komplexverbindungen in der Vakuole, noch die optischen Besonderheiten der Blattstruktur und die Kombinationen unterschiedlicher Chromophore in variierenden Konzentrationen, die nach einer Anthocyan-Biosynthese in juvenilen, ausdifferenzierten oder seneszierenden Blättern auftreten. Im weiteren Sinne beachten die Veröffentlichungen nur die Ab- bzw. Anwesenheit der Anthocyane, ohne die Abschirmung zu quantifizieren.

Während Lan et al. (2011) variierende PS II-Schädigungsraten in sich entwickelnden grünen und roten Blättern von *Fagopyrum dybotris* unter natürlichen Lichtverhältnissen ausschließen, notieren Manetas et al. (2002) für junge, anthocyanhaltige Blätter von *Ricinus communis* und *Rosa spec.* im Vergleich mit den adulten, grünen Blättern deutliche Unterschiede bei der PS II-Deaktivierung. Die hohen Anthocyanengehalte in den juvenilen Blättern, die basierend auf Absorptionsmessungen an den gelösten Pigmente die Konzentrationen in den ausdifferenzierten Vergleichsblattproben um das 21- bzw. 27-fache überstiegen, gingen einher mit einer relativen Verringerung der PS II-Inhibition von 50 bzw. 33 % (Manetas et al. 2002). Um etwa 25 % sank die PS II-Deaktivierung in roten Blättern der karnivoren Pflanze *Pinguicula vulgaris*, wenn sich im Vergleich mit grünen Blättern die Absorption der Blattextrakte bei 525 nm verdreifachte (Mendez et al. 1999).

Werden die *in vivo*-Verhältnisse bei der Einlagerung von Anthocyanen in Blätter berücksichtigt, kann einer um 85 % verringerten Transmission für grünes Licht nach einer Weißlichtbehandlung bei Kühle ein um etwa 35 % reduzierter Funktionsverlust von Photosystem II gegenübergestellt werden (Hughes und Smith 2007a). Ebenfalls bei niedrigen Temperaturen durchgeführte Behandlungen mit hohen Photonenflussdichten lassen Pietrini et al. (2002) schlussfolgern, dass für *Zea mays*-Blätter mit einer kühleinduzierten Anthocyan-Akkumulation die Lichtmenge verdoppelt werden muss, um das gleiche PS II-Schadensniveau zu erreichen wie in den Blättern des grünen Phänotyps. Im Widerspruch dazu sehen die Autoren basierend auf dem berechneten linearen PS II-Elektronentransport allerdings nur einen photosynthetischen Unterschied von ca. 28 % zwischen grünen und roten Blättern.

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte Schutz der Anthocyane vor Photoinhibition wird durch die Aussagen von Havaux und Kloppstech (2001) zum photoprotektiven Potential der Pigmente nur teilweise bestätigt. Die Autoren sehen zwar einen Effekt, stellen die Wirksamkeit der Anthocyane aber in Frage, da nach einer mehrtägigen Induktionszeit die anthocyanfreie *tt3*-Mutante im Vergleich zum *Arabidopsis*-Wildtyp nur einen um etwas über 10 % erhöhten Effizienzverlust von PS II aufwies. Vielmehr wird die auffällige Photoinhibition des *tt5*-Genotyps, der aufgrund der Deletion der Chalcon-Isomerase frühzeitig im

Flavonoid-Biosyntheseweg blockiert ist, genutzt, um für eine Rolle von Quercetin und Kämpferol als blaulichtabsorbierende Schutzpigmente im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 420 nm innerhalb einer längerfristigen Adaptationsstrategie zu argumentieren (Havaux und Kloppstech 2001). Zumindest wäre damit ein Ansatz gegeben, die erhöhte Photoinhibitionsrate von PS II in den Blättern der *tt7*-Mutante trotz der Präsenz geringer Anthocyanmengen zu verstehen.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit und die Ergebnisse verschiedener Publikationen eröffnen den Raum für eine Interpretation, in der die Anthocyane im Lichtschutz durch Abschirmung wirken, da zwischen der eingestrahnten Lichtstärke und der Photoinhibition eine lineare Abhängigkeit besteht (Park et al. 1995, Melis 1999) und von einer konstanten Quantenausbeute der Photodeaktivierung (Tyystjärvi und Aro 1996) ausgegangen werden kann. Das heißt, je mehr Licht durch die Anthocyane abgeschirmt wird, desto weniger ist Photosystem II von der Inhibition betroffen.

4.3.2 Die Wirksamkeit von grünem Licht in der Photosynthese und bei der Photoinhibition

Wenn Anthocyane den Photosyntheseapparat durch Abschirmung schützen, ist der Effekt nur für grüne Strahlung wirksam. Es stellt sich daher die Frage, ob die Abschirmung gegen grünes Licht, das vom Chlorophyll nur in geringem Umfang absorbiert wird, strahlungsinduzierte Schäden am Photosyntheseapparat verhindern kann.

Die gestapelten Thylakoide und die Verteilung der Plastiden im heterogenen Mesophyll bedingen einen Absorptionszuwachs für grünes Licht. Aktionsspektren belegen die photosynthetische Relevanz dieses Spektralbereiches im Blatt bei einer derart strukturbedingten Verlängerung des optischen Pfades. Es konnte gezeigt werden, dass Blätter von *Phaseolus vulgaris* im lichtlimitierten Bereich der Photosynthese mit grüner Strahlung 70 % der maximalen CO₂-Fixierungsrate erzielten (Balegh und Biddulph 1970). Gelbes und oranges Licht aus dem Bereich von 580 und 600 nm, in dem Anthocyane *in vivo* noch äußerst effektiv absorbierten (Abb. 3.1 A und 3.8 B), steigerten die Carboxylierung auf 90 % der maximalen Rate (Balegh und Biddulph 1970). Basierend auf der Bestimmung maximaler CO₂-Gaswechselraten gelang Inada (1976) der Nachweis, dass sich in den Blättern verschiedener annueller und ausdauernder Pflanzen die höchsten Photonenwirksamkeiten auf einem breiten Niveau zwischen 560-680 nm stabilisierten. Das relativ flache Aktionsspektrum intakter Blätter ist vor allem Ausdruck einer guten Quantenausbeute von grüner Strahlung in den tief liegenden Zellschichten des Mesophylls. Die blattstrukturellen Heterogenitäten begünstigen eine Situation, in der die Verlängerung der optischen Pfadlänge zu einer erhöhten Absorptionswahrscheinlichkeit für grünes Licht führt (Inada 1976). Entsprechend der Angaben von Sun et al. (1998) manifestierte sich der Effekt jenseits der Blattmitte, in einem Abstand von 250-300 µm zur adaxialen Epidermis, in einer maximalen ¹⁴CO₂-Fixierungsrate, die die für blaues und rotes Licht im oberen Palisadenparenchym ermittelten annähernd erreichte. Unter hohen Photonenflussdichten aus dem grünen Spektralbereich partizipierten Zellschichten nahe der abaxialen Epidermis sogar soweit an der Carboxylierung, dass sich die für rote und grüne Strahlung ermittelten photosynthetischen Lichtfluss-Effekt-Kurven des CO₂-Gaswechsels im Sättigungsniveau überlagerten (Terashima et al. 2009). Dabei können gerade im lichtgesättigten Bereich der Photosynthese die Quantenausbeuten grüner Strahlung jene des roten Lichtes oberhalb von 660 nm sogar übersteigen (Terashima et al. 2009).

Die optimale photosynthetische Ausnutzung des gesamten Wellenlängenbereiches durch Blätter beinhaltet demnach auch, das die intrinsische Kapazität des Photosyntheseapparates zur photochemischen Ableitung von Anregungsenergie nicht nur für blaues und rotes Licht, sondern auch für grüne Strahlung in einem ähnlichen Ausmaß begrenzt ist. Das bedeutet, auch grünes Licht kann ein exzessives Niveau erreichen und Photoinhibition hervorrufen. In der Tat wiesen Aktionsspektren der Photoinhibition intakter Blätter von *A. thaliana* für weite Teile der photosynthetisch aktiven Strahlung keine Maxima auf (Sarvikas et al. 2006, Takahashi et al. 2010). Von 700 nm bis etwa 470 nm dominiert dabei die Chlorophyllabsorption die Initialphase der Photoinhibition und bei kürzeren Wellenlängen nimmt die Absorption des Mangan-Clusters als primäre Ursache der Photodeaktivierung zu (Sarvikas et al. 2006). Bei *Arabidopsis*-Blätter, in denen die *de novo*-Synthese des D1-Proteins mit Chloramphenicol blockiert war, lag der relative Wirkungsschwerpunkt im solaren Spektrum sogar im Absorptionsbereich der Anthocyane bei 500-600 nm, da dort die spektrale Quantenwirksamkeit des photodestruktiven Effekts am ausgeprägtesten war (Takahashi et al. 2010).

4.3.3 Schutz vor Photoinhibition durch Abschirmung grüner Strahlung

Mit der verringerten Photoinhibition roter Blätter unter hohen Photonenflussdichten aus dem gesamten photosynthetisch aktiven Spektralbereich konnte eine Schutzwirkung der Anthocyane nachgewiesen werden (Abb. 3.21 A und B). Allerdings war es nicht möglich, zwischen der Abschirmung und der antioxidativen Wirkung zu unterscheiden. Wenn der Lichtschutz im Weißlicht auf der Abschirmung der Anthocyane beruhte, sollte unter Beachtung der *in vivo*-Absorption der roten Pigmente die Schädigung von Photosystem II nach einer Bestrahlung mit Wellenlängen, die nur teilweise (blauer Spektralbereich), fast vollständig (grüner Spektralbereich) oder kaum (roter Spektralbereich) von den Anthocyanen absorbiert werden, den optischen Lichtschutz belegen. In bemerkenswerter Weise bestätigten die Ergebnisse in Abb. 3.22 B diese Annahme. Zwar scheint die Absorption von blauem Licht durch Anthocyane in den Blättern des Wildtyps und in den Blattproben der *tt7*-Mutante (Abb. 3.22 A) nur eine tendenzielle oder keine photoprotektive Wirkung zu besitzen, jedoch folgte die Photoinhibition in den beiden langwelligeren Spektralbereichen dem Absorptionsmuster der Anthocyane. Zum einen sanken bei der Verwendung von grünem Licht in Relation zur anthocyanfreien *tt3*-Mutante die Inhibitionsraten in den roten Blättern des Wildtyps und der *tt7*-Mutante um 75 % und 35 %, zum anderen schädigte rote Strahlung oberhalb von 645 nm, die von den Anthocyanen nicht absorbiert wird, die Photosysteme der drei Genotypen in gleichem Maße.

Den Umfang des Lichtschutzes bestätigen die Daten zur Photoinhibition aus der Studie von Hughes et al. (2005). Die winterliche Einlagerung der Polyphenole in das Mesophyll von *Galax urceolata*-Blättern hatte zur Folge, dass durch grünes Licht PS II um etwa 70 % weniger inhibiert wurde als in den anthocyanfreien Kontrollproben, und dass vermutlich auch die enzymatische Wiederinstandsetzung der Photosysteme in signifikanter Weise geringfügiger von photooxidativen Degradationsprozessen betroffen war (Hughes et al. 2005).

Der Lichtschutz durch Abschirmung könnte auf einer akzeptorseitigen Entlastung von PS II beruhen. Darauf deuten verschiedene Analysen von Chlorophyllfluoreszenz-Daten hin. Beispielsweise wurde mit einer PPF von $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aus dem blaugrünen Spektralbereich die Kapazitätsgrenze der nichtphotochemischen Ableitung von Anregungsenergie in roten Blättern von *Cornus stolonifera*, die Anthocyane in der Auftaktphase der Blattseneszenz verstärkt einlagerten, nicht erreicht (Feild et al. 2001) und die effektive PS II-Quantenausbeute wies nur

einen moderaten Wirkungsverlust von etwa 35 % auf, während in den Blättern der „gelb“ seneszierenden Kontrollproben der Elektronentransfer durch Photosystem II fast vollständig zum Erliegen kam (Feild et al. 2001). Eine akzeptorseitige Entlastung belegen auch die Daten von Smillie und Hetherington (1999). Wenn in den roten Schoten von *Bauhinia variegata* die Absorption von grünem Licht anstieg, verharrte der Koeffizient des photochemischen Fluoreszenzlöschung (q_p) unter hohen Lichtstärken aus dem blaugrünen Bereich bei Werten um 0,8, während q_p in den grünen Schoten der Kontrollproben auf 0,3 sank. So lag durch die Absorption der Anthocyane der primäre Elektronenakzeptor Q_A ausreichend oxidiert vor und eine Photoinhibition wurde damit unwahrscheinlicher (Smillie und Hetherington 1999).

Zusätzlich ermöglichen die Daten in Abbildung 3.22 A und 3.24 eine Diskussion über einen weiteren Mechanismus, der neben einer Limitation an der Akzeptorseite zu einer lichtabhängigen Deaktivierung von PS II führte. Besonders offensichtlich wird dies, wenn die Photoinhibitionsraten verursacht durch blaue und rote Strahlung miteinander verglichen werden. Bei übereinstimmender auftreffender Photonenflussdichte war PS II in der Blaulicht-Behandlung deutlich stärker deaktiviert. Die Daten stützen die Modellvorstellungen zur donorseitigen Inhibition von Photosystem II durch blaue Strahlung bzw. zu dessen zweistufiger Deaktivierung (Ohnishi et al. 2005, Hakala et al. 2005, Oguchi et al. 2011). Dabei gilt die Konstanz der Quantenausbeute in der Photodeaktivierung (Tyystjärvi 2008) voraussichtlich für die Donor- und die Akzeptorseite, wenn die eingestrahelte Lichtmenge einerseits die Absorptionseignisse des Mangan-Clusters bestimmt und wenn die Absorption überschüssiger Strahlung bei einem unveränderten Anteil exzessiver Anregungsenergie allein von der Photonenflussdichte abhängt (Oguchi et al. 2011).

Als Resultat ergibt sich aus den vorliegenden Daten und den Modellvorstellungen die Annahme, dass in den Blättern der verwendeten *Arabidopsis*-Genotypen Photosystem II durch Strahlung aus dem blauen Wellenlängenabschnitt vermutlich auch über den Mangan-Mechanismus deaktiviert wurde. Demzufolge wäre ein pigmentbasierter Schutz dieses Spektralbereiches besonders effektiv, gleichwohl eine vorwiegende Wirkung der Anthocyane dahingehend aber bezweifelt werden muss. Gewiss folgt die PS II-Deaktivierung in ihrer Tendenz den spektral aufgelösten relativen Transmissionsverhältnissen in den Blättern der drei Genotypen (Abb. 3.22 A und B), allerdings wird auch ersichtlich, dass in Anbetracht der mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp vergleichbaren Abschirmung von blauem Licht in den Blättern der *tt3*-Mutante (Abb. 3.19) vornehmlich freie Carotinoide in diesem Spektralbereich einen Lichtschutz besitzen. Gegen die bevorzugte Beteiligung der Anthocyane am Schutz des Wasserspaltungsapparates spricht die eher wirkungslose Einlagerung der roten Pigmente in das Mesophyll der *tt7*-Mutante (3.21 B und 3.22 B). In Anlehnung an Havaux und Kloppstech (2001) könnte Quercetin bis zu einer Wellenlänge von 420 nm als das effektivere Abschirmungspigment angesehen werden. Das Fehlen des Flavonols in der *tt7*-Mutante könnte die Sensitivität der Photosysteme gegenüber blauer Strahlung ansatzweise erhöhen, zumal gerade im kurzwelligen Bereich dieses Abschnittes die Absorptivität von manganenthaltenden Komplexverbindungen und die photoinhibitorische Effizienz mit steigendem Energiegehalt der Quanten exponentiell zunehmen (Hakala et al. 2005, Ohnishi et al. 2005). Allerdings war in der Blaulichtbehandlung der effektive Anteil der Strahlung unterhalb von 420 nm sehr gering (Abb. 3.23 B), so dass die tendenziell höhere PS II-Inhibition in den Blättern der *tt7*-Mutante (Abb. 3.22 B) aus der fehlenden antioxidativen Wirkung hervorgegangen sein könnte.

In Erweiterung der Schlussfolgerungen von Oguchi et al. (2011) zur blattinternen Heterogenität der Photoinhibition und der Überlegungen von Nishio (2000) zur dynamischen

Blattabsorption lässt sich abschließend ein Modell des mehrfachen Lichtschutzes entwerfen. Darin schützen Anthocyane zusammen mit Flavonolen und „freien“ Carotinoiden die Photosysteme nahe der adaxialen Epidermis durch Abschirmung vor exzessivem Anregungsdruck. Neben den beiden Pigmenten könnten Anthocyane in geringem Umfang vor allem im Palisadenparenchym auch blaue Strahlung absorbieren, die den Mangan-Cluster von Photosystem II deaktiviert. Inwieweit Anthocyane dadurch tatsächlich einen Lichtschutz bieten, konnte aber nicht geklärt werden. Darüber hinaus würden Anthocyane durch Absorption allerdings grünes Licht aus dem Bereich von 500-600 nm daran hindern, tief im Inneren des Blattes eine akzeptorseitige Limitation der Photosysteme zu verursachen.

