

Regulation der Zeaxanthin- und der Diatoxanthin- Epoxidase in Chlorophyll a/b- und Fucoxanthin- Chlorophyll a/c-haltigen Pflanzen

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrads**

Eingereicht am Fachbereich Biologie
Johannes Gutenberg Universität
Mainz

Das Thema der Arbeit wurde von
Herrn Dr. Michael Richter gestellt

Vorgelegt von Elizabeth A. Pinto
geb. in Koblenz

Mainz, November 2004

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2005

Meinem lieben Partner
und
unserem Baby

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
1.	Photosynthese und Photoprotektion bei Pflanzen	1
1.1	Die Grundlagen der Photosynthese	1
1.2	Die Notwendigkeit der Regulation der Photosynthese	2
1.3	Der unterschiedliche Aufbau der Lichtsammelsysteme	3
1.4	Photoprotektive Mechanismen	5
2.	Die Xanthophyllzyklen	6
2.1	Die Grundlagen des photoprotektiven Charakters der Xanthophyllzyklen	6
2.2	Der Violaxanthinzyklus	8
2.2.1	Überblick über den Aufbau und die Komponenten des V _x -Zyklus ...	8
2.2.2	Regulation des V _x -Zyklus	9
2.3	Der Diadinoxanthinzyklus	10
2.3.1	Überblick über den Aufbau und die Komponenten des Diadinoxanthinzyklus	10
2.3.2	Regulation des Diadinoxanthinzyklus	11
2.4	Die biochemischen Eigenschaften der Enzyme der X-Zyklen	11
2.5	Die Einbindung der X-Zyklen in den Metabolismus der Pflanzen	12
2.5.1	Die Einbindung der X-Zyklen in die Carotinoidsynthesewege	12
2.5.2	Die Einbindung der X-Zyklen und deren Regulation in die verschiedenen Anpassungsmechanismen von Pflanzen	13
3.	Zielsetzung der Arbeit	14
II	MATERIAL UND METHODE	16
1.	Pflanzenmaterial	16
1.1	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	16
1.2	<i>Cyclotella meneghiniana</i>	17

1.3	<i>Prymnesium parvum</i>	17
1.4	<i>Heterosigma carterae</i>	18
1.5	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	18
1.6	<i>Spinacia oleracea</i>	19
1.7	<i>Elodea canadensis</i>	19
2.	Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen an Hand eines PAM-Fluorometers	20
2.1	Theoretischer Hintergrund des PAM-Fluorometers	20
2.2	Die Nomenklatur der PAM-Fluoreszenzparameter und deren Interpretation	21
2.2.1	Das photochemische Quenching qP	22
2.2.2	Das nichtphotochemische Quenching (NPQ)	22
2.3	Prinzipien und Aufbau eines Pulse-Amplituden-Modulations- Fluorometers (PAM-Fluorometer)	23
2.4	Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz	24
2.5	Darstellung der Ergebnisse der Fluoreszenzinduktionskinetiken	25
3.	Pigmentanalyse mittels HPLC	25
3.1	Das Trennprinzip der HPLC	25
3.2	Der Aufbau der HPLC	26
3.2.1	Trennbedingungen	26
3.2.2	Pigmentidentifizierung	28
3.2.3	Pigmentquantifizierung	29
3.3	Probennahme und Herstellung der Pigmentextrakte	29
3.3.1	Probenentnahme bei in vivo Versuchen	29
3.3.2	Herstellung der Pigmentextrakte nach einer in vitro Epoxidierung ..	30
4.	Thylakoidpräparationen	30
4.1	Thylakoidpräparationen aus Algen	30
4.2	Thylakoidpräparationen aus Höheren Pflanzen	31
5.	Bestimmung des Chlorophyllgehalts	31

5.1	Bestimmung des Chlorophyllgehalts bei Chl a/c-haltigen Organismen	31
5.2	Bestimmung des Chlorophyllgehalts bei Chl a/b-haltigen Organismen	32
6.	In vitro Epoxidierung	32
6.1	Etablierung eines stabilen Systems	32
6.2	Versuchsablauf bei <i>P. tricornutum</i>	32
6.3	Versuchsablauf bei <i>S. oleraceae</i>	33
6.4	Diatoxanthinpräparation	33
7.	Bestimmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion	34
7.1	Prinzipien der Sauerstoffmessung an Hand der Sauerstoffelektrode	34
7.2	Ermittlung der Photosyntheseraten	34
8.	Identifikation der Diatoxanthin-Epoxidase	35
8.1	Elektrophorese der Thylakoidproteine	35
8.1.1	Theoretische Grundlagen des Trennprinzips der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	35
8.1.2	Gießen und Vorbereiten der Gele	36
8.1.3	Probenvorbereitung und Start der Elektrophorese	36
8.1.4	Anfärben der Proteinbanden	36
8.2	Nachweis der Diatoxanthin-Epoxidase durch Western-Blotting	37
8.2.1	Theoretische Grundlagen des Western-Blottings	37
8.2.2	Durchführung des Western-Blottings	37
III	ERGEBNISSE	39
1.	Die Beziehung zwischen der Regulation der Epoxidasen, dem ΔpH und der Löschung der Chlorophyll-Fluoreszenz durch Zeaxanthin und Diatoxanthin	39
1.1	Die ΔpH-Abhängigkeit des Zx-abhängigen Quenchings	39

1.1.1	Analyse des Anteils an Zx-abhängigen Quenching	39
1.1.2	Analyse der Korrelation von NPQ, Zx und Δ pH	41
1.1.3	In <i>E. canadensis</i> konnte kein ausdauernder Teil des Quenching („sustained quenching“) gezeigt werden	41
1.2	Die fehlende, direkte Δ pH-Abhängigkeit des Diatoxanthin-abhängigen Quenching	43
1.2.1	Das Quenching bei <i>P. tricornutum</i> und <i>P. parvum</i> beruht allein auf Dtx	43
1.2.2	Das Recovery des NPQ ist durch die Hemmung der Dtx-Epoxidase ebenfalls inhibiert	45
2.	<i>In vivo</i> Studien zur Regulation der Zx-Epoxidase im Vergleich zur Dtx-Epoxidase	48
2.1	Die fehlende Regulation der Zx-Epoxidase	48
2.2	Die Δ pH-Regulation der Diatoxanthin-Epoxidase	51
2.3	Die Hemmung der Dtx-Epoxidase durch die Hemmung von Phosphatasen	53
3.	Die Charakterisierung der Diatoxanthin-Epoxidase in einem <i>in vitro</i> System	55
3.1	Die Stabilität der isolierten Thylakoide bei <i>P. tricornutum</i>	55
3.2	Die Abhängigkeit der Diatoxanthin-Epoxidase vom pH-Wert und von ihren Cosubstraten bei <i>P. tricornutum</i>	55
3.3	Der Effekt unterschiedlicher pH-Werte bei der Isolation	57
3.4	<i>In vitro</i> Epoxidierungskinetiken bei <i>P. tricornutum</i> und <i>S. oleracea</i> im Vergleich	58
3.5	Studien zur Starklichthemmung der Dtx-Epoxidase – Bindung an die Membran und Ablösung von der Membran als Regulationsmechanismus?	59
3.5.1	Aufrechterhaltung der Starklichthemmung <i>in vitro</i>	59
3.5.2	Die Wirkung von ATP, ADP und Mg^{2+} als potenzielle Regulatoren der Starklichthemmung	59

3.5.3	Die Wirkung extremer pH-Werte auf die Aktivität der Diatoxanthin-Epoxidase	60
3.5.4	Die Wirkung von Hochsalz (NaBr) und EDTA auf die Aktivität der Dtx-Epoxidase	61
3.5.5	Die Wirkung einer Inkubation mit Phospholipase A ₂ zur Überprüfung des Vorhandenseins eines Membranankers	62
3.5.6	Die Wirkung von Detergenzien auf die Aktivität der Dtx-Epoxidase	63
3.5.7	Epoxidierung von Dtx unabhängig von der Thylakoidmembran nach einer Isolation nach Schockgefrieren der intakten Zellen im HL	64
3.5.8	Epoxidierung von Dtx unabhängig von der Thylakoidmembran nach einer pH 11,5-Behandlung	65
3.5.9	Versuche zur Reaktivierung der Dtx-Epoxidase nach erfolgter Hemmung	66
4.	Die Identifikation der Diatoxanthin-Epoxidase bei <i>P. tricornutum</i>	69
4.1	Das Thylakoidproteinmuster von <i>P. tricornutum</i>	69
4.2	Der Antikörper reagiert auf das Peptid, gegen das er synthetisiert wurde	71
4.3	Der Nachweis und die Größenbestimmung der Dtx-Epoxidase mittels Westernblottig	72
4.4	Der Vergleich der Bandenintensitäten im HL und nach HL	78
IV	DISKUSSION	80
1.	Die Dtx-Epoxidase ist im Starklicht Δ pH-gehemmt, die Zx-Epoxidase nicht	80
2.	Die Dtx-Epoxidase muss reguliert sein, da Dtx auch ohne Δ pH ein Quencher ist	81

3.	Bei allen Fx-haltigen Algen hat die Epoxidase eine hohe Aktivität	83
4.	Die Identifizierung der Dtx-Epoxidase	85
5.	Der Mechanismus der ΔpH-Regulation der Dtx-Epoxidase	87
5.1	Die ΔpH-Hemmung ist nicht durch die pH-Abhängigkeit der Dtx-Epoxidase zu erklären	87
5.2	Phosphorylierung/Dephosphorylierung als möglicher Regulationsmechanismus	88
5.3	Oxidation/Reduktion als möglicher Regulationsmechanismus	89
5.4	Die Regulation der Dtx-Epoxidase unter der Annahme einer Lokalisation im Lumen	90
5.5	Offene Frage und spekulative Antworten zum Regulationsmechanismus der Dtx-Epoxidase	92
6.	Modell zur Regulation der Dtx-Epoxidase durch einen Rezeptor	94
7.	Ausblick	95
V	ZUSAMMENFASSUNG	97
VI	LITERATUR	98
VII	ANHANG	A1

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	Antheraxanthin
BSA	Rinderserumalbumin
CAB	Chlorophyll a/b-bindend
Chl	Chlorophyll
CMC	Kritische micellare Konzentration
Cyt	Cytochrom
Ddx	Diadinoxanthin
DTT	Dithiothreitol
Dtx	Diatoxanthin
Epox-RM	Epoxidierungs-Reaktionsmedium
FCP	Fucoxanthin-Chlorophyll-bindenes Protein
Fd	Ferredoxin
Fm	Maximale Fluoreszenz
Fo	Grundfluoreszenz
Fv	Variable Fluoreszenz
Fx	Fucoxanthin
HL	Starklicht (engl. High light)
HPLC	High performance liquid chromatography
LHC II	Hauptlichtsammelkomplex (Light harvesting complex) des Photosystems II
LL	Schwachlicht (engl. low light)
NADPH	Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NPQ	Non-photochemical-quenching
Nx	Neoxanthin
OG	Octyl-b-D-glucoopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PPFD	Photosynthetisch nutzbare Photonenflussdichte
PQ	Plastochinon
PS	Photosystem

Abkürzungen

Q _A	Plastochinon A
qE	high energy state quenching
qI	inhibitorisches Quenching
qP	photochemischer Quenchkoeffizient
qT	Quenching durch state-transitions
RC	Reaktionszentrum
RM	Reaktionsmedium
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffer-saline
TBST	Tris-buffer-saline mit Tween
TS	Thylakoidsuspension
Vgl.	vergleiche
V _x	Violaxanthin
X-Zyklus	Xanthophyll-Zyklus
Z _x	Zeaxanthin
ΔpH	pH-Gradient bzw. Protonengradient

I EINLEITUNG

Pflanzen müssen auf Grund ihrer Sessilität ihren Stoffwechsel den herrschenden Umweltbedingungen anpassen. Licht stellt einen Faktor dar, von dem die Pflanze direkt abhängig ist, der aber auch starken Schwankungen unterliegt und somit auch Stress für die Pflanze bedeuten kann. Die Fähigkeit zur Photosynthese birgt auch Risiken für photoinhibitorische Schäden, die Pflanzen versuchen zu vermeiden.

1. Photosynthese und Photoprotektion bei Pflanzen

1.1 Die Grundlagen der Photosynthese – von der Lichtabsorption bis zum Zucker

Die Antennen, also die Lichtsammelsysteme des Photosystems (PS) II haben in erster Linie die Aufgabe, Lichtenergie einzufangen und möglichst effizient an das Reaktionszentrum (RC), das P₆₈₀ weiterzuleiten. Dies wird durch die Anordnung der Pigmente zueinander gewährleistet. Am RC kommt es dann durch die Weiterleitung der Anregungsenergie der Antenne zur eigentlichen photochemischen Reaktion, nämlich zur primären Ladungstrennung. Das bedeutet, dass das Chl a Dimer des RCs, das sogenannte „spezial pair“, angeregt wird und so ein Elektron an den primären Akzeptor, ein Phaeophytin abgegeben werden kann. Stabilisiert sich die Ladungstrennung so kommt es zur Reduktion von einem Plastochinon (PQ) aus dem PQ-Pool. Durch nachgeschaltete Redoxsysteme werden nun die Elektronen über den Cytochrom (Cyt) b₆/f-Komplex zum PS I transportiert und schließlich über Ferredoxin (Fd) auf NADP⁺ übertragen, was dadurch zu NADPH reduziert wird. Die Elektronenlücke am PS II wird durch die Elektronen, die bei der Oxidation des Wassers im wasserspaltenden Komplex entstehen wieder aufgefüllt.

Dieser photochemische Elektronentransport läuft an den Thylakoiden ab und führt einerseits zur Synthese von NADPH am PS I, sowie andererseits zur Ansäuerung des Thylakoidinnenraums, des Lumens, und damit zum Aufbau eines Protonengradienten (ΔpH). Der entstandene ΔpH wird zur ATP-Synthese und somit zur Konservierung der Lichtenergie in chemisch nutzbare Energie benötigt. Diese Prozesse werden zusammengefasst als photosynthetische Lichtreaktionen, bzw. Primärreaktion.

Die Höhe des ΔpH s ist einerseits abhängig von der Intensität des eingestrahlt Lichts und damit von der Protonenpumpaktivität, andererseits aber auch vom aktuellen ATP- und NADPH-Verbrauch. Daher dient der ΔpH der Pflanze als Lichtsensor, also als Messgröße der relativen Lichtsättigung der Photosynthese. Bei hoher Lichtenergie und niedrigem ATP- und

NADPH-Verbrauch wird der ΔpH groß und die Pflanze erkennt so die Notwendigkeit zur Herabregulierung der photochemischen Effizienz (Horton et al., 1996).

Unter der photosynthetischen Dunkelreaktion oder Sekundärreaktion wird die Fixierung des CO_2 durch die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxigenase (RubisCO) und der Aufbau von Zuckern mit Hilfe der Reduktionsäquivalente NADPH und der chemischen Energie ATP verstanden.

1.2 Die Notwendigkeit der Regulation der Photosynthese

Aus- und sogar Überlastung der Photosynthese bei hohen Lichtintensitäten hat einen hohen ΔpH und Reduktionsgrad zur Folge und kann so zu Photoinhibition führen. Die Gründe liegen in verschiedenen Limitierungen der Chemie der Photosynthese, wie z.B. die Zeiten der vor- und nachgeschalteten Reaktionen der Photosysteme und der Geschwindigkeit der Dunkelreaktion.

Das PS II zeichnet sich durch eine schnelle Donor-, aber langsame Akzeptorseite aus. Das bedeutet, dass die Elektronenlücke durch den wasserspaltenden Komplex schnell wieder aufgefüllt wird, also eine erneute Anregung des RCs stattfinden kann. Allerdings verläuft die Reduktion und Reoxidation des PQs am Cyt b_6/f -Komplex sehr viel langsamer, wodurch der Abtransport der Elektronen limitiert wird. Eine weitere Anregung des P_{680} kann dann dazu führen, dass kein Akzeptor für das angeregte Elektron vorhanden ist und so die Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, was zur Bildung hochreaktiver Sauerstoffspezies führt (Holzwarth, 1999). Ferner stellt das RC des PS II nach der Ladungstrennung als P_{680}^+ ein starkes Oxidationsmittel dar. So ist es in der Lage, Wasser zu spalten, in dem der darin enthaltene Sauerstoff oxidiert wird und Protonen in das Lumen abzugeben. Daraus resultiert ebenfalls die Gefahr oxidativer Schädigung der Apoproteine des RC des PS II (D_1 und D_2).

Hohe Lichtintensitäten und zusätzlicher Trockenstress zwingen die Pflanze zum Schließen der Stomata, was zu einer Herabsetzung der CO_2 -Aufnahme und damit zu niedrigen CO_2 -Partialdrücken im Blattgewebe führt, wodurch die Dunkelreaktion limitiert wird. Daraus resultiert ein geringerer NADPH- und ATP-Verbrauch, was wiederum einen erhöhten ΔpH und somit eine Überanregung der Thylakoide zur Folge hat. Dies führt dann ebenfalls zu oben beschriebenen Reaktionen und so zu Photoinhibition.

Die Pflanze muss also Mittel und Wege finden, überschüssige Energie ohne Schaden zu dissipieren. Das erreicht sie durch die Variabilität der photosynthetischen Effizienz: Die von den Antennen absorbierte Lichtenergie wird, abhängig von der photosynthetischen Kapazität mit unterschiedlicher Effizienz an das RC weitergeleitet. Je nach dem, wie viel des

einstrahlenden Lichts photochemisch genutzt werden kann, wird ein variabler Teil in Form von Wärme wieder abgestrahlt, auch thermische Dissipation genannt. Dies kann zwischen ca. 20 und über 90% der anfangs absorbierten Energie betragen. Ein kleiner Teil der Energie wird immer in Form von Fluoreszenz abgegeben und wird daher im offenen RC als Grundfluoreszenz (F_0 , ca. 0,6%) und im geschlossenen RC als maximale Fluoreszenz (F_m , ca. 3%) bezeichnet (siehe auch Material und Methode, Punkt 2.1).

Die Variabilität der thermischen Dissipation beruht auf unterschiedliche Anpassungsmechanismen, die es der Pflanze ermöglichen, auf veränderte Lichtbedingungen zu reagieren. Da diese Anpassungsmechanismen die Pflanze vor Photoinhibition schützen, werden sie auch als Photoprotektion oder photoprotektive Mechanismen bezeichnet. Maßgeblich beteiligt an thermischer Dissipation sind die Antennen der Pflanzen.

1.3 Der unterschiedliche Aufbau der Lichtsammelsysteme

Licht führt bei Pflanzen zur Synthese von Chlorophyll aus Protochlorophyll. Die Bindung von Chlorophyll und Carotinoiden an verschiedene Proteine führt zur Bildung der Antennen, den Lichtsammelsystemen der Pflanzen. An diesem Punkt gibt es eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Pflanzengruppen, da sich im Laufe der Evolution vielfältige Entwürfe Chl a-haltiger Lichtsammelsysteme entwickelten (Grossman et al., 1995). Von besonderem Interesse sind für diese Arbeit die Chl a/b- und Chl a/c-haltigen Typen, die sich besonders durch die gebundenen Pigmente unterscheiden. Allen gemeinsam sind die Pigmente Chl a und β -Carotin (Anderson und Barrett, 1986).

Allgemein bekannt ist der Aufbau des Lichtsammelsystems des Photosystem (PS) II der Höheren Pflanzen, der Light Harvesting Complex II (LHC II). Als hauptsächliche Lichtsammelpigmente sind Chl a und Chl b gebunden, während nur wenige Xanthophylle zu finden sind. Diese erfüllen auch viel mehr eine Schutzfunktion (siehe unten, Punkt 1.4), als dass sie signifikant zur Lichtsammlung beitragen würden. Diese unterschiedlichen Chl a/b-bindenden (CAB) Proteine bilden die äußere (majore und minore) sowie die innere Antenne, die in zwei Ringen um das RC angeordnet sind, so dass die innere Antenne die äußere mit dem RC verbindet. Es konnte gezeigt werden, dass die minoren Antennenproteine CP26 und CP29 pro Protein den höchsten Anteil der Vx-Zyklus Pigmente binden (Goss et al., 1996), die zum Teil zu thermischer Dissipation führen können (siehe unten). So ist gewährleistet, dass die Energieweiterleitung von der Antenne an das RC im Fall überschüssig absorbierte Lichtenergie minimiert werden kann. Nach Liu et al. (2004) befinden sich genau diese Xanthophylle an den Übergängen zwischen den einzelnen LHC-Monomeren, die zu Trimeren

aggregieren, so dass sie den Energietransport innerhalb der Antennen effizient stören können. Die inneren Antennenproteine Höherer Pflanzen sind nach Goss et al. (1997) völlig frei von Pigmenten des Violaxanthin- (Vx) Zyklus. Li et al. (2000) fanden, dass eine Untereinheit des LHC, das PsbS-Protein maßgeblich an der Bildung des Non-photochemical-quenching (NPQ) beteiligt ist. Durch einen niedrigen pH im Lumen sollen nach Li et al. (2004) zwei Zx-Moleküle an das protonierte PsbS-Protein binden und die Wechselwirkungen dieses Komplexes mit der inneren Antenne des PS II die Bildung von NPQ zur Folge haben.

Im Gegensatz dazu sind bei den Algen nicht nur andere Chlorophylle nämlich Chl a, Chl c_1 und Chl c_2 , zu finden, sondern auch ein hoher Anteil an Xanthophyllen, wie z.B. Fucoxanthin (Fx) (Brown, 1988), die hier als Massenzpigmente signifikant an der Lichtsammlung beteiligt sind (Grossman et al., 1995). Der Vorteil liegt dabei in der Verkleinerung der Grünücke, was Algen in tieferen Wasserschichten eine effizientere Nutzung des dort dominierenden grünen Lichts ermöglicht. Die pigmentbindenden Proteine werden in diesem Fall auch Fx Chl binding Proteins (FCPs) oder nach Jansson et al. (1999) auch LHCF genannt. Die für Chl-Bindung und Struktur relevanten Bereiche dieser Lichtsammelproteine sind hoch konserviert (Durnford et al., 1996). Dennoch scheinen die FCPs den Proteinen des LHCI, also der Lichtsammelproteine des PS I, sowie den Proteinen der minoren Antennen des LHCI (CP29 und CP24) näher zu stehen (Durnford et al., 1996, Laroche et al. 1994). Von Müller et al. (2001) wurde auch berichtet, dass den Chl a/c-haltigen Algen eine Differenzierung in majore, minore und innere Antenne fehlt und damit auch einige Proteine der minoren Antenne, wie z.B. das CP26 und CP29 nicht vorhanden sind. Auch ein Analogon zum PsbS-Protein der Höheren Pflanzen konnte bei Kieselalgen bislang nicht nachgewiesen werden. Lavaud et al. (2003) konnten zeigen, dass in allen isolierten FCP-Fractionen Pigmente des Ddx-Zyklus (siehe unten) gefunden wurden, und dass die von den Autoren so genannte „majore FCP-Fraktion“ eine Schlüsselrolle beim Aufbau von NPQ spielt. Zwei weitere FCP-Fractionen enthielten dagegen noch Reste der RCs, was den Aussagen von Müller et al. (2001) widerspricht und für eine Gliederung in äußere und innere Antenne spricht. Welche Komponenten bei Kieselalgen für die Gewährleistung von thermischer Dissipation, also für Photoprotektion wichtig sind, ist zur Zeit noch unklar. Allerdings schlagen Lavaud et al. (2003) vor, dass die „majore FCP-Fraktion“ der äußeren Antenne entspricht, und dass diese die höchsten De-Epoxidierungsgrade erreicht und daher eine basale Rolle im Aufbau von NPQ spielt.

1.4 Photoprotektive Mechanismen

Starklicht löst verschiedene Regulationsmechanismen aus, die Photoinhibition verhindern sollen. Solche photoprotektiven Prozesse können an verschiedenen Stellen der Photosynthese greifen. Grundsätzlich gibt es für eine Pflanze verschiedene Alternativen, um sich vor Photoinhibition zu schützen, z.B. der Verbrauch überschüssiger Reduktionskraft, ohne daran gekoppelte ATP-Synthese. Das heißt, die Pflanze kann verschiedene Systeme im Leerlauf arbeiten lassen. Besonders effizient ist es allerdings, wenn einstrahlende Lichtenergie noch vor dem Auslösen einer photochemischen Reaktion thermisch dissipiert wird. In diesem Fall wird das RC erst gar nicht angeregt, so dass ΔpH und Reduktionsgrad nicht noch höher steigen. Für beide Varianten stehen der Pflanze verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die im Folgenden kurz vorgestellt werden:

- 1.) Die Mehlerreaktion wird auch als pseudozyklischer Elektronentransport bezeichnet, da es im Falle eines sehr hohen Reduktionsgrades des Fd zur Übertragung von Elektronen vom PS I auf Sauerstoff kommt. Durch Folgereaktionen, die zur Entgiftung der entstehenden Superoxidradikale dienen, wird die Spaltung des Wassers am PS II rückgängig gemacht, während es trotzdem zum Aufbau eines ΔpH kommt (Heldt, 1999).
- 2.) Der photorespiratorische Weg wird bei hohen Lichtintensitäten und besonders bei gleichzeitiger Trockenheit auf Grund der zwangsweise geschlossenen Stomata ausgelöst. Wegen des daraus resultierenden niedrigen CO_2 -Partialdrucks im Blattgewebe bindet die RubisCO Sauerstoff anstatt CO_2 an Ribulose-1,5-bisphosphat (RbBP). Das aus dessen Spaltung entstehende 2-Phosphoglykolat wird dann unter ATP- und NADPH-Verbrauch zum Glycerat bzw. zum Glycerinaldehyd regeneriert. Dieser Weg führt folglich zur Verringerung des Reduktionsgrades der Thylakoidmembran und zum Abbau des ΔpH (Heldt, 1999).
- 3.) Ein hoher Reduktionsgrad des Fds bzw. ein hohes NADPH/NADP⁺-Verhältnis im Chloroplasten wirkt als Auslöser, um Oxalacetat zu Malat zu reduzieren. Dieses kann dann über Translokatoren in die Mitochondrien befördert und dort veratmet werden. Das heißt, es handelt sich hier um ein Überdruckventil („Malatventil“), das eine schädliche Überreduktion der Chloroplastenenzyme verhindert. So hat die Pflanze eine effiziente Möglichkeit, Reduktionskraft in die Mitochondrien zu verlagern und dort zur ATP-Bildung zu nutzen (Heldt, 1999).
- 4.) Der Weg der alternativen Oxidase findet im Mitochondrium statt und stellt einen Mechanismus dar, überschüssiges NADH ohne gleichzeitige ATP-Synthese zu oxidieren. Dieser Weg wird allerdings erst bei übermäßiger Reduktion des mitochondrialen Ubichinons eingeschlagen. Es kommt hierbei zu einer Übertragung von Elektronen über das reduzierte

Ubichinon (=Ubihydrochinon) auf Sauerstoff. Daran ist kein Protonentransport gekoppelt, was eine ATP-Bildung verhindert (Heldt, 1999).

5.) Ein Anstau von reduziertem PQ (=Plastohydrochinon) signalisiert eine zu hohe Anregung des PS II. Dies führt zur Aktivierung einer Proteinkinase, die über eine Phosphorylierung des LHC II eine Abkopplung der Antenne des PS II bewirkt. Dadurch wird die Energie, die das RC noch erreicht, herabgesetzt (Heldt, 1999). Da die Grana durch den LHC II gebildet werden, bewirkt die Phosphorylierung zusätzlich, dass eine laterale Wanderung des LHC II in die Stromathylakoide und so zum PS I ermöglicht wird (Allen, 1992). Diese Möglichkeit der gleichmäßigen Energieverteilung zwischen den beiden Photosystemen wird als state-transition bezeichnet.

6.) Aufgrund des hohen ΔpH s über der Thylakoidmembran kommt es zu Protonierungen von Proteinen. Wird der LHC II protoniert, so ändert er seine räumliche Struktur, was zu einer veränderten Lage der Chlorophylle zueinander führt (z.B. Chlorophylldimerisierung). Dies setzt die Effizienz des Energietransfers innerhalb der Antenne stark herab, was zur Abgabe der Energie in Form von Wärme führt (Horton et al., 1996).

7.) Die Carotinoide spielen in der Antenne der Pflanzen eine duale Rolle (siehe oben). Einerseits sind sie zu einem Energietransfer innerhalb der Antenne in der Lage, andererseits können sie auch Energie schnell in Form von Wärme ableiten (Holzwarth, 1999). Dies steht mit dem Vorhandensein eines mesomeren Systems in Zusammenhang. β -Carotin z.B. besitzt elf konjugierte Doppelbindungen, wodurch die Energie von Triplettchlorophyllen wie auch von Singulett-Sauerstoff übernommen werden kann (Pfündel und Bilger, 1994; Demmig-Adams und Adams, 1996).

Als spezielle Schutzmechanismen dienen die Xanthophyllzyklen (X-Zyklen). Da sie eine zentrale Rolle in der vorliegenden Abhandlung einnehmen, wird dieser Zyklus im folgenden Kapitel erläutert.

2. Die Xanthophyllzyklen

2.1 Die Grundlagen des photoprotektiven Charakters der Xanthophyllzyklen

Carotine bzw. die oxigenierten Xanthophylle wirken zum einen als akzessorische Lichtsammelpigmente in der Antenne (Holzwarth, 1999) und besonders Epoxy-Xanthophylle gewährleisten zum anderen die strukturelle Integrität des LHC (Rock et al, 1992), da sie überschüssige Energie thermisch dissipieren können (Holzwarth, 1999). Diese vermehrte Abgabe von Anregungsenergie in Form von Wärme ist anhand Fluoreszenzmessungen darzustellen, da eine verstärkte Dissipation in einem Quenching der Chl a Fluoreszenz

(=NPQ) resultiert (Krause und Weis, 1991). Das Umschalten zwischen einem Zustand effizienter Lichtsammlung und effizienter thermischer Dissipation wird unter anderem durch die sogenannten X-Zyklen gewährleistet (Demmig-Adams et al., 1999; Horton et al., 1999).

Wir kennen zwei verschiedene X-Zyklen: den Violaxanthinzyklus (Vx-Zyklus) der Höheren Pflanzen (Chlorophyta), Grünalgen (Chlorophyceen) und Braunalgen (Phaeophyceen) (Hager, 1980) und den Diadinoxanthinzyklus (Ddx-Zyklus) der Kieselalgen (Bacillariophyceen), Chrysophyceen, Xanthophyceen und Dinophyceen (Stransky und Hager, 1970). Bei beiden wird unter Starklicht, also bei einem hohen ΔpH , ein Pigment der Antenne, das bei niedrigen Lichtintensitäten Energie einfangen und weiterleiten kann, in ein anderes umgewandelt. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine De-Epoxidierung des Pigments, wodurch eine zusätzliche Doppelbindung in das Pigment eingeführt wird. Das neu entstandene Pigment ist dann in der Lage, die auftreffende Lichtenergie in Wärme umzuwandeln und wieder abzugeben, was sich in einem erhöhten NPQ ausdrückt. Sinkt die einstrahlende Lichtintensität wieder, wird dieser Prozess wieder rückgängig gemacht, das Pigment wird epoxidiert, liegt dann wieder in seinem Anfangszustand vor (Pfündel und Bilger, 1994; Demmig-Adams and Adams, 1996; Eskling et al., 1997).

Der Mechanismus, der es den de-epoxidierten Pigmenten ermöglicht, im Überschuss absorbierte Energie thermisch zu dissipieren ist nach wie vor unklar. In der Literatur werden zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert: die Wirkung als direkten Quencher bzw. als indirekten Quencher. Die Wirkung als direkten Quencher wird durch ihre Struktur und den daraus resultierenden energetischen Übergängen gewährleistet (Holzwarth, 1999). Die Einführung einer zusätzlichen Doppelbindungen, was zu einer Vergrößerung des konjugierten Doppelbindungssystems führt, ermöglicht, dass relativ zu den anderen Lichtsammelpigmenten weniger Energie ausreicht, um sie anzuregen. Dies hat zur Folge, dass auf Grund des niedriger liegenden Anregungszustands die Anregungsenergie nicht mehr auf Chlorophylle „bergauf“ übertragen werden kann, sondern nur noch die Möglichkeit eines dissipativen Prozesses besteht (Pfündel und Bilger, 1994).

Nach Horton (1996) hat die De-Epoxidierung der Xanthophylle eine Veränderung der räumlichen Struktur der Pigmente und damit eine Annäherung der Chlorophylle im LHC zur Folge. Auf Grund der gestreckteren Struktur der De-Epoxide kommt es also zu einer Aggregation der Chlorophylle, weshalb Horton sie als indirekte Quencher bezeichnet. Dadurch wird der normale Energietransfer zwischen den Chlorophyllen hin zum RC gestört und die im Überschuss absorbierte Energie wird thermisch dissipiert.

2.2 Der Violaxanthinzyklus

Der Zusammenhang zwischen einem Fluoreszenzquenching und einer erhöhten Zeaxanthin- (Zx-) Konzentration in der Lichtsammelantenne ist schon früh beobachtet und untersucht worden. Die Vermutung, Zx wirke als Quencher, wurde vor allen Dingen durch das Ergebnis gestützt, dass eine Hemmung der De-Epoxidierung eine reversible Fluoreszenzlöschung weitgehend verhindert (Demmig-Adams et al., 1990).

2.2.1 Überblick über den Aufbau und die Komponenten des Vx-Zyklus

Zum Vx-Zyklus gehören drei Xanthophylle, die durch zwei Enzyme ineinander umwandelbar sind. Die Hinreaktion, die im Starklicht (HL), also im Fall überschüssig absorbierter Lichtenergie stattfindet, wird durch die Vx-De-Epoxidase katalysiert (Hager 1969; Hager und Holocher, 1994). Sie beinhaltet die Umwandlung von Vx über das Intermediat Antheraxanthin (Ax) zu Zx. Es wird hierzu Ascorbat als Cosubstrat benötigt (Hager 1966; Hager 1969). Nehmen die Lichtintensitäten wieder ab, ändern sich also von HL hin zu Schwachlicht (LL) oder gar Dunkelheit, so läuft die Rückreaktion ab. Hierbei wandelt dann die Zx-Epoxidase über eine zweifache Epoxidierung Zx wieder über Ax in Vx um (Hager 1967), so dass unter limitierenden Lichtbedingungen die absorbierte Energie wieder effizient zur Photochemie genutzt werden kann. Die Epoxidase benötigt als Cosubstrate NADPH und Sauerstoff (Hager, 1967; siehe Abb. 1.1).

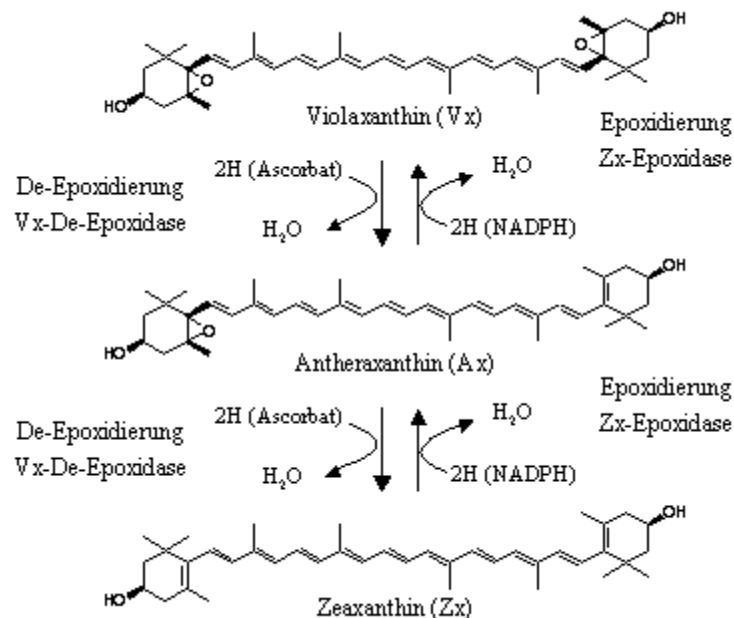


Abb. 1.1: Der Vx-Zyklus – involvierte Pigmente, Enzyme und Cofaktoren.

Durch die Vx-De-Epoxidase wird Vx unter Verbrauch von Ascorbat und der Entstehung von Wasser über das Intermediat Ax durch zwei De-Epoxidierungsschritte zu Zx umgewandelt. Durch die Zx-Epoxidase wird dann Zx unter Verbrauch von NADPH und der Entstehung von Wasser über das Intermediat Ax durch zwei Epoxidierungsschritte wieder zu Vx umgewandelt.

2.2.2 Regulation des Vx-Zyklus

Damit der Vx-Zyklus nicht einen sinnlosen Leerlaufprozess für die Pflanze darstellt, müssen die beteiligten Enzyme so reguliert sein, dass es im HL zur Akkumulation von Zx und im LL, bzw. Dunkeln umgekehrt wieder zur Akkumulation von Vx kommt. Dies wird durch eine pH-Regulation der Vx-De-Epoxidase gewährleistet (Hager, 1969). Durch die lichtbedingte Ansäuerung des Lumens wird dieses lumenal lokalisierte Enzym protoniert, so dass es an die Membran binden kann (Hager und Holocher, 1994). Hieber et al. (2002) berichten von einer Region von 12 Aminosäuren am C-Terminus, die sie als membranbindende Domäne vorschlugen. Die Protonierung dieses Glutamat-reichen C-Terminus soll die Ladung des Enzyms so verändern, dass es zur Membranbindung kommen kann (Bugos und Yamamoto, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Vx-De-Epoxidase bei einem pH-Wert von 6,5 und kleiner an die Membran bindet (Hager und Holocher, 1994). Dadurch werden die Substrate Vx und Ax verfügbar und können nun de-epoxidiert werden. Es gibt allerdings auch Berichte darüber, dass der Km-Wert der Vx-De-Epoxidase für Ascorbat pH-abhängig ist und dass ein stressbedingter Anstieg der Ascorbat-Konzentration im Chloroplasten im Zusammenhang mit Langzeit-Adaptationen steht (Bratt et al., 1995).

Sinkt unter limitierenden Lichtbedingungen der ΔpH wieder ab, so löst sich die Vx-De-Epoxidase auf Grund der Deprotonierung wieder von der Membran und wird dadurch inaktiviert. Das Enzym, das die Rückreaktion katalysiert, die Zx-Epoxidase, wird unter physiologischen Bedingungen als konstitutiv aktiv, allerdings mit niedrigen Umsatzraten beschrieben (Hager, 1967). Die Epoxidase wird als pH-abhängiges Enzym beschrieben und man geht von einem Optimum um pH 7,5 aus (Hager, 1975; Siefermann und Yamamoto, 1975). Da NADPH ein Cosubstrat ist, im Stroma gebildet wird, aber vermutlich nicht die Membran passieren kann und die Zx-Epoxidase trotz ihres pH-Optimums im HL aktiv ist, nimmt man an, dass sie im Stroma lokalisiert ist (Hager, 1975). Ihre Aktivität wird im HL zwar von der Vx-De-Epoxidase überlagert, im LL und im Dunkeln aber, wenn die De-Epoxidase inaktiv ist, kann dann Vx langsam wieder akkumulieren (Hager, 1966; Hager, 1967; Siefermann und Yamamoto, 1975).

Die Epoxidierung läuft im LL, also unter natürlichen Bedingungen, sogar noch besser als im Dunkeln ab. Diese Tatsache begründet Hager (1966, 1967) mit einer erhöhten O_2 -Konzentration durch den photosynthetisch entstandenen Sauerstoff. NADPH dagegen scheint in vivo nicht limitierend zu sein (Pfündel und Bilger, 1994).

2.3 Der Diadinoxanthinzyklus

Über den Ddx-Zyklus ist im gesamten deutlich weniger bekannt, als über den Vx-Zyklus. Zum größten Teil wird das Wissen über den Vx-Zyklus auf den Ddx-Zyklus übertragen, ohne dass die entsprechenden Fakten wirklich überprüft wurden. Daher ist in der Literatur wenig über die beteiligten Pigmente, konkret über den Aufbau und besonders über die Regulation des Ddx-Zyklus zu finden.

2.3.1 Überblick über den Aufbau und die Komponenten des Diadinoxanthinzyklus

Im Gegensatz zum Vx-Zyklus beinhaltet der Ddx-Zyklus nur zwei an Stelle der drei Pigmente, so dass es hier kein Intermediat analog zum Ax gibt (Hager und Stransky, 1970, Olaizola und Yamamoto, 1994). So wird in diesem Fall aus Ddx durch einen einfachen De-Epoxidierungsschritt Diatoxanthin (Dtx), das photoprotektiven Charakter besitzt (Arsalane et al., 1994; Olaizola und Yamamoto, 1994). Diese Reaktion wird analog zu der im Vx-Zyklus von der Ddx-De-Epoxidase katalysiert. So kommt es im HL zur Akkumulation von Dtx, jedoch ist der Mechanismus der zu thermischer Dissipation führt nicht klar. Lavaud et al. (2002) schlagen eine Δ ph-abhängige Bindung von Dtx an die FCPs vor. Die Rückreaktion, die ebenfalls im LL bzw. im Dunkeln abläuft, beinhaltet in diesem Fall auch nur einen einfachen Epoxidierungsschritt und wird von der Dtx-Epoxidase katalysiert (Hager, 1980). So ist die Pflanze wieder in der Lage, die absorbierte Lichtenergie effizient zu nutzen. Die beiden Enzyme des Ddx-Zyklus benötigen die gleichen Cosubstrate, wie die Vx-De-Epoxidase bzw. die Zx-Epoxidase (Hager, 1980).

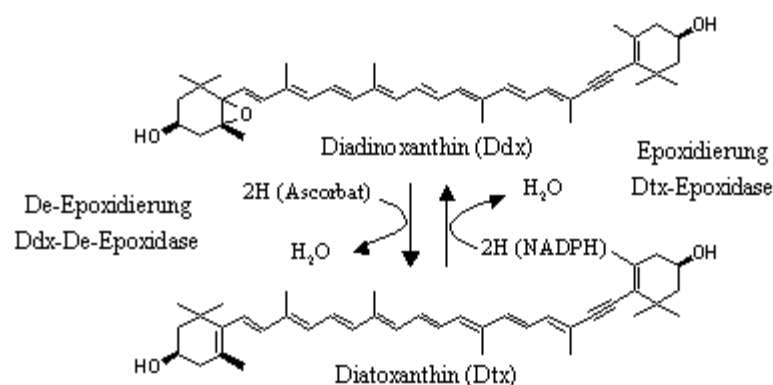


Abb. 1.2: Der Ddx-Zyklus – involvierte Pigmente, Enzyme und Cofaktoren.

Durch die Ddx-De-Epoxidase wird Ddx unter Verbrauch von Ascorbat und der Entstehung von Wasser einen De-Epoxidierungsschritt zu Dtx umgewandelt. Durch die Dtx-Epoxidase wird dann Dtx unter Verbrauch von NADPH und der Entstehung von Wasser durch einen Epoxidierungsschritt wieder zu Ddx umgewandelt.

2.3.2 Regulation des Diadinoxanthinzyklus

Auch die Enzyme des Ddx-Zyklus müssen hoch reguliert sein, allerdings ist über die spezielle Regulation des Ddx-Zyklus wenig bekannt. Man geht davon aus, dass die Ddx-De-Epoxidase, wie auch beim Vx-Zyklus, im Lumen und die Dtx-Epoxidase im Stroma lokalisiert sind. Neuere Daten sprechen aber für größere Unterschiede in der Regulation der Enzyme des Vx-Zyklus bzw. des Ddx-Zyklus, als früher angenommen. So konnten Jakob et al. (2001) zeigen, dass das pH-Optimum der Ddx-De-Epoxidase, im Vergleich zu dem der Vx-De-Epoxidase, deutlich ins Basische verschoben ist. Außerdem ist auch die kooperative Reaktion auf die Ansäuerung des Mediums klar geringer. Es konnte daher schon ab einem pH von 7,2 Ddx-De-Epoxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Das heißt aber, dass die Ddx-De-Epoxidase unter physiologischen Bedingungen als konstitutiv aktiv bezeichnet werden kann. Das hätte zur Folge, dass schon bei limitierenden Lichtbedingungen die De-Epoxidierung von Ddx zur Akkumulation von Dtx führe. Falls die Dtx-Epoxidase eine, zur Zx-Epoxidase analoge, konstitutive Aktivität besäße, würden nun zwei quasi konstitutiv aktive Enzyme ständig zwei entgegengesetzte Reaktionen katalysieren. Das aber würde zu einem sinnlosen Leerlaufprozess führen und kann daher nicht als realistisches Bild angenommen werden. Allerdings gibt es bis heute keine umfassenden Untersuchungen zur Regulation der Dtx-Epoxidase. Mewes und Richter (2002) konnten allerdings Hinweise dafür finden, dass die Dtx-Epoxidase im Gegensatz zur Zx-Epoxidase im HL gehemmt ist.

