

**Strukturelle und funktionelle Analyse von
Lichtsammelkomplexen in
Nicotiana tabacum und *Cyclotella meneghiniana***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften (FB15)
der Johann Wolfgang Goethe -Universität
in Frankfurt am Main

von

Anja Röding

aus Rochlitz

Frankfurt, 2013

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (FB15) der

Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan(in):

Gutachter(in):

Datum der Disputation:.....

*Die Zukunft soll man nicht voraussehen wollen,
sondern möglich machen.*

Antoine de Saint-Exupéry

(1900-1944)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Entstehung und Bedeutung von höheren Pflanzen und Diatomeen	1
1.2 Lichtsammelkomplexe.....	2
1.3 Die Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese	5
1.4 Chlorophyllfluoreszenz und Non-Photochemical Quenching	7
1.5 Das Ketocarotinoid Astaxanthin	10
1.6 Ziele der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Anzucht der Versuchsorganismen.....	14
2.1.1 Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i> Var. Xanthi	14
2.1.2 Anzucht von <i>Cyclotella meneghiniana</i>	14
2.2 Fluoreszenzkinetiken.....	15
2.2.1 PAM - Messungen (NPQ).....	15
2.2.2 PEA-Messungen (OJIP)	17
2.3 Thylkoidisolation	18
2.3.1 <i>Nicotiana tabacum</i> Var. Xanthi	18
2.3.2 <i>Cyclotella meneghiniana</i>	19
2.4 Pigmentanalysen	20
2.4.1 Chlorophyllbestimmungen	20
2.4.1.1 <i>Nicotiana tabacum</i> Var. Xanthi.....	20
2.4.1.2 <i>Cyclotella meneghiniana</i>	21
2.4.2 HPLC-Messungen von <i>N. tabacum</i> Var. Xanthi	21
2.5 Radikalreduktionsnachweis.....	22
2.6 Ionenaustauscherchromatographie von <i>C. meneghiniana</i> Thylakoiden	22
2.7 Größenausschlusschromatographie.....	23
2.8 Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation.....	24
2.8.1 Kontinuierliche SDG von <i>N. tabacum</i> Var. Xanthi - Granathylakoiden	24
2.8.2 Diskontinuierliche SDG von FCPa und FCPb aus <i>C. meneghiniana</i>	24
2.9 Spektroskopie.....	25
2.10 Gelelektrophoresen und Immunodetektionen	27
2.10.1 Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27

2.10.2	Native Gelelektrophorese (Blue Native PAGE).....	27
2.10.3	Immunodetektion.....	28
2.11	Transmissionselektronenmikroskopie.....	30
2.11.1	Blattschnitte von <i>N. tabacum</i> Var. Xanthi.....	30
2.11.2	Grid-Präparation und Einzelpartikelaufnahmen von FCPa, FCPb und LHCII	31
2.11.3	Einzelpartikelanalyse von FCPb	31
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Charakterisierung des Ketocarotinoid-produzierenden <i>N. tabacum</i> Var. Xanthi	35
3.1.1	Wachstum der Pflanzen	35
3.1.2	<i>In vivo</i> Fluoreszenzanalysen	36
3.1.2.1	PAM-Messungen	36
3.1.2.2	PEA-Messungen.....	38
3.1.3	Thylakoidanordnung und Plastoglobuli.....	39
3.1.4	Vergleich der Photosynthesekomplexe.....	42
3.1.5	Spektroskopische Analysen der Thylakoidmembranen und einzelner Photosynthese- komplexe	43
3.1.5.1	Spektroskopische Charakterisierung der (Grana-)Thylakoide.....	44
3.1.5.2	Charakterisierung der Lichtsammelkomplex-Fraktionen	45
3.1.5.3	Charakterisierung der Photosystem-Fraktionen	46
3.1.6	Pigment-Analysen.....	48
3.1.6.1	Vergleich der Photosynthesepigmente und des Ketocarotinoid-Gehalts.....	48
3.1.6.2	Chlorophyllgehalt, Blattfläche und Frischgewicht.....	49
3.1.7	Reduktion des Radikalgehalts durch Astaxanthin	49
3.2	Struktur des Lichtsammelkomplexes FCPb von <i>C. meneghiniana</i>	50
3.2.1	Isolation des FCPb	50
3.2.2	Größe und Form des FCPb.....	52
3.2.2.1	Stabilität des FCPb in der Größenausschlusschromatographie	52
3.2.2.2	Gelelektrophoresen und Immunodetektionen	56
3.2.2.3	Transmissionselektronenmikroskopie.....	57
4	Diskussion.....	61
4.1	Charakterisierung des Ketocarotinoide produzierenden <i>N. tabacum</i>	61
4.1.1	Bindung der Ketocarotinoide an die Lichtsammelproteine	61
4.1.2	Auswirkung der Ketocarotinoide auf die LHCII-Trimerisierung.....	62
4.1.3	Auswirkung der Ketocarotinoide auf die PSII-LHCII-Superkomplex-Assemblierung.....	64
4.1.4	Funktionelle Auswirkungen der Ketocarotinoide auf den Photosyntheseapparat.....	65
4.1.5	Auswirkungen der Ketocarotinoidproduktion auf die Thylakoidstruktur	67

4.2	Der Lichtsammelkomplex FCPb aus <i>C. meneghiniana</i>	70
4.2.1	Größe und Stabilität der Lichtsammelkomplexe FCPa und FCPb.....	70
4.2.2	Struktur des FCPb Oligomers.....	72
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis.....	77
7	Anhang.....	91
7.1	Strukturen ausgewählter Carotinoide	91
7.2	Detaillierte Schrittfolge der Einzelpartikelanalyse des FCPb.....	91
7.3	Detailwerte zu den (Mini)-PAM- und PEA-Messungen	96
7.4	Exemplarisches Elutionsprofil der in der bkt-Linie enthaltenen Pigmente	98
7.5	Detailwerte zum Radikalreduktionsnachweis	99
	Eidesstattliche Erklärung	100
	Danksagung	101
	Lebenslauf	102

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.2-1: DIE CAROTINOIDBINDESTELLEN IM LHCII-MONOMER	2
ABBILDUNG 1.2-2: MÖGLICHE BINDUNGEN DES LHCII AN PSII.....	4
ABBILDUNG 1.3-1: DIE VIER KOMPLEXE DER PHOTOSYNTHESE	7
ABBILDUNG 1.4-1: ABSORPTIONS- UND EMISSIONSSPEKTRUM VON CHLOROPHYLL A IM BEZUG ZUM JABLONSKI-DIAGRAMM DER SINGULETT- UND TRIPLETTZUSTÄNDE	8
ABBILDUNG 1.5-1: STRUKTUREN DER KETOCAROTINOIDE ASTA- UND CANTHAXANTHIN.....	11
ABBILDUNG 1.5-2: POSTULIERTER KETOCAROTINOID-SYNTHESEWEG IN <i>A. THALIANA</i>	12
ABBILDUNG 2.2-1: MINI-PAM-MESSUNGEN	17
ABBILDUNG 3.1-1: WACHSTUM VON <i>N. TABACUM</i>	35
ABBILDUNG 3.1-2: VERGLEICH DER PHOTOSYNTHESEPARAMETER VON <i>NICOTIANA TABACUM</i>	38
ABBILDUNG 3.1-3: OJIP-KURVEN DER PEA-MESSUNGEN.....	39
ABBILDUNG 3.1-4: HISTOGRAMM DER PLASTOGLOBULI.....	40
ABBILDUNG 3.1-5: ULTRADÜNNSSCHNITTE DER BLÄTTER VON <i>N. TABACUM</i>	41
ABBILDUNG 3.1-6: AUFTRENNUNG DER PHOTOSYNTHESEKOMPLEXE AUS <i>N. TABACUM</i>	43
ABBILDUNG 3.1-7: SPEKTROSKOPIE DER (GRANA-)THYLAKOIDE AUS <i>N. TABACUM</i>	45
ABBILDUNG 3.1-8: SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER LHC-FRAKTIONEN AUS ÜBER SACCHAROSE- DICHTEGRADIENTEN AUFGETRENNTEN GRANATHYLAKOIDEN.....	48
ABBILDUNG 3.1-9: SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER PHOTOSYSTEM ENTHALTENDEN SDG- FRAKTIONEN VON SOLUBILISIERTEN GRANATHYLAKOIDEN.....	49
ABBILDUNG 3.1-10: ASTAXANTHIN ALS RADIKALFÄNGER	49
ABBILDUNG 3.2-1: IONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE VON SOLUBILISIERTEN THYLAKOIDEN AUS <i>C. MENECHINIANA</i>	50
ABBILDUNG 3.2-2: ABSORPTIONSSPEKTREN DER IEX-FRAKTIONEN	51
ABBILDUNG 3.2-3: REINIGUNG DER ÜBER DIE IEX SEPARIERTEN FCPA- UND FCPB-FRAKTIONEN	51
ABBILDUNG 3.2-4: SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON FCPA UND FCPB	52
ABBILDUNG 3.2-5: STABILITÄT VON FCPA UND FCPB	53
ABBILDUNG 3.2-6: OLIGOMERISIERUNGSZUSTÄNDE VON FCPB	54
ABBILDUNG 3.2-7: VERGLEICH DER GRÖßENVERHÄLTNISSE VON LICHTSAMMELKOMPLEXEN	58
ABBILDUNG 3.2-8: GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON FCPA UND FCPB.....	59
ABBILDUNG 3.2-9: GRÖßENVERGLEICH VERSCHIEDENER LICHTSAMMELKOMPLEXE IM TRANSMISSIONS- ELEKTRONENMIKROSKOP	57
ABBILDUNG 3.2-10: SEITENANSICHTEN DES FCPB.....	58
ABBILDUNG 3.2-11: AUFSICHTEN DES FCPB NACH EINZELPARTIKELANALYSE.	63
ABBILDUNG 7.1-1: CAROTINOIDSTRUKTUREN	91
ABBILDUNG 7.3-1: OJIP-KURVEN DER PEA-MESSUNGEN AUS 3.1.2	97
ABBILDUNG 7.5-1: HPLC-ELUTIONSPROFIL EINES BLATTEXTRAKTS DER BKT-LINIE VON <i>N. TABACUM</i>	98

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.2-1: BEDEUTUNG DER AUS PAM-MESSUNGEN ABLEITBAREN PARAMETER.	16
TABELLE 2.2-2: BESTANDTEILE DER OJIP-KURVE NACH STRASSER & GOVINDJEE.....	18
TABELLE 2.3-1: PUFFERZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE THYLAKOIDISOLATION AUS <i>N. TABACUM</i> . ..	19
TABELLE 2.3-2: ZUSAMMENSETZUNG DIVERSEER LÖSUNGEN ZUR ANZUCHT UND THYLAKOIDISOLATION VON <i>C. MENEGHINIANA</i>	20
TABELLE 2.10-1: ZUSAMMENSETZUNG DER DENATURIERENDEN GELE UND IHRER LAUFPUFFER	27
TABELLE 2.10-2: ZUSAMMENSETZUNG DER NATIVEN GRADIENTENGELE UND IHRER LAUFPUFFER..	28
TABELLE 2.10-3: PRIMÄRANTIKÖRPER DER IMMUNODETEKTIONEN.	29
TABELLE 3.1-1: AUSWERTUNG DER MINI-PAM-MESSUNGEN.....	36
TABELLE 3.1-2: DURCHSCHNITTSWERTE DER PAM-MESSUNGEN AM AUSGESTANZTEN BLATT.	38
TABELLE 3.1-3: ÜBERSICHT ÜBER DIE GEMESSENEN Q_Y -MAXIMA DER ANALYSIERTEN PROBEN.	44
TABELLE 3.1-4: HPLC-ANALYSE VON BLÄTTERN UND THYLAKOIDEN AUS <i>N. TABACUM</i>	48
TABELLE 3.1-5: KORRELATION VON BLATTFLÄCHE, FRISCHGEWICHT UND CHLOROPHYLLGEHALT..	49
TABELLE 7.2-1: ÜBERSICHT DER ZUR FCPB ANALYSE AUFGENOMMENEN DATENSÄTZE	91
TABELLE 7.3-1: DETAILWERTE DER MINI-PAM-MESSUNGEN.....	96
TABELLE 7.3-2: F_V/F_M -WERTE AUS MINIPAM UND PEA-MESSUNGEN	97
TABELLE 7.4-3: RADIKALREDUKTIONSNACHWEIS, EINZELMESSUNGEN.	99

Abkürzungsverzeichnis

A ₀	Chlorophyll a; primärer Elektronenakzeptor des PSI
Abb	Abbildung
AS	Aminosäure
BBY	Bezeichnung für Granathylakoide, die nach einer von Berthold, Babcock und Yocum 1987 etablierten Methode hergestellt wurden.
β-DDM	β-1,4-Dodecylmaltosid
C.m.	Cyclotella menhianiana
CAB	Chlorophyll a/b bindende Proteine
Chl	Chlorophyll, Chlorophyll
DMSO	Dimethylsulfoxid
F ₀	Grundfluoreszenz einer Probe bei Belichtung mit rotwelligem Messlicht.
FCP	Fucoxanthin-Chlorophyll-Proteine
F _m	Maximalfluoreszenz einer dunkel-adaptierten Probe nach Belichtung mit aktinischem Lichtblitz
gav	group average, softwareinterner Klassifikationsparameter zur Gruppierung zueinander ähnlicher Partikel im Rahmen der Einzelpartikelanalyse.
HPLC	high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEX	Ion Exchange Chromatography, Ionenaustauscherchromatographie
LHC	light harvesting complex, Lichtsammelkomplex
(Mini)PAM	portables Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer zur Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenz
Mn	Mangan
MRA	multi reference alignment, Abgleich von Einzelpartikelbildern (Rotation und Translation) anhand von mindestens zwei Referenzen im Rahmen der Einzelpartikelanalyse
MSA	multivariate statistical analysis, Vergleich der Einzelbilder anhand ihrer Information pro Pixel
NRA	no reference alignment, Abgleich (Rotation und Translation) eines Datensatzes aus Einzelbildern ohne Bezugsbild im Rahmen der Einzelpartikelanalyse
P680	spezielles Chlorophyll a - Paar mit Absorptionsmaximum bei 680 nm, gebunden an das Reaktionszentrum (D1) des PSII
PAM	Puls-Amplituden-moduliertes Fluorometer
PEA	Plant Efficiency Analyzer, Fluoreszenzmessgerät zur Bestimmung der schnellen Fluoreszenzreaktionen (<1sec) im PSII
PG	Plastoglobuli
pmf	proton motive force; protonenmotorische Kraft, Protonengradient über einer Membran
PQH	protoniertes Plastochinon
PS	Photosystem
Q _A	Chinon A, an D2 gebundenes Chinon im PSII-Reaktionszentrum
Q _B	Chinon B, an D1 gebundenes Chinon im PSII Reaktionszentrum
qE	pH- bzw. energieabhängige Fluoreszenzlöschung des NPQ
qi	photoinhibitorische Komponente des NPQ
qT	state transition; Verschiebung des LHCII zum PSI als Teil des NPQ
Q _Y	Elektronenübergang zwischen den beiden niedrigsten unbesetzten Molekül-Orbitalen
SDG	Saccharosedichtegradienten, Saccharosedichtegradienten
SEC	Size Exclusion Chromatography, Größenausschlusschromatographie
UZ	Ultrazentrifuge, Ultrazentrifugation
V1	Violaxanthin- bzw. Zeaxanthinbindestelle im LHCII-Monomer
var	variation, softwareinterner Klassifikationsparameter zur Gruppierung zueinander ähnlicher Partikel im Rahmen der Einzelpartikelanalyse
VAZ	Xanthophyllzyklus; Umwandlung von Viola-zu Zeaxanthin über Antheraxanthin in saurem pH
WT	<i>N. tabacum</i> Var. Xanthi, Wildtyp
Y _Z	Tyrosin am PSII, das als Elektronendonator für die Reduktion des P680 ⁺ dient

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Bedeutung von höheren Pflanzen und Diatomeen

Der Ursprung der heutigen, zur oxygenen Photosynthese befähigten Eukaryoten geht auf ein in der Erdgeschichte wohl einmaliges Ereignis zurück, das als „primäre Endosymbiose“ beschrieben wurde, also die Aufnahme eines Vorläufers der heutigen Cyanobakterien in einen eukaryotischen Wirt. Aus diesem Schritt gingen die Rotalgen, die Glaucophyta, die Grünalgen und aus diesen letztendlich die Landpflanzen hervor. Zu letzteren gehört auch der hier verwendete Modellorganismus *Nicotiana tabacum*, der erste Organismus, dessen komplettes Chloroplastengenom aus ca. 155.000 Basenpaaren bereits im Jahr 1986 sequenziert wurde [1] und der sich dank seiner leichten Transformierbarkeit und dem ergiebigen Blattmaterial als Labororganismus für verschiedenste Fragestellungen seit langem bewährt hat [2]-[5].

In sekundären Endosymbiose-Ereignissen entstanden durch die Aufnahme der Grün- bzw. Rotalgen in verschiedene heterotrophe Eukaryoten neue Vertreter der Algen, wie wir sie heute kennen. Unter ihnen befinden sich auch die auf die Rotalgen zurückgehenden Chl a/c-haltigen Diatomeen, die durch die sekundäre Endosymbiose Chloroplasten mit 4 statt 2 umhüllenden Membranen aufweisen [6]-[8]. Diatomeen (Kieselalgen; Heterokontophyta, Bacillariophyceae) sind Einzeller und im Gegensatz zu den Landpflanzen nur zwischen 5 µm und 5 mm klein, und doch kommt ihnen im globalen Kohlenstoffkreislauf eine enorme Bedeutung zu. Sie leisten mit einer Varietät von bis zu 10000 Spezies etwa 40 % der marinen Primärproduktion [9], [10]. Ihr besonderes Merkmal ist die sie umgebende Silikathülle, deren Form sie in zwei verschiedene Gruppen einteilt: die zentrischen, radialsymmetrischen und die pennaten, bilateral-symmetrischen Diatomeen, die in planktonischer oder benthischer Umgebung leben [11].

Cyclotella meneghiniana gehört zu den zentrischen Kieselalgen und unterscheidet sich, wie alle Diatomeen, nicht nur durch die Existenz von vier statt zwei Chloroplastenmembranen, sondern auch durch die Anordnung der Thylakoidmembranen in den Chloroplasten deutlich von den Landpflanzen. Anstelle der aus letzteren bekannten Aufteilung der Thylakoide in

Granastapel und einzelne Stromalamellen, weisen Diatomeen die für sie typischen Bänder aus drei aneinander liegenden Thylakoidmembranen auf [12], [13]. Daraus folgt in den Diatomeen auch das Fehlen der bei Pflanzen deutlich ausgeprägten Separierung von Photosystem II (Grana) und I (Stroma).

1.2 Lichtsammelkomplexe

So mannigfaltig die aus der Evolution hervorgegangenen Arten photosynthetisch aktiver Organismen sind, so verschieden sind auch die Komplexe, die sie zur Sammlung des für sie so essentiellen Lichts entwickelt haben. Unabhängig von ihrer jeweiligen Struktur dienen die Chlorosomen der Chlorobiaceae und Chloroflexaceae [14],[15], die Phycobilisomen der Cyanobakterien und Rotalgen [16],[17] und die Lichtsammelkomplex (LHC)-Varianten der eukaryotischen Organismen allesamt diesem Zweck: die Reaktionszentren ihres Photosyntheseapparates mit ausreichend Lichtenergie zu versorgen bzw. die Energiezufuhr effizient zu regulieren.

Die LHCs der höheren Pflanzen und Grünalgen stammen aus einer Multigenfamilie, zu denen auch die PSI bzw. PSII assoziierten Lhca bzw. Lhcb Chlorophyll a/b bindenden (CAB) - Proteinen gehören [18]-[20]. Die dem PSII zugeordneten Lhcb Proteine lassen sich in den peripheren Antennenkomplex LHCII und die Monomere der minoren Antennen CP29, CP26 und CP24 unterscheiden [21],[22]. Zusätzlich fungieren auch die inneren Antennenproteine CP43 und CP47 als Lichtsammler [23],[24].

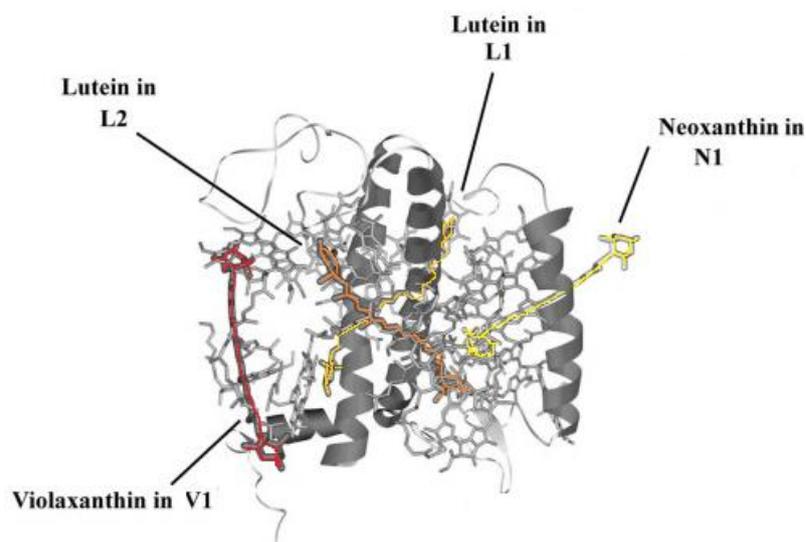


Abbildung 1.2-1: Die Carotinoidbindestellen im LHCII-Monomer. Exemplarisch dargestellt, modifiziert nach Dall'Osto et al., 2006, basierend auf Liu et al. 2004 [34],[30].

Die einfachere Struktur des PSI assoziierten LHCI besteht aus den Lhca1/4 und Lhca2/3 Dimeren [25],[26] und reagiert bei weitem nicht so flexibel in ihrer Zusammensetzung auf unterschiedliche Lichtbedingungen, wie es die äußeren Antennen des PSII zu tun vermögen [27],[28]. Das LHCII-Trimer setzt sich aus den Monomeren Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 zusammen, wobei erstere sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind und letzteres sich nicht zuletzt wegen seiner geringeren Größe deutlicher von den beiden Erstgenannten unterscheidet [22]. Diese Proteinuntereinheiten binden jeweils etwa 8 Chl a, 6 Chl b und bis zu 4 Carotenoiden (2 Lutein (Bindestelle L1, L2), 1 Neo- und max. 1 Violaxanthin (Bindestellen N1, V1), Abb. 1.2-1), deren Anwesenheit essentiell für die Assemblierung des LHCII sind [29]-[33], wobei sowohl die Chlorophyll- als auch die Xanthophyllbindestellen zum Teil recht spezifisch nur bestimmte Pigmente binden, zum Teil aber auch flexibel auf das vorhandene Pigmentangebot zu reagieren vermögen [35]-[38]. Die Chlorophylle arrangieren sich dabei zweischichtig auf beiden Seiten der Thylakoidmembran um die drei Transmembranhelices [29],[30],[39]. Die Lutein-Bindestellen (L1, L2) liegen zentral im Helixkreuz aus Helix A und B [29]. L1 orientiert das gebundene Lutein schräg zur Helix und die Besetzung dieser Bindestelle scheint essentiell für die Stabilität des Trimers zu sein [32]. Die Bindestellen für Violaxanthin (V1) und Neoxanthin (N1) sind eher an der Peripherie eines LHCII-Monomers gelagert. Violaxanthin könnte hier im Rahmen des Xanthophyllzyklus' leicht durch Zeaxanthin ersetzt werden, Neoxanthin käme durch seine exponierte Position eventuell eine Verbindungsfunktion mit anderen pigmentierten Proteinen zu [40].