4.4 Lichtschutzwirkung der Anthocyane durch ihre antioxidative Wirkung

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Abschirmung gegen photosynthetisch aktive Strahlung erlaubt zusammen mit den Ergebnissen aus den Experimenten zur Photoinhibition die Schlussfolgerung, dass Anthocyane den Photosyntheseapparat bei Lichtstress über die Abschirmung schützen. Ob Anthocyane parallel dazu über ihre antioxidative Kapazität die Komponenten der Elektronentransportkette vor den destruktiven Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies bewahren, oder ob *in vivo* nur einer von beiden Schutzmechanismen auftritt, ist nicht eindeutig geklärt. Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit besteht deshalb darin, bei photooxidativem Stress das bisher nur *in vitro* charakterisierte Nebeneinander der beiden Schutzmechanismen auch *in vivo* zu analysieren und den Anthocyanen eine eindeutige Funktion im Lichtschutz zu geben. In besonderem Maße schien wiederum die vergleichende Gegenüberstellung des Anthocyane bildenden Wildtyps von *A. thaliana* und der Transparent-Testa Mutante *tt3*, die aufgrund der Deletion der Dihydroflavonol-4-Reductase unter gleichen Voraussetzungen keine Anthocyane synthetisiert, geeignet zu sein, die antioxidative Wirkung der roten Pigmente zu erfassen. Da unter extremen Wachstumsbedingungen in nicht unerheblichem Umfang Quercetin in den Blättern akkumuliert, bot die *tt7*-Mutante, deren Flavonol-Biosynthese durch die fehlende Flavonol-3'-Hydroxylase auf Kämpferol beschränkt ist, die Möglichkeit, etwaige Kompensationseffekte durch die antioxidative Wirkung von Quercetin zu überprüfen.

4.4.1 Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies in der Photoinhibition

Neben Strahlung können aber auch diverse reaktive Sauerstoffspezies die Deaktivierung der Photosysteme verursachen. Durch ihre reduzierende Wirkung wären beide Flavonoide in der Lage, diese zu neutralisieren. Es besteht in diesem Zusammenhang aber Uneinigkeit darüber, welche Sauerstoffspezies die Photosysteme inaktivieren und welche weiteren Zellbestandteile von der photooxidativen Degradation betroffen sind. Bedingt durch ihre subzelluläre Lokalisation scheint die theoretische Wirkungswahrscheinlichkeit von Anthocyanen und Quercetin begrenzt zu sein. Wenn der hochreaktive Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) sowie die toxischen Superoxid-Anionen (O_2^-) und Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) nur mit ihrer unmittelbaren Umgebung interagieren, ist fraglich, ob die finale Sequestrierung der Anthocyane in die Vakuole (Marrs et al. 1995) und die zytosolische Lokalisation des Quercetins (Peer et al. 2001) überhaupt einen effektiven Schutz ermöglichen.

Für künstlich erzeugten Singulett-Sauerstoff konnte in Blättern von *Nicotiana tabacum* eine lokal begrenzte Reaktion des aktivierten Moleküls demonstriert werden (Hideg et al. 2007). Parallel zum Funktionsverlust von PS II trat nach einer Starklichtexposition ein massiver Verlust des D1-Proteins auf, dessen detektierbare Restmenge oxidativ modifiziert (Hideg et al. 2007) oder für eine akzeptorseitig initiierte Photoinhibition charakteristisch fragmentiert zu sein schien (Barber 1994, Mishra et al. 1994).

Detaillierte Publikationen zur Inhibition von Photosystem I erlauben ebenfalls die Einschätzung, dass auch Superoxid-Anionen nur in der unmittelbaren Nähe ihres Ursprungs wirksam werden. Im Kontrast zum Ferredoxin, das über die Bildung von OH[•] ausgehend von einer Haber-Weiss-Reaktion seine eigene Deaktivierung einleiten könnte (Herbert et al. 1992), wären mit PSI-C, PSI-D bzw. PSI-E und PSI-A sowie PSI-B die zentralen, strukturgebenden Polypeptide von Photosystem I betroffen (Scheller und Haldrup 2005). Die Degradation der Proteine wurde dabei erst initiiert, nachdem die Eisen-Schwefel-Zentren in ihrer Elektronentransportrate limitiert waren (Tjus et al. 1998). Indes ist bei genauerer Betrachtung zum einen unklar, ob Superoxid direkt oder in einer anderen Form die Bildung von 45 oder 51 kDa-Fragmenten des PSI-B-Proteins bewirkte und zum anderen, inwieweit die Fragmentierung die Inaktivierung von Photosystem I widerspiegelt (Sonoike 1996). Unter Umständen kann Superoxid auch direkt am Photosystem II entstehen und seine destruktive Wirkung entfalten. Durch die Bestrahlung isolierter PS II-Membranpartikel konnte demonstriert werden, dass vermutlich ausgehend von Phäophytin über einen von Plastochinon vermittelten Elektronentransfer Cytb₅₅₉ im Zustand eines niedrigen Redox-Potentials reduziert wurde und durch spontane Autoxidation molekularen Sauerstoff aktivierte (Pospíšil et al. 2006).

Als äußerst unwahrscheinlich muss ein direktes antioxidatives Wirkungspotential von Anthocyanen und Quercetin gegenüber Hydroxyl-Radikalen bewertet werden. Zwar ist für Hydroxyl-Radikale grundsätzlich ein erweiterter Reaktionsradius denkbar, da in der Zelle die annähernd ubiquitär verteilten zwei- und höherwertigen Metallionen in Verbindung mit dem permeablen Wasserstoffperoxid OH[•]-Radikale in allen Kompartimenten generieren könnten. Dabei werden zum Beispiel in den Plastiden nicht nur die Reaktionszentren von PS II, sondern alternativ auch andere Komponenten des Photosyntheseapparates oxidativ beschädigt. Während Tschiersch und Ohmann (1993) beim Verlust von [¹⁴C]Atrazin-Bindestellen in Anwesenheit von OH[•]-Radikalen Konformationsänderungen des D1-Proteins oder wichtiger prosthetischer Gruppen in den Fokus rücken, proklamieren Kim und Lee (2005) eine direkt verursachte D1-Degradation. Auch in den peripheren Antennenkomplexen wäre eine destruktive Wechselwirkung mit der hochreaktiven Sauerstoffform vorstellbar (Zolla und Rinalducci 2002). Sogar im Stroma sind Reaktionen beobachtet worden, die von Hydroxyl-Radikalen ausgehen. Dazu gehören die Spaltung der großen Rubisco-Untereinheit (Nakano et al. 2006) als auch der Verlust Thioredoxin-regulierter Enzyme wie der Ribulose-5-Phosphat-Kinase (Shen et al. 1997).

Ebenfalls im Hinblick auf den zweiten, vielleicht sogar physiologisch relevanteren Reaktionsschwerpunkt der Hydroxyl-Radikale, bei dem die strukturelle Integrität der Membranen zerstört wird, scheint die räumlich-funktionale Diskrepanz zwischen dem antioxidativ wirksamen Quercetin bzw. den Anthocyanen und der toxischen Sauerstoffformation fortzubestehen. Im direkten Umfeld ihres Entstehens initialisieren OH[•]-Radikale die Kettenreaktion der Lipidoxidation, indem sie Wasserstoffatome proximal ungesättigter Phospholipide entfernen (Girotti 1998). Ein ungehinderter Zugang von Triplett-Sauerstoff zu den Lipid-Radikalen fördert im Anschluss das Entstehen von Peroxyl-Radikal-Intermediaten, die sich lokal als Lipidhydroperoxide stabilisieren (Gutteridge und Halliwell 1990, Girotti 1998). Nach einer

doppelten Zyklisierung und der Kopplung mit Sauerstoff lässt eine weitere Reduktion das toxische Malondialdehyd entstehen (Valko et al. 2005), das dann besonders mit benachbarten Proteinen und DNS interagieren kann.

Einzig Wasserstoffperoxid könnte den Reaktionsradius von Quercetin und Anthocyanen erreichen. Die Mobilität von H_2O_2 könnte analog zum Wasser in Abhängigkeit von der Fettsäuren-Komposition der Membranen und dem Phosphorylierungs- bzw. Glykosylierungsgrad der Lipide auf passiver Diffusion basieren, da Wasserstoffperoxid über ein vergleichbares permanentes Dipol-Moment verfügt (Bienert et al. 2006). Höhere Transportkapazitäten vermitteln unter Umständen spezifische Aquaporine. Mit Vitalitätstests und eingeschleusten H_2O_2 -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen konnte in Hefesystemen demonstriert werden, dass AtTIP1, ein vakuoläres Aquaporin von *A. thaliana* (Bienert et al. 2006), den raschen Konzentrationszuwachs von Wasserstoffperoxid im Zellinneren ermöglichte (Bienert et al. 2007). In diesem Kontext ist aber nicht genau geklärt, ob unter physiologischen Temperatur- und pH-Bedingungen der erhöhte Zufluss von H_2O_2 durch Transportmoleküle, beispielsweise durch das neutrale Histidin- H_2O_2 -Addukt (Schubert und Wilmer 1991), eine Folge der unspezifischen Permeabilität der Lipid-Doppelschichten ist oder der Co-Transport bevorzugt durch die Aquaporine erfolgt.

4.4.2 Photooxidativer Stress erzeugt durch die Methylviologen-induzierte Bildung von H_2O_2

Aus den vorangestellten Zusammenhängen wird ersichtlich, dass Anthocyane und Quercetin mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht primär an der Detoxifizierung der relativ kurzlebigen reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sein können. Aufgrund seines großen Wirkungsradius schien es für die vorliegende Arbeit sinnvoll, die antioxidative Wirkung der beiden Polyphenole gegenüber H_2O_2 zu untersuchen. Zur Induktion von photooxidativem Stress wurden Blattscheiben der drei *Arabidopsis*-Genotypen mit Methylviologen inkubiert. Unter mittleren Photonenflussdichten generiert eine Behandlung mit Methylviologen, das an der Akzeptorseite von PS I mit Ferredoxin um die Elektronen konkurriert und Sauerstoff zu Superoxid-Anionen reduziert, signifikant mehr Wasserstoffperoxid als die Inhibition der Superoxid-Dismutase mit Diethyldithiocarbamat (DDC) und die Blockade der Ascorbat-Peroxidase durch Hydroxyharnstoff hervorbrachten (Kim und Lee 2005).

Wie der Abbildung 3.26 A entnommen werden kann, führte die Inkubation der drei *Arabidopsis*-Genotypen mit Methylviologen und die Bestrahlung mit rotem Licht, das von den Anthocyanen nicht absorbiert wird, zu erheblichen Einbußen in der Quantenausbeute von Photosystem II. Dabei stieg in der Methylviologen-Behandlung die Inhibitionsrate von PS II im Vergleich mit Blattproben, deren D1-Protein-Reparaturzyklus mit Lincomycin deaktiviert war, bei gleicher Strahlungsdosis um das Doppelte. Die photochemisch hervorgerufene Bildung von H_2O_2 am Photosystem I beeinträchtigt vermutlich auch die Funktion von PS II nachhaltig. Werden isolierte Thylakoidmembranen und intakte Blätter mit Methylviologen inkubiert, verringert sich unter hohen Photonenflussdichten insbesondere der Elektronenabfluss von der PS II-Donorseite (Krieger-Liszkay et al. 2011). Ob die Diffusionsreichweite von Superoxid-Anionen ausreicht, den Wasserspaltungskomplex zu deaktivieren, das mobile H_2O_2 das eigentliche Ausgangssubstrat einer Mangan-Cluster-Degradation darstellt oder ob Wasserstoffperoxid die Deaktivierung der PS II-Reaktionszentren beschleunigt, ist dabei Gegenstand anhaltender Diskussionen (Song et al. 2006, Krieger-Liszkay et al. 2011, Pospíšil 2009). Mit der Sensitivität

von Photosystem II gegenüber dem am PS I gebildeten H_2O_2 , die mit einer Veränderung in der maximalen Quantenausbeute bestimmbar ist, war in jedem Fall ein adäquater Parameter verfügbar, um die antioxidative Wirkung von Anthocyanen und Quercetin bestimmen zu können. Als äußerst interessant muss weiterhin der Umstand bewertet werden, dass das Produkt beider Einzeleffekte von Lincomycin und Methylviologen die Photodeaktivierung von PS II durch eine gleichzeitige Behandlung überschreitet. Wurden Methylviologen- und Lincomycin kombiniert, sanken die Inhibitionsraten um etwa 30 %. Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass unter Umständen Superoxid-Anionen und/oder Wasserstoffperoxid auch die enzymatische Instandsetzung der Photosysteme einschränkten und beide Hemmstoffe in ihrer Wirkung konkurrierten. Allerdings wurde auch deutlich, dass entgegen der Hypothese PS II in den roten Blättern des *Arabidopsis*-Wildtyps stärker durch die photooxidativen Bedingungen inhibiert war als in den Blättern der beiden *tt*-Mutanten (Abb.3.26 A).

4.4.3 Bestimmung der niedrigmolekularen antioxidativen Kapazität von Blattextrakten des *Arabidopsis*-Wildtyps und der beiden Transparent Testa-Mutanten

Die stärkere Inhibition von PS II in den mit Methylviologen und Lincomycin behandelten Blättern des Wildtyps (Abb. 3.26 A) widerspricht dem bekannten Bild der *in vitro* antioxidativ höchst wirksamen Flavonoide, besonders auch im Hinblick auf die hohe Anthocyankonzentration in den Blättern. Es galt zu klären, ob die Bildung von Anthocyanen oder Quercetin in *Arabidopsis*-Blättern überhaupt eine höhere antioxidative Kapazität darstellte. Den Abbildungen 3.25 A und B kann entnommen werden, dass in den Pflanzenextrakten der quercetinfreien *tt7*-Mutante die antioxidative Wirkung im Vergleich mit den beiden anderen *Arabidopsis*-Genotypen tendenziell früher erschöpft war. Die Extrakte des anthocyanhaltigen Wildtyps und der quercetinbildenden *tt3*-Mutante zeigten eine deutliche länger anhaltende Löschung des Lumineszenzsignals, jedoch konnte in der statistischen Analyse dieser Unterschied nicht bestätigt werden.

Mit dem Tac-Assay (total antioxidative capacity) kam ein Testsystem zur Anwendung, dessen Sensitivität und Robustheit für komplexe Stoffgemische wie Blattextrakte optimiert ist. Das grundlegende Prinzip des Testes ist die doppelte Reduktion der Meerrettich-Peroxidase durch Luminol und die regenerierende Oxidation der Peroxidase durch H_2O_2 (Saleh und Plieth 2010). Zwar dokumentieren Girotti et al. (2002) für die komplexen Matrices von Rotweinproben eine lineare Abhängigkeit zwischen der Unterdrückung der Photonenemission und dem absoluten Polyphenolgehalt, jedoch ist auch dieses Verfahren nicht frei von analytischen Restriktionen.

Neben dem oxidativen Status der Proben und dem hohen Reaktionsvermögen der isolierten Antioxidantien bei einem kaum zu vermeidenden Kontakt mit Sauerstoff (Girotti et al. 2006, Saleh und Plieth 2010) könnten das relativ offene Redoxsystem sowie der generelle Ansatz des Tac-Assays die eindeutige Unterscheidung der antioxidativen Kapazität in den jeweiligen Blattproben der *Arabidopsis*-Genotypen erschweren. Gerade die vermittelnde Reaktion der phenolischen Beschleuniger (Dodeigne et al. 2000, Saleh und Plieth 2010), die den Reaktionszyklus stabilisiert, könnte zugleich einen Schwachpunkt des Verfahren darstellen. In wässrigen Puffern zeigen Phenole in Abhängigkeit von der Konzentration konträre Reaktionskinetiken. Beispielsweise verstärkte Iodphenol in nmol-Konzentrationen die Chemolumineszenz im Meerrettich-Peroxidase- H_2O_2 -Reaktionssystem, während höhere Konzentrationen im μ mol-Bereich die Signalausbeute absenkten (Ilyina et al. 2003). Insbesondere können aber pflanzliche Phenolcarbonsäuren die Oxidation von Luminol beschleunigen. Von den Hydroxyzimtsäure-

Derivaten ist bekannt, dass vor allem p-Cumarsäure im pH-Optimum des Testverfahrens die Signalintensität um das sechs- bis zehnfache steigern kann (Ramos et al. 2001, Navas Díaz et al. 1996). Damit ergeben sich für die komplexen Stoffgemische der mit dem Tac-Assay analysierten Pflanzenextrakte die Möglichkeiten, dass zum einen im durch Kühle induzierten Flavonoid-Biosyntheseweg neben der gebildeten Sinapinsäure (Abb. 2.4) mit Kaffeesäure und Ferulasäure Vorläufersubstanzen akkumulierten, die Luminol vermehrt oxidieren könnten. Andererseits wäre die Konzentration der Sinapinsäure unter Umständen ausreichend, um analog zu den von Gombau et al. (2006) für verwandte Phenolsäuren ermittelten Resultaten die Photonenemission in Konkurrenz zum Quercetin und zu den Anthocyanen zeitweise zu unterbinden. Zusätzlich verfügen die im zytosolischen und plastidären Metabolismus allgegenwärtigen Reduktionsmittel über die Fähigkeit, die antioxidative Kapazität der Phenole zu überlagern. Insbesondere für Ascorbinsäure ist ein effektives Löschen des Lichtsignals nachgewiesen, das dem Niveau der ausgeprägten antioxidativen Aktivität von Trolox entspricht (Whitehead et al. 1992) und auf einer direkten Reduktion des aktivierten Luminols beruhen könnte. Der Reaktionsverlauf scheint allerdings nicht spezifisch zu sein. In Anlehnung an die Ergebnisse von Veljovic-Jovanovic et al. (2002) wäre mit der Reduktion von Eisen, das als Bestandteil der Pflanzenextrakte in der Form von Fe^{3+} die Oxidation von Luminol vorantreiben kann, ein Reaktionsmodell gegeben, in dem Ascorbinsäure die antioxidative Wirkung der beiden Polyphenole indirekt maskiert. Überdies besitzt Glutathion das duale Reaktionsvermögen einer unmittelbaren oder versetzten Inhibition der Luminol-Photoreaktion (Evelson et al. 2001).