2.4 Die biochemischen Eigenschaften der Enzyme der X-Zyklen

Die Enzyme der Xanthophyllzyklen wurden als die ersten pflanzlichen Lipocaline beschrieben (Bugos et al., 1998; Hieber et al., 2000), obwohl tierische Lipocaline typischerweise nicht als Enzyme, sondern als funktional divergente Proteinfamilie bekannt sind (Skerra, 2000). Lipocaline sind allgemein in ihrer Tertiärstruktur hoch konserviert und besitzen zentral eine sogenannte Fassstruktur aus acht β -Faltblättern, die flankiert werden von einer cysteinreichen N-terminalen Domäne und einer glutamatreichen C-terminalen Domäne (Villoutreix et al., 2000). Sie sind bekannt dafür, dass ihre Aktivität durch die Bindung mehrerer (hydrophober) Liganden verändert werden kann (Skerra, 2000; Villoutreix et al., 2000; Andersen et al., 2003). Im Fall der Vx-De-Epoxidase befindet sich im Innern dieses Fasses befindet sich das aktive Zentrum des Enzyms. Die Substrate, in diesem Fall all-trans Xanthophylle, werden aus der Membran ins Innere des Enzyms gezogen, dort am Ring verändert und wieder zurück in die Membran geschoben (Bugos et al., 1998). Untersuchungen von Latowski et al. (2000) zeigen, dass die Anwesenheit des Lipids

Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) in Liposomen die Aktivität der Vx-De-Epoxidase steigert. Das könnte bedeuten, dass MGDG als Ligand der Vx-De-Epoxidase wirkt.

Die Vx-De-Epoxidase besitzt im katalytischen Zentrum eine Disulfid-Brücke, deren Reduktion zur Hemmung des Enzyms führt. Folglich kann die Vx-De-Epoxidase durch Dithiothreitol (DTT) gehemmt werden (Yamamoto und Kamite, 1972), wodurch die Umsetzung von Epoxiden wirkungsvoll unterbunden wird. Das gleiche Resultat wurde auch bei der Ddx-De-Epoxidase erzielt (Olaizola et al., 1994).

Die Zx-Epoxidase wird von Büch et al. (1995) als FAD-Enzym beschrieben, weshalb sie durch den Einsatz von Diphenylenejodoniumchloride (DPI) zu hemmen ist. Außerdem wird beschrieben, dass die Zx-Epoxidase durch Cadmium zu hemmen ist (Bertrand et al., 2001). Hager (1966) schlug vor, dass die Zx-Epoxidase Kupfer enthalten muss, da sie durch den Kupferchelator Salicylaldoxime zu hemmen war. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Zx-Epoxidase ein Enzym ist, das schnell abgebaut wird, da Bouvier et al. (1996) mehrere potentielle PEST-Regionen fanden. Büch et al. (1995) berichteten über eine Verstärkung der Aktivität der Zx-Epoxidase durch FAD und Bouvier et al. (1996) und Marin et al. (1996) fanden später auch eine FAD-Bindungsdomäne. Des Weiteren berichten Marin et al. (1996) über eine ADP Bindungsfalte. Neuere Daten weisen auch darauf hin, dass die Zx-Epoxidase nicht mit NADPH direkt sondern mit Fd als Cosubstrat arbeitet (Bouvier et al., 1996). Der Reaktionsmechanismus entspricht dem einer FAD-haltigen, NAD(P)H- und O₂-abhängigen Monooxygenase (Bouvier et al., 1996).

2.5 Die Einbindung der X-Zyklen in den Metabolismus der Pflanzen

2.5.1 Die Einbindung der X-Zyklen in die Carotinoidsynthesewege

Die Xanthophylle der X-Zyklen stellen in den Synthesewegen der Carotinoide, wie in Abbildung 1.3 zu sehen ist, zum Teil Intermediate anderer Xanthophylle dar. Wichtig ist hierbei der β -Carotin-Ast der Carotinoidsynthesen, in den die X-Zyklen jeweils involviert sind (Pogson und Rissler, 2000; Lohr und Wilhelm, 2001). Das heißt, dass die Regulation der X-Zyklen auch einen Eingriff in die Synthesen anderer Carotinoide, wie z.B. Neoxanthin (Nx) im Fall der Höheren Pflanzen oder Fx im Fall einiger Algen, bedeutet (siehe unten Abb. 1.3).

Bei *P. tricornutum* kommen die Pigmente des Vx-Zyklus allerdings nicht nur als Intermediate anderer Xanthophylle vor, sondern es wurde von Lohr und Wilhelm (1999, 2001) auch berichtet, dass nach einer sechsstündigen Starklicht-Phase auch Zx akkumulierte. Das

bedeutet also, dass *P. tricornutum* unter extremen Bedingungen zusätzlich auf den Vx-Zyklus zurückgreift.

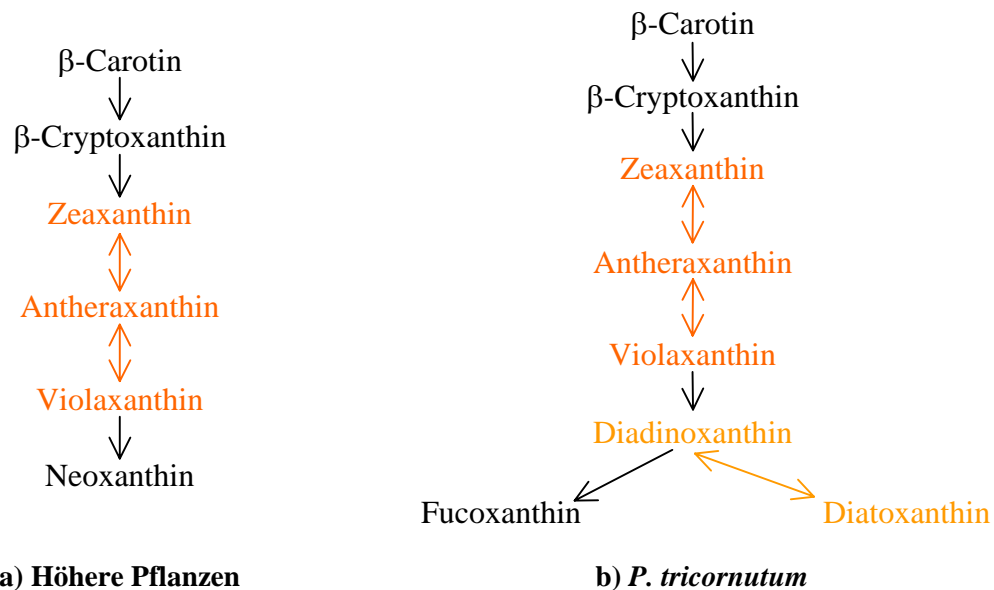


Abb. 1.3 a und b: Carotinoidsynthesewege der Höheren Pflanzen (a), vereinfacht nach Pogson und Rissler (2000) und von *P. tricornutum* (b), vereinfacht nach Lohr und Wilhelm (2001).

Dargestellt sind einige Intermediate des β -Carotinasts. Bei den Höheren Pflanzen ist Vx eine Vorstufe von Neoxanthin (Pogson und Rissler, 2000), das im LHC vorkommt. Bei *P. tricornutum* sind auch alle Xanthophylle des Vx-Zyklus vorhanden. Vx ist dann eine Vorstufe von Ddx, welches dann eine Vorstufe von Dtx und genauso auch von Fx ist (nach Lohr und Wilhelm, 2001)

2.5.2 Die Einbindung der X-Zyklen und deren Regulation in die verschiedenen Anpassungsmechanismen von Pflanzen

Um einen Eindruck der vielfältigen Aufgaben der X-Zyklus Pigmente bei Höheren Pflanzen im Vergleich zu *P. tricornutum* zu vermitteln, soll Abbildung 1.4 dies zunächst veranschaulichen (siehe unten). Die Pigmente der X-Zyklen sind nicht nur, wie in Abbildung 1.3 gezeigt, Vorstufen anderer Xanthophylle, sondern bei Höheren Pflanzen auch von dem Hormon Abscisinsäure (Marin et al., 1996), das bei Trockenstress gebildet wird und zum Schließen der Stomata führt. Außerdem schützt Zx nicht nur die Photosysteme vor einer Überanregung, sondern setzt auch zusätzlich die Fluidität der Thylakoidmembranen herab, so dass die Thylakoide bei erhöhten Temperaturen, also bei Hitzestress stabiler bleiben (Havaux und Gruszecki, 1993; Tardy und Havaux, 1997). Eine geringere Fluidität könnte auch wichtig sein für eine Abnahme der Durchlässigkeit für raktive Sauerstoffspezies (Müller et al., 2001). Hinzu kommt noch, dass Zx eine Peroxidierung der Lipide im Chloroplasten verhindert und auch so zur Stabilisierung der Membran beiträgt (Havaux und Niyogy, 1999). Das bedeutet, dass die Akkumulation von Zx nicht nur eine Anpassung an Lichtstress, sondern auch an Hitzestress ist. Es existieren bislang allerdings keine Daten darüber, ob das analoge Pigment Dtx diese Aufgaben auch bei *P. tricornutum* erfüllt. Allerdings besteht hierfür auch keine

Notwendigkeit, da Hitzestress bei marinen Algen nicht analog zu Landpflanzen vorkommt. Klar ist dagegen, dass die Synthese des Massenpigments Fx gesichert sein muss und Vx und Ddx Vorstufen von Fx darstellen (vgl. auch Abb. 1.3).

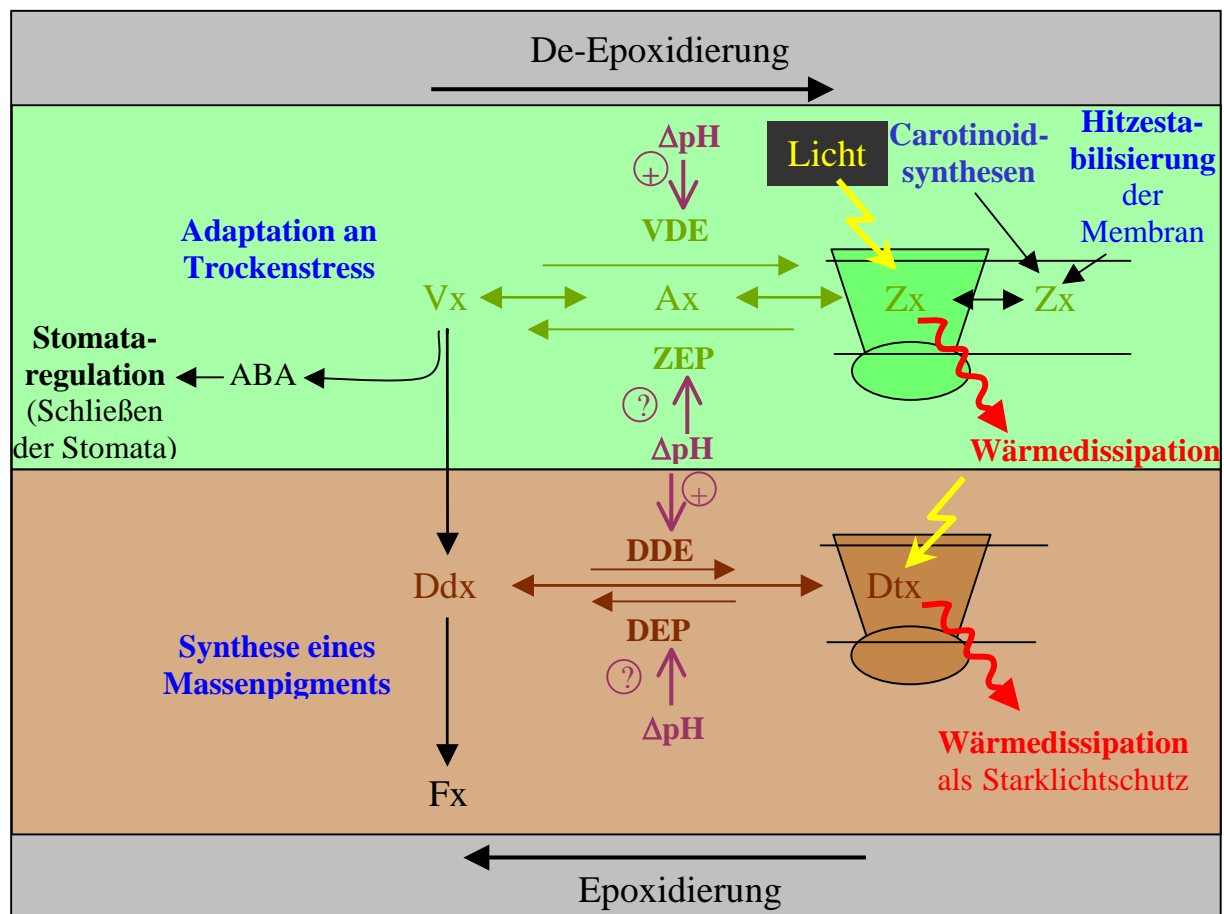


Abb. 1.4: Einbindung der X-Zyklen in verschiedene Anpassungsmechanismen der Pflanze

Abkürzungen: ABA, Abscisinsäure; Fx, Fucoxanthin; VDE, Violaxanthin-De-Epoxidase; ZEP, Zeaxanthin-Epoxidase; DDE, Diadinoxanthin-De-Epoxidase; DEP, Diatoxanthin-Epoxidase.

Die grünunterlegte Fläche verdeutlicht die Vorgänge in Höheren Pflanzen und Grünalgen, die braununterlegte Fläche die in Kieselalgen. Dunkelgrün sind die Komponenten des Vx-Zyklus und dunkelbraun die des Ddx-Zyklus gezeichnet. Violett gekennzeichnet ist die Rolle des ΔpH auf die X-Zyklus-Enzyme. Blau markiert sind die unterschiedlichen Stoffwechselwege, in denen die X-Zyklen involviert sind. Nähere Erläuterungen, siehe Text.

3. Zielsetzung der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit liegt in der Erweiterung unseres Verständnisses über die Steuerung von Xanthophyllzyklen im Hinblick auf deren multiplen Bedeutungen in Photoprotektion und Pigmentsynthesen. Die bisherigen Vorstellungen der ΔpH -Regulation der Xanthophyllzyklen sind klar unvollständig. Nach dem derzeitigen Wissen würden im Fall des Ddx-Zyklus unter limitierenden Lichtbedingungen zwei entgegengerichtete Prozesse bei ungefähr dem gleichen ΔpH aktiviert werden. Durch die Aktivität der Epoxidase würde es zu Energiekonservierung kommen, da das dissipierende Pigment Dtx (bzw. Zx) epoxidiert wird

zu dem sammelnden Pigment Ddx (bzw. Vx). Eine zeitgleich aktive De-Epoxidase würde zur De-Epoxidierung der sammelnden Pigmente und somit zu Energiedissipation führen. Hinzu kommt noch, dass die ATP-Synthese mindestens einen ΔpH von 2 benötigt, wozu limitierende Lichtintensitäten nicht ausreichen.

Dieser scheinbaren Widersprüche resultieren aus dem gegenwärtig auf die Xanthophyllzyklus-De-Epoxidasen begrenzten Forschungsinteresse. Allerdings gibt es eindeutige Hinweise (Mewes und Richter, 2002; Pinto, 2001), dass zumindest bei einigen Algen nicht nur die Hinreaktion des Ddx-Zyklus, sondern zusätzlich die Rückreaktion einer übergeordneten ΔpH -Kontrolle unterliegt. Im Falle der Hinreaktion wirkt schon ein moderater ΔpH als Aktivator, im Falle der Rückreaktion ein extremer ΔpH als Inhibitor. Das hat zur Folge, dass bei normalem ΔpH die De-Epoxidierung durch hohe Raten der Epoxidierung rückgängig gemacht wird. Erst bei extremem ΔpH , d.h. bei Energieüberschuss kommt es durch eine Hemmung der Epoxidase zu einer Netto-De-Epoxidierung und damit einhergehend zu der notwendigen Energiedissipation. So ist der scheinbare Widerspruch zwischen Energiekonservierung und Energiedissipation aufgehoben.

Mit dieser Arbeit soll in Kapitel eins des Ergebnisteils zunächst dargestellt werden, in wie fern Zx und Dtx sich in ihrer Eigenschaft als Quencher unterscheiden, denn diese Unterschiede sind wichtig in Hinblick auf die Regulation der Zx-, bzw. der Dtx-Epoxidase. Im zweiten Kapitel werden dann *in vivo* Studien dargestellt, an Hand derer die unterschiedliche Regulation der Epoxidasen im Vergleich analysiert werden soll. Das heißt konkret, dass die ΔpH -Hemmung der Dtx-Epoxidase bewiesen werden soll. Dieses, bisher kaum untersuchte Enzym soll dann im dritten Teil *in vitro* charakterisiert werden. Hierzu soll für die Dtx-Epoxidase ein Nachweissystem etabliert werden, um an Hand von Aktivität, bzw. fehlender Aktivität Aussagen über die beteiligten Faktoren dieser Regulation der Dtx-Epoxidase treffen zu können. Dabei liegen die Schwerpunkte auf der Analyse der Mechanismen der Regulation und auf den Bindungseigenschaften der Dtx-Epoxidase an die Thylakoide. Im vierten und letzten Teil soll dann die Dtx-Epoxidase durch Immunreaktionen identifiziert werden. Gelingt dies, so können dann verschiedene Bedingungen der *in vitro* Aktivitätsmessungen auch immunologisch analysiert und dann mit den Ergebnissen der Aktivitätstest verglichen werden.

Auf Grund dieser umfassenden Analysen der Dtx-Epoxidase soll schließlich nicht nur die Tatsache des Vorhandenseins einer ΔpH -Regulation des Enzyms diskutiert werden, sondern auch die Gründe hierfür. Außerdem sollen mögliche Modelle des Regulationsmechanismus der Dtx-Epoxidase vorgestellt und diskutiert werden.

II MATERIAL UND METHODE

Die verwendeten Chemikalien wurden generell über die Firmen Merck, Serva, Roth und Sigma bezogen und entsprechen dem Reinheitsgrad „Research grade“ oder „pro analysis“. Die für die Extraktion der Pigmente eingesetzten Lösungsmittel, sowie die der mobilen Phase der HPLC wurden über Roth bezogen (Reinheitsgrad ROTISOLV HPLC).

1. Pflanzenmaterial

Als Versuchsorganismen dienten zwei einzellige Kieselalgen (*Phaeodactylum tricornerutum* und *Cyclotella meneghiniana*), eine einzellige Haptophyceae (*Prymnesium parvum*), eine einzellige Raphidophyceae sowie die Höheren Pflanzen *Spinacia oleracea* und *Elodea canadensis*.

Die Algen werden als Batch-Kulturen in sterilisierten 500 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Einige Milliliter einer 2 Wochen alten Stammkultur werden in 200 ml Nährmedium überimpft. Die Kulturen werden auf einer rotierenden Platte (Certomat U, Firma Braun, Melsungen, BRD) bei 18 °C mit circa 120 U/min geschwenkt und von oben mit einem Lichtfeld mit einer Intensität von $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bestrahlt, bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, bzw. *Heterosigma carterae* modifiziert nach Hariharan et al. (1998) bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit und einer Lichtintensität von $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Als Versuchsmaterial dienen 10-14 Tage alte Kulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

1.1 Phaeodactylum tricornerutum

Es handelt sich um eine Brackwasseralge, die auch ohne eine Schale aus Silikat lebensfähig ist und sich daher als „Laboralge“ etabliert hat. Ihre braune Farbe kommt durch den hohen Gehalt an Xanthophyllen (besonders Fx) zustande, die Chl a und c maskieren. *Phaeodactylum tricornerutum* wird nach Ricard (1986) wie folgt systematisch zugeordnet:

SAG-Nr.: 1090-1a
Reich: Eukaryota
Abteilung: Heterokontophyta
Klasse: Bacillariophyceae (=Diatomeae)
Ordnung: Pennales
Gattung: Phaeodactylum
Art: *P. tricornerutum*

P. tricorutum wurde in modifiziertem ASP-2 Medium (Provasoli et al., 1957; Mann und Meyers, 1968; Lohr und Wilhelm, 2001) kultiviert (siehe Anhang).

1.2 Cyclotella meneghiniana

Bei diesem Organismus handelt es sich um eine marine Alge, die allerdings, im Gegensatz zu *P. tricorutum*, Silikat im Medium benötigt. Ihre braune Farbe entsteht, wie auch bei *P. tricorutum* durch den hohen Gehalt an Fx und anderen Xanthophyllen, die die Chlorophylle a und c maskieren. *Cyclotella meneghiniana* wird nach Hoek et al. (1995) wie folgt zugeordnet:

SAG-Nr.: 1020-1a
Reich: Eukaryota
Abteilung: Heterokontophyta
Klasse: Bacillariophyceae (=Diatomeae)
Ordnung: Centrales
Gattung: Cyclotella
Art: *C. meneghiniana*

C. meneghiniana wurde in modifiziertem ASP-2 Medium (Provasoli et al., 1957; Mann und Meyers, 1968; Lohr und Wilhelm, 2001) kultiviert. Dem Medium wurde zusätzlich 500 mg/l Silikat zugegeben (siehe Anhang).

1.3 Prymnesium parvum

Es handelt sich hier um eine marine, begeißelte Alge. Ihre braune Farbe kommt ebenfalls durch den hohen Gehalt an Xanthophyllen (besonders Fx) zu Stande, die Chl a und c maskieren. *Prymnesium parvum* wird nach Hoek et al. (1995) wie folgt systematisch zugeordnet:

SAG-Nr.: 127.79
Reich: Eukayota
Abteilung: Haptophyta
Klasse: Haptophyceae
Gattung: Prymnesium
Art: *P. parvum*

P. parvum wurde in ASW-Medium (Müller, 1962, siehe Anhang) kultiviert.

1.4 Heterosigma carterae

Es handelt sich hier um eine marine, begeißelte Alge. Auch ihre braune Farbe ist durch den hohen Gehalt an Xanthophyllen (ebenfalls besonders Fx) zu erklären, die Chl a und c maskieren. *Heterosigma carterae* ist auch unter den Namen *Heterosigma akashiwo* und *Olisthodiscus luteus* (Thronsen, 1996) bekannt und wird nach Hoek et al. (1995) wie folgt systematisch zugeordnet:

SAG-Nr.: B 46.89
Reich: Eukaryota
Abteilung: Heterokontophyta
Klasse: Raphidophyceae
Gattung: Heterosigma
Art: *H. carterae*

H. carterae wurde in ASW-Medium (Müller, 1962, siehe Anhang) kultiviert.

1.5 Scenedesmus vacuolatus

Die Grünalgen scheinen den höheren Pflanzen näher zu stehen als den anderen Abteilungen der Algen. Beide Gruppen besitzen die gleichen Photosynthesepigmente (Chlorophyll a und b, sowie die Carotinoide α -, β -, und γ -Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin u.a.), den gleichen Reservestoff (Stärke) und die gleiche Gerüstsubstanz der Zellwand (Cellulose).

Die Chlorococcales sind üblicherweise unbegeißelt und besitzen feste Zellwände. Es fehlen dann auch pulsierende Vakuolen und Stigmen. Es gibt einzellige und koloniebildende, meist planktisch lebende Arten, wobei eine Kolonie meist aus einer festgelegten Zahl von Zellen in typischer Anordnung besteht (z.B. *Scenedesmus*, *Pediastrum*).

Scenedesmus ist einzellig, kann aber auch zu einem Verband aus vier Zellen aggregieren, die durch eine gemeinsame Gallerte verbunden sind. *Scenedesmus vacuolatus* wird wie folgt nach Keeler et al. (1997) systematisch zugeordnet:

SAG-Nr.: 211-8B (*ehemals Chlorella fusca*)
Reich: Eukaryota
Abteilung: Chlorophyta (Grünalge)
Klasse: Chlorophyceae
Ordnung: Chlorococcales
Gattung: Scenedesmaceae
Art: *S. vacuolatus*

S. vacuolatus wurde in N5b-Medium nach Strotmann (1966) (siehe Anhang) angezogen.

1.6 Spinacia oleracea

Bei diesem Organismus handelt es sich um eine Höhere Pflanze, also eine Samenpflanze (Spermatophyta). Wegen der typischen Pigmente Chl a und b und dem Fehlen dominierender Carotinoide sind sie grün gefärbt. *Spinacia oleracea* wird nach Rauh und Senghas („Schmeil“, 1982) wie folgt systematisch zugeordnet:

Reich: Eukaryota
Abteilung: Spermatophyta
Klasse: Dicotyledoneae
Ordnung: Caryophyllales
Familie: Chenopodiaceae
Gattung: *Spinacia*
Art: *S. oleracea*

Die Spinatanzucht erfolgt im Klimaraum unter folgenden konstanten Bedingungen:

16 °C nachts

20 °C tags

Tag/Nacht- Rhythmus von 11:13 Stunden

Die Samen werden in feuchtes Lecaton gesät (Dunkelkeimer) und mit Leitungswasser angegossen. Nach zwei Wochen können die Keimlinge pikiert und in eine Hydroponic-Kultur überführt werden. Als Nährlösung diente eine nach Robinson (1986) modifizierte Hoaglandlösung (siehe Anhang), die in ihrer Zusammensetzung speziell auf den Spinat abgestimmt ist. Damit eine homogene Verteilung der Nährstoffe gewährleistet werden kann und sich keine anaeroben Bakterien bilden, wird die Lösung ständig mit Luft durchperlt.

6-8 Wochen lang muss ständig darauf geachtet werden, dass die Spinatwurzeln in die Nährlösung reichen. Ab der 5. Woche wird die Nährlösung wöchentlich ausgetauscht, um den Spinat keinem Salzstress auszusetzen. Aus dem gleichen Grund werden ältere und größere Spinatpflanzen mit einer 1:4 verdünnten Hoaglandlösung gegossen. Die einzelnen Blätter können nach 6-8 Wochen geerntet werden.

1.7 Elodea canadensis

Hierbei handelte es sich um Proben aus dem Freiland, die jeweils frisch aus einem Pflanzenbecken des botanischen Gartens geerntet wurden. Sie enthält, wie auch *S. oleracea* die Pigmente Chl a und b und nur wenige Carotinoide und ist daher auch grün gefärbt. *Elodea canadensis* wird nach Sitte et al. (1991) wie folgt systematisch zugeordnet:

Reich:	Eukaryota
Abteilung:	Spermatophyta
Klasse:	Monocotyledoneae
Ordnung:	Hydrocharitales
Gattung:	Elodea
Art:	<i>E. canadensis</i>

2. Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen anhand eines PAM-Fluorometers

2.1 Theoretischer Hintergrund des PAM-Fluorometers

Durch Absorption roter und blauer Lichtquanten sind Chlorophyllmoleküle in der Lage, verschiedene Anregungszustände anzunehmen. Die so aufgenommene Anregungsenergie kann auf unterschiedliche Arten genutzt oder auch wieder abgegeben werden. In der Lichtsammelantenne eines phototrophen Organismus relaxiert ein angeregtes Chlorophyllmolekül, indem es die Energie mit Hilfe des Förster- oder Dextermechanismus an ein Nachbarmolekül weitergibt. Der Förstermechanismus beruht auf induktive Resonanz, der Dextermechanismus auf den Austausch eines angeregten Elektrons gegen ein nicht angeregtes und kommt nur bei Carotinoid-Chlorophyll-Anregungen vor (Holzwarth, 1999). Im RC dagegen wird die absorbierte Energie für photochemische Prozesse genutzt.

Zu diesen beiden Prozessen (Energieweitergabe bzw. Photochemie) steht die Abgabe als Wärme (thermische Dissipation) oder Licht (insb. Fluoreszenz) in Konkurrenz. In Abhängigkeit von verschiedenen Parametern können sich die Anteile dieser vier Prozesse verändern. So ist es möglich, über die Messung der Fluoreszenz, Aussagen über die Verwertung der Anregungsenergie zu machen.

Der größte Teil der Fluoreszenzemission beruht, unter physiologischen Bedingungen, auf der Lichtabgabe durch Chl a Moleküle der Lichtsammelantenne des PS II (Schatz et al., 1988, Schlodder u. Brettel, 1988), da das PS II im Gegensatz zum PS I akzeptorlimitiert ist. Deshalb machen PAM-Messungen nur eine Aussage über den Zustand des PS II.

Wenn sich alle Reaktionszentren in offenem Zustand befinden, ist die Fluoreszenz minimal (F_0 = Grundfluoreszenz), d.h. Q_A und somit die gesamte Elektronentransportkette liegt in oxidiertem Zustand vor. Ist Q_A jedoch vollständig reduziert, so kann P_{680} aufgrund elektrostatischer Abstoßung kein weiteres Elektron abgeben. Es entfällt Photochemie als der quantitativ bedeutendste Prozess. Die RCs sind nun geschlossen und die Fluoreszenz ist maximal (F_m). Das RC eines dunkeladaptierten Photosystems kann also eintreffende

Lichtquanten effektiv für photochemische Prozesse nutzen. Kurz danach liegt das Photosystem in geschlossenem Zustand vor, bis der Akzeptor Q_A wieder oxidiert, also eine effektive Ladungstrennung wieder möglich ist.

In Photosystemen mit geschlossenem RC relaxieren die Chl-Moleküle auf einem alternativen Weg z.B. durch die Abstrahlung von Fluoreszenz. Der Anteil der Fluoreszenz an der absorbierten Energie beträgt im Fm 3% und im Fo 0,6% (Krause und Weis, 1991). Da selbst in offenen Zentren nie die gesamte Anregungsenergie photochemisch genutzt werden kann, kommt es zu einer permanenten Fluoreszenzemission, der Grundfluoreszenz Fo.

2.2 Die Nomenklatur der PAM-Fluoreszenzparameter und deren Interpretation

Belichtet man eine dunkeladaptierte Probe, so steigt die Fluoreszenzemission innerhalb kürzester Zeit bis zum Maximum an und fällt dann langsam mit Einsetzen des Elektronentransports. Sobald die Belichtung endet, erholt sich dieser Prozess wieder, bis die Fluoreszenz wieder ihr Maximum erreicht hat. Nachfolgendes Schema zeigt den skizzierten Verlauf einer solchen Messung und zeigt die verwendete Terminologie auf:

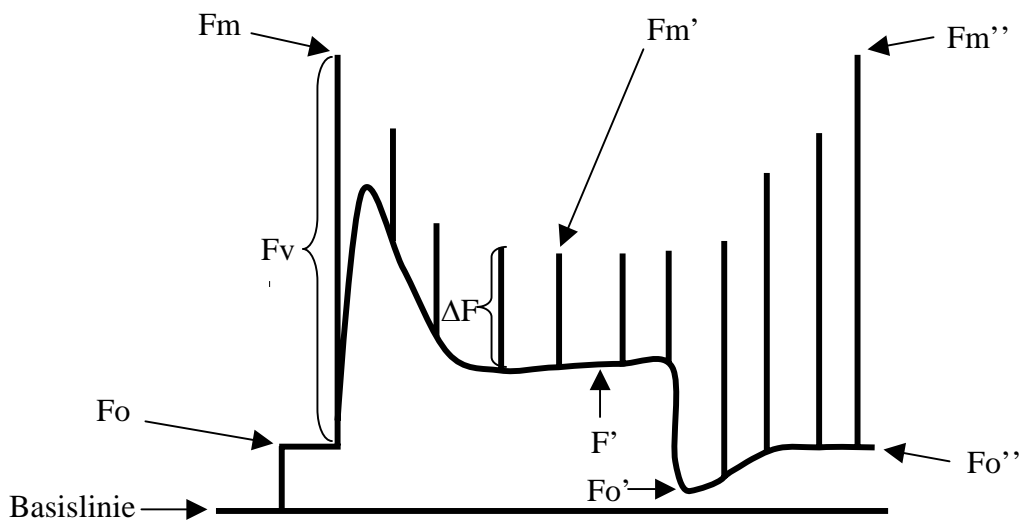


Abb. 2.1: Skizzierte PAM-Kurve mit Erläuterung der verwendeten Terminologie

F_o : Grundfluoreszenz, offener Zustand der RCs der PS II, Probe dunkeladaptiert

F_m : maximale Fluoreszenz, geschlossener Zustand der RCs der PS II durch Sättigungspuls

F_v : variable Fluoreszenz, $F_v = F_m - F_o$, Probe dunkeladaptiert

F_o' : Grundfluoreszenz sofort nach einer Belichtung, da im Licht kein F_o messbar ist

F_m' : maximale Fluoreszenz im Licht

F' : Gleichgewichtsfluoreszenz, durch aktinisches Licht angeregte Fluoreszenz

ΔF : Differenz zwischen F_m' und F' $\Delta F = F_m' - F'$

F_o'' , F_m'' : wie oben aber im Dunkeln im Anschluss an eine Belichtung

Das Absinken der maximalen Fluoreszenz bei konstanten Lichtverhältnissen kommt durch das sogenannte Quenching (engl. Löschung) zustande. Das Ausmaß des Quenchings wird durch Quenchkoeffizienten beschrieben, die sich im Normalfall auf die maximale variable

Fluoreszenz (F_v) beziehen, aber auch einen Rückgang von F_o und F_m beschreiben können. Man kann hier zwischen zwei grundsätzlichen Möglichkeiten des Quenchings unterscheiden. Die Fluoreszenzlöschung durch Photochemie (photochemisches Quenching, q_P) und die Fluoreszenzlöschung durch Wärmedissipation (NPQ).

2.2.1 Das photochemische Quenching q_P

Der Koeffizient des photochemischen Quenching q_P gibt an, wie viele Excitonen von offenen RCs eingefangen und in chemische Energie umgewandelt werden können. Die Reoxidation von Q_A verursacht eine Fluoreszenzlöschung, da die Anregungsenergie in die Photochemie eingeht und somit nicht mehr als Fluoreszenz abgestrahlt werden kann. Während einer Belichtung lässt sich aus der Fluoreszenzkurve der Anteil des PS II mit oxidiertem Akzeptor Q_A , bzw. der Reduktionsgrad der Probe ablesen. Die Differenz zwischen F_m' und F' , also ΔF , entspricht dem Anteil an oxidiertem Q_A , die Differenz zwischen F_m' und F_o' dem gesamten Q_A und der Quotient aus beiden Differenzen bezeichnet die photochemische Fluoreszenzlöschung $q_P = \Delta F / F_v'$.

2.2.2 Das nichtphotochemische Quenching (NPQ)

Bei dem NPQ handelt es sich um die Fluoreszenzlöschung in einem photochemisch geschlossenem Reaktionszentrum und zeigt eine Zunahme der Wärmedissipation an. Das NPQ setzt sich aus drei Prozessen zusammen: dem „high energy state quenching (q_E)“, dem Quenching durch state-transitions (q_T) und dem photoinhibitorischen Quenching (q_I). Diese drei Komponenten können an Hand ihrer jeweiligen Kinetik der Relaxation im Dunkeln nach einer HL-Phase und an Hand ihrer Reaktion auf verschiedene Inhibitoren unterschieden werden (Horton and Hague, 1988).

q_E entsteht durch die Energetisierung der Thylakoidmembran im Licht, also durch den Aufbau eines lichtinduzierten pH-Gradienten (ΔpH) und führt zu einer gesteigerten thermischen Dissipation der PS II. Nach Crofts und Yerkes (1994) kommt diese Fluoreszenzlöschung durch reversible Protonierungen von Aminosäuren in bestimmten Domänen des Hauptlichtsammelkomplexes LHCIIB zustande. Außerdem werden indirekt durch den ΔpH die Schutzpigmente Z_x bzw. Dtx gebildet, die nach Demmig-Adams et al. (1990) und Arsalane et al. (1994) F_m und auch F_o quenchen. q_E kann bis zu 90 % der Abnahme von F_v und 15 – 20 % der Abnahme von F_o ausmachen (Weis und Berry, 1987).

Ebenso wie q_E beruht q_I auf eine Erhöhung der thermischen Dissipation des PS II, jedoch durch mögliche Umwandlungen der RCs der PS II in Wärmefallen (Cleland et al., 1986). q_I

und qE sind erst nach einer längeren Erholungsphase nach einer Starklichtbestrahlung zu unterscheiden, da die Komponenten von qE sehr viel schneller relaxieren, als die von qI . Da nach Niyogi (1999) qT nicht wichtig zu sein scheint für Photoprotektion, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

Nach Stern-Volmer wird das NPQ als $F_m/F_m'-1$ dargestellt (Bilger und Björkman, 1990) und beschreibt den zeitlichen Verlauf der nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit eines Fluoreszenzlöschers bzw. Quenchers. Der Ausdruck $F_m/F_m'-1$ verändert sich proportional zur Konzentration eines Quenchers und kann so zur Darstellung der Quencher Z_x bzw. A_x oder D_{tx} verwendet werden. Nach dieser Berechnungsweise werden allerdings nur Änderungen im F_m , nicht aber im F_o berücksichtigt.

2.3 Prinzip und Aufbau eines Pulse-Amplituden-Modulations- (PAM-) Fluorometers

Das besondere an einem PAM-Fluorometer, im Gegensatz zu herkömmlichen Geräten, sind bei einem PAM-Fluorometer Anregungs- und Messlicht getrennt. Diese Anordnung ermöglicht eine Variation der Lichtintensität des Dauerlichts während einer Messung.

Das Messlicht ist zur Unterscheidung vom Anregungslicht (=aktinisches Licht, Dauerlicht) gepulst, was in einer ebenso gepulsten Fluoreszenz resultiert. Ein an den Detektor angeschlossener Verstärker ist auf die Frequenz der Messlichtpulse geeicht und daher in der Lage, nur die gepulste Fluoreszenz selektiv zu verstärken, nicht aber die durch das aktinische Licht ausgelöste.

Des Weiteren existiert eine zusätzliche Lichtquelle (Blitzlampe), mit der sättigende Lichtblitze auf die Probe gegeben werden können. Dadurch schließen sich für kurze Zeit alle Photosysteme, was zur genauen Berechnung der thermischen Dissipation nötig ist.

Ein zusätzliches Filtersystem verhindert die Detektion störenden Lichts: zwischen der Leuchtdiode und der Probe befindet sich ein Filter, der nur für Blaulicht kleiner als einer Wellenlänge von 580 nm durchlässig ist (Schott, SP 580), wodurch eine selektive Anregung ermöglicht wird. Ein weiterer Filter, der nur rotes Licht mit einer Wellenlänge größer als 645 nm durchlässt (Schott, RG 645), befindet sich vor dem Detektor, was verhindert, dass gepulstes blaues Streulicht an Stelle von gepulster Fluoreszenz den Detektor erreicht.

Skizzierter Aufbau eines PAM-Fluorometers (PAM 101, Firma Walz, Effeltrich, BRD):

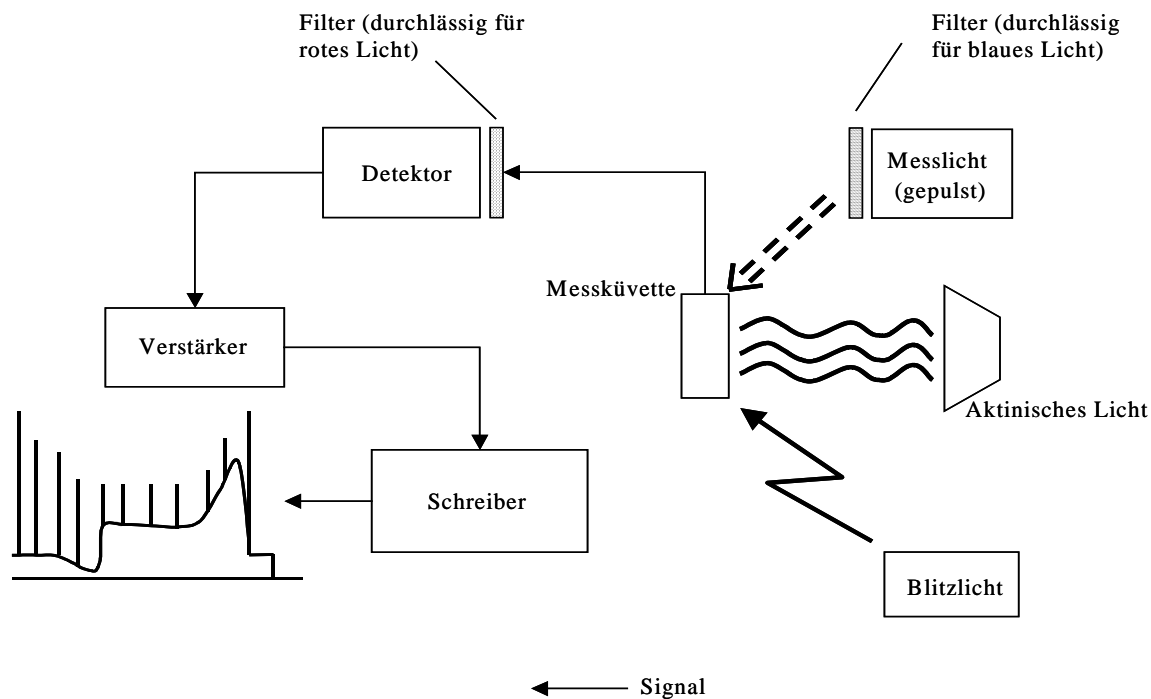


Abb 2.2: Aufbau eines PAM-Fluorometers. Erläuterungen siehe Text oben.

2.4 Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz

1200 μl der zu messenden Suspension wurden in eine Küvette gefüllt und das Verhalten der Fluoreszenz, in Abhängigkeit der eingestellten Bedingungen, aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei Algen an intakten Zellen direkt im Nährmedium. Um aktinische Effekte zu vermeiden, erfolgten die Messungen im Dunkeln bei einer Pulsfrequenz des Messlichts von 1,6 kHz und nur im Licht bei 100 kHz.

Nach einer kurzen Dunkelphase zur Festlegung der Basislinie, wurde das Messlicht eingeschaltet, um so F_0 zu bestimmen. Nach einer Minute wurde dann das Blitzprogramm gestartet, so dass im Licht ein Blitzintervall immer 60 Sekunden betrug. Mit dem ersten Lichtblitz ($2800 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), der F_m lieferte, wurde das AL ($500 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) ein- und nach 30 Minuten Belichtung wieder ausgeschaltet. Zugleich wurde die Blitzfrequenz erniedrigt, um aktinische Effekte zu vermeiden und so die Relaxation als reale Dunkelreaktion betrachten zu können. Zusätzlich wurden die Proben während der gesamten Messung mit einem Rotlicht mit einer Wellenlänge größer ca. 695 nm (RG 695, Firma Schott) bestrahlt, das selektiv das PS I anregt. So konnten chlororespiratorische Effekte (Büchel und Garab, 1995; Ting und Owens, 1993; Bennoun, 1982) verhindert werden. Die Daten wurden anhand der Software Win Control (Firma Walz, Effeltrich, BRD) aufgenommen.

2.5 Darstellung der Ergebnisse der Fluoreszenzinduktionskinetiken

Aus den ermittelten Werten für F_m und F_o läßt sich die maximale variable Fluoreszenz F_v bestimmen. Die variable Fluoreszenz F_v ($F_v = F_m - F_o$) repräsentiert keine eigenständige Fluoreszenzkomponente, sondern beschreibt die Änderung der Fluoreszenz zwischen zwei Zuständen der Photosysteme, nämlich offen (F_o) und geschlossen (F_m). Im Allgemeinen kann man F_v als ein Maß für das Elektronentransportpotential des PS II bezeichnen.

Anhand dieser Größen (F_o , F_m , F_v) lassen sich nun das NPQ_m, das NPQ_o und die maximale photochemische Effizienz F_v/F_m bestimmen. Diese leicht zu berechnende Größe dient als Maß für die Effizienz, mit der das PS II absorbierte Quanten in Photochemie umsetzt. Im Gegensatz zu höheren Pflanzen, die eine äußerst geringe Variation der F_v/F_m -Verhältnisse um einen Wert von ca. 0,8 aufweisen (Grevby, 1996), treten bei Fx-haltigen Algen niedrigere F_v/F_m Werte auf (Büchel und Wilhelm, 1993).

3. Pigmentanalyse mittels HPLC

3.1 Das Trennprinzip der HPLC

Die Abkürzung „HPLC“ steht für High Performance Liquid Chromatography. Das Trennprinzip aller chromatographischen Anwendungen beruht auf unterschiedlichen Wechselwirkungen der zu trennenden Substanzen mit den eingesetzten Phasen. Das Phasensystem der HPLC besteht aus einer flüssigen mobilen und einer festen stationären Phase. Nach einer Probenauftragung werden die gelösten Substanzen mit der mobilen Phase durch die Säule transportiert und treten nun aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften unterschiedlich stark mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung. Bei der hier eingesetzten Trennung handelt es sich um eine Reversed-Phase-Adsorptions-Chromatographie. Die Bezeichnung Reversed-Phase bezieht sich auf den Umstand, dass im Gegensatz zur Normal-Phase-Chromatographie die mobile Phase die polare Phase darstellt und die stationäre Phase die unpolare Phase. Die zu trennenden Substanzen werden durch langkettige, hydrophobe Moleküle an der stationären Phase adsorbiert. Bei diesen Molekülen handelt es sich um C-18 Bausteine, die an die Hydroxylgruppen eines porösen Kieselgels durch eine Siloxanbindung gebunden sind.

3.2 Der Aufbau der HPLC

Die verwendete HPLC-Anlage bestand aus einer Niederdruckgradienten Pumpe (Spectra Physics 8800/8810 LC PUMP), einer Trennsäule (EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, Düren, BRD) in einem Säulenofen mit Peltier-Temperatur-Regelsystem (Eigenbau), einem Detektor in Form eines LC Spektrophotometer (Waters Lambda Max Model 481) mit nachgeschaltetem Auswertsystem (Peak Simple-Model 202/203) von SRI-Instruments. Absorptionsspektren wurden mit einem Photodiodenarray-Detektor (Waters 991) aufgenommen. Abbildung 2.3 veranschaulicht den Aufbau der Anlage.