Die Trimerisierung von Lhcb-Monomeren wird durch das N-terminale Proteinbindemotiv WYGPDR und die Stabilität des Trimers durch die Interaktion der C-terminalen Enden über eine Tryptophan-Seitenkette und das Thylakoidmembranlipid Phosphatidylglycerin (PG) vermittelt [41]-[45].

LHCII-Trimere binden zusammen mit den minoren Antennenproteinen mit unterschiedlicher Affinität an PSII (vgl. Abb. 1.2-2), wodurch sich u.a. sog. C2S2M2 Superkomplexe aus einem dimeren Photosystem II Core (C2), 2 „strongly bound“ LHCII (S2) und 2 „moderately bound“ LHCII (M2) bilden können [46]. Die „S“-Trimere könnten dabei neben ihrer Bindung über CP26 auch in direktem Kontakt mit der PSII-Antenne CP43 stehen, wohingegen die Verbindung der „M“-Trimere zum Photosystem-Reaktionszentrum nur über die minoren Antennenproteine CP24 und CP29 vermittelt wird [27].

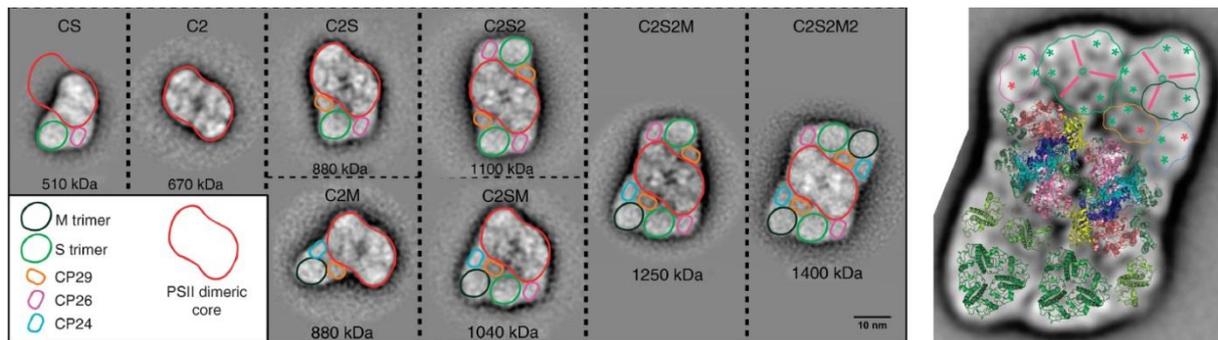


Abbildung 1.2-2: Mögliche Bindungen des LHCII an PSII. Übersicht aus Caffarri *et al.* 2009 [27].

Der LHCII dient dabei nicht nur der Organisation des einfallenden Lichts, sondern vermittelt auch strukturell die Bindung zwischen den Granathylakoiden und kann als Reaktion auf Lichtfluktuationen im Rahmen des sog. „State Transition“ durch Phosphorylierung aus der Peripherie der Granastapel vom PSII zum PSI in die Stromaregion abwandern, einem regulatorischen Aspekt in Hinblick auf die Energieverteilung zwischen den Photosystemen [47]-[50].

Im Gegensatz zu den Lhcs der Chl a/b-haltigen Organismen binden die Lichtsammelproteine der Diatomeen (Fucoxanthin-Chlorophyll-Proteine, FCPs) das Xanthophyll Fucoxanthin anstelle des Lutein und Chlorophyll c anstelle des Chl b in einem 4:4:1 Verhältnis von Chl a:Fucoxanthin:Chl c, wobei die jüngsten Erkenntnisse hier von 8 Fucoxanthin, 8 Chlorophyll a und 2 Chlorophyll c pro FCP-Monomer in *C. meneghiniana* ausgehen [51]. Auch die FCPs gehören auf Grund deutlicher Sequenz-Homologien in den Transmembranhelices 1 und 3 zur Multigenfamilie der CAB-Proteine, doch ihre Vertreter sind in Hinblick auf ihre Polypeptidstruktur kleiner als die der o.g. LHCs [52]-[54]. Für *Cyclotella meneghiniana* wurden zwei dominante FCP-Komplexe gefunden: FCPa und FCPb [55]. Wenngleich bei den Diatomeen keine so deutliche Zuordnung der Lichtsammelkomplexe zu den Photosystemen wie bei höheren Pflanzen möglich ist, gibt es doch Belege für eine präferierte Assoziation verschiedener FCPs mit PSI oder PSII [56]-[58]. Als Bestandteile des FCPa-Trimers sind Polypeptide der lichtsammlenden Lhcf- (Fcp1-3) bzw. der lichtschützenden Lhcx -Gruppe (Fcp6-8) gefunden worden, wogegen FCPb wahrscheinlich ausschließlich aus dem im Schwachlicht stärker exprimierten Lhcf Protein Fcp5 besteht und als ‚lose ans PSI gebunden‘ beschrieben wurde [57], [59], [60].

Sowohl im Falle der LHCs höherer Pflanzen als auch bei den FCPs der Diatomeen erfolgt die Lichtsammlung von der Peripherie der Antennen hin zum Reaktionszentrum der Photosysteme.

Dabei kann die Anregungsenergie eines Chlorophylls bei einem räumlichen Abstand bis zu etwa 5 nm binnen Femto- bis Picosekunden an ein benachbartes Pigment über den sogenannten Förster-Resonanz-Energietransfer übertragen werden [61]-[63]. Das Überlappen der Absorptionsspektren der Photosynthesepigmente ermöglicht hier die strahlungsfreie Energieweiterleitung von den lichtsammelnden Carotinoiden über Chlorophyll b/c zu Chlorophyll a durch induktive Resonanz. Innerhalb eines Proteins können Anregungszustände zwischen den benachbarten Pigmentmolekülen bei Überlappung ihrer Molekülorbitale auch direkt übertragen werden [64]. In jedem Fall führt dies zu einer sukzessiven Weiterleitung von Lichtenergie hin zu den Reaktionszentren, wo es zum Übergang eines Elektrons aus den primären Elektronendonoren P680 bzw. P700 auf einen primären Elektronenakzeptor (Pheophytin bzw. A_0) und damit zur Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie kommt.

1.3 Die Lichtreaktion der oxygenen Photosynthese

Im Jahr 1960 wurde der Verlauf des photosynthetischen Elektronentransports erstmalig als sogenanntes Z-Schema formuliert [65]. Dabei kommt es zur Übertragung eines Elektrons aus dem durch Lichtenergie angeregten P680 am PSII auf Pheophytin, Chinon A (Q_A , permanent an D2 gebunden) und letztendlich Chinon B (Q_B , reversibel an D1 gebunden), das nach einem zweiten Durchlauf dieses Elektronentransfers doppelt reduziert vorliegt, nach Protonierung mit 2 H^+ aus dem Stroma (PQH_2) als Teil des mobilen Plastochinonpools durch die Thylakoidmembran zum Cytochrom- b_6f -Komplex hin abwandert und am D1 durch ein oxidiertes Chinon aus dem Plastochinonpool ersetzt wird [66],[67]. Q_B ist damit eine der mobilen Komponenten des Photosynthese-Apparates und wird nur in seiner Semichinon-Form eng an PSII gebunden [68].

Das durch die Elektronenabgabe entstandene oxidierte $P680^+$ wird durch Oxidation eines nahegelegenen Tyrosins (Y_Z) wieder in seinen ursprünglichen Zustand zurück reduziert. Zur Reduktion des nun um ein Elektron ärmeren Y_Z dient der wasserspaltende Mangan-Komplex. Dieser Komplex enthält unter anderem vier Mangan-Ionen, von denen eins ein Wassermolekül binden, daraus ein Elektron extrahieren und an Y_Z übertragen kann [69]-[71]. Das Mangancluster selbst wird dabei durch die Spaltung des Wassermoleküls pro zweifacher

Mangan-Oxidation wieder reduziert. Für die Entstehung eines Moleküls Sauerstoff sind dabei insgesamt vier lichtinduzierte Elektronenübertragungsschritte notwendig [72]-[74].

Im Rahmen der Elektronentransportkette erfolgt die weitere Elektronenübertragung vom oben beschriebenen protonierten Plastochinon PQH_2 hin zum Cytochrom- b_6f -Komplex (Cyt- b_6f), in dessen Verlauf durch den Chinonzyklus ein Protonengradient über die Membran aufgebaut wird, der als protonenmotorische Kraft (= proton motive force, pmf) den Antrieb für die ATP-Synthese darstellt [75]-[79].

Über das mobile, lumenale Plastocyanin des Cyt b_6f erfolgt die Übertragung des aufgenommenen Elektrons hin zum PSI und über dessen Reaktionszentrum hin zum stromal andockenden Ferredoxin (Fd), wo sich entscheidet, ob das Elektron zum $NADP^+$ transferiert wird (es Bedarf zur vollständigen Reduktion von $NADP^+$ zu $NADPH + H^+$ zweier Elektronen, die gemeinsam über das periphere Membranprotein Ferredoxin- $NADP^+$ -Oxidoreduktase (FNR) vom Fd weitergeleitet werden) oder ob es im zyklischen Elektronentransport wieder auf Cytochrom b_6f abgegeben wird und damit abermals dem pmf-Aufbau dient [80], [81], [82]. Die Umsetzung der pmf zu ATP erfolgt in Chloroplasten, Mitochondrien und bakteriellen Plasmamembranen, über eine ATP-Synthase vom F-Typ [83],[84]. Das reduzierte NADPH findet letztendlich Verwendung in den als Calvin-Zyklus in die Geschichte eingegangenen CO_2 -Fixierungsreaktionen [85].

Das Verständnis des Elektronentransports durch die Thylakoidmembran wird durch einen Überblick über den Aufbau der Photosynthesekomplexe erleichtert (Abb. 1.3-1).

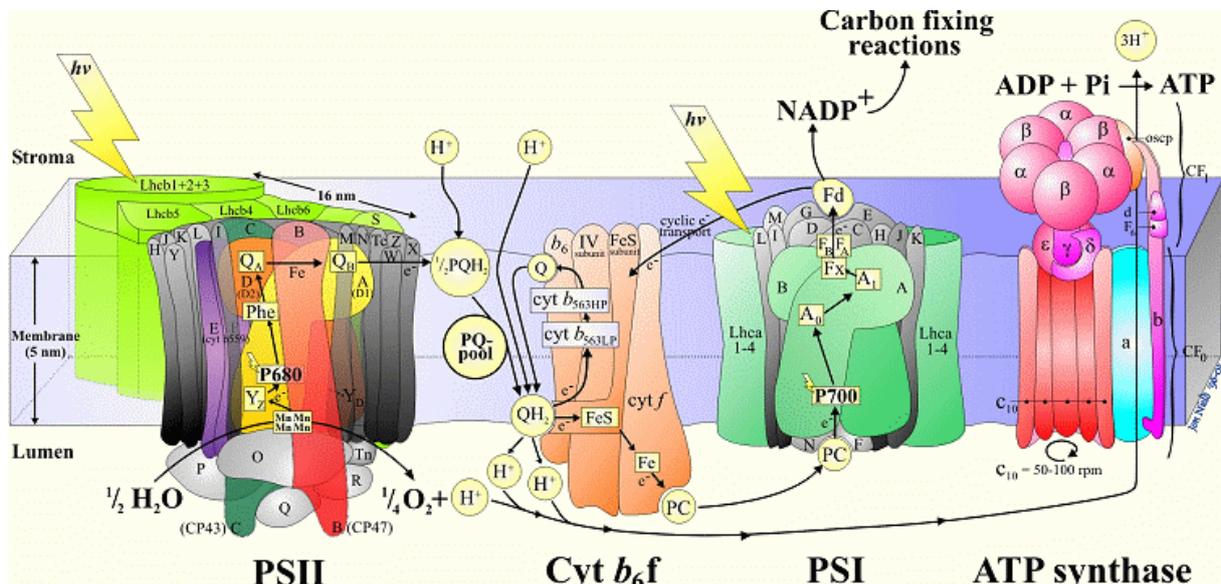


Abbildung 1.3-1: Die vier Komplexe der Photosynthese. Abbildung von Jon Nield, 2003. Erklärung siehe Text.

1.4 Chlorophyllfluoreszenz und Non-Photochemical Quenching

Die Absorption eines Photons führt zum Übergang eines Pigments von seinem energetischen Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Singulett-Zustand (S_1) oder sogar höhere Energielevel ($S_2 - S_n$). Die Moleküle können ihren angeregten Energiezustand durch Vibration und Rotation auf das S_1 -Level relaxieren und von dort durch Fluoreszenzemission oder Vibrationsenergie (Wärmeabgabe) wieder in den Grundzustand gelangen, bzw. durch Spinumkehr eines Elektrons in den Triplettzustand übergehen und von dort durch eine langsame Energieabgabe in Form von Phosphoreszenz auf das S_0 -Niveau zurückfallen [86], [87]. Die Absorptions- und Fluoreszenzemissionswellenlängen der Chlorophylle unterscheiden sich dabei in Abhängigkeit ihrer Substituenten und ihrer Bindung an die Proteine. So kann man bei 77 K anhand der Emissionswellenlängen beispielsweise die langwelligen Chl a Moleküle des PSI-LHCI zwischen 715 und 740 nm und Chl a des PSII-LHCII mit einer Fluoreszenz um die 680 nm unterscheiden [26], [88], [89].

Abbildung 1.4-1 zeigt den Zusammenhang zwischen den Anregungszuständen der Chlorophyll-Elektronen und der Absorption von Chlorophyll a, insbesondere den sogenannten Soret- und Q_y -Maxima, auf die auch im Laufe der vorliegenden Arbeit zur Charakterisierung der Proben verwiesen wird.

Die o.g. Möglichkeiten, die Anregungsenergie des Lichts neben der Nutzung in Form von Photochemie, auch anderweitig wieder abgeben zu können schützt in gewissem Umfang vor photoinhibitorischen Schäden als Folge überschüssiger Lichtenergie [90]-[93]. Insbesondere die Lichtsammlung am PSII mit dem angegliederten Wasserspaltungskomplex verursacht ein hohes Potential reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die erheblichen Schaden an den umliegenden Proteinen und Lipiden anrichten können [94]-[96]. Fluoreszenz, Wärme und Photochemie stehen dabei in direkter Konkurrenz zueinander, so dass Veränderungen eines Parameters Aussagen über die Änderungen der anderen ermöglichen.

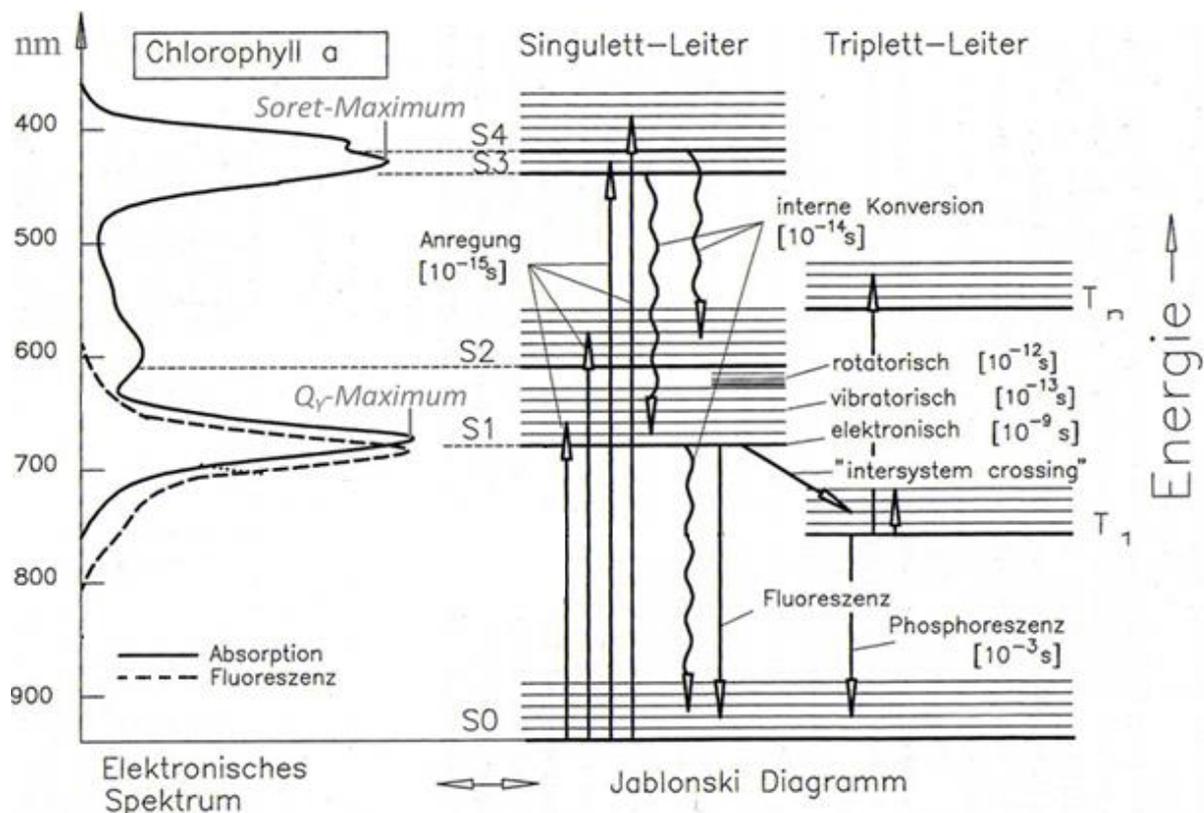


Abbildung 1.4-1: Absorptions- und Emissionsspektrum von Chlorophyll a im Bezug zum Jablonski-Diagramm der Singulett- und Triplettzustände [97].

Die Lichtsammelkomplexe haben demnach zweierlei Funktion: entsprechend ihres Namens sammeln sie das Licht und leiten es an die Reaktionszentren der Photosysteme weiter, wodurch ein Teil der sonst von den Chlorophyllen als Fluoreszenz abgegebenen Energie als photochemische Energie (qP, photochemische Fluoreszenzlöschung, Indikator für die Anzahl offener Reaktionszentren) verwendet wird. Zum anderen dienen sie aber auch dem Schutz der in 1.3 beschriebenen Komplexe vor Schädigung durch ROS, wenn angeregtes Chlorophyll vom Singulett- in den Triplett-Zustand übergeht und von diesem Level durch Übertragung seiner Energie auf Sauerstoff letzteren vom Grundzustand in den angeregten Singulettzustand hebt [96],[98].

Die Mechanismen der Verringerung eines großen Energieüberschusses werden allgemein als NPQ, nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung bzw. non-photochemical quenching, bezeichnet. NPQ wird als Zusammensetzung der drei Komponenten qI, qT und qE beschrieben. Die photoinhibitorische Komponente qI ist noch nicht vollständig erforscht, gilt aber als sehr langsam relaxierender, teils irreversibler Prozess, der durch nachhaltige Photoschädigung ausgelöst wurde [99],[100].

Die Verschiebung des LHCII zum PSI, das sogenannte state transition q_T , wird als Möglichkeit der Verringerung der Lichtabsorption am PSII durch entsprechende Verringerung der Antennengröße soweit zwar anerkannt, doch die dafür nötige Phosphorylierung scheint in Starklichtbedingungen inaktiviert zu werden, so dass fraglich ist, ob die Mechanismen des q_T direkt mit Starklichtschutz gleichzusetzen sind oder eher eine flexible Komponente der Reaktion auf schwankende Lichtbedingungen darstellen [101],[102]. Der Hauptfokus der NPQ-Messungen liegt daher auf der pH- oder auch energieabhängigen Fluoreszenzlöschung (q_E), die direkt mit dem Xanthophyllzyklus (VAZ bzw. DDZ), also der Deepoxidierung von Violaxanthin über Anthera- zu Zeaxanthin (Pflanzen) bzw. von Diadino- zu Diatoxanthin (Diatomeen), verbunden ist [103]-[108].

Die nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung basiert in höheren Pflanzen nach bisherigem Stand der Forschung neben dem Xanthophyllzyklus auf zwei weiteren Komponenten, der Photosystem II - Untereinheit S (PsbS) und der Aggregation der Lichtsammelproteine.

PsbS gehört auf Grund seiner Sequenzhomologien mit den Lhcs auch zur Familie der CAB-Proteine, unterscheidet sich aber durch die Anwesenheit von 4 statt 3 Transmembranhelices und seiner Stabilität in Abwesenheit von Pigmenten deutlich von ihnen [109],[110]. Auf Grund zweier protonierbarer Aminosäuren in der lumenalen Sequenzregion scheint es eine tragende Rolle in q_E zu spielen [111],[112], sobald es in Folge des photosynthetischen Elektronentransports zum Aufbau eines Protonengradienten über der Thylakoidmembran und dadurch zur Ansäuerung des Thylakoidlumens kommt. Diese pH-Änderung verursacht dabei nicht nur die Monomerisierung des in neutralem pH dimeren PsbS, sondern auch die Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin, womit eine deutliche Erhöhung des NPQ-Levels einhergeht [113], [114]. Im Vergleich der reinen Energielevel käme auch Violaxanthin als Akzeptor für überschüssige Lichtenergie und damit als direkte Ursache für die Ableitung überschüssiger Lichtenergie in Form von Wärme in Frage [115]. Da Zeaxanthin weniger polar als Violaxanthin ist, scheint es jedoch stärker an V1 binden zu können [47],[116] und auf Grund seiner Struktur im Gegensatz zu Violaxanthin in Hinblick auf die räumlichen Distanzen zu den umgebenden Chlorophyllen ein besserer Energieakzeptor zu sein [117], [47]. Dennoch konnte anhand von Mutanten-Studien gezeigt werden, dass Zeaxanthin nicht notwendigerweise für die Ausbildung von q_E vorhanden sein muss [118], [119], [120]. Durch *in vitro* Rekonstitution wurde aber verdeutlicht, dass die gemeinsame Zugabe von PsbS und Zeaxanthin zu nativem LHCII zur Bildung von LHCII-PsbS-Heterodimeren und einem deutlich

höheren Level an Chlorophyllfluoreszenzlöschung führte, als es bei den Versuchsansätzen der Fall war, die nur LHCI und Zeaxanthin bzw. LHCI und PsbS enthielten [121].

Es ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung, wie genau das pH-abhängige NPQ in Hinblick auf die drei Komponenten PsbS, Xanthophyllzyklus und struktureller Reorganisation der Lichtsammelproteine zusammenhängt. Einerseits wurde postuliert, dass monomeres, protoniertes PsbS als PSII-Untereinheit Zeaxanthin bindet und so direktes Energiequenching an den inneren PSII Antennenproteinen vermitteln kann [111], [122], [123], [40]. Andererseits sind auch strukturelle Veränderungen in den PSII-LHCI-Superkomplexen als Folge der photosynthesebedingten Ansäuerung des Thylakoidlumens beschrieben worden. So wird die Bildung von qE unter anderem in direktem Zusammenhang mit der PsbS- und Zeaxanthin-vermittelten Dissoziation eines Komplexes aus den minoren Antennenproteinen CP24 und CP29 zusammen mit dem trimeren LHCI vom Photosystem II [124] bzw. der verstärkten Aggregation der LHCI-Trimere [125],[40] gesehen. Andere publizierte Experimente separieren deutlich zwischen einem Zeaxanthin-vermittelten Quenching innerhalb der minoren Antennen und einem PsbS-vermittelten Quenching, das maßgeblich auf der Dissoziation der LHCI-Trimere und deren Aggregation basiert [126].