Zusammenfassend lässt sich notieren, dass der Tac-Assay in seiner Aussagekraft eingeschränkt ist, um eine antioxidative Wirkung von Anthocyanen und Quercetin in Blättern widerzuspiegeln. Die komplexe Matrix der Pflanzenextrakte, die ein Stoffgemisch mit potentiellen Partnern für eine Reihe von Redoxreaktionen darstellt, scheint die differenzierende Zuordnung der antioxidativen Wirkung beider Flavonoide innerhalb des Testverfahrens zu limitieren. Allenfalls manifestiert sich in Anwesenheit von Quercetin eine tendenziell höhere antioxidative Aktivität, die jedoch im klaren Widerspruch steht zu dem geringeren PS II-Inhibitionsniveau in den Blättern der quercetinfreien *tt7*-Mutante (Abb. 3.26 A).

4.4.4 Strahlungsdosisabhängige Deaktivierung von Photosystem II im Methylviologen-Lincomycin-System

Das Testverfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität ließ die spezifischen Beiträge von Quercetin und den Anthocyanen nicht erkennen und stellte damit im Vergleich der Deletionsmutanten deren mögliche antioxidative Schutzfunktion in Frage. Zugleich lieferte die Dynamik der Lichtemission dennoch den entscheidenden Hinweis, um die hypothetische antioxidative Wirkung der beiden Flavonoide in Blättern nachweisen zu können. Der multiphasische Verlauf des Lumineszenzsignals illustrierte die Kinetik der Redoxreaktionen. Die Abfolge ist geprägt durch eine extrem kurze Initialphase gefolgt von einem stabilen Abschnitt, in dem Luminol vorzugsweise durch die niedrigmolekularen Antioxidantien fast vollständig reduziert wurde. Danach verweist der exponentielle Anstieg der Lichtemission auf eine nachlassende antioxidative Aktivität, deren Erschöpfung sich abschließend als Sättigungsniveau darstellte. Die strikte Abhängigkeit der Teilabschnitte von der Zeit führt zur Vermutung, dass *in vivo* unter photooxidativen Bedingungen auch ein Zeitpunkt erreicht gewesen sein könnte, an dem die antioxidative Kapazität in den Blattproben der drei Genotypen erschöpft war und somit Unterschiede in der schützenden Wirkung nicht beobachtet werden konnten.

Diskussion

Um den Reaktionsverlauf des Assays *in vivo* annähernd reproduzieren zu können, wurden Zeitreihen der photooxidativen Deaktivierung von Photosystem II erstellt. Aus der Abbildung 3.26 B geht hervor, dass in Blättern mit einem blockierten D1-Reparaturzyklus und einer durch Methylviologen induzierten Bildung von Wasserstoffperoxid bereits eine 5-minütige Strahlungsbehandlung mit rotem Licht ausreichte, um im Kontrast zur kapazitiven Einschätzung des Tac-Assays signifikante Unterschiede in der maximalen Quantenausbeute von PS II hervorzurufen. Bis zu einer Belichtungsdauer von 40 min lag die Deaktivierung von Photosystem II in den anthocyanhaltigen Blättern des Wildtyps ca. 30-50 % unterhalb der Werte der grünen *tt3*-Mutante. Bemerkenswerterweise wies die *tt7*-Mutante mit unterschiedlichen Signifikanzniveaus während der einzelnen Behandlungszeiträume intermediäre Schadensstufen auf, obwohl Quercetin nachweislich nicht synthetisiert wurde (Abb. 3.28 A). Unter Umständen könnte das wahrscheinlich alternativ gebildete Pelargonidin mit etwa 25 % des Anthocyangehaltes der Wildtyp-Blattproben eine Konzentration erreicht haben, die physiologisch relevant ist und den Ausfall der antioxidativen Kapazität von Quercetin kompensieren könnte.

Letztendlich stellt sich die Frage, wie Anthocyane in der Zelle H_2O_2 neutralisieren können. Eine mögliche Erklärung für das generelle Reaktionsprinzip, das *in vivo* auf der Interaktion zwischen Chloroplasten und Mitochondrien einerseits und dem Tonoplasten andererseits beruhen würde (Yamasaki et al 1997, Agati et al. 2013), geht aus den Schlussfolgerungen von Takahama und Oniki (1997) zur vakuolären Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid durch Quercetin-Rutinosid oder aus den Modellvorstellungen zur Neutralisierung durch Flavonole im Allgemeinen (Agati et al. 2013) hervor. Nachdem H_2O_2 in die Vakuole diffundiert ist, wird es durch eine Klasse III-Peroxidase reduziert, die wahrscheinlich an der Innenseite der Tonoplastenmembran verankert ist (Takahama und Oniki 2000, Yamasaki et al. 1997) und einen Großteil der extraplastidären Peroxidase-Aktivität verantwortet (Ferrerres et al. 2011). Anschließend wird die Peroxidase aufgrund einer doppelten Reduktion durch die eingelagerten Flavonole wieder in ihren reaktionsbereiten Zustand überführt. Die Substrataffinität des Isoenzym ist dabei jedoch nicht auf Flavonole, wie Kämpferol- und Quercetin-Glykoside, beschränkt, sondern auch Hydroxyzimtsäure-Derivate garantieren einen effizienten Elektronentransfer (Ferrerres et al. 2011). Entstehende Phenoxyl-Radikale könnten in der Vakuole durch Ascorbinsäure und dessen Oxidationsprodukt Monodehydroascorbat inaktiviert werden (Takahama und Oniki 1997). Mit einem Meerrettich-Peroxidase-System konnte nachgewiesen werden, dass Ascorbat tatsächlich nicht als primärer Elektronendonator der Peroxidase-Reaktion fungiert, sondern als Elektronen-Donor in der Reduktion der oxidierten Flavonole Quercetin und Kämpferol verbraucht wird (Yamasaki et al. 1997). Da in photosynthetisch aktiven Blättern eine vakuoläre Akkumulation von braunen Komplexverbindungen ausgehend von der Polymerisierung oxidierten Phenole unterbleibt, scheint ein enzymatisches Recycling von Dehydroascorbat (DHA) durch die zytosolische DHA-Reduktase im Austausch mit regeneriertem Ascorbat den Reaktionszyklus zu komplettieren (Takahama und Oniki 2000). Ein ähnliches Redox-System ist auch für Anthocyane beschrieben worden. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird die Meerrettich-Peroxidase durch das aus Hibiscus-Blütenblättern isolierte Cyanidin-Sophorosid reduziert, das durch die Oxidation des Moleküls sein Absorptionsvermögen für Strahlung aus dem blauen und grünen Spektralbereich verliert (Yamasaki 1997).

Die Veröffentlichungen schlagen zwar einen detaillierten Reaktionsmechanismus zur Reduktion des mobilen Wasserstoffperoxids durch Anthocyane und andere Flavonoide vor, aber

hinreichende Belege zur physiologischen Bedeutung stehen noch aus. Ein erstes Verständnis zur antioxidativen Wirkung in intakten Zellen eröffnet sich aus der Arbeit von Kytridis und Manetas (2006) zur funktionalen Gegenüberstellung von epidermalen und chlorenchymatischen Anthocyanen. Werden sich im Freiland entwickelnde grüne und rote Blätter von *Cistus creticus*, die Anthocyane in den Vakuolen des Palisadenparenchyms einlagern, sowie grüne und rote Blätter von *Ricinus communis* mit epidermalen Anthocyanen mit Methylviologen inkubiert und mit rotem Licht konfrontiert, wiesen die *Cistus*-Blattproben geringere PS II-Inhibitionsraten auf, da ausgehend von den Plastiden der Diffusionsradius von H₂O₂ eher begrenzt zu sein scheint (Kytridis und Manetas 2006).

In einem mit der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Ansatz unterstreichen Shao et al. (2008) die schützende Wirkung von Anthocyanen in Blättern von *A. thaliana* gegenüber photooxidativem Stress. Bereits schwache Konzentrationen des Polyphenols, die zu gering sind, um die Photosysteme abzuschirmen, bewahrten PS II bei einer geringen PPFD von 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ vor einer mit Hilfe von Methylviologen induzierten oxidativen Deaktivierung. Interessanterweise bleibt die antioxidative Kapazität unter Schwachlichtbedingungen bis weit über 3 h unverändert und erst danach wurde die maximale Quantenausbeute von PS II in den Blättern der *tt4*-Mutante, die mit dem Ausfall der Chalconsynthase bereits eingangs des Phenylpropanoid-Syntheseweges limitiert ist, sowie der *tt3tt4*-Doppelmutante stärker beeinträchtigt als in den Blattproben des Wildtyps (Shao et al. 2008). Im Kontrast dazu dokumentieren Zhang et al. (2012) für den Wildtyp und die *tt3tt4*-Mutante bei einer Behandlung mit einer PPFD von 1300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zwar Differenzen in der H₂O₂-Akkumulation und im PS II-Aktivitätsverlust, jedoch steigert einzig der Wildtyp während der Behandlung sein Reduktionspotential gegenüber DPPH-Radikalen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Abschirmung photosynthetisch aktiver Strahlung durch Anthocyane und die antioxidativen Wirkung der Flavonoide lassen sich in einer Hypothese vereinigen, die davon ausgeht, dass unter photooxidativen Bedingungen beide Schutzmechanismen nebeneinander existieren und ihnen ein bestimmter Wirkungsanteil zugeordnet werden kann. Um zwischen den beiden grundverschiedenen photoprotektiven Teilprozessen differenzieren zu können, wurden die mit Lincomycin und Methylviologen inkubierten Blattproben photosynthetisch aktiver Strahlung ausgesetzt. Zum einen wurde mit Hilfe eines grünen Filters das Emissionsspektrum der Lichtquelle dem *in vivo*-Absorptionsmaximum der Anthocyane annähernd angepasst. Des Weiteren führte die Verwendung von roter Strahlung oberhalb von 645 nm dazu, dass die Anthocyane nicht absorbierten und nur die antioxidative Wirkung relevant war. Auf der Grundlage der Resultate mehrerer Experimente (Abb. 3.28 A) wurde die eingestrahlte Photonenflussdichte auf 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ verringert, da unter den gewählten Bedingungen höhere Photonenflussdichten den Elektronentransfer auf den Sauerstoff sättigten und eine Unterscheidung verhinderten. Die experimentelle Umsetzung dieses Ansatzes offenbarte für die Blätter des anthocyanhaltigen Wildtyps in Relation zur anthocyanfreien *tt3*-Mutante einen antioxidativen Effekt, der die PS II-Inhibitionsrate um etwa 40 % absenkte. Wurden die Blattscheiben grüner Strahlung ausgesetzt, sank die Deaktivierung von Photosystem II in Bezug zum antioxidativen Effekt nochmals um etwa 40 % (Abb. 3.28 B). Natürlich lagen die relativen Inhibitionen mit 2-7 % sehr nah an der Auflösungsgrenze, jedoch garantierten die geringen Photonenflussdichten, dass alternative PS II-Deaktivierungsvorgänge an Bedeutung verloren. Die Frage nach der Beteiligung von Quercetin an der Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid muss unbeantwortet bleiben, da die *tt7*-Mutante über einen alternativen Zweig des Flavonoid-Syntheseweges Anthocyane bildete. Das mögliche Nebeneinander beider Schutzmechanismen unter-

streicht die Arbeit von Neill und Gould (2003). Unter einem künstlichen Lichtfilter, mit dem sich die Absorptionseigenschaften der Anthocyane nachbilden ließen, generierten isolierte Chloroplasten weniger O_2^- - Radikale als die mit Weißlicht bestrahlten, nicht abgeschirmten Kontroll Suspensionen. Ein vergleichbarer Effekt wurde ebenfalls beobachtet, wenn die Suspensionen bei einem pH-Wert von 7,0 das farblose Tautomer des Cyanidin 3-(6-malonyl)Glykosids erhielten, um das Vorhandensein von Anthocyanen im Zytosol zu simulieren (Neill und Gould 2003).

4.4.5 Gegenüberstellung des antioxidativen Systems zur Detoxifizierung von H_2O_2 und Hydroxyl-Radikalen in den verschiedenen Genotypen

Um Unterschiede in der photooxidativen PS II-Deaktivierung (Abb. 3.26 B, 3.27 B) mit der Wirkung von Anthocyanen und Quercetin erklären zu können, wurde das antioxidative System der drei Genotypen zur Neutralisierung von H_2O_2 verglichen. Die zelluläre Detoxifizierung des mobilen Wasserstoffperoxids basiert im wesentlichen auf dem plastidären Glutathion-Ascorbat-Ascorbat-Peroxidase-System sowie der APX-Aktivität in den Peroxisomen und der Neutralisation über den vakuolären Peroxidase-Phenol-Ascorbat-Zyklus. Mit einem Anteil des vakuolären Isoenzym von bis zu über 90 % an der gesamten Reaktionskapazität der Peroxidasen in intakten Blättern (Ferrerres et al. 2011) ist die Verfügbarkeit von phenolischen Elektronen-Donoren von entscheidender Bedeutung für den Ablauf der Redoxreaktionen. Die Effektivität bei der Inaktivierung von H_2O_2 geht aus der unspezifischen Affinität des Enzyms gegenüber den einzelnen Substraten hervor. So wird die Bildung von melaninähnlichen Komplexverbindungen in Blättern von *Vicia faba* gefördert, wenn Phenoxyl-Radikale, die bei einer Oxidation von P-Cumarsäure oder Kaffeesäure durch die Peroxidase entstehen, 3,4-Hydroxy-Phenylalanin in der Vakuole oxidierten (Takahama und Oniki 2000). Die Guajacol-Peroxidasen, deren bekanntester Vertreter die Meerrettich-Peroxidase ist, akzeptieren darüber hinaus Quercetin und Kämpferol als Reduktionsmittel (Yamasaki et al. 1997). Für die vakuoläre Peroxidase aus *Catharanthus roseus* wiesen Ferreres et al. (2011) ebenfalls ein unspezifisches Reaktionsvermögen gegenüber Hydroxyzimtsäure-Derivaten und Flavonolen nach. In der Anzucht dominierten unter Schwachlichtbedingungen dabei Chlorogensäure-Isomere mit einer hohen Substrataffinität die Reduktion der Peroxidase. Erst unter hohen Quantenflussdichten erreichten die weniger affinen Quercetin-3-Rhamno-Galactoside und Kämpferol-3-Rhamno-Galactoside Konzentrationen, die eine Einbindung der Flavonole in den detoxifizierenden Redox-Zyklus erlaubten (Ferrerres et al. 2011). Trotz der deutlich geringeren Oxidationsraten der Flavonole im Peroxidase-Phenol-Ascorbatsystem als beispielsweise Chlorogensäure (Takahama und Oniki 1997) wäre bei steigenden H_2O_2 -Diffusionsraten mit der Akkumulation dieser Flavonoide in den hier untersuchten *A. thaliana*-Pflanzen ein alternativer Elektronen-Donor verfügbar.