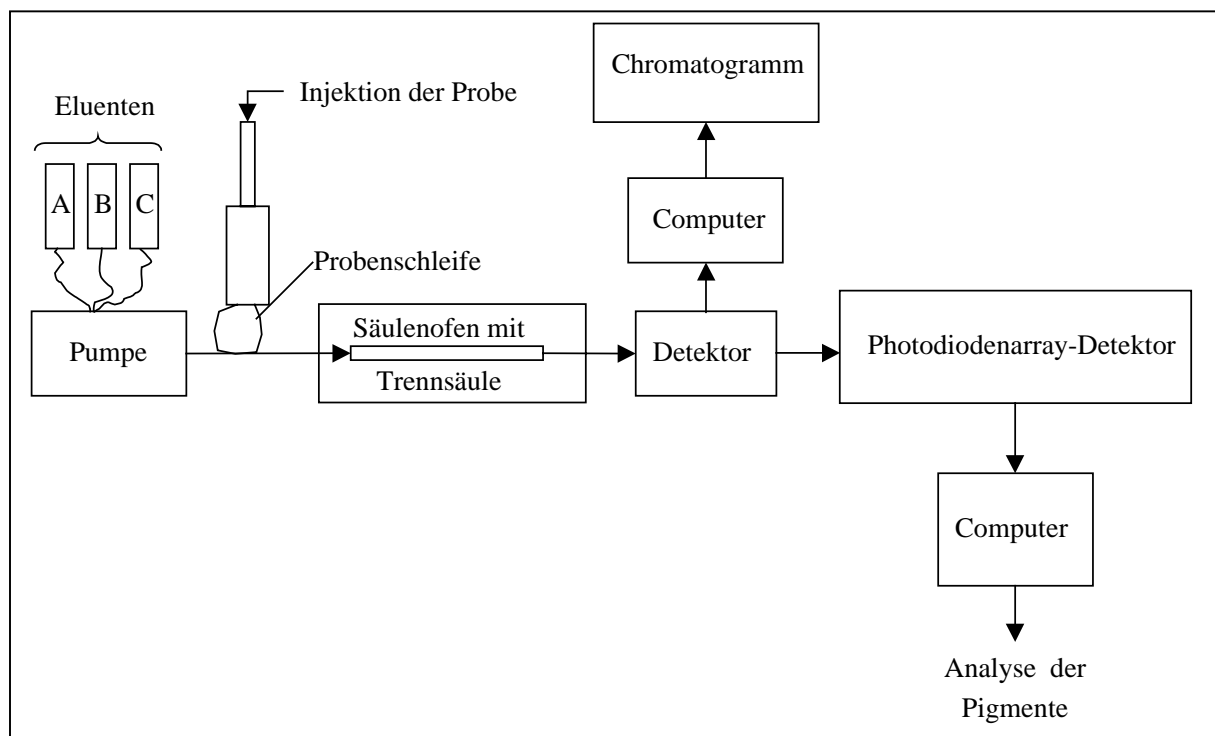


Abb. 2.3: Aufbau einer HPLC-Apparatur. Erläuterungen siehe Text.

3.2.1 Trennbedingungen

Säule EC 125/4 mm Nucleosil 100-5 C18

mit Vorsäule CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18 (Fa. Macherey and Nagel, Düren, BRD)

Säulentemperatur 20 °C

Detektionswellenlänge 440 nm

Die verwendeten Lösungsmittel besaßen HPLC-Qualität. Die Lösungsmittel wurden vor der Verwendung mit Helium entgast. Das eingesetzte Wasser wurde einer Reinstwasseranlage (Optilab-Standard Water systems, Firma Membrane Pure, Bodenheim) entnommen.

Eluent A: 95% Acetonitril + 5% Tris-HCl (25 mM), pH 7,5

Eluent B: 100% Methanol

Eluent C: 100% Ethylacetat

Tab. 2.1: Lösungsmittelgradient für Chl a/c-haltige Organismen (Gradient A)

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [ml/min]
0	100	0	0	1
5	90	10	0	1
9	0	50	50	1
11	0	50	50	1
12	0	100	0	1
13	100	0	0	1
15	100	0	0	1

Unter diesen Bedingungen erhält man folgendes Chromatogramm:

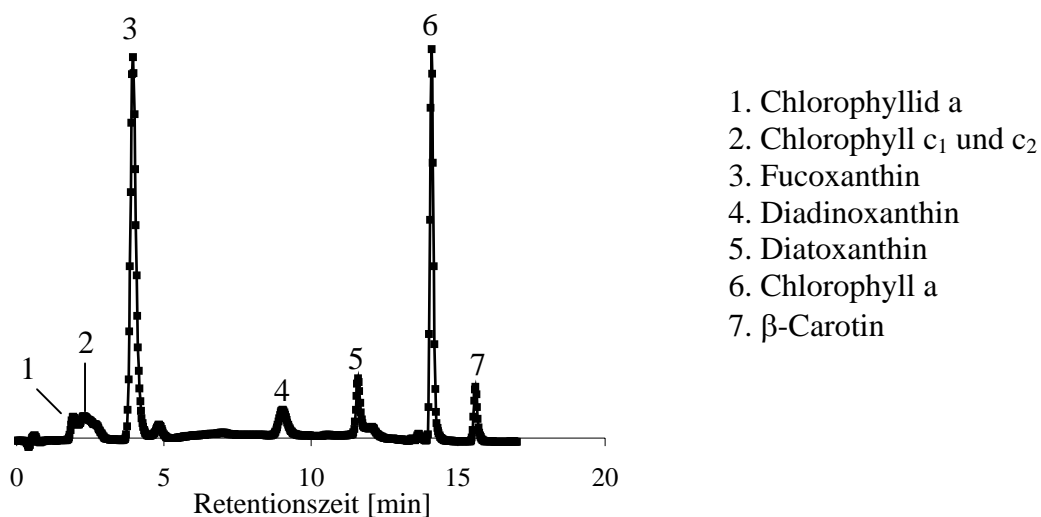


Abb. 2.4. Chromatogramm von *P.tricornutum* nach 30minütiger Belichtung bei 500 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Tab. 2.2: Lösungsmittelgradient für Chl a/b-haltige Organismen (Gradient B)

Zeit [min]	A [%]	B [%]	C [%]	Flussrate [ml/min]
0	100	0	0	1
10	95	5	0	1
19	95	5	0	1
26	0	50	50	1
27	0	50	50	1
29	100	0	0	1

Unter diesen Bedingungen erhält man folgendes Chromatogramm:

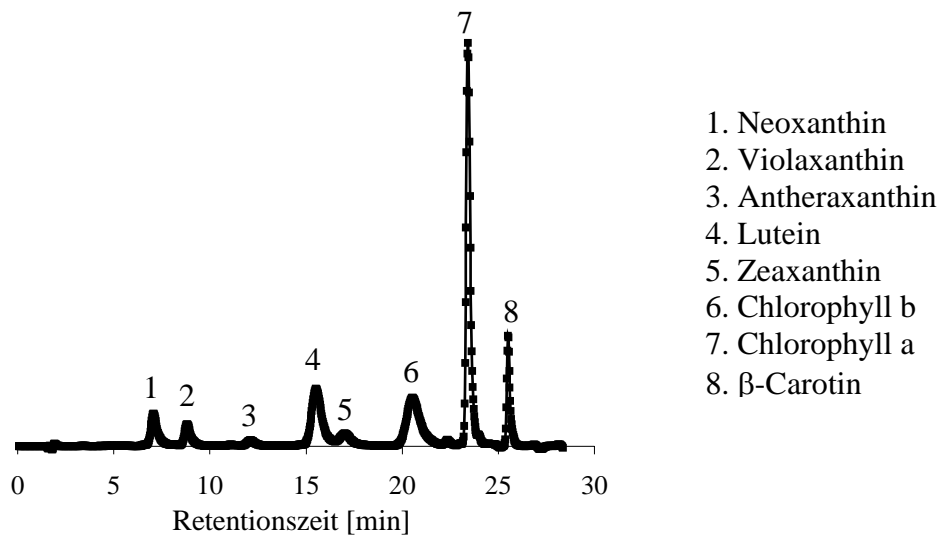


Abb. 2.5. Chromatogramm von *E. canadensis* nach 30minütiger Belichtung bei $1400 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Nach Beendigung jedes Trennprogramms wurde die Säule mit dem anfänglichen Eluentengemisch äquilibriert, bis sich ein konstanter Anfangsdruck einstellte. Dann konnte die nächste Probe aufgetragen werden.

3.2.2 Pigmentidentifizierung

Mit den Retentionszeiten und den Absorptionseigenschaften der Pigmente wurden zwei Merkmale zur Identifizierung der Peaks benutzt. Durch den Einsatz eines Photodioden-Array-Detektors (Waters 991) ist die Möglichkeit gegeben, Absorptionsspektren aufzunehmen. Der Verlauf der Spektren und die Absorptionsmaxima wurden mit schon vorhandenen Daten (Mewes, 1997; Lohmann, 1997; Mewes, 2001; Pinto, 2001) verglichen (siehe auch Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Absorptionsmaxima aller Pigmente und III/II-Verhältnis der Carotinoide (nach Mewes 2001).

Pigment	Abs.-Max. [nm]	III/II [%]
Neoxanthin	441,2	32
Violaxanthin	438,6	87
Antheraxanthin	446,6	41
Lutein	447	53
Zeaxanthin	449	25
Fucoxanthin	449	<1
Diadinoxanthin	446	72
Diatoxanthin	454	38
Chlorophyll a	428	
Chlorophyll b	456,8	
Chlorophyll c	430,6	
β-Carotin	451,6	11

Weiterhin gaben die Retentionszeiten der Pigmente in den oben genannten Arbeiten Möglichkeiten eines Vergleichs mit den Retentionszeiten der Pigmente unter den hier gewählten chromatographischen Bedingungen. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die Verhältnisse der Peaks der Carotinoide und Absorptionsmaxima der einzelnen Pigmente.

3.2.3 Pigmentquantifizierung

Die Kalibrierung des verwendeten HPLC-Systems wurde von Mewes (2001) durchgeführt. Aus den ermittelten Eichfaktoren (siehe Tabelle 2.4) wird dann durch ihre Multiplikation mit der Fläche des erhaltenen Peaks die Menge an Pigment in μmol errechnet (Fläche*Eichfaktor= μmol Pigment).

Tab. 2.4: Eichfaktoren ermittelt von Mewes (2001)

Pigment	Eichfaktoren
Vx	1,14E-07
Ax	1,07E-07
Lutein	1,09E-07
Zx	1,64E-07
Chl a	1,99E-07
Fx	1,49E-07
Ddx	1,30E-07
Dtx	1,60E-07

3.3 Probennahme und Herstellung der Pigmentextrakte

3.3.1 Probenentnahme bei in vivo Versuchen

Proben für die Pigmentanalysen wurden zu bestimmten Zeitpunkten aus der Bestrahlungseinheit entnommen, mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe auf einen Glasfaserfilter (Typ No. 6, Schleicher und Schuell, Dassel, BRD) gesaugt und anschließend in flüssigem Stickstoff (77 K = -194 °C) schockgefroren und für eine kurze Lagerung sofort bei -20 °C aufbewahrt. Im Falle einer längeren Lagerungsdauer wurden die Proben gefriergetrocknet (Alpha 1-4, Firma Christ, Osterode am Harz, BRD).

Die Pigmente wurden aus diesen Proben extrahiert, in dem die Zellen mit Hilfe eines Zellhomogenisators (MSK, Firma Braun, Melsungen, BRD) aufgebrochen wurden. Hierfür wurde eine Duranglasflasche mit 3 ml Glasperlen (0,3 und 1 mm Durchmesser, Gewichtsverhältnis 1:1) beschickt, der Filter hinzugefügt und mit 5 ml Extraktionsgemisch (90% Methanol, gepuffert mit 0,2 M Ammoniumacetat und 10% Ethylacetat) überschichtet. Die Flasche wurde in einen Zellhomogenisator (MSK; Firma Braun, Melsungen, BRD)

gegeben und die Zellen unter Trockeneiskühlung für 30 s bei Stufe 2 aufgeschlossen. Ein Aliquot des pigmenthaltigen Überstandes wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 15000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro 12-24). Danach wurde ein Teil des klaren Überstandes entnommen, mit 10% H₂O_{dest} versetzt, was zu schärferen Peaks führte und erneut für 1 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Der so vorbereitete Pigmentextrakt konnte nun zur Probeninjektion und nachfolgender chromatographischer Analyse verwendet werden.

3.3.2 Herstellung der Pigmentextrakte nach einer in vitro Epoxidierung

Da es sich hier um Thylakoide handelt, mussten die Zellen nicht mehr aufgebrochen werden. Es war dann ausreichend, das Extraktionsgemisch (siehe oben) direkt auf die Thylakoide zu geben, zu vortexen und anschließend für 2 Minuten bei 15000 rpm abzuzentrifugieren. Mit dem pigmenthaltigen Überstand konnte dann wie oben beschrieben verfahren werden.

4. Thylakoidpräparationen

4.1 Thylakoidpräparationen aus Algen

Die Isolation von Thylakoiden oder allgemein von Proteinen aus *P. tricornutum* stellt auf Grund von hoch aktiven Abbauenzymen wie Chlorophyllasen und Proteasen ein Problem dar. Um Abbauprozesse schon während der Isolation zu vermeiden, wurden Tris-Borat-gepufferte Medien verwendet, außerdem alle verwendeten Medien und Gerätschaften auf 0 °C vorgekühlt und auf Eis gehalten. Die Zellen wurden bei 500xg und 0°C 5min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 10ml Isolationsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in eine 50 ml Duranglasflasche überführt und mit 3 ml eines Glasperlengemischs (0,3 und 1 mm Durchmesser, Gewichtsverhältnis 1:1) 30 s unter Trockeneiskühlung homogenisiert. Die Glasperlen wurden durch Absaugen der Suspension durch eine D1-Fritte abgetrennt und Perlen und Flasche mit wenig Isolationsmedium nachgespült. Anschließend wurde die Suspension 9 min bei 8500xg und 0 °C abzentrifugiert (Avanti J-25, Rotor JA20, Beckman), das Pellet in 5ml Reaktionsmedium resuspendiert und erneut 9 min bei 8500xg und 0 °C zentrifugiert. Nach einer weiteren Resuspendierung in 5 ml Reaktionsmedium (RM) wurde 8 min bei 8000xg und 0 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren wurde das Pellet schließlich in wenig RM aufgenommen.

4.2 Thylakoidpräparationen aus Höheren Pflanzen

Es wird im Kühlraum bei 4 °C zügig gearbeitet. Alle verwendeten Geräte müssen vorgekühlt, die Medien auf Eis gehalten werden. 2-4 Blätter werden geerntet und in Eiswasser überführt. Nach Entfernen der Mittelrippe werden sie in kleine Stücke gerissen und unter Zusatz von 50 ml Isolationsmedium (Medium A) im Mixer (Typ 4142, Firma Braun, Melsungen) homogenisiert (10 sec Stufe 1; 10 sec Stufe 3). Die Suspension wird schnell durch 4 Lagen Mull und eine Lage Watte durch einen Trichter in ein vorgekühltes Zentrifugenglas filtriert. In der Kühlzentrifuge (Heraeus Christ, Minifuge GL) (0 °C) wird das Filtrat anschließend für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach Dekantieren wird das Pellet in 30 ml Wasch- und AufbewahrungsmEDIUM (Medium B) aufgenommen und mit einem Haarpinsel gründlich resuspendiert. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation für 2 min bei 3000 rpm. Das entstandene Pellet wird in 30 ml Schockmedium (Medium C) aufgenommen und erneut mit dem Pinsel resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 2 min bei 3000 rpm wird das Pellet in 500 µl Medium B aufgenommen und auf Eis gelagert.

5. Bestimmung des Chlorophyllgehalts

5.1 Bestimmung des Chlorophyllgehalts bei Chl a/c-haltigen Organismen

Bei diesen Organismen gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten zur Chlorophyllbestimmung, abhängig davon, in welchem Zustand mit ihnen gearbeitet wird. Handelt es sich um Messungen, die an intakten Algenzellen stattfinden, so ist es möglich, ein *in vivo*-Spektrum von 750 nm bis 600 nm aufzunehmen. Dieses wurde von Mewes (2001) geeicht, so dass nun aus dem Extinktionsmaximum von Chl a bei einer Wellenlänge von 674 nm der Chlorophyllgehalt errechnet werden kann. Eine Extinktion von 0,2 entspricht dabei 2,77 mg Chl a pro Liter.

Wird mit isolierten Thylakoiden oder auch nur mit aufgebrochenen Zellen gearbeitet, so können die Pigmente entweder aus 50 µl der Suspension in 5 ml 90%igem Aceton direkt oder auch erst nach 30 s Homogenisation im Zellhomogenisator extrahiert und die ausgefallenen Proteine sowie andere störende Substanzen bei 3000 rpm 5 min abzentrifugiert (Heraeus Sepatech, Megafuge 1) werden. Vom Überstand werden die Extinktionen bei 630 nm, 664 nm und 750 nm (Korrekturwert, wird von den anderen beiden Werten abgezogen) bestimmt und daraus nach folgender Formel (Jeffrey und Humphrey, 1975) der Chlorophyllgehalt berechnet.

$$\text{Chl a:} \quad 11,47 * E_{664} - 0,4 * E_{630}$$

$$\text{Chl c:} \quad 24,34 * E_{630} - 3,73 * E_{664}$$

Der Gesamtchlorophyllgehalt ergibt sich aus der Addition der erhaltenen Werte, wobei der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden muss.

5.2 Bestimmung des Chlorophyllgehalts bei Chl a/b-haltigen Organismen

Es wurden 50 µl einer Thylakoidsuspension in 5 ml 80%iges Aceton überführt. Die ausgefallenen Proteine wurden 5min bei 3000 rpm abzentrifugiert (Heraeus Sepatech, Megafuge 1). Aus dem klaren Überstand wurden die Extinktionen bei 647 nm, 664 nm und 750 nm bestimmt und dann nach einer Formel von Ziegler und Egle (1965) der Chlorophyllgehalt errechnet.

$$\text{Chl a:} \quad 11,78 * E_{664} - 2,29 * E_{647}$$

$$\text{Chl b:} \quad 20,05 * E_{647} - 4,77 * E_{664}$$

Wie auch bei der Bestimmung von Chl a und Chl c ergab sich der Gesamtchlorophyllgehalt aus der Addition der errechneten Werte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

6. In vitro Epoxidierung

6.1 Etablierung eines stabilen Systems

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde ein Epoxidierungs-Reaktionsmedium (Epox-RM, siehe Anhang) mit pH 8 entwickelt, das die prosthetische Gruppe FAD (50µM), sowie entfettetes BSA (BSA Typ H2, Firma Gerbu, 0,3mg/ml), zur Bindung freier Fettsäuren, enthielt.

6.2 Versuchsablauf bei *P. tricornutum*

Die in vitro Epoxidierung wurde in 100µl oder 200µl auf RT temperierten Epoxidierungs-RM durchgeführt. Zum Starten der Reaktion wurden NADH (2mM) und Thylakoide entsprechend einem Chlorophyllgehalt von 0,3 mg/ml im RM, zugegeben. Die in vitro Epoxidierung wurde bei RT auf einem Schüttler (Mini-shaker, Modell Kühner, Firma Braun Melsungen, BRD) zur optimalen Sauerstoffversorgung durchgeführt. Nach der gewünschten Zeit (maximal 60min) wurde die Reaktion durch Abzentrifugieren (Hettich Mikro 12-24) und Aufnehmen der Pellets in 300µl Extraktionsmittel (90% Methanol, gepuffert mit 0,2 M Ammoniumacetat und 10% Ethylacetat) abgestoppt. Die Langzeitlagerung der Proben fand bei -20°C statt.

6.3 Versuchsablauf bei *S. oleraceae*

Wie auch bei *P. tricorutum* wurde die in vitro Epoxidierung bei *S. oleraceae* bei einem Chlorophyllgehalt von 0,3 mg/ml durchgeführt. Dem Reaktionsmedium (siehe Anhang) wurde FAD (50 μ M) und BSA (0,3 mg/ml) zugefügt und die Reaktion durch die Zugabe von 2 mM NADH gestartet. Zur Hemmung der De-Epoxidase wurde zusätzlich noch DTT (5mM) zugegeben, um auszuschließen, dass im LL die De-Epoxidase noch Restaktivität zeigt. Um für ausreichende Sauerstoffversorgung zu sorgen wurde die in vitro Epoxidierung auf einem Schüttler (Mini-shaker, Modell Kühner, Firma Braun Melsungen, BRD) durchgeführt. Nach der gewünschten Zeit (maximal 60min) wurde die Reaktion durch Abzentrifugieren (Hettich Mikro 12-24) und Aufnehmen der Pellets in 300 μ l Extraktionsmittel (90% Methanol, gepuffert mit 0,2 M Ammoniumacetat und 10% Ethylacetat) abgestoppt. Die Langzeitlagerung der Proben fand bei -20°C statt.

6.4 Diatoxanthinpräparation

Um bei einer in vitro Epoxidierung die Menge des Substrats genau kontrollieren zu können, muss es in reiner Form vorliegen. Da es Dtx nicht käuflich zu erwerben gibt, wurde eine dünnschichtchromatographische (DC) Methode gewählt (Hager und Meyer-Bertenrath, 1966). Hierfür wurden DC-Platten angefertigt, in dem aus 29,5 g CaCO₃, 6 g MgO, 5 g Ca(OH)₂ und 60 ml 1,7%iger KOH-Lösung ein Brei gerührt und auf 5 Platten (ca. 20 x 20 cm) mit einer Schichtdicke von 0,25 mm ausgestrichen wurde. Die Platten wurden anschließend im Trockenschrank bei 100 °C 60 min getrocknet und möglichst frisch verwendet.

Der Dtx-haltige Extrakt wurde hergestellt, in dem zunächst 50 bis 100 ml Algensuspension auf einen oder mehrere Glasfaserfilter gezogen, in flüssigem Stickstoff gefroren und gefriergetrocknet wurden. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml 100%igem Aceton 2 Minuten unter Trockeneiskühlung homogenisiert. Der acetonische Extrakt wurde vollständig auf eine DC-Platte aufgetragen und die Platte in eine Laufkammer mit einem Fließmittel (50 ml Benzin (Kp 100-140°C), 50 ml Aceton, 40 ml Chloroform) gestellt. Nach ca. 60 Minuten hatte die Laufmittelfront den Rand der Platte erreicht und die Chromatographie konnte abgebrochen werden.

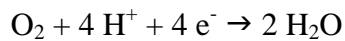
Die einzelnen Pigmentbanden wurden separat gesammelt und die Pigmente in Ethanol aufgenommen. Die Identifikation erfolgte an Hand der photometrisch bestimmten Spektren wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben.

7. Bestimmung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion

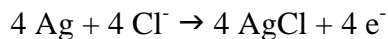
7.1 Prinzipien der Sauerstoffmessung anhand der Sauerstoffelektrode

Verwendet wurde eine Sauerstoffelektrode (Oxygenmeter, Firma Bachhofer), bestehend aus einer Platinkathode und einer Silberanode, welche in eine Trägerscheibe eingelassen sind. Über die Elektrode wurde ein Stückchen Zigarettenpapier gelegt, das mit 3,5 M KCl-Lösung durchtränkt war, damit eine Verbindung der beiden Elektroden über den Elektrolyten zu Stande kommt. Darüber wurde eine gasdurchlässige Teflonmembran mit Hilfe eines Gummirings gespannt. Die so vorbereitete Elektrode konnte dann als Abdichtung der Messküvette an ihrer Unterseite eingesetzt werden.

Der durch die Algen oder Thylakoide freigesetzte Sauerstoff diffundierte durch die Membran und wurde durch eine angelegte Polarisationsspannung von 700 mV zu Wasser reduziert. An der Platinkathode fand folgende Reaktion statt:



An der Silberanode kam es zu folgender Reaktion:



Diese Redoxreaktionen hatten einen zur Sauerstoffproduktion proportionalen Polarisationsstrom zur Folge, welcher verstärkt und so von einem Schreiber (L 6532, Firma Linseis) aufgezeichnet werden konnte.

An jedem Versuchstag wurde eine Eichung durchgeführt. Dazu wurde sauerstoffgesättigtes Wasser in die auf 20 °C temperierte Elektrodenkammer gefüllt und so lange gewartet, bis sich ein konstantes Signal eingestellt hatte. Das Signal entsprach einer 100%igen Luftsauerstoffsättigung. Durch das Entfernen des Sauerstoffs durch die Zugabe einer Mikrospatelspitze Natriumdithionit konnte das Signal für 0% Sauerstoff aufgezeichnet werden. Die Differenz beider Signale entspricht unter oben genannten Bedingungen 0,276 mM O₂/l (bei 20 °C lösen sich in 1 l Wasser 8,84 mg O₂).

7.2 Ermittlung der Photosyntheseraten

In die Elektrodenkammer wurde 1 ml Probe gefüllt. Die Probe konnte hierbei aus intakten Zellen in Nährmedium bzw. auch aus Thylakoiden in RM bestehen. Die Probe wurde zunächst dunkeladaptiert, bis sich ein konstantes Signal einstellte. Die Bestimmung der Photosyntheserate wurde bei sättigender Lichtintensität (500 μmol m⁻² s⁻¹) durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Kaltlichtlampe (KL 1500, Fa Schott) Die Bestimmung der Lichtintensitäten erfolgte in der Elektrodenkammermitte mit Hilfe eines Quantensensors (LI-250, Light Meter, Firma Li Cor). Die Probe wurde solange belichtet, bis sich auch hier ein

konstantes Signal einstellte. Zur Berechnung der reellen Photosyntheseraten in $\mu\text{mol O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ mg Chl}^{-1}$ wurde die Dunkelrespiration nach der jeweiligen Belichtung von der apparenten Photosynthese abgezogen.

Die Berechnung der Sauerstoffproduktionsraten erfolgte nach Bestimmung des Chlorophyllgehalts und des Eichfaktors nach folgender Formel:

$$\text{O}_2 [\mu\text{mol/h} \cdot \text{mgChl}] = \frac{276 \mu\text{mol O}_2/\text{h} \cdot (\text{Skt}/\text{min}) \cdot 60\text{min}}{\text{Eichung Skt.} \cdot \text{Chl (mg/l)}}$$

8. Identifikation der Diatoxanthin-Epoxidase

8.1 Elektrophorese der Thylakoidproteine

8.1.1 Theoretische Grundlagen des Trennprinzips der SDS-Polyacrylamid Elektrophorese

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung und Analyse einer Proteinmischung, hier der Auftrennung der Thylakoidproteine. Als Gelmatrix dient dabei ein durch radikalische Polymerisation aus den Monomeren Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestelltes Polyacrylamidgel. Die Proteine werden mit SDS, einem anionischen Detergenz versetzt. Es lagert sich reversibel in konstantem Verhältnis an Proteine, und umgibt sie so mit einem Mantel identischer negativer Ladung, wodurch ihre Eigenladung abgeschirmt wird. Das Gewichtsverhältnis von SDS zu umschlossenem Protein beträgt immer ca. 1,4, woraus ein etwa gleiches Verhältnis von Ladung zu Molekülmasse resultiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgt so alleine aufgrund ihrer Größe, wenn sie während der Elektrophorese durch ein Netz mit definierter Porengröße wandern. Große Proteine bilden also mit SDS große Micellen und wandern langsamer als Kleine. Durch den gleichzeitigen Einsatz von Eichproteinen bekannter Größe kann die Molekülmasse der zu trennenden Proteine erfasst werden.

Um die Proteinauftrennung und Bandenschärfe zu optimieren, wird ein diskontinuierliches Gel benutzt, d.h. es wird zusätzlich ein Sammelgel verwendet. In diesem werden die Proben basierend auf dem Prinzip der Isotachophorese in sehr kleinen Bereichen konzentriert, so dass die Probe als scharfe Bande in das Trenngel eintreten kann.

8.1.2 Gießen und Vorbereiten der Gele

Die verwendeten Gele wurden am Vortag gegossen. Das Puffersystem basierte auf den Angaben von Laemmli (1970), (verwendete Lösungen: siehe Anhang). Es wurde eine Apparatur der Fa Biorad (Mini-PROTEAN 3) benutzt.

Die verwendeten Glasplatten wurden zunächst gereinigt und mit Ethanol (96%) entfettet. Nach dem Zusammenbau des Gelgießstands wurde zunächst das 12%ige Trenngel (siehe Anhang) gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach ca. 45 min Polymerisation bei RT wurde das Wasser vollständig entfernt, das 4%ige Sammelgel (siehe Anhang) darauf gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach weiteren 30 min Polymerisation wurden die Gele gespült und anschließend bei 4 °C gelagert. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, wurde der Kamm gezogen, danach wurden die Gele erneut gespült und in die Gelkammer eingespannt.

8.1.3 Probenvorbereitung und Start der Elektrophorese

Es wurde TS entsprechend 7 µg Chlorophyll (ca. 2 µg Protein) entnommen und entweder direkt in Denaturierungs- (Denat-) Puffer (Roti Load1, Firma Roth) aufgenommen, oder durch die Zugabe von 1 ml 100%igem, eiskaltem Aceton und einer mindestens einstündigen Lagerung bei -20 °C die Proteine gefällt. Anschließend wurden die gefällten Komponenten abzentrifugiert (Hettich Mikro 12-24, 70% der Geschwindigkeit, RT), der grüngefärbte Überstand verworfen und das Pellet mit 100%igem Aceton gewaschen. Nach der Trocknung des Pellets wurde es mit Denat-Puffer versetzt und resuspendiert. Außerdem wurden auch Markerproteine (Marker 4+5, Firma Serva) mit Denaturierungspuffer versetzt (Endkonzentration = 1 mg Protein/ml) und resuspendiert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Thylakoidproteine, sowie der Markerproteine durch eine mindestens 15 minütige Inkubation bei 70 °C. Danach wurden die Proteinproben kurz auf Eis abgekühlt, um eine Rückfaltung der Proteine zu vermeiden und mindestens 5 min abzentrifugiert (maximale Geschwindigkeit, 4 °C, Centrifuge 5415C, Firma Eppendorf). Der klare Überstand der Proben sowie der Marker konnte dann mit Hilfe einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei 120V und RT mit einer Laufzeit von ca. 2,5 h durchgeführt.

8.1.4 Anfärben der Proteinbanden

Um die mit Coomassie Gele anfärben zu können, musste zunächst das SDS durch Waschen in H₂O_{dest} (3x 5 min) entfernt werden. Dann wurde das Gel über Nacht auf einem Schüttler

(Mini-shaker, Modell Kühner, Firma Braun Melsungen, BRD) in die Färbelösung Roti-Blue (Firma Roth) gelegt und danach solange in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ entfärbt, bis nur noch ein minimaler Hintergrund vorhanden war. Eine Aufbewahrung der Gele erfolgte bei 4 °C, nachdem sie mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ in Folie eingeschweißt wurden.

Für eine Silberfärbung wurde der Kit 35076 (Firma Serva) verwendet und es wurde streng nach der entsprechenden Anleitung verfahren. Eine Aufbewahrung der Gele erfolgte bei 4 °C, nachdem sie in Glycerin (2% w/v) in Folie eingeschweißt wurden.

8.2 Nachweis der Diatoxanthin-Epoxidase durch Western-Blotting

8.2.1 Theoretische Grundlagen des Western-Blottings

Elektrophoretisch getrennte Proteine werden bei Western-Blotting unter dem Einfluss eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes von der Polyacrylamidmatrix auf eine inerte Membran (hier Nitrocellulose) transferiert und immobilisiert. Dort können sie dann immunologisch nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte in zwei Schritten. Zuerst bindet ein spezifischer Antikörper an das zu untersuchende Protein bevor dieses durch die Bindung eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht werden kann. Der sekundäre Antikörper erkennt eine konstante Region des primären Antikörpers und ist meist gekoppelt mit einem Enzym, das eine spezifische Farbreaktion oder auch Chemilumineszenz ermöglicht.

Zur Detektion der Diatoxanthin-Epoxidase wurde ein polyklonales Antiserum gegen eine Konsensussequenz aus den drei verschiedenen cDNA-Sequenzen aus Kaninchen (Firma Coring System Diagnostix GmbH) verwendet. Die Aminosäuresequenz des Peptids lautete: MMPNLGQGGCQAIED.

8.2.2 Durchführung des Western-Blottings

Der Transfer wurde nach Towbin et al. (1979) durchgeführt. Vor dem Transfer wurde die Nitrocellulosemembran sowie das Gel für 30 min in Transferpuffer (Towbin-Puffer, siehe Anhang) äquilibriert. Außerdem wurden 3 Filterpapiere, die etwas größer als die Membran und das Gel waren, sowie 3 Filterpapiere die exakt die Größe des Gels hatten, in Transferpuffer gelegt. Für den Transfer nach dem Prinzip des Semi-Dry-Blottings wurde ein Sandwich aus den 3 großen Filterpapieren, der Membran, dem Gel und den 3 kleinen Filterpapieren auf der Anode der Blotting-Apparatur (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Firma BioRad) aufgebaut, die Kathode aufgelegt und die Apparatur verschlossen. Der Transfer wurde durch Anlegen einer Spannung von 15 V für 60 min durchgeführt.

Nach dem Transfer wurden zunächst die Proteine reversibel durch Einlegen der Membran für 5 min in Ponceau S (siehe Anhang) angefärbt, die Marker mit einem Stift markiert und anschließend die Membran mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gespült. Bei Bedarf konnte an dieser Stelle die Membran getrocknet, evt. gescannt und anschließend bis auf weiteres dunkel gelagert werden. Für den Nachweis der Dtx-Epoxidase wurde die Membran für 1 h auf einem Schüttler (Minishaker, Modell Kühner, Firma Braun Melsungen, BRD) bei RT in Blocking-Lösung, entweder mit BSA als Blocking Protein (siehe Anhang) oder mit einem Blocking-Reagenz auf Polymerbasis (Roti-Block, Firma Roth) gelegt. Nach Waschen (3 x 5 min in Waschlösung (siehe Anhang), RT) wurde die Membran für 3 h in primärem Antiserum (1:250 entweder in Waschlösung oder in Roti-Block verdünnt), Präimmunserum (1:250 entweder in Waschlösung oder in Roti-Block verdünnt) bzw. gereinigtes Antiserum (1:166,67 entweder in Waschlösung oder in Roti-Block verdünnt) inkubiert. Nach abermaligem Waschen (3 x 5 min in Waschlösung, RT) wurde die Membran für ½ h in sekundärem Antiserum (Sigma, Anti-Kaninchen, Alkalische-Phosphatase-Konjugat, 1:5000 verdünnt in Waschlösung oder in Roti-Block inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 5min in TBS bzw. TBST (siehe Anhang) gewaschen.

Zur Detektion wurde die Membran 1 min in Detektionspuffer für Alkalische Phosphatase (siehe Anhang) äquilibriert. Die Färbung erfolgte durch Zugabe von 1-2 ml BCIP/NBT-Fertiglösung (Firma Sigma) nach Augenmaß. Anschließend konnte die Membran getrocknet und bei 4 °C dunkel gelagert werden.

III ERGEBNISSE

1. Die Beziehung zwischen der Regulation der Epoxidasen, dem ΔpH und der Löschung der Chlorophyll-Fluoreszenz durch Zeaxanthin und Diatoxanthin

1.1 Die ΔpH -Abhängigkeit des Zx-abhängigen Quenchings

Das Versuchsobjekt *E. canadensis* zeichnet sich zunächst dadurch aus, dass das Quenching nur in der Antenne lokalisiert ist (Drumm, 2004). Außerdem bestehen die Blätter dieser Wasserpflanze nur aus zwei Schichten, was sie für Reagenzien genauso durchlässig macht, wie einzellige Algen. Dadurch ist eine schnelle Reaktion auf z.B. die Zugabe von Entkoppler möglich und nur so auch in vivo direkt messbar, was wiederum die Basis für die Analyse der Rolle des ΔpH in vivo ist. Bei der Berechnung des De-Epoxidierungsgrads werden die Xanthophylle Ax und Zx beide berücksichtigt, da schon Glimore und Yamamoto (1993) vorschlugen, dass Zx-unabhängiges Quenching durch den Gehalt an Ax zu erklären sei. Später konnten Goss et al. (1998) zeigen, dass bei der Alge *Mantoniella squamata*, deren Vx-Zyklus unvollständigen, nämlich nur bis Ax, abläuft dennoch ein starkes NPQ messbar ist, die Rolle von Zx also auch von Ax übernommen werden kann.

1.1.1 Analyse des Anteils an Zx-abhängigen Quenching

Zwar ist bekannt, dass *E. canadensis* ein reiner Antennenquencher ist, allerdings bleibt hierbei unklar, welcher Mechanismus hinter dem Quenching steht. Daher wurde zunächst der Anteil des Zx-abhängigen Quenchings bestimmt, indem die Vx-De-Epoxidase durch die Zugabe von DTT noch vor Beginn der Belichtung inhibiert wurde (Yamamoto und Kamite, 1972).

Die HL-Behandlung führt bei *E. canadensis* zu einem schnellen und starken Anstieg des NPQ (Abb. 3.1.1 a). Das Fehlen des NPQ nach der DTT-Zugabe (Abb. 3.1.1 a), sowie der unverändert niedrigen De-Epoxidierungsgrad (Abb. 3.1.1 b) zeigt, dass annähernd das gesamte NPQ abhängig vom Vx-Zyklus ist. Vergleicht man die Kinetiken der NPQ-Entwicklung und des De-Epoxidierungsgrads im HL ohne DTT, so sieht man, dass der De-Epoxidierungsgrad annähernd linear von 0,03 auf 0,64 ansteigt, innerhalb der 30 min HL. Auch der Anstieg des NPQ im HL ohne DTT verläuft annähernd linear von 0 auf 5,1 in 30 min.

In der anschließenden Dunkelphase war jedoch ein anderer Verlauf zu beobachten. Während der größte Teil des NPQ innerhalb von 1 min relaxiert war, sank der De-Epoxidierungsgrad

langsam von 0,64 auf 0,38 in 20 min. Das heißt, dass das Quenching trotz seiner Abhängigkeit von Z_x dem Einfluss einer weiteren Komponente unterliegt. Dieser Faktor muss sich beim Übergang von HL in eine Dunkelphase sehr schnell, nämlich innerhalb von 1 min verändern, weshalb an dieser Stelle vermutet wird, dass es sich hierbei um den ΔpH handelt.

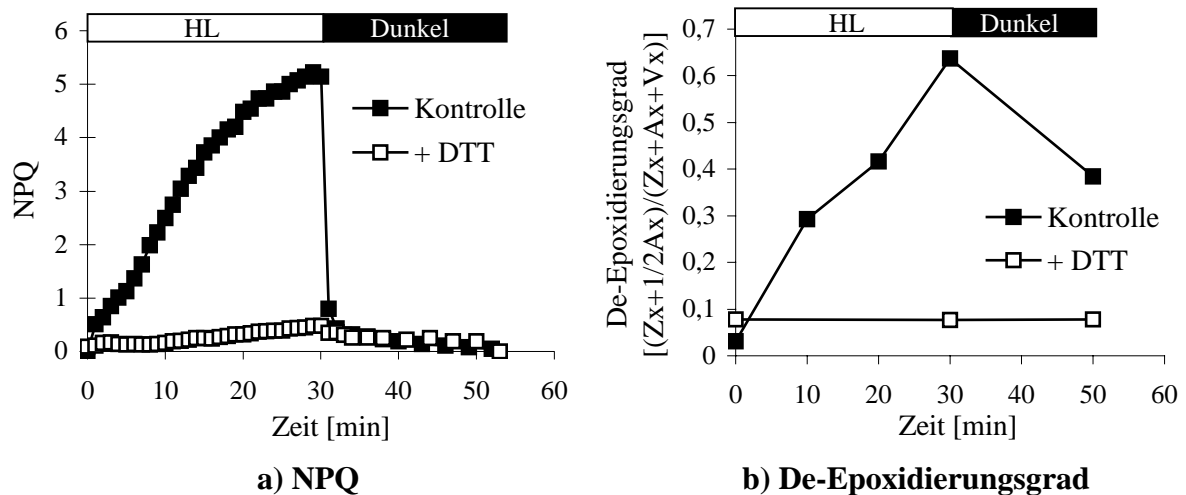


Abb. 3.1.1 a und b: Zeitlicher Verlauf des NPQ (a) und des De-Epoxidierungsgrads (b) mit und ohne 5 mM DTT bei *E. canadensis*.

Ohne DTT kommt es zum Aufbau eines hohen NPQ und De-Epoxidierungsgrad. Unter DTT findet keine De-Epoxidierung mehr statt und es wird nur ein sehr niedriges NPQ aufgebaut. DTT wurde 15 min vor Beginn der Belichtung zugegeben.

Um den Zusammenhang zwischen De-Epoxidierungsgrad und NPQ während der HL-Phase genauer zu analysieren, wurde in der folgenden Abbildung der De-Epoxidierungsgrad gegen das NPQ aufgetragen.

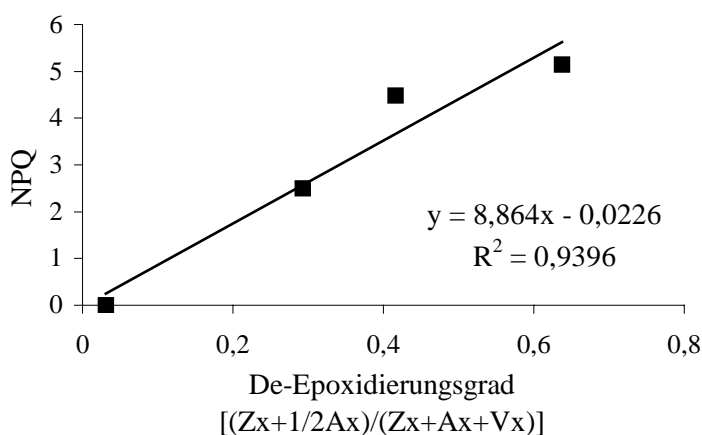


Abb. 3.1.2: Auftragung von NPQ gegen den De-Epoxidierungsgrad bei *E. canadensis*.

Es ist das NPQ gegen den De-Epoxidierungsgrad während der 30 min Belichtung bei *E. canadensis* aufgetragen. So ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von 0,94.

Das Ergebnis der Auftragung von NPQ gegen den De-Epoxidierungsgrad ist eine Gerade mit einem Bestimmtheitsmaß von ca. 0,94, was für einen ausgeprägten Zusammenhang zwischen NPQ und De-Epoxidierungsgrad, also für eine gute Korrelation spricht. Diese Gerade ist also ein weiteres Indiz dafür, dass der V_x -Zyklus für *E. canadensis* die einzige Möglichkeit der

HL-Adaptation darstellt. Die Frage ist, warum dieser Zusammenhang im Dunkeln offensichtlich nicht besteht, sondern nur im HL. Dieser Frage soll im Folgenden nachgegangen werden.

1.1.2 Analyse der Korrelation von NPQ, Zx und ΔpH

Um den Einfluss des ΔpH auf das NPQ zu untersuchen, wurde *E. canadensis* zunächst 30 min vorbelichtet und dann im HL durch die Zugabe von 5 mM NH_4Cl entkoppelt. Abb. 3.3 zeigt die Ergebnisse bezüglich des NPQ, sowie des De-Epoxidierungsgrads.

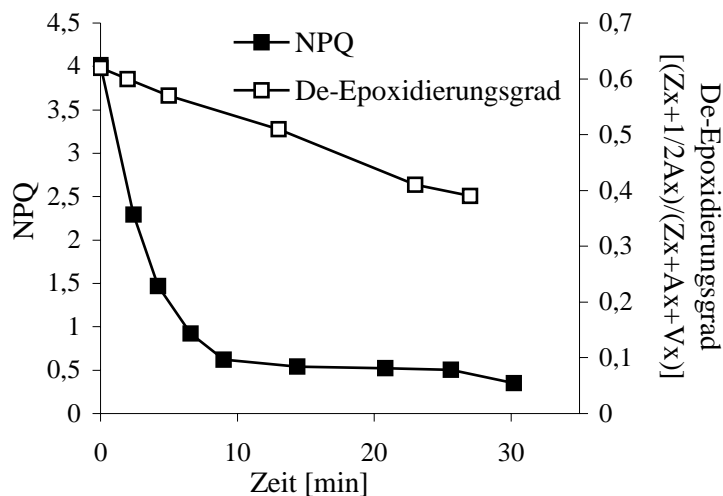


Abb. 3.1.3: Zeitlicher Verlauf des NPQ, sowie des De-Epoxidierungsgrads nach erfolgter Entkopplung im HL bei *E. canadensis*.

Die Entkopplung führt zu einem schnellen Rückgang des NPQ, aber nur zu einem sehr langsamen, linearen Rückgang des De-Epoxidierungsgrads.

Auch Abb. 3.1.3 verdeutlicht, dass die Kinetik der Veränderungen des NPQ unter Entkopplung im Vergleich zu der des De-Epoxidierungsgrads sehr viel schneller ist. Während das NPQ innerhalb von 10 min fast vollständig relaxiert war, sinkt der De-Epoxidierungsgrad langsam innerhalb von 20 min von 0,62 auf 0,39.

Da das NPQ nach erfolgter Entkopplung im HL innerhalb von 10 min fast vollständig relaxiert war, zeigt Abbildung 3.1.3, dass das NPQ stark vom ΔpH abhängt. Da die Abbildungen 3.1.1 und 3.1.2 aber zeigen, dass das NPQ zumindest im HL vollständig von dem De-Epoxidierungsgrad abhängt, konnte so gezeigt werden, dass bei *E. canadensis* zum Auf- und Abbau des NPQ der ΔpH in Verbindung mit einem hohen De-epoxidierungsgrad notwendig sind.