1.5 Das Ketocarotinoid Astaxanthin

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *N. tabacum* Var. Xanthi bkt-Linie bildet die Ketocarotinoide Asta- und Canthaxanthin, die zu den für die Photosynthese nicht notwendigen, sekundären Carotinoiden gehören. Sie werden natürlicher Weise in einigen Vertretern des Phytoplanktons, wie beispielsweise der Grünalge *Haematococcus pluvialis*, als Folge von ungünstigen Nährstoffveränderungen und Starklichtstress gebildet [127]-[129].

Ihre Biosynthese erfolgt über den plastidären Carotinoidstoffwechselweg, wobei Canthaxanthin eine Vorstufe des Astaxanthins darstellt (Abb. 1.5-2). Ausgehend von β -Carotin bzw. Zeaxanthin sind die Schlüsselenzyme für die Astaxanthinproduktion dabei die β -Carotin-Hydroxylase und die β -Carotin-Ketolase.

Diese Ketocarotinoide kommen in Pflanzen in der Regel nicht vor, bekannte Ausnahmen sind dabei aber die Blütenblätter von Vertretern der Gattung *Adonis* und das Herbstlaub des Urweltmammutbaums *Metasequoia glyptostroboides* [131],[132].

Auf Grund ihrer intensiven, rötlichen Farbe dienen Asta- und Canthaxanthin als Zusatzstoffe in Lebens- und Futtermitteln, und verleihen so beispielsweise Lachs den appetitlich-rosa Farbton oder Flamingos durch die Aufnahme von Phytoplankton-fressenden Kleinkrebsen das pinkfarbene Gefieder [133],[134]. Schon seit langem ist das Ketocarotinoid Astaxanthin für seine starke antioxidative Wirkung bekannt [135],[127], doch insbesondere die Studien zu seiner Wirkung gegen Krebs schaffen ein sehr hohes Interesse an diesem Pigment [136]-[138].

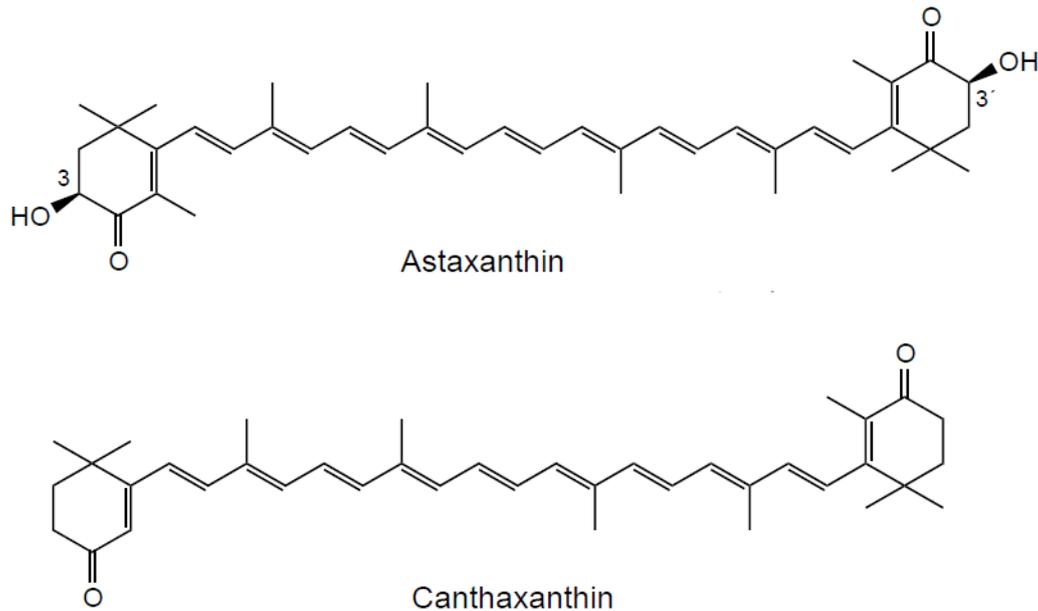


Abbildung 1.5-1: Strukturen der Ketocarotinoide Asta- und Canthaxanthin. Aus Guerin *et al.*, 2003 [130].

Bisher wird Astaxanthin zu relativ hohen Kosten aus *Haematococcus pluvialis* - Kulturen isoliert. Obwohl die Grünalge unter den Astaxanthinproduzenten der bisher effizienteste Organismus ist, gilt sie nicht zuletzt auch wegen ihrer langsamen Wachstumsrate und Intoleranz gegen höhere Temperaturen als wenig rentabel für die Massenproduktion [134]. Der wissenschaftliche Trend geht daher hin zu Suche nach genetisch veränderten Modellorganismen, die das Pigment zu ökonomisch günstigeren Bedingungen zum einen im Überschuss und zum anderen leicht isolierbar produzieren. Unter den Testorganismen befindet sich beispielsweise *Arabidopsis thaliana* [139], das hier verwendete Nachtschattengewächs *Nicotiana tabacum* [140] und dessen naher Verwandter, die Tomate [141].

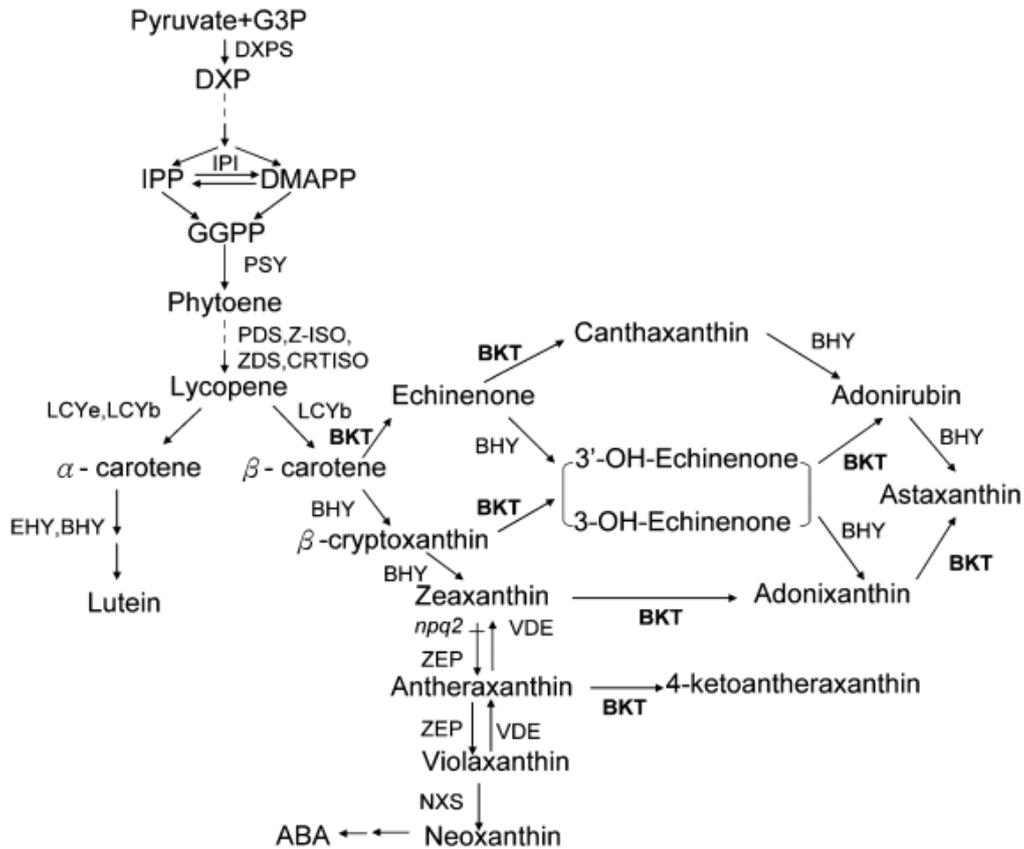


Abbildung 1.5-2: Postulierter Ketocarotenoid-Syntheseweg in *Arabidopsis thaliana* (transgen) aus Zhong *et al.* 2011 [139].
 Abkürzungen: G3P, D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DXPS, 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat; IPP, Isopentenylpyrophosphat; DMAPP, Dimethylallyldiphosphat; GGPP, Geranylgeranyldiphosphat; ABA, Abscisinsäure; DXPS, 1-Desoxy-D-Xylulose-5-phosphat-Synthase; IPI, Isopentenylidiphosphat-Isomerase; PSY, Phytoensynthase; PDS, Phytoen-Desaturase; Z-ISO, 15-cis- ζ -Carotin-Isomerase; ZDS, ζ -Carotin-Desaturase; CRTISO, Carotin-Isomerase; LCYe, Lycopene ϵ -Cyclase; LCYb, Lycopene β -cyclase; EHY, ϵ -Carotin-Hydroxylase; BHY, β -Carotin-Hydroxylase; BKT, β -Carotin-Ketolase; ZEP, Zeaxanthin-Epoxidase; VDE, Violaxanthin-Deepoxidase; NXS, Neoxanthin-Synthase.

1.6 Ziele der Arbeit

I) In der hier vorgelegten Arbeit stehen die Lichtsammelkomplexe LHCI_{II} aus *Nicotiana tabacum* und FCPb aus *Cyclotella meneghiniana* im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Zum einen wurde der Einfluss der Ketocarotinoide in einer entsprechend genetisch veränderten Tabakpflanze auf den LHCI_{II} und die Struktur und Funktion des Photosyntheseapparats im Allgemeinen untersucht. Sekundäre Carotinoide wie Asta- und Canthaxanthin kommen in *N. tabacum* natürlicherweise nicht vor, so dass vor dem Hintergrund einer gewissen Flexibilität des LHCI_{II} [35], [36], [37], [38] in Hinblick auf seine Pigmentierung im Laufe der Charakterisierungsarbeiten die Frage aufkam, ob die hier gebildeten Ketocarotinoide in den Lichtsammelkomplex eingebaut werden könnten und die veränderte Pigment-Zusammensetzung in der Pflanze keine weiteren Auswirkungen auf den Zusammenbau der PSII-LHCI_{II}-Superkomplexe aufzeigt.

II) Anhand biochemischer Analysen wurde bereits festgestellt, dass der FCPb der Kieselalge *Cyclotella meneghiniana* wie der etwas größere LHCI_{II} als trimere Einheit existiert, doch wurden auch größere Komplexe aus dieser Einheit gefunden [55], [142]. Wie das Trimer und seine höheren Oligomere konkret angeordnet sind, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Durch Transmissionselektronenmikroskopie und anschließende Einzelpartikelanalyse sollte daher hier geklärt werden, ob das FCPb-Trimer wie auch der LHCI_{II} trigonal angeordnet ist und wie sich die trimeren Untereinheiten strukturell zu den postulierten Oligomeren anordnen.

2 Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben stammten die verwendeten Chemikalien von Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

2.1 Anzucht der Versuchsorganismen

2.1.1 Anzucht von *Nicotiana tabacum* Var. Xanthi

Die Samen des in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Tabaks *N. tabacum* Var. Xanthi (Wildtyp (im Folgenden abgekürzt mit WT) und der *bkt*-Transformante N28-1 (T1) (im Folgenden abgekürzt mit *bkt*) wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. G. Sandmann, JWGU Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Ihren Ursprung hat die *bkt*-Linie in der Kollaboration um Prof. Dr. Feng Chen., Universität von Hongkong [140].

Zur Initiierung des Quellvorgangs wurden die Samen zunächst für 24 Stunden bei Raumtemperatur in VE-Wasser unter Lichtausschluss gelagert, bevor sie einzeln auf Topfsubstrat („mittlere Struktur“) der Firma Stender ausgelegt wurden, um in der Folge in einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 Stunden bei 25 °C und einer Weißlicht-Stärke von 100-140 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ zu wachsen. Nach 4 Wochen erfolgte die Umsetzung und damit verbunden die Vereinzelnung der Pflanzen.

Abweichend von dieser Standardanzucht wuchsen die Pflanzen nach einer 2-tägigen Keimung bei ca. 100 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ und 25 °C zur Dokumentation ihres Wachstums in verschiedenen Lichtintensitäten vergleichend für 4 Wochen in Schwachlicht (40 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$), Normallicht (140 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$) und Starklicht (400 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$).

2.1.2 Anzucht von *Cyclotella meneghiniana*

Die Anzucht des aus der Algenkultursammlung Göttingen erworbenen Diatomeen-Stamms SAG 1020-1a erfolgte modifiziert nach [143] als 300 ml Schüttel-Kultur (120 Umdrehungen pro Minute) in ASP-Medium (Tab. 2.1-2) über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 18 °C Raumtemperatur und Schwachlicht (35 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$) in einem 16h/8h Tag/Nacht-Rhythmus.

2.2 Fluoreszenzkinetiken

Im Alter von 5,5 Wochen wurde die Hälfte der bis dahin in Normallicht (NL, ca. 120-140 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) gewachsenen Tabakpflanzen für weitere 5 Tage in Schwachlicht (SL, ca. 30-40 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) gestellt. Danach erfolgte in der Lichtphase an den nun ca. 4-5 Wochen alten adulten Blättern in NL und SL eine 30-minütige Dunkeladaptation, mit sog. Leafclips, zur vollständigen Oxidation der Photosynthese-Elektronentransportkette, um anschließend Kinetiken der Chlorophyll a - Fluoreszenz und daraus abgeleitet Parameter zur Charakterisierung der Photosynthese zu ermitteln.

2.2.1 PAM - Messungen (NPQ)

Die Bestimmung des NPQ und damit verbunden weiterer Parameter zur Untersuchung der Photosyntheseleistung erfolgt über die Messung der Chlorophyll a - Fluoreszenz *in vivo*.

Diese Messungen beruhen dabei auf einem 1986 von Schreiber *et al.* erstmalig entwickelten Puls-Amplituden-modulierten (PAM) Fluorometer [144]. Die Geräte dieser Art haben über die Jahre zwar einige Verbesserungen durchlebt, das Grundprinzip blieb aber das gleiche: Ein schwaches, nicht-aktinisches LED-Messlicht wird mit einer definierten Frequenz auf ein Blatt gestrahlt. Die dabei erzeugte Chlorophyllfluoreszenz kann vom Detektor als messlichterzeugte Grundfluoreszenz (F_0) von der eigentlichen Fluoreszenz unterschieden werden, die von Chlorophyllen nach Anregung mit aktinischem Licht abgegeben wird.

Unterschiede in der Chlorophyll-Fluoreszenzintensität wurden dabei erstmalig als das beschrieben, was wir heute den „Kautsky-Effekt“ nennen:

Unter dem Kautsky-Effekt versteht man die Änderungen in der Chl a Fluoreszenzintensität während der Belichtung eines zuvor dunkel-adaptierten Blattes [145].

Damit wird die Fähigkeit des PSII beschrieben, Elektronen auf Grund des Ein-Elektronenakzeptors Q_A immer nur einzeln nacheinander aufzunehmen. Sind die Elektronenakzeptoren des PSII erst einmal reduziert, bezeichnet man das PSII als geschlossen, da keine weitere Ladungstrennung mehr stattfinden kann. Überschüssige Energie wird in diesem Stadium in Form von Fluoreszenz vom Chlorophyll a abgegeben und kann als Maximalfluoreszenz (F_m) einer Probe nach Dunkeladaptation gefolgt von einem sättigenden, aktinischen Lichtblitz beschrieben werden.

NPQ-Messungen werden über einen definierten Zeitraum von mehreren Minuten durchgeführt, um die diversen Parameter zur Charakterisierung der Photosynthesekapazität

und des NPQ aufnehmen zu können. Ein guter Übersichtsartikel hierzu ist Maxwell & Johnson, 2000 [93]. Definiert werden dabei die Berechnungen der von Schreiber *et al.* (1986) und Genty *et al.* (1989) aufgezeigten Parameter F_v/F_m , F_v'/F_r , ϕPSII und NPQ (vgl. Tab. 1.4-1, Tab. 2.2-1), die auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung finden werden [144], [146]. Aus den o.g. Erläuterungen lässt sich festhalten: parallel zum Reduktionsprozess des PSII steigt die Fluoreszenz des Chlorophyll a deutlich an und diese messbare Fluoreszenz dient als Analysegrundlage der Photosynthese. Das Einsetzen der nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung (NPQ) im Verlauf der Experimente führt dabei zu einer Reduktion der Chlorophyllfluoreszenz, die sich durch die Berechnung des $(F_m - F_m')/F_m'$ oder aus der Addition der Komponenten qE und qI ergibt.

Tabelle 2.2-1: Bedeutung der aus PAM-Messungen ableitbaren Parameter [93], siehe Abbildung 2.2.1.

F_v/F_m	maximaler Anteil der für die Photochemie genutzten Photonen: $(F_m - F_0)/F_m$
F_v'/F_r	wie oben, aber nach Lichtstress mit anschließender Dunkelphase → Ausdruck der Regenerationsfähigkeit: $(F_r - F_0')/F_r$
ϕPSII	Ausdruck des in der Photochemie genutzten Lichtanteils $(F_m' - F_t)/F_m'$
NPQ	nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung: $(F_m - F_m')/F_m'$ oder $qE + qI$

Der Messablauf mit der Mini-PAM (portables Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer zur Bestimmung der Chlorophyll-Fluoreszenz; Walz, Deutschland) gestaltete sich dabei wie folgt:

- 1) Messung der Grundfluoreszenz F_0 im dunkeladaptierten Zustand
(das Emissionsmaximum des Messlichts liegt bei 650 nm)
- 2) Abgabe eines sättigenden Lichtblitzes ($>3000 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, aktinisches Licht) zur Bestimmung der Maximalfluoreszenz (F_m) einer dunkel adaptierten Probe,
- 3) 5-minütige Belichtung mit aktinischem Licht (ca. $600-700 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$) zur Ermittlung der Steady State (F_t) und der maximalen Fluoreszenz (F_m') einer belichteten Probe durch einen sättigenden Lichtblitz am Ende der Belichtungsphase,
- 4) 30 Minuten Dunkeladaptation zur Regeneration des Blattes,
- 5) Wie 1) zur Bestimmung der Grundfluoreszenz (F_0') und 2) zur Bestimmung der Höhe der Maximalfluoreszenz (F_r) der relaxierten Probe.

Die daraus ableitbaren Berechnungen zur Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit auswertbaren Photosynthese-Parameter sind in Tabelle 2.2-1 aufgelistet. Statistisch wurden

die Einzelmessungen von WT und bkt-Linie durch einen einseitigen studentischen t-Test mit zwei Stichproben gleicher Varianz auf die Signifikanz der gemessenen Unterschiede hin untersucht.

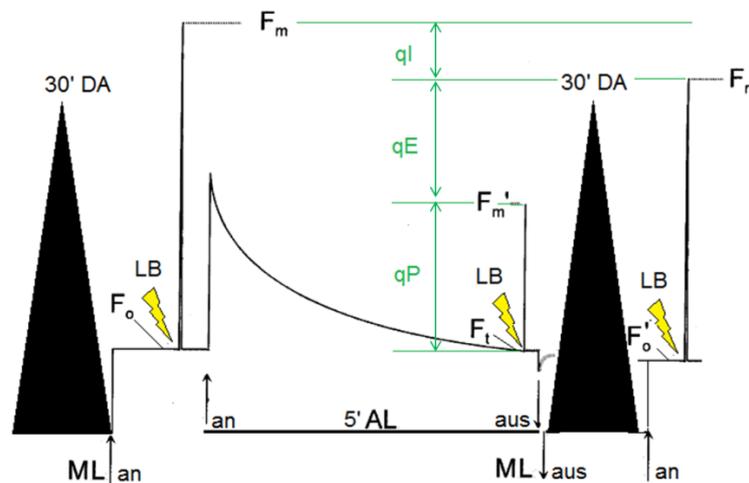


Abbildung 2.2-1: Mini-PAM-Messungen. Dargestellt sind der Messverlauf und die daraus ables-, bzw. ableitbaren Parameter. Modifiziert nach Maxwell & Johnson (2000) und Müller *et al.* (2001), [93], [96]. AL, aktinisches Licht; DA, Dunkeladaption; LB, sättigender Lichtblitz; ML, Messlicht; F_0 bzw. F_m , Grund- bzw. Maximalfluoreszenz des dunkeladaptierten Blattes; F_t bzw. F_m' , Grund- bzw. Maximalfluoreszenz des belichteten Blattes; F_0' bzw. F_r , Grund- bzw. Maximalfluoreszenz des relaxierten Blattes nach erneuter Dunkeladaption; qP , Photochemie; qE , pH-abhängiges Fluoreszenzlöschen; qI , photoinhibitorisches Fluoreszenzlöschen.

An ausgestanzten Blattscheiben von in Normallicht ($140 \mu E/(m^2 \cdot s)$) gewachsenen Pflanzen wurde zudem auch der Einfluss höherer Lichtintensitäten und kürzerer Regenerationszeiten mit dem (nicht portablen) PAM-101 (Walz) untersucht. Hier erfolgte zunächst eine 15-minütiger Dunkelinkubation mit anschließender F_0 und F_m - Bestimmung. Es folgte eine ca. 20-minütigen Bestrahlung mit $900 \mu E/(m^2 \cdot s)$ aktinischen Lichts und eine kurze Regenerationsphase von 5-minütiger Dunkelheit mit der anschließenden Bestimmung von F_0' und F_r am Ende der Messungen.

2.2.2 PEA-Messungen (OJIP)

Die binnen einer Sekunde ablaufende Reduktion der Elektronenakzeptoren Q_A und Q_B im PSII und somit dessen Aktivität kann dank einer Weiterentwicklung der unter 2.2.1 beschriebenen Technik im Rahmen der sogenannten OJIP-Messungen direkt am Blatt nachvollzogen werden, wobei die verwendete Abkürzung OJIP (Tab. 1.4-2) schlichtweg den Kurvenverlauf beschreibt [147]. Der Wendepunkt J wird dabei den (teil)reduzierten Chinonen ($Q_A^- Q_B$ und $Q_A^- Q_B^-$) zugeschrieben, wohingegen I die Stufe der beginnenden $Q_A^- Q_B^-$ Reduktion beschreibt, deren Maximum bei P erreicht ist. Die vollständige Reduktion des

in der Thylakoidmembran vorliegenden Plastochinon-Pools (Q_B zu Q_B^{2-} zu PQH durch Aufnahme von 2 Protonen pro reduziertem Q_B^{2-}) dauert um die 500 ms [148], [149].

Tabelle 2.2-2: Bestandteile der OJIP-Kurve nach Strasser & Govindjee, 1991 [147].

O	origin	Grundfluoreszenz zu Beginn der Messung (F_0)
J	intermediate 1	erster Fluoreszenz-Wendepunkt
I	intermediate 2	zweiter Fluoreszenz-Wendepunkt
P	peak	maximale Fluoreszenz (F_m)

Durch das portable Fluorimeter Pocket PEA (Plant Efficiency Analyzer der Firma Hansatech Instruments, England) erfolgte die Messung der schnellen Fluoreszenzkinetik im PSII nach einem sättigenden Lichtblitz von ca. $3500 \mu E/(m^2*s)$ bei einem Messlicht mit Emissionsmaximum bei 627 nm. Durch die Software PEA Plus (Version 1.02) konnten die durch das Gerät ermittelten Fluoreszenzkurven (OJIP) und die F_v/F_m -Werte digital dargestellt werden. Die Einzelmessungen von Wildtyp (n=5) und bkt-Linie (n=7) wurden anschließend zur besseren Vergleichbarkeit der Wendepunkte J und I mit den jeweiligen Fluoreszenzminima auf 0 bzw. den entsprechenden Maxima auf 1 normiert und gemittelt.