Aufgrund des unspezifischen Reaktionsvermögen von Guajacol-Peroxidasen mit diversen Flavonoiden war es erforderlich, zur Bedeutung von Quercetin und Anthocyanen als Antioxidantien die Gehalte von Flavonolen und Hydroxyzimtsäure-Derivaten in den drei Genotypen zu vergleichen. Aus Abb. 3.28 A geht hervor, dass außer den roten Pigmenten die *tt3*-Mutante mit den Hydroxyzimtsäuren, dem Kämpferol und den Quercetin über eine vergleichbare Kapazität verfügte, um den Peroxidase-Zyklus mit Reduktionsmitteln zu versorgen. Die verringerte photooxidative Deaktivierung von PS II in den Blättern des Wildtyps könnte daher auf der zusätzlichen Verfügbarkeit von Anthocyanen als Elektronen-Donoren basieren. Bemerkenswerterweise unterbleibt in der *tt3*-Mutante bei einem blockierten Abfluss der

Flavonole über die Dihydroflavonol-Reduktase aber ein kompensatorischer Konzentrationszuwachs von Quercetin-Glykosiden, sodass in diesem Genotyp weniger Reduktionskapazität zur Verfügung stand. Damit könnte die geringere PS II-Inhibition der roten Blätter bei oxidativem Stress der Wirkung von Anthocyanen zugeordnet werden. Als etwas komplexer stellte sich die Phenol-Komposition in den Blättern der *tt7*-Mutante in Bezug zum relativen Aktivitätsverlust von PS II unter photooxidativen Bedingungen dar. Bei den Hydroxyzimtsäuren, die in der Mehrzahl als Sinapinsäure-Derivate vorlagen (Abb. 2.4), bestand nur ein tendenzieller Zuwachs in Relation zu den beiden anderen Vergleichspartnern. Erwartungsgemäß wurde kein Quercetin synthetisiert, jedoch verdoppelte sich der Gehalt von Kämpferolglykosiden, deren Oxidationsraten im Peroxidase-System aber jene der Quercetinglykoside deutlich unterschreiten (Yamasaki et al. 1997). Unter Umständen verhinderten im Vergleich mit dem *tt3*-Genotyp die alternativ gebildeten Anthocyane zusammen mit dem Kämpferol eine signifikant höhere PS II-Inhibitionsrate, wenn vermehrt Wasserstoffperoxid auftrat.

Neben dem Peroxidase-Phenol-Ascorbat-System der Vakuole bestimmen vor allem die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Ascorbat-Peroxidase (APX) in den Chloroplasten die zelluläre Konzentration von Wasserstoffperoxid. Um Unterschiede bei der photooxidativen Inhibition von PS II auszuschließen, die auf einer variablen SOD-Aktivität beruhen könnten, wurde in Blattextrakten des *Arabidopsis*-Wildtyps und der beiden Transparent Testa-Mutanten das Reaktionsvermögen des Enzyms analysiert. Wie die Ergebnisse der Abbildung 3.28 D darstellen, verfügten der Wildtyp und die *tt3*-Mutante bereits vor der Induktion von oxidativen Stress über eine tendenziell höhere Kapazität zur enzymatischen Umsetzung von Superoxid-Anionen. Da die mitochondriale MnSOD möglicherweise nur eine geringe Aktivität aufweisen kann und bei photooxidativen Bedingungen an den Thylakoiden nicht limitierend ist, spiegelt das erhöhte Reaktionsvermögen wahrscheinlich nicht eine gestiegene FeSOD-Aktivität der Chloroplasten wider, sondern könnte in Anlehnung von Camp et al. (1997) auf einer protektiven Kopplung der zytosolischen Cu,ZnSOD und der in der *tt7*-Mutante nicht vorhandenen Flavonoid-3'-Hydroxylase aus der Familie der Cytochrom P450-Enzyme beruhen.

Die tendenziellen Unterschiede in der SOD-Aktivität erreichten nach der Behandlung der Blattscheiben mit photooxidativem Stress ein statistisch signifikantes Niveau. Nach 40 min kann in den Blattproben des Wildtyps und der *tt3*-Mutante theoretisch deutlich mehr O_2^- zu Wasserstoffperoxid umgesetzt werden als in den Proteinextrakten des *tt7*-Genotyps (Abb. 3.28 D). Der kurzfristige Aktivitätszuwachs steht aber im Kontrast zu den bekannten Translations- und Mobilisationsszeiträumen der Enzymgruppe in Blättern annualer Pflanzen, die moderaten Stressbedingungen ausgesetzt waren. Bei niedrigeren Methylviologenkonzentrationen erreichte der Aktivitätszugewinn der chloroplastidären FeSOD erst nach etwa 5 h ein ausgeprägtes Maximum (Alscher et al. 2002). Hingegen vergingen bis zu einem deutlichen Anstieg des Reaktionsvermögen mitochondrialer MnSOD und zytosolischer Cu,ZnSOD mehrere Tage, wenn beispielsweise Pflanzen von *Pisum sativum* moderaten Wasserdefiziten ausgesetzt wurden (Iturbe-Ormaetxe et al. 1998).

Beim Vergleich der photooxidativen PS II-Deaktivierung in den Blattproben der *tt3*- und *tt7*-Mutante (Abb. 3.26 B, 3.27 A und B) wird deutlich, dass trotz der dreifach erhöhten SOD-Aktivität in den *tt3*-Blättern der Funktionsverlust der Photosysteme gleich hoch ausfiel. Dies kann als Anzeichen dafür gewertet werden, dass der photooxidative Stress intensiv war und die Kapazität des Enzyms überstieg. Unter solchen Bedingungen besteht für die Gruppe der Superoxiddismutasen sogar das Risiko einer strukturellen Deaktivierung. In den Annahmen von

Iturbe-Ormaetxe et al. (1998) bildet katalytisches Eisen, das bei mit Methylviologen erzeugtem oxidativem Stress aus dem plastidären Phytoferritin freigesetzt werden könnte, die Voraussetzung für einen beschleunigten Funktionsverlust der besonders sensitiv reagierenden FeSOD. Auch die stabilere Cu,ZnSOD in den Chloroplasten könnte bei einem limitierten Ascorbat-Gluthathion-Zyklus eine Angriffsfläche für exzessives Wasserstoffperoxid bieten (Casano et al. 1997).

Ein weiteres, für die Detoxifizierung von H_2O_2 bedeutendes Enzym ist die Ascorbat-Peroxidase (APX). Um Aussagen über die Effektivität von Anthocyanen und Quercetin im postulierten Peroxidase-Phenol-Ascorbat-Zyklus treffen zu können, erschien es sinnvoll, die parallel dazu ablaufenden Neutralisierungsreaktionen des gesamten zelleigenen Ascorbat-Peroxidase-Systems der drei Genotypen zu vergleichen. Aus den Resultaten des Enzym-Aktivitätstests geht hervor, dass in den Blattextrakten der *tt3*-Mutante in Bezug zu den Blättern des Wildtyps und der *tt7*-Mutante bereits vor der Induktion von photooxidativem Stress ein um etwa 50 % erhöhtes Reaktionsvermögen der zellulären Ascorbat-Peroxidase bestand. In der Konsequenz ergab sich dadurch für die *tt3*-Mutante eine Überschätzung des Effektes von Quercetin an der enzymatischen Reduktion von Wasserstoffperoxid. In diesem Zusammenhang sollte der generelle Ansatz des verwendeten Assays, der nicht zwischen zytosolischer und plastidärer Ascorbat-Peroxidase-Aktivität differenziert, als ausreichend angesehen werden, da das mobile Wasserstoffperoxid beide Enzymgruppen erreicht. Vielmehr ist es unsicher, ob die zusätzliche APX-Aktivität in den Blättern der *tt3*-Mutante überhaupt zum Tragen kommt, da die APX bemerkenswerterweise extrem anfällig ist gegenüber einem Übermaß ihres Zielsubstrates. Innerhalb weniger Minuten kann vor allem die thylakoidale APX unter aeroben Bedingungen deaktiviert werden, wenn der Ascorbat-Pool bei einer massiven Bildung von Wasserstoffperoxid durch die über Methylviologen vermittelte Photoreduktion von Sauerstoff erschöpft ist (Miyagawa et al. 2000, Mano et al. 2001). Dabei geht der Funktionsverlust des Enzyms sogar der Inaktivierung der besonders H_2O_2 -empfindlichen Thiol-modulierten Enzyme der CO_2 -Fixierung voraus (Miyagawa et al. 2000), dem zeitlich versetzt auch die zytosolischen APX und die vakuolären Guaiacol-Peroxidasen folgen (Mano et al. 2001). Wahrscheinlich ist das H_2O_2 -oxidierte Intermediat der Ascorbat-Peroxidase (Compound I) betroffen, indem unter dem Einfluss des Moleküls der Häm-Komplex einer fortschreitenden Dekomposition unterliegt (Miyake und Asada 1996). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass umso mehr eine zusätzliche Detoxifizierung von H_2O_2 über das vakuoläre Anthocyane / Quercetin-Peroxidase-System von Bedeutung sein könnte.

4.4.6 Schutz vor der über Malondialdehyd vermittelten Inhibition von Photosystem II durch Anthocyane und Quercetin

Bei erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen besteht das Risiko einer Freisetzung von Metall-Ionen aus den katalytischen Zentren diverser Proteinkomplexe. Beispielsweise konnte für Hämoglobin *in vitro* demonstriert werden, dass in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalytisches Eisen in der Lösung nachweisbar war und die Fenton-Reaktion initialisierte, in deren Folge $OH\cdot$ -Radikale akkumulierten (Gutteridge 1986). In der unmittelbaren Umgebung von Membranen stellen die Hydroxyl-Radikale dann den Ausgangspunkt der Lipidperoxidation dar (Stoys und Bagchi 1995, Girotti 1998). Für Pflanzen konnte dieser Reaktionsverlauf der Lipidperoxidation sowohl für intakte Blätter als auch an isolierten mikrosomalen Membranen nachgewiesen werden. Dabei wirken freigesetzte Eisen-Ionen effektiver als katalytische Kupfer-Ionen (Moran et al. 1994).

Analog zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bedingungen zur Induktion des Phenylpropanoid-Biosyntheseweges bewirken kühle Umgebungstemperaturen die Aktivität diverser Fettsäure-Desaturasen, die zur verstärkten Einlagerung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in die Chloroplastenmembranen führt (Upchurch 2008). Bei oxidativem Stress entsteht aus der dreifach ungesättigten Linolensäure Malondialdehyd (MDA) (Esterbauer et al. 1991). MDA kann über die Vernetzung von α - und ε -Aminogruppen (Nair et al. 1986, Esterbauer et al. 1991) in der Form von 1:1- oder 2:1 Addukten, als Enamine und Imine (Aubourg 1993), die funktionale Struktur von Proteinen modifizieren. Auch die Proteine des Photosyntheseapparates können mit MDA interagieren. Während in isolierten Chloroplasten von *Spinacia oleracea* ungesättigte 2-Alkenale über kovalente Bindungen mit Cystein die Thiol-regulierten Enzyme des Calvin-Benson-Zyklus deaktivieren (Mano et al. 2009), reagiert Malondialdehyd insbesondere mit den Proteinkomplexen der Photosysteme. In intakten Blättern von *A. thaliana* und *S. oleracea* sind in der Gegenwart von Malondialdehyd strukturelle Modifikationen der Lichtsammelkomplexe und des Wasserspaltungsapparates detektiert worden (Yamauchi et al. 2008). Im Hinblick auf letzteren besteht die Vermutung, dass ebenfalls über die Interaktion von Cystein und MDA die elektrostatische Wechselwirkung von CP47 und OEC33 unterbunden ist und in der nachfolgenden Trennung der Untereinheiten mit der Freisetzung des Mangan-Clusters die Elektronentransportwirksamkeit von PS II sinkt (Yamauchi und Sugimoto 2010). Malondialdehyd ist also nicht nur ein allgemeiner Marker für oxidativen Stress, sondern es kann auch selbst direkte Schäden am Photosyntheseapparat verursachen.

Aus der Abbildung 3.29 D geht jedoch deutlich hervor, dass die bereits vor der Induktion von photooxidativen Bedingungen bestehenden MDA-Konzentrationen auch nach dem Ablauf der Behandlung unverändert und gleich blieben. Folglich muss dadurch eine explizite Beteiligung von Quercetin und den Anthocyanen an einem kurzfristigen Schutz der Thylakoidmembranen vor der Lipidperoxidation in Frage gestellt werden. Damit ist auch die erhöhte Deaktivierungsrate von Photosystem II nach der Strahlungsexposition in den Blättern der *tt*-Mutanten (Abb. 3.26 B, 3.27 A und 3.27 B) nicht unbedingt auf die Interaktion zwischen dem reaktivem MDA und den Polypeptiden der PS II-Untereinheiten zurückzuführen. Die relativ hohen MDA-Konzentrationen könnten bereits aus der Starklicht-Behandlung in kühler Umgebung hervorgegangen sein. Sie wären entsprechend der Überlegungen von Farmer und Davoine (2007) teilweise als latent vorhandene, reaktive elektrophile Spezies (RES) anzusehen, die bei oxidativem Stress in eine notwendig werdende Signaltransduktion involviert sind.

Um die Bedeutung von Anthocyanen und Quercetin an der Verhinderung der MDA-Entstehung, die zur Inaktivierung von Photosystem II führen kann (Yamauchi et al. 2010), näher beurteilen zu können, sind Blattproben der drei *Arabidopsis*-Genotypen hinsichtlich ihrer Ausstattung mit antioxidativ wirksamen Tocopherolen analysiert worden. Es wurde vermutet, dass höhere Tocopherol-Gehalte in den beiden *tt*-Mutanten das Fehlen von Anthocyanen und Quercetin kompensierten und so vergleichbare MDA-Gehalte hervorbrachten. Weder in den α -Tocopherol-Gehalten noch in den β -Tocopherol-Konzentrationen traten im Vergleich des Wildtyps mit den *tt*-Mutanten signifikante Unterschiede auf (Abb. 3.29 B). Es sind im Wesentlichen zwei Mechanismen, mit denen Tocopherole *in vivo* die Zellkompartimente vor den Folgen einer ausufernden Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies schützen. Zum einen sind Tocopherole in der Lage, $^1\text{O}_2$ in der unmittelbaren Umgebung der PS II-Reaktionszentren über den Ladungstransfer in einem Exciplex physikalisch zu quenchen oder über intermediäre Hydroxyperoxide, die zu Tocopherolchinone zerfallen, chemisch zu neutralisieren (Krieger-Liszkay und Trebst 2006, Munné-Bosch und Alegre 2002). Zum anderen, und darauf liegt bei mit

Methylviologen induziertem photooxidativen Stress der Focus in der vergleichenden Bewertung, sind die lipophilen Tocopherole in oxygenen, phototrophen Organismen wie *Synechocystis* (Maeda et al. 2005) oder *A. thaliana* (Havaux et al. 2005) an der Aufrechterhaltung der Membranfluidität beteiligt, indem sie in den Thylakoiden die Lipidperoxidation unterbinden. Der Chromanol-Ring des Moleküls deprotoniert dabei zugunsten des Lipid-Peroxyradikals und wird anschließend durch das Ascorbat-Glutathion-System in seine Ausgangsform zurückversetzt (Munné-Bosch und Alegre 2002).

Aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit lässt sich das Fazit ziehen, dass Anthocyane in den Blättern Höherer Pflanzen als Lichtschutzpigmente wirken, wenn die Umweltbedingungen die Photosynthese limitieren. Die Bildung der Anthocyane bietet unter diesen Bedingungen den Vorteil, dass ATP und Reduktionsäquivalente verbraucht werden und der Reduktionsgrad der Elektronentransportkette sinkt. Als Endprodukt des Phenylpropanoid-Biosyntheseweges sind die roten Pigmente aufgrund ihrer optischen Eigenschaften in der Lage, das Mesophyll gegen photosynthetisch aktive Strahlung abzusichern, um die destruktive Wirkung von überschüssigem Licht einzuschränken. In den Blättern von *B. thunbergii* konnte die Abschirmung der Anthocyane nachgewiesen werden. Die Absorption von grünem Licht ließ die Quantenausbeute der photosynthetischen Sauerstoffevolution sinken. Der permanente Abschirmungseffekt zeigte sich in gleicher Größenordnung sowohl bei der Anpassung der Photosynthesekapazität als auch bei der Akklimatisation der Lichtsammelkomplexe. Mit der Modellpflanze *A. thaliana* konnte nachgewiesen werden, dass Anthocyane durch die Abschirmung von grünem Licht die PS II-Inhibition verringerten.