1.1.3 In *E. canadensis* konnte kein ausdauernder Teil des Quenching („sustained quenching“) gezeigt werden

Adams et al. (1995) berichten über einen Teil des Quenchings, dass unter extremen Bedingungen, in diesem Fall bei kälteadaptierten Blättern immergrüner Pflanzen, nach Starklichtlangzeitexpositionen auch im Dunkeln dauerhaft bestehen bleibt. Diese ausdauernde

Form des Quenching ging einher mit erhöhten Zx -Konzentrationen in den Blättern, was zu der Vermutung führte, dass es sich um Zx abhängiges NPQ handeln könnte. Später spekulierten Demmig et al. (1999), dass das Auftreten dieser Form des Zx -abhängigen, ausdauernden NPQ mit dem Phosphorylierungsgrad des LHC II zusammenhängt. Auch Ebbert et al. (2001) fanden Hinweise für eine Korrelation ausdauernder Formen Zx -abhängiger Dissipation und Thylakoidprotein-Phosphorylierungen. Damit müsste dieses Phänomen weit verbreitet sein unter den grünen Pflanzen, auch wenn Ebbert et al. zeigen konnten, dass der Grad der Phosphorylierung unterschiedlicher Thylakoidproteine in verschiedenen Pflanzen stark divergent sein kann.

Um zu untersuchen, ob eine solche Form des NPQ auch bei *E. canadensis* existiert, wurden nach 3 hintereinander folgenden sonnigen Tagen, mittags nach einem halben Tag vollem Sonnenlicht (entspricht einer PPFD von $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) Spitzen der Pflanzen gesammelt, 30 min dunkeladaptiert und anschließend eine PAM-Messung durchgeführt.

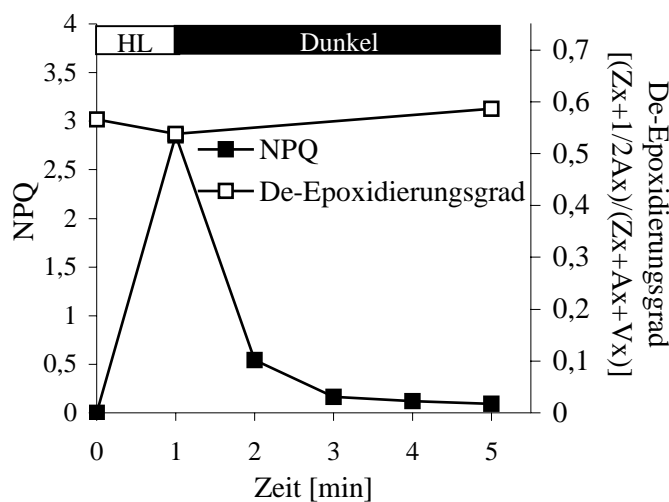


Abb. 3.1.4: Zeitlicher Verlauf des NPQ und des De-Epoxidierungsgrads nach einer HL-Adaptation bei *E. canadensis*.

Spitzen von *E. canadensis* wurden bis zum Mittag bei vollem Sonnenlicht (PPFD ca. $1600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) HL-adaptiert und anschließend 30 min wieder dunkeladaptiert. 92% des F_v/F_m war vor Beginn der Messung erholt, was für einen dunkeladaptierten Zustand spricht. Es ist im NPQ ein schneller Anstieg im HL und wieder ein schneller Rückgang im Dunklen zu sehen. Der De-Epoxidierungsgrad blieb dabei annähernd unverändert.

Die Abbildung 3.1.4 zeigt, dass die natürliche Starklichtlangzeitexposition bei vollem Sonnenlicht zu einem hohen De-Epoxidierungsgrad von 0,57 geführt hat. Durch die 30minütige Dunkelphase erholte sich F_v/F_m zu 92%, so dass die photochemische Effizienz wieder einen für *E. canadensis* normalen Wert von 0,79 erreichte. Eine ausdauernde Form des NPQ war also bei *E. canadensis* unter den gewählten Bedingungen nicht nachzuweisen.

Allerdings ist eine kurze Belichtungsphase von nur einer Minute ausreichend, um einen schnellen Anstieg zu einem sehr hohen NPQ von 2,9 zu induzieren. Diese schnelle Reaktion des NPQ ist bei dem hohen De-Epoxidierungsgrad auf den Aufbau des ΔpH bei Einschalten des Lichts zurückzuführen. Auch das Recovery des NPQ erfolgt mit Beginn der Dunkelphase innerhalb von wenigen Minuten mit vergleichbarer Geschwindigkeit, wie im HL. Dieses Phänomen wurde von Johnson et al. (1994) als Aktivierung von NPQ bezeichnet. Man kann

annehmen, dass diesem schnelleren Aufbau des NPQ in HL-adaptierten Blättern den Kinetiken der Veränderungen im ΔpH zu Grunde liegen, unabhängig von einer zusätzlichen V_x -De-Epoxidierung. Der schon zu Beginn der Messung hohe De-Epoxidierungsgrad blieb im Gegensatz zum NPQ über die gesamte Messung hinweg annähernd gleich.

1.2 Die fehlende, direkte ΔpH -Abhängigkeit des Diatoxanthin-abhängigen Quenchings

1.2.1 Das Quenching bei *P. tricornutum* und *P. parvum* beruht allein auf D_{tx}

Um den Anteil an D_{tx} -abhängigen NPQ festzustellen, wurden Algen 30 min in An- und Abwesenheit von DTT belichtet (PPFD = $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), und das NPQ sowie der De-Epoxidierungsgrad über die Zeit gemessen.

Abbildung 3.1.5 zeigt, dass bei beiden Algen im HL innerhalb von 30 min ein NPQ von 1,7 bei *P. tricornutum* und von 1 bei *P. parvum* aufgebaut wird. In der Dunkelphase geht dieses NPQ bei beiden Algenspezies wieder langsam zurück, bei *P. parvum* allerdings etwas schneller. Unter DTT dagegen entsteht im HL bei beiden Algen kein reversibles NPQ. Bei dem wenigen NPQ, das gebildet wird, handelt es sich also um qI, da es in der beobachteten Zeit von 40 bzw. 60 min nicht relaxierte.

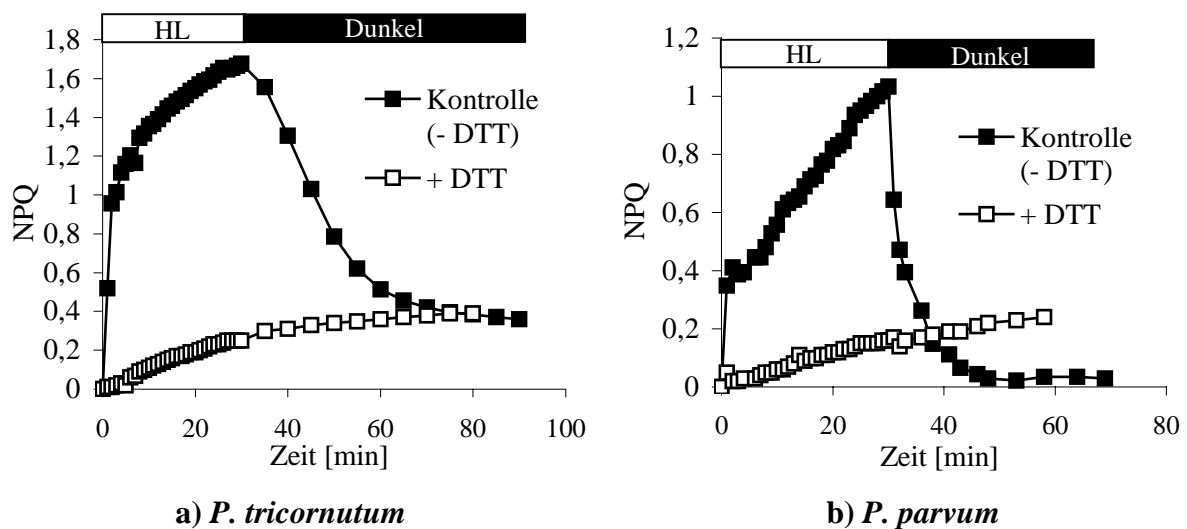


Abb. 3.1.5 a und b: Zeitlicher Verlauf des NPQ bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b) mit und ohne DTT.

Die Veränderungen im NPQ wurden während einer 30minütigen HL-Phase (PPFD = $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) und einer anschließenden Dunkelphase von 60 min (a) bzw. 40 min (b) beobachtet, mit und ohne 5 mM DTT vor Beginn der Belichtung. Mit DTT kommt es nur noch zum Aufbau eines nicht reversiblen NPQ, ohne DTT dagegen zu einem gleichmäßigen Anstieg im HL und einem Rückgang im Dunkeln.

Vergleicht man die Erholungskinetiken des NPQ im Dunkeln von *P. tricornutum* (Abb. 3.1.5 a) und *P. parvum* (Abb. 3.1.5 b) mit denen von *E. canadensis* (Abb. 3.1.1 a), so sieht man, dass sie deutlich langsamer sind. Um nun die Relevanz des D_{dx} -Zyklus für den Aufbau von

NPQ bei *P. tricornutum* und *P. parvum* herauszufinden wird unter den gleichen Bedingungen belichtet und es werden Proben zur Bestimmung des De-Epoxidierungsgrads gezogen.

Die in Abbildung 3.1.6 a und b dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es ohne DTT innerhalb von 30 min HL zur De-Epoxidierung von Ddx zu Dtx bis zu einem De-Epoxidierungsgrad von 0,55 (a) bzw. 0,49 (b) kommt. DTT inhibiert auch die Ddx De-Epoxidase (Olaziola et al., 1994), so dass der De-Epoxidierungsgrad über die gesamte Messung weitgehend unverändert blieb. Das heißt, dass es bei beiden Algen mit Ddx-Zyklus im HL nicht mehr zum Aufbau eines Dtx-abhängigen NPQ kommt, die HL-Anpassung bei *P. tricornutum* und *P. parvum* also vollständig vom X-Zyklus abhängt (Abb. 3.1.5 a und b und 3.1.6 a und b).

Beim Vergleich der Abbildungen 3.1.5 und 3.1.6 fällt außerdem auf, dass die Kinetiken von NPQ und De-Epoxidierungsgrad im HL und auch im Dunkeln einen ähnlichen Verlauf zu haben scheinen.

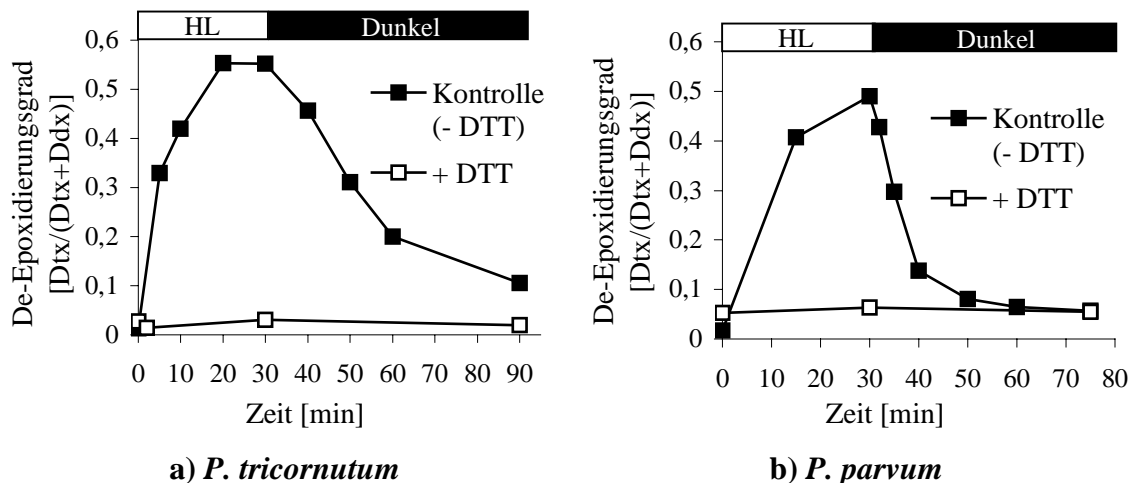


Abb. 3.1.6 a und b: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads mit und ohne DTT bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b).

Während der 30 minütigen HL-Phase ($PPFD = 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kommt es ohne DTT zu einem Anstieg des De-Epoxidierungsgrads, während der anschließenden Dunkelphase von 60 min (a) bzw. 45 min (b) sinkt der De-Epoxidierungsgrad wieder ab. Mit der Zugabe von DTT vor Beginn der Belichtung bleibt der De-Epoxidierungsgrad annähernd unverändert.

Um also den Zusammenhang zwischen den Veränderungen im NPQ und den Veränderungen im De-Epoxidierungsgrad genauer zu analysieren wurden beide Kurven gegeneinander aufgetragen und das Bestimmtheitsmaß (R^2) ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind die in Abbildung 3.1.7 a und b gezeigten Ursprungsgeraden mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,97 und einer Steigung von 2,9 bei *P. tricornutum* (a) und 0,99 bzw. 3,3 bei *P. parvum* (b). Diese beiden hohen Werte des Bestimmtheitsmaßes sprechen für eine Korrelation von NPQ und De-Epoxidierungsgrad bei *P. tricornutum* und bei *P. parvum* während der HL- und auch der Dunkelphase. Im Gegensatz

dazu war bei *E. canadensis* diese Korrelation von NPQ und De-Epoxidierungsgrad nur während der HL-Phase gegeben. Dass am Auf- und Abbau des NPQ, im Gegensatz zu *E. canadensis*, keine zusätzliche Komponente beteiligt ist, als die Veränderungen des De-Epoxidierungsgrads zeigt, dass Dtx auch im Dunkeln ein Quencher ist. Der ΔpH hat also bei diesen Algen mit Ddx-Zyklus im Gegensatz zu *E. canadensis* mit dem Vx -Zyklus keinen direkten Einfluss auf das Quenching durch den Quencher Dtx.

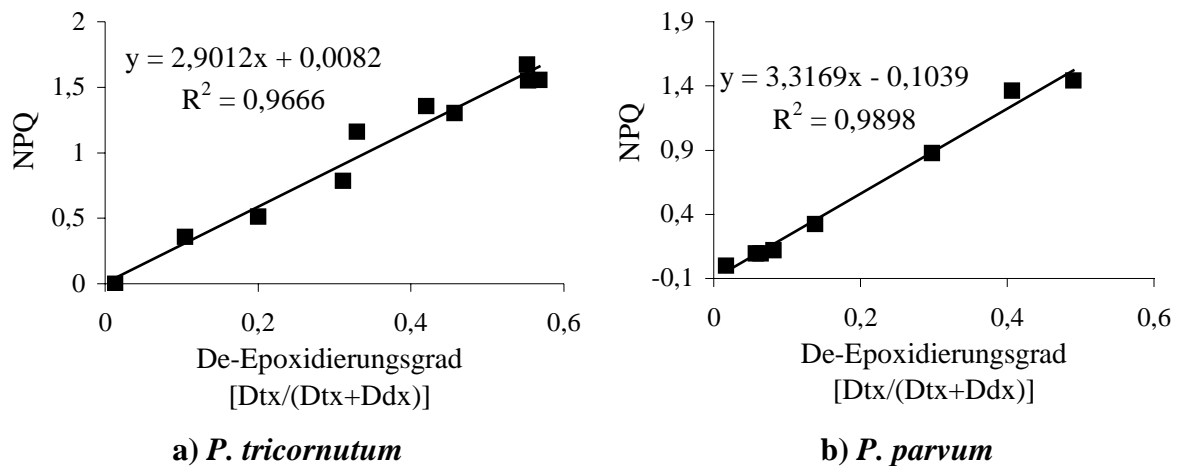


Abb. 3.1.7 a und b: Auftragung des NPQ gegen den De-Epoxidierungsgrad bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b).

Es ergibt sich jeweils eine Ursprungsgrade mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,97 bei *P. tricornutum* (a) und 0,99 bei *P. parvum* (b).

Um nun genauer zu überprüfen, ob Dtx unter Bedingungen mit und ohne ΔpH ein Quencher ist, soll die Epoxidierung im Dunkeln gehemmt werden, um dann das Recovery des NPQ beobachten zu können.

1.2.2 Das Recovery des NPQ ist durch die Hemmung der Dtx-Epoxidase ebenfalls inhibiert

Die Epoxidierung von Dtx lässt sich durch den Entzug des Cosubstrats Sauerstoff hemmen. Daher wurden Proben von *P. tricornutum* und *P. parvum* für 30 min belichtet, um Ddx zu Dtx zu de-epoxidieren. Während der letzten 10 min der HL-Phase und der ersten 10 min der anschließenden LL-Phase wurden die Proben dann mit Stickstoff durchperlt, um den Sauerstoff kurzzeitig zu entfernen. Es stellte sich dadurch im HL und auch in der anschließenden LL-Phase ein Gleichgewicht bei sehr niedrigem Sauerstoffgehalt ein. Die Erholung des NPQ und des De-Epoxidierungsgrads wurde wegen der besseren NADPH und Sauerstoffversorgung im LL gemessen. Auf Grund der durch eine bessere Cosubstratversorgung induzierten, höheren Epoxidierungsraten sollten etwaige Unterschiede

forciert und somit besser aufgelöst werden. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Auswirkungen des Sauerstoffentzugs auf das NPQ (Abb. 3.1.8) und den De-Epoxidierungsgrad (Abb. 3.1.9) jeweils bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b) im Vergleich zur Kontrolle mit Sauerstoff. Die NPQ-Werte während der LL-Recovery-Phase wurden auf den maximalen Wert am Ende der HL-Phase normiert, um kleine Unterschiede im HL-induzierten NPQ zwischen den einzelnen Proben zu korrigieren.

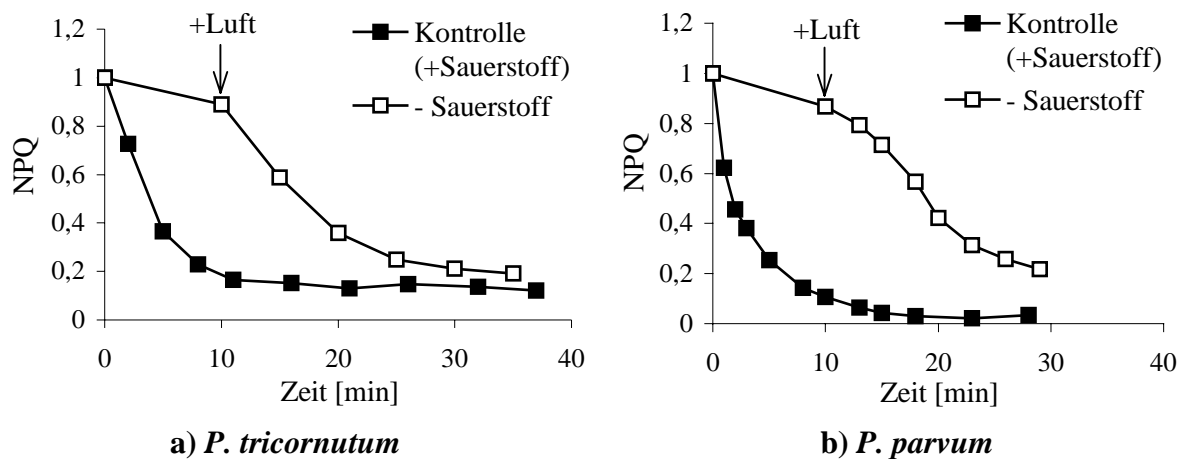


Abb. 3.1.8 a und b: Zeitlicher Verlauf des NPQ im LL mit und ohne Sauerstoff.

Der Sauerstoffentzug im LL (PPFD = 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) für 10 min nach einer 30minütigen HL-Phase (PPFD = 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) führt bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b) zu einem verzögerten Rückgang des NPQ. Die NPQ-Werte im LL wurden auf den maximalen Wert am Ende der HL-Phase normiert.

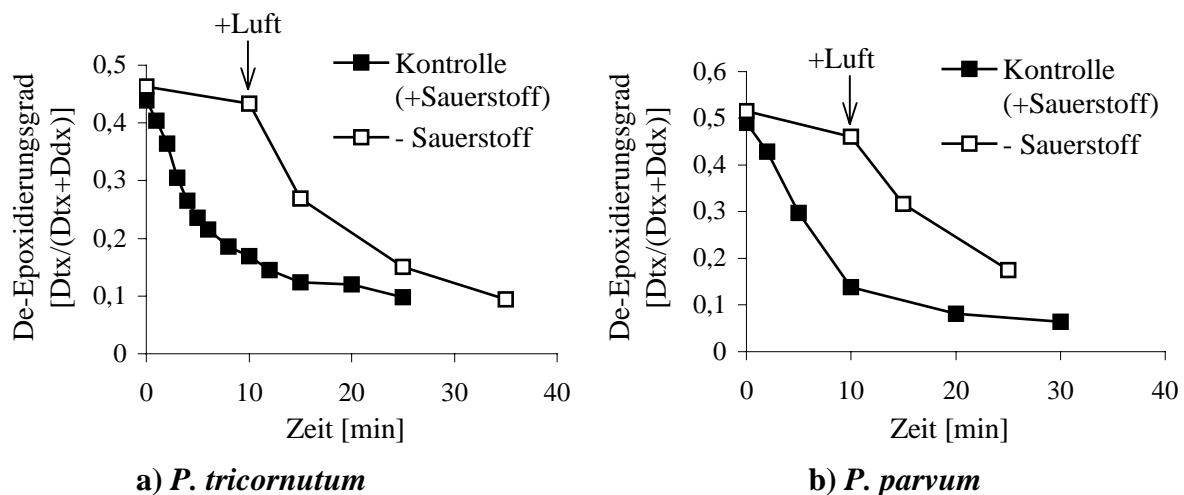


Abb. 3.1.9 a und b: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads im LL mit und ohne Sauerstoff bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b).

Der Sauerstoffentzug im LL (PPFD = 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) führt bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b) zu einem verzögerten Rückgang des De-Epoxidierungsgrads.

In den Abbildungen ist deutlich zu sehen, dass der Entzug von Sauerstoff bei *P. tricornutum* (a) und *P. parvum* (b) zu einer verzögerten Relaxation des NPQ (Abb. 3.1.8 a und b) und genauso auch des De-Epoxidierungsgrads (Abb. 3.1.9 a und b) führt, im Vergleich zu den

Kurven mit Sauerstoff. Der leichte Rückgang im NPQ und im De-Epoxidierungsgrad unter Sauerstoffentzug ist durch einen sehr niedrigen Rest an Sauerstoff zu erklären.

Bei Sauerstoffzufuhr im LL kommt es dann sofort zu einem schnellen Rückgang des NPQ (Abb. 3.1.8 a und b) und des De-Epoxidierungsgrads (Abb. 3.1.9 a und b), also zu einer Aufhebung der Hemmung der Dtx-Epoxidase. Daher verhindert die Hemmung der Dtx-Epoxidase durch den Entzug ihres Cosubstrats Sauerstoff auch die Relaxation des NPQ im LL.

Außerdem zeigen diese Abbildungen, dass der Verlust des ΔpH , der nach 10 min LL abgebaut ist, kein direktes Recovery des NPQ im LL zur Folge hat, wie das in Abb 3.1.3 für *E. canadensis* gezeigt werden konnte. Hier hat also der ΔpH keinen direkten Einfluss auf das NPQ. Wenn Dtx vorhanden ist, ist auch ein Dtx-abhängiges Quenching messbar, auch wenn aktuell dann kein ΔpH mehr vorliegt ist. Die in den ersten 10 min zu beobachtenden kleinen Veränderungen im NPQ und auch im De-Epoxidierungsgrad sind auf die geringen Mengen Sauerstoff zurückzuführen, die durch die weiterhin ablaufende Photosynthese in den Proben noch vorhanden waren.

2. In vivo Studien zur Regulation der Zx-Epoxidase im Vergleich zur Dtx-Epoxidase

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Zx nur in Gegenwart eines ΔpH zu einem Quenching führt, Dtx dagegen auch ohne einen bestehenden ΔpH ein Quenching verursacht. Für eine optimale Energieausbeute ist eine schnelle Anpassung der Pflanze bei dem Übergang von Starklicht zu Schwachlicht essentiell. Bei Pflanzen mit Vx-Zyklus ist eine schnelle Anpassung durch den ΔpH gewährleistet. Doch wie ist eine schnelle Anpassung der Pflanzen mit Ddx-Zyklus gesichert?

2.1 Die fehlende Regulation der Zx-Epoxidase

Die folgenden Abbildungen zeigen die Epoxidierungsreaktionen der Zx-Epoxidase unter wechselnden Lichtbedingungen, sprich bei HL, im LL bzw. im Dunkeln. Da im letzten Kapitel gezeigt werden konnte, dass das NPQ bei *E. canadensis* unter Entkopplung innerhalb kürzester Zeit vollständig zurück geht, sich der De-Epoxidierungsgrad aber nur sehr langsam verändert, soll hier an unterschiedlichen Organismen überprüft werden, ob es sich bei dieser Tatsache um ein allgemeines Phänomen der Pflanzen mit Vx-Zyklus handelt. Daher wurden die Epoxidierungsreaktionen der Zx-Epoxidase auch im HL unter zusätzlicher Entkopplung beobachtet.

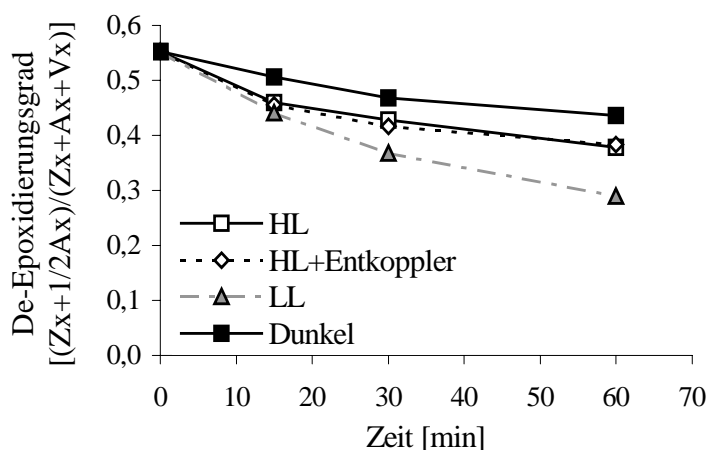


Abb. 3.2.1: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads bei *S. vacuolatus* im HL, im HL unter zusätzlicher Entkopplung, im LL und im Dunkeln.

Die Zellen wurden vorher für 30 min mit HL ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) belichtet, wodurch die De-Epoxidierungsreaktion ablaufen konnte. Allen Proben wurde am Ende der Vorbelichtung DTT zur Hemmung der Vx De-Epoxidase zugesetzt.

Die Kurven fallen, ausgehend von einem hohen De-Epoxidierungsgrad von 0,55 nach der Vorbelichtung, stetig und gleichmäßig langsam über die gemessenen 60 min. Die Epoxidierungsraten im HL und im HL unter Entkopplung verlaufen mit gleicher Kinetik. Die unveränderten Umsatzraten unter entkoppelten Bedingungen im HL zeigen deutlich, dass der ΔpH keinen Einfluss auf die Aktivität der Zx-Epoxidase hat. Im LL kommt es zu einer leichten Erhöhung der Epoxidierungsraten, während im Dunkeln ein niedrigerer Umsatz zu

sehen ist. Diese Abweichung ist mit der Verfügbarkeit der Cosubstrate NADPH und O₂ der Zx-Epoxidase zu erklären, da diese, auf Grund der fehlenden Photosynthese im Dunkeln nicht mehr gebildet werden.

Als weiteres Versuchsobjekt mit Vx-Zyklus diene *H. carterae*. Sie ist deshalb von Interesse, da sie mit ihren Pigmenten Chl a/c und Fx eher den Kieselalgen und *P. parvum* entspricht, allerdings nicht den Ddx-Zyklus besitzt.

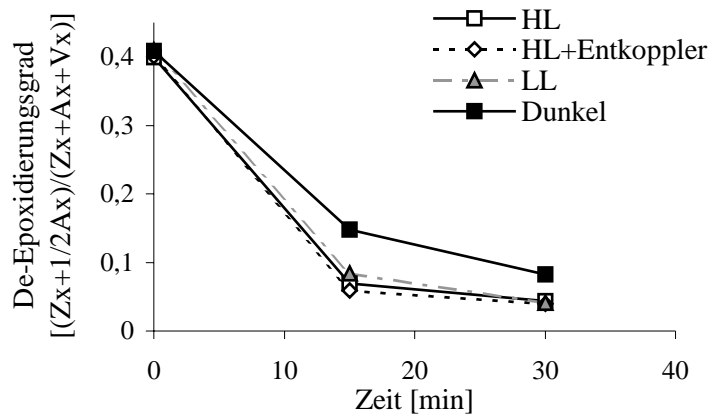


Abb. 3.2.2: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads bei *H. carterae* unter DTT im HL, im HL unter zusätzlicher Entkopplung, im LL und im Dunkeln.

Die Zellen wurden vorher für 30 min mit HL (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) belichtet, wodurch die De-Epoxidierungsreaktion ablaufen konnte. Allen Proben wurde am Ende der Vorbelichtung DTT zur Hemmung der Vx-De-Epoxidase zugesetzt.

Der durch die Vorbelichtung erzielte De-Epoxidierungsgrad von 0,4 ist etwas niedriger im Vergleich zu *S. vacuolatus*. Um diesen De-Epoxidierungsgrad zu erreichen ist auch eine höhere Lichtintensität (PPFD = 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nötig. Wie auch bei *S. vacuolatus* verlaufen die Epoxidierungskinetiken unter den oben genannten Bedingungen gleichmäßig und nur im Dunkeln etwas langsamer. Es ist also auch in dieser Abbildungen kein Unterschied zwischen der Geschwindigkeit der Epoxidierung im HL und unter zusätzlicher Entkopplung zu sehen. Allerdings wurden bei *H. carterae* mit einer Differenz von ca. 0.35 in nur 15 min sehr viel höhere Umsatzraten beobachtet, als bei *S. vacuolatus*. Der Versuch wurde daher auch schon nach 30 min Epoxidierung abgebrochen.

Obwohl in Kapitel 1 schon der Verlauf des De-Epoxidierungsgrads im HL unter zusätzlicher Entkopplung bei *E. canadensis* gezeigt wurde, soll diese Kurve hier im Vergleich zum Verlauf des De-Epoxidierungsgrads im HL noch einmal in einem Diagramm dargestellt werden. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich, um besser analysieren zu können, ob der ΔpH auf die Zx-Epoxidase in *E. canadensis*, also in einer Höheren Pflanze, einen Einfluss hat oder nicht. Da in den beiden vorherigen Abbildungen schon gezeigt werden konnte, dass im Dunkeln die Epoxidierungsraten leicht limitiert sind und im LL ungefähr genauso verlaufen, wie im HL, wird hier auf die Darstellung der Kurven unter diesen beiden Bedingungen verzichtet.

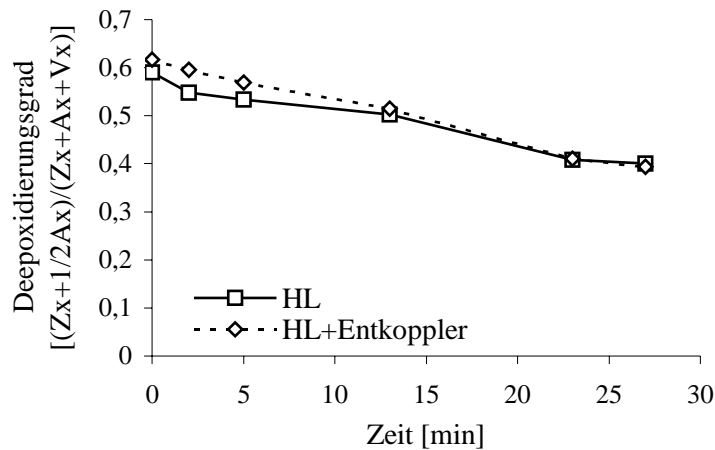


Abb. 3.2.3: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads bei *E. canadensis* unter DTT im HL und im HL unter zusätzlicher Entkopplung.

Spitzen der Pflanzen wurden vorher für 30 min mit HL ($1450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) belichtet, wodurch die De-Epoxidierungsreaktion ablaufen konnte. Den Proben wurde am Ende der Vorbelichtung DTT zur Hemmung der Vx-De-Epoxidase zugesetzt.

Auch diese Abbildung zeigt deutlich den gleichmäßigen Verlauf der Epoxidierung im HL und im HL unter zusätzlicher Entkopplung. Das bedeutet, dass auch in der Höheren Pflanze *E. canadensis* der ΔpH keinen hemmenden Einfluss auf die Zx-Epoxidase hatte. Die Umsatzraten waren hier mit einer Differenz von 0,2 in 27 min allerdings wieder deutlich niedriger, als in *H. carterae*.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass die Abbildungen 3.2.1 bis 3.2.3 im Vergleich eindeutig zeigen, dass die Umsatzraten der Zx-Epoxidase unter fast allen gemessenen Bedingungen annähernd konstant bleiben. Ein signifikanter Unterschied der Umsatzraten ist nur im Dunkeln zu sehen, da die Zx-Epoxidase unter diesen Bedingungen limitiert ist, auf Grund eines Mangels ihrer Cosubstrate NADPH und O_2 (Hager, 1967; Hager, 1975). Es war also keine signifikante Reaktion der Zx-Epoxidase auf die Entkopplung der Thylakoidmembran zu beobachten. Folglich ist die Zx-Epoxidase kein ΔpH -reguliertes Enzym.

H. carterae nimmt im Vergleich zu *S. vacuolatus* und *E. canadensis* eine Sonderstellung ein: obwohl *H. carterae* Fx und Chl a/c als Lichtsammelpigmente enthält, also als braun gefärbte Alge optisch eher den Algen mit Ddx-Zyklus entspricht, besitzt sie doch den Vx-Zyklus. An dieser Stelle wird also deutlich, dass in alle Organismen mit Vx-Zyklus, unabhängig von ihrer übrigen Pigmentierung, die Zx-Epoxidase nicht durch den ΔpH reguliert wurde.

Die Unterschiede in den gemessenen Umsatzraten können einerseits mit der Bedeutung des X-Zyklus für den jeweiligen Organismus, andererseits auch mit der Pigmentierung zusammenhängen. Auf diesen Sachverhalt soll in der Diskussion unter Punkt 3 noch weiter eingegangen werden.

2.2 Die Δ pH-Regulation der Diatoxanthin-Epoxidase

Die folgenden Abbildungen zeigen die Epoxidierungsreaktionen der Dtx-Epoxidase ebenfalls unter wechselnden Lichtbedingungen, sprich bei HL, im LL bzw. im Dunkeln.

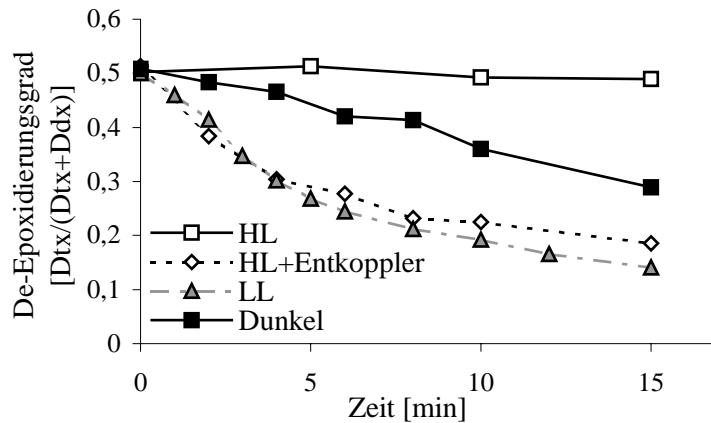


Abb. 3.2.4: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads bei *P. tricornutum* im HL, im HL unter zusätzlicher Entkopplung, im LL und im Dunkeln.

Die Zellen wurden vorher für 30 min mit HL ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) belichtet, wodurch die De-Epoxidierungsreaktion ablaufen konnte. Allen Proben wurde am Ende der Vorbelichtung DTT zur Hemmung der Ddx De-Epoxidase zugesetzt.

Unter fast allen gewählten Bedingungen fallen die Kurven stetig ab, allerdings mit signifikant unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Während im HL kaum Epoxidierung messbar ist, führt die zusätzliche Entkopplung im HL zu einer starken Beschleunigung und somit zu beinahe maximalen Umsatzraten. Die Dtx Epoxidierung im LL, als die Nachahmung des natürlichen Wechsels der Lichtintensitäten, läuft mit leicht erhöhter Geschwindigkeit ab, wie unter Entkopplung, also mit maximalen Umsatzraten. Ein kleiner Unterschied liegt allerdings darin, dass am Anfang im LL eine kurze Lag-Phase zu beobachten ist, an die sich eine Phase höchster Geschwindigkeit anschließt. Unter Entkopplung fehlt diese Lag-Phase völlig. Im Dunkeln lief zwar eindeutig eine Epoxidierung ab, jedoch langsamer als im LL oder unter Entkopplung im HL. Daher ist die Dtx Epoxidierung im Dunkeln, wie auch die Zx-Epoxidase des Vx-Zyklus, offensichtlich limitiert durch den Mangel an NADPH und O_2 .

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Dtx-Epoxidierung bei *P. tricornutum* und der Zx-Epoxidierung der bisher untersuchten Chl a/b-haltigen Organismen liegt in der erhöhten Geschwindigkeit der Reaktion (vgl. Abb. 3.2.4 mit Abb. 3.2.1 und Abb. 3.2.2). Im LL sinkt der De-Epoxidierungsgrad innerhalb von nur 15 min von 0,5 auf 0,14.

Bei der Haptophyte *P. parvum* (Abb. 3.2.5) fielen, wie auch bei *P. tricornutum* (Abb. 3.2.4), die Kurven stetig ab, ebenfalls mit deutlich unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Während HL die Epoxidierung signifikant hemmte, führte eine Entkopplung auch hier zu einer deutlichen Steigerung der Epoxidierung im Gegensatz zu HL alleine. Die Epoxidierung im LL zeigte hier die maximalen Umsatzraten, während im Dunkeln wieder die gleiche Limitierung zu sehen war, wie bei allen anderen bisher gezeigten Organismen auch. Dass in diesem Fall

die Umsatzraten unter Entkopplung im HL eher denen im Dunkeln als denen im LL entsprechen liegt daran, dass *P. parvum* nicht vollständig entkoppelt war, also zumindest noch ein kleiner ΔpH vorhanden war. Dieser reichte offensichtlich aus, um die Dtx-Epoxidase teilweise zu hemmen. Die Epoxidierung scheint bei dieser Alge allerdings nicht die gleiche, hohe Geschwindigkeit zu haben, wie bei *P. tricornutum*, allerdings im LL mit einem Umsatz von 0,53 auf 0,14 in 30 min immer deutlicher höher, als bei den Chl a/b-haltigen Organismen *S. vacuolatus* und *S. oleraceaea*.

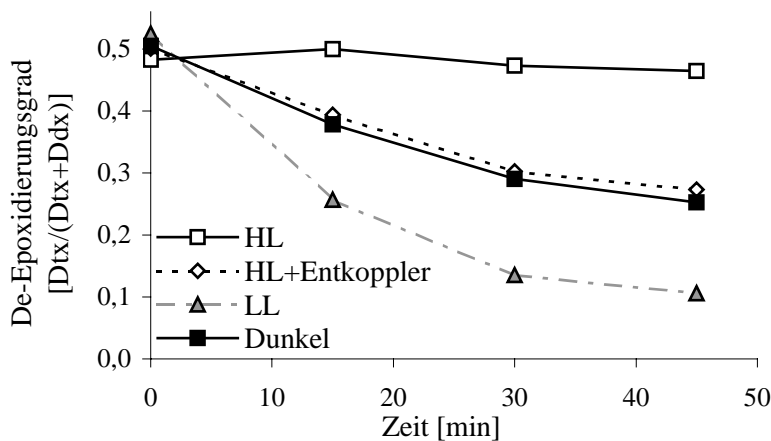


Abb. 3.2.5: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads bei *P. parvum* im HL, im HL unter zusätzlicher Entkopplung, im LL und im Dunkeln.

Die Zellen wurden vorher für 30 min mit HL ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) belichtet, wodurch die De-Epoxidierungsreaktion ablaufen konnte. Allen Proben wurde am Ende der Vorbelichtung DTT zur Hemmung der Ddx De-Epoxidase zugesetzt.

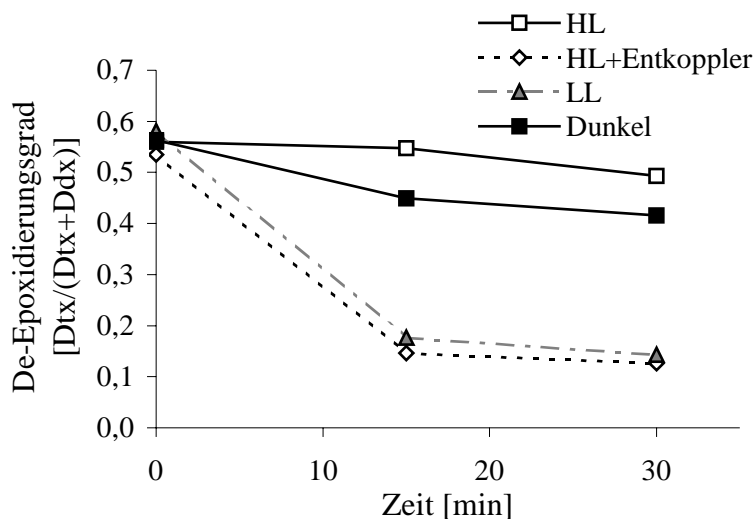


Abb. 3.2.6: Zeitlicher Verlauf des De-Epoxidierungsgrads bei *C. meneghiniana* im HL, im HL unter zusätzlicher Entkopplung, im LL und im Dunkeln.

Die Zellen wurden vorher für 30 min mit HL ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) belichtet. Allen Proben wurde am Ende der Vorbelichtung DTT zur Hemmung der Ddx De-Epoxidase zugesetzt.

Die Kurven der Kieselalge *C. meneghiniana* in Abbildung 3.2.6 zeigen den gleichen grundsätzlichen Verlauf, wie für die Abbildungen 3.2.4 und 3.2.5 beschrieben. Wie auch bei *P. tricornutum* und *P. parvum* zeigt die Abbildung dieser Kieselalge eine klare Hemmung der Dtx Epoxidierung im HL, während die zusätzliche Entkopplung diese Hemmung aufhebt und so hier zu maximalen Umsatzraten führt. Im LL findet wieder eine ähnlich schnelle Epoxidierung statt, wie unter Entkopplung im HL, so dass nach 15 min schon der größte Teil des Dtx wieder epoxidiert war. Auch hier war im Dunkeln die Dtx-Epoxidase limitiert durch

den Mangel an ihren Cosubstraten NADPH und O₂. Die Geschwindigkeit der Epoxidierung im LL ist bei *C. meneghiniana* mit einem Umsatz von 0,58 auf 0,18 in 15 min vergleichbar mit den beiden anderen Algen mit Ddx-Zyklus und deutlich schneller als die Reaktion der Chl a/b-haltigen Pflanzen mit Vx-Zyklus.

Die hier gezeigten Organismen mit Ddx-Zyklus zeigen alle eine grundsätzlich gleiche Reaktion auf den Wechsel der Lichtbedingungen. Zusammenfassend kann man sagen, dass HL die Dtx-Epoxidase hemmt, im LL, als die natürliche und damit relevante Bedingung, jedoch sehr hohe, teils maximale Umsatzraten zu messen sind. Im Dunkeln ist ein Mangel an Cosubstraten vermutlich der Grund für die vergleichsweise niedrigen Umsatzraten. Dass die Entkopplung im HL die HL-Hemmung der Dtx-Epoxidase aufhebt (zumindest teilweise bei *P. parvum*, vgl. Abb. 3.2.5) zeigt, dass der ΔpH an dem Mechanismus der HL-Hemmung beteiligt sein muss, also zumindest das Signal für die Notwendigkeit der Herabregulierung der Dtx-Epoxidase darstellt.

2.3 Die Hemmung der Dtx-Epoxidase durch die Hemmung von Phosphatasen

Da der ΔpH direkt mit dem ATP/ADP-Verhältnis zusammenhängt, wäre eine Regulation über Phosphorylierung und Dephosphorylierung denkbar. Da es auch Berichte gibt (Xu et al., 1999), dass die Zx-Epoxidierung in Reisblättern durch die Hemmung von Chloroplasten-Phosphatasen durch eine Inkubation mit NaF zu verzögern sei, soll dies bei *P. tricornutum* in vivo getestet werden.

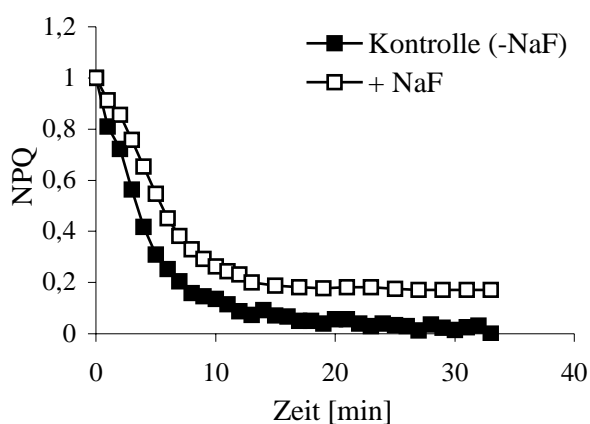


Abb. 3.2.7: Hemmung der Epoxidierung in vivo bei *P. tricornutum* durch NaF

Die Kurven wurden auf den maximalen Wert des NPQ nach einer 30minütigen HL-Phase normiert. Das Recovery des NPQ ist unter NaF leicht verzögert. Das NPQ erreicht daher am Ende der Erholung einen um 18% niedrigeren Wert gegenüber dem NPQ ohne NaF.