2.3 Thlykoidisolation

2.3.1 *Nicotiana tabacum* Var. Xanthi

Die Ernte der Blätter erfolgte am Ende der Dunkel-Phase, um den Gehalt an Speicherstärke so gering wie möglich zu halten. Das Zerkleinern des Blattmaterials erfolgte bei 4 °C im Dunkeln wie im Folgenden beschrieben (modifiziert nach Burke *et al.* (1978), [115]): 4 x 10 Sekunden Häckseln von 100 g Frischgewicht auf 150 ml Puffer A im Waring Blender (Bender & Hobein, Zürich). Es folgten die Filtration durch 4 Lagen Gaze und 1 Lage Miracloth (Calbiochem) und die Sedimentation der aus den aufgebrochenen Chloroplasten gewonnenen Thylakoide für 10 min bei $8600 \times g$. Nach Rücklösen des Sediments in der Hälfte des Ausgangsvolumens mit Puffer B wiederholte sich der o.g. Zentrifugationsschritt. Die gewaschenen Thylakoide wurden nun mit einer Konzentration von 3-5 mg Chl/ml in einem sehr geringen Volumen mit Puffer C rückgelöst und konnten anschließend entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Tabelle 2.3-1: Pufferzusammensetzung für die Thylakoidisolation aus *N. tabacum*.

Puffer A	Puffer B	Puffer C	Puffer B1-Nt	Puffer B1a-Nt
50 mM HEPES, pH 7,5	50 mM Mes, pH 6	50 mM Mes, pH 6,0	40 mM Mes	B1-Nt
400 mM NaCl	150 mM NaCl	15 mM NaCl	20 mM NaCl	0,03% β -DDM
10 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	-
2 g/l BSA	1g/l BSA	-	1 mM CaCl ₂	-
0,5 g/l Ascorbat	0,5 g/l Ascorbat	-	-	-

2.3.2 *Cyclotella meneghiniana*

Nach 7 Tagen Wachstum bei 18 °C Raumtemperatur und Schwachlicht (35 μ E/(s*m²)) in einem 16h/8h Tag/Nacht-Rhythmus, wurden die Zellen jeweils am 7. Tag eine Stunde nach Ende der Dunkelphase geerntet.

Für die Zellernte wurden die Kulturen durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 Umdrehungen/Minute (Herolab HiCen 21C, Rotor F10S-6x500y, Fiberlite) sedimentiert und anschließend in Homogenisierungspuffer (Tab. 2.3-2) rückgelöst und anschließend entweder direkt weiter verwendet oder bei - 20 °C gelagert. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte leicht modifiziert nach [59] mit einer Glasperlenmischung (2 Teile \varnothing 1 mm, 1 Teil \varnothing 0,25 mm) in einer auf 4 °C gekühlten Kugelmühle (Edmund Bühler, Tübingen) mit 8 Schüttelzyklen à 45 Sekunden, jeweils unterbrochen von 30 Sekunden Pause. Nach Vakuumfiltration durch eine Glasfritte (Duran, Porosität 0) wurden die aufgebrochenen Zellen auf ein Volumen von 150 ml mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und für 15 Minuten bei 1000 Umdrehungen/Minute und 4 °C zentrifugiert (Biofuge primo R, Heraeus), um Zelltrümmer durch Sedimentation von den Thylakoiden zu trennen. Letztere wurden in einem nachfolgenden Schritt durch 45minütige Zentrifugation bei 300000 x g in einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery 90 SE, Kendro/Thermo) sedimentiert und anschließend in Waschpuffer (Homogenisierungspuffer ohne Sorbitol) rückgelöst. Nach abschließender Zentrifugation über 30 Minuten bei 200000 x g und 4 °C konnten die Thylakoide in Waschpuffer C gelöst und entweder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert oder direkt weiter verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Thylakoide in der Regel direkt weiter verwendet (im Ergebnisteil der Kürze halber als „frisch“ bezeichnet), sofern nicht anders angegeben.

Tabelle 2.3-2: Zusammensetzung diverser Lösungen zur Anzucht und Thylakoidisolation von *C. meneghiniana*

ASP-Medium	Homogenisierungspuffer	B1a-Cm
1 mM Kieselsol	10 mM Mes	25 mM Tris
86 mM NaCl	2 mM KCl	2 mM KCl
4 mM Tris	5 mM EDTA	0,03 % β -DDM (AppliChem)
21 mM KCl	pH 6,5	
8,1 mM MgSO ₄	1 M Sorbitol	
11,8 mM NaNO ₃		
0,58 mM K ₂ HPO ₄		
0,16 mM H ₃ BO ₃		
pH 7,7 (H ₂ SO ₄), autoklavieren	Waschpuffer	B1-Cm
2,72 mM CaCl ₂	10 mM Mes	25 mM Tris
0,092 mM Na ₂ -EDTA	2 mM KCl	2 mM KCl
0,012 mM FeCl ₃	5 mM EDTA	
0,02 mM MnCl ₂	pH 6,5	
0,002 mM ZnCl ₂		
50 pM CoCl		
25 pM Na ₂ MoO ₄		
22,5 pM CuCl ₂		

2.4 Pigmentanalysen

2.4.1 Chlorophyllbestimmungen

2.4.1.1 *Nicotiana tabacum* Var. Xanthi

Die Chlorophyllbestimmungen der zuvor im Glashomogenisator homogenisierten Thylakoide erfolgten bei einer Verdünnung von 1:500 in 80 %igem Aceton, nach 5-minütiger Sedimentation unlöslicher Bestandteile bei 13000 Upm, in Küvetten aus optischem Spezialglas (10 mm, Hellma) bei 646,8 nm, 663,6 nm und 750 nm und einer Bandweite von 1 nm nach [150]. Hierzu wurden das Spektrometer Jasco V-550 und die dazu gehörige Software Spectra Manager (Version 1.41.02) verwendet. Die Berechnungen erfolgten dann unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors über die folgenden Gleichungen [150]:

$$\text{Chl } a \text{ [mg/ml]} = 0,0127 \times (E_{663,6} - E_{750}) - 0,00269 \times (E_{646,8} - E_{750})$$

$$\text{Chl } b \text{ [mg/ml]} = 0,0229 \times (E_{646,8} - E_{750}) - 0,00468 \times (E_{663,6} - E_{750}).$$

2.4.1.2 *Cyclotella meneghiniana*

Die Chlorophyllbestimmungen erfolgten nach [151] in 90 %igem Aceton, nach 5-minütiger Sedimentation unlöslicher Bestandteile bei 13000 Upm, in Küvetten aus optischem Spezialglas (10 mm, Hellma) bei 630 nm, 664 nm und 750 nm und einer Bandweite von 1 nm. Hierzu wurden das Spektrometer Jasco V-550 und die dazu gehörige Software Spectra Manager (Version 1.41.02) verwendet. Die Berechnung erfolgte dann über die folgenden Gleichungen [151]:

$$\text{Chl } a \text{ [mg/l]} = 11.47 \times (E_{664} - E_{750}) - 0.40 \times (E_{630} - E_{750})$$

$$\text{Chl } c \text{ [mg/l]} = 24.34 \times (E_{630} - E_{750}) - 3.73 \times (E_{664} - E_{750}).$$

2.4.2 HPLC-Messungen von *N. tabacum* Var. Xanthi

Aus adulten Blättern von *N. tabacum* Var. Xanthi wurden für die Bestimmung der Pigmentzusammensetzung ca. 2 cm große Blattscheiben ausgestanzt, in flüssigem Stickstoff (N₂ lq) eingefroren und anschließend in N₂ lq gemörsert. Die Dehydratation des Blattpulvers erfolgte durch 18-stündiges Lyophilisieren bei -58 °C und 0,47 mbar Vakuum (ALPHA 1-4 LSC, Christ Gefriertrocknungsanlagen). Anschließend wurden die Trockengewichte bestimmt (Feinwaage Sartorius Analytic) und die Proben zur HPLC (high performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeit chromatographie) - Analyse an Dipl.-Biol. Hagen Schlicke aus der AG Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. B. Grimm), Humboldt-Universität zu Berlin, gesandt. Das Blattpulver wurde hier jeweils mit 800 µl Aceton und 0,1 M NH₄OH in einem Volumen-Verhältnis von 9:1 versetzt und für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Die anschließende Pigmentbestimmung erfolgte bei Raumtemperatur durch Auftrennung der Proben auf einer Protonsil 200-3-C30-Säule (3 µm, 250 x 4,6 mm) bei einem Lösungsmittelgradienten aus A) 90 % Acetonitril, 10 % Wasser, 0,1 % Triethylamin und B) 100 % Ethylacetat mit einer Flussrate von 1 ml/min, gesteuert durch das HPLC System Agilent 1100. Die Quantität der identifizierten Photosynthesepigmente höherer Pflanzen sowie Asta- und Canthaxanthin, deren Standards freundlicher Weise von Prof. Dr. Sandmann zur Verfügung gestellt worden sind, konnten anhand der Peak-Flächen bzw. -Höhen berechnet werden.

2.5 Radikalreduktionsnachweis

Um zu überprüfen, ob Astaxanthin neben den nativ in den Thylakoidmembranen vorkommenden Pigmenten eine signifikante Rolle als Radikalfänger spielt, wurde ein nach [152] modifizierter Radikalreduktionsnachweis angewandt. Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung der Radikallösung aus gleichen Teilen in Wasser gelöster 7,6 mM ABTS (2,2-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) und 2,45 mM K_2SO_5 . Diese Lösung wurde über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend mit 100 % Ethanol bei 734 nm auf eine Absorption von 1,35 eingestellt (=Kontrolle). Je 1,5 ml dieser alkoholischen Lösung wurden mit Thylakoiden aus adulten Blättern von Wildtyp und bkt-Linie (je 1 μ g Chl a) versetzt, Schwebeteilchen durch 1 Sekunde „shortspin“ bei 13000 Umdrehungen/Minute in der Biofuge fresco (Heraeus) sedimentiert und die Absorption des Überstandes bei 734 nm über einen Zeitraum von 125 Minuten gegen die o.g. Kontrolle photometrisch (Ultrospec 1000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.6 Ionenaustauscherchromatographie von *C. meneghiniana* Thylakoiden

Frisch isolierte Thylakoide aus *C. meneghiniana* wurden nach [59] mit 1,5 mg Chl a in einem Endvolumen von 6 ml B1 mit 20 mM β -DDM für 20 Minuten langsam schwenkend auf Eis solubilisiert und anschließend 5 Minuten bei 13000 Umdrehungen/Minute Biofuge fresco (Heraeus) und 4 °C zentrifugiert. Nach Filtration des Überstands durch den Filteraufsatz Filtropur S 0.2 (Sarstedt) erfolgte umgehend die Auftragung der Probe über einen 10 ml - Superloop auf eine 8 cm hohe Säule aus positiv geladenem Toyopearl DEAE-650S - Material in B1a. Im Rahmen der Ionenaustauscherchromatographie (IEX) wurde anschließend mit 30 ml B1a gewaschen, um nicht gebundenes Material zu entfernen. Durch einen kontinuierlich ansteigenden Salzgradienten (0-25 % 750 mM NaCl in B1a) erfolgte daraufhin die sukzessive Elution von PSI, FCPa, PSII und FCPb. Während der durch den Äkta Purifier P900 (Amersham) gesteuerten Ionenaustauscherchromatographie (IEX) blieben Flussrate (2 ml/min), Druck (0,12 MPa) und Fraktionsvolumen (2 ml/Fraktion) konstant. Die Eluatsammlung erfolgte auf Eis durch den Frac-950 (Amersham) in 2 ml Fraktionen. Detektiert wurde die Proben trennung durch die Äkta Purifier Detektoruntereinheit UV-900 (Amersham) bei 437 nm. Die braun gefärbten Fraktionen wurden anhand von Absorptionsspektren FCPa (Fraktion D7-F3) bzw. FCPb (Fr. G9-G12) zugeordnet, vereinigt und für die

Weiterverwendung im Saccharosedichtegradienten bei 1000 x *g* in Millipore Centripreps mit einem Größenausschluss von 30 kDa auf ein Volumen von ca. 300 µl reduziert.

2.7 Größenausschlusschromatographie

Die über SDG gereinigten FCPs aus *C. meneghiniana* und der aus *N. tabacum* Var. Xanthi isolierte LHCI wurden durch eine Größenausschlusschromatographie, nachfolgend SEC genannt, anhand ihrer Größen zueinander verglichen.

Die SEC bestand aus 33 cm des Säulenmaterial Superdex 200 (GE Healthcare) in B1a-Cm (Tab. 2.3-2), gefüllt in eine Omnifit Glassäule mit 0,66 cm Durchmesser. Das Grundprinzip folgt der in [55] beschriebenen Auftrennung der FCPs, adaptiert von Kathi Gundermann auf das o. g. System.

Die direkt aus dem Saccharosegradienten entnommenen Proben wurden mit einem Chlorophyllgehalt zwischen 10 und 100 µg Chl a in 100 µl Endvolumen (ggf. verdünnt mit B1a-Cm (Tab. 2.3-2)) auf die Säule aufgetragen.

Die in 3.2.2 angegebenen Ergebnisbeschreibungen von FCPs, die mit 20 bzw. 100 mM β-DDM nachsolubilisiert worden sind, beziehen sich auf eine einstündige Inkubation von 20 µg Chl a in 100 µl B1-Cm mit dem entsprechenden Detergenzgehalt bei Raumtemperatur.

Die in 3.2.2 angegebene Ergebnisbeschreibung zur „lyophilisierten und beglimmten Probe“ bezieht sich auf 50 µl direkt aus dem SDG entnommenen FCPb, der zunächst im 1,5 ml Reagiergefäß bei -58 °C und 0,47 mbar gefriergetrocknet (ALPHA 1-4 LSC von CHRIST), anschließend für 20 Sekunden bei einem Vakuum von 0,1 mbar und 10 mA in der Cressington Power Unit 208 (Cressington) beglimmt und wieder in 50 µl B1a-Cm rückgelöst wurde.

Die Flussrate (0,3 ml/min), der Druck (0,10 MPa) und das Fraktionsvolumen (0,75 ml/Fraktion) blieben in den jeweiligen durch den Äkta Purifier P-900 (Amersham) gesteuerten Läufen konstant. Detektiert wurde der Probenlauf durch die Äkta Purifier Detektoruntereinheit UV-900 (Amersham) bei 280 nm (Protein) und 437 nm (Chl a). Die Eluatsammlung erfolgte auf Eis durch den Frac-950 (Amersham) in 750 µl Fraktionen.

2.8 Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation

2.8.1 Kontinuierliche SDG von *N. tabacum* Var. *Xanthi* - Granathylakoiden

Zur Auftrennung der Photosynthesekomplexe wurden zunächst durch 3-fache Gefrier-Tauzyklen kontinuierliche Saccharose-Gradienten aus einer 17 %igen Saccharoselösung in Puffer B1a-Nt (Tab. 2.1-1) hergestellt. Die Solubilisierung der Thylakoidmembranen erfolgte zunächst im Rahmen der sogenannten „BBY“-Herstellung nach [153] durch 20-minütige Inkubation von 6 mg Chl mit 4,4 % v/v Triton-X-100 (aus einer 25 %igen Stammlösung) ad 3 ml Puffer C (Tab. 2.1-1) unter ständigem, langsamem Rühren auf Eis. Mit Ablauf der Solubilisierungsdauer konnten die durch die Detergenzbehandlung aus der Membran gelösten Grana-Stapel für 30 Minuten bei 27000 Umdrehungen/Minute in der Ultrazentrifuge (UZ) (Sorvall Discovery 90 SE, Kendro/Thermo) mit dem Rotor TFT 80.4 sedimentiert werden. Die Sedimente wurden in Puffer B1-Nt (Tab. 2.1-1) rückgelöst, auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. An diesen Waschschrift schloss sich direkt die Vorbereitung der BBYs für die Auftrennung im Saccharosedichtegradienten (SDG) nach [154] an. Die Proben wurden hierzu bei einem Chlorophyllgehalt von 1,2 mg Chl a mit 20 mM β -DDM ad 1,2 ml B1 in einem Glashomogenisator 6x mechanisch behandelt und dann eine Minute bei 13000 Umdrehungen in einer auf 4 °C gekühlten Biofuge fresco (Heraeus) zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde mit jeweils ca. 200 μ g Chl a/200 μ l auf 6 vollständig aufgetaute Gradienten verteilt. Die Separierung der in den Granastapeln enthaltenen Photosynthese-Komplexe erfolgte nun durch Auftrennung in den Saccharosegradienten in 36 ml-Polyallomer-Röhrchen (PK25, Sorvall) durch eine 22-stündige Zentrifugation bei 4 °C und 230000 x g in der o.g. UZ im Rotor AH-6.29 (Sorvall) oder SW28 (Beckmann).

2.8.2 Diskontinuierliche SDG von FCPa und FCPb aus *C. meneghiniana*

Über eine Ionenaustauscherchromatographie (IEX, Abschnitt 2.7) wurden die Lichtsammelkomplexe FCPa und FCPb aus den Thylakoidmembranen von *Cyclotella meneghiniana* isoliert und voneinander separiert. Durch die anschließende Ultrazentrifugation in diskontinuierlichen SDG konnten verbliebene Photosysteme aus den FCP-Fraktionen entfernt werden. Die hierfür verwendeten Gradienten wurden hierfür bei 4 °C kurz vor Verwendung wie folgt mit Saccharoselösungen verschiedener Dichte in B1a-Cm

(Tab. 2.3-2) geschichtet: 7 ml 14,5 %, 4 ml 12 %, 3 ml 10 % und 2 ml 7,5 %. Die aus der IEX gewonnenen FCPs wurden bei 1000 x *g* in Millipore Centripreps mit einem Größenausschluss von 30 kDa auf ein Volumen von ca. 300 µl reduziert und anschließend vollständig auf jeweils einen Gradienten aufgetragen. Die 22-stündige Ultrazentrifugation erfolgte bei 4 °C und 230000 x *g* in der o.g. UZ (Rotor AH6.29, Sorvall).

2.9 Spektroskopie

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben wurden durch Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren hinsichtlich ihrer Funktionalität und Intaktheit näher charakterisiert.

Messungen

Die Absorption wurde am Jasco-550V mit einer Spaltbreite von 2 nm und einer Messgeschwindigkeit von 400 nm/min im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts von 370 bis 750 nm gemessen.

Ob die isolierten Pigment-Proteinkomplexe in ihrer Energieweiterleitung gestört oder auch nach der Präparation noch intakt waren, wurde durch Anregung der Proben im Chlorophyll b bzw. Chlorophyll c Absorptionsmaximum (= Soret-Maximum im Blaulichtbereich) überprüft. Diese Emissionsspektren wurden mit dem Hitachi Fluorometer FP-6500 bei einer Spaltbreite von 3 nm (Emission/Excitation) und einer Messgeschwindigkeit von 100 nm/min im Bereich von 600-800 nm aufgenommen. Für die FCP-Isolationen aus *C. meneghiniana* (3.2) stand die Intaktheit der isolierten Komplexe im Fokus, die Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten war im Gegensatz dazu bei den LHCII-Isolationen aus *N. tabacum* (3.1) von besonderem Interesse, weshalb hier durch entsprechende Verdünnung mit B1a auf eine möglichst gleiche Absorption im Q_Y-Maximum (= Maximum im Rotlichtbereich) des Chlorophyll a geachtet worden ist. Die zugehörigen Q_Y-Maxima sind entsprechend im Ergebnisteil genannt.

Für einen vergleichenden Überblick über die Gesamtheit der energieübertragenden Pigmente wurden zudem Anregungsspektren aufgenommen. Die Proben wurden hierfür ebenfalls im FP-6500 (mit den Parametern der Emissionsmessungen) im Bereich von 400 bis 600 nm angeregt. Gemessen wurde die dadurch erzeugte Fluoreszenz im zuvor durch die Emissionsspektren ermittelten Fluoreszenzmaximum von Chlorophyll a.

Einfluss der Kalibrierung des Fluorometers auf die gemessenen Spektren

- 1) Die gemessenen Emissionsspektren wurden software-intern mit dem über eine externe Lampe bekannten Spektrums aufgenommenen Sensitivitätsspektrum des Photodetektors verrechnet, da die gemessenen Spektren von der Empfindlichkeit des Detektors und die Transmissionseigenschaft des Emissionsmonochromators beeinflusst werden.
- 2) Die gemessenen Anregungsspektren wurden software-intern mit dem Spektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin verrechnet, um sie gegen die Emission der Lichtquelle und die Transmissionseigenschaft des Anregungsmonochromators zu korrigieren. Rhodamin wird für die Bestimmung der Quanteneinstrahlung der internen Lampe verwendet, da es sehr stabil ist und eine 100%ige Fluoreszenzausbeute bietet.

Normierungen der Spektren

Zur einheitlicheren Darstellung wurden die gemessenen Spektren wie folgt normiert:

1) Absorptionsspektren

- a) im Chlorophyll a - Q_Y - Maximum auf 1, um die Proben untereinander mit Bezug zu gleichem Chlorophyll a - Gehalt vergleichen zu können
- b) im Chlorophyll a - Soret-Maximum auf 1, um die Absorptionsspektren mit den Anregungsspektren vergleichen zu können

2) Anregungsspektren

ggf. im Chlorophyll a - Soret-Maximum auf 1, um sie mit den Absorptionsspektren vergleichen zu können

3) Emissionsspektren

- a) geteilt durch das jeweilige Q_Y - Maximum der Absorptionsspektren zur Normierung auf die gleiche Emitterkonzentration und
- b) geteilt durch das Chl b - Maximum der Absorptionsspektren, um die Proben mit einheitlicher Absorption in der Anregungswellenlänge vergleichen zu können
- c) ggf. normiert auf 1 im Chl a Fluoreszenzmaximum

2.10 Gelelektrophoresen und Immunodetektionen

Sowohl für *N. tabacum* als auch für *C. meneghiniana* wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Gelelektrophoresen durchgeführt. In *Cyclotella* dienten diese dem Reinheitsnachweis von FCPb, in Tabak einem Überblick über Unterschiede in der Probenzusammensetzung.

2.10.1 Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende Gelelektrophorese erfolgte modifiziert nach Schägger und Jagow [155]. Von FCPa, FCPb bzw. Thylakoiden aus *C. meneghiniana* wurden jeweils 2,5 bzw. 5 µg Chl a mit 4x Rotiload und B1-Puffer ad 16 µl versetzt, 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend auf 15 %ige Tris-Tricin-Minigele (Zusammensetzung siehe Tab. 2.5-1, Biometra) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in Kathoden- bzw. Anodenpuffer (Tab. 2.5-1) bei 10 mA für das Sammelgel und wurde nach Einlaufen der Proben ins Trenngel erhöht auf 30 mA. Als Marker diente der SM#0441 von Fermentas.

Für *N. tabacum* wurde das gleiche Platten-/Kammer-/Puffersystem und auch die zuvor genannte Stromstärke, jedoch ein 10 %iges Tris-Tricin-Gel mit 4 µg Chl plus 4x Rotiload und B1 ad 40 µl pro Probe verwendet.

Tabelle 2.10-1: Zusammensetzung der denaturierenden Gele und ihrer Laufpuffer. SG, TG = Sammelgel, Trenngel.