Gleichzeitig schützen sie Photosystem II aber auch durch ihre antioxidative Wirkung. Letzteres basiert jedoch nicht auf der Unterdrückung der Malondialdehyd-Bildung in der plastidären Lipidperoxidation. Vielmehr könnten Anthocyane im vakuolären Guaiacol-Peroxidase-System an der Neutralisation überschüssigen Wasserstoffperoxids beteiligt sein und so die toxische Interaktion von H_2O_2 mit Photosystem II limitieren. Dabei muss offen bleiben, welcher Reaktionsweg in der Photodeaktivierung damit eingeschränkt wird. In Erweiterung der Annahmen von Pospíšil (2009) und Liu et al. (2004) würde bei geringeren H_2O_2 -Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit einer $OH\cdot$ -Bildung durch die Oxidation des Nicht-Häm-Eisens in den Reaktionszentren sinken. Auch bei einer lichtinduzierten Degradation des Wasserspaltungsapparates wäre für die am OEC33-Protein angelagerten Mn^{2+} -Ionen (Henmi et al. 2004) weniger H_2O_2 für die risikoreiche Fenton-Reaktion verfügbar. Alternativ könnten in Anlehnung an Becana et al. (1998) Anthocyane bei einem gestörten Eisentransport über Ferritin, die durch Fe^{2+} eingeleitete Oxidation von Lysin oder Arginin zu Carbonyl-Derivaten verhindern.

Allerdings ist fraglich, ob die antioxidative Wirkung die primäre Schutzfunktion der Anthocyane darstellt. Zum einen stehen sie eingelagert in der Vakuole für eine effektive Neutralisierung der plastidär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies nicht zur Verfügung. Andererseits zeigten die Experimente, dass ihre Reduktionskapazität unter moderaten Lichtstärken relativ schnell erschöpft war. Zusammengenommen ergeben die Ergebnisse am ehesten ein Bild, in dem Anthocyane eine duale Schutzfunktion zur Vermeidung einer photooxidativen Deaktivierung von Photosystem II besitzen. Da für die Bildung von ROS in den Chloroplasten die Strahlungsabsorption der Photosysteme die unabdingbare Voraussetzung darstellt, kann die Abschirmung als primäre Schutzfunktion angesehen, zumal die Experimente ihre ausgeprägte Wirkung belegen. Dabei ist der genaue Wirkungsmechanismus nicht geklärt. Wahrscheinlich resultiert aus der Abschirmung von exzessiver Strahlung ein ausreichendes

Diskussion

Reservoir oxidiertes Elektronenakzeptoren, sodass eine Limitation an der PS II-Akzeptorseite abnimmt und in der Folge die schädlichen Ladungsrekombinationen im PS II-Reaktionszentrum verringert werden. Ist bei hoher Strahlungsbelastung und eingeschränkter Photosyntheseaktivität die Abschirmung nicht ausreichend und akkumulieren zunehmend reaktive Sauerstoffspezies, besteht die Gefahr, dass die Kapazitäten der SOD und der APX erschöpft sind. Hier könnten Anthocyane ein zusätzliches Reduktionsmittel darstellen, das vor allem bei extremem photooxidativem Stress überschüssiges Wasserstoffperoxid neutralisiert und so eventuell auch den enzymatischen PS II-Reparaturzyklus vor Schäden bewahrt.

5 Zusammenfassung

Viele Pflanzenarten lagern in ihren Blättern Anthocyane ein, wenn die Umweltbedingungen die Photosynthese einschränken und bei anhaltend hoher Strahlungsbelastung die Gefahr einer Schädigung des Photosyntheseapparates besteht. Anthocyane könnten Lichtschutzpigmente sein, da sie dann häufig in exponierten Blattgeweben akkumulieren. Dabei ist nicht geklärt, auf welche Weise sie eine Inhibition von Photosystem II (PS II) unterbinden. Zum einen besteht die Vermutung, dass die Pigmente durch Absorption das Mesophyll gegen Strahlung abschirmen. Andererseits könnten Anthocyane durch ihre *in vitro* nachgewiesene antioxidative Wirkung reaktive Sauerstoffspezies neutralisieren und eine photooxidative Degradation der Photosysteme verhindern. Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Anthocyanen eine eindeutige Lichtschutzfunktion zuzuordnen.

An Blättern der grünen und roten Varietät von *Berberis thunbergii* / *thunbergii atropurpurea* wurde die optische Abschirmung der Anthocyane nachgewiesen. Der Vergleich von Chlorophyllfluoreszenz-Anregungsspektren grüner und roter Blätter ergab zunächst, dass Anthocyane *in vivo* vor allem grünes Licht absorbieren. Unter Berücksichtigung des Absorptionsmaximums wurde eine nicht-invasive, optische Methode entwickelt, mit der basierend auf Chlorophyllfluoreszenz-Verhältnissen die Abschirmung quantifiziert werden konnte. In dunkelroten Blättern von *B. thunbergii atropurpurea* lag die maximale Abschirmung des grünen Anregungslichtes bei etwa 90 %. Aufgrund der breiten *in vivo*-Absorption der Anthocyane wurde die Methode erweitert und die gesamte Abschirmung ermittelt. Für unterschiedliche Lichtquellen konnte die effektive Photonenflussdichte bestimmt werden, die als Teilmenge des photosynthetisch aktiven Spektralbereichs das Mesophyll erreichte. Mit Messungen zur Sauerstofffreisetzung in *Berberis*-Blättern wurde der Abschirmungseffekt mit einer unabhängigen Methode bestätigt. Die niedrigeren Quantenausbeuten im lichtlimitierten Bereich der photosynthetischen Sauerstoffevolution spiegelten in roten Blättern die effektiven Photonenflussdichten wider.

Untersuchungen zur Lichtakklimatisation in roten Blättern von *B. thunbergii* bestätigten den Abschirmungseffekt nicht nur, sondern verifizierten auch die ermittelte Größenordnung. Die permanente Abschirmung bewirkte die Absenkung der Photosynthesekapazität. Auch die Lichtsammelkomplexe wurden den verringerten Lichtstärken angepasst. So entsprach das Chlorophyll a / b-Verhältnis in roten Blättern den effektiven Photonenflussdichten der jeweiligen Lichtakklimatisationsstufe. Ebenso sanken die Pigmentmengen des Xanthophyll-Zyklus entsprechend der Lichtstärken, die während der Lichtakklimatisation im Mesophyll wirksam waren.

Mit der Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurde die schützende Wirkung der Anthocyane untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer Bestrahlung mit weißem Licht die roten Blätter des Wildtyps weniger von der PS II-Inhibition betroffen waren als die grünen Blätter der *tt3*-Mutante und die Blätter der wenige Anthocyane enthaltenden *tt7*-Mutante, die kein Quercetin synthetisieren kann. Die Behandlung der Genotypen mit unterschiedlichen Lichtqualitäten bestätigte die Abschirmung von grünem Licht als Ursache. Auch bei der gezielten Erzeugung photooxidativer Bedingungen mit Methylviologen und rotem Licht war PS II in den Blättern des Wildtyps weniger deaktiviert als bei den Vergleichspartnern, sodass ohne Abschirmungseffekt auch die antioxidative Wirkung der Pigmente auftrat. Da sich die zelluläre Kapazität der drei Genotypen zur Neutralisierung von H₂O₂ nicht im Wesentlichen unterschied, könnten *in vivo* sowohl die Abschirmung als auch die antioxidative Wirkung nebeneinander aufgetreten sein. Die Resultate dazu belegten die gleichzeitige Wirkung beider Prozesse. Wahrscheinlich schützen die vakuolären Anthocyane aber primär durch ihre Abschirmung und detoxifizieren das mobile H₂O₂ nur, wenn in den Chloroplasten die Kapazität dafür nicht ausreicht.

Summary

Many plant species synthesize anthocyanins in their leaves under conditions when photosynthesis is limited and the photosynthetic apparatus therefore is sensitive to prolonged high irradiance. Because of their accumulation in exposed leaf tissues the compounds could participate in light protection. It is still a subject of debate, how anthocyanins could prevent inhibition of photosystem II (PS II). On the one hand the pigments are supposed to protect the mesophyll against high irradiance by shielding excessive light. Alternatively, anthocyanins are able to detoxify reactive oxygen species due to their antioxidative effect avoiding the degradation of PS II. The aim of this work is to clarify the photoprotective role of anthocyanins in leaves.

The optical screening by anthocyanins has been demonstrated on leaves of the green and red variety of *Berberis thunbergii* / *thunbergii atropurpurea*. The comparison of chlorophyll fluorescence excitation spectra of green and red leaves shows that anthocyanins *in vivo* absorb green light. Considering the absorption maxima a non-invasive optical method has been established to quantify the screening effect with chlorophyll fluorescence excitation ratios. In dark red leaves of *B. thunbergii atropurpurea* 90 % of the green excitation light was attenuated by the red pigments. In consequence of the broad *in vivo*-absorption of anthocyanins the method was spectrally extended to capture the overall screening effect. Following this, it was possible to determine the effective photon flux densities of photosynthetically active radiation reaching the mesophyll. Gas exchange measurements of *Berberis* leaves independently confirm the screening effect. The declined quantum yields of photosynthetic oxygen evolution in red leaves matched the effective photon flux densities of the mesophyll.

By analyzing the light acclimation of red *B. thunbergii* leaves the extent of the screening effect has been verified. The permanent attenuation of light caused not only the reduction of photosynthetic capacity but also the adjustment of the light harvesting complexes. For instance the chlorophyll a / b ratios of red leaves were consistent with the effective photon flux densities of the fluorescence lamps applied during the cultivation of plants. Also the pool sizes of the pigments of the xanthophyll cycle decreased correspondingly to the light intensities which actually caused the acclimation.

The model plant *Arabidopsis thaliana* was used to examine the putative light protection of anthocyanins in leaves. High light treatments with red leaves of the wild type, green leaves of the *tt3*-mutant and bright reddish leaves of the *tt7*-mutant which is blocked in the biosynthesis of quercetin indicated that under white light the wild type is less affected by photoinhibition. Exposures of the three genotypes to different light qualities pointed to a photoprotective screening of green light by anthocyanins. Photooxidative stress induced by methyl viologen and red light avoiding a screening effect of anthocyanins similarly caused lower photoinhibition in red leaves of the wild type. The results clearly show that *in vivo* also the antioxidative effect of anthocyanins prevents the deactivation of PS II. The three genotypes basically had the same cellular capacity to neutralize H₂O₂ leading to the hypothesis that screening and antioxidative effect simultaneously avoid inhibition of PS II. Experiments confirmed the assumption. In a model concept vacuolar anthocyanins primarily shield the photosystems against high light and detoxify H₂O₂ only when the capacities of chloroplasts are exhausted.

6 Literaturverzeichnis

- Aaby K., Ekeberg D., Skrede G. (2007): Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4395-4406
- Adams W. W., Demmig-Adams B. (1994): Carotenoid composition and down regulation of photosystem II in three conifer species during the winter. *Physiologia Plantarum* 92: 451-458
- Agarwal R., Chase S. D. (2002): Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B* 775: 121-126
- Agati G., Brunetti C., di Ferdinando M., Ferrini F., Pollastri S., Tattini M. (2013): Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72: 35-45
- Agati G., Stefano G., Biricolti S., Tattini M. (2009): Mesophyll distribution of 'antioxidant' flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Annals of Botany* 104: 853-861
- Agati G., Traversi M. L., Cerovic Z. G. (2008): Chlorophyll fluorescence imaging for the noninvasive assessment of anthocyanins in whole grape (*Vitis vinifera* L.) bunches. *Photochemistry and Photobiology* 84: 1431-1434
- Agati G., Meyer S., Matteini P., Cerovic Z. G. (2007a): Assessment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a noninvasive chlorophyll fluorescence method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1053-1061
- Agati G., Matteini P., Goti A., Tattini M. (2007b): Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist* 174: 77-89
- Agati G., Pinelli P., Cortés Ebener S., Romani A., Cartelat A., Cerovic Z. G. (2005): Nondestructive evaluation of anthocyanins in olive (*Olea europaea*) fruits by *in situ* chlorophyll fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1354-1363
- Agati G., Fusi F., Mazzinghi P., Lipucci di Paola M. (1993): A simple approach to the evaluation of the reabsorption of chlorophyll fluorescence spectra in intact leaves. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 17: 163-171
- Aida R., Yoshida K., Kondo T., Kishimoto S., Shibata M. (2000): Copigmentation gives bluer flowers on transgenic *Torenia* plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Science* 160: 49-56
- Albert N. W., Lewis D. H., Zhang H., Irving L. J., Jameson P. E., Davies K. M. (2009): Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *Journal of Experimental Botany* 60: 2191-2202
- Alscher R. G., Ertuk N., Heath L. S. (2002): Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341
- Andersen Ø. M., Fossen T., Torskangerpoll K., Fossen A., Hauge U. (2004): Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry* 65: 405-410
- Anderson J. M., Park Y.-I., Chow W. S. (1997): Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum* 100: 214-223
- Anderson J. M., Chow W. S., Park Y.-I. (1995): The grand design of photosynthesis: Acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynthesis Research* 46: 129-139
- Antolín M. C., Hekneby M., Sánchez-Díaz M. (2005): Contrasting response of photosynthesis at low temperatures in different annual legumes species. *Photosynthetica* 43: 65-74
- Arató A., Bondarava N., Krieger-Liszkay A. (2004): Production of reactive oxygen species in chloride- and calcium-depleted photosystem II and their involvement in photoinhibition. *Biochimica et Biophysica Acta* 1608: 171-180
- Archetti M. (2009): Classification of hypotheses on the evolution of autumn colours. *Oikos* 118: 328-333
- Aronsson H., Jarvis P. (2002): A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts. *FEBS Letters* 529: 215-220
- Asen S., Stewart R. N., Norris K. H. (1972): Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* 11: 1139-1144

Literaturverzeichnis

- Aubourg S. P. (1993): Review: Interaction of malondialdehyde with biological molecules – new trends about reactivity and significance. *International Journal of Food Science and Technology* 28: 323-335
- Bae R.-N., Kim K.-W., Kim T.-C., Lee S.-K. (2006): Anatomical observations of anthocyanin rich cells in apple skins. *HortScience* 41: 733-736
- Balegh S. E., Biddulph O. (1970): The photosynthetic action spectrum of the bean plant. *Plant Physiology* 46: 1-5
- Bailey S., Walters R. G., Jansson S., Horton P. (2001): Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213: 794-801
- Barber J. (1994): Molecular basis of the vulnerability of photosystem II to damage by light. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 201-208
- Barros T., Kühlbrandt W. (2009): Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting complex II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 753-772
- Becana M., Moran J. F., Iturbe-Ormaetxe I. (1998): Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. *Plant and Soil* 201: 137-147
- Beckwith A. G., Zhang Y., Seeram N. P., Cameron A. C., Nair M. G. (2004): Relationship of light quantity and anthocyanin production in *Pennisetum setaceum* cvs. Rubrum and Red Riding Hood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 456-461
- Bidigare R. R., Ondrusek M. E., Kennicutt M. C., Iturriaga R., Harvey H. R., Hoham R. W., Macko S. A. (1993): Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *Journal of Phycology* 29: 427-434
- Bienert G. P., Møller A. L. B., Kristiansen K. A., Schulz A., Møller I. M., Schjoerring J. K., Jahn T. P. (2007): Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 1183-1192
- Bienert G. P., Schjoerring J. K., Jahn T. P. (2006): Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 994-1003
- Bilger W., Veit M., Schreiber L., Schreiber U. (1997): Measurement of leaf epidermal transmittance of UV radiation by chlorophyll fluorescence. *Physiologia Plantarum* 101: 754-763
- Bilger W., Fisahn J., Brummet W., Kossmann J., Willmitzer L. (1995): Violaxanthin cycle pigment contents in potato and tobacco plants with genetically reduced photosynthetic capacity. *Plant Physiology* 108: 1479-1486
- Biswal B. (1995): Carotenoid catabolism during leaf senescence and its control by light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 30: 3-13
- Björkman O., Demmig-Adams B. (1994): Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In: *Ecophysiology of photosynthesis*. Schulze E.-D., Caldwell M. M. (eds). Springer Verlag Berlin: 17-47
- Björkman O., Demmig B. (1987): Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504
- Bloor S. J., Abrahams S. (2002): The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 59: 343-346
- Boardman N. K. (1977): Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology* 28: 355-377
- Bolton J. R., Hall D. O. (1991): The maximum efficiency of photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* 53: 545-548
- Brüggemann W., van der Kooij T. A. W., van Hasselt P. R. (1992): Long term chilling of young tomato plants under low light and subsequent recovery. *Planta* 186: 172-178
- Burchard P., Bilger W., Weissenböck G. (2000): Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant, Cell and Environment* 23: 1373-1380