Aus Abbildung 3.2.7 wird deutlich, dass die Hemmung von Phosphatasen in vivo zu einer leichten Hemmung (18%) der Epoxidierungsreaktion führt. Allerdings ist dieses Ergebnis nur unter Vorbehalt zu betrachten, da längere Inkubationszeiten und höhere Konzentrationen von NaF eine normale Fluoreszenzinduktion verhinderten, da die variable Fluoreszenz Fv bis auf

0 zurückging. Hinzu kommt, dass es zu einer Aggregation der Zellen kam, was als Schutzreaktion gedeutet werden kann.

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass in der Photosyntheseregulation an verschiedenen Stellen Phosphatasen involviert sind. Daher kann nicht eindeutig entschieden werden, ob die Verlangsamung des Recoverys wirklich auf eine Hemmung der Dtx-Epoxidase auf Grund einer gehemmten Dephosphorylierung zurück zu führen ist. Der Rückgang von Fv nach längerer NaF-Inkubation kann auch ein Hinweis auf eine allgemeine Schädigung des Photosyntheseapparates sein.

3. Die Charakterisierung der Diatoxanthin-Epoxidase in einem *in vitro* System

3.1 Die Stabilität der isolierten Thylakoide bei *P. tricornutum*

Die Fähigkeit einen ΔpH aufzubauen wird bei Thylakoiden oft als Qualitätsmerkmal angesehen. Da die aus *P. tricornutum* isolierten Thylakoide dies aber nicht können, wurde über sieben Tage hinweg die photosynthetische Aktivität gemessen, da die Elektronentransportrate auf Grund der Komplexität der Elektronentransportkette ebenfalls als Maßstab für die Qualität der Thylakoide dient.

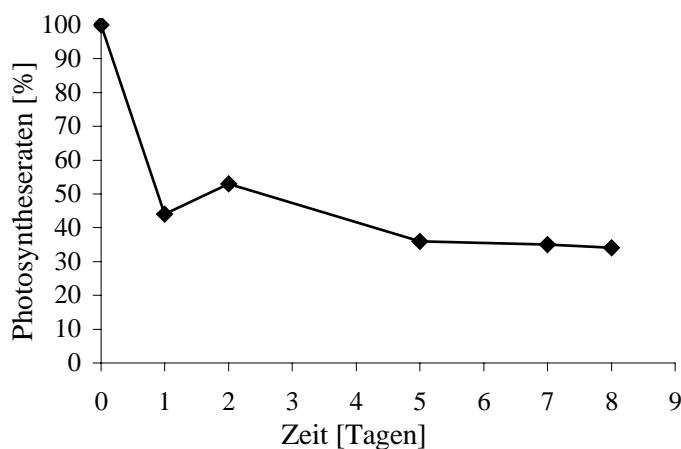


Abb. 3.3.1: Photosynthetische Aktivität von Thylakoiden aus *P. tricornutum* im Verlauf von einer Woche bei einer Lagerung bei 0°C. Am ersten Tag zeigten die Thylakoide mit einer O_2 -Produktion von $135 \text{ mol } O_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$ eine hohe Aktivität. Nach einem Tag ist die Aktivität auf ca. 50% gesunken, nimmt dann aber im Verlauf der folgenden Tage nur noch in kleinen Schritten ab, bis auf 34% nach 8 Tagen.

In Abbildung 3.3.1 ist zu sehen, dass innerhalb von 24 h die photosynthetische Aktivität der Thylakoide um ca. 50% abnahm, nach einer Woche jedoch noch eine Aktivität von ca. 34% vorhanden war, auch wenn sie stetig abnahm. Da bei allen folgenden Versuchen nur Thylakoide eingesetzt wurden, die noch am selben Tag isoliert wurden, ist davon auszugehen, dass trotz der fehlenden Entkoppelbarkeit die Qualität kontinuierlich hoch war.

3.2 Die Abhängigkeit der Diatoxanthin-Epoxidase vom pH-Wert und von ihren Cosubstraten bei *P. tricornutum*

Um ein stabiles Testsystem entwickeln zu können, musste zunächst getestet werden, in welchem pH-Bereich das Enzym seine maximale Aktivität hat und welche Cosubstrate umgesetzt werden. Außerdem ist auch wichtig, welche Menge an Cosubstrat zugegeben werden muss, um eine Cosubstratlimitierung während der Messung zu verhindern. Daher wurden zunächst isolierte Thylakoide für 10 min in Epoxidierungs-Reaktionsmedium, das auf einen pH-Wert zwischen 5 und 11,5 eingestellt wurde inkubiert, um danach in dem selben Medium die *in vitro* Epoxidierung durchzuführen. Alle folgenden *in vitro* Epoxidierungen wurden bei einem Chlorophyllgehalt von 0,14 mg/ml durchgeführt, da ein veränderter Chlorophyllgehalt auch zu einer anderen Konzentration an Enzym führen würde.

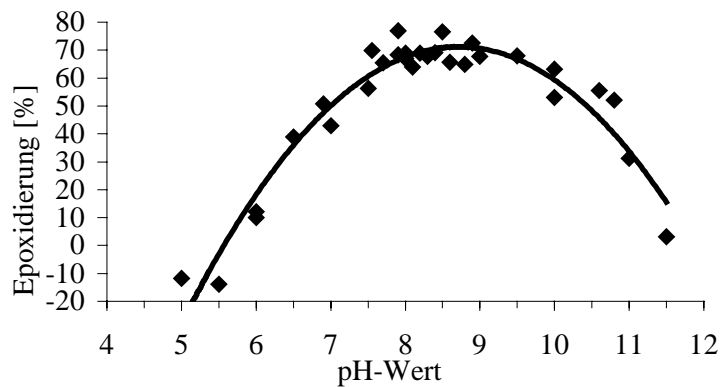


Abb. 3.3.2: pH-Optimumskurve der Dtx-Epoxidase.

Die isolierten Thylakoide wurden für 10 min in Epoxidierungs-RM, das auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt wurde inkubiert und anschließend eine *in vitro* Epoxidierung mit einer Reaktionszeit von 30 min durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.3.2 zu sehen ist, zeigt die Dtx-Epoxidase ein breites pH-Optimum von pH 7,5 bis pH 9,5. Im alkalischen Milieu ist bei pH 11,5 fast keine Pigmentumsetzung mehr messbar. Unterhalb eines pH-Werts von ca. 5,6 findet nicht nur keine Epoxidierung mehr statt, sondern der De-Epoxidierungsgrad steigt sogar. Ob es sich hierbei um eine De-Epoxidierung von Dtx handelt ist fraglich, da dem Medium kein Ascorbat zugesetzt wurde. Allerdings könnte es sich auch um Pigmentabbau auf Grund des sauren Milieus handeln.

Analog zur Ddx-De-Epoxidase zeigt auch die Dtx-Epoxidase ein breites pH-Optimum. Es ist, wie das pH-Optimum der Ddx-De-Epoxidase im Vergleich zu den jeweiligen Enzymen des Vx-Zyklus ins basische verschoben. Diese pH-Optimumskurve kann also unter der Annahme, dass die Epoxidase auf der Stromaseite der Membran lokalisiert ist, die *in vivo* zu beobachtende Δ pH-Hemmung nicht erklären. Denn unter diesen Umständen wäre ein sehr scharfes Optimum zu erwarten, das nicht genau in dem pH-Bereich liegt, der für das Stroma im HL angenommen werden kann.

Um für die folgenden *in vitro* Epoxidierungen maximale Umsatzraten zu erhalten, wurde nach dem optimalen pH-Wert auch das Cosubstrat untersucht.

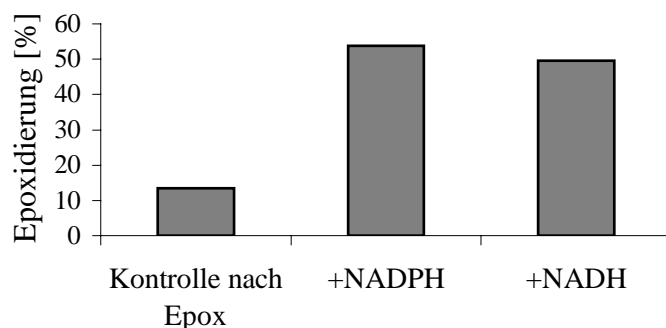


Abb. 3.3.3: Prozentuale *in vitro* Epoxidierungsraten in Abhängigkeit der Cosubstrate NADPH und NADH.

Ohne die Zugabe von NADPH oder NADH wurden nur 13% des Dtx umgesetzt. Zwischen NADPH und NADH ist der Unterschied sehr klein und kann als Streuung angesehen werden.

Es wird deutlich, dass zwar auch ohne die Zugabe eines Cosubstrats eine leichte Epoxidierung von Dtx in isolierten Thylakoiden ablief, jedoch ist diese Reaktion durch die Zugabe von NADH oder auch NADPH um ein Vielfaches zu steigern. Die schwache Reaktion auch ohne

extern zugegebenes Cosubstrat weist auf eine geringe Konzentration von NAD(P)H+H⁺ in der Thylakoidsuspension (TS) hin.

Mit NADH als Cosubstrat wurde anschließend eine Konzentrationsreihe aufgenommen, um spätere in vitro Epoxidierungen bei sättigenden Cosubstratkonzentrationen durchführen zu können.

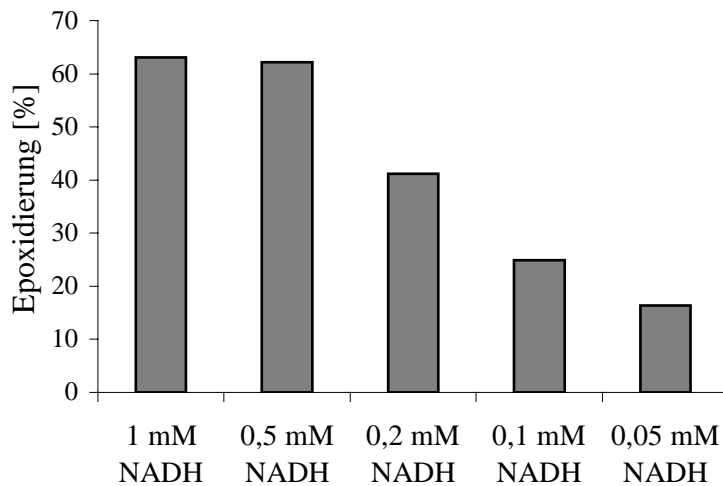


Abb. 3.3.4: Prozentuale in vitro Epoxidierungsraten bei unterschiedlichen NADH-Konzentrationen.

Ab einer Konzentration von 0,5mM NADH ist der Umsatz der Dtx-Epoxidase bei einem Chlorophyllgehalt von 0,14 mg/ml und 30 min Reaktionszeit nicht mehr zu steigern.

Da über die Zx-Epoxidase berichtet wurde, dass nicht NADPH sondern Fd das eigentliche Cosubstrat wäre (Bouvier et al., 1996), wurden Vergleichsmessungen mit NADH alleine und mit der zusätzlichen Gabe von Fd durchgeführt.

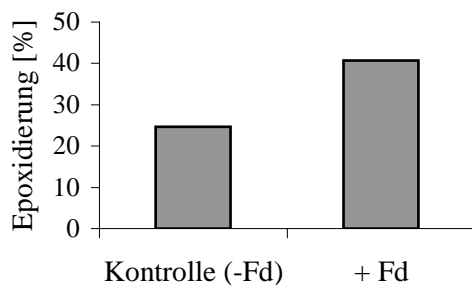


Abb. 3.3.5 Prozentuale in vitro Epoxidierungsraten mit und ohne zusätzliches Fd.

Die Zugabe von Fd steigert den Dtx-Umsatz von ca. 25% auf ca. 41 %, also um 64%, bei einem Chlorophyllgehalt von 0,14 mg/ml.

Fd führt, wie auch für die Zx-Epoxidase beschrieben zu einer signifikanten Steigerung der in vitro Epoxidierung (Abb. 3.3.5). Es scheint also während der Isolation ein Teil des Fd verloren zu gehen, so dass die Zugabe von Fd auch ohne die Zugabe der Fd-NADPH-Reduktase (FNR) zu einer erhöhten Umsatzrate führt.

3.3 Der Effekt unterschiedlicher pH-Werte bei der Isolation

Für die Vx-De-Epoxidase ist bekannt, dass sie bei einem pH kleiner 6,5 an die Thylakoidmembran bindet (Hager und Holocher, 1994). Wird eine Isolation bei einem pH-Wert größer als 6,5, also im neutralen bis alkalischen durchgeführt, so ist anschließend folglich kaum De-Epoxidaseaktivität an den Thylakoiden nachweisbar. Um zu untersuchen,

ob bei der Dtx-Epoxidase eventuell der umgekehrte Fall zutrifft, werden Isolationen bei zwei verschiedenen sauren pH-Werten (5 und 5,5) durchgeführt und mit der Standardisolation (pH 7,5) verglichen.

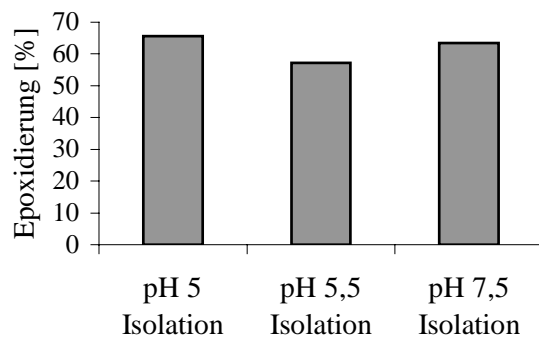


Abb. 3.3.6: Prozentuale in vitro Epoxidierungsraten nach erfolgter Isolation bei unterschiedlichen pH-Werten.

Bei allen gewählten pH-Werten (5; 5,5 und 7,5) verläuft die anschließende in vitro Epoxidierung unter Standardbedingungen (pH 8) mit hohen Raten.

Eine Thylakoidisolation im Sauren hat keinerlei negative Effekte auf die anschließend durchgeführte in vitro Epoxidierung. Es ist also auszuschließen, dass die Dtx-Epoxidase durch einen sauren pH-Wert von der Thylakoidmembran gelöst wird. Das bedeutet, dass sie sich im Sauren also nicht frei im Medium befindet, da sie sonst bei der Isolation zumindest zum Teil verlorengegangen wäre und es so zu einem signifikanten Rückgang des Dtx-Umsatzes gekommen wäre.

3.4 In vitro Epoxidierungskinetiken bei *P. tricornutum* und *S. oleracea* im Vergleich

Es konnte gezeigt werden, dass in vivo die Umsatzgeschwindigkeiten der Dtx-Epoxidase in *P. tricornutum* denen der Zx-Epoxidase in Chl a/b-haltigen Pflanzen deutlich überlegen sind (vergleiche auch Abb. 3.2.4 mit Abb. 3.2.1 und 3.2.2). Daher sollte die Hypothese, dass die Zx-Epoxidase niedrigere Umsatzraten hat auch in vitro überprüft werden.

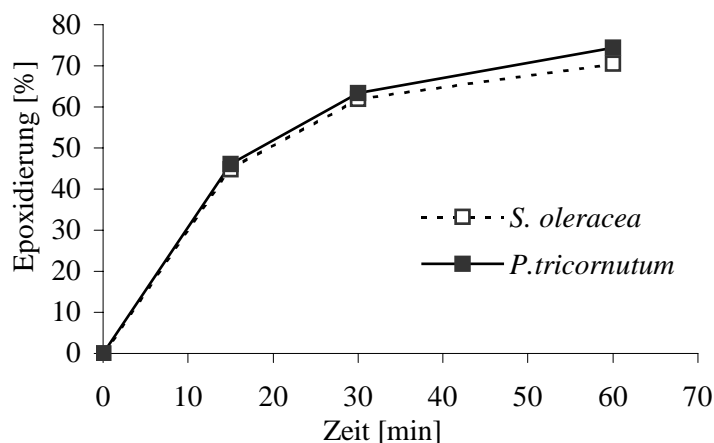


Abb. 3.3.7: Prozentuale in vitro Epoxidierung bei *P. tricornutum* und *S. oleracea* im Vergleich.

Unter annähernd optimalen Bedingungen (ohne Fd) besitzt die Zx-Epoxidase in vitro annähernd die gleichen Aktivitäten wie die Dtx-Epoxidase. Nach 60min sind beinahe 80% des vorhandenen Substrats (Zx bzw. Dtx) umgesetzt.

Auf Grund der gleichmäßigen in vivo Umsatzgeschwindigkeiten der Zx-Epoxidase (vgl. Abb. 3.2.1-3.2.3) war nicht zu erwarten, dass das Enzym in vivo limitiert war. Die beinahe identischen Umsatzraten in vitro zeigen also, dass die maximalen Umsatzraten der Dtx-Epoxidase nicht erreicht wurden, da sie sonst höher wären als die der Zx-Epoxidase. Es ist also zu vermuten, dass die in vitro gefundenen Umsatzraten der Dtx-Epoxidase nicht maximal

waren, also noch eine Limitierung vorhanden war. Auch der Vergleich der gemessenen *in vivo* Dtx-Epoxidierungskinetik unter optimalen Bedingungen, also unter LL (vgl. Abb. 3.2.4), zeigt, dass die *in vitro* Kinetiken deutlich limitiert sind.

3.5 Studien zur Starklichthemmung der Dtx-Epoxidase – Bindung an die Membran und Ablösung von der Membran als Regulationsmechanismus?

3.5.1 Aufrechterhaltung der Starklichthemmung *in vitro*

Die Aufrechterhaltung des regulativen Zustands der Dtx-Epoxidase im HL stellt die Grundlage zur Analyse des Regulationsmechanismus dar, was durch das Schockgefrieren der intakten Zellen in flüssigem Stickstoff (-192 °C) noch im HL erreicht wurde. Die intakten Algen wurden hierzu nach 20 min HL abzentrifugiert (0 °C, 500xg, 3min), in Isolationsmedium wieder aufgenommen, für weitere 10 min belichtet und nach dem Schockgefrieren im noch gefrorenen Zustand aufgeschlossen.

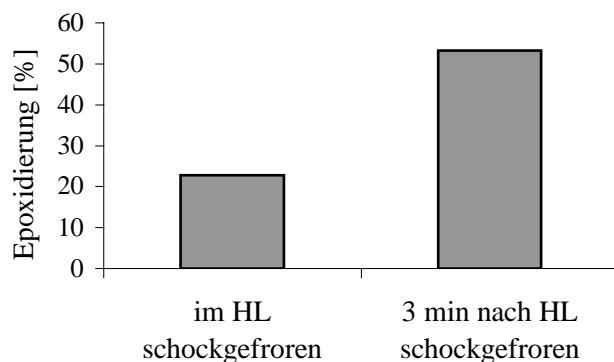


Abb. 3.3.8: Prozentuale *in vitro* Epoxidierung nach Schockgefrieren der Algen im HL bzw. 3 min nach HL.

Die Epoxidaseaktivität der Thylakoide aus Algen, die im HL schockgefroren wurden zeigt eine signifikante Abnahme von 53% auf 23%, also um 57%.

Obwohl nach dem Aufschluss direkt im HL noch ein Teil der Aktivität erhalten ist, ist der Unterschied mit einer Abnahme um 57% doch signifikant. Ein vollständiger Verlust der Aktivität ist nicht zu erwarten, da auch *in vivo* noch eine leichte Epoxidierung im HL unter DTT zu beobachten ist (vgl. Abb. 3.2.4). Außerdem war eine leichte Beschattung der Zellen bei der Überführung in Stickstoff und ein schwaches Auftauen der Zellsuspension bei der Überführung in die Schüttelflasche nicht zu vermeiden, was eine leichte Reaktivierung zur Folge haben könnte. Dadurch ist der Anteil an Restaktivität von 23% zu erklären.

3.5.2 Die Wirkung von ATP, ADP und Mg^{2+} als potenzielle Regulatoren der Starklichthemmung

Marin et al. (1996) haben für die Zx-Epoxidase eine Bindestelle für ADP beschrieben. Daher wurde für die Dtx-Epoxidase überprüft, ob ATP, ADP, oder auch bivalente Kationen *in vitro* einen negativen Einfluss auf die Aktivität und eventuell auch auf die Bindung an die

Membran haben könnten. ADP und ATP wurden hierbei immer gemeinsam mit Mg^{2+} eingesetzt, da für andere Proteine, wie z.B. den LHC II, eine Bindung von ATP, bzw. Phosphat über Mg^{2+} beschrieben wurde (Allen, 1992; Held, 1999). Dies steht in Zusammenhang mit einem Mg^{2+} -Transport im Licht vom Lumen ins Stroma, was zum Ladungsausgleich beim Aufbau des ΔpH dient. Außerdem wurden zur Kontrolle bivalente Kationen durch hohe EDTA-Konzentrationen vollständig entzogen.

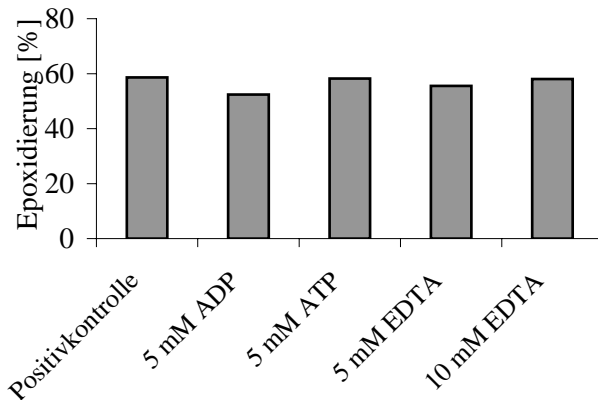


Abb. 3.3.9: Die Wirkung von ATP, ADP und bivalenten Kationen auf die *in vitro* Epoxidierung.

ATP, ADP und EDTA wurden dem Epoxidierungsansatz zugegeben und blieben unter diesen Bedingungen nach 30 Minuten Epoxidierung ohne eine negative Wirkung in Form eines Aktivitätsverlusts der Dtx-Epoxidase. Die leichten Unterschiede entsprechen hier einer normalen Streuung.

Wie in Abbildung 3.3.9 zu sehen ist, führten ATP, ADP und EDTA *in vitro* nicht zu einem Aktivitätsverlust. Daher kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden, dass die *in vivo* beobachtete ΔpH -Hemmung im HL der Dtx-Epoxidase über ATP, ADP oder Mg^{2+} vermittelt wird. Es kann so allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob an das aktive Enzym eventuell dauerhaft ADP oder auch ATP gebunden sein könnte.

3.5.3 Die Wirkung extremer pH-Werte auf die Aktivität der Diatoxanthin-Epoxidase

Die pH-Optimumskurve (siehe Abb 3.3.2) zeigt die pH-Bereiche, bei denen die Dtx-Epoxidase inaktiv ist, nämlich unterhalb von pH 5 und oberhalb von pH 11,5. Daher wurde eine Inkubation der Thylakoide bei diesen beiden pH-Werten vorgenommen. Anschließend wurden die Thylakoide wieder abzentrifugiert und in Epoxidierungs-Reaktionsmedium wieder aufgenommen. Die *in vitro* Epoxidierung wurde unter Standardbedingungen, also unter optimalen Bedingungen durchgeführt.

Dieser Versuch (Abb. 3.3.10) zeigt, dass die Epoxidase durch eine Deprotonierung derart gestört wurde, dass sie ihre Aktivität, auch nach Überführung in ein Medium mit optimalem pH-Wert, irreversibel verliert, während ein hoher Protonendruck ohne dauerhaften, negativen Effekt bleibt. Beachtet werden muss hierbei allerdings, dass ausgehend von einem neutralen pH-Wert der Protonendruck mit einer Differenz von 2 (pH 7 – pH 5) sehr viel kleiner ist, als umgekehrt der Protonenzug mit einer Differenz von 4,5 (pH 11,5 – pH 7). Da allerdings

vom pH-Optimum der Dtx-Epoxidase (vgl. Abb. 3.3.2) ausgegangen wurde, sind die Abstände zu den beiden Rändern ins Saure bzw. ins Basische ungefähr gleich.

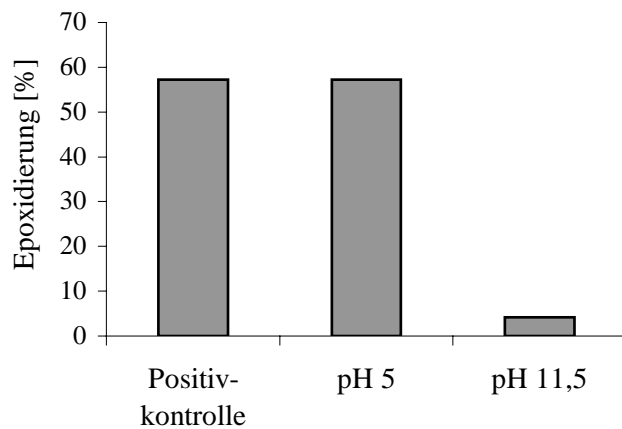


Abb. 3.3.10: Die Wirkung extremer pH-Werte auf die Epoxidaseaktivität.

Die Vorbehandlung mit pH 5 führt zu keiner Veränderung der Aktivität, nach einer pH 11,5-Vorbehandlung ist jedoch kaum (4%) noch Epoxidaseaktivität nachweisbar.

Es konnte so allerdings nicht entschieden werden, ob die Deprotonierung des Enzyms zu innermolekularen Veränderungen führt oder aber die Bindung des Enzyms an die Membran gestört wird. Daher sollte später versucht werden, den Überstand nach der pH 11,5 Inkubation aufzureinigen und aufzukonzentrieren, um an Hand einer *in vitro* Epoxidierungsreaktion das Enzym nachzuweisen (siehe Abb. 3.5.8).

3.5.4 Die Wirkung von Hochsalz (NaBr) und EDTA auf die Aktivität der Dtx-Epoxidase

Da EDTA selbst in hohen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der Dtx-Epoxidase hat (vgl. Abb. 3.3.9), besteht also in einer EDTA-Behandlung die Möglichkeit, über bivalente Kationen an die Membran gebundene Proteine, durch den Entzug dieser Kationen, abzuwaschen. Hochsalz, in diesem Fall NaBr (3 M) stört inter- und intramolekulare, polare Wechselwirkungen, z.B. zwischen Proteinen und der Membran, wodurch es zu einer Ablösung von Proteinen kommen kann. Speziell für die Dtx-Epoxidase sollte die Wirkung dieser Reagenzien durch eine nachfolgende *in vitro* Epoxidierung (Abb. 3.3.11 a) bzw. allgemein durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) gezeigt werden (Abb. 3.3.11 b).

An Hand dieser Methode ist es gelungen, einige Thylakoidproteine von der Membran zu waschen. Jedoch war es so nicht möglich, die Dtx-Epoxidase zu identifizieren, da EDTA und NaBr zu viele Proteine von der Membran ablösen, also zu viele Proteinbanden zu sehen sind, auch in dem ungefähr erwarteten Bereich (ca. 50-70 kDa, Lohr, persönliche Mitteilung). Daher ist es an dieser Stelle nicht möglich zu entscheiden, ob der beobachtete Aktivitätsverlust durch die Störung von Wechselwirkungen innerhalb des Enzyms oder zwischen Enzym und Membran zustande kam.

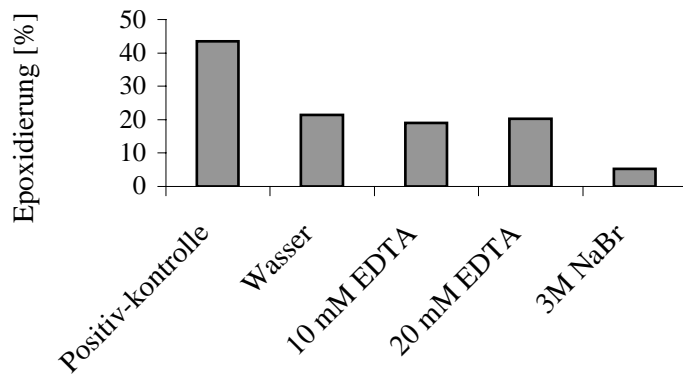


Abb. 3.3.11 a: Prozentuale *in vitro* Epoxidierung nach einer Behandlung mit EDTA und Hochsalz (NaBr 3M).

Nach einer Inkubation bei RT für eine Stunde nimmt die Aktivität der Dtx-Epoxidase von 43% auf 21%, also um 48% ab. EDTA führt in verschiedenen Konzentrationen nicht mehr zu einem weiteren Aktivitätsverlust. Anschließendes Waschen mit NaBr resultiert dagegen in einen beinahe vollständigen Aktivitätsverlust (5% Restaktivität).

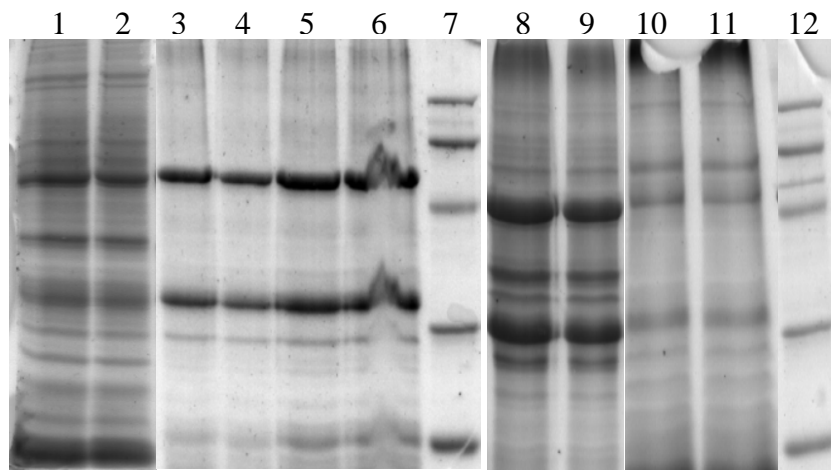


Abb. 3.3.11 b: Fotos der Gele nach EDTA und NaBr-Behandlung.

Es ist zu sehen, dass rein mechanisch durch Waschen mit Wasser einige Proteine von der Membran abgelöst werden (Lane 3 und 4). Der Zusatz von EDTA verstärkt nur wenige Proteinbanden (Lane 5 und 6). Ein weiterer Waschschritt mit NaBr löst weitere Proteine von der Membran (Lane 8 und 9), so dass das Proteinmuster der

Thylakoide (Lane 10 und 11) deutlich verändert ist gegenüber dem Proteinmuster vor den Waschschritten (Lane 1 und 2).

Lane 1 und 2: Thylakoidsuspension nach der Isolation

Lane 3 und 4: Überstand nach Waschen mit H₂O

Lane 5 und 6: Überstand nach Waschen mit EDTA

Lane 7 und 12: Marker (Banden von oben nach unten: 97,4kDa, 67kDa, 45kDa, 29kDa, 21kDa)

Lane 8 und 9: Überstand nach zweistufigem Waschen mit 1. EDTA und 2. NaBr

Lane 10 und 11: Thylakoidsuspension nach zweistufigem Waschen mit 1. EDTA und 2. NaBr

3.5.5 Die Wirkung einer Inkubation mit Phospholipase A₂ zur Überprüfung des Vorhandenseins eines Membranankers

Das Enzym Phospholipase wird beschrieben als ein Enzym, dass peripher gebundene Proteine von Membranen ablösen kann, falls sie einen Membrananker, sprich eine kovalente Bindung mit einem Membranbaustein, besitzen (Lottspeich und Zorbas, 1998). Daher ist es auch möglich, eine Inkubation mit Phospholipase als einen Test zu nutzen, der eine Aussage machen kann, ob die Dtx-Epoxidase einen Membrananker besitzt oder nicht.

Die unveränderte Aktivität der Dtx-Epoxidase nach einer Inkubation mit Phospholipase A₂ (siehe Abb. 3.3.12) spricht dafür, dass die Dtx-Epoxidase nicht über einen Membrananker, also nicht kovalent an die Thylakoidmembran gebunden ist. Andernfalls wäre eine verringerte Aktivität des Enzyms nach der Phospholipase-Behandlung auf Grund des Verlustes des Enzyms zu erwarten gewesen.

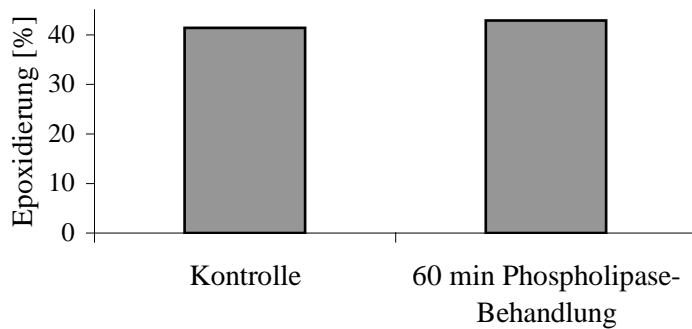


Abb. 3.3.12: Prozentuale in vitro Epoxidierung nach einer Behandlung mit Phospholipase A₂.

Zu sehen ist, dass die Probe nach einer Phospholipase-Inkubation ungefähr die gleiche Epoxidierungsrate zeigt, wie die Probe ohne Phospholipase-Behandlung.

3.5.6 Die Wirkung von Detergenzien auf die Aktivität der Dtx-Epoxidase

Detergenzien sind Reagenzien mit einem polaren und einem unpolaren Teil. Dadurch können sie polare und auch lipophile Wechselwirkungen zwischen anderen Molekülen schwächen. Das bedeutet, dass sie schon in geringen Konzentrationen, also unter der kritischen micellaren Konzentration (CMC) in der Lage sind, peripher gebundene Proteine von bestehenden Membranstrukturen abzulösen. Des Weiteren bilden Detergenzien in höheren Konzentrationen Micellen (oberhalb des CMCs), wodurch sie sogar integrale Proteine aus der Membran herauslösen (solubilisieren) und Membranen fragmentieren können.

Um nun die Bindung der Dtx-Epoxidase an die Membran weiter zu untersuchen und eventuell das Protein im Überstand aktiv zu halten, wurde der Effekt zwei verschiedener, nicht-ionischer Detergenzien (Triton-X-100 und Octyl-b-D-glucoopyranosid (OG)) jeweils unterhalb und oberhalb des CMCs analysiert.

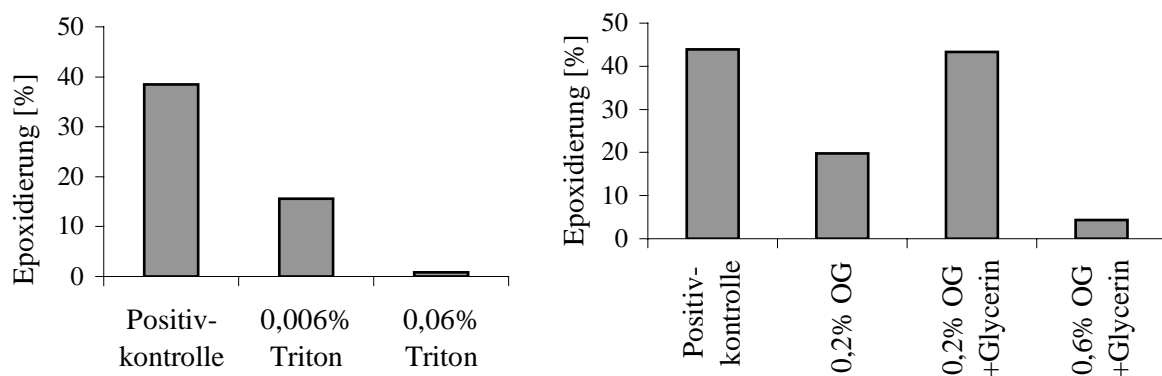


Abb. 3.3.13 a und b: Prozentuale in vitro Epoxidierung nach einer Behandlung mit Triton-X-100 (a) und OG (b).

Die Positivkontrolle gibt jeweils den maximalen Umsatz ohne eine Behandlung mit Detergenzien an. Die beiden Detergenzien Triton-X-100 und OG führen schon unterhalb des CMCs zu einer Hemmung, die oberhalb des CMCs 96 - 99% beträgt. Außerdem wird deutlich, dass Glycerin den hemmenden Effekt von 0,2% OG aufhebt, allerdings nicht mehr von 0,6% OG.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Dtx-Epoxidase in *P. tricorutum* stark auf die Störung der polaren und lipophilen Wechselwirkungen reagiert. Diese Störung kann sich grundsätzlich auf

inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen beziehen. Es ist dabei anzunehmen, dass sich die Störung der schwachen Bindungen in einer strukturellen Konformationsänderung auswirkt und dadurch die in vitro beobachtete Hemmung zu erklären ist. Im Fall von intramolekularen Wechselwirkungen könnte es sein, dass die Dtx-Epoxidase nur schwach an die Membran gebunden ist, da schon sehr niedrige Konzentrationen der Detergenzien zu einer Hemmung führen. Die Hemmwirkung auf das Enzym bei den Detergenzkonzentrationen, die deutlich über dem CMC liegen, kann auch durch die Fragmentierung der Membran erklärt werden, da dadurch das Substrat Dtx nicht mehr für das Enzym verfügbar wäre.

Die Aufhebung der Hemmwirkung durch eine zusätzliche Beigabe von Glycerin bei 0,2% OG könnte durch die allgemeinen Protein-stabilisierenden Eigenschaften von Glycerin zu erklären sein (Sousa, 1995). Ebenso möglich wäre, dass Glycerin, das ein polares, aber ungeladenes, kleines Molekül ist, für das auch Membranen permeabel sind dem Detergenz alternative Bindestellen bietet, wodurch weniger OG zum Solubilisieren der Proteine verfügbar ist.

3.5.7 Epoxidierung von Dtx unabhängig von der Thylakoidmembran nach einer Isolation nach Schockgefrieren der intakten Zellen im HL

Hierzu wird der Überstand zunächst mittels Ultrafiltration gereinigt und aufkonzentriert (Centricon, cut-off = 30 kDa, Firma Milipore), um störende Faktoren zu eliminieren und die Konzentration des Enzyms zu erhöhen.

Um die Aktivität der Dtx-Epoxidase im Überstand bestimmen zu können, muss die Methode der in vitro Epoxidierung so verändert werden, dass das Substrat, also Dtx für die Epoxidase verfügbar ist und das Enzym arbeiten kann. Hierzu werden Lipide (1:1 Mischung aus MDGD und DDGD), die unter anderen in den Thylakoiden vorkommen, hinzugegeben, um dem Enzym eine Membran ähnliche Oberfläche zur Bindung zu simulieren und Dtx zu lösen und lokal zu konzentrieren.

Um das eventuell gelöste Enzym zu stabilisieren, werden verschiedene Faktoren als Redox- (DTT) und Proteinschutz (Glycerin) zugegeben.

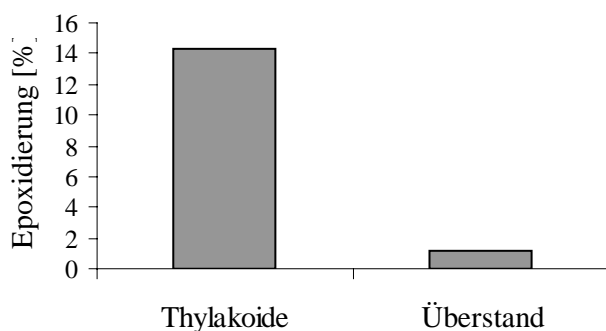


Abb. 3.3.14: Prozentuale in vitro Epoxidierung nach Schockgefrieren der intakten Zellen im HL.

Nach einer Isolation im HL mit DTT und Glycerin im Medium ist die Epoxidaseaktivität an den Thylakoiden sehr niedrig (14% Restaktivität), im Überstand ist sogar annähernd keine Epoxidaseaktivität (1% Epoxidierung) nachweisbar. Dieser Wert muss allerdings als Streuung interpretiert werden.

Obwohl der die Epoxidaseaktivität an den Thylakoiden stark abgenommen hat, ist auch im Überstand keine Aktivität nachweisbar. Grundsätzlich gibt es hierfür mehrere Gründe: Einerseits kann es sein, dass das Enzym abgelöst von der Membran in eine inaktive Konformation wechselt, so dass die aktive Konformation *in vitro* nicht wieder hergestellt werden kann. Andererseits ist es auch möglich, dass das Enzym im HL nicht abgelöst, sondern inaktiviert wurde, so dass es nach wie vor an den Thylakoiden gebunden, allerdings inaktiv, so aber nicht nachweisbar ist, weder an den Thylakoiden direkt, noch im Überstand. Außerdem ist es auch möglich, dass das von der Membran gelöste Enzym während dem Aufschluss der Zellen mit Proteasen in Kontakt kam, die dann schnell zu einer Inaktivierung der Dtx-Epoxidase führten. Hinzu kommt, dass die Methode nicht sicherstellt, dass alles Dtx in Lipid inseriert, also gelöst wird und so überhaupt für das Enzym verfügbar ist. Die letzte Möglichkeit liegt in einem Verlust des Enzyms während der Aufreinigung und Aufkonzentrierung durch Bindung an die Membranoberfläche der Ultrafiltrationsröhrchen.

3.5.8 Epoxidierung von Dtx unabhängig von der Thylakoidmembran nach einer pH 11,5-Behandlung

Eine Deprotonierung der Dtx-Epoxidase durch eine Behandlung mit pH 11,5 führte zur Inaktivierung des Enzyms (vgl. Abb. 3.3.10). Um zu überprüfen, ob diese Inaktivierung auf eine Ablösung der Epoxidase von der Membran beruht, sollte auch hier versucht werden, über eine *in vitro* Epoxidierung die Dtx-Epoxidase im Überstand nachzuweisen. Hierfür wurden nach der pH 11,5-Behandlung die Thylakoide abzentrifugiert und der Überstand auf pH 7,5 zurück titriert. Da in diesem Fall die Behandlung mit schon gereinigten Thylakoiden durchgeführt wurde, war eine anschließende Aufreinigung des Überstands nicht mehr nötig. Außerdem fand die gesamte Prozedur in einem kleinen Volumen (1 ml) statt, so dass auch das Aufkonzentrieren überflüssig wurde.

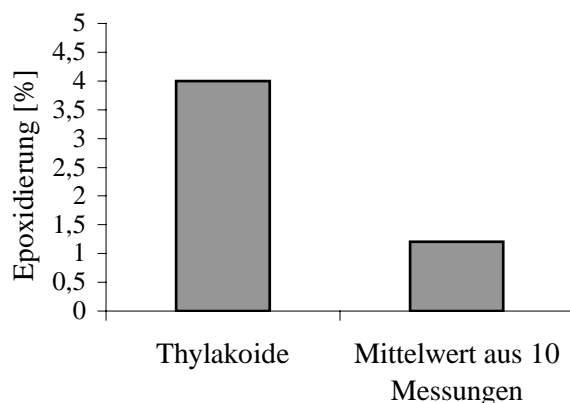


Abb. 3.3.15: Prozentuale *in vitro* Epoxidierung im Überstand nach einer Behandlung mit pH 11,5.

Es ist nur eine sehr geringe Epoxidase-Aktivität im Überstand nachweisbar (ca. 1%). An dieser Stelle kann man davon ausgehen, dass es sich bei diesen geringen Werten um Fehler und Streuung handelt.

Dass auch unter diesen Bedingungen kaum Epoxidierung stattgefunden hat, kann ähnlich wie unter Punkt 3.4.7 diskutiert werden, obwohl in diesem Fall der Gehalt an Proteasen im Ansatz deutlich verringert sein sollte. Trotzdem ist nicht sicher, ob die Dtx-Epoxidase unter diesen Bedingungen überhaupt (vollständig) im Überstand vorliegt. Die fehlende Epoxidaseaktivität an den Thylakoiden könnte auch auf eine irreversible Hemmung des Enzyms durch Deprotonierung zurückzuführen sein. Ebenso möglich wäre eine Ablösung der Dtx-Epoxidase von den Thylakoiden und ein damit verbundener Übergang in eine inaktive Konformation, zumindest teilweise. Außerdem ist die Verfügbarkeit des Substrates auch hier nicht sicher.

3.5.9 Versuche zur Reaktivierung der Dtx-Epoxidase nach erfolgter Hemmung

Um zu untersuchen, ob die in vivo beobachtete Reaktivierung der Dtx-Epoxidase nach einer erfolgten Inaktivierung im HL sich auch in vitro in den Aktivitäten des Enzyms widerspiegelt, wurde eine Zellsuspension belichtet, ein Teil davon noch im HL in flüssigen Stickstoff überführt und daraus die Thylakoide isoliert. Entsprechend wurde mit weiteren Aliquots nach den in Abbildung 3.3.16 genannten Zeiten im LL verfahren.

Abbildung 3.3.16 macht deutlich, dass das im HL aufgebaute NPQ innerhalb der ersten 2-3 min nur langsam wieder absinkt, was eine nur langsame in vivo Epoxidierung repräsentiert. Erst nach ca. 3 min ist ein schneller Rückgang des NPQ zu beobachten. Dies spiegelt sich auch in den dazugehörigen Aktivitäten der Dtx-Epoxidase in vitro wider. Innerhalb der ersten 3 min ist eine stetige Zunahme der Dtx-Epoxidaseaktivität zu beobachten, die danach wieder abfällt. Die in Abbildung 3.3.16 gezeigte Kinetik der Dtx-Epoxidase-Reaktivierung entspricht also exakt den Veränderungen des NPQ im LL nach einer HL-Periode, da erst bei maximaler Epoxidaseaktivität das NPQ signifikant zurück geht.