	<i>N. tabacum</i> Var. Xanthi		<i>C. meneghiniana</i>		3x Gelpuffer pH 8,45	Anoden-puffer pH 8,9	Kathoden-puffer pH 8,25
	SG	TG	SG	TG			
Harnstoff	-	3,6 g	-	5,4 g	3 M Tris	0,2 M Tris	0,1 M Tris
3x Gelpuffer	1,67 ml	3,33 ml	2,5 ml	5ml	0,3 % w/v SDS		0,1 M Tricin
Rotiphorese Gel B	37,5 µl	0,227 ml	56,25 µl	0,51 ml			0,1 % w/v SDS
Rotiphorese Gel 40	513 µl	2,57 ml	0,77 ml	5,775 ml			
H₂O	ad 5 ml	ad 10 ml	ad 7,5 ml	ad 15 ml			
TEMED	5 µl	3 µl	7,5 µl	4,5 µl			
APS (10 %)	50 µl	30 µl	75 µl	45 µl			

2.10.2 Native Gelelektrophorese (Blue Native PAGE)

Die nativen Photosynthese-Komplexe wurden auch durch eine BN PAGE aufgetrennt (modifiziert nach [156]). Hierfür war es im Falle von *C. meneghiniana* zunächst nötig, die Thylakoide zu solubilisieren, damit überhaupt eine Trennung erfolgen kann. Die

Solubilisierung erfolgte mit 25 µg Chl a in einem Volumen von 100 µl durch 20 mM β-DDM über 5, 10, 20 und 30 Minuten sacht auf Eis schüttelnd im Dunkeln, wobei die Auftrennung und das anschließende Ergebnis des Immunoblots in Hinblick auf die Solubilisierungszeit keine Unterschiede zeigte. Auf die Minigele (Zusammensetzung siehe Tab. 2.6-2) wurden je 7 µg Chl a der solubilierten Thylakoide in einem Volumen von 30 µl incl. des 10x Ladepuffers (50 mg Serva Blue G, 500 µl 2x BisTrisACA pH 7,0 [200 mM BisTris, 1M Aminocaprinsäure, pH 7] und 400 µl 75 % Saccharose ad 1 ml) aufgetragen. Der Lauf erfolgte im dunklen Kühlraum bei 10 bzw. 30 mA für das Sammel- und Trenngel.

Tabelle 2.10-2: Zusammensetzung der nativen Gradientengele und ihrer Laufpuffer.

	Sammelgel (5 %)	Trenngel 1 (12,5 %)	Trenngel 2 (4 %)	3x Gelpuffer	Anoden- puffer	Kathodenpuffer
3x Gelpuffer	1,1 ml	0,933 ml	0,933 ml	1,5 M 6- amino- caprinsäure		0,05 M Tricin
Acrylamid 40 (37,5:1)	0,333 ml	0,833 ml	0,333 ml			
75% Glycerin	-	0,8 ml	0,173 ml	150 mM BisTris	0,05 M BisTris	15 mM BisTris
H₂O	1,9 ml	0,1 ml	1,2 ml			
TEMED	10 µl	4 µl	4 µl	pH 7,0	pH 7,0	(0,01% Serva Blue G)
10 % APS	20 µl	10 µl	10 µl			pH 7,0

2.10.3 Immunodetektion

Im Rahmen des sog. Western Blot - Verfahrens (nach [157]) wurden die Proteine aus den in 2.5.1 und 2.5.2 beschriebenen Gelen in 45 Minuten bei einer Stromstärke (mA) von 1,5 x Gelfläche (cm²) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roth) transferiert. Dafür wurden das Gel und 3 ebenso große Whatman Filterpapiere (3 mm, Schleicher & Schüll) zunächst 10 Minuten in Kathodenpuffer (K: 25 mM Tris-HCl, 40 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 9,4) eingelegt. Die PVDF-Membran wurde 10 Sekunden in 100 % Methanol gelegt, kurz mit destilliertem Wasser gespült und anschließend in Anodenpuffer 2 (A2: 25 mM Tris-HCl, 10 % Methanol, pH 10,4) inkubiert. 3 weitere Filterpapiere wurden in Anodenpuffer 1 (A1: 0,3 M Tris-HCl, 10 % Methanol, pH 7,4) eingeweicht und bildeten die unterste Schicht der hier genannten Bestandteile des Western-Blot-Stapels aus 3x Filterpapier in K, Gel in K, PVDF-Membran in A2, 3x Filterpapier in A1. Der Transfer erfolgte in einer „semi-dry“ Transferapparatur von Biorad (Trans-Blot SD).

Im Anschluss erfolgte das Blockieren der verbliebenen freien Protein-Bindestellen durch mindestens 30-minütige Inkubation der Membran mit 5 % Milchpulver in einer

phosphatgepufferten Salzlösung (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄). Diese Milchpulver-Lösung wurde auch zur Verdünnung der Antikörper eingesetzt.

Tabelle 2.10-3: Primärantikörper der Immunodetektionen.

Antikörpername	detektiertes Protein	Herkunft
α-FCP2	fcp2 (Untereinheit von FCPa)	Prof. Dr. E. Rhiel, (Oldenburg)
α-lhcf1-11	lhcf1-11, fcp5 (Untereinheit von FCPb)	Prof. Dr. C. Büchel (Frankfurt)
α-D1	D1 (=PsbA)	Agrisera (Schweden)

Die jeweils in einer 1:1000 Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der PVDF-Membran inkubierten primären Antikörper sind in Tab. 2.10-3 aufgelistet. Anschließend erfolgte jeweils eine 45-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper „Goat-α-Rabbit“ (Calbiochem, 1:10000). Zwischen und nach den beiden Antikörper-Schritten wurde die Membran mehrfach gründlich mit PBS gewaschen. Am Ende erfolgte der Start der Chemolumineszenzreaktion durch 60 Sekunden leichtes Schwenken in der ECL (enhanced chemoluminescence)-Lösung (10 ml enthalten 10 µl 250 mM Luminol (in DMSO), 45 µl 90 mM p-Coumarsäure (Fluka, in DMSO), 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5) und 3 µl frisch zugegebene 30 % H₂O₂-Lösung) und anschließend sofortiges Auflegen des Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) auf die Membran. Die Expositionszeit betrug 1' für die mit α-FCP2 und 5' für die mit α-lhcf1-11 behandelte Membran. Entwickelt wurde der Röntgenfilm durch aufeinanderfolgendes Schwenken in Entwickler (Röntogen, Tetenal), Stopplösung (2 % Essigsäure) und Fixierer (Adefofix, Adefo).

Im Fall der Proteinübertragung aus dem Blue Native Gel auf die PVDF-Membran wurde auch sehr viel des Serva Blue G - Farbstoffs auf die Membran übertragen. Dieser störte die daran anschließende Immunodetektion nachhaltig, weshalb die Membran für 30 Minuten bei 50 °C in einer Lösung aus 100 mM β-Mercaptoethanol, 67,5 mM Tris (pH 6,7) und 2 % SDS inkubiert wurde, was zum einen die beim ersten Detektionsversuch verwendeten Antikörper und zum anderen den Farbstoff entfernte. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBS gewaschen und die oben beschriebene Prozedur beginnend mit der Blockierung freier Proteinbindestellen mit gutem Detektionsergebnis wiederholt.

2.11 Transmissionselektronenmikroskopie

2.11.1 Blattsschnitte von *N. tabacum* Var. *Xanthi*

Eine Stunde nach Beginn der Lichtphase wurden mit einem Skalpell ca. 2x5 mm große Stücke aus der Mitte der ca. 5,5 Wochen alten Blätter von WT und bkt-Linie geschnitten und über Nacht in Fixierer (0,05 M Natrium-Cacodylat, pH 7,2, 0,4 M Saccharose, 2,5 % Glutaraldehyd) im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke 3 x 15 Minuten mit Waschpuffer (WP: wie Fixierer, ohne Glutaraldehyd) vom Glutaraldehyd bereinigt und 25 Minuten mit 2 % OsO₄ (in WP) versetzt. Es schlossen sich zwei weitere 15-minütige Waschschrte und die Entwässerung der Proben an. Letztere erfolgte durch die Überführung der Blattsschnitte (nach jeweils 15 Minuten) in 50, 70, 90 und 96 % vergällten Ethanol und in 100 % unvergällten Ethanol. Anschließend folgten 15 Minuten Inkubation in Propylenoxid und schlussendlich 15 Minuten Inkubation in einem Gemisch aus gleichen Teilen Propylenoxid und Agar Low Viscosity Resin (Agar Scientific). Die Proben wurden in diesem Gemisch bis zum vollständigen Abdampfen des Oxids über Nacht im Abzug gelassen und am nächsten Tag in 3 Schritten (die ersten beiden über die Dauer von jeweils 3 Stunden) in frischen Agar eingebettet. Nach dem dritten Umbetten folgte das Aushärten der im Agar eingeschlossenen Proben über die Dauer von mindestens 16 Stunden bei 60 °C.

Am Mikrotom (Reichert Ultracut S, Leica) wurden mit einem Diamantmesser (Diatome) im Schnittwinkel von 6° 50 nm dünne Schnitte der Proben angefertigt, die anschließend auf mit Pioloform (Plano, 1,7 g gelöst in 100 ml Chloroform) überzogenen Kupfergrids (Plano) aufgenommen wurden. Die Schnitte trockneten über Nacht bei Raumtemperatur und wurden danach 15 Minuten mit 7 % Uranylacetat (in Methanol, Plano) und 10 Minuten mit Bleicitrat kontrastiert (nach [158]). Vor der Überführung in Bleicitrat erfolgten noch drei 1-minütige Waschschrte in 50, 25 und 0 % Methanol, gelöst in destilliertem Wasser.

Nach mindestens 60-minütigem Trocknen bei Raumtemperatur konnten im Philips CM12 Transmissionselektronenmikroskop (80 kV, Lanthanhexaborid (LaB₆) Filament) mit der CCD Kamera Erlangshen ES5W von Gatan digitale Bilder der Schnitte aufgenommen werden.

Die statistische Auswertung der Plastoglobuligröße und Anzahl erfolgte über einen zweiseitigen studentschen t-Test mit zwei Stichproben unterschiedlicher Varianz.

2.11.2 Grid-Präparation und Einzelpartikelaufnahmen von FCPa, FCPb und LHCII

Zum näheren Vergleich der nativen Proteingrößen und -formen wurden bei 300000-facher Vergrößerung im o.g. Philips CM12 bei 120 kV unter den gleichen Bedingungen wie beim strukturell bereits bekannten LHCII-Trimer (hier aus *N. tabacum* Var. Xanthi) mit der CCD Kamera Erlangshen ES5W (Gatan) digitale Aufnahmen von FCPa und FCPa aus *Cyclotella meneghiniana* gemacht.

Hierfür wurden je 5 µl der aus den SDG (vgl. Abschnitte 2.4.1, 2.4.2) entnommenen und anschließend 1:20 in Puffer B1a verdünnten Proteinfractionen auf zuvor für 20 Sekunden bei einem Vakuum von 0,1 mbar und 10 mA in der Cressington Power Unit 208 (Cressington) hydrophilisierte (beglimmte) Kupfer-Grids (Plano) aufgetragen. Die Grids wurden im Vorfeld mit einem feinen Film aus Kohlestaub als Trägermaterial für die Proteinlösung überzogen. Dafür wurden im Carbon Coater 208 (Cressington) 5 x 2 Sekunden 4 Volt bei einem Vakuum von <0,0001 mbar durch zwei Kohlestäbe geleitet, an deren Berührungsfläche durch den angelegten Strom feinste Partikel absprengten und sich auf frisch gespaltene Glimmerplättchen (Meica, Plano) legten. Nach mindestens einem Tag des „Setzenlassens“ konnte der Kohlefilm im Wasserbad abgeschwemmt und durch gleichmäßiges Absenken des Wasserspiegels auf die zuvor untergetauchten Grids übertragen werden. Nach einer Trocknungszeit von abermals mindestens 24 Stunden erfolgte die oben beschriebene Hydrophilisierung mit direkter Auftragung der zu analysierenden Proteinlösung. Die Probe verblieb 1 Minute auf dem Kohlefilm, wurde dann zunächst durch Wasser und 2 % Uranylacetat ersetzt und schlussendlich durch abermaliges Auftragen von 10 µl der Uranylacetatlösung 30 Sekunden kontrastiert.

Für die Aufnahme der Seitenansichten des FCPb wurde auf die Hydrophilisierung des Kohlefilms verzichtet.

Das genaue Vermessen der Partikel erfolgte über das digitale Geometrie-Dreieck „MB-Ruler 5.1“, eine von Herrn Markus Bader entwickelte, frei erhältliche Software.

2.11.3 Einzelpartikelanalyse von FCPb

Die Einzelpartikelanalyse der wie in 2.11.2 auf mit Kohlefilm bedeckten, hydrophilisierten Grids kontrastierten FCPb-Proben erfolgte an der Rijksuniversiteit Groningen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Egbert Boekema, Groningen, Niederlande.

Hierfür wurden im Philips CM120 (LaB₆ Filament) bei 120 kV und 133000-facher Vergrößerung im Unterfokus von -200 nm mit der CCD-Kamera Gatan 4000 SP 4K mit einer Pixelgröße von 0,225 nm (nach 2x Pixel-Binning) Aufnahmen der Proteine gemacht. Dies geschah zum Teil manuell, zum Teil auch halb-automatisch mit der Software GRACE [159].

Die Partikel wurden anschließend mit der frei verfügbaren Software EMAN2 [160] gepickt (Boxgröße 96 x 96 Pixel) und mit dem Programm GRIP (Groningen Image Processing, entwickelt von Wilko Keegstra, Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande) analysiert. Es wurden Partikelaufnahmen von 3 verschiedenen Grids an drei verschiedenen Tagen gemacht (siehe auch Anhang 7.2).

Nachfolgend wird das Vorgehen bei der Partikelanalyse beschrieben. Eine detaillierte, tabellarische Auflistung der Einzelschritte findet sich in Anhang 7.2.

A) Aus einem Testdatensatz (10000 Partikel, reduziert auf eine Boxgröße von 64x64 Pixeln) wurden zunächst die potentiell Kontrastumkehr- und damit Fehlinformation-verursachenden Randbereiche der Bildfrequenzen gefiltert (frequency filtering: low frequencies 0,1, high frequencies 0,6, remaining frequencies 0,6) und ein kreisförmiger Ausschnitt definierter Größe (soft circle) um die Partikel gelegt, um einen möglichst hohen Anteil des Kohlefilm-Hintergrunds abzudecken und die weitere Verrechnung der Partikel dadurch zu erleichtern.

In einem ersten Abgleich der Einzelbilder untereinander wurden sie rotiert und zentriert (no reference alignment, NRA) und anschließend anhand der Ähnlichkeit der Bildinformation pro Pixel zueinander verglichen (multivariate statistical analysis, MSA). Im Folgenden konnte der Datensatz dann entsprechend der Ähnlichkeit der Einzelbilder zueinander in verschiedene Klassen mit einer Maximalsumme aus 5000 Einzelbildern pro Klasse (hierarchical classification, 5000 group average (gav)) aufgeteilt werden.

Die Partikel der größten Klasse aus 4526 zueinander ähnlichen Einzelbildern wurden nun bis zu einem Korrelationsfaktor von 0,1 aufsummiert. Daraus ergab sich eine Bildsumme aus 929 Einzelbildern. Die restlichen, in der Klasse befindlichen Bilder wurden auf Grund ihrer geringer werdenden Ähnlichkeit zu den aufsummierten 929 Partikeln (Korrelationsfaktor >0,1) nicht mit in die Partikelsumme eingerechnet.

Das so entstandene Bild wurde als Referenz in einem neuen Abgleich der 10000 Einzelbilder des Testdatensatzes eingesetzt. In diesem als reference alignment bezeichneten Analyseschritt werden die Einzelbilder im Vergleich zu der angebotenen Referenz rotiert und

zentriert. Es folgten wiederum MSA, die Klassifizierung mit maximal 2000 Partikeln pro Klasse (2000 gav) und die anschließende Aufsummierung der zueinander ähnlichsten Partikel, diesmal jedoch etwas weiter gefasst mit einem Korrelationsfaktor bis 0,2, zum Referenzbild, hier zjunk0.img genannt.

B) In einem zweiten Versuchsansatz wurde der o.g. Testdatensatz mit anderen Parametern für die Frequenzfilterung (0,001 low/0,45 high/0,1 remain) und der gleichen Zirkelweite (0,9) für die Ausblendung störenden Hintergrunds um die Partikel behandelt. Ein neuer Durchlauf von NRA, MSA, Klassifizierung (5000 gav) und Aufsummierung (Korrelationsfaktor 0,1) führte zum Referenzbild ajunk1.img aus 673 Einzelbildern. Dieses Bild wurde als Referenz für die Analyse eines größeren Datensatzes aus 25005 Partikeln verwendet, deren Ergebnis mit dem Korrelationsfaktor 0,1 zu einer neuen Bildsumme aufsummiert und mit der unter A) beschriebenen Referenz zjunk0.img kombiniert. Diese Zwei-Referenzen-Datei und der Gesamtdatensatz aus >54000 wurden zunächst mit den gleichen Frequenzfilterbedingungen behandelt und anschließend im sogenannte multi reference alignment (MRA) mit anschließender MSA, Klassifizierung (5000 gav) verwendet. Da die Computerleistung für eine solche Analyse mit 54000 Einzelbildern nicht ausreichte, wurde der Datensatz zuvor in zwei Hälften geteilt.

Aus den Klassifizierungen und den Aufsummierungen der in den Klassen enthaltenen Einzelbilder (Korrelationsfaktor 0,1) ergaben sich verschiedene Bildsummen, die sich ihrer Form nach in Dreiecke und Sechsecke mit vergleichbarer Größe unterscheiden ließen. Die Bildsumme aus einer Klasse für Dreieck bzw. Sechseck wurde in der Folge dann jeweils als neue Referenz verwendet. Die entsprechenden Klassen selbst wurden miteinander zu zwei Datensätzen verbunden: einer für die dreieckige und einer für die sechseckige Form.

Anschließend wurde die sechseckige Referenz noch einmal zum reference alignment auf den Sechseck-Datensatz (22138 Partikel, Name: hex01.img) verwendet. Das Aufsummieren der mit dem Korrelationsfaktor 0,2 am besten zueinander passenden Einzelbildern führte hier zum bestmöglichen Ergebnis für die **„sechseckige“ Ansicht des FCPb (Summe aus 4344 Einzelbildern)**. Die ansprechendste Bildsumme aus einer der „dreieckigen“ Klassen wird im Folgenden als testreftri.img weiterverwendet.

C) Die zuvor herausgefilterten Frequenzen wurden als Möglichkeit des Zugewinns zusätzlicher Informationen wieder in die drei- und sechseckigen Datensätze zurückgeführt (restore frequencies). Mit dem aus 7575 Einzelpartikeln bestehenden Datensatz aus den o.g. „dreieckigen“ Klassen und der in B) beschriebenen Referenz ajunk1.img wurde ein weiteres reference alignment gestartet, um so noch einmal Dreiecke und eventuell im Datensatz verbliebene Sechsecke voneinander zu separieren, da bisher alle weiteren Versuche zur Verbesserung der „dreieckigen“ Ansicht des FCPb fehlgeschlagen waren.

Es folgten anschließend MSA und Klassifizierung (2500 gav). Die Einzelartikel innerhalb der Klassen wurden jeweils durch sogenannte „conditional sum series“ aufsummiert, d.h. Aufsummierung der zueinander ähnlichsten 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, usw. Einzelartikel. Anhand der Form und der aufsummierten Partikelanzahl wurde aus den Klassen die als „beste“ erscheinende Bildsumme als neue Referenz testrefhex.img ausgewählt und mit der oben benannten testreftri.img für eine neues MRA auf den o.g. Datensatz hex01.img verwendet. Es folgten wiederum MSA und Klassifikation (5000 var (variation)).

Die daraus resultierenden Klassen unterschieden sich wieder in drei- und sechseckige Formen, wobei letztere nichts zur Verbesserung der finalen, in B) besprochenen Endsumme beitrugen. Die dreieckigen Klassen wurden miteinander und dem in B) bereits erhaltenen Dreiecks-Datensatz aus 7575 Einzelpartikeln zu 12627 Einzelbildern kombiniert und mit dem besten Summenbild einer der verwendeten Klassen als Referenz für ein letztes reference alignment verwendet. Die anschließende MSA und Klassifizierung (3500 var) führte zu der für die **Dreieck-Struktur** besten Bildsumme (Korrelationsfaktor 0,2) **aus 2661 Einzelbildern**.

Dieses Bild und die in B) beschriebene Summe aus 4344 Einzelpartikeln werden als Endergebnisse der beiden möglichen Aufsichten auf den FCPb in Abb. 3.2-11 gezeigt.

D) Größere Partikel als die in A-C analysierten wurden kaum gefunden. Ein paar wenige konnten jedoch mit einer Boxgröße von 128 x 128 gepickt werden. Auf Grund der geringen Menge an länglichen Partikeln (27) und großen, dreieckigen Partikeln (8) konnte keine ganzheitliche Einzelpartikelanalyse gemacht werden, lediglich ein no reference alignment, um die Einzelartikel in Hinblick auf ihre Rotation und Translation miteinander abzugleichen. Da sie sich nach dem NRA entsprechend zentriert und mit gleicher Ausrichtung angeordnet haben, konnten die länglichen und die großen, dreieckigen Partikel nun jeweils aufsummiert. Die beiden daraus resultierenden Summenbilder sind in Abb. 3.2-11C zu sehen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Ketocarotinoid-produzierenden *N. tabacum* Var. Xanthi

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung der Astaxanthin produzierenden bkt-Linie von *N. tabacum* Var. Xanthi vergleichend zum Wildtyp dargestellt.

Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf den Auswirkungen des Astaxanthins bzgl. Intaktheit und Funktion des Photosyntheseapparats. Die Auftrennung der Photosynthesekomplexe und deren spektroskopische bzw. chromatographische Charakterisierung ist ebenso Bestandteil der vorliegenden Arbeit wie die makro- bzw. mikroskopischen Untersuchungen des Pflanzenwachstums und die Analyse der Photosyntheseeffizienz durch Fluoreszenzkinetiken am adulten Blatt.

3.1.1 Wachstum der Pflanzen

Der Keimungszeitpunkt von Wildtyp und bkt-Linie zeigte bei gleichzeitiger Aussaat in den diversen Anzuchten der Pflanzen keinen signifikanten Unterschied. In der Folge wuchs die bkt-Linie jedoch etwas langsamer, was nach etwa 6-wöchigem Wachstum zu einem ca. 7-tägigen Rückstand auf die Entwicklung des Wildtyps führte (Abb. 3.1-1 C).

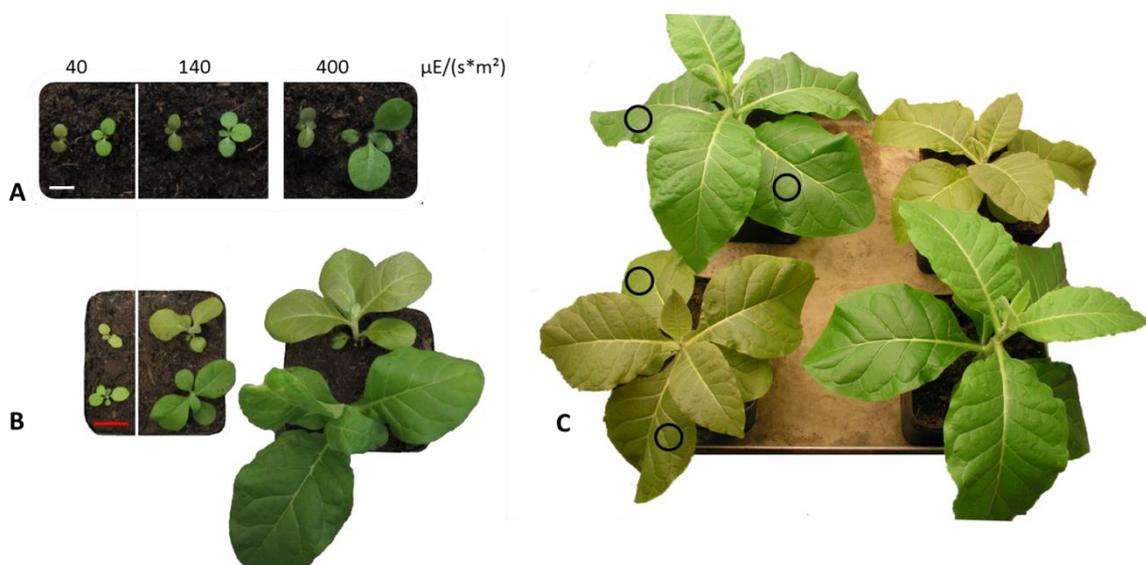


Abbildung 3.1-1: Wachstum von *N. tabacum* Var. Xanthi WT (grün) und bkt-Linie (oliv) in verschiedenen Lichtintensitäten. Die Keimung erfolgte für alle Pflanzen über 2 Tage bei ca. 100 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ und 25 °C. Anschließend wuchsen die Pflanzen in verschiedenen Lichtintensitäten und wurden nach 7 Tagen (A) bzw. 4 Wochen (B) vermessen. Der Maßstab in A (weiß) entspricht 1 cm, in B (rot) 3 cm. C) Aussehen der in ca. 140 μE (Normallicht) gewachsenen Pflanzen nach 6-7 Wochen. Die schwarzen Kreise markieren exemplarische Blattstellen für die PAM-, PEA- und HPLC - Messungen.