Literaturverzeichnis

- Burger J., Edwards G. E. (1996): Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant Cell Physiology* 37: 395-399
- Buschmann C. (2007): Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaves. *Photosynthesis Research* 92: 261-271
- Casano L. M., Gómez L. D., Lascano H. R., González C. A., Trippi V. S. (1997): Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. *Plant and Cell Physiology* 38: 433-440
- Castellarin S. D., Pfeiffer A., Sivilotti P., Degan M., Peterlunger E., di Gaspero G. (2007): Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in ripening fruits of grapevine under seasonal water deficit. *Plant, Cell and Environment* 30: 1381-1399
- Castaneda-Ovando A., de Lourdes Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández M. E., Rodríguez J. A., Gálan-Vidal C. A. (2009): Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113: 859-871
- Cerovic Z. G., Moise N., Agati G., Latouche G., Ben Ghazlen N., Meyer S. (2008): New portable optical sensors for the assessment of winegrape phenolic maturity based on berry fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 650-654
- Cerovic Z. G., Ounis A., Cartelat A., Latouche G., Goulas Y., Meyer S., Moya I. (2002): The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive *in situ* assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell and Environment* 25: 1663-1676
- Chalker-Scott L. (1999): Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70: 1-9
- Champney W. S., Tober C. L. (2000): Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin b antibiotics. *Current Microbiology* 41: 126-135
- Chattopadhyay S., Ang L.-H., Puente P., Deng X.-W., Wei N. (1998): *Arabidopsis* bZIP protein HY5 interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *The Plant Cell* 10: 673-683
- Chen L., Cheng L. (2003): Carbon assimilation and carbohydrate metabolism of 'Concord' grape (*Vitis labrusca* L.) leaves in response to nitrogen supply. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 754-760
- Chow W. S., Melis A., Anderson J. M. (1990): Adjustments of photosystem stoichiometry in chloroplasts improve the quantum efficiency of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 87: 7502-7506
- Ciampi S., Gentili E., Guidi L., Soldatini G. F. (1996): The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. *Plant Science* 118: 177-184
- Close D. C., Beadle C. L. (2003): The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review* 69: 149-161
- Close D. C., Beadle C. L., Brown P. H., Holz G. K. (2000): Cold-induced photoinhibition affects establishment of *Eucalyptus nitens* (Deane and Maiden) Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. *Trees* 15: 32-41
- Collins A. M., Jones H. D. T., Han D., Hu Q., Beechem T. E., Timlin J. A. (2011): Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS ONE* 6: e24302 (19.03.2012)
- Cominelli E., Gusmaroli G., Allegra D., Galbiati M., Wade H. K., Jenkins G. I., Tonelli C. (2008): Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 165: 886-894
- Conn S., Curtin C., Bézier A., Franco C., Zhang W. (2008): Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany* 59: 3621-3634
- Croce R., Morosinotto T., Castelletti S., Breton J., Bassi R. (2002): The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I: *Biochimica et Biophysica Acta* 1556: 29-40
- Cui M., Vogelmann T. C., Smith W. K. (1991): Chlorophyll and light gradients in sun and shade leaves of *Spinacia oleracea*. *Plant, Cell and Environment* 14: 493-500

Literaturverzeichnis

- Cunnigham Jr. F. X., Gantt E. (1998): Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557-583
- Dangles O., Saito N., Brouillard R. (1993): Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry* 34: 119-124
- Davies B. H. (1976): Carotenoids. In Goodwin T. W. (ed): *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press, London
- Davison P. A., Hunter C. N., Horton P. (2002): Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418: 203-206
- Demmig-Adams B. (1998): Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant Cell Physiology* 39: 474-482
- Demmig-Adams B., Adams W. W. (1996): Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198: 460-470
- Demmig-Adams B., Gilmore A. M., Adams W. W. (1996a): *In vivo* functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 10: 403-412
- Demmig-Adams B., Adams W. W., Barker D. H., Logan B. A., Bowling D. R., Verhoeven A. S. (1996b): Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum* 98: 253-264
- Demmig-Adams B., Adams W. W. (1992a): Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626
- Demmig-Adams B., Adams W. W. (1992b): Carotenoid composition in sun and shade leaves of plants with different life forms. *Plant, Cell and Environment* 15: 411-419
- Dodeigne C., Thunus L., Lejeune R. (2000): Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta* 51: 415-439
- Eskling M., Arvidsson P.-O., Åkerlund H.-E. (1997): The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum* 100: 806-816
- Esteban R., Fernández-Marín B., Becerril J. M., García-Plazaola J. I. (2008): Photoprotective implications of leaf variegation in *E. dens-canis* L. and *P. officinalis* L.. *Journal of Plant Physiology* 165: 1255-1263
- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* 11: 81-128
- Estévez L., Mosquera R. A. (2008): Molecular structure and antioxidant properties of delphinidin. *The Journal of Physical Chemistry A* 112: 10614-10623
- Estévez M., Kylli P., Puolanne E., Kivikari R., Heinonen M. (2008): Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: Interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 10933-10940
- Evans J. R., Poorter H. (2001): Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant, Cell and Environment* 24: 755-767
- Evans J. R. (1989): Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C_3 plants. *Oecologia* 78: 9-19
- Evans J. R. (1987): The dependence of quantum yield on wavelength and growth irradiance. *Australian Journal of Plant Physiology* 14: 69-79
- Evelson P., Travacio M., Repetto M., Escobar J., Llesuy S., Lissi E. A. (2001): Evaluation of total reactive antioxidant potential of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 388: 261-266
- Farmer E. E., Davoine C. (2007): Reactive electrophile species. *Current Opinoin in Plant Biology* 10: 380-386
- Feild T. S., Lee D. W., Holbrook N. M. (2001): Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of Red-Osier Dogwood. *Plant Physiology* 127: 566-574

Literaturverzeichnis

- Ferrar P. J., Osmond C. B. (1986): Nitrogen as a factor influencing photoinhibition and photosynthetic acclimation after transfer of shade-grown *Solanum dulcamara* to bright light. *Planta* 168: 563-570
- Ferreres F., Figueiredo R., Bettencourt S., Carqueijeiro I., Oliveira J., Gil-Izquierdo A., Pereira D. M., Valentão P., Andrade P. B., Duarte P., Ros Barcelo A., Sottomayor M. (2011): Identification of phenolic compounds in isolated vacuoles of the medicinal plant *Catharanthus roseus* and their interaction with vacuolar class III peroxidase: an H₂O₂ affair? *Journal of Experimental Botany* 62: 2841-2854
- Feyissa D. N., Løvdaal T., Olsen K. M., Slimestad R., Lillo C. (2009): The endogenous *GL3*, but not *EGL3*, is necessary for anthocyanin accumulation as induced by nitrogen depletion in *Arabidopsis* rosette stage leaves. *Planta* 230: 747-754
- Figueiredo P., Elhabiri M., Toki K., Saito N., Dangles O., Brouillard R. (1996): New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry* 41: 301-308
- Ford C. M., Boss P. K., Høj P. B. (1998): Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 9224-9233
- Formaggio E., Cinque G., Bassi R. (2001): Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. *Journal of Molecular Biology* 314: 1157-1166
- Fujii T., Yokoyama E., Inoue K., Sakurai H. (1990): The sites of electron donation of photosystem I to methyl viologen. *Biochimica et Biophysica Acta* 1015: 41-48
- Gamon J. A., Surfus J. S. (1999): Assessing leaf pigment content and activity with a reflectometer. *New Phytologist* 143: 105-117
- Gibasiewicz K., Dobek A., Breton J., Leibl W. (2001): Modulation of primary radical pair kinetics and energetics in photosystem II by the redox state of the quinone electron acceptor Q_A. *Biophysical Journal* 80: 1617-1630
- Gilmore A. M. (1997): Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99: 197-209
- Giovanelli G., Brenna O. V. (2007): Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *European Food Research and Technology* 225: 145-150
- Girotti A. W. (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research* 39: 1529-1542
- Girotti S., Fini F., Bolelli L., Savini L., Sartini E., Arfelli G. (2006): Chemiluminescent determination of total antioxidant capacity during winemaking. *Luminescence* 21: 233-238
- Girotti S., Bolelli L., Budini R., Arfelli G. (2002): Comparison of analytical methods in determining total antioxidant capacity in red wine. *Analytical Letters* 35: 747-758
- Gitelson A. A., Chivkunova O. B., Merzlyak M. N. (2009): Nondestructive estimation of anthocyanins and chlorophylls in anthocyanic leaves. *American Journal of Botany* 96: 1861-1868
- Gitelson A. A., Keydan G. P., Merzlyak M. N. (2006): Three-band model for noninvasive estimation of chlorophyll, carotenoids, and anthocyanin contents in higher plant leaves. *Geophysical Research Letters* 33: 1-5
- Gitelson A. A., Merzlyak M. N., Chivkunova O. B. (2001): Optical properties and nondestructive estimation of anthocyanin content in plant leaves. *Photochemistry and Photobiology* 74: 38-45
- Giusti M. M., Rodríguez-Saona L. E., Wrolstad R. E. (1999): Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4631-4637
- Gombau L., García F., Lahoz A., Fabre M., Roda-Navarro P., Majano P., Alonso-Lebrero J. L., Pivel J. P., Castell J. V., Gómez-Lechon M. J., González S. (2006): *Polypodium leucotomos* extract: Antioxidant activity and disposition. *Toxicology in Vitro* 20: 464-471
- Gould K. S. (2004): Nature's swiss army knife: The diverse protective roles of anthocyanins in leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5: 314-320

Literaturverzeichnis

- Gould K. S., Mckelvie J., Markham K. R. (2002a): Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* 25: 1261-1269
- Gould K. S., Vogelmann T. C., Han T., Clearwater M. J. (2002b): Profiles of photosynthesis within red and green leaves of *Quintinia serrata*. *Physiologia Plantarum* 116: 127-133
- Gould K. S., Quinn B. D. (1999): Do anthocyanins protect leaves of New Zealand native species from UV-B? *New Zealand Journal of Botany* 37: 175-178
- Grünewald K., Hirschberg J., Hagen C. (2001): Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 6023-6029
- Gutteridge J. M. C. (1986): Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS* 201: 291-295
- Gutteridge J. M. C. (1981): Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Letters* 128: 343-346
- Gutteridge J. M. C., Halliwell B. (1990): The measurement and mechanism of lipid-peroxidation in biological-systems. *Trends in Biochemical Sciences* 15: 129-135
- Hagen S. F., Solhaug K. A., Bengtsson G. B., Borge G. I. A., Bilger W. (2006): Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. *Postharvest Biology and Technology* 41: 156-163
- Hakala M., Tuominen I., Keränen M., Tyystjärvi T., Tyystjärvi E. (2005): Evidence for the role of the oxygen-evolving manganese complex in photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1706: 68-80
- Haldimann P., Fracheboud Y., Stamp P. (1995): Carotenoid composition in *Zea mays* developed at sub-optimal temperature and different light intensities. *Physiologia Plantarum* 95: 409-414
- Hartmann U., Sagasser M., Mehrtens F., Stracke R., Weisshaar B. (2005): Differential combinatorial interactions of *cis*-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Molecular Biology* 57: 155-171
- Hasegawa H., Fukasawa-Hakada T., Okuno T., Niizeki M., Suzuki M. (2001): Anthocyanin accumulation and related gene expression in Japanese parsley (*Oenanthe stolonifera*, DC.) induced by low temperature. *Journal of Plant Physiology* 158: 71-78
- 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
- Havaux M., Kloppstech K. (2001): The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta* 213: 953-966
- Havaux M. (1998): Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3: 147-151
- Hemelrijk P. W., Kwa S. L. S., van Grondelle R., Dekker J. P. (1992): Spectroscopic properties of LHC-II, the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from chloroplast membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1098: 159-166
- Henmi T., Miyao M., Yamamoto Y. (2004): Release and reactive-oxygen-mediated damage of the oxygen-evolving complex subunits of PS II during photoinhibition. *Plant and Cell Physiology* 45: 243-250
- Herbert S. K., Samson G., Fork D. C., Laudenbach D. E. (1992): Characterization of damage to photosystems I and II in a cyanobacterium lacking detectable iron superoxide dismutase activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 8716-8720
- Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. (2011): Recent advances in transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* 62: 2465-2483
- Hideg E., Kós P. B., Vass I. (2007): Photosystem II damage induced by chemically generated singlet oxygen in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum* 131: 33-40

Literaturverzeichnis

- Hideg E., Kálai T., Hideg K., Vass I. (1998): Photoinhibition of photosynthesis *in vivo* results in singlet oxygen production. Detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry* 37: 11405-11411
- Hoch W. A., Singaas E. L., McCown B. H. (2003): Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology* 133: 1296-1305
- Holm M., Ma L.-G., Qu L.-J., Deng X.-W. (2002): Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 16: 1247-1259
- Holton T. A., Cornish E. C. (1995): Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1071-1083
- Huang J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou Y.-H., Yu J.-Q., Chen Z. (2010): Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology* 153: 1526-1538
- Hughes N. M., Burkey K. O., Cavender-Bares J., Smith W. K. (2012): Xanthophyll cycle pigment and antioxidant profiles of winter-red (anthocyanic) and winter-green (acyanic) angiosperm evergreen species. *Journal of Experimental Botany* 63: 1895-1905
- Hughes N. M. (2011): Winter leaf reddening in 'evergreen' species. *New Phytologist* 190: 573-581
- Hughes N. M., Smith W. K. (2007a): Attenuation of incident light in *Galax urceolata* (Diapensiaceae): Concerted influence of adaxial and abaxial anthocyanic layers on photoprotection. *American Journal of Botany* 94: 784-790
- Hughes N. M., Smith W. K. (2007b): Seasonal photosynthesis and anthocyanin production in 10 broadleaf evergreen species. *Functional Plant Biology* 34: 1072-1079
- Hughes N. M., Morley C. B., Smith W. K. (2007): Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *New Phytologist* 175: 675-685
- Hughes N. M., Neufeld H. S., Burkey K. O. (2005): Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytologist* 168: 575-587
- Huner N. P. A., Maxwell D. P., Gray G. R., Savitch L. V., Krol M., Ivanov A. G., Falk S. (1996): Sensing environmental temperature change through imbalances between energy supply and energy consumption: Redox state of photosystem II. *Physiologia Plantarum* 98: 358-364
- Hutchison R. S., Groom Q., Ort D. R. (2000): Differential effects of chilling-induced photooxidation on the redox regulation of photosynthetic enzymes. *Biochemistry* 39: 6679-6688
- Ilyina A. D., Martínez-Hernández J. L., Mauricio Benavides J. E., López Luján B. H., Bogatcheva E. S., Romero García J., Rodríguez Martínez J. (2003): Determination of phenol using an enhanced chemiluminescent assay. *Luminescence* 18: 31-36
- Inada K. (1976): Action spectra for photosynthesis in higher plants. *Plant and Cell Physiology* 17: 355-365
- Iriel A., Lagorio M. G. (2009): Biospectroscopy of *Rhododendron indicum* flowers. Non-destructive assessment of anthocyanins in petals using a reflectance-based method. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8: 337-344
- Ioku K., Tsushida T., Takei Y., Nakatani N., Terao J. (1995): Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1234: 99-104
- Iturbe-Ormaetxe I., Escuredo P. R., Arrese-Igor C., Becana M. (1998): Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology* 116: 173-181
- Jahns P., Holzwarth A. R. (2012): The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817: 182-193
- Jahns P., Latowski D., Strzalka K. (2009): Mechanism and regulation of violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 3-14
- Jegerschöld C., Styring S. (1996): Spectroscopic characterization of intermediate steps involved in donor-side-induced photoinhibition of photosystem II. *Biochemistry* 35: 7794-7801

Literaturverzeichnis

- Johnsen G., Prézelin B. B., Jovine R. V. M. (1997): Fluorescence excitation spectra and light utilization in two red tide dinoflagellates. *Limnology and Oceanography* 42: 1166-1177
- Johnson D. M., Smith W. K., Vogelann T. C., Brodersen C. R. (2005): Leaf architecture and direction of incident light influence mesophyll fluorescence profiles. *American Journal of Botany* 92: 1425-1431
- Juszczuk I. M., Wiktorowska A., Malusá E., Rychter A. M. (2004): Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 267: 41-49
- Jones T. L., Tucker D. E., Ort D. R. (1998): Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. *Plant Physiology* 118: 149-158
- Kähkönen M. P., Heinonen M. (2003): Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 628-633
- Kano M., Takayanagi T., Harada K., Makino K., Ishikawa F. (2005): Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69: 979-988
- Kato M. C., Hikosaka K., Hirotsu N., Makino A., Hirose T. (2003): The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. *Plant & Cell Physiology* 44: 318-325
- Kim J.-H., Lee C.-H. (2005): *In vivo* deleterious effects specific to reactive oxygen species on photosystem I and II after photo-oxidative treatments of rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Plant Science* 168: 1115-1125
- Kimura M., Yamamoto Y. Y., Seki M., Sakurai T., Sato M., Abe T., Yoshida S., Manabe K., Shinozaki K., Matsui M. (2003): Identification of *Arabidopsis* genes regulated by high light-stress using cDNA microarray. *Photochemistry and Photobiology* 77: 226-233
- Kingston-Smith A. H., Harbinson J., Williams J., Foyer C. H. (1997): Effect of chilling on carbon assimilation, enzyme activation and photosynthetic electron transport in the absence of photoinhibition in maize leaves. *Plant Physiology* 114: 1039-1046
- Kitajima M., Butler W. L. (1975): Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta* 376: 105-115
- Kitamura S., Shikazono N., Tanaka A. (2004): *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 37: 104-114
- Koes R., Verweij W., Quattrocchio F. (2005): Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* 10: 236-242
- Koizumi M., Takahashi K., Mineuchi K., Nakamura T., Kano H. (1998): Light gradients and the transverse distribution of chlorophyll fluorescence in mangrove and *Camellia* leaves. *Annals of Botany* 81: 527-533
- Kondo T., Yoshida K., Nakagawa A., Kawai T., Tamura H., Goto T. (1992): Structural basis of blue-colour development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature* 358: 515-518
- Kovinich N., Saleem A., Arnason J. T., Miki B. (2010): Functional characterization of a UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase from the seed coat of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Phytochemistry* 71: 1253-1263
- Krause G. H., Koroleva O. Y., Dalling J. W., Winter K. (2001): Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. *Plant, Cell and Environment* 24: 1345-1352
- Krieger-Liszkay A., Kós P. B., Hideg E. (2011): Superoxide anion radicals generated by methylviologen in photosystem I damage photosystem II. *Physiologia Plantarum* 142: 17-25
- Krieger-Liszkay A., Trebst A. (2006): Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PS II reaction centre. *Journal of Experimental Botany* 57: 1677-1684
- Krieger-Liszkay A. (2004): Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56: 337-346