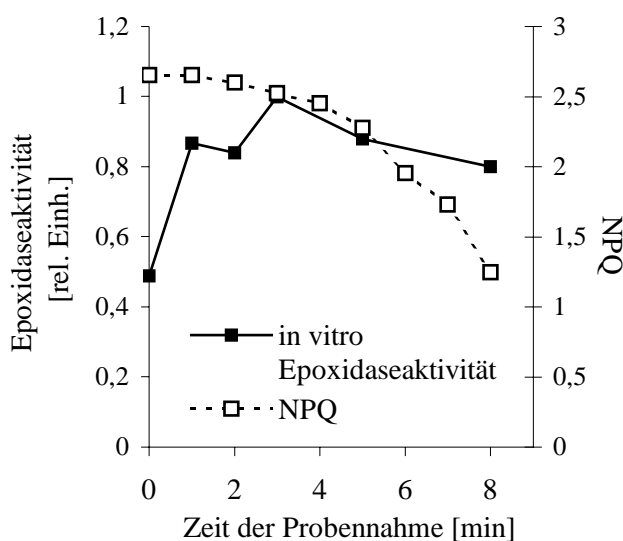


Abb. 3.3.16: NPQ und Epoxidaseaktivität nach einer Probenentnahme zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 5 und 8 Minuten nach einer HL-Behandlung.

Für die Epoxidaseaktivität ergibt sich eine Optimumskurve mit dem höchsten Wert bei 3 Minuten. Der anfängliche Anstieg zeigt die Zunahme der Epoxidaseaktivität nach einer Hemmung im HL. Da nach einigen Minuten in den intakten Algen im LL schon ein Teil des Dtx epoxidiert wurde, ist der spätere Abfall mit einer Substratlimitierung in den isolierten Thylakoiden zu erklären. Das NPQ sinkt innerhalb der ersten 3 min zunächst nur leicht, danach mit hoher Geschwindigkeit.

Genauso von Interesse ist, ob die Dtx-Epoxidase nach einer pH 11,5-Behandlung wieder zu reaktivieren ist, in dem sie wieder an die Thylakoide bindet. Das heißt es soll im Folgenden versucht werden, die Dtx-Epoxidase und die Thylakoide zu reassoziieren, um nach erfolgter Hemmung wieder eine aktive Epoxidierungsfraction zu erhalten. Hierfür wurde der gesamte Ansatz nach der pH 11,5-Behandlung zurück titriert auf pH 7,5 und erst anschließend zentrifugiert.

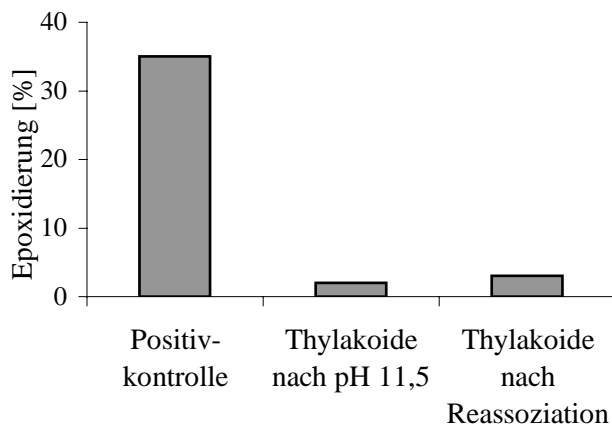


Abb. 3.3.17: Prozentuale *in vitro* Epoxidierung nach einer pH 11,5-Behandlung und dem anschließenden Versuch der Reassoziaton.

Die pH 11,5-Behandlung führt an den Thylakoiden zu einer sehr geringe Epoxidase-Aktivität (3%). Nach der Rücktitrierung des Ansatzes auf pH 7,5 ist keine signifikante Erhöhung der Epoxidase-Aktivität messbar.

Abbildung 3.3.17 zeigt, dass eine Reaktivierung der Dtx-Epoxidase durch eine einfache Umkehrung der pH 11,5-Behandlung anhand einer Rücktitration des gesamten Ansatzes nicht möglich ist. Gründe hierfür könnten darin liegen, dass die Dtx-Epoxidase zur Rückbindung ihre Konformation ändern muss, was *in vitro* unter den gewählten Bedingungen nicht möglich sein könnte. Ein Grund hierfür könnte das Fehlen von Chaperons zur Gewährleistung einer kontrollierten Rückfaltung sein. Dass auch eine Titrierung bis auf saure pH-Werte die Aktivität nicht wieder erhöhte (Daten hier nicht gezeigt) könnte die gleichen, genannten Gründe haben.

Um auch zu testen, ob die Hemmung durch Detergenzien reversibel oder irreversibel ist, sollte nun versucht werden, ob die Entfernung von OG durch Bio-Beads (Firma Bio-Rad) zu einer Reaktivierung der Dtx-Epoxidase führt.

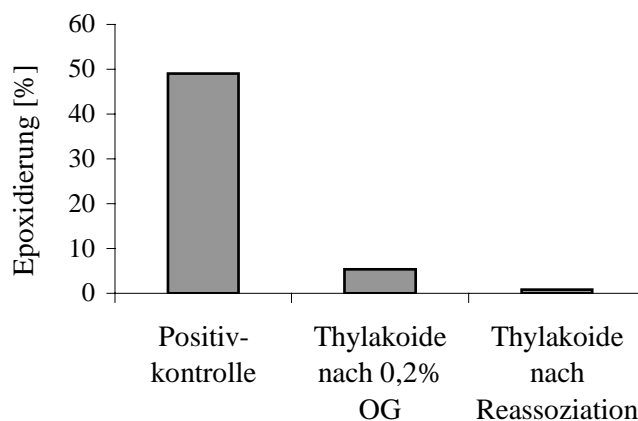


Abb. 3.3.18: Prozentuale *in vitro* Epoxidierung nach einer OG-Behandlung und dem anschließenden Versuch der Reassoziaton.

Die OG-Behandlung führt an den Thylakoiden zu einer sehr geringe Epoxidase-Aktivität (5%). Nach der Entfernung des Detergenzes durch Bio-Beads (Firma Bio-Rad) ist keine signifikante Veränderung der Epoxidase-Aktivität messbar.

Die Abbildung zeigt, dass der Versuch der Entfernung des Detergenzes durch Bio-Beads zu einer weiteren, leichten Abnahme der Epoxidierung führt. Dies könnte daran liegen, dass noch Reste des Detergenzes im Ansatz vorhanden waren, so dass die Wechselwirkungen nach wie vor gestört waren und der sogar niedrigere Umsatz als Streuung angesehen werden kann. Es ist aber auch möglich, dass zumindest ein Teil des Enzyms ebenfalls an die Beads gebunden hat und so mit dem Detergenz aus dem Ansatz entfernt wurde.

4. Die Identifikation der Diatoxanthin-Epoxidase bei *P. tricornutum*

4.1 Das Thylakoidproteinmuster von *P. tricornutum*

Die Darstellung des Proteinmusters von *P. tricornutum* stellt auf Grund des proteolytischen Abbaus der Proteine und der diffus bandierenden Proteine ein Problem dar. Vermutlich sind auch aus diesem Grund kaum Abbildungen von Proteinmustern dieser Alge in der Literatur zu finden, was die Zuordnung der Proteinbanden erschwert. Daher wurden Isolationen mit verschiedenen Zusätzen zur Stabilisierung der Proteine durchgeführt und für die Probenvorbereitung ein fertiger Denaturierungspuffer (Roti-Load1, Firma Roth) verwendet, der zu einer schärferen Bandierung führte.

Es wurden bei allen Gelen verschiedene Marker der Firma MBI Fermentas (Protein Ladder, 10-200 kDa und Prestained Protein Ladder, ca. 10-180 kDa) benutzt. Die folgende Abbildung zeigt ein Beispielgel nach einer colloidalen Coomassiefärbung (Roti-Blue, Firma Roth).

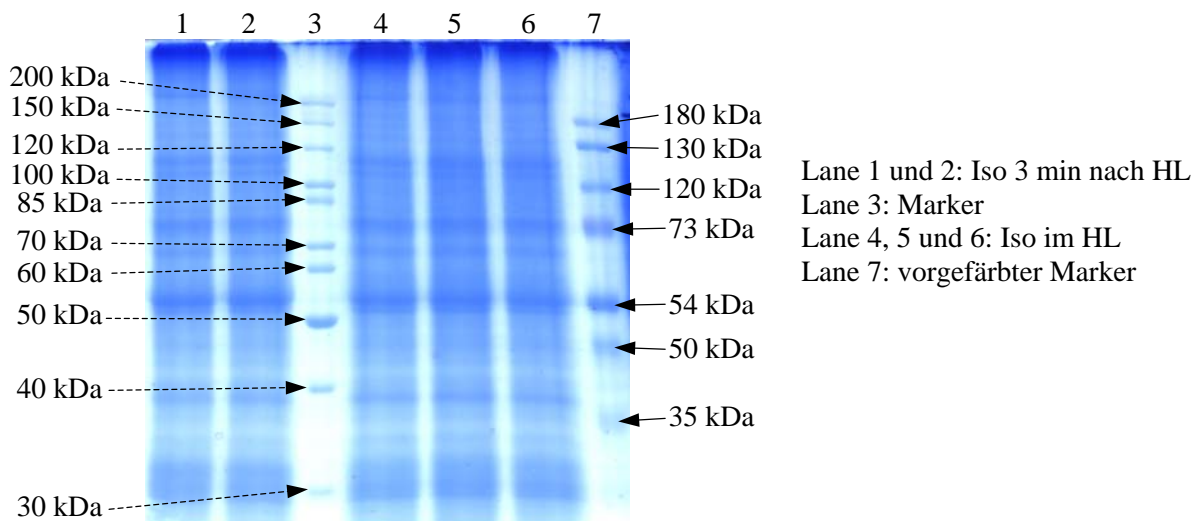


Abb. 3.4.1: Thylakoid-Proteinmuster von *P. tricornutum* nach einer colloidalen Coomassiefärbung (Roti-Blue, Firma Roth).

Der Gellauf wurde beendet, nachdem alle Proteine kleiner ca. 30 kDa aus dem Gel gelaufen waren. Bei beiden Isolationen (Iso), nach Schockgefrieren der intakten Algen im und 3 min nach HL, wurde ein Stabilisierungsreagenz (Roti-Stab PI, Firma Roth) eingesetzt, um den zusätzlichen Stress durch den Gefrier-Tau-Zyklus, ohne den Einsatz des Schutzproteins Rinderserumalbumin (BSA), auszugleichen.

Vergleicht man zunächst die beiden unterschiedlichen Marker, die in dem Gel mitgelaufen sind, so erkennt man ein abweichendes Laufverhalten. Daher führten diese beiden Marker also zu zwei unterschiedlichen Eichkurven und folglich auch zu unterschiedlichen Größen der Proteine (vgl. auch Tabelle 3.4.1 unter Punkt 4.3). Da aber vorgefärbte Marker oft ein verändertes Laufverhalten zeigen, wurde er eingesetzt, um während des Gellaufs schon zu

überprüfen, wie weit die Gele gelaufen waren und später wie effizient der Transfer der Proteine auf die Blotmembran war.

Das Thylakoid-Proteinmuster weist einige dominante Banden auf: bei ca. 110 kDa, 75 kDa, 55 kDa und 30 kDa (Abb. 3.4.1). Die Bereiche dazwischen sind durch schwache Banden mit zum Teil nur diffus bandierten Proteinen gekennzeichnet. In dieser Abbildung eines mit Coomassie gefärbten Gels ist zunächst kein Unterschied zwischen der Isolation im HL und 3 min nach HL zu erkennen. Um die Auflösung des Proteinmusters zu verbessern und auch schwache Banden sichtbar zu machen, wurde ein Gel des Thylakoid-Proteinmusters von *P. tricornutum* Silber gefärbt.

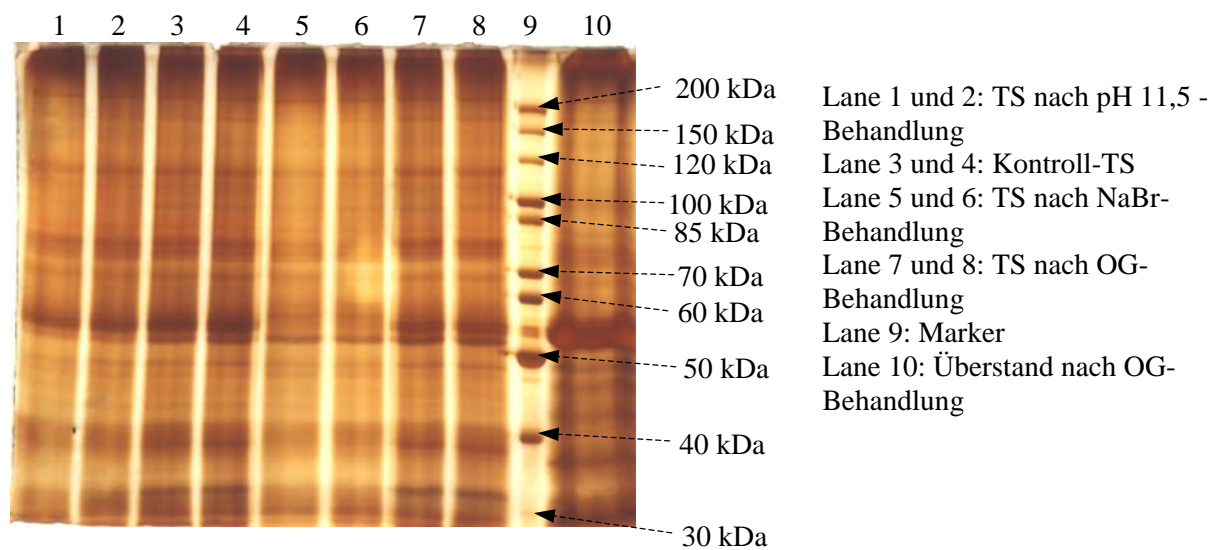


Abb. 3.4.2: Thylakoid-Proteinmuster von *P. tricornutum* nach einer Silberfärbung (Serva Silverstain Kit 35076).

Der Gellauf wurde beendet, nachdem alle Proteine kleiner ca. 30 kDa aus dem Gel gelaufen waren. Es sind einige Bereiche mit dominierenden Banden zu sehen: bei ca. 115 kDa, 78 kDa, 54 kDa, 40 kDa und 30 kDa. In den Lanes nach der NaBr-Behandlung sind einige der dominierenden Banden bei ca. 78 kDa, 54 kDa, 40 kDa und 33 kDa verschwunden. In allen anderen Lanes ist das Thylakoidmuster ähnlich, obwohl der Überstand nach OG-Behandlung eine Anreicherung der Bande bei ca. 54 kDa zeigt.

Durch die Silberfärbung werden einige Banden sehr viel deutlicher bzw. überhaupt erst sichtbar (Abb. 3.4.2), im Vergleich zur herkömmlichen, weniger sensitiven Färbemethode mit Coomassie (vgl. auch Abb. 3.4.1). Auf Grund der fehlenden Literaturdaten zum Proteinmuster von *P. tricornutum*, fällt es schwer die sichtbaren Banden bestimmten Proteinen zuzuordnen. Allerdings hilft der Vergleich mit der Höheren Pflanze weiter.

Von Nelson und Eytan (1979) wurde beschrieben, dass durch eine Behandlung mit NaBr (3 M) das Köpfchen der ATP-Synthase, also α -, β -, γ - und δ - Untereinheit (UE) abgelöst werden können. Mit dieser Methode wurde so die γ -UE von Spinat gereinigt (Richter et al., in press) und es sind die Größen dieser einzelnen UEs der ATP-Synthase bekannt. Die α - und β -UE

liegen damit bei ca. 54-55 kDa (Schuman et al., 1985; Feng und McCarty, 1990), die γ -UE bei ca. 36 kDa (Nalin und McCarty, 1983) und die δ -UE bei ca. 20 kDa (Napier et al, 1992). Aus diesen Daten und den Ergebnissen der NaBr-Behandlung ist es möglich abzuleiten, dass es sich bei einer der dominierenden Banden im Gel bei ca. 53-54 kDa um eine Doppelbande handelt. Sie repräsentiert vermutlich die α - und β -UE der ATP-Synthase, da diese Banden nach einer Behandlung mit NaBr gänzlich verschwunden ist. Außerdem fehlt auch eine sonst deutlich sichtbare Bande bei ca. 38 kDa, was der γ -UE entsprechen könnte, sowie eine Bande bei ca. 33 kDa, die allerdings nicht genauer zuzuordnen ist.

Durch das Entfernen dieser dominierenden Banden kommen in den Lanes nach einer NaBr-Behandlung zwei andere dünne Banden bei ca. 57 und 59 kDa zum Vorschein, die in den anderen Fällen wenn überhaupt nur mit Mühe zu erkennen sind. Ob die Dtx-Epoxidase in einem Proteingel, in dem alle Proteine gleich angefärbt wurden überhaupt sichtbar ist, ist völlig unklar. Daher wurden Westernblots durchgeführt, bei denen über eine Immunreaktion ein spezifischer Antikörpers die Dtx-Epoxidase anfärben sollte.

4.2 Der Antikörper reagiert auf das Peptid, gegen das er synthetisiert wurde

Um zunächst zu überprüfen, ob die synthetisierten Antiseren der Kaninchen 765 und 766 unter den gewählten Bedingungen auf das Peptid reagieren und ob die entsprechenden Präimmunsereen dies nicht tun, wurden Dot-Blots durchgeführt. Diese wurden exakt unter den gleichen sonst auch verwendeten Blotbedingungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die gewählten Bedingungen für das Peptid und den Antikörper geeignet sind.

Die Abbildungen 3.4.3 a und b zeigen, dass die Antiseren beider Kaninchen auf das Peptid reagieren. Allerdings zeigen die Blots auch einen relativ starken Hintergrund und Signale mit unklaren Grenzen. Solche Signale können unter anderem den Grund haben, dass eine Blocking-Lösung auf Proteinbasis verwendet wurde und es so zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und dem Blocking-Protein kommen kann. Daher wurde der selbe Test zusätzlich mit einer synthetischen Blocking-Lösung auf Polymerbasis (Roti-Block, Firma Roth) durchgeführt (Abb. 3.4.3 c). Das Ergebnis sind klarere Punkte und kein Hintergrundsignal.

In den Abbildungen 3.4.3 d und e wird deutlich, dass dagegen die Präimmunsereen beider Kaninchen keine spezifische Reaktion auf das synthetisierte Peptid zeigen. Erst ab einer Konzentration von 0,5 μ g ist ein minimales Signal zu sehen, was durch eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit dem Peptid nach langen Inkubations- und Entwicklungszeiten zu erklären ist.

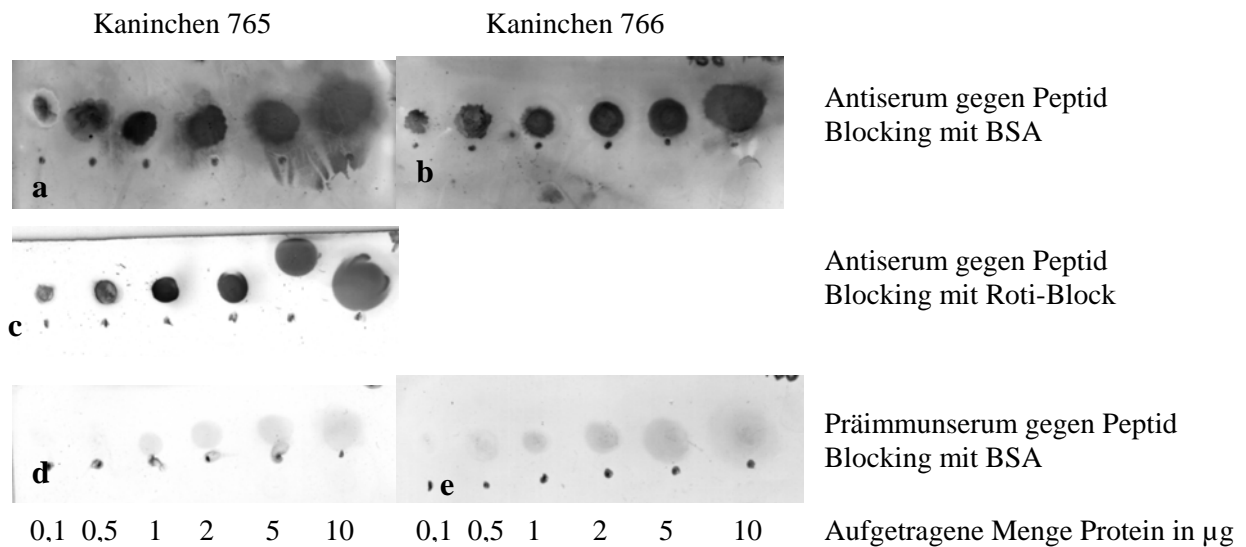


Abb. 3.4.3 a-e: Dot-Blots der Präimmunsereen und der Antiseren der Kaninchen 765 und 766.

Kaninchen 765, a und c Antiserum gegen Peptid, d Präimmunserum gegen Peptid und Kaninchen 766, b Antiserum gegen Peptid, e Präimmunserum gegen Peptid. Auf allen Membranteilen wurden von links nach recht die Konzentrationen 0,1, 0,5, 1, 2, 5 und 10 μg aufgetragen und es wurden alle gleich lang entwickelt. Membranen a, b, d und e wurden mit einer BSA-Lösung geblockt, c mit einer synthetischen Blocking-Lösung auf Polymerbasis (Roti-Block).

4.3 Der Nachweis und die Größenbestimmung der Dtx-Epoxidase mittels Westernblottig

Alle weiteren Nachweise wurden mit dem aufgereinigten Antikörper des Kaninchens 765 durchgeführt. Zur Überprüfung der Laufstrecke der Proteine im Gel während der Elektrophorese und der Effizienz des Transfers der Proteine auf die NC-Membran wurde eine vorgefärbter Markerproteinmischung (Prestained Protein Ladder ca. 10-180 kDa, Firma MBI Fermentas) eingesetzt.



Lane 1: Marker (Marker 4 und 5, Firma Serva)
Lane 2-5: Thylakoidsuspension (TS), ohne BSA aber mit Proteaseinhibitoren isoliert

Abb. 3.4.3: Signale des Gesamt-Thylakoid-Proteinmusters von *P. tricornutum* nach einer dreistündigen Inkubation mit dem gereinigten Antiserum des Kaninchens 765.

Es sind viele, jedoch keine spezifischen Signale zu erkennen. Nur bei ca. 75 und 30 kDa sind deutliche Banden zu sehen.

Die Abbildung 3.4.3 zeigt, dass der Antikörper nicht nur ein Signal lieferte, sondern es zu einigen Kreuzreaktionen kam, die so stark waren, dass kein spezifisches Signal mehr zu erkennen war. Daher wurde zunächst nach Möglichkeiten gesucht, das Signal der Epoxidase ausfindig und deutlicher zu machen. Dazu wurde versucht, den relevanten Größenbereich einzuschränken, um diesen möglichst gut auflösen zu können. Dies war möglich, da die Zx-Epoxidase bereits *in vitro* expremiert und ihre Größe nach Bouvier et al. mit ca. 65 kDa bestimmt wurde. Nach einer persönlichen Mitteilung von Lohr (2004) ist die Dtx-Epoxidase auf Grund der c-DNA-Sequenzen als etwas kleiner einzuschätzen. Es war jedoch noch keine genaue Aussage möglich, da das Protein noch nicht in reiner Form vorliegt und so genaue Informationen über Signal-Sequenzen etc. fehlen.

Ein weiterer Grund für die hohe Anzahl an Signalen könnte auch darin liegen, dass das Antiserum in sehr hohen Konzentrationen und mit langen Inkubationszeiten eingesetzt werden musste, da es nur gegen eine Aminosäuresequenz von 15 Aminosäuren synthetisiert wurde und daher die Anzahl an Epitopen vermutlich sehr gering ist. Hinzu kommt, dass die Dtx-Epoxidase vermutlich in nur sehr niedriger Konzentrationen vorhanden ist, so dass ihr Anteil am Gesamt-Thylakoid-Protein als sehr klein geschätzt werden kann, eventuell sogar kleiner als 1%.

Es wurden daher die Gele so gefahren, dass Proteine kleiner ca. 25 kDa das Gel schon wieder verlassen hatten, um für Proteine zwischen 40 und 70 kDa eine möglichst lange Trennstrecke zu gewährleisten. Dadurch entfallen die Kreuzreaktionen mit Proteinen kleiner als 25 kDa, wodurch auch weniger Antikörper weggefangen wird.

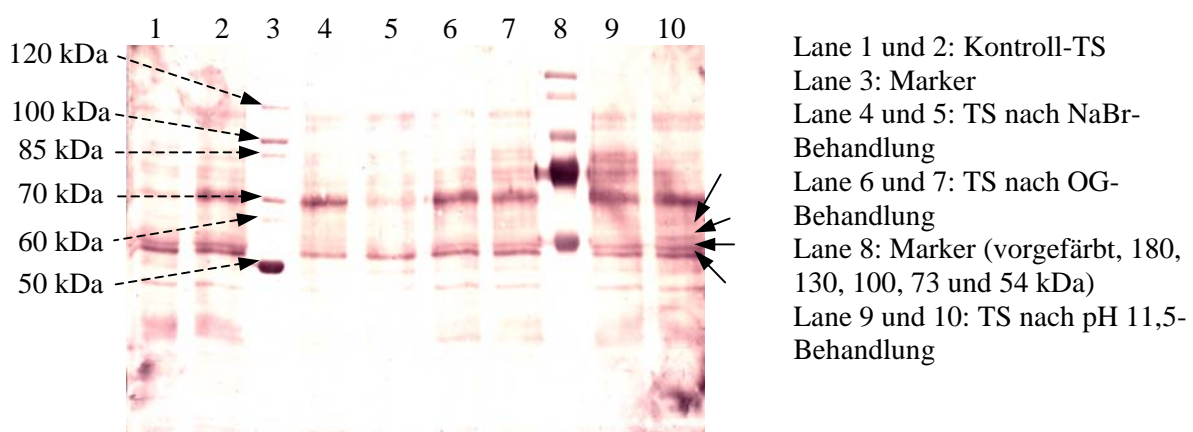


Abb. 3.4.4: Signale des Thylakoid-Proteinmusters größer als ca. 25 kDa bei *P. tricornutum* nach einer dreistündigen Inkubation mit dem Antiserum des Kaninchens 765.

Dieser Blot zeigt deutlich weniger Signale, so dass im relevanten Größenbereich zwischen 40 und 70 kDa nur noch einige wenige Banden zu sehen sind. In allen Lanes ist auf der Höhe von 70 kDa eine starke Bande zu sehen. Darunter ist in Lane 10 auf der Höhe von 60 kDa eine sehr schwache Bande zu sehen (oberster Pfeil). In Lane 1, 2, 9 und 10 ist bei ca. 55 kDa eine Banden zu sehen (2. Pfeil), darunter in den Lanes 1,2,5,7,9 und 10 eine weitere (3. Pfeil) und darunter in allen Lanes eine recht starke Bande (unterster Pfeil).

Auch dieser Blot zeigt einen hohen Anteil an Kreuzreaktionen, was eine direkte Identifikation der Dtx-Epoxidase unmöglich macht. Hinzu kommt die Tatsache, dass das Wissen über die Dtx-Epoxidase zur Zeit noch sehr begrenzt ist, also keine zusätzlichen Daten vorhanden sind, die zur Identifizierung des Proteins im denaturierenden Gel dienen könnten. Fraglich ist an dieser Stelle auch, ob überhaupt ein Signal der Dtx-Epoxidase auf dem Blot zu sehen ist, da sich auch die Signale zwischen zwei Lanes, die grundsätzlich die gleiche Probe enthielten, unterscheiden. Daher liegt der Verdacht nahe, dass es zu einem Verlust des Proteins, eventuell durch das Einfrieren und Auftauen der Proben kommen könnte. Daher wurden Thylakoide mit Denat-Puffer versetzt und vergleichsweise für 72 h auf Eis gehalten bzw. eingefroren und danach im denaturierenden Gel aufgetrennt und anschließend der Westernblot durchgeführt.

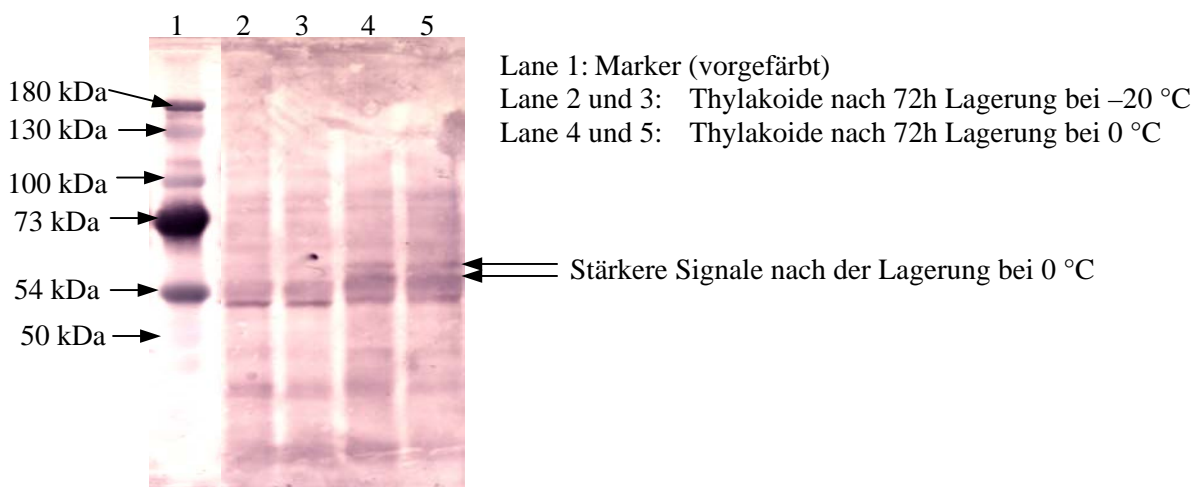


Abb. 3.4.5: Signale des Thylakoid-Proteinmusters größer als ca. 25 kDa bei *P. tricornutum*.

Die Membran wurde drei Stunden mit dem gereinigeten Antiserum des Kaninchens 765 inkubiert. Die Proben wurden bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lane 4 und 5) bzw. bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lane 2 und 3) gelagert. Die Pfeile rechts zeigen an, wo in Lane 4 und 5 deutlich stärkere Signale zu sehen sind, als in Lane 2 und 3.

Die Abbildung 3.4.5 zeigt, dass nach der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lane 2 und 3) einige Banden kaum noch zu sehen sind, die bei einer Lagerung bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ noch vorhanden sind. Dies spricht für den Verlust der entsprechenden Proteine bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Allerdings tritt dafür die Bande kurz unterhalb des 54 kDa Markerproteins etwas deutlicher hervor, was dadurch zu erklären sein könnte, dass in dieser Bande Abbauprodukte des gesuchten Enzyms vorliegen könnten. Daher werden alle weiteren Westernblots mit frisch isolierten Thylakoiden durchgeführt.

Um nun herausfinden zu können, bei welchem der Signale es sich um das der Dtx-Epoxidase handelt, soll nun versucht werden, an Hand der Bedingungen, die physiologisch zur Inaktivierung der Dtx-Epoxidase geführt haben (vgl. auch Punkt 3.5.3, 3.5.4 und 3.5.6) zu einer exakteren Aussage zu kommen.

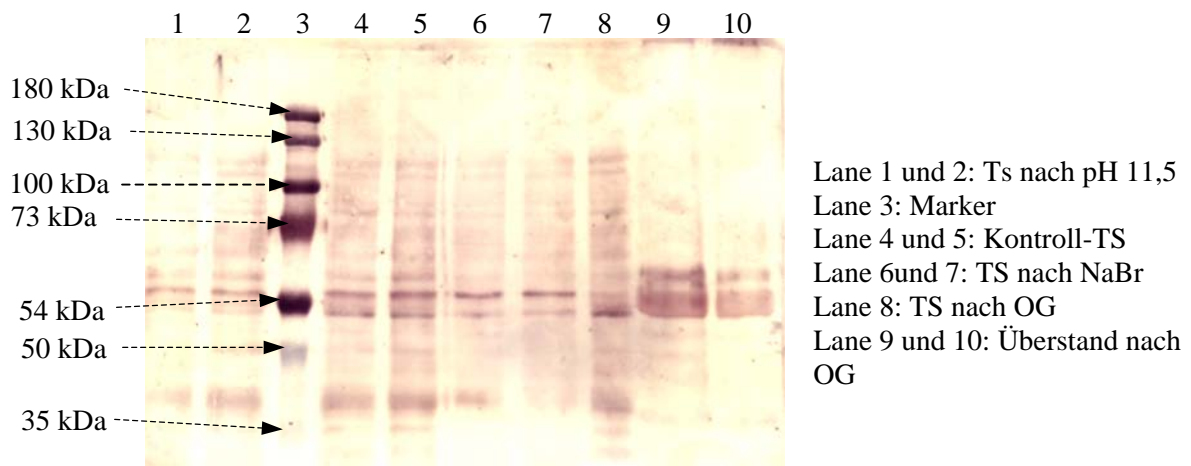


Abb. 3.4.6: Signale des Thylakoidmusters kleiner ca. 35 kDa nach dreistündiger Inkubation mit dem gereinigten Antiserums des Kaninchens 765.

Zwei Banden, eine kurz über, sowie eine kurz unter dem 54 kDa Markerprotein scheinen als spezifische Signale gedeutet werden zu können. Hintergrund und Kreuzreaktionen sind weniger intensiv, als diese Banden. Des Weiteren zeigt der Überstand nach der OG-Behandlung der Thylakoide (Lane 9 und 10) eine deutliche Bande bei ca. 60 kDa und eine diffus bandierte Bande bei ca. 54 kDa.

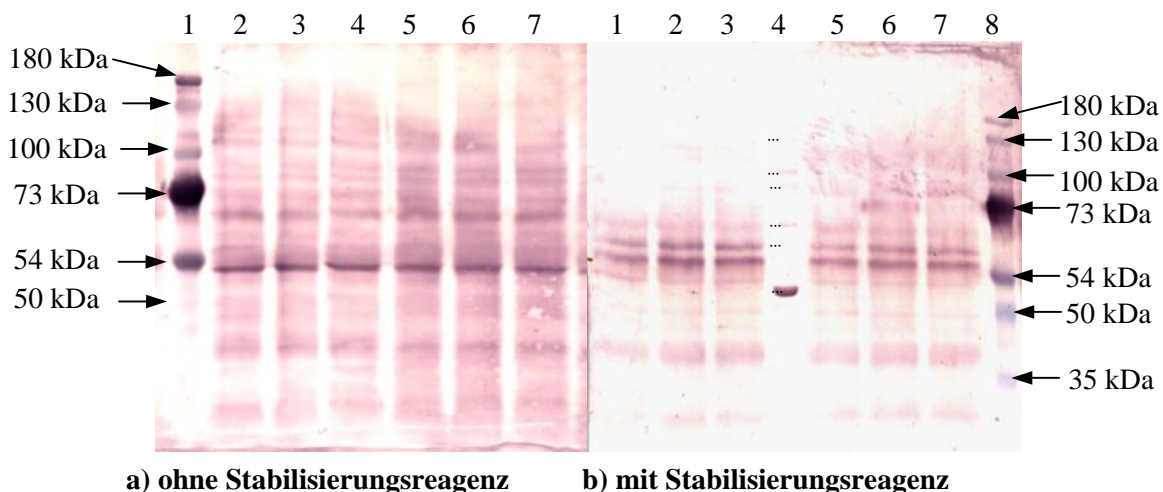
Dieser Blot zeigt kurz über der Bande des 54 kDa Markerproteins eine Bande, die im Gegensatz zu den anderen Signalen deutlich hervortritt, was für ein spezifisches Signal spricht. So kann nun vermutet werden, dass es sich bei dieser Bande um die Dtx-Epoxidase handelt. Diese Bande korreliert allerdings nicht vollständig mit den physiologischen *in vitro* Daten, da sie nach einer NaBr- (Lane 6 und 7) und pH 11,5-Behandlung (Lane 1 und 2) noch vorhanden ist. Allerdings ist sie nach einer OG-Behandlung (Lane 8) kaum noch zu sehen, was zu den physiologischen Daten passt. Im Überstand nach der OG-Behandlung ist diese Bande allerdings schwer zu identifizieren da auf der Höhe von dem 54 kDa Markerprotein nur ein diffuses Signal zu sehen ist.

Ein weiteres recht deutliches Signal ist kurz unter dem 54 kDa Markerprotein zu erkennen, das allerdings ebenfalls nicht mit den physiologischen *in vitro* Daten korreliert. Diese Bande ist nach NaBr- und pH 11,5-Behandlung schwächer, scheint aber durch die OG-Behandlung unverändert zu sein. Außerdem ist in dem Überstand nach der OG-Behandlung ein deutliches Signal auf der Höhe von ca. 60 kDa zu sehen, was allerdings in den anderen Lanes nur sehr schwach zu erkennen ist. Daher kann auch über diese Bande an dieser Stelle keine weitere Aussage getroffen werden.

Dieser Blot (Abb. 3.4.6) zeigt also mehrere Banden, die grundsätzlich die Dtx-Epoxidase repräsentieren könnten. Allerdings reichen die bisherigen Daten nicht aus, um eine eindeutige Aussage zu treffen.

Es könnte außerdem ein weiteres Problem in dem Vorhandensein von PEST-Regionen liegen, wie sie für die Zx-Epoxidase schon beschrieben wurden (Bouvier et al., 1996) und typisch für schnell abbaubare Proteine sind (Rogers et al., 1986). Diese Proteinbereiche könnten dazu führen, dass die Dtx-Epoxidase in einem Medium, dass, wie in diesem Fall, kein Schutzprotein wie z.B. BSA enthält, extrem schnell abgebaut würde. Dies würde dann wiederum zu einem schwachen Signal auf Grund von Proteinabbau führen. Ob der Verlust einiger Signale bei der Lagerung der Proben bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vgl. Abb. 3.4.5) auch dadurch zu erklären ist, bleibt offen.

Besonders unter Isolationsbedingungen, die von sich aus schon kritisch sind, z.B. mit einem zusätzlichen Gefriertauzyklus, könnte sich ein Problem wie Proteinabbau besonders stark auswirken. Daher wurde bei der Isolation im Starklicht direkt, bei der die Zellen in N_2 schockgefroren wurden, zusätzlich ein Stabilisierungsreagenz (Roti-Stab PI, Firma Roth) eingesetzt.



Lane 1: Marker (vorgefärbt)
Lane 2, 3 und 4: Isolation im HL
Lane 5, 6 und 7: Isolation nach HL

Lane 1, 2 und 3: Isolation nach HL
Lane 4: Marker (120, 100, 85, 70, 60 und 50 kDa)
Lane 5, 6 und 7 : Isolation im HL
Lane 8: Marker (vorgefärbt)

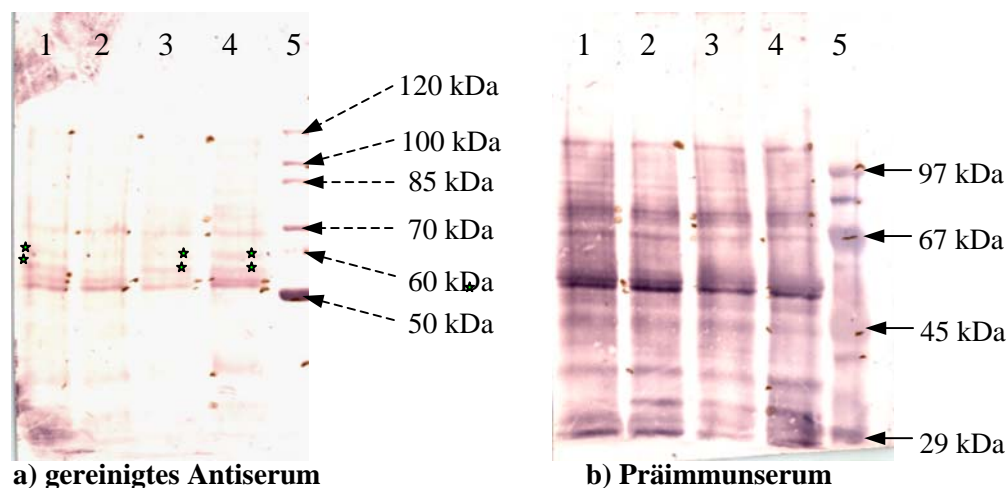
Abb. 3.4.7 a und b: Signale der Isolationen nach Schockgefrieren der Zellen im HL und 3 min nach HL mit (b) und ohne (a) Stabilisierungsreagenz (Roti-Stab PI) im Isolationsmedium.

Mit Stabilisierungsreagenz sind die Banden schärfer und es sind bei gleicher eingesetzter Proteinmenge pro Lane (Protein entsprechend $7\text{ }\mu\text{g Chl}$) schon nach kürzerer Entwicklungsdauer klarere Signale und weniger Kreuzreaktionen zu erkennen.

Abbildung 3.4.7 b zeigt im Gegensatz zu Abbildung 3.4.7 a zwei deutliche Banden, die als spezifische Signale des Antikörpers gedeutet werden können. Es handelt sich hierbei um zwei der schon oben angesprochenen Banden: zum einen kurz oberhalb des 54 kDa Markerproteins, zum anderen bei ca. 60 kDa. Abbildung 3.4.7 a zeigt dagegen an diesen

Stellen nur sehr schwache und diffuse Signale, dafür aber ein deutliches Signal kurz unterhalb des 54 kDa Markerproteins. Da die Blots unterschiedlich lang entwickelt wurden, ist aber nicht klar, ob diese Bande bei kürzerer Entwicklungsdauer ebenso deutlich gewesen wäre. Allerdings ist dieses Phänomen auch schon früher (vgl. Abb. 3.4.5) aufgetreten, so dass auch hier vermutet werden kann, dass die Stärke dieses Signals wieder damit zu erklären ist, dass es durch Abbauprodukte der Dtx-Epoxidase zu Stande kommt.

Nach den hier gezeigten Abbildungen 3.4.4 bis 3.4.7 kommen grundsätzlich noch mehrere Banden der Westernblot-Analysen in Frage. Um nun herauszufinden, bei welchem der Signale es sich nun wirklich um Signale der Dtx-Epoxidase handelt, wurde an dieser Stelle ein Vergleich des Antiserums mit dem Präimmunserum wichtig, um die erhaltenen Signale einordnen zu können.



Lane 1: TS nach pH 11,5-Behandlung
 Lane 2: TS nach OG-Behandlung
 Lane 3: TS nach NaBr-Behandlung
 Lane 4: Kontroll-TS
 Lane 5: Marker (Firma MBI)

Lane 1: TS nach pH 11,5-Behandlung
 Lane 2: TS nach OG-Behandlung
 Lane 3: TS nach NaBr-Behandlung
 Lane 4: Kontroll-TS
 Lane 5: Marker (Firma Serva)

Abb. 3.4.8 a und b: Signale des Thylakoidproteinmusters kleiner ca. 30 kDa.

Zu sehen sind die Signale des gereinigten Antiserums (a) und des Präimmunserums (b) des Kaninchens 765 bei gleicher Entwicklungsdauer der Membranen. Deutlich ist, dass im relevanten Größenbereich nach der Inkubation im Antiserum (a) nur zwei Banden (Pfeile links) vorhanden sind, die nach einer Inkubation mit dem Präimmunserum (b) fehlen.

Der Vergleich der beiden Blots zeigt, dass im relevanten Größenbereich zwischen ca. 70 und 40 kDa eine Inkubation im Antiserum (Abb. 3.4.8 a) nur zu zwei zusätzlichen Signalen (siehe grüne Sternchen) führt, im Gegensatz zu einer Inkubation im Präimmunserum (Abb. 3.4.8 b). Es handelt sich hierbei wieder um die Bande kurz oberhalb des 54 kDa Markers und um die bei ca. 60 kDa. Die schon oben angesprochene Bande unterhalb des 54 kDa Markers ist in Abb. 3.4.8 b (Präimmunserum) ebenso stark, wie in Abb. 3.4.8 a (Antiserum), so dass sie

nicht als spezifisches Signal der Dtx-Epoxidase gedeutet werden kann. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass diese Bande mehr als ein Protein repräsentiert, so dass dennoch die Möglichkeit besteht, dass sie auch Abbauprodukte der Dtx-Epoxidase enthält. Da keine der beiden verbliebenen Banden eindeutig favorisiert werden konnte, sollen für die Größenbestimmung der Dtx-Epoxidase beide Banden berücksichtigt werden.

Die Größenbestimmung wurde an Hand von drei verschiedenen Markerproteinmischungen (Firma Serva Marker 4+5, Firma MBI Fermentas Prestained Protein Ladder ca. 10-180 kDa und Protein Ladder ca. 10-200 kDa) durchgeführt. Tabelle 3.4.1 zeigt die Ergebnisse, die leicht voneinander abweichen.

Tabelle 3.4.1: Größenbestimmungen der beiden möglichen Dtx-Epoxidase-Banden.

Angegeben sind Mittelwerte der, auf Grund der Eichproteinkurven errechneten Größen der Proteine der beiden möglichen Dtx-Epoxidase-Banden mit entsprechendem Bestimmtheitsmaß R^2 .