Diese Entwicklungsdiskrepanz konnte unabhängig von der verwendeten Intensität des Anzuchtlichts beobachtet werden, wobei sowohl Wildtyp als auch bkt-Linie im Schwachlicht von ca. 40 $\mu\text{E}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ das geringste Wachstum zeigten (Abb. 3.1-1 A, B).

3.1.2 *In vivo* Fluoreszenzanalysen

3.1.2.1 PAM-Messungen

Die nachfolgenden Messungen sind an adulten Blättern ca. 6 Wochen alter Pflanzen vorgenommen worden. Unterschieden wurde hierbei in normal belichtete Pflanzen und solche, die die letzten 5 Tage vor dem Messzeitpunkt in Schwachlicht (40 $\mu\text{E}/(\text{m}\cdot\text{s}^2)$) wuchsen. Durch Mini-PAM-Messungen konnten verschiedene Parameter zur Charakterisierung der Photosynthese in bkt-Linie und Wildtyp bestimmt werden. Schon die nach Dunkeladaptation gemessenen Grundfluoreszenzen F_0 und die Maximalfluoreszenzen F_m , sowie die daraus kalkulierten Photosystem II – Aktivitäten $F_v/F_m (=F_m-F_0/F_m)$ und die jeweiligen NPQ-Level unterschieden sich, unabhängig von den Lichtbedingungen, signifikant zwischen WT und bkt-Linie ($p < 0,005$, Tab. 3.1-1, Abb. 3.1-2). In der bkt-Linie lagen dabei sowohl die Grund- als auch die Maximalfluoreszenz deutlich unter denen des Wildtyps. Insbesondere letztere war verstärkt reduziert, da auch das Verhältnis F_v/F_m in der bkt-Linie geringer ausfiel. Der gemessene NPQ-Wert lag in der bkt-Linie ebenfalls deutlich unter dem Wildtyp-Level.

Tabelle 3.1-1: Auswertung der Mini-PAM-Messungen von in Normal- und Schwachlicht gewachsenen Pflanzen.

Normallicht		F_0	F_m	F_t	F_m'	F_0'	F_r	F_v/F_m	ϕPSII	F_v'/F_r	NPQ
WT	$\bar{\phi}$ (n=3)	0,199	1,091	0,316	0,788	0,207	1,097	0,82	0,60	0,81	0,28
	Sta.abw.	0,002	0,024	0,004	0,007	0,011	0,046	0,004	0,01	0,01	0,01
bkt	$\bar{\phi}$ (n=3)	0,150	0,458	0,242	0,429	0,167	0,532	0,67	0,43	0,69	0,06
	Sta.abw.	0,018	0,022	0,012	0,02	0,001	0,016	0,03	0,06	0,01	0,03
Schwachlicht		F_0	F_m	F_t	F_m'	F_0'	F_r	F_v/F_m	ϕPSII	F_v'/F_r	NPQ
WT	$\bar{\phi}$ (n=3)	0,199	1,124	0,305	0,784	0,195	1,094	0,82	0,61	0,82	0,30
	Sta.abw.	0,015	0,101	0,02	0,03	0,03	0,04	0,005	0,01	0,02	0,04
bkt	$\bar{\phi}$ (n=3)	0,153	0,415	0,194	0,354	0,158	0,414	0,63	0,45	0,62	0,14
	Sta.abw.	0,01	0,04	0,01	0,01	0,01	0,04	0,02	0,03	0,02	0,04

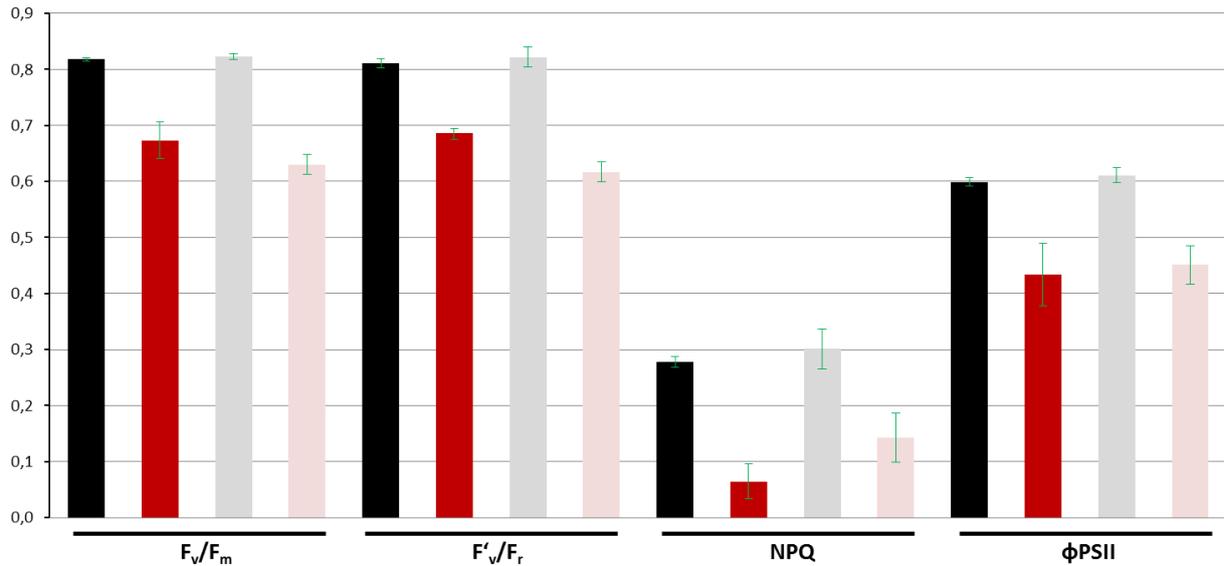


Abbildung 3.1-2: Vergleich der Photosyntheseparameter von *Nicotiana tabacum* Var. Xanthi WT und bkt-Linie. Dargestellt sind die in Tab. 3.1-1 aus den gemessenen Fluoreszenzen errechneten Parameter in Wildtyp (schwarz, grau) und bkt-Linie (rot, rosa). Gemessen wurde bei Normallicht gewachsene Pflanzen (schwarz, rot) und zum Vergleich Pflanzen, die 5 Tage vorher unter Schwachlichtbedingungen wuchsen (grau, rosa).

Die photoinhibitorische NPQ-Komponente q_l spielte aber bei dieser Messung weder im Wildtyp noch in der bkt-Linie eine Rolle, da sich die Regenerationsrate F'_v/F_r , gemessen nach 5-minütiger Bestrahlung mit $600-700 \mu E/(m^2 \cdot s^2)$ aktinischem Licht und erneuter Dunkeladaptation, in allen Fällen wieder auf das jeweilige F_v/F_m -Level der Proben einpegelte und damit einer 100 %igen Erholung nach der intensiven Belichtung entsprach. Der für die Photochemie genutzte Energieanteil ϕ_{PSII} lag im WT jeweils ca. 1/3 höher als in der bkt-Linie.

Da die Mini-PAM über den Versuchszeitraum ein stabiles aktinisches Licht bis $600 \mu E$ lieferte und hier in Hinblick auf die Erholung nach Starklichtstress keine Beeinträchtigung bei Wildtyp und bkt-Linie zu beobachten war, wurde auch der Einfluss höherer Lichtintensitäten und kürzerer Regenerationszeiten durch Fluoreszenzmessungen an ausgestanzten Blattscheiben von in Normallicht gewachsenen Pflanzen mit dem (nicht portablen) PAM-101 (Walz) untersucht. Nach 15-minütiger Dunkelinkubation lag das F_v/F_m - Verhältnis der bkt-Linie auch hier unter dem des Wildtyps. Nach der anschließenden, ca. 20-minütigen Bestrahlung mit $900 \mu E/(m^2 \cdot s)$ aktinischem Licht zeigte sich auch hier ein deutlich geringeres NPQ in der bkt-Linie. Sie erholte sich aber in einer 5-minütigen Dunkelphase in Hinblick auf das Fluoreszenzverhältnis F'_v/F_r am Ende der Messung ebenso wie der Wildtyp auf das Ausgangsniveau von F_v/F_m .

Tabelle 3.1-2: Durchschnittswerte der PAM-Messungen am ausgestanzten Blatt.

	F_v/F_m	F_v'/F_r	NPQ
Wildtyp ($n = 3$)	0,77 (+/- 0,01)	(0,75 +/- 0,0)	0,64 (+/- 0,02)
bkt-Linie ($n = 3$)	0,68 (+/- 0,04)	(0,67 +/- 0,03)	0,25 (+/- 0,02)

Auch bei längerer Belichtung mit einer deutlich höheren Lichtintensität und einer wesentlich kürzeren Erholungszeit am Ende der Messungen zeigte die bkt-Linie also keine photoinhibitorische Schädigung. Da der Wildtyp sich aber schon zu Beginn etwas unter den für ihn im ungestressten Zustand normalen F_v/F_m - Werten befand, gehen diese Messungen in der Folge nicht weiter in die Diskussion ein. Sie bestätigen aber das schon in den Mini-PAM-Messungen beobachtete Verhalten und verdeutlichen durch die intensiveren Versuchsbedingungen (höhere Lichtintensität, geringere Erholungsdauer durch Dunkeladaptation am Ende der Messungen) die hohe Toleranz der bkt-Linie gegenüber Starklicht ($F_v/F_m = F_v'/F_r$), obwohl ihre verringerte Maximalfluoreszenz und ihr geringes NPQ-Level auf deutliche Beeinträchtigungen innerhalb der Photosynthesekomplexe hinweisen.

3.1.2.2 PEA-Messungen

Ergänzend zu den in 3.1.2.1 dargestellten Daten wurden durch Messungen mit einem Plant Efficiency Analyzer (PEA) am 30 Minuten dunkel-inkubierten Blatt die Kinetiken der F_v bildenden Parameter aufgenommen, um die Abläufe des Elektronentransports im PSII kinetisch zu erfassen (Abb. 3.1-3). Hierbei zeigte sich für die bkt-Linie anhand der Rohdaten zum einen erneut eine geringere Grundfluoreszenz F_0 (O) und zum anderen ein deutlich flacherer Verlauf der Fluoreszenzkurve über die Reduktion der primären Elektronenakzeptoren des PSII. Normiert man die Fluoreszenzgrenzen auf 0 im Minimum und 1 im Maximum, zeigt sich zwischen Wildtyp und bkt-Linie ein deutlicher Unterschied im Bereich des Wendepunkts J (Abb. 3.1-3 B), wohingegen die Kurvenverläufe ab dem zweiten Wendepunkt (I) wieder übereinander liegen.

Zusätzlich zu den Kinetiken wurden auch hier die F_v/F_m -Verhältnisse ermittelt: WT 0,83, bkt-Linie 0,69. Sie entsprechen damit den auch über die Mini-PAM-Messungen ermittelten Werten. Die Auflistung aller Einzelmessungen findet sich im Anhang 7.2.

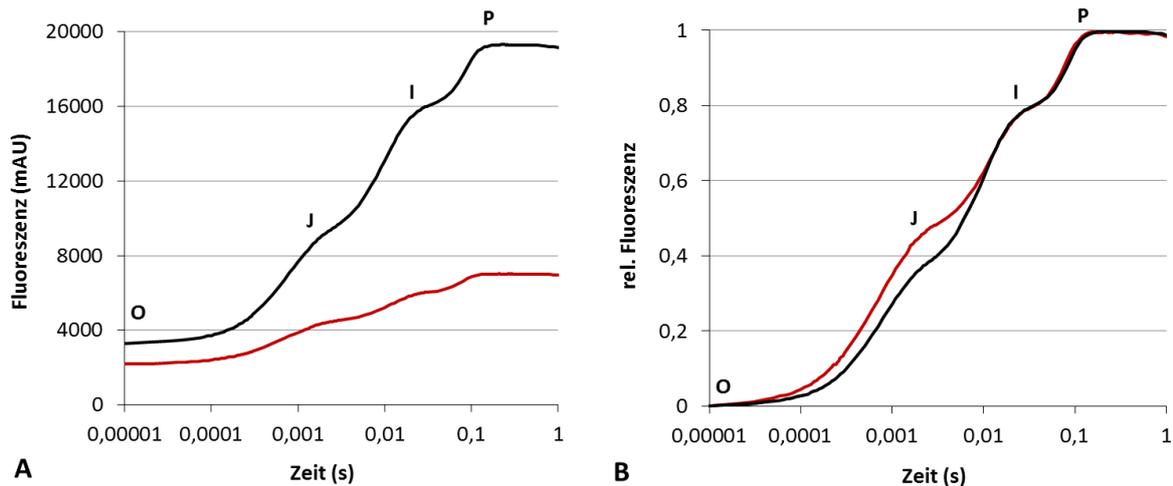


Abbildung 3.1-3: OJIP-Kurven der PEA-Messungen an WT (schwarz, n=5) und bkt-Linie (rot, n=7). A) Mittelwert der Rohdaten. B) Auf O (F_0) = 0 und P (F_m) = 1 normierte Kurven aus A).

3.1.3 Thylakoidanordnung und Plastoglobuli

Die transmissionselektronenmikroskopischen Analysen der Chloroplasten von Wildtyp und Astaxanthin produzierender bkt-Linie zeigten zwei deutlich sichtbare Unterschiede.

Zum einen erwies sich die Stapelung der Granathylakoide in der bkt-Linie als stark beeinträchtigt: die Thylakoidanordnung wirkte deutlich ungeordneter, die Höhe der Granathylakoide geringer und die Granastapelung insgesamt lockerer als beim Wildtyp (Abb.3.1-5).

Zum anderen war hier auch eine Vergrößerung der in den Chloroplasten befindlichen Plastoglobuli (PG) zu beobachten. In der bkt-Linie wiesen sie ein sehr breites Spektrum der gemessenen Durchmesser auf (16-510 nm), wohingegen die Größe der PG im Wildtyp nur von 10 bis 133 nm variierte (Abb. 3.1-4 A). Im Mittel überstieg die bkt-Linie mit 113 nm +/- 66 nm letztendlich jedoch deutlich den durchschnittlichen Wert des Wildtyps (55 nm +/- 24 nm) (Abb. 3.1-4 B). Für die Größe der Chloroplasten und die Anzahl der Plastoglobuli pro Chloroplast konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Letztere differierte in der bkt-Linie zwar deutlich stärker als im WT (2-23 bzw. 6-13 PG pro Chloroplast), wodurch sich eine höhere Standardabweichung ergab (Abb. 3.1-4 C). Ihre Gesamtzahl unterscheidet sich im Mittel jedoch nicht signifikant zwischen den beiden Organismen. Für den WT ergab sich ein Durchschnittswert von 9 +/- 2 PG pro Chloroplast, für die bkt-Linie betrug dieser Wert 8 +/- 5 ($p = 0,131$).

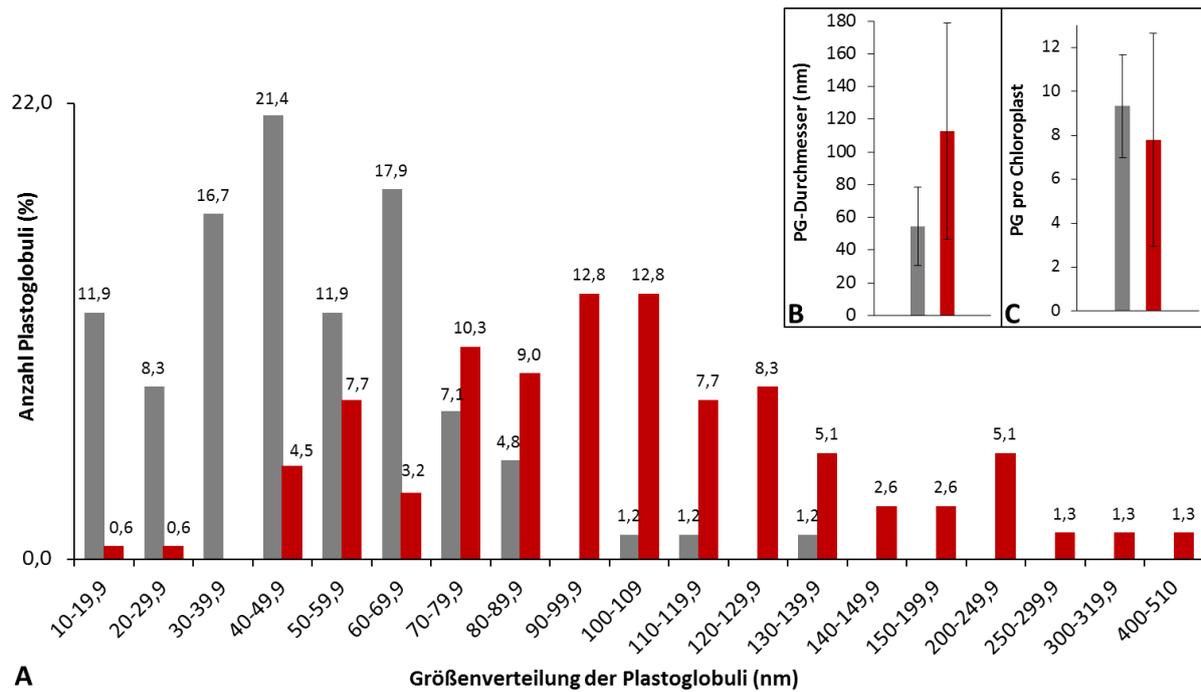


Abbildung 3.1-4: Histogramm der Plastoglobuli von WT (grau) und bkt-Linie (rot). A stellt die nach ihrer durchschnittlichen Größe geordnete Verteilung der Plastoglobuli (PG) in Gruppen zwischen 10 und 510 nm dar. (WT: n=84, bkt-Linie: n=156). **B**) zeigt den Mittelwert aller in A) abgebildeten PG-Durchmesser. Die Standardabweichung spiegelt das Spektrum der Größenvarianz wider. $p < 0,005$. **C**) spiegelt die durchschnittliche Anzahl der PG pro Chloroplast (WT: n=9, bkt-Linie: n=20, $p > 0,005$) wider.

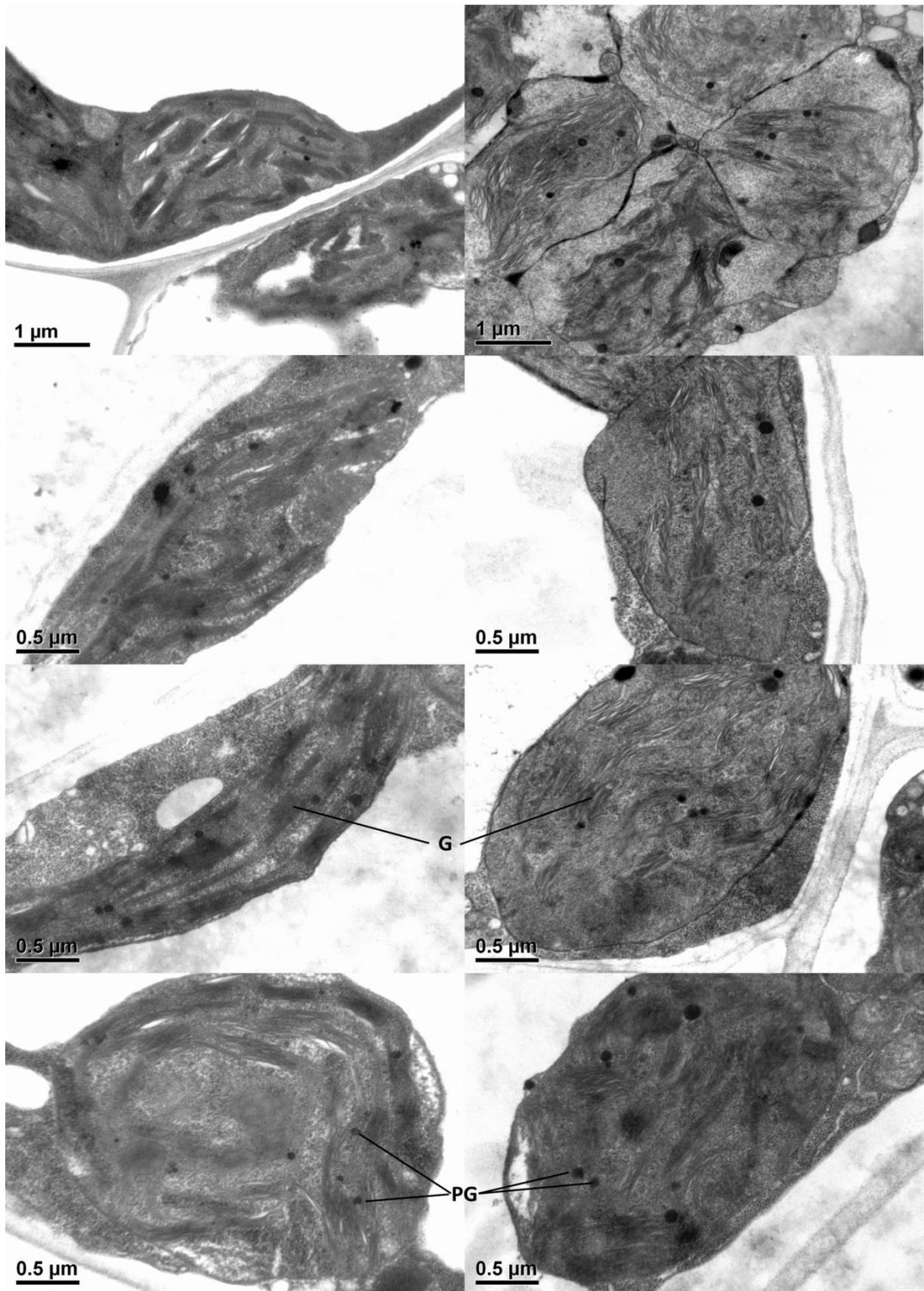


Abbildung 3.1-5: Ultradünnschnitte der ca. 5 Wochen alten Blätter von *N. tabacum* Var. Xanthi. Rechts: WT, links: bkt-Linie. G = Granathylakoidstapel, PG = Plastoglobuli.