Literaturverzeichnis

- Kumar V., Sharma S. S. (1999): Nutrient deficiency-dependent anthocyanin development in *Spirodela polyrhiza* L. Schleid. *Biologia Plantarum* 42: 621-624
- Kyparissis A., Grammatikopoulos G., Manetas Y. (2007): Leaf morphological and physiological adjustments to the spectrally selective shade imposed by anthocyanins in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* 27: 849-857
- Kytridis V.-P., Karageorgou P., Levizou E., Manetas Y. (2008): Intra-species variation in transient accumulation of leaf anthocyanins in *Cistus creticus* during winter: Evidence that anthocyanins may compensate for an inherent photosynthetic and photoprotective inferiority of the red-leaf phenotyp. *Journal of Plant Physiology* 165: 952-959
- Kytridis V.-P., Manetas Y. (2006): Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential *in vivo* antioxidants: Evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *Journal of Experimental Botany* 57: 2203-2210
- Lan J.-X., Li A.-L., Chen C.-X. (2011): Effect of transient accumulation of anthocyanin on leaf development and photoprotection of *Fagopyrum dibotrys* mutant. *Biologia Plantarum* 55: 766-770
- Latifi A., Ruiz M., Zhang C.-C. (2009): Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 258-278
- Lea U. S., Slimestad R., Smedvig P., Lillo C. (2007): Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta* 225: 1245-1253
- Lee D. W., O'Keefe J., Holbrook N. M., Field T. S. (2003): Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecological Research* 18: 677-694
- Lee D. W. (2002): Anthocyanins in leaves: Distribution, phylogeny and development. *Advances in Botanical Research* 37: 37-53
- Lee J., He K., Stolc V., Lee H., Figueroa P., Gao Y., Tongprasit W., Zhao H., Lee I., Deng X. W. (2007): Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *The Plant Cell* 19: 731-749
- Lehrer J. M., Brand M. H. (2010): Purple-leaved Japanese barberry (var. *atropurpurea*) genotypes becomes visually indistinguishable from green-leaved genotypes (*Berberis thunbergii* DC.) at low light levels. *Journal of Environmental Horticulture* 28: 187-189
- Leong T.-Y., Anderson J. M. (1984): Adaptation of thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynthesis Research* 5: 105-115
- Leyva A., Jarillo J. A., Salinas J., Martinez-Zapater J. M. (1995): Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiology* 108: 39-46
- Liakopoulos G., Nikolopoulos D., Klouvatou A., Vekkos K.-A., Manetas Y., Karabourniotis G. (2006): The photoprotective role of epidermal anthocyanins and surface pubescence in young leaves of grapevine (*Vitis vinifera*). *Annals of Botany* 98: 257-265
- Lichtenthaler H. K. (2007): Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research* 92: 163-179
- Lin W., Navaratnam S., Yao S., Lin N. (1998): Antioxidative properties of hydroxycinnamic acid derivatives and a phenylpropanoid glycoside. A pulse radiolysis study. *Radiation Physics and Chemistry* 53: 425-430
- Liu K., Sun J., Song Y., Liu B., Xu Y., Zhang S., Tian Q., Liu Y. (2004): Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in D1/D2/cytochrome *b*₅₅₉ photosystem II reaction center complex. *Photosynthesis Research* 81: 41-47
- Logan B. A., Barker D. H., Demmig-Adams B., Adams W. W. (1996): Acclimation of leaf carotenoid composition and ascorbate levels to gradients in the light environment within an Australian rainforest. *Plant, Cell and Environment* 19: 1083-1090
- Long S. P., Humphries S., Falkowski P. G. (1994): Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 633-662

Literaturverzeichnis

- Løvdaal T., Olsen K. M., Slimestad R., Verheul M., Lillo C. (2010): Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71: 605-613
- Lu Y.-P., Li Z.-C., Rea P. A. (1997): *AtMRP1* gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 94: 8243-8248
- Lupínková 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
- Maeda H., Sakuragi Y., Bryant D. A., DellaPenna D. (2005): Tocopherols protect *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 from lipid peroxidation. *Plant Physiology* 138: 1422-1435
- Manetas Y., Buschmann C. (2011): The interplay of anthocyanin biosynthesis and chlorophyll catabolism in senescing leaves and the question of photosystem II photoprotection. *Photosynthetica* 49: 515-522
- Manetas Y. (2006): Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora* 201: 163-177
- Manetas Y., Petropoulou Y., Psaras G. K., Drinia A. (2003): Exposed red (anthocyanic) leaves of *Quercus coccifera* display shade characteristics. *Functional Plant Biology* 30: 265-270
- Manetas Y., Drinia A., Petropoulou Y. (2002): High contents of anthocyanins in young leaves are correlated with low pools of xanthophyll cycle components and low risk of photoinhibition. *Photosynthetica* 40: 349-354
- Mano J., Miyatake F., Hiraoka E., Tamoi M. (2009): Evaluation of the toxicity of stress-related aldehydes to photosynthesis in chloroplasts. *Planta* 230: 639-648
- Mano J., Ohno C., Domae Y., Asada K. (2001): Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate detected with *in vivo* ESR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504: 275-287
- Markwell J., Bruce B. D., Keegstra K. (1992): Isolation of a carotenoid-containing sub-membrane particle from the chloroplastic envelope outer membrane of pea (*Pisum sativum*). *The Journal of Biological Chemistry* 267: 13933-13937
- Marrs K. A., Alfenito M. R., Lloyd L. M., Walbot V. (1995): A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 375: 397-400
- Martens S., Preuß A., Matern U. (2010): Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L.. *Phytochemistry* 71: 1040-1049
- Martens S., Teeri T., Forkmann G. (2002): Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS Letters* 531: 453-458
- Martino-Catt S., Ort D. R. (1992): Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 3731-3735
- Melis A. (1999): Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends in Plants Science* 4: 130-135
- Mendez M., Gwynn Jones D., Manetas Y. (1999): Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytologist* 144: 275-282
- Merzlyak M. N., Chivkunova O. B., Solovchenko A. E., Razi Naqvi K. (2008a): Light absorption by anthocyanins in juvenile, stressed and senescing leaves. *Journal of Experimental Botany* 59: 3903-3911
- Merzlyak M. N., Melø T. B., Razi Naqvi K. (2008b): Effect of anthocyanins, carotenoids, and flavonols on chlorophyll fluorescence excitation spectra in apple fruit: signature analysis, assessment, modelling, and relevance to photoprotection. *Journal of Experimental Botany* 59: 349-359
- Merzlyak M. N., Solovchenko A. E., Gitelson A. A. (2003): Reflectance spectral features and non-destructive estimation of chlorophyll, carotenoid and anthocyanin content in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 27: 197-211

Literaturverzeichnis

- Merzlyak M. N., Chivkunova O. B. (2000): Light-stress-induced pigment changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 55: 155-163
- Mishra N. P., Francke C., van Gorkom H. J., Ghanotakis D. F. (1994): Destructive role of singlet oxygen during aerobic illumination of the photosystem II core complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1186: 81-90
- Miyagawa Y., Tamoi M., Shigeoka S. (2000): Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology* 41: 311-320
- Miyake C., Asada K. (1996): Inactivation mechanism of ascorbate peroxidase at low concentrations of ascorbate; hydrogen peroxide decomposes compound I of ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 37: 423-430
- Miyao M., Ikeuchi M., Yamamoto N., Ono T. (1995): Specific degradation of the D1 protein of photosystem II by treatment with hydrogen peroxide in darkness: Implications for the mechanism of degradation of the D1 protein under illumination. *Biochemistry* 34: 10019-10026
- Miyao M. (1994): Involvement of active oxygen species in degradation of the D1 protein under strong illumination in isolated subcomplexes of photosystem II. *Biochemistry* 33: 9722-9730
- Mol J., Grotewold E., Koes R. (1998): How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3: 212-217
- Moncada M. C., Moura S., Melo M. J., Roque A., Lodeiro C., Pina F. (2003): Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts. A source of blue and purple color. *Inorganica Chimica Acta* 356: 51-61
- Moran J. F., Becana M., Iturbe-Ormaetxe I., Frechilla S., Klucas R. V., Aparicio-Tejo P. (1994): Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352
- Mueh Bachmann K., Ebbert V., Adams W. W., Verhoeven A. S., Logan B. A., Demmig-Adams B. (2004): Effects of lincomycin on PS II efficiency, non-photochemical quenching, D1 protein and xanthophyll cycle during photoinhibition and recovery. *Functional Plant Biology* 31: 803-813
- Mueller L. A., Goodman C. D., Silady R. A., Walbot V. (2000): AN9, a *Petunia* glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology* 123: 1561-1570
- Müller R., Nilsson L., Krintel C., Nielsen T. H. (2004): Gene expression during recovery from phosphate starvation in roots and shoots of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 122: 233-243
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002): The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 31-57
- Murchie E. H., Horton P. (1997): Acclimation of photosynthesis to irradiance and spectral quality in British plant species: chlorophyll content, photosynthetic capacity and habitat preference. *Plant, Cell and Environment* 20: 438-448
- Nagata T., Todoriki S., Masumizu T., Suda I., Furuta S., Du Z., Kikuchi S. (2003): Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in *Arabidopsis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2992-2999
- Nair V., Cooper C. S., Vietti D. E., Turner G. A. (1986): The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids* 21: 6-10
- Nakajima J., Tanaka Y., Yamazaki M., Saito K. (2001): Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 25797-25803
- Nakano R., Ishida H., Makino A., Mae T. (2006): *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant and Cell Physiology* 47: 270-276
- Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880

Literaturverzeichnis

- Nakatsuka A., Yamagishi M., Nakano M., Tasaki K., Kobayashi N. (2009): Light-induced expression of basic helix-loop-helix genes involved in anthocyanin biosynthesis in flowers and leaves of asiatic hybrid lily. *Scientia Horticulturae* 121: 84-91
- Nambara E., Marion-Poll A. (2005): Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185
- Navas Díaz A., García Sanchez F., González García J. A. (1996): Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H₂O₂-horseradish peroxidase system: Comparative studies. *Analytica Chimica Acta* 327: 161-165
- Neill S. O., Gould K. S. (2003): Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants? *Functional Plant Biology* 30: 865-873
- Neill S. O., Gould K. S., Kilmartin P. A., Mitchell K. A., Markham K. R. (2002): Antioxidant activities of red versus green leaves in *Elatostema rugosum*. *Plant, Cell and Environment* 25: 539-547
- Nielsen I. L. F., Ravn Haren G., Loftin Magnussen E., Dragsted L. O., Rasmussen S. E. (2003): Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5861-5866
- Nielsen S. L., Simonsen A.-M. (2011): Photosynthesis and photoinhibition in two differently coloured varieties of *Oxalis triangularis* – the effect of anthocyanin content. *Photosynthetica* 49: 346-352
- Niinemets Ü., Kollist H., García-Plazaola J. I., Hernández A., Becerril J. M. (2003): Do the capacity and kinetics for modification of xanthophyll cycle pool size depend on growth irradiance in temperate trees?. *Plant, Cell and Environment* 26: 1787-1801
- Niinemets Ü., Bilger W., Kull O., Tenhunen J. D. (1998): Acclimation to high irradiance in temperate deciduous trees in the field: changes in xanthophyll cycle pool size and in photosynthetic capacity along a canopy light gradient. *Plant, Cell and Environment* 21: 1205-1218
- Nishio J. N. (2000): Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. *Plant, Cell and Environment* 23: 539-548
- Niyogi K. K. (1999): Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 333-359
- Noda Y., Kaneyuki T., Mori A., Packer L. (2002): Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanindins: delphinidin, cyanidin and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 166-171
- Noguchi T. (2002): Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: Photoprotection and photodamage of the D1 protein. *Plant and Cell Physiology* 43: 1112-1116
- Nussberger S., Dekker J. P., Kühlbrandt W., van Bolhuis B. M., van Grondelle R., van Amerongen H. (1994): Spectroscopic characterization of three different monomeric forms of the main chlorophyll a/b binding protein from chloroplast membranes. *Biochemistry* 33:14775-14783
- Oguchi R., Terashima I., Kou J., Chow W. S. (2011): Operation of dual mechanisms that both lead to photoinactivation of photosystem II in leaves by visible light. *Physiologia Plantarum* 142: 47-55
- Oguchi R., Terashima I., Chow W. S. (2009): The involvement of dual mechanisms of photoinactivation of photosystem II in *Capsicum annuum* L. plants. *Plant and Cell Physiology* 50: 1815-1825
- Oh M.-M., Carey E. E., Rajashekar C. B. (2009): Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 578-583
- Ohad I., Berg A., Berkowicz S. M., Kaplan A., Keren N. (2011): Photoinactivation of photosystem II: is there more than one way to skin a cat?. *Physiologia Plantarum* 142: 79-86
- Ohnishi N., Allakhverdiev S. I., Takahashi S., Higashi S., Watanabe M., Nishiyama Y., Murata N. (2005): Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction center. *Biochemistry* 44: 8494-8499

Literaturverzeichnis

- Olsen K. M., Slimestad R., Lea U. S., Brede C., Løvdaal T., Ruoff P., Verheul M., Lillo C. (2009): Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant, Cell and Environment* 32: 286-299
- Olsen K. M., Lea U. S., Slimestad R., Verheul M., Lillo C. (2008): Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; *PAL1* and *PAL2* have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. *Journal of Plant Physiology* 165: 1491-1499
- Öquist G., Chow W. S. (1992): On the relationship between the quantum yield of photosystem II electron transport, as determined by chlorophyll fluorescence and the quantum yield of CO₂-dependent O₂-evolution. *Photosynthesis Research* 33: 51-62
- Oren-Shamir M. (2009): Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants. *Plant Science* 177: 310-316
- Osborne B. A. (1994): Photon requirement for O₂-evolution in red (lambda=680 nm) light for some C₃ and C₄ plants and a C₃-C₄ intermediate species. *Plant, Cell and Environment* 17: 143-152
- Ougham H., Thomas H., Archetti M. (2008): The adaptive value of leaf colour. *New Phytologist* 179: 9-13
- Ounis A., Cerovic Z. G., Briantais J. M., Moya I. (2001): Dual-excitation FLIDAR for the estimation of epidermal UV absorption in leaves and canopies. *Remote Sensing of Environment* 76: 33-48
- Park Y.-I., Chow W. S., Anderson J. M. (1995): Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* 196: 401-411
- Passarini F., Wientjes E., van Amerongen H., Croce R. (2010): Photosystem I light-harvesting complex Lhca4 adopts multiple conformations: Red forms and excited-state quenching are mutually exclusive. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797: 501-508
- Pedrós R., Moya I., Goulas Y., Jacquemoud S. (2008): Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochemical and Photobiological Science* 7: 498-502
- Peer W. A., Brown D. E., Tague B. W., Muday G. K., Taiz L., Murphy A. S. (2001): Flavonoid accumulation patterns of Transparent Testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 536-548
- Pelletier M. K., Murrell J. R., Shirley B. W. (1997): Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 113: 1437-1445
- Pfannschmidt T., Nilsson A., Allen J. F. (1999): Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397: 625-628
- Pfündel E. E., Ben Ghazlen N., Meyer S., Cerovic Z. G. (2007): Investigating UV screening in leaves by two different types of portable UV fluorimeters reveals *in vivo* screening by anthocyanins and carotenoids. *Photosynthesis Research* 93: 205-221
- Pietrini F., Iannelli M. A., Massacci A. (2002): Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 25: 1251-1259
- Pomar F., Ros Barceló A. (2007): Are red leaves photosynthetically active? *Biologia Plantarum* 51: 799-800
- 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
- Pospíšil P. (2009): Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787: 1151-1160
- Pospíšil P., Šnrychová I., Kruk J., Strzalka K., Nauš J. (2006): Evidence that cytochrome *b₅₅₉* is involved in superoxide production in photosystem II: effect of synthetic short-chain plastoquinones in a cytochrome *b₅₅₉* tobacco mutant. *Biochemical Journal* 397: 321-327
- Ramsay N. A., Glover B. J. (2005): MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science* 10: 63-70