	Marker 4+5 (Serva)	Proteinleiter (MBI)	Vorgefärbte Proteinleiter (MBI)
Bestimmtheitsmaß (R^2)	0,997	0,992	0,993
Errechnete Proteingrößen	61 kDa 57 kDa	59 kDa 56 kDa	61 kDa 57 kDa

Die Bestimmtheitsmaße aller Korrelationen von Laufstrecke und Proteingröße sind größer als 0,99 und damit sind alle darauf beruhenden Bestimmungen durchgehend sehr gut abgesichert. Die gefundenen Variationen sind vor allen Dingen mit der Anzahl der Eichproteine in Verbindung zu bringen. Je mehr Eichproteine der verwendete Marker hat, desto niedriger ist das Bestimmtheitsmaß R^2 (Marker 4+5: 5 Eichproteine, Proteinleiter MBI: 10 Eichproteine und vorgefärbte Proteinleiter MBI 7: Eichproteine). Des Weiteren ergeht aus Tabelle 3.4.1, dass das Protein der oberen Bande zwischen 59 und 61 kDa, das der unteren zwischen 56 und 57 kDa groß ist. Da der Marker mit den kleinsten Intervallen der genaueste sein sollte, beide anderen Marker aber zu einem andern, einheitlichen Ergebnis führten, werden ungefähr die Mittelwerte, also 60 kDa für die obere und 57 kDa für die untere Bande angenommen.

4.4 Der Vergleich der Bandenintensitäten im HL und nach HL

Analysiert man den in Abbildung 3.4.7 b gezeigten Westernblot in Hinblick auf unterschiedliche Bandenintensitäten nach einer Isolation im HL oder nach HL, so ergeben sich signifikante Unterschiede. Die Quantifizierungen wurden mit Hilfe der Software Quantity One (Firma Bio Rad, USA) durchgeführt.

Tabelle 3.4.2: Mittelwerte der Proteinmengen der drei Lanes der Isolationen im bzw. nach HL.
Die Werte wurden normiert auf das gesamte Signal der jeweiligen Lane.

Isolation im HL [% des Gesamtsignals der Lane]		Isolation nach HL [% des Gesamtsignals der Lane]		Prozentualer Anteil der Proteinmenge im HL [im HL/nach HL*100]	
60 kDa-Bande	57 kDa-Bande	60 kDa-Bande	57 kDa-Bande	60 kDa-Bande	57 kDa-Bande
15,5	29,8	21,8	34,5	71,1	86,3

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Banden aus der Isolation im HL nur ca. 71% (obere Bande) und ca. 86% (untere Bande) der Proteinmenge der entsprechenden Banden aus der Isolation nach HL enthalten, bezogen auf die gesamten Signale der jeweiligen Lane. Um dieses Ergebnis zu verifizieren wurden weitere Blots mit Proben aus einer Isolation im HL bzw. einer nach HL durchgeführt. Tabelle 3.4.3 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 3.4.3: Vergleich zweier Quantifizierungen der Proteinmengen aus Isolationen im HL und nach HL.

Es wurden die Proteinmengen verschiedener Isolationen bestimmt und normiert.

Nr. der Quantifizierung	Prozentualer Anteil der Proteinmenge im HL von der nach HL vorhandenen Menge [im HL/nach HL*100]		Mittelwert der unterschiedlichen Anteile beider Banden
	60 kDa-Bande	57 kDa-Bande	
1	71,1	86,3	78,7
2	82,5	74,8	78,7

Es ergibt sich, dass im Mittel der Gehalt der Banden im HL ca. 79% von den Banden der Isolation nach HL beträgt.

IV DISKUSSION

1. Die Dtx-Epoxidase ist im Starklicht Δ pH-gehemmt, die Zx-Epoxidase nicht

In den letzten Jahren gab es mehrere Hinweise, dass das Enzym der Rückreaktion des Ddx-Zyklus, die Dtx-Epoxidase, im Gegensatz zur analogen Zx-Epoxidase, reguliert sein könnte. Jakob et al. (2001) berichteten über eine ungewöhnliche pH-Abhängigkeit des Enzyms der Hinreaktion, der Ddx-De-Epoxidase. Sie müsste diesen Untersuchungen nach, schon bei limitierenden Lichtbedingungen aktiv sein, ohne dass allerdings entsprechende De-Epoxidierungsgrade messbar wären. Daher ist eine hohe Dtx-Epoxidase-Aktivität anzunehmen, was zu der Forderung einer Starklichtregulation der Dtx-Epoxidase führt. Tatsächlich beobachteten Mewes und Richter (2002) unter Einwirkung von UV-B eine Umkehrung des Ddx-Zyklus im Starklicht und begründeten dies mit dem Rückgang einer HL-Hemmung der Dtx-Epoxidase unter zusätzlichen UV-Strahlen.

Eine solche HL-Hemmung der Dtx-Epoxidase konnte nun erstmalig eindeutig gezeigt werden. Abbildungen 3.2.4 bis 3.2.6 veranschaulichen, dass in verschiedenen Algen die zu unterschiedlichen Klassen gehören, aber alle Chl a/c und Fx, sowie den Ddx-Zyklus enthalten, im HL, im Vergleich zu LL, in vivo kaum noch Epoxidierung messbar ist. Das bedeutet, dass das Enzym im Starklicht inaktiviert wird. Im Gegensatz dazu bestätigen die durchgeführten Messungen bei Pflanzen mit Vx-Zyklus die in der Literatur beschriebene konstitutive Aktivität der Zx-Epoxidase (Pfündel und Bilger, 1994; Yamamoto et al., 1999; Müller et al., 2001), also die fehlende Regulation im HL (Abb. 3.2.1 bis 3.2.3).

Schon Mewes und Richter (2002) vermuteten auf Grund einer unter UV auftretenden Revertierung des Ddx-Zyklus eine Δ pH-Hemmung der Dtx-Epoxidase im HL. Da Polymere allgemein und damit auch Membranen ein UV-Target sind, könnte die Schädigung der Thylakoide durch UV zum Abbau des Δ pH im HL und so zur Aufhebung der Δ pH-Hemmung der Dtx-Epoxidase führen. Durch Entkopplungsexperimente konnte auch diese Vermutung bestätigt werden (Abb. 3.2.4 bis 3.2.6). Die Entkopplung der Zellen im HL führte bei allen untersuchten Algen mit Ddx-Zyklus zu einer signifikanten Steigerung der Epoxidierung und zum Teil sogar zu maximalen Umsatzraten. Bei Pflanzen mit Vx-Zyklus war diese Steigerung nicht zu beobachten. Dieses in vivo Experiment birgt allerdings noch die Möglichkeit, dass nicht die Dtx-Epoxidase direkt, sondern vielmehr die pigmentbindenden Proteine, die FCPs unter Einwirkung eines Δ pHs protoniert werden. Es wäre denkbar, dass die FCPs dann durch

die Aufhebung des ΔpH s wieder deprotoniert werden, damit Bindemotive für die Dtx-Epoxidase und das Substrat Dtx verändert werden und es so zu einer verringerten Substratverfügbarkeit für das Enzym kommen könnte. Abb. 3.3.8 und 3.3.16 zeigen dagegen, dass die induzierte HL-Hemmung auch nach einer Thylakoidpräparation zu einem signifikanten Teil noch existiert, obwohl dann kein ΔpH mehr vorliegt. Diese Tatsache ist in dem sekundenschnellen Zusammenbruch des ΔpH beim Übergang von HL zu LL bzw. Dunkelheit im Verlauf einer Isolation begründet. Da also eine einfache Protonierung von FCPs im HL nach einer Isolation im leicht alkalischen nicht mehr vorhanden sein kann, ist von einer direkten Regulation der Dtx-Epoxidase auszugehen. Abb. 3.3.16 zeigt zusätzlich noch, wie die Aktivität der Dtx-Epoxidase im LL im Anschluss an eine HL-Phase zurückkehrt. Dieser Anstieg der Dtx-Epoxidase-Aktivität verläuft auch parallel zur zeitgleich gemessenen NPQ-Kurve. So konnte gezeigt werden, dass das NPQ erst dann wieder deutlich abfällt, wenn die Dtx-Epoxidase nach der HL-Phase wieder aktiv ist. Diese Daten zeigen allerdings nicht, ob die Dtx-Epoxidase selbst das Target für die ΔpH -Regulation ist, oder ob weitere Komponenten zur Signaltransduktion vorhanden sind.

2. Die Dtx-Epoxidase muss reguliert sein, da Dtx auch ohne ΔpH ein Quencher ist

Nachdem im letzten Kapitel die ΔpH -Regulation der Dtx-Epoxidase im Gegensatz zur Zx-Epoxidase diskutiert wurde, stellt sich nun die Frage nach dem Grund für diese Regulation. Um diese Frage beantworten zu können, muss der Vx-Zyklus mit dem Ddx-Zyklus verglichen werden, um Unterschiede aufdecken zu können. Ein solcher Vergleich führt zu den vorhandenen Pigmenten Zx und Dtx, die sich in ihren Eigenschaften als Quencher unterscheiden (Abb. 3.1.1 bis 3.1.9). Während Dtx alleine ausreichend ist, um, selbst im Dunkeln nach dem Zusammenbruch des ΔpH , ein Quenching aufzubauen (Abb. 3.1.8 a und b und 3.1.9 a und b), benötigt Zx zusätzlich einen ΔpH (Abb. 3.1.1, 3.1.3 und 3.1.4). Dass der ΔpH für den Mechanismus des Zx-abhängigen Quenching wichtig sei, schlugen auch Goss et al. (1995) schon vor. Niyogi (1999) bestätigten dies ebenfalls mit ihren Untersuchungen an Mutanten, die konstitutiv Zx akkumulierten, aber dennoch zusätzlich den ΔpH benötigten zum Aufbau eines NPQ. Das bedeutet, dass Pflanzen mit Vx-Zyklus über den ΔpH eine Möglichkeit besitzen, sehr schnell von einem Zustand effizienter Dissipation im HL umzuschalten in einen Zustand effizienter Lichtsammlung im Fall eines Rückgangs der Lichtintensitäten. Allerdings berichten Rees et al. (1992) auch, dass Zx-freie Thylakoide zwar

ein hohes NPQ zeigen können, aber erst bei deutlich höherem ΔpH . Dies zeigt die Notwendigkeit beider Komponenten, Z_x und ΔpH , zum effizienten Aufbau eines NPQ. Wie wichtig welche Komponente ist, hängt dabei von der jeweils untersuchten Pflanzenspezies ab (Horton et al., 1994).

Den Algen mit Ddx-Zyklus ist die Möglichkeit eines schnellen Wechsels zwischen Lichtsammlung und Energiedissipation, auf Grund der fehlenden ΔpH -Abhängigkeit des Dtx-abhängigen NPQ nicht gegeben. Aus der Notwendigkeit für ein schnelles Umschalten von dem dissipierenden Zustand in den sammelnden Zustand der Antennen ergibt sich auch die Forderung nach einer hoch aktiven Dtx-Epoxidase. Nur so ist es möglich einmal akkumuliertes Dtx möglichst schnell wieder in Ddx umzuwandeln. Ein Vergleich der Kinetiken der Epoxidierung bei Pflanzen mit V_x -, bzw. mit Ddx-Zyklus (vgl. Abb. 3.2.1 bis 3.2.6 und 4.1) zeigt, dass diese Forderung erfüllt wird.

Wenn allerdings eine Epoxidase mit sehr hohen Umsatzraten vorhanden ist, müsste trotzdem die Akkumulation von Dtx im HL gesichert werden. Dazu müsste entweder die Ddx-De-Epoxidase noch höhere Umsatzraten haben, aber im Dunklen gehemmt sein, oder aber die Dtx-Epoxidase im HL gehemmt sein. Da schon die Untersuchungen von Jakob et al. (2001) zeigten, dass die Ddx-De-Epoxidase schon bei limitierenden Lichtbedingungen aktiv ist, es im LL aber nicht zum Aufbau eines De-Epoxidierungsgrads kommt, erscheint die nun gezeigte ΔpH -Regulation der Dtx-Epoxidase umso logischer und gut begründet.

Weiterhin von Interesse ist auch, warum Z_x einen ΔpH benötigt, Dtx aber nicht. Dies ist allerdings schwer zu beantworten, da in der Literatur verschiedenen Mechanismen diskutiert werden, wie ein Pigment zu einem Quenching führen kann. Müller et al. (2001) schlagen vor, dass eher strukturelle als energetische Unterschiede der Pigmente wichtig sind. So haben Z_x , A_x und Dtx eine de-epoxidierte 3-hydroxy- β -Ring-Endgruppe, im Gegensatz zu V_x , Ddx und anderen Xanthophylle (vgl. Abb. 1.1 und 1.2).

Unter der Annahme Z_x sei ein direkter Quencher, könnte der ΔpH zu der nötigen Asymmetrie des Membran-durchspannenden Xanthophylls Z_x führen, in dem er den normalerweise verbotenen S_0 - S_1 -Übergang ermöglicht (Owens, 1994). Da Dtx als Mono-Epoxid ein permanent asymmetrisches Molekül ist, hätte der ΔpH hier keine analoge Funktion. Alternativ könnte der ΔpH zu einer Verstärkung der Interaktion zwischen Z_x und Chl a Molekülen führen. Dies wäre auf Grund einer Protonierung von Bindestellen im LHC denkbar, was die Lösung von Chl a Molekülen zur Folge haben könnte (Crofts und Yerkes, 1994). Wie ein solcher Mechanismus analog bei den FCPs aussehen könnte ist spekulativ, da solche Studien noch fehlen. Genauso möglich wäre auch, dass die Bindung von Z_x an die protonierte

Untereinheit PsbS zu verstärkten Wechselwirkungen von Chl a und Zx führen könnte (Li et al., 2000 und 2004). Da bisher allerdings kein PsbS-Analogon bei *P. tricornutum* identifiziert werden konnte (Lavaud et al., 2002), scheint diese Möglichkeit bei den Pflanzen mit Ddx-Zyklus auszuschneiden.

3. Bei allen Fx-haltigen Algen hat die Epoxidase eine hohe Aktivität

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Organismen eine unterschiedlich schnelle Epoxidierung aufweisen. Um dies zu verdeutlichen, sollen die Kurven mit der jeweils höchsten Geschwindigkeit miteinander verglichen werden. Daher werden in Abbildung 4.1 die LL-Kurven von *S. vacuolatus*, *P. tricornutum*, *P. parvum* und *C. meneghiniana*, sowie die Kurven im HL unter Entkopplung von *H. carterae* und *E. canadensis* gegen die Zeit aufgetragen. Zusätzlich enthält die Abbildung noch eine LL-Kurve von Spinat, die mit Blattscheiben aufgenommen wurde.

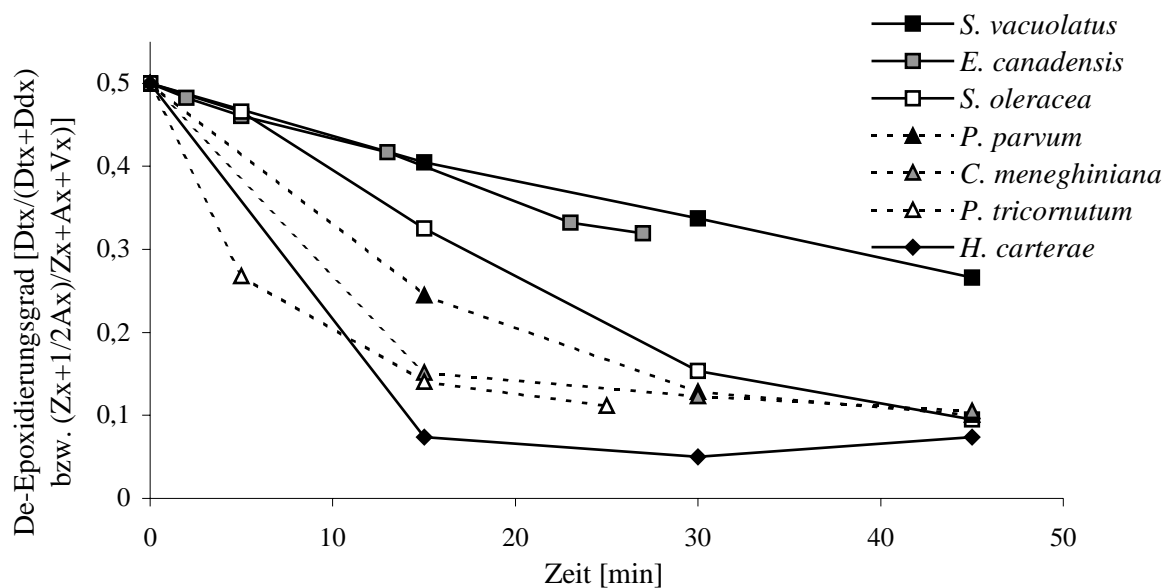


Abb. 4.1: Zeitlicher Verlauf der maximalen Epoxidierung bei Chl a/b haltigen Organismen (Quadrate) mit Vx-Zyklus (durchgezogene Linie), bei einem Fx-Chl a/c-haltigen Organismus (Rauten) mit Vx-Zyklus (durchgezogene Linie) und bei Fx-Chl a/c-haltigen Organismen (Dreiecke) mit Ddx-Zyklus (gepunktete Linie).

Die Chl a/b-haltigen Organismen ohne Fx mit Vx-Zyklus zeigen hier die langsamsten Kinetiken, *H. carterae* als der einzige Organismus mit Fx, Chl a/c und dem Vx-Zyklus hat die schnellste Kinetik, während sich die Organismen mit Fx, Chl a/c und dem Ddx-Zyklus, in der Mitte ansiedeln.

Dass der vorhandene X-Zyklus und dessen Regulation allein nicht der Grund für die unterschiedlich hohen Epoxidierungsraten sein kann zeigt der Organismus *H. carterae*. Diese Alge weist die höchsten Epoxidierungsraten von allen untersuchten Organismen auf (Abb. 4.1), besitzt aber den Vx-Zyklus, das heißt eine nicht regulierte Epoxidase. Nun ist es von

Interesse, in wie fern Zusammenhänge zwischen der maximalen Geschwindigkeit der Epoxidierung, dem X-Zyklus und dessen Regulation, sowie der Pigmentierung bestehen.

Abbildung 4.1 verdeutlicht, dass alle Organismen, die in ihrer Antenne Fx enthalten deutlich schnellere Umsatzraten zeigen, als die ohne Fx. Daraus geht hervor, dass die Art der Pigmentierung des entsprechenden Lichtsammelsystems letztendlich ausschlaggebend sein könnte für die Geschwindigkeiten der Epoxidierung, unabhängig vom vorhandenen X-Zyklus. Fraglich ist an dieser Stelle, wie es in einem System wie bei *H. carterae* dann überhaupt zur Akkumulation von Zx und/oder Ax kommen kann. Hierzu ist zu sagen, dass bei *H. carterae* grundsätzlich nur extrem niedrige De-Epoxidierungsgrade erreicht wurden und diese auch erst unter schätzungsweise über den natürlich vorkommenden Lichtintensitäten im Meer (PPFD = 1500). Außerdem handelt es sich um einen begeißelten Organismus, so dass sich die Algenzellen bei Lichtstress auch von dem Licht weg, also in tiefere Wasserschichten bewegen können. Ähnlich photophobe Reaktionen sind von dem Organismus *Euglena* bekannt, der keinen X-Zyklus besitzt.

Wie aber ist der Zusammenhang zwischen der Pigmentierung der Antenne, also dem Vorhandensein von Fx und der hohen Aktivität der Epoxidase zu erklären? In der Einleitung (Punkt 2.5) wurde bereits beschrieben, wie die X-Zyklen in die verschiedenen Carotinoïdsynthesewege eingebunden sind (vgl. Abb. 1.3). Dabei wurde deutlich, dass Fx am Ende des Synthesewegs steht, während die Pigmente der X-Zyklen Intermediate auf dem Weg zu Fx darstellen. Wichtig ist hier auch, dass Zx eine Vorstufe von Vx ist und dass Ddx gleichermaßen für Dtx aber auch für Fx eine Vorstufe darstellt. Das bedeutet, dass die De-Epoxidierung hin zu Zx bzw. Dtx entgegengesetzt zur Synthese des Massenpigments Fx läuft (vgl. Abb. 1.3). Um nun aber unter limitierenden Lichtbedingungen eine optimale und effiziente Lichtsammlung zu gewährleisten, ist eventuell auch eine Neusynthese von Fx erforderlich. Daher erscheint es sinnvoll für Pflanzen mit Fx in der Antenne, unter limitierenden Lichtbedingungen die Epoxidierungsreaktion mit hohen Raten ablaufen zu lassen, um ausreichend Vx bzw. Ddx zur Synthese von Fx zur Verfügung zu stellen.

Folgende Abbildung soll nun die Zusammenhänge zwischen den X-Zyklen, deren Regulation, dem NPQ und den Carotinoïdbiosynthesen veranschaulichen.

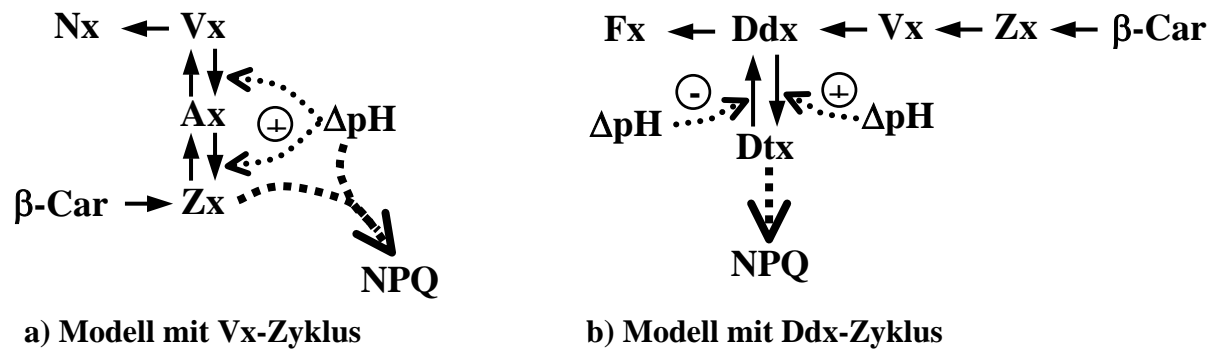


Abb. 4.2 a und b: Modelle der Zusammenhänge zwischen den X-Zyklen, der Entstehung von NPQ und den Carotinoidbiosynthesen in Pflanzen mit Vx- bzw. Ddx-Zyklus.

a) In Pflanzen mit Vx-Zyklus sind Zx und der ΔpH notwendig für den Aufbau von NPQ. Außerdem aktiviert der ΔpH die Hinreaktion des Vx-Zyklus, also die Synthese von Zx aus Vx. Vx ist des Weiteren im Verlauf der Carotinoidbiosynthesen eine Vorstufe für das Lichtsammelpigment Nx, das allerdings im Gegensatz zu Fx nur in sehr geringen Mengen vorkommt.

b) In Algen mit Ddx-Zyklus ist für die Entstehung von NPQ die Anwesenheit von Dtx ausreichend. Der ΔpH aktiviert die Hinreaktion und inhibiert die Rückreaktion des Ddx-Zyklus. Ist kein ΔpH vorhanden, ist die Hemmung der Rückreaktion aufgehoben und Dtx wird schnell wieder in Ddx umgewandelt. Des Weiteren ist Ddx im Verlauf der Carotinoidbiosynthesen eine Vorstufe des Lichtsammelpigments Fx, dessen Anteil bis zu 50% der Lichtsammelpigmente betragen kann.

4. Die Identifizierung der Dtx-Epoxidase

Die Analysen mittels SDS-PAGE und Westernblotting führten letztendlich zu drei Signalen, die der Dtx-Epoxidase zuzuordnen sind. Die erste Bande entspricht einem ungefähren Molekulargewicht von 60 kDa, die zweite, stärkere von ca. 57 kDa und die dritte von ca. 52 kDa, deren Intensität stark schwankte. Die Frage ist, warum der Antikörper mehr als ein spezifisches Signal lieferte. Da der Antikörper gegen eine Konsensussequenz der drei von Lohr gefundenen c-DNA-Sequenzen (persönliche Mitteilung, 2004) synthetisiert wurde, ist es durchaus möglich, dass der Dtx-Epoxidase nicht nur eine Bande zuzuordnen ist, sondern sie in der Zelle in mehreren Isoformen vorkommt, was sich z.B. in mehreren Signalen auf dem jeweiligen Blot ausdrücken könnte. Ebenso könnten posttranslationale Modifikationen am Enzym das Laufverhalten im Gel beeinflussen. Die Banden würden demnach für jeweils unterschiedlich modifizierte Fraktionen stehen, eine eventuell für eine nicht modifizierte Fraktion der Dtx-Epoxidase.

Bouvier et al. (1996) berichteten ebenfalls von zwei Signalen der Zx-Epoxidase, eins bei 65 kDa, das zweite bei 58 kDa, welches dominierte. Es zeigen sich also gewisse Ähnlichkeiten mit den hier präsentierten Daten, da auch hier die mittlere Bande im Gegensatz zur oberen dominierte. Die starken Schwankungen der untersten Bande bleiben zunächst fraglich. Allerdings hatte das in *E. coli* expremierte Enzym eine Größe von 65 kDa, weshalb Bouvier et al. (1996) die zweite, stärkere Bande bei 58 kDa mit einem durch die PEST-Regionen kontrollierten Proteinabbau erklären. Da auch im Laufe der vorliegenden Arbeit gezeigt

werden konnte, dass Probleme aufgetreten waren, die mit einem starken Proteinabbau zu erklären wären, erscheint diese Möglichkeit als wahrscheinlich, kann aber so nicht bewiesen werden.

Da außerdem gezeigt werden konnte, dass die unterste Bande vor allen Dingen dann stark wird, wenn die beiden oberen Signale deutlich zurückgehen (vgl. Abb. 3.4.5 und 3.4.7), scheint das Protein der unteren Bande ein Abbauprodukt der Proteine der beiden oberen Banden darzustellen. Da eine Belichtung unter DTT zu einer extremen Verstärkung der untersten Bande und auch zu einer damit korrespondierenden Schwächung der oberen beiden Banden führte, scheint es sich um kontrollierten Proteinabbau unter sehr starkem Lichtstress zu handeln. Diese Ergebnisse sind mit den Interpretationen von Bouvier et al. absolut konsistent und unterstützen die Annahme, dass es sich auch bei der Dtx-Epoxidase um ein empfindliches Enzym handelt, das unter extremen Bedingungen einem hohen turn-over unterliegt. Ein Grund hierfür könnte darin liegen, dass unter sehr starkem Lichtstress der Abbau des Enzyms der Rückreaktion die De-Epoxidierung beschleunigen und damit die Adaptation an den Stressfaktor intensivieren könnte.

Allerdings widerspricht der Vergleich mit den Signalen des Präimmuserums und den gefärbten Gelen der Annahme, dass es sich bei der Bande bei ca. 52 kDa um ein Signal der Dtx-Epoxidase handelt, da in diesen beiden Fällen keine deutliche Bande zu sehen sein sollte. An dieser Stelle ergibt sich also die Notwendigkeit für eine bessere Auftrennung der Proteine im Bereich zwischen ca. 50 und 60 kDa, um zu klären, ob die gefundenen Banden wirklich von nur einem Protein gebildet werden. Dies wäre z.B. durch eine zweidimensionale Elektrophorese möglich, bei der die zweite Dimension eine isoelektrische Fokussierung darstellt. Auch eine vorherige Anreinigung des Enzyms wäre sinnvoll. Allerdings müsste hierzu zunächst ein Nachweissystem entwickelt werden, in dem die Dtx-Epoxidase ihre Aktivität nach Ablösung von den Thylakoiden behält.

Gegen einen starken Proteinabbau spricht auch, dass bei hohen Lichtintensitäten und/oder CO₂-Mangel die Dtx-Epoxidase innerhalb weniger Minuten inaktiviert wird, ohne dass dies so schnell auch zu einem Proteinabbau führen würde. Welchen Vorteil dann ein zusätzlicher Proteinabbau verschafft bleibt unklar. Es könnte allerdings möglich sein, dass die Dtx-Epoxidase ein Target für Sauerstoff-Radikale darstellt, die unter extremen Bedingungen am PS II entstehen. So würde die Pflanze im HL nur ein Protein „opfern“, dessen Aktivität unter diesen Bedingungen als kontraproduktiv bezeichnet werden kann, dafür andere wichtige Proteine aber vor einer Schädigung schützen. Da bei Kieselalgen nicht bekannt ist, wie entstandene Sauerstoff-Radikale entsorgt werden können, könnte dieser Abbau der Dtx-

Epoxidase unter extremem Lichtstress einen Regulationsmechanismus zur Entgiftung der Radikale im HL darstellen.

5. Der Mechanismus der Δ pH-Regulation der Dtx-Epoxidase

Wenn die Frage nach einer Δ pH-Regulation der Dtx-Epoxidase gestellt wird, so müssen zunächst einige grundsätzliche Dinge betrachtet werden, z.B. wie überhaupt die Kompartimentierung in Chloroplasten von Kieselalgen gewährleistet ist. Es ist bekannt, dass Kieselalgen der Gattung Pennales zwei große Chloroplasten, einen je Epi- und Hypotheka besitzen. In den Chloroplasten sind die Thylakoide nicht, wie bei Höheren Pflanzen in Stroma- und Granathylakoide gegliedert, sondern in sogenannte Dreierlamellen (Hoek, 1993). Hieraus ergibt sich auch das grundsätzliche Problem der Isolation intakter Thylakoide, da diese langen Lamellen beim Zerstören der Zell- und Chloroplastenhülle ebenfalls zerstört werden. Darüber hinaus ist unklar, wie groß unter solchen Bedingungen der Δ pH wird, insbesondere wie groß die pH-Änderungen im Stroma sind, da keine Daten über Volumina der Kompartimente Stroma und Lumen vorhanden sind. Für Höhere Pflanzen kann der Δ pH unter sättigendem Dauerlicht bis zu drei Einheiten betragen und die pH-Änderungen im Stroma können von pH 6,5 im Dunkeln bis pH 8 im HL reichen (Wildner, 1999). Da dies für Kieselalgen nicht geklärt ist, ist auch nicht klar, welche Rolle der Δ pH spielt, in Bezug auf eventuelle Proteine, die im HL protoniert oder auch phosphoryliert werden.

Bekannt sind einige prinzipielle Systeme in der Regulation der Photosynthese der Höheren Pflanzen. Z.B. ist das Prinzip von Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen bekannt, was über das ATP/ADP-Verhältnis reguliert wird. Da der Δ pH zur ATP-Synthese benötigt wird, ist klar, dass diese beiden Komponenten in enger Verbindung stehen müssen. Des Weiteren ist der Reduktionsgrad der Chloroplasten eng an den Δ pH gekoppelt, so dass auch eine Reduktion der Dtx-Epoxidase im HL bzw. eine Oxidation im LL denkbar wäre.

5.1 Die Δ pH-Hemmung ist nicht durch die pH-Abhängigkeit der Dtx-Epoxidase zu erklären

Um den Mechanismus der in vivo beobachteten Δ pH-Hemmung der Dtx-Epoxidase im HL zu erklären, stellt sich einerseits die Frage, was an den Thylakoiden von *P. tricornutum* im HL passiert und andererseits was davon zur Hemmung der Dtx-Epoxidase führt. Die in vivo beobachtete Δ pH-Hemmung im HL ließe sich, analog zur Regulation der De-Epoxidasen, am einfachsten durch eine direkte pH-Abhängigkeit des Enzyms erklären. Betrachtet man jedoch die pH-Optimumskurve der Dtx-Epoxidase (vgl. Abb. 3.3.2), so fällt auf, dass sie kein

scharfes, sondern ganz im Gegenteil ein sehr breites Optimum besitzt, das auch als Plateau von pH 7,5 bis 9,5 bezeichnet werden kann. Da dieser pH-Bereich dem im HL im Stroma ungefähr zu erwartenden pH-Wert entspricht und keine kooperative Reaktion auf eine Ansäuerung oder Alkalisierung des Mediums zu sehen ist, sprechen diese Fakten gegen eine direkte pH-Abhängigkeit der Dtx-Epoxidase. Dies wirft was die Frage auf, wie der Δ pH der energienisierten Thylakoide sonst zu einer Hemmung des Enzyms führen kann.

5.2 Phosphorylierung/Dephosphorylierung als möglicher Regulationsmechanismus

Es gibt verschiedene Proteine, wie z.B. den LHC, die als Phosphoproteine bekannt sind (Allen, 1992). Phosphoproteine werden im allgemeinen im HL, wenn das ATP/ADP-Verhältnis groß ist phosphoryliert und bei dessen Abnahme wieder dephosphoryliert. Im Fall des LHC führt dies zu state transitions, also zur Abkopplung der äußeren Antenne des PS II.

Die Möglichkeit einer Regulation über Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Dtx-Epoxidase kann nicht völlig ausgeschlossen werden, obwohl der fehlende Einfluss von ATP und ADP (vgl. Abb. 3.3.9) in vitro zunächst dagegen spricht. Die in vivo Daten sprechen allerdings für eine leichte Hemmung der Epoxidierung durch eine Hemmung von Chloroplasten-Phosphatasen (vgl. Abb. 3.2.7).

Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, dass auch Xu et al. (1999) eine direkte Hemmung der Zx-Epoxidase durch NaF nur als eine von mehreren Möglichkeiten betrachten. Es wäre genauso möglich, dass die Dephosphorylierung eines Phosphoproteins das eine Bindestelle für die Zx-Epoxidase besitzt über eine verringerte Substratverfügbarkeit die Epoxidierung hemmt. Als solches Bindeprotein schlagen Xu et al. (1999) ein Protein der inneren Antenne, das CP29 vor. Dieses ist als Phosphoprotein (Ruben et al., 1994; Bassi et al., 1993) bekannt und wurde auch schon als Antennenprotein mit erhöhter Zx-Konzentration pro Protein diskutiert (Goss et al., 1997; Bassi et al., 1993). Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass in Diatomeen eben dieses CP29, bzw. ein entsprechendes Analogon nicht existiert (Müller et al., 2001). Allgemein gibt es allerdings keine Berichte darüber, wie genau in *P. tricornutum* die Antennen aufgebaut sind und welche der vorhandenen Proteine Ddx bzw. Dtx binden. Rhiel et al. (1997) fanden durch Messungen mit HL- und LL-adaptierten Zellen einer Kieselalge Hinweise für eine Differenzierung in majore und minore Antennen. Je nach dem unter welchen Bedingungen die Algen angezogen wurden, kam es zu veränderten Konzentrationen von β -Carotin, Fx und Ddx bzw. Dtx bezogen auf Chl a. Lavaud et al. (2003) fanden in allen, durch Saccharose-Dichtegradienten getrennten FCP-Fraktionen Ddx. Allerdings war es den Autoren nicht möglich den verschiedenen Fraktionen bestimmte

Proteine der FCP-Familie zuzuordnen. Daher ist unklar geblieben, an welche Proteine Ddx tatsächlich gebunden ist und wie die entsprechenden Proteine im HL modifiziert werden könnten. Allerdings fanden auch Lavaud et al. (2002, 2003) Unterschiede in den Konzentrationen der Xanthophylle Fx und Ddx bzw. Dtx, in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen.

Des Weiteren ist nicht klar, ob die bei Höheren Pflanzen bekannten makroskopischen Membranveränderungen auch in Kieselalgen analog ablaufen. Färber und Jahns (1998) berichten, dass in den gestapelten Thylakoiden Höherer Pflanzen die Epoxidierung grundsätzlich langsamer verläuft, als in nicht gestapelten. In Kieselalgen ist allerdings nicht klar, ob die Stapelung der Dreierlamellen der Stapelung der Grana in Höheren Pflanzen und Grünalgen entspricht. In Höheren Pflanzen und Grünalgen wird die Stapelung der Thylakoide durch die Phosphorylierung des LHC aufgehoben, wodurch state-transitions (Zustandsänderungen) möglich werden (Allen, 1992). Dadurch stellen diese Thylakoide ein dynamisches System dar. Ist dies auch bei Kieselalgen der Fall, so würde eine Phosphorylierung der FCPs zu einer Lösung der Lamellen voneinander und damit zu höheren Epoxidierungsraten im HL führen und eine Hemmung der Phosphatasen damit zu unverändert hohen Epoxidierungsraten im LL. Dies würde also den verringerten Epoxidierungsraten nach Hemmung von Phosphatasen widersprechen.

Da aber bei *P. tricornutum* nicht klar ist, welche Proteine eventuell phosphoryliert werden und welche Proteine wichtig sind zum Aufbau eines NPQ, ist jede Diskussion um eventuelle Bindeproteine für die Dtx-Epoxidase und ihr Substrat Dtx extrem spekulativ.

5.3 Oxidation/Reduktion als möglicher Regulationsmechanismus

Als eine weitere, grundsätzliche Option ist die Regulation in Abhängigkeit vom Reduktionsgrad der Thylakoide und Chloroplasten zu sehen. Es ist bekannt, dass verschiedene Proteine der Photosynthese, wie z.B. die γ -UE der ATP-Synthase über NADPH und das Thioredoxin-System reguliert werden (Nalin und McCarty, 1983; Wildner, 1999). Diese Regulation beruht auf dem Einstellen eines Gleichgewichts zwischen Oxidation und Reduktion der Thioredoxine und damit auch der zu regulierenden Proteine. Zu welchem Teil die Thioredoxine und ihre entsprechenden Proteine reduziert sind hängt direkt ab vom Reduktionsgrad des NADPH. Dieser ist allerdings im Licht immer recht hoch und im Dunkeln niedrig, ändert sich also bei Schwankungen der Lichtintensitäten nur geringfügig. Dies ist mit dem Einstellen eines Gleichgewichts zwischen Calvinzyklus als ATP- und

NADPH-verbrauchenden Prozess und der photosynthetischen Primärreaktion als ATP- und NADPH-generierenden Prozess im Licht zu erklären.

Angenommen die Dtx-Epoxidase würde nun auch durch das Thioredoxin-System reguliert werden, so müsste ein hoher Reduktionsgrad hemmend wirken, da dies dem Zustand im HL entspricht. Die Aufhebung des ΔpHs durch Entkopplung führt aber wenn überhaupt nur zu einer sehr geringen Veränderung des Reduktionsgrads der Zelle, wie an Hand von NAD(P)H-Messungen gezeigt werden konnte (Pinto 2001). Also ist dadurch der schnelle Anstieg der Epoxidase-Aktivität bei Entkopplung im HL nicht zu erklären. Auch zeigten NAD(P)H-Messungen, dass sich der Reduktionsgrad im LL nur geringfügig verringert (Pinto, 2001), so dass auch die hohen Epoxidierungsraten im LL über dieses System nicht zu erklären sind. Wie auch Richter et al. (in press) an Hand der Reduktion der γ -Untereinheit der ATP-Synthase zeigen konnten, gewährleistet das Thioredoxin-System nur eine Unterscheidung zwischen hell und dunkel, nicht aber zwischen LL und HL und ist somit für die notwendige Feinregulation der Dtx-Epoxidase nicht geeignet.

5.4 Die Regulation der Dtx-Epoxidase unter der Annahme einer Lokalisation im Lumen

Bei allen Überlegungen, die man über den Dtx-Zyklus macht, ist ein wichtiger Punkt, dass einige Fakten, wie z.B. die Lokalisation der Dtx-Epoxidase im Stroma nie gezeigt wurden, sondern aus Analogieüberlegungen zur Zx-Epoxidase abgeleitet wurden. Für die Zx-Epoxidase wurde diese Annahme dadurch gestützt, dass das Cosubstrat NADPH nicht durch die Thylakoidmembran diffundieren kann. Als zusätzliches Argument diente die Beobachtung, dass die Zx-Epoxidase mit einem pH-Optimum um 7,5 im HL konstitutiv aktiv ist und daher also nicht im Lumen lokalisiert sein kann (Hager, 1975). Diese Indizien wurde allerdings für die Zx-Epoxidase nie eindeutig bewiesen und für die Dtx-Epoxidase nie untersucht. Es ergibt sich also die Möglichkeit, dass die Dtx-Epoxidase im Lumen lokalisiert sein könnte. Abbildung 4.3 veranschaulicht schematisch diese Option.

Für diesen Aufbau des Dtx-Zyklus spricht, dass es sich bei der Umwandlung der Pigmente ineinander nur um einen einfachen (De-) Epoxidierungsschritt handelt. Das heißt, dass die Pigmente in der Membran nicht wie beim Vx-Zyklus ihre Orientierung ändern, also nicht gedreht werden müssten, was sich positiv auf die Umsatzraten auswirken könnte. Außerdem würde dieses Schema auch mit der gemessenen pH-Optimumskurve der Dtx-Epoxidase (siehe Abb. 3.3.2) und mit der reversiblen Hemmbarkeit im Säuren bei pH 5 (siehe Abb. 3.3.10) korrelieren. Es wäre vorstellbar, dass im Zuge der Ansäuerung des Lumens die Dtx-

Epoxidase Moleküle nach und nach protoniert und dadurch inaktiviert würden. Allerdings wäre es dann wahrscheinlich, dass die Dtx-Epoxidase-Moleküle auch im Säuren an der Membran gebunden blieben, da nach einer Isolation bei pH 5 und 5,5 vollständige Epoxidase-Aktivität messbar war (vgl. Abb. 3.3.6). Dieses Schema würde auch mit älteren *in vivo* Daten korrelieren, die zeigen, dass nach der Zugabe von DTT zu unterschiedlichen Zeitpunkten während einer Fluoreszenzinduktion die Epoxidierung schrittweise stärker bis, mit Erreichen des steady state, annähernd vollständig gehemmt ist (Pinto, 2001). Konkret würde das bedeuten, dass eine schrittweise Protonierung im Zuge der Ansäuerung des Lumens nach und nach zu einer Inaktivierung der Dtx-Epoxidase führen würde. Je größer also der Anteil der schon protonierten Enzyme ist, desto kleiner würde die Revertierung des Quenching nach einer Hemmung der Ddx-Epoxidase durch DTT werden.

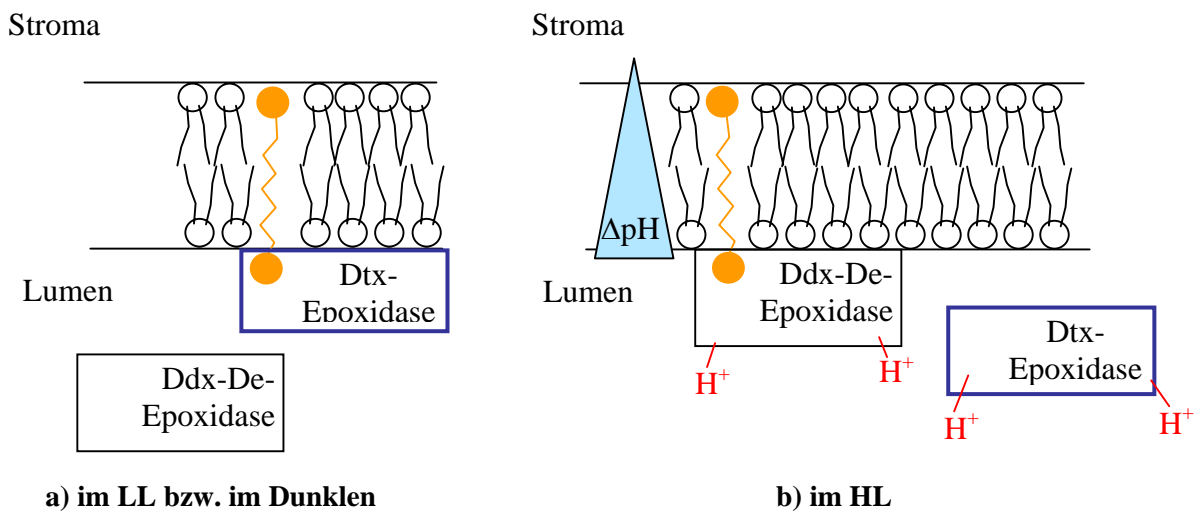


Abb. 4.3 a und b: Regulation der Dtx-Epoxidase unter der Annahme einer Lokalisation im Lumen

Beide Enzyme (Ddx-De-Epoxidase und Dtx-Epoxidase) sind auf der gleichen Seite der Thylakoidmembran, nämlich im Lumen lokalisiert. Berücksichtigt ist die Protonierung der Enzyme in Folge der Ansäuerung des Lumens im HL (b), im Vergleich zur Situation ohne ΔpH , also im LL bzw. im Dunkeln (a).

Gegen diese Lokalisation spricht, wie bei der Zx-Epoxidase auch, dass das Cosubstrat NADPH nicht in der Lage ist per Diffusion eine Membran zu durchdringen. Es sind auch keine Translokatoren für NADPH in der Thylakoidmembran bekannt. Ob eventuell Fd die Thylakoidmembran per Diffusion durchdringen könnte ist unklar, allerdings, auf Grund seiner polaren Eigenschaften, nicht wahrscheinlich. Über das Vorhandensein eines Fd-Translokators ist aber ebenfalls nichts bekannt. Allerdings ist dieses Argument ein wenig zu entkräften, da nicht klar ist, wie Ascorbat, das Cosubstrat der luminal lokalisierten Ddx-De-Epoxidase Membranen überqueren kann.