3.1.4 Vergleich der Photosynthesekomplexe

Die Auftrennung der Granathylakoide erfolgte über Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation. Bezeichnend sind dabei das Fehlen der PSII-LHCII-Superkomplexe, die sich ihrer Größe und Dichte gemäß im unteren Teil des Gradienten ansammeln (Abb. 3.1-6A, Fraktion 4-6, vgl. Spektren in Abb. 3.1-9, [27],[161]) und die schwächere Ausprägung der LHCII-Trimer-Fraktion in der bkt-Linie (Abb. 3.1-6A, Fraktion 1). Die Fraktionen aus dem Saccharosedichtegradienten wurden zur weiteren Klärung ihrer Zusammensetzung auf ein natives (blue native, BN), bzw. denaturierendes (SDS-PAGE) Gel aufgetragen (Abb. 3.1-6 B, C) und spektroskopisch charakterisiert (Abschnitt 3.1.5-2/-3).

Im BN Gel zeigte sich für die Fraktion 3 von WT und bkt-Linie ein sehr ähnliches Proteinmuster, wobei die Photosystem II – Monomere bei der bkt-Linie etwas stärker und die PSII-LHCII-Bande etwas schwächer ausgeprägt war als im WT. Die PSII – Monomere waren zudem in Fraktion 2X besonders stark ausgeprägt. Die Proteinmuster von Fraktion 3 aus WT und bkt-Linie (X) sind sich dagegen sehr ähnlich, wobei auch hier bei der bkt-Linie intensivere Proteinsignale im Bereich der PSII Monomere und im Vgl. zum WT etwas schwächer ausgeprägte für die höheren Komplexe (PSII Dimer, PSII-LHCII) gefunden werden konnten.

Die Zuordnung der einzelnen Proteinbanden erfolgte zum einen über die spektroskopischen Eigenschaften der SDG-Fraktionen (vgl. Abschnitt 3.1.5) und zum anderen über bereits publizierte Ergebnisse solubilisierter Thylakoide in *A. thaliana* bzw. *N. tabacum* [162], [163]. Für die SDS-PAGE wurden in Abb. 3.1-6 exemplarisch ebenfalls die wichtigsten Bestandteile der aufgetrennten Fraktionen benannt [27], [164]. Die Auftrennung von Thylakoiden, Granathylakoiden und den oben beschriebenen SDG-Fraktionen zeigte dabei jeweils einen etwas geringeren Anteil von LHCII-Proteinen in der bkt-Linie. Zudem wurden hier leichte Verunreinigungen durch andere Proteine in der LHCII-Fraktion (1X) sichtbar. Bei beiden Organismen wurden auch in den Granathylakoiden die PSI-Proteine PsaA/B gefunden, die sich insbesondere in Fraktion 3 bzw. 3X anreicherten (vgl. dazu auch die entsprechenden Spektren in Abschnitt 3.1.5.).

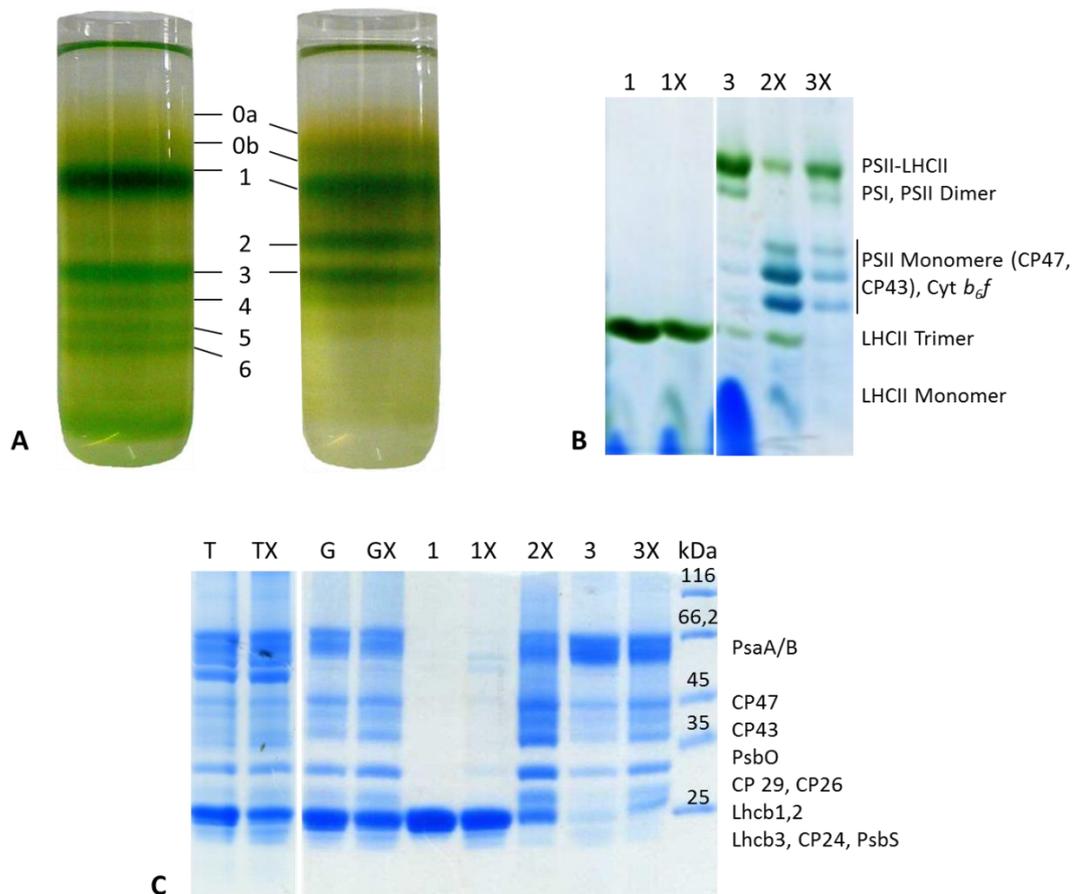


Abbildung 3.1-6: Auftrennung der Photosynthesekomplexe aus *N. tabacum* Var. *Xanthi*. **A)** Kontinuierliche Saccharosedichtegradienten von Granathylakoiden, aufgetragen wurden je 200 μg Chl a. Links: WT, rechts: bkt. **B)** Blue Native Gel der SDG-Fractionen 1-3 von WT und bkt-Linie (X), aufgetragen wurden je 3 μg Chl a. **C)** SDS-PAGE der Gesamt-Thylakoide (T), von Granathylakoiden (G) und den SDG-Fractionen 1-3 von WT und bkt-Linie (X) mit jeweils 4 μg Chl a.

3.1.5 Spektroskopische Analysen der Thylakoidmembranen und einzelner Photosynthesekomplexe

Die (Grana-) Thylakoide und ihre über die Saccharosedichtegradienten aufgetrennten Bestandteile wurden zur besseren Charakterisierung auch spektroskopisch durch Absorptions-, Anregungs- und Emissionsspektren analysiert. Dadurch sollte untersucht werden, ob und, falls ja, wo Astaxanthin in den Photosynthesekomplexen eingebaut oder zumindest assoziiert angelagert wird, und ob es dann als Energieüberträger oder Fluoreszenzlöcher eine Rolle spielen könnte. Die Vergleichbarkeit der hier dargestellten Fluoreszenzen wurde durch das Einstellen der zu vergleichenden Proben auf ein möglichst gleiches Q_Y -Maximum des Chlorophyll a gewährleistet (Tab. 3.1-3).

Tabelle 3.1-3: Übersicht über die gemessenen Q_Y -Maxima des Chlorophyll a der analysierten Proben.

	Wildtyp	bkt-Linie
Thylakoide	0,06274	0,06201
Granathylakoide	0,04074	0,04096
B1	0,06245	0,06213
B2	-	0,06144
B3	0,06169	0,06182

3.1.5.1 Spektroskopische Charakterisierung der (Grana-)Thylakoide

Im Vergleich zum Wildtyp konnte für die bkt-Linie sowohl in den Gesamt- als auch in den daraus isolierten Grana-Thylakoiden eine deutlich höhere Absorption im Übergangsbereich vom blauen zum grünen Licht festgestellt werden. Im Gegensatz dazu blieb in Hinblick auf die Energieübertragungsfähigkeit der Ketocarotinoide die Fluoreszenz im Bereich der für sie spezifischen Absorption jeweils auf dem Level des Wildtyps, wenn man die auf das Chl a Soret - Maximum normierten Anregungsspektren miteinander vergleicht (Abb. 3.1-7 A, C). Die in den Insets der o.g. Abbildungen gezeigten Rohdaten verdeutlichen hier zusätzlich das unter dem Wildtyp liegende Chlorophyll a-Fluoreszenzlevel der bkt-Linie nach Anregung im Bereich zwischen 400 und 600 nm.

Für die Tieftemperatur-Emissionsspektren der Thylakoide nach Anregung im Soret-Maximum von Chlorophyll a wurde eine deutlich geringere Chlorophyll a - Fluoreszenz für die bkt-Linie detektiert. Zudem zeigte die Analyse der Energieübertragung von Chl b auf Chl a bereits auf Ebene der Thylakoide eine leichte Eigenemission des Chl b bei ca. 650 nm (Abb. 3.1-7 B).

Weiterhin konnte nach Anregung im Chlorophyll b Soret-Maximum sowohl für die Thylakoide bei 77 K als auch für die Granathylakoide bei RT eine geringere Chlorophyll a Fluoreszenz gemessen werden (Abb. 3.1-7 B, D).

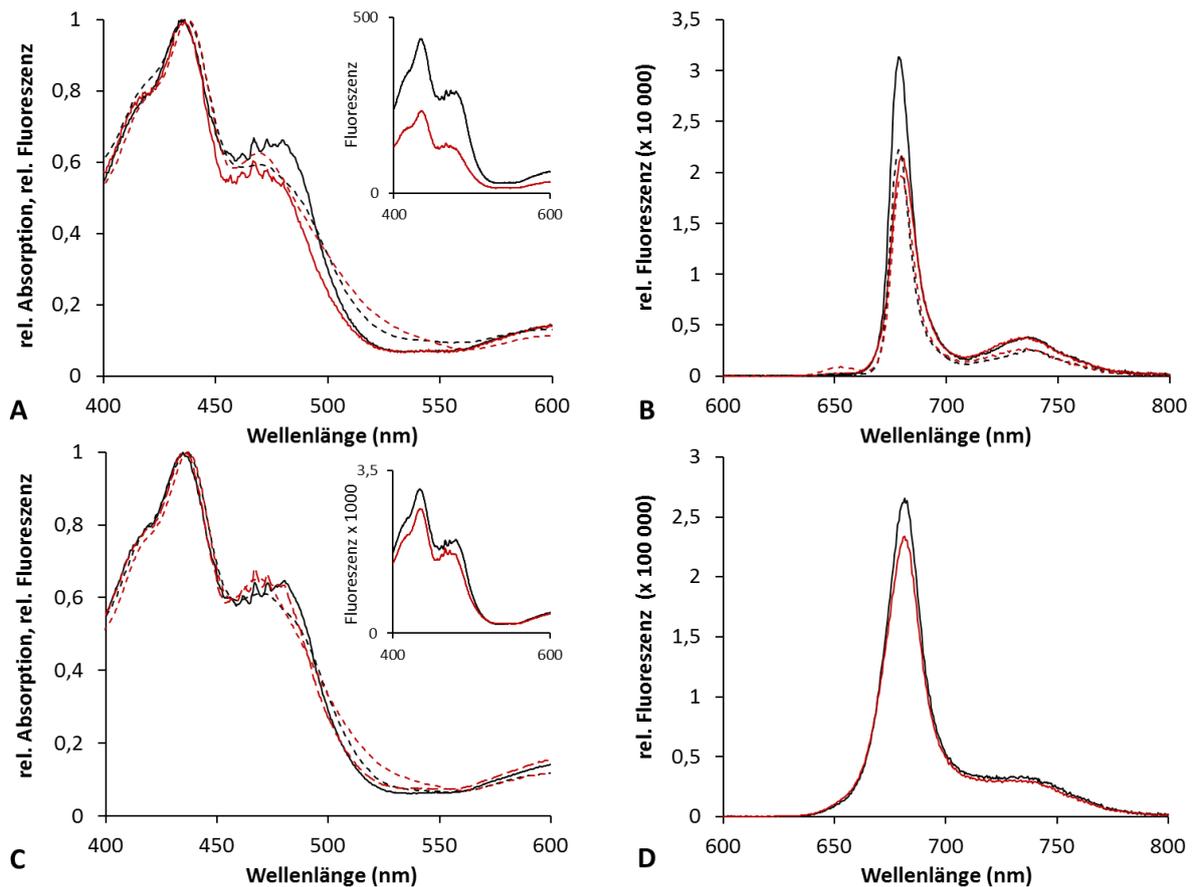


Abbildung 3.1-7: Spektroskopie der (Grana-)Thylakoide aus *N. tabacum* Var. Xanthi WT (schwarz) und bkt (rot). Oben: Gesamthylakoide (0,05 mg Chl a ad 20 mM β -DDM, 5', 4°C), **unten:** Granathylakoide (BBYs). **A+C)** Absorptions- und Anregungsspektren (gestrichelte bzw. durchgehende Linie), normiert im Soret-Maximum von Chl a, aufgenommen bei RT. **B)** 77K Emissionsspektren, Anregung im Soret-Maximum von Chl a (durchgehende Linie) bzw. Chl b (gestrichelt). **D)** RT Emissionsspektren, Anregung im Soret-Maximum von Chl b. **Insets in A und C:** gemessene Anregungsspektren, nicht normiert.

3.1.5.2 Charakterisierung der Lichtsammelkomplex-Fractionen

Die in 3.1.4 beschriebene Auftrennung der solubilisierten Granathylakoide aus WT und bkt-Linie im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten führte zur Separation der Lichtsammelkomplexe von den Photosystemfraktionen (Vgl. Abb. 3.1-5). In Abbildung 3.1-8 sind die spektroskopischen Analysen der ersten drei SDG-Fractionen dargestellt, wobei der Fokus hier auf den LHCII-Trimeren liegt. Auch hier zeigte sich für die Anregungsspektren keine Energieweiterleitung in dem für die Ketocarotinoide spezifischen Absorptionsbereich (Abb. 3.1-8B). Auch hier verdeutlicht das Inset in der zuvor genannten Abbildung gezeigten Rohdaten das deutlich unter dem Wildtyp liegende Chlorophyll a-Fluoreszenzlevel der bkt-Linie nach Anregung im Bereich zwischen 400 und 600 nm.

Es zeigten sich zudem Unterschiede in der Chlorophyll a Fluoreszenz nach spezifischer Anregung der jeweiligen Proben im Absorptionsmaximum des Chlorophyll b. Die gemessene

LHCII-Trimer-Fluoreszenz lag hier beim Wildtyp deutlich über der der bkt-Linie (Abb. 3.1-8C). Normiert man die Maxima jeweils auf 1, wird außerdem die zusätzliche Chl b - Emission und die höhere Absorption im rotwelligeren Bereich (710-750 nm) bei der bkt-Linie sichtbar (Abb. 3.1-8D).

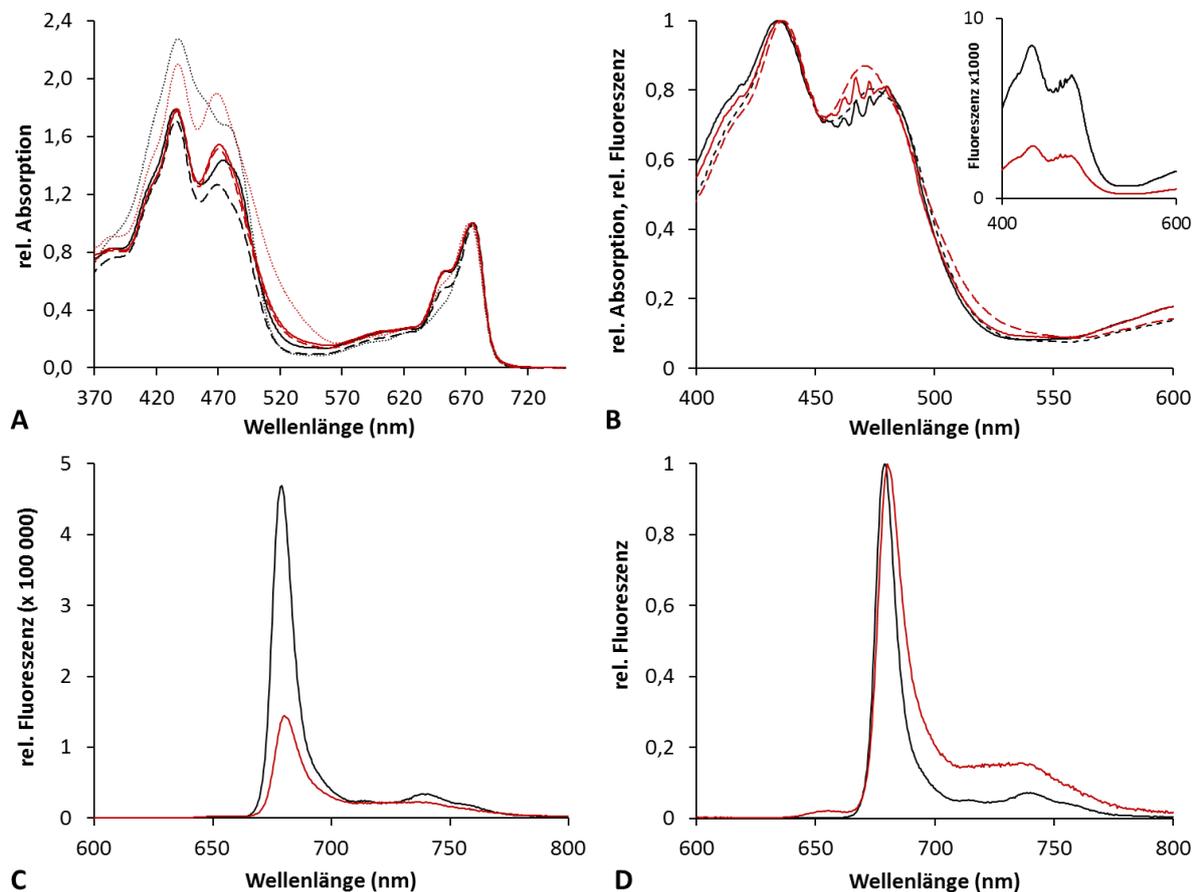


Abbildung 3.1-8: Spektroskopische Charakterisierung der LHC-Fractionen aus über Saccharosedichtegradienten aufgetrennten Granathylakoiden von WT (schwarz) und bkt-Linie (rot). **A)** Absorptionsspektren. Gepunktet: Fraktion 0a (freies Pigment), gestrichelt: Fraktion 0b (LHCII-Monomere), durchgehend: Fraktion 1 (LHCII-Trimere). **B-D)** Charakterisierung der LHCII-Trimere: **B)** Vergleich von LHCII-Anregungsspektren (durchgehend), gemessen im Fluoreszenzmaximum von Chl a, und LHCII-Absorption (gestrichelt), normiert auf das Soret-Maximum von Chl a bzw. nicht normiert (Inset). **C)** Emission des LHCII bei 77K, angeregt im Soret-Maximum des Chlorophyll b. **D)** wie C), aber normiert auf das Maximum der Chl a Fluoreszenz.

3.1.5.3 Charakterisierung der Photosystem-Fractionen

Die in den Saccharosedichtegradienten aufgetrennten, Photosystem enthaltenden (PS) Fraktionen wurden ebenfalls durch Absorptions-, Emissions- und Anregungsspektren näher untersucht. Dabei waren vor allem die Eigenschaften der in der bkt-Linie so dominanten Fraktion 2 von Interesse (in Abb. 3.1-9 grün dargestellt). Diese unterschied sich in Hinblick auf das Absorptionsspektrum kaum zu Fraktion 3 (rot) aus der bkt-Linie. Letztere wies aber, wie auch Fraktion 3 aus dem WT SDG (schwarz), eine verstärkte Verschiebung in den

Rotlichtbereich (Abb. 3.1-9A), was sich auch anhand der langwelligen Chl a Emissionen zwischen 710 und 750 nm in den 77K - Emissionsspektren deutlich widerspiegelte. Wie bereits für das LHCII Trimer wurde auch hier bei der bkt-Linie eine leichte Emission des angeregten Chl b beobachtet (Abb. 3.1-9C). Die Verläufe der in Abb. 3.1-9B dargestellten Anregungsspektren lagen in der bkt-Linie für beide PS-Fraktionen deutlich unter ihren Absorptionen. Insbesondere die für Wildtyp und bkt-Linie auf vergleichbarer Höhe im SDG gefundene Fraktion 3 zeigte hier für den WT im Carotinoidbereich eine ausgeprägtere Energieübertragung.

Für die im WT SDG tiefer gelegenen Fraktionen 5 und 6 wurde anhand der Absorptionsspektren eine Zunahme im Carotinoid- bzw. des LHC-typischen Chlorophyll b - Bereichs beobachtet. WT Fraktion 4 zeigte in diesem Bereich die geringste Absorption (Abb. 3.1-9A).

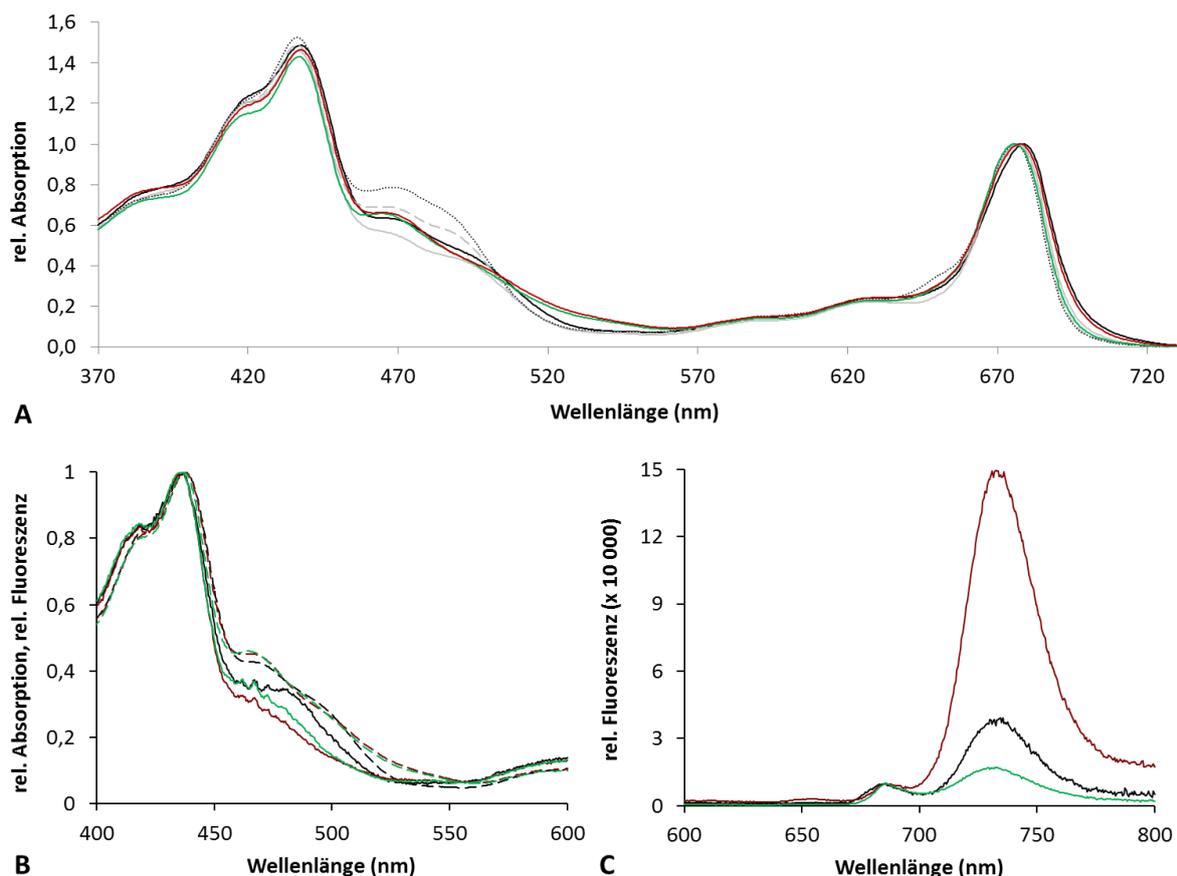


Abbildung 3.1-9: Spektroskopische Charakterisierung der Photosystem enthaltenden SDG-Fraktionen von solubilisierten Granathylakoiden aus WT und bkt-Linie. Schwarz: WT Fraktion 3, grau durchgehend: WT Fraktion 4, grau gestrichelt: WT Fraktion 5, grau gepunktet: WT Fraktion 6, grün: bkt Fraktion 2, rot: bkt Fraktion 3.

A) Absorptionsspektren von WT bzw. bkt-Linie, normiert auf 1 im Q_Y -Maximum von Chl a. **B)** Vergleich von Absorption (gestrichelt) und Anregungsspektren (durchgehend) von Fraktion 2 und 3 bei RT, gemessen im Fluoreszenzmaximum von Chl a, normiert auf das Chl a Soret-Maximum. **C)** Emissionsspektren der Fraktionen 2 (grün) und 3 (schwarz, rot) aus WT und bkt, gemessen bei 77 K, angeregt im Absorptionsmaximum von Chl b, normiert auf das Maximum der Chl a Fluoreszenz.

3.1.6 Pigment-Analysen

3.1.6.1 Vergleich der Photosynthesepigmente und des Ketocarotinoid-Gehalts

In der nachfolgend aufgeführten Tabelle 3.1-4 sind die Daten der Pigmentanalysen von gemörsertem Blattmaterial (A, B) und isolierten Thylakoiden (C) in nmol pro mg Trockengewicht bzw. Pigment pro Chlorophyll (nmol/nmol) zusammengefasst. Im Vergleich zum Blattextrakt zeigt sich für die Thylakoide eine etwas verringerte Menge an Ketocarotenoiden pro Chlorophyll a. Die in der Tabelle aufgeführten Ketocarotenoid-Derivate (Ke) entsprechen dabei drei Peaks innerhalb der HPLC-Analyse, die dem Spektrum nach Asta- bzw. Canthaxanthin entsprachen, jedoch nicht auf Höhe des jeweiligen Standards eluierten (siehe dazu exemplarisch Anhang 7.5). Insgesamt überstieg die Menge der gefundenen Derivate die Menge von Asta- und Canthaxanthin zusammen um ca. das Doppelte, so dass man bei dieser bkt-Linie von einer eher ineffizienten Herstellung des Zielpigments Astaxanthin sprechen kann. Die Verhältnisse von Chl a zu Chl b und Chl a zu β -Carotin sind nach den hier ermittelten Daten konstant. Die Gesamtmenge an primären Carotinoiden pro Chl a beträgt damit im WT ca. 0,4, in der bkt-Linie ist sie um fast die Hälfte auf 0,26 pro Chl a reduziert. Hinzu kommen bei letzterer aber etwa 0,2 sekundäre Carotinoide (Astaxanthin, Canthaxanthin und ihre Derivate) pro Chlorophyll a. Im Rahmen der Standardabweichungen ist der Gesamtcarotinoidgehalt in WT und bkt-Linie damit etwa gleich.

Tabelle 3.1-4: HPLC-Analyse von Blättern (A), (B) und Thylakoiden (C) aus *N. tabacum* Var. Xanthi. A) Angaben in nmol pro mg Trockengewicht (TG). B, C) Angaben in Pigment pro Chl a (nmol/nmol). β -Car = β -Carotin, Lut = Lutein, Vio = Violaxanthin, Neo = Neoxanthin, As = Astaxanthin, Ca = Canthaxanthin, Ke = Ketocarotenoid-Derivate. ($n = 3$)

(A) pro mg TG (Blattextrakt)											
	Chl a	Chl b	β -Car	Lut	Vio	Neo	As	Ca	Ke		
WT	42,0 +/- 10,4	15,4 +/- 3,5	6,4 +/- 1,4	7,2 +/- 1,9	1,5 +/- 0,6	2,1 +/- 0,5	-	-	-		
bkt	23,1 +/- 0,5	8,4 +/- 0,4	3,5 +/- 0,5	2,1 +/- 0,3	0,4 +/- 0,1	0,0 +/- 0,0	0,8 +/- 0,3	0,8 +/- 0,2	3,1 +/- 0,3		
(B) pro mol Chl a (Blattextrakt)									(C) pro mol Chl a (Thyl.)		
	Chl b/a	β -Car/a	Lut/a	Vio/a	Neo/a	As/a	Ca/a	Ke/a	As/a	Ca/a	Ke/a
WT	0,37 +/- 0,011	0,15 +/- 0,004	0,17 +/- 0,012	0,03 +/- 0,005	0,05 +/- 0,0004	-	-	-	-	-	-
bkt	0,37 +/- 0,009	0,15 +/- 0,004	0,09 +/- 0,01	0,02 +/- 0,002	0,0 +/- 0,0	0,04 +/- 0,001	0,03 +/- 0,01	0,13 +/- 0,007	0,01 +/- 0,0004	0,04 +/- 0,002	0,10 +/- 0,002

3.1.6.2 Chlorophyllgehalt, Blattfläche und Frischgewicht

Zur Ermittlung des Verhältnisses von Frischgewicht, Blattgröße und Chlorophyllgehalt in Wildtyp und bkt-Linie wurden 0,8 cm große Blattscheiben (0,5 cm²) aus 4 Wochen alten Blättern gestanzt, gewogen, anschließend unter N₂ lq gemörsert und das daraus resultierende Pulver für die in 2.3.1.1 beschriebenen Chlorophyllbestimmungen in 80 % Aceton aufgenommen. Die dabei dokumentierten Daten sind in Tabelle 3.1-5 zusammengefasst.

Tabelle 3.1-5: Korrelation von Blattfläche, Frischgewicht und Chlorophyllgehalt von *N. tabacum* Var. Xanthi.

	FG mg/cm ²	Chl a+b (µg)/mg FG	Chl a/b
Wildtyp (n = 34)	14,9 mg +/- 0,8 mg	2,6 µg +/- 0,2 µg	3,2
bkt-Linie (n = 31)	13,5 mg +/- 0,6 mg	2,2 µg +/- 0,1 µg	3,2

3.1.7 Reduktion des Radikalgehalts durch Astaxanthin

Die Thylakoide aus WT und bkt-Linie wurden mit Blick auf ihre unterschiedliche Pigmentkomposition im Folgenden auf ihre Wirkung als Radikalfänger hin untersucht. Es wurde hierfür in Ethanol ein Reaktionsansatz aus radikalischer Lösung und den auf 1 µg Chl a eingestellten Thylakoiden aus Wildtyp bzw. bkt-Linie hergestellt. Die Abnahme des Radikalgehalts konnte photometrisch bei 734 nm über einen Zeitraum von 125 Minuten dokumentiert werden. In diesem Versuch zeigte die bkt-Linie in der Langzeitreaktion zunehmend einen höheren Radikalumsatz als der Wildtyp, wohingegen die in Dreifachbestimmung gemessenen Absorptionen für beide Organismen zu Beginn der Reaktion im Rahmen der Standardabweichung noch sehr nah beieinander lagen (Abb. 3.1-10, Einzelmessungen in Anhang 7.4).

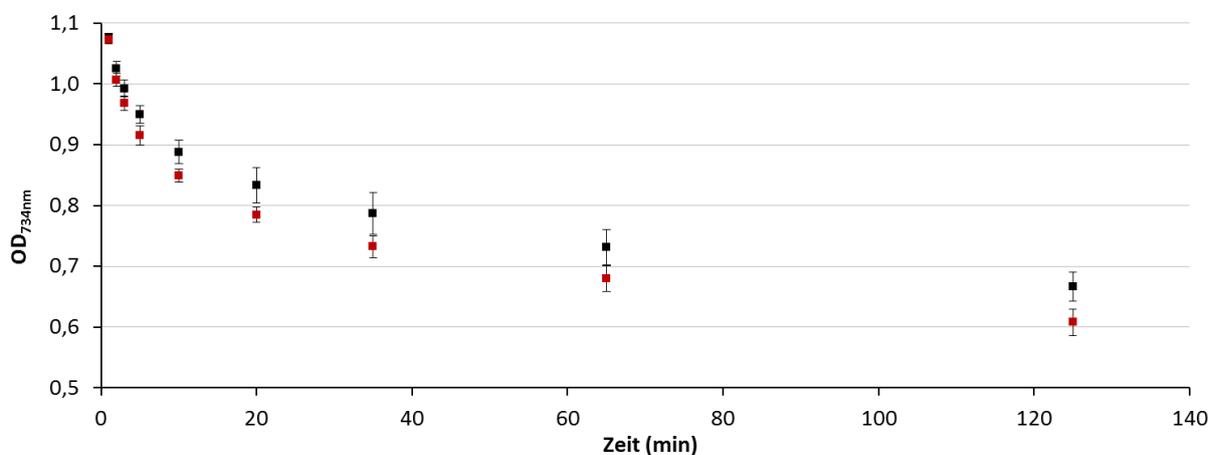


Abbildung 3.1-10: Astaxanthin als Radikalfänger. Verwertung einer Radikallösung aus 7,6 mM ABTS und 2,45 mM K₂SO₅ in EtOH, gemessen bei 734 nm. Eingesetzt wurden Thylakoide aus 5-6 Wochen alten Blättern von *N. tabacum* Var. Xanthi WT (schwarz, n=3) und bkt-Linie (rot, n=5) á 1 µg Chl a.

3.2 Struktur des Lichtsammelkomplexes FCPb von *C. meneghiniana*

3.2.1 Isolation des FCPb

Um den Lichtsammelkomplex FCPb auf seine strukturellen Eigenschaften näher untersuchen zu können, wurde er zunächst im intakten Zustand aus den Thylakoiden einer 7 Tage im Schwachlicht gewachsenen *Cyclotella meneghiniana* Kultur isoliert. Die Separierung der Photosynthesekomplexe erfolgte in einem ersten Schritt über Anionenaustauscherchromatographie (IEX). Abbildung 3.2-1 zeigt den Verlauf der Auftrennung. FCPb eluierte bei Zugabe von 17-20 % Lösung B, was einem Salzgehalt von ca. 130-150 mM NaCl entspricht. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte durch Absorptionsspektroskopie der Elutionsmaxima (Abb. 3.2-1). Diese können den Photosynthesekomplexen wie folgt zugeordnet werden: freies Pigment (1), Photosystem II (2), FCPa (3), Photosystem I (4) und FCPb (5), vgl. auch [59].

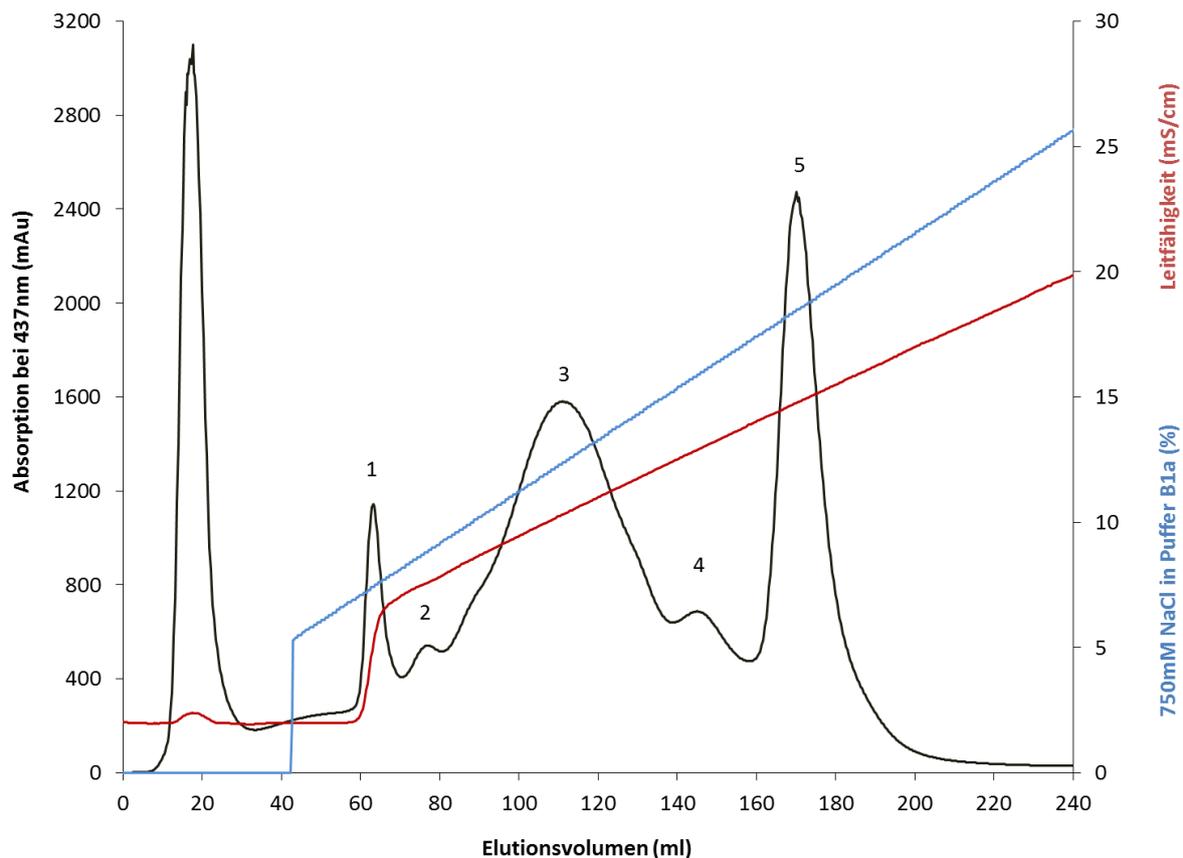


Abbildung 3.2-1: Ionenaustauscherchromatographie von solubilisierten Thylakoiden aus *C. meneghiniana* (Anzucht: 7 Tage, Schwachlicht). 1 = freies Pigment, 2 = Photosystem II, 3 = FCPa, 4 = Photosystem I, 5 = FCPb [59].

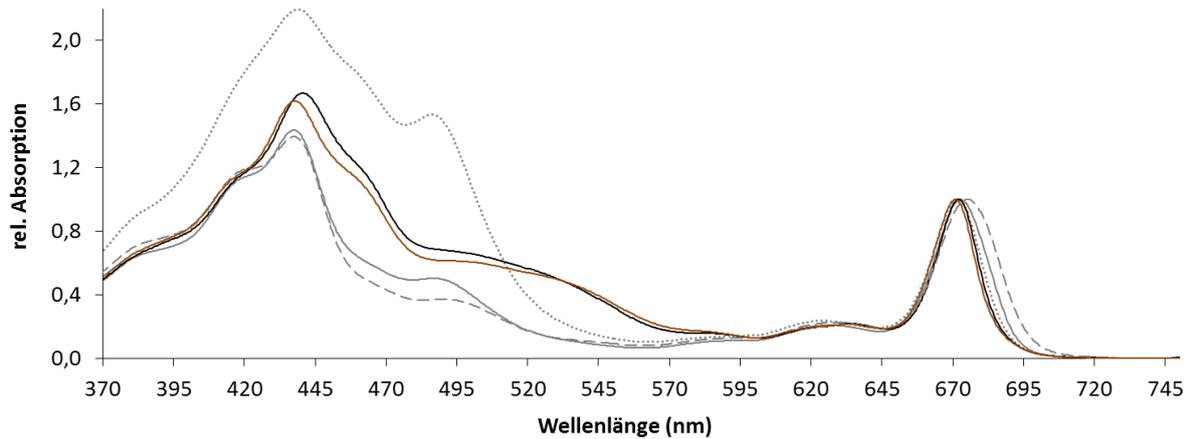


Abbildung 3.2-2: Absorptionsspektren der IEX-Fraktionen. Grau gepunktet (1) = freies Pigment, grau durchgehend (2) = Photosystem II, schwarz (3) = FCPa, grau gestrichelt (4) = Photosystem I, braun (5) = FCPb

Durch die IEX konnten FCPa und FCPb voneinander getrennt werden. Die noch vorhandenen Photosystemverunreinigungen in den FCP-Fraktionen wurden in einem zweiten Schritt über diskontinuierliche Saccharosedichtegradienten entfernt (Abb. 3.2-3A). Die anschließende, in Abbildung 3.2-3B dargestellte Größenausschlusschromatographie (SEC) zeigt das größenbedingt unterschiedliche Elutionsverhalten der isolierten FCPa- und FCPb-Fraktionen.

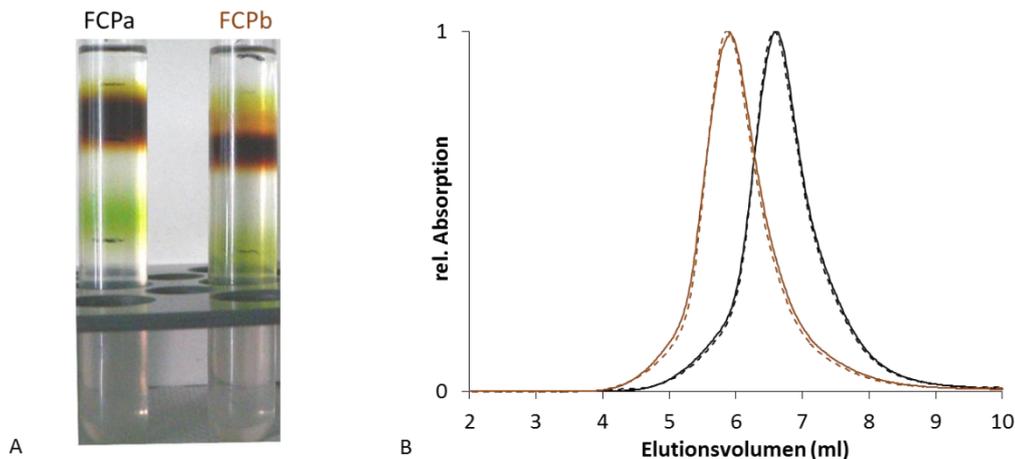


Abbildung 3.2-3: Reinigung der über die IEX separierten FCPa- und FCPb-Fraktionen. A) Auftrennung der IEX-Fraktionen von FCPa und b nach 22 h Ultrazentrifugation bei 230000 x g. C) Größenausschlusschromatographie der via UZ gereinigten FCPa (schwarz) bzw. FCPb (braun) Fraktionen. Der Lauf wurde spektroskopisch für Chl a bei 437 nm (durchgehende Linie), bzw. 280 nm für den Proteinanteil (gestrichelte Linie) verfolgt und anschließend auf 1 im Absorptionsmaximum normiert.

Zur Überprüfung der Funktionalität der gereinigten Komplexe wurden Absorptionsspektren nach Anregung von 370 bis 750 nm (Abb. 3.2-4) bzw. Emissionsspektren nach Anregung von Chlorophyll c bei 465 nm (Abb. 3.2-4A) aufgenommen. Abbildung 3.2-4B stellt die im Rotlichtbereich aufgezeichneten Absorptions- bzw. Emissionsmaxima vergrößert dar. FCPb absorbiert (671 nm) bzw. emittiert (674 nm) jeweils einen Nanometer vor FCPa (672 bzw.

675 nm, vgl. auch [165]. Es zeigte sich im spektroskopischen Verhalten der Lichtsammelkomplexe kein deutlicher Unterschied zwischen direkt aus Saccharosedichtegradienten stammenden Proben bzw. den zusätzlich über die SEC nachgereinigten Fraktionen.

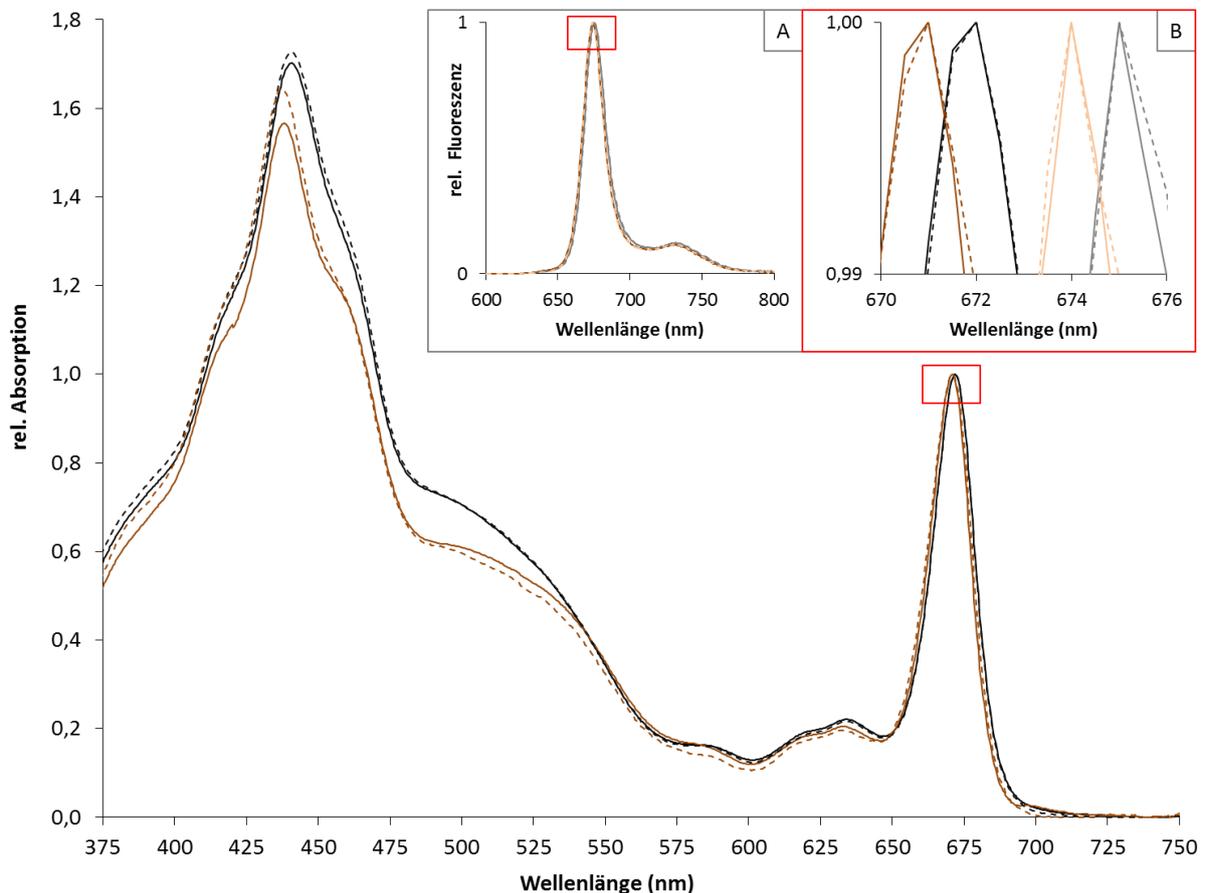


Abbildung 3.2-4: Spektroskopische Charakterisierung von FCPa (schwarz) und FPb (braun), gemessen nach SDG (gestrichelt) bzw. SDG mit anschließender SEC (durchgehend).

Hauptbild: Absorptionsspektren im Bereich des sichtbaren Lichts.

A) Emissionsspektren der o.g. Proben. Anregung von Chlorophyll c bei 465 nm, RT. **B)** Vergrößerung der Absorptions- bzw. Emissionsmaxima. Q_