Literaturverzeichnis

- Ramos M. C., Torijas M. C., Navas Díaz A. (2001): Enhanced chemiluminescence biosensor for the determination of phenolic compounds and hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators B* 73: 71-75
- Ramos M. E., Lagorio M. G. (2004): True fluorescence spectra of leaves. *Photochemical and Photobiological Science* 3: 1063-1066
- Rao G. S. (1991): Release of 2-thiobarbituric acid reactive products from glutamate, deoxyuridine or DNA during autoxidation of dopamine in the presence of copper ions. *Pharmacology & Toxicology* 69: 164-166
- Rapisarda P., Fanella F., Maccarone E. (2000): Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2249-2252
- Rivadossi A., Zucchelli G., Garlaschi F. M., Jennings R. C. (1999): The importance of PS I chlorophyll red forms in light-harvesting by leaves. *Photosynthesis Research* 60: 209-215
- Rowan D. D., Cao M., Lin-Wang K., Cooney J. M., Jensen D. J., Austin P. T., Hunt M. B., Norling C., Hellens R. P., Schaffer R. J., Allan A. C. (2009): Environmental regulation of leaf colour in red *35S:PAP1 Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 182: 102-115
- Ruban A. V., Lee P. J., Wentworth M., Young A. J., Horton P. (1999): Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 10458-10465
- Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F., Castelli F. (1995): Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radical Biology and Medicine* 19: 481-486
- Saito K., Yamasaki M. (2002): Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. *New Phytologist* 155: 9-23
- Saito K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y., Yamazaki M. (1999): Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *The Plant Journal* 17: 181-189
- Sakuta M. (2000): Transcriptional control of chalcone synthase by environmental stimuli. *Journal of Plant Research* 113: 327-333
- Saleh L., Plieth C. (2010): Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nature Protocols* 5: 1627-1634
- Sarvikas P., Hakala M., Pätsikkä E., Tyystjärvi T., Tyystjärvi E. (2006): Action spectrum of photoinhibition in leaves of wild type and *npq1-2* and *npq4-1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 47: 391-340
- Sassenrath G. F., Ort D. R., Portis Jr. A. R. (1990): Impaired reductive activation of stromal bisphosphatases in tomato leaves following low-temperature exposure at high light. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 282: 302-308
- Schaberg P. G., van den Berg A. K., Murakami P. F., Shane J. B., Donnelly J. R. (2003): Factors influencing red expression in autumn foliage of sugar maple trees. *Tree Physiology* 23: 325-333
- Scheller H. V., Haldrup A. (2005): Photoinhibition of photosystem I. *Planta* 221: 5-8
- Schmid V. H. R., Thomé P., Rühle W., Paulsen H., Kühlbrandt W., Rogl H. (2001): Chlorophyll b is involved in long-wavelength spectral properties of light-harvesting complexes LHC I and LHC II. *FEBS Letters* 499: 27-31
- Schreiber U., Schliwa U., Bilger W. (1986): Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62
- Schubert J., Wilmer J. W. (1991): Does hydrogen peroxide exist "free" in biological systems? *Free Radical Biology and Medicine* 11: 545-555
- Schultze M. (2011): Die Funktion von UV-Schutzpigmenten bei Kühle in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Kiel
- Seemann J. R. (1989): Light adaptation/acclimation of photosynthesis and the regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity in sun and shade plants. *Plant Physiology* 91: 379-386

Literaturverzeichnis

- Shao L., Shu Z., Peng C.-L., Lin Z.-F., Yang C.-W., Gu Q. (2008): Enhanced sensitivity of *Arabidopsis* anthocyanin mutants to photooxidation: a study with fluorescence imaging. *Functional Plant Biology* 35: 714-724
- Shen B., Jensen R. G., Bohner H. J. (1997): Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* 115: 527-532
- Shin J., Park E., Choi G. (2007): PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49: 981-994
- Shiono M., Matsugaki N., Takeda K. (2005): Structure of the blue cornflower pigment. *Nature* 436: 791
- Sims D. A., Pearcy R. W. (1991): Photosynthesis and respiration in *Alocasia macorrhiza* following transfers to high and low light. *Oecologia* 86: 447-453
- Smillie R. M., Hetherington S. E. (1999): Photoabatement by anthocyanin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica* 36: 451-463
- Song Y. G., Liu B., Wang L. F., Li M. H., Liu Y. (2006): Damage to the oxygen-evolving complex by superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in photoinhibition of photosystem II. *Photosynthesis Research* 90: 67-78
- Sonoike K. (1996): Degradation of *psaB* gene product, the reaction center subunit of photosystem I, is caused during photoinhibition of photosystem I: possible involvement of active oxygen species. *Plant Science* 115: 157-164
- Steele M. R., Gitelson A. A., Rundquist D. C., Merzlyak M. N. (2009): Nondestructive estimation of anthocyanin content in grapevine leaves. *American Journal of Enology and Viticulture* 60: 87-92
- Steyn W. J., Wand S. J. E., Holcroft D. M., Jacobs G. (2002): Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349-361
- Stohs S. J., Bagchi D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 321-336
- Stracke R., Favory J.-J., Gruber H., Bartelniewoehner L., Bartels S., Binkert M., Funk M., Weissshaar B., Ulm R. (2010): The *Arabidopsis* bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the *PFG1/MYB12* gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant, Cell and Environment* 33: 88-103
- Sughara N., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K. (1999): Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid. *Free Radical Biology & Medicine* 27: 1313-1323
- Sun J., Nishio J. N., Vogelmann T. C. (1998): Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. *Plant and Cell Physiology* 39: 1020-1026
- Suzuki Y., Shioi Y. (2004): Changes in chlorophyll and carotenoid contents in radish (*Raphanus sativus*) cotyledons show different time courses during senescence. *Physiologia Plantarum* 122: 291-296
- Takahama U., Oniki T. (2000): Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research* 113: 301-309
- Takahama U., Oniki T. (1997): A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101: 845-852
- Takahashi S., Milward S. E., Yamori W., Evans J. R., Hillier W., Badger M. R. (2010): The solar action spectrum of photosystem II damage. *Plant Physiology* 153: 988-993
- Takizawa K., Kanazawa A., Kramer D. M. (2008): Depletion of stromal P_i induces high 'energy-dependent' antenna excitation quenching (qe) by decreasing proton conductivity at CF₀-CF₁ ATP synthase. *Plant, Cell and Environment* 31: 235-241
- Tan B.-C., Cline K., McCarty D. R. (2001): Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplasts membranes. *The Plant Journal* 27: 373-382
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008): Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54: 733-749

Literaturverzeichnis

- Tardy F., Havaux M. (1997): Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1330: 179-193
- Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D., Agati G. (2004): Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547-561
- Taulavuori E., Tahkokorpi M., Laine K., Taulavuori K. (2010): Drought tolerance of juvenile and mature leaves of a deciduous dwarf shrub *Vaccinium myrtillus* L. in a boreal environment. *Protoplasma* 241: 19-27
- Terashima I., Fujita T., Takeshi I., Chow W. S., Oguchi R. (2009): Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant and Cell Physiology* 50: 684-697
- Terashima I., Saeki T. (1985): A new model for leaf photosynthesis incorporating the gradients of light environment and of photosynthetic properties of chloroplasts within a leaf. *Annals of Botany* 56: 489-499
- Terashima I., Saeki T. (1983): Light Environment within a leaf I. Optical properties of paradermal sections of *Camellia* leaves with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissues. *Plant and Cell Physiology* 24: 1493-1501
- Thayer S. S., Björkman O. (1990): Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* 23: 331-343
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Timmins G. S., Holbrook N. M., Field T. S. (2002): Le Rouge et le Noir: Are anthocyanins plant melanins? *Advances in Botanical Research* 37: 18-30
- Tjus S. E., Scheller H. V., Andersson B., Møller B. L. (2001): Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology* 125: 2007-2015
- Tjus S. E., Møller B. L., Scheller H. V. (1998): Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiology* 116: 755-764
- Toda K., Takahashi R., Iwashina T., Hajika M. (2011): Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene. *Journal of Plant Research* 124: 173-182
- Tschiersch H., Ohmann E. (1993): Photoinhibition in *Euglena gracilis*: Involvement of reactive oxygen species. *Planta* 191: 316-323
- Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. (1996): Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L.. *Biochemical Pharmacology* 52: 1033-1039
- 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 Science of the United States of America* 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
- Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 12: 1161-1208
- van Camp W., Inze D., van Montagu M. (1997): The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 515-520
- van den Berg A. K., Perkins T. D. (2005): Nondestructive estimation of anthocyanin content in autumn sugar maple leaves. *HortScience* 40: 685-686

Literaturverzeichnis

- van Heerden P. D. R., Viljoen M. M., de Villiers M. F., Krüger G. H. J. (2004): Limitation of photosynthetic carbon metabolism by dark chilling in temperate and tropical soybean genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 117-12
- Várkonyi Z., Masamoto K., Debreczeny M., Zsiros O., Ughy B., Gombos Z., Domonkos I., Farkas T., Wada H., Szalontai B. (2002): Low-temperature-induced accumulation of xanthophylls and its structural consequences in the photosynthetic membranes of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*: An FTIR spectroscopic study. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 2410-2415
- Vass I. (2011): Role of charge recombination processes in photodamage and photoprotection of the photosystem II complex. *Physiologia Plantarum* 142: 6-16
- Vass I., Kirilovsky D., Etienne A.-L. (1999): UV-B radiation-induced donor- and acceptor-side modifications of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 38: 12786-12794
- Vass I., Styring S., Hundal T., Koivuniemi A., Aro E.-M., Andersson B. (1992): Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced Q_A species promote chlorophyll triplet formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 89: 1408-1412
- Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. (1998): Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117
- Veljovic-Jovanovic S., Noctor G., Foyer C. H. (2002): Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 501-507
- Verhoeven A. S., Adams W. W., Demmig-Adams B., Croce R., Bassi R. (1999): Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *Vinca major*. *Plant Physiology* 120: 727-737
- Viljanen K., Kylli P., Kivikari R., Heinonen M. (2004): Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7419-7424
- Villano D., Fernández-Pachón M. S., Moyá M. L., Troncoso A. M., García-Parilla M. C. (2007): Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71: 230-235
- Vina A., Gitelson A. A. (2011): Sensitivity to foliar anthocyanin content of vegetation indices using green reflectance. *Geoscience and Remote Sensing Letters* 8: 464-468
- Vogelmann T. C., Evans J. R. (2002): Profiles of light absorption and chlorophyll within spinach leaves from chlorophyll fluorescence. *Plant, Cell and Environment* 25: 1313-1323
- Vogelmann T. C., Han T. (2000): Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. *Plant, Cell and Environment* 23: 1303-1311
- Wade H. K., Bibikova T. N., Valentine W. J., Jenkins G. I. (2001): Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *The Plant Journal* 25: 675-685
- Walker D. (1987): The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Oxygraphics Ltd., Sheffield
- Walters R. G. (2005): Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* 56: 435-447
- Walters R. G., Ibrahim D. G., Horton P., Kruger N. J. (2004): A mutant of *Arabidopsis* lacking the triose-phosphate / phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light. *Plant Physiology* 135: 891-906
- Wang H., Cao G., Prior R. L. (1997): Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 304-309
- Wellburn A. R. (1994): The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolutions. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313

Literaturverzeichnis

- Whitehead T. P., Thorpe G. H. G., Maxwell S. R. J. (1992): Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta* 266: 265-277
- Wientjes E., Croce R. (2011): The light-harvesting complexes of higher-plant photosystem I: Lhca1/4 and Lhca2/3 form two red-emitting heterodimers. *Biochemical Journal* 433: 477-485
- Winkel-Shirley B. (2001): Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493
- Woodall G. S., Stewart G. R. (1998): Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*? *Journal of Experimental Botany* 49: 1447-1450
- Wooley J. T. (1971): Reflectance and transmittance of light by leaves. *Plant Physiology* 47: 656-662
- Yamasaki H. (1997): A function of colour. *Trends in Plant Science* 1: 7-8
- Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N. (1997): Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiology* 115: 1405-1412
- Yamauchi Y., Sugimoto Y. (2010): Effect of protein modification by malondialdehyde on the interaction between the oxygen-evolving complex 33 kDa protein and photosystem II core proteins. *Planta* 231: 1077-1088
- Yamauchi Y., Furutera A., Seki K., Toyoda Y., Tanaka K., Sugimoto Y. (2008): Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 786-793
- Yamazaki M., Yamagishi E., Gong Z., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Yamaguchi M., Saito K. (2002): Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. *Plant Molecular Biology* 48: 401-411
- Yamori W., Nagai T., Makino A. (2011): The rate-limiting step for CO₂ assimilation at different temperatures is influenced by the leaf nitrogen content in several C₃ crop species. *Plant, Cell and Environment* 34: 764-777
- Yin D. (1995): Appropriate excitation/emission wavelengths for fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances. *Clinical Chemistry* 41: 329-330
- Yoshihara N., Imayama T., Fukuchi-Mizutani M., Okuhara H., Tanaka Y., Ino I., Yabuya T. (2005): cDNA cloning and characterization of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase in *Iris hollandica*. *Plant Science* 169: 496-501
- Zeliou K., Manetas Y., Petropoulou Y. (2009): Transient winter leaf reddening in *Cistus creticus* characterizes weak (stress-sensitive) individuals, yet anthocyanins cannot alleviate the adverse effects on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 60: 3031-3042
- Zhang K. M., Wang X. M., Cui J. X., Ogwen J. O., Shi K., Zhou Y. H., Yu J. Q. (2011): Characteristics of gas exchange and chlorophyll fluorescence in red and green leaves of *Begonia semperflorens*. *Biologia Plantarum* 55: 361-364
- Zhang K. M., Yu H. J., Shi K., Zhou Y. H., Yu J. Q., Xia X. J. (2010): Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Science* 179: 202-208
- Zhang Q., Su L.-J., Chen J.-W., Zeng X.-Q., Sun B.-Y., Peng C.-L. (2012): The antioxidative role of anthocyanins in *Arabidopsis* under high-irradiance. *Biologia Plantarum* 56: 97-104
- Zheng W., Wang S. Y. (2003): Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 502-509
- Zheng W., Wang S. Y. (2001): Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5165-5170
- Zolla L., Rinalducci S. (2002): Involvement of active oxygen species in degradation of light-harvesting proteins under light stresses. *Biochemistry* 41: 14391-14402
- Zsiros O., Allakhverdiev S. I., Higashi S., Watanabe M., Nishiyama Y., Murata N. (2006): Very strong UV-A light temporally separates the photoinhibition of photosystem II into light-induced inactivation and repair. *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 123-129

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde.

Ferner versichere ich an Eides statt, dass die Abhandlung nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist und dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe, sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Teile der Arbeit wurden durch folgende Tagungsbeiträge veröffentlicht:

Nichelmann L. und Bilger W. (2007): Light screening by anthocyanins in leaves of *Berberis thunbergii*. Botanikertagung 03.-07.09. 2007, Hamburg, Posterbeitrag

Nichelmann L. und Bilger W. (2008): Light screening by anthocyanins in leaves – a quantitative approach. AKOE-Tagung 31.03.-04.04. 2008, Tharandt, Posterbeitrag

Nichelmann L. und Bilger W.(2010): Anthocyanins: Screening pigments or antioxidants? AKOE-Tagung 22.03.-25.03. 2010, Kiel, Vortrag

Nichelmann L. und Bilger W. (2011): Photoprotective roles of anthocyanin and quercetin in leaves of *Arabidopsis thaliana*. Botanikertagung 18.09.-22.09. 2011, Berlin, Posterbeitrag

Nichelmann L. und Bilger W. (2012): The photoprotective role of anthocyanins in leaves. Sektionstagung “Pflanzliche Naturstoffe” 30.09.-02.10. 2012, Hildesheim, Vortrag

Kiel, den

.....
Lars Nichelmann

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Bilger für die Möglichkeit bedanken, ein spannendes und vielseitiges Forschungsthema bearbeiten zu können. Ausdrücklich danke ich ihm für sein Interesse und die damit verbundenen inspirierenden Diskussionen, das in mich gesetzte Vertrauen und für die gewährte Unterstützung, ohne die ein problemloser Fortgang der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Karin Krupinska für die Begutachtung meiner Arbeit und für die zwischenzeitliche Unterstützung. Sehr dankbar bin ich dafür, dass ich an einer internationalen Kooperation teilnehmen konnte.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die immerwährende Hilfsbereitschaft, das mir entgegengebrachte Verständnis und für die schöne Zeit.

Den Mitarbeitern des Botanischen Institutes danke ich für den bereichernden Austausch von Gedanken und Ideen.

Insbesondere möchte ich dem ATB Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. vertreten durch Dr. Werner Herppich dafür danken, dass ich im Rahmen meiner Anstellung die vorliegende Arbeit beenden konnte.