Davon ausgehend, dass die Dtx-Epoxidase im Lumen lokalisiert ist, wäre im Falle einer Ablösung von der Membran im HL keine Aktivität mehr nach einer Isolation im Sauren zu erwarten. Die gemessene volle Aktivität des Enzyms nach einer Isolationen bei pH 5, bzw. 5,5 (vgl. Abb. 3.3.6), spricht also gegen eine pH-bedingte Ablösung von der Membran, allerdings nicht direkt gegen eine lumenale Lokalisation. Dies korreliert allerdings nicht mit dem dauerhaften Verlust der Epoxidase-Aktivität nach eine Isolation im HL, da ein alkalischer pH-Wert eine Deprotonierung und damit eine Rückkehr der Aktivität zur Folge haben müsste. Außerdem sprechen auch die unterschiedlichen Mengen der Epoxidase nach einer Isolation im HL bzw. nach HL (vgl. Tabelle 3.4.3) für eine Ablösung des Enzyms von der Membran im HL, was eine Lokalisation im Lumen wiederum unwahrscheinlicher erscheinen lässt.

5.5 Offene Frage und spekulative Antworten zum Regulationsmechanismus der Dtx Epoxidase

Da die prinzipiellen Regulationssysteme der Photosynthese Höherer Pflanzen die Δ pH-Hemmung der Dtx-Epoxidase nicht ausreichend erklären können, wird die Suche nach neuen Komponenten für eine solche Regulation wichtig. Es stellt sich die Frage, ob die Art der Bindung der Dtx-Epoxidase an die Thylakoidmembran hierbei hilfreich sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit NaBr bzw. mit pH 11,5 zu einer irreversiblen Inaktivierung der Dtx-Epoxidase führte. Da nach der NaBr-Behandlung die Banden des Köpfchens der ATP-Synthase fehlten, ist sicher, dass die Behandlung mit Hochsalz auch bei *P. tricornutum* geeignet war, peripher gebundene Proteine von der Membran zu lösen. Da aber unter beiden Bedingungen das Enzym noch von dem Antikörper detektiert werden konnte, muss es sich um innermolekulare Veränderungen handeln, die zur Inaktivierung führten. Da beide Bedingungen zu unspezifischen Störungen elektrostatischer (ionischer) Wechselwirkungen führen, scheint die Struktur der Dtx-Epoxidase empfindlich auf Änderungen der Ionenkonzentration im umgebenden Milieu zu reagieren. Da eine Behandlung mit EDTA, die bivalente Kationen bindet, ohne negativen Effekt bleibt, kann man annehmen, dass der Entzug der positiven Ladungen weniger schädlich ist, als das Zuführen von Ladungen. Der unphysiologische Charakter der hier diskutierten Bedingungen, verhindert aber eine weiterführende Charakterisierung der Regulation des Enzyms auf Grund dieser Ergebnisse.

Eine Behandlung mit OG, mit der eine Störung hydrophiler und auch hydrophober Wechselwirkungen einherging, führte dann zu einer irreversiblen Hemmung und auch zur

Ablösung der Dtx-Epoxidase (vgl. Abb. 3.3.13, 3.3.18 und 3.4.6). Das heißt, dass das Enzym durch eine milde Behandlung mit Detergenzien unter dem CMC solubilisiert werden kann, was für eine anschließende Reinigung und Aufkonzentrierung genutzt werden könnte.

Neuste Untersuchungen (Goss, persönliche Mitteilung, 2004) zeigen für die De-Epoxidasen, dass die Struktur der Lipidphase der Thylakoide entscheidend für die Aktivität der De-Epoxidasen sind. So konnten mit Lipiden wie z.B. MGDG, die revers-hexagonale Phasen bilden (Wieslander et al., 1982) hohe Aktivitäten gemessen werden, während sich Lipide wie z.B. DGDG, die lamellare oder kubische Phasen bilden (Wieslander et al., 1982), negativ auf die Aktivitäten auswirkten. Demnach scheint nicht die Ladung, sondern die Oberflächenstruktur der Enzyme und der Membranen entscheidend für die Bindung und somit für die De-Epoxidierung zu sein. Allerdings ist nach Wieslander et al. (1982) nur die lamellare Lipidphase kompatibel mit funktionalen Biomembranen. Mock und Kroon (2002) konnten in Diatomeen der arktischen Gewässer einen Zusammenhang zwischen sinkenden Temperaturen und steigendem MGDG:DGDG-Verhältnis zeigen, was sie mit der dadurch veränderten Fluidität der Membran begründen. Sie konnten auch zeigen, dass die lamellare Membranstruktur durch einen erhöhten Anteil an Pigment-Protein-Komplexen stabilisiert wird. Aus diesen Daten kann man ableiten, dass eine veränderte Zusammensetzung der Thylakoidmembran durch Stressoren einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität der X-Zyklus-Enzyme haben und dies in Zusammenhang mit Adaptationen stehen könnte. Da Lipocaline auch bekannt sind als Proteine mit hydrophoben Liganden (Skerra, 2000; Villoutreix et al., 2000; Andersen et al., 2003), würde die Annahme von Bindungen verschiedener Lipide an die X-Zyklus-Enzyme ein komplexes Regulationsmodell eröffnen. Es gibt außerdem Hinweise dafür, dass mit verschiedenen Proteinen der Thylakoide bestimmte Lipide in unterschiedlich hohen Konzentrationen isoliert werden können (Goss, persönliche Mitteilung, 2004). Es wäre demnach denkbar, dass all die Proteine, die in ihrer Umgebung einen hohen Anteil an Lipiden aufweisen, die die De-Epoxidasen für ihre Aktivität brauchen, als Bindeproteine für alle Komponenten der X-Zyklen zu verstehen sind.

Unklar ist auch, wie die Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Aktivitäten der Dtx-Epoxidase im HL bzw. nach HL (Differenz > 50%) und den entsprechenden Proteinmengen der 60- und 57 kDa-Bande im HL und nach HL (Differenz \approx 15-25%) zu erklären ist. Zunächst fällt es schwer, diese beiden Versuche direkt mit einander zu vergleichen, da sie mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt wurden. Trotz nachweisbarer Aktivität war ohne Stabilisierungsreagenz nur eine deutliche Bande bei ca. 52 kDa zu sehen, die allerdings als Abbauprodukt der Dtx-Epoxidase interpretiert werden kann (vgl. Punkt 4). Erst mit Hilfe

eines Stabilisierungsreagenzes konnte ein eindeutiges Signal auf dem Westernblot identifiziert werden. Nach einer Isolation mit dem Stabilisierungsreagenz waren aber kaum noch Aktivitäten messbar, weshalb diese beiden Versuche nicht parallel mit einer Methode durchführbar waren. Allerdings kann man davon ausgehend, dass die Daten trotzdem vergleichbar sind, da jeweils die Isolation im und nach HL mit der gleichen Methode durchgeführt wurde. Die erhaltene Diskrepanz könnte dann durch allgemeine Regulationsvorgänge im HL zu erklären sein, die zwar die Aktivität des Enzyms zusätzlich verringern, aber ohne Einfluss auf die Bindung der Dtx-Epoxidase, also auf die Proteinmenge an der Membran bleiben.

6. Modell zur Regulation der Dtx-Epoxidase durch einen Rezeptor

Da die Frage nach dem Mechanismus nicht eindeutig zu beantworten werden konnte, soll im Folgenden ein mögliches Modell vorgestellt werden, das mit allen erhaltenen Daten konsistent ist.

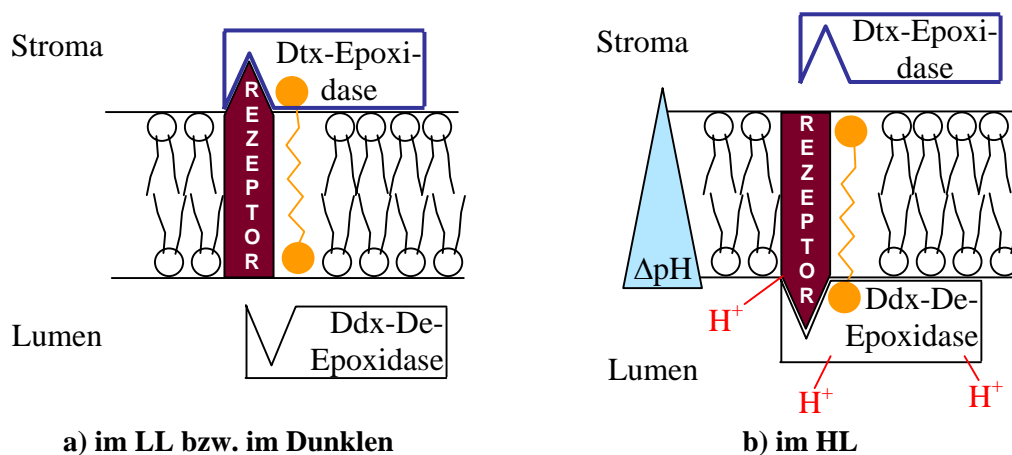


Abb. 4.4 a und b: ΔpH -Regulation mit Hilfe eines transmembranen Rezeptors

Im LL bzw. im Dunkeln, wenn kein ΔpH vorhanden ist, ist der Rezeptor nicht protoniert und besitzt so eine Konformation, die der Dtx-Epoxidase den Umsatz ihrer Substrate ermöglicht (a). Im HL unter Einwirkung eines ΔpH ändert der nun protonierte Rezeptor seine Konformation, so dass die Pigmente nun für die Ddx-De-Epoxidase verfügbar sind (b).

Ausgehend von der Lokalisation der Dtx-Epoxidase im Stroma stellt sich nach wie vor die Frage, wie eine direkte ΔpH -Regulation an das Stroma übermittelt werden kann. Eine Möglichkeit hierzu wäre eine transmembrane Komponente, die mit einem Teil in Kontakt mit dem Lumen wäre. Es könnte sich hierbei also um einen Rezeptor handeln, der einerseits mit der Epoxidase im Stroma, andererseits auch mit der De-Epoxidase im Lumen interagieren könnte (siehe Abb. 4.4). Eine Protonierung am lumenalen Teil dieses Rezeptors als Reaktion auf die Ansäuerung des Lumens im HL könnte eine Änderung der gesamte Konformation zur

Folge haben, wodurch die stromal lokalisierte Dtx-Epoxidase inaktiviert würde. Für eine solche Inaktivierung gibt es grundsätzlich eine Vielzahl von Möglichkeiten von einer direkten Interaktion bis hin zu einer Signaltransduktionskette. Als Folge könnte es schließlich zu einer Ablösung des Enzyms von dem Rezeptor und damit von der Membran (siehe Abb. 4.4 b), oder auch nur zu einer Veränderung des Enzym kommen, so dass schließlich die Pigmente nicht mehr umgesetzt werden können.

In Abb. 4.4 ist nur die Möglichkeit einer Ablösung der Dtx-Epoxidase von der Membran als Folge der Protonierung des Rezeptors gezeigt. Hierfür sprechen die unterschiedlichen Mengen an Dtx-Epoxidase nach einer Isolation im HL bzw. nach HL (vgl. Tab. 3.4.3), sowie das dauerhafte Fehlen von ca. 50% der Aktivität nach einer Isolation im HL (vgl. Abb. 3.3.8). Grundsätzlich wäre auch denkbar, dass die Dtx-Epoxidase zwar an der Membran und eventuell auch an den Rezeptor gebunden bliebe, aber dennoch die räumliche Struktur des aktiven Zentrums so verändert wird, dass ein Umsatz der Substrate nicht mehr möglich ist. Allerdings sprechen die veränderten Aktivitäten und Enzymmengen nach einer Isolation im HL dagegen.

Für dieses Modell spricht einerseits, dass tierische Lipocaline als rezeptorabhängige Proteine bekannt sind und andererseits seine Einfachheit. Da die Möglichkeit besteht, dass eines der transmembranen Proteine des PS II als Rezeptor fungiert, bestünde nicht einmal die Forderung nach einem neuen Protein. Ganz im Gegenteil wäre denkbar, dass mit Aufklärung der Bindeproteine für Dtx, den umgebenden Lipiden und der für die Entstehung von NPQ notwendigen Komponenten einige Kandidaten für einen solchen Rezeptor zu finden sein könnten.

7. Ausblick

Die vorliegende Arbeit über die Dtx-Epoxidase hat viele, neue Fragen aufgeworfen, die der Klärung bedürfen, besonders die Frage nach dem exakten Mechanismus der HL-Hemmung. Hierzu würde sich die Suche nach Bindeproteinen, also nach potentiellen Rezeptorproteinen für die Dtx-Epoxidase, entweder auf molekular-biologischer (two-hybrid-system) oder aber auch auf protein-biochemischer Ebene anbieten. Auch das Klären der Frage nach der Lokalisation der Dtx-Epoxidase könnte zu neuen Aussagen führen.

Als weiterer, interessanter Aspekt erscheint die Analyse der Zusammenhänge zwischen den X-Zyklen, ihrer Regulation und den Carotinoidbiosynthesen. Hierzu könnten Starklichtlangzeitexpositionen bei verschiedenen Entkopplungszuständen weitere Erkenntnisse liefern.

Des Weiteren müssten die Signale, die der Antikörper lieferte genauer untersucht werden. Nur so wäre es möglich herauszufinden, bei welchem Signal es sich wirklich um eine Isoform der Dtx-Epoxidase, um ein intaktes oder zum Teil abgebautes Enzym, um eine posttranslational modifizierte oder nicht modifizierte Form handelt, oder ob eines der Signale nur eine Kreuzreaktion darstellt. Handelt es sich tatsächlich um Isoformen, wie es sich auf Grund der cDNA-Sequenzen ein wenig andeutet (Lohr, persönliche Mitteilung), so stellt sich die Frage nach dem Grund für das Vorhandensein mehrerer Isoformen.

Als weiterer Schritt läge dann auch die Aufreinigung der Dtx-Epoxidase an, um sie genauer analysieren zu können. Eine Basis hierfür bietet eine sequenzielle Behandlung erst mit NaBr, um störende Proteine zu entfernen, dann mit OG, um dadurch das Enzym von der Membran abzulösen.

V ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden der Vx-Zyklus und der Ddx-Zyklus unterschiedlicher Pflanzen hinsichtlich ihrer Regulation untersucht. Es konnte an Hand von in vivo Messungen gezeigt werden, dass bei zwei Kieselalgen unterschiedlicher Ordnung (Pennales bzw. Centrales) und einer Haptophyte mit Ddx-Zyklus die Dtx-Epoxidase Δ pH-reguliert ist. Im Gegensatz dazu steht die nicht-regulierte Zx-Epoxidase des Vx-Zyklus einer Raphidophyceae, einer Grünalge und einer aquatischen Höheren Pflanze.

Es konnte gezeigt werden, dass der Grund für diese unterschiedliche Regulation der beiden Epoxidasen die verschiedenen Quench-Eigenschaften der Pigmente Dtx bzw. Zx ist. Durch parallele Messungen des NPQ und des De-Epoxidierungsgrads wurde deutlich, dass Zx zum Aufbau eines Quenching direkt den im Licht aufgebauten Δ pH benötigt, während Dtx alleine ausreichend ist, um ein Quenching zu verursachen. Wird die Epoxidierung von Dtx zu Ddx im LL durch Sauerstoffentzug gehemmt, so bleibt das NPQ, auch wenn der Δ pH schon abgebaut wurde, dauerhaft bestehen, bis auch die Epoxidierung durch die Zugabe von Sauerstoff wieder ablaufen kann.

Bei diesen in vivo Messungen wurde außerdem deutlich, dass die Aktivitäten der untersuchten Epoxidasen große Unterschiede aufweisen. Diese sind abhängig von der entsprechenden Pigmentierung des jeweiligen Lichtsammelsystems, stehen also in Zusammenhang mit den Carotinoidbiosynthesen. Es konnte gezeigt werden, dass bei allen untersuchten Organismen, die eine Xanthophyll-dominierte Antenne mit Fx als Mass pigment enthielten, die Umsatzraten der Epoxidase sehr hoch waren, im Gegensatz zu Chl-dominierten Antennen.

Nach diesen Erkenntnissen wurde die Dtx-Epoxidase weiter untersucht und so erstmalig durch Western-Blotting identifiziert. Es ergaben sich, allerdings erst nach zusätzlicher Proteinstabilisierung, zwei Signale, eins bei 60 kDa, das andere bei 57 kDa. Hierbei ist nach wie vor unklar, warum das Antiserum zwei Signale lieferte und ob es sich dabei um Isoformen, um anderweitige Modifizierungen, oder um eine Kreuzreaktion handelt.

Auch der Mechanismus der Δ pH-Regulation der Dtx-Epoxidase konnte trotz in vivo und in vitro durchgeführter Studien nicht endgültig geklärt werden. Allerdings konnten verschiedene Mechanismen, wie z.B. eine direkte pH-Abhängigkeit des Enzyms, eine Regulation durch Reduktion und Oxidation oder durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung, auf Grund der Daten falsifiziert werden. Es konnte schließlich die Regulation mit Hilfe eines transmembranen Rezeptors als das einzige, mit allen Daten konsistente Regulationsmodell vorgeschlagen werden.

VI LITERATUR

Adams W.W., Demmig-Adams B., Verhoeven A.S., Barker D.H. (1995)

Photoinhibition during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation.

Aust. J. Plant. Physiol. 22, 261-276

Allen J.F. (1992)

Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis.

Biochim. Biophys. Acta 1098, 275-335

Andersen J.F., Francischetti I.M.B., Valenzuela J.G., Schuck P., Ribeiro J.M.C. (2003)

Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect

J. Biol. Chem. 278, 4611-4617

Anderson J.M. und Barrett J. (1986)

Light-harvesting pigment-protein complexes of algae.

Encycl. Plant Physiol. New Ser. 19, 269-285

Arsalane W., Rousseau B., Duval J.-C. (1994)

Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition.

Photochem. Photobiol. 60, 237-243

Bassi R., Pineau B., Dainese P., Marquardt J. (1993)

Carotenoid-binding proteins of photosystem II.

Eur. J. Biochem. 212, 297-303

Bennoun P. (1982)

Evidence for a respiratory chain in the chloroplast.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4352-4356

Bertrand M., Schoefs B., Siffel P., Rohacek K., Molnar I. (2001)

Cadmium inhibits epoxidation of diatoxanthin in the xanthophyll cycle of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*.

FEBS Letters 508, 153-156

Bilger W. and Björkman O. (1990)

Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*

Photosynth. Res. 25, 173-185

Bouvier F., d'Harlingues A., Hugueney P., Marin E., Marion-Poll A., Camara B. (1996)

Xanthophyll Biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of β -cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*capsicum annum*).

Journal of Biological Chemistry 271, 28861-28867

Bratt C.E., Arvidson P.O., Carlson M., Akerlund H.E. (1995)

Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbat concentration

Photosynth. Res. 45, 169-175

Brown J.S. (1988)

Photosynthetic pigment organization in diatoms (Bacillariophyceae)

J. Phycol. 24, 96-102

Büch K., Stransky H., Hager A. (1995)

FAD is a further cofactor of the NAD(P)H and O₂-dependent zeaxanthin-epoxidase.
FEBS Letters 376, 45-48

Büchel C., Wilhelm C. (1993)

In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives.

Photochem. Photobiol. 58, 137-148

Büchel C., Garab G. (1995)

Respiratory regulation of the electron transport in chloroplasts. Chlororespiration
in :M. Dekker Inc, New York, 83-93

Bugos R.C., Yamamoto H.Y. (1996)

Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 6320-6325

Bugos R.C., Hieber A.D., Yamamoto H.Y. (1998)

Xanthophyllcycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants.

J. Biol. Chem. 273, 15321-15324

Cleland R.E., Melis A., Neale P.J. (1986)

Mechanism of photoinhibition:Photochemical reaction center in system II of chloroplasts.

Photosynth. Res. 9, 79-88

Crofts A.R., Yerkes C.T. (1994)

A molecular mechanism for q_E-quenching

FEBS Lett. 352, 265-270

Demmig-Adams B. (1990)

Carotenoids and photoprotection in plants: a role for xanthophyll zeaxanthin.

Biochim. Biophys. Acta 1020, 1-24

Demmig-Adams B., Adams W.W. (1996)

The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis

Trends in plant science 1, 21-26

Demmig-Adams B., Adams W.W., Heber U., Neimanis S., Winter K., Krüger A., Czygan F.-C., Bilger W., Björkman O. (1990)

Inhibition of Zeaxanthin formation and of rapid changes in radiationsless energy dissipation by dithiothreitol in spinach leaves and chloroplasts.

Plant Physiol. 92, 293-301

Demmig-Adams B., Adams W.W., Ebbert V., Logan B.A. (1999)

Ecophysiology of the xanthophyll cycle.

In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (eds)

The photochemistry of Carotenoids, 8, 245-269

Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands

Drumm T. (2004)

Regulation der Energienutzung am Photosystem II in Pflanzen mit verschiedenen Xanthophyllzyklen und Lichtsammelsystemen.

Diplomarbeit am FB Biologie, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz

Durnford D.G., Aebersold R., Green B.R. (1996)

The fucoxanthin-chlorophyll proteins from a chromophyte alga are part of a large multigene family: structural and evolutionary relationships to other light harvesting antennae

Ebbert V., Demmig-Adams B., Adams W.W., Mueh K.E., Staehelin A. (2001)

Correlation between persistent forms of zeaxanthin-dependent energy dissipation and thylakoid protein phosphorylation.

Photosynth. Res. 67, 63-78

Eskling M., Arvidsson P.-O., Akerlund H.-E. (1997)

The xanthophyll cycle, its regulation and components.

Physiologia Plantarum 100, 806-816

Feng Y., McCarty R.E. (1990)

Chromatographic purification of the chloroplast ATP Synthase (CF₀-CF₁) and the role of CF₀ subunit IV in proton conduction.

J. Biol. Chem. 265 (21), 12474-12480

Goss R., Richter M., Wild A. (1995)

Role of ΔpH in the mechanism of zeaxanthin-dependent amplification of qE

J. Photochem. Photobiol. 27, 147-152

Goss R., Richter M., Wild A. (1997)

Pigment composition of PS II pigment protein complexes purified by anion exchange chromatography. Identification of xanthophyll cycle pigment binding proteins

J. Plant Physiol. 151, 115-119

Goss R., Böhme K., Wilhelm C. (1998)

The xanthophyll cycle of *Mantoniella squamata* converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanism of enhanced non-photochemical energy dissipation.

Planta 205, 613-621

Grevby C. (1996)

Organisation of the light harvesting complex in fucoxanthin containing algae.

Dissertation: Faculty of Natural Sciences, University of Göteborg

Grossman A.R., Bhaya D., Apt K.E., Kehoe D.M. (1995)

Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: Diversity, Control, and Evolution.

Annual Reviews in Genetic 29, 231-288

Hager A. (1966)

Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und Hillreaktion.

Ber. Dtsch. Ges. 79, 94-107

Hager A. (1967)

Untersuchungen über die Rückreaktion im Xanthophyll-Cyclus bei Chlorella, Spinacia und Taxus

Planta 76, 138-148

Hager A. (1969)

Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung

Planta 89, 224-243

Hager A. (1975)

Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten.
Ber. Dtsch. Bot. Ges. 88, 27-44

Hager A. (1980)

The reversible light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast.
In: Czygan (Hrsg.)
Pigments in Plants, 57-79, Stuttgart

Hager A., Meyer-Bertenrath (1966)

Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer Methoden
Planta 69, 198-217

Hager A., Holocher K. (1994)

Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease.
Planta 192, 581-589

Hariharan T., Johnson P.J., Cattolico R.A. (1998)

Purification and Characterization of Phosphoribulokinase from the Marine Chromophytic Alga *Heterosigma carterae*
Plant Physiol. (1998) 117: 321-329

Havaux M. und Gruszecki W.I. (1993)

Heat and light induced chlorophyll fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin: indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity.
Photochem. Photobiol. 58, 607-614

Havaux M. und Niyogy K.K. (1999)

The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8762-8767

Heldt H.W. (1999)

Pflanzenbiochemie
2. Auflage Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

Hieber A.D., Bugos R.C., Yamamoto H.Y. (2000)

Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase.
Biochimica et Biophysica Acta- Protein structure and molecular Enzymology 1482, 84-91

Hieber A.D., Bugos R.C., Verhoeven A.S., Yamamoto H.Y. (2002)

Overexpression of violaxanthin de-epoxidase: properties of C-terminal deletions on activity and pH-dependent lipid binding.
Planta 214, 476-483

Hoek C. van den (1993)

Algen. Einführung in die Phykologie
3. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Hoek C. van den, Mann D.G., Jahns H.M. (1995)

Algae. An Introduction to Phycology.
Cambridge University Press

Holzwarth A.R., (1999)

Die primären Prozesse der Photosynthese
In: Häder D.-P. (Hrsg.)
Photosynthese, 1-20
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York

Horton P., Hague A. (1988)

Studies on the induction of nchlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts: IV. Resolution of non-photochemical quenching.
Biochim. Biophys. Acta 932, 107-115

Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1994)

Regulation of light harvesting in green plants: indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence.
Plant Physiol. 106, 415-420

Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. (1996)

Regulation of light harvesting in green plants.
Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 47, 655-684

Horton P., Ruban A.V., Young A.J. (1999)

Regulation of the structure and function of the light-harvesting complexes of photosystem II by the xanthophyll cycle.
In: Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. (Hrsg.)
The photochemistry of Carotenoids 8, 271-291
Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande

Jansson S., Green B.R., Grossman A.R., Hiller R. (1999)

A proposal for extending the nomenclature of light-harvesting proteins of the three transmembrane helix type.
Plant Mol. Biol. Rep. 17, 221-224

Jakob T., Goss R., Wilhelm C. (2001)

Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diadinoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.
Journal of Plant Physiol. 158, 383-390

Jeffrey S.W., Humphrey G.F. (1975)

New spectrometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton
Biochem. Physiol. Pflanz. 167, 191-194

Krause G.H., Weis E. (1991)

Chlorophyll fluorescence and photosynthesis
The basics. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313-349

Laemmli U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685

Laroche J., Henry D., Wyman K., Sukenik A., Falkowski P. (1994)

Cloning and nucleotide-sequence of a cDNA-encoding a major fucoxanthin, chlorophyll a/c-containing protein from the chrysophyte *Isochrysis-galbana* – implications for evolution of the CAB gene family.
Plant Mol. Biol. 25, 355-368

Latowski D., Kostecka A., Strzalka K. (2000)

Effect of monogalactosyldiacylglycerol and other thylakoid lipids on violaxanthin de-epoxidation in liposomes.
Biochemical Society Transactions 28 (6), 810-812

Lavaud J., Roussea B., Etienne A.-L. (2002)

In diatoms a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching.
FEBS Letters 523, 163-166

Lavaud J., Rousseau B., van Gorkom H.J., Etienne, A.-L. (2002)

Influence of the Diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*.
Plant Physiol. 129, 1398-1406

Lavaud J., Rousseau B., Etienne A.L. (2003)

Enrichment of the light harvesting complex in diadinoxanthin and implications for the nonphotochemical fluorescence quenching in diatoms.
Biochemistry 42, 5802-5808

Li X.-P., Björkman O. Shih C., Grossman A.R., Rosenquist M., Jansson S., Niyogi K.K. (2000)

A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting.
Nature 403, 391-395

Li X.-P., Gilmore A.M., Caffarri S., Bassi R., Golan T., Kramer D., Niyogi K.K. (2004)

Regulation of photosynthetic light-harvesting involves intra-thylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein.
J. Biol. Chem. 279, 22866-22874

Lohmann C. (1997)

Vergleichende Phytoplankton-Untersuchung der Trinkwassertalsperren Neuzehnhain und Dröda sowie des schmalen Luzin-Sees anhand der Lichtmikroskopie und HPLC-gestützten Pigmentanalyse.
Dissertation am FB Biologie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz

Lohr M., Wilhelm C. (1999)

Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle
Plant Biol. 96, 8784-8789

Lohr M., Wilhelm C. (2001)

Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model.
Planta 212, 382-391

Lottspeich F., Zorbach H. (1998)

Bioanalytik
Spektrum Akad. Verl. Heidelberg

Mann J.E., Meyers J. (1968)

On pigment, growth and photosynthesis of *Phaeodactylum tricorutum*
J. Phycol. 4, 349-335-

Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B., Huguency P., Frey A., Marion-Poll A. (1996)

Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotina plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*.
EMBO J. 15, 2331-2342

Mewes H. (1997)

Die Wirkung von UV-B-Strahlung auf den Xanthophyllzyklus und die Xanthophyllsynthesen der einzelligen Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*.

Diplomarbeit am FB Biologie, Johannes Gutenberg Universität, Mainz

Mewes H. (2001)

Auswirkungen kurzzeitiger UV-B-Strahlung auf die Regulation von Photosystem II der Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* und der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*.

Dissertation am FB Biologie, JohannesGutenberg Universität, Mainz

Mewes H., Richter M. (2002)

Supplementary ultraviolet-B radiation induces a rapid reversible of the diadinoxanthin cycle in the strong light-exposed diatom *Phaeodactylum tricornutum*.

Plant Physiol. 130, 1527-1535

Mock T., Kroon B.M.A. (2002)

Photosynthetic energy conversion under extreme conditions—II the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms.

Phytochemistry 61, 53–60

Müller P., Li X.-P., Niyogi K.K. (2001)

Non-photochemical quenching. A response to excess light energy.

Plant Physiol. 125, 1558-1566

Müller D. (1962)

Über jahres- und lunarperiodische Erscheinungen bei einigen Braunalgen.

Bot. Mar. 4, 140-155

Nalin C.M., McCarty R.E. (1983)

Role of a disulfid bond in the g subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1.

J. Biol. Chem. 259 (11), 7275-7280

Napier J.A., Larsson K.H., Madueno F., Gray J.C. (1992)

Import and processing of the precursor of the delta subunit of tobacco chloroplast ATP synthase.

Plant Mol Biol. 20 (3), 549-554

Nelson N., Eytan E. (1979)

In: Mukohata Y., Packer L. (Hrsg.)

Cation fluxes across biomembranes, 409-415

Acad. Press, New York

Niyogi K.K. (1999)

Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches .

Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 333-359

Olaizola M., La Roche J., Kolber Z., Falkowski P.G. (1994)

Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom.

Photosynth. Res. 41, 357-370

Olaizola M., Yamamoto H.J. (1994)

Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom

Photosynth. Res. 41, 357-370

Provasoli L., Mc Laughlin J. J., Droop M. R. (1975)

The development of artificial media for marine algae.

Arch. Mikrobiol. 25, 392-428

Pfündel E., Bilger W. (1994)

Regulation and possible function of the Violaxanthin cycle
Photosynth. Res. 42, 89-109

Pinto E.A. (2001)

Die Rolle des Diadinoxanthinzyklus und des Violaxanthinzyklus in der Starklichtregulation bei einem Chlorophyll a/c- und a/b-haltigen Photosystem II.
Diplomarbeit am FB Biologie, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz

Rauh W., Senghas K. (1982)

Schmeil und Fitschen (Berg.)
87. Auflage, Quelle und Meyer Verlag, Heidelberg

Rees D., Noctor G., Ruban A.V., Crofts J., Young A., Horton P. (1992)

pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching in spinach thylakoids from light treated or dark-adapted leaves.
Photosynth. Res.31, 11-19

Rhiel E., Marquardt J., Eppard M., Mörschel E., Krumbein W.E. (1997)

The light harvesting system of the diatom *Cyclotella cryptica*. Isolation and characterization of the main light harvesting complex and evidence for the existence of minor pigment proteins.
Bot. Acta 110, 109-117

Ricard M. (1986)

Atlas du Phytoplancton Marine, volume 2, Diatophycees
Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 107

Richter M., Daufenbach J., Drebing S., Vucetic V., Nguyen D.T. (in press)

Distinguishing light-induced proton slip and proton leak at the thylakoid membrane.
J. Plant Physiol., in press

Robinson S.P. (1986)

Improved rates of CO₂-fixation by intact chloroplasts isolated in media with KCl as osmoticum.
Photosynth. Res. 10, 93-100

Rogers S., Wells R., Rechsteiner M., 1986

Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: The PEST Hypothesis.
Science 234, 364-368

Schatz G. H., Brock H., Holzwarth A. R. (1988)

Kinetic and energetic model for the primary process in PS II
Biophys. J., 54, 397-405

Schlodder E. und Brettel K., (1988)

Primary charge separation in closed PS II with a lifetime of 11 ns. Flash absorption spectroscopy with oxygen evolving PS II complexes from *Synechococcus*.
Biochim. Biophys. Acta 933, 22-34

Siefermann D., Yamamoto H. Y. (1975)

Properties of NADPH and oxygen-dependent Zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts
Arch. Biochim. Biophys. 171, 70-77

Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F., Bresinsky A. (2002)

„Strasburger“ Lehrbuch der Botanik
Strasburger E., Noll F., Schenk H., Schimper A.F.W. (Begr.)
35. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Skerra A. (2000)

Lipocalins as a scaffold.
Biochemica et Biophysica Acta-Protein structure and molecular Enzymology 1482, 337-350

Sousa R. (1995)

Use of glycerol and other protein structure stabilizing agents in protein crystalization.
Acta Cryst. D51, 271-277

Stransky H., Hager A. (1970)

Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllzyklus in verschiedenen Algenklassen.
Arch. Mikrobiol. 73, 315-323

Tardy F., Havaux M. (1997)

Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts.
Biochim. Biophys. Acta 1330, 179-193

Thronsen J. (1996)

Note on the taxonomy of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae).
Phycologica 35, 367

Ting C.S., Owens T.G. (1993)

Photochemical and non-photochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Pheodactylum tricorutum*.
Plant Physiol. 101, 1323-1330

Villoutreix B.O., Akerstrom B., Lindqvist A. (2000)

Structural model of human alpha(1)-microtubulin: proposed scheme for the interaction with Gla domain of anticoagulant protein C
Blood coagulation & Fibrinolysis 11, 261-275

Weis, E. Berry J.A. (1987)

Quantum efficiency of PS II in relation to energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence.
Biochim. Biophys. Acta 894, 198-208

Wildner G.F. (1999)

Regulation des Calvinzyklus in C₃-Pflanzen
In: Häder D.-P. (Hrsg)
Photosynthese, 1-20
Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York

Wieslander A, Christiansson A, Rilfors L, Khan A, Johansson LB, Lindblom G. (1982)

Lipid phase structure in the regulation of lipid composition in *Acholeplasma laidlawii* membranes.
Rev. Infect. Dis. 4 43-49

Xu C.C., Jeon Y.A., Hwang H.J., Lee C.-H. (1999)

Suppression of zeaxanthin epoxidation by chloroplast phosphatase inhibitors in rice leaves.
Plant Science 146, 27-34

Yamamoto und Kamite (1972)

The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidase and absorbance changes in the 500 nm region
Biochim. Biophys. Acta 276, 583-543

Ziegler R., und Egle K. (1965)

Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. I. Kritische Überprüfung der spektralphotometrischen Chlorophyllbestimmung.

Beitr. Biol. Pfl., 41, 11-37

VII ANHANG

1. Nährmedien

Modifiziertes **ASP Medium** nach Provasoli et al. (1975), Mann und Meyers (1986) und Lohr und Wilhelm (2001):

Nr.	Chemikalien	Stammlösung (ad 100 ml H ₂ O bidest)	Menge ad 1 Liter H ₂ O bidest	Endkonzentration
1	K ₂ HPO ₄	1,0 g	10 ml	0,58 mM
2	H ₃ BO ₃	0,1 g	10 ml	0,16 mM
3	MgSO ₄ * 7H ₂ O	20 g	10 ml	8,1 mM
4	KCl	16 g	10 ml	21,0 mM
5	NaNO ₃	10 g	10 ml	11,8 mM
6	CaCl ₂ * 2H ₂ O	4 g	10 ml	2,72 mM
7	FeCl ₃ * 6H ₂ O	0,330 g	1 ml	7,194 mM
8	Titriplex III	0,465 g	1 ml	80,593 µM
9	TRIS	10 g	10 ml	16,0 mM

Spurenelementlösung A:

CoCl₂ * 6H₂O 48 mg

CuCl₂ * 2H₂O 12 mg

Na₂MoO₄ * 2H₂O 24 mg

Ad 200 ml H₂O bidest.

Spurenelementlösung B:

Titriplex III 600 mg

ZnCl₂ 6 mg

MnCl₂ * 2H₂O 66 mg

Spurenelementlg. A 1 ml

Die Lösung wird auf 20 ml aufgefüllt und mittels KOH auf pH 7 eingestellt.

Zum Fertigstellen des Nährmediums werden 5 g NaCl und 10 ml der Lösungen 1, 2, 3, 4, 5 und 9 unter ständigem Rühren in 1 l H₂O bidest gelöst und mit HCl ein pH-Wert von 7,7 eingestellt. Danach kommen 10 ml der Lösung 6, sowie je 1 ml der Lösungen 7, 8 und der Spurenelementlösung B hinzu. Zur Sterilisation wird das Medium 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Für das Nährmedium der Kieselalge *C. meneghiniana* wurden vor dem Sterilisieren noch 500 mg Silikat pro Liter Medium zugegeben.

N5b-Medium nach Strotmann (1966):

Stammlösungen für 100 ml:

MgSO₄ * 7 H₂O 5 g

CaCl₂ * 2 H₂O 1,06 g

Spurenelementlösung für 500 ml:

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	27,5 mg
KJ	14 mg
KBr	14 mg
LiCl	14 mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	194,5 mg
H_3BO_3	153,5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	27,5 mg
$\text{NiSO}_4 \cdot 7 (6) \text{H}_2\text{O}$	27,5 (29,35) mg
$\text{Co}(\text{NO}_3) \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	27,5 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	27,5 mg

Ansatz für 1 l Medium:

Stammlösung 1	1 ml
Stammlösung 2	100 μl
Spurenelementlösung	500 μl
KNO_3	1 g
Na_2HPO_4	260 mg
KH_2PO_4	740 mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	3,356 mg

Diese Substanzen werden in 1 l H_2O bidest unter Rühren gelöst. Das fertige Medium wird dann 20 min bei 121 °C autoklaviert, um es zu sterilisieren.

Artificial sea water-(ASW)-Medium nach Müller (1962)

Extra-Stammlösung für 500 ml:

NaNO_3	15 g
Na_2HPO_4	0,6 g
K_2HPO_4	0,5 g

Vitaminlösung für 1000 ml:

Biotin	0,2 mg
Ca-Pantothemat	20 mg
Folsäure	0,4 mg
Inositol	1000 mg
Nicotinsäure	20 mg
Thiamin	100 mg
Thymin	600 mg

Ansatz für 1 l Medium:

Extra-Stammlösung	3,75 ml
B_{12} -Lösung	2,5 ml
Vitaminlösung	2,5 ml
Erdabkochung	25 ml

Tricin	0,5 ml
Seesalz	33,6 g

Das fertige Medium wird 20 min bei 121 °C autoklaviert, um es zu sterilisieren. Die Vitaminlösung sowie die B₁₂-Lösung müssen zum Sterilisieren sterilfiltriert werden, da sie nicht autoklaviert werden können und werden erst wenn das Medium kalt ist zugegeben.

Nach Robinson (1986) modifizierte **Hoaglandlösung**:

50 mM H ₃ BO ₃
10 mM MnCl ₂
1 mM ZnSO ₄
0,5 mM CuSO ₄
0,1 mM H ₂ MoO ₄
0,1 mM Co(NO ₃) ₂

2. Isolations- und Reaktionsmedien

Isolationsmedien für *P. tricornutum*:

Stammlösungen:

Nr.	Chemikalien	Lösung ad 200 ml H ₂ O _{dest}	Endkonzentration
1	Sorbit	36,4 g	1 M
2	KCl	0,03 g	2 mM
3	MgCl ₂	0,08 g	2 mM
4	Borsäure	0,49 g	40 mM
5	Tris		40 mM
6	EDTA	0,074 g	1 mM
7	BSA (entfettet)	0,4 g	0,2%

Isolationsmedium, pH 7,4 (KOH):

Nr.	Chemikalien	Lösung ad 200 ml H ₂ O _{dest}	Stammlösung für 200 ml	Endkonzentration
1	Sorbit	36,4 g		1 M
2	KCl	0,03 g	4 ml	2 mM
3	MgCl ₂	0,08 g	8 ml	2 mM
4	Borsäure	0,49 g	20 ml	40 mM
5	Tris		20 ml	40 mM
6	EDTA	0,074 g		1 mM
7	BSA (entfettet)	0,4 g		0,2%

Reaktionsmedium, pH 7,5 (KOH):

Nr.	Chemikalien	Lösung ad 200 ml H ₂ O _{dest}	Stammlösung für 200 ml	Endkonzentration
1	Sorbit	12 g		330 mM
2	KCl	0,15 g	20 ml	10 mM
3	MgCl ₂	0,2 g	20 ml	5 mM
4	Borsäure	0,49 g	20 ml	40 mM
5	Tris		20 ml	40 mM

6	EDTA	0,074 g		1 mM
---	------	---------	--	------

Epoxidierungs-Reaktionsmedium, pH 8 (KOH)

Wie oben, aber zusätzlich mit 50 µM FAD und entfettetem BSA (0,3 mg/ml, Typ H2, Firma Gerbu).

Isolationsmedien für Spinat:**Isolationsmedium (Medium A), pH 6,1:**

Chemikalien	Endkonzentration	Molekulargewicht MG [g/mol]	Einwaage [g/l]
Sorbit	330 mM	182,2	60,13
NaCl	10 mM	58,44	0,5844
MgCl ₂	1 mM	203,3	0,2033
MnCl	1 mM	197,91	0,1979
EDTA	2 mM	372,24	0,7445
KH ₂ PO ₄	0,5 mM	136,09	0,068
MES	44 mM	195,23	8,59

Aufbewahrungs-/Waschmedium (Medium B), pH 6,7

Chemikalien	Endkonzentration	Molekulargewicht MG [g/mol]	Einwaage [g/l]
Sorbit	330 mM	182,2	60,13
NaCl	10 mM	58,44	0,5844
MgCl ₂	1 mM	203,3	0,2033
MnCl	1 mM	197,91	0,1979
EDTA	2 mM	372,24	0,7445
KH ₂ PO ₄	0,5 mM	136,09	0,068
HEPES	40 mM	238,3	9,52

Schockmedium (Medium C), pH 7,6:

	Molarität	Molekulargewicht MG [g/mol]	g/l
NaCl	10 mM	58,44	0,5844
MgCl ₂	5 mM	203,3	1,0165
HEPES	10 mM	238,3	2,3831

Reaktionsmedium, pH 7,6:

	Endkonzentration
Sorbit	0,33 M
NaCl	10 mM
MgCl ₂	5 mM
HEPES	40 mM

Extraktionsgemisch für Pigmente:

90% Methanol, 0,2 M Ammoniumacetat gepuffert
10% Ethylacetat

3. Medien zur Gelelektrophorese:**Trenngelpuffer pH 8,8 (HCl)**

	Endkonzentration	Einwaage
Tris	1,5 M	19 g/100 ml

Sammelgelpuffer pH 6,8 (HCl)

	Endkonzentration	Einwaage
Tris	0,5 M	3,02 g/50 ml

Stammlösungen

	Endkonzentration	Einwaage
SDS	10%	10 g/100 ml
Ammoniumperoxosulfat (APS)	10% (w/v)	0,1 g/ml

Acrylamid/N',N'-Bismethylenacrylamid Fertiglösung

40% Gesamt-Monomerkonzentration
2,67% Quervernetzer (crosslinker)

Elektrodenpuffer pH 8,3 (5x)

	Endkonzentration	Einwaage pro Liter
Tris		15,15 g
Glycin		72 g
SDS		5 g

auffüllen mit H₂O_{dest} auf einen Liter, pH keinesfalls einstellen

Trenngel (12%):

Trenngelpuffer	2,5 ml
Acrylamid-Bis-Stammlösung	3 ml
10% SDS	0,1 ml
H ₂ O _{dest}	4,3 ml
10% APS	80 µl
TEMED	5 µl

APS und TEMED sind die Starter der Polymerisation und werden daher erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

Sammelgel (4%):

Sammelgelpuffer	630 µl
Acrylamid-Bis-Stammlösung	250 µl
10% SDS	25 µl
H ₂ O _{dest}	1,55 ml
10% APS	20 µl
TEMED	2,5 µl

APS und TEMED sind die Starter der Polymerisation und werden daher erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben.

4. Medien für Western-Blotting

Transferpuffer (Towbin Puffer) pH 8,3

	Endkonzentration	Einwaage pro Liter
Tris	48 mM	5,81 g
Glycin	39 mM	2,93 g
Methanol	20% (v/v)	200 ml
SDS	0,0375%	375 mg

auf einen Liter mit H₂O_{dest} auffüllen

Ponceau S-Färbelösung

0,2% (w/v) Ponceau S

3% (w/v) Trichloressigsäure

TBS pH 7,4 (HCl)

	Endkonzentration	Einwaage pro Liter
Tris	20 mM	2,42 g
NaCl	0,15 M	8,77 g

auf einen Liter mit H₂O_{dest} auffüllen

TBST pH 7,4 (HCl)

	Endkonzentration	Menge pro Liter
Tris	20 mM	2,42 g
NaCl	0,15 M	8,77 g
Tween 20	10% (V/V)	1 ml

auf einen Liter mit H₂O_{dest} auffüllen

Blocking-Lösung auf Proteinbasis:

3% (w/v) BSA in TBS-Puffer pH 7,4

Blockinglösung auf Polymerbasis:

Roti-Block, Ready to use, 10x konzentriert, Firma Roth

Detektionspuffer

	Endkonzentration	Einwaage pro Liter
Tris	0,1 M	1,21 g
NaCl	0,1 M	0,58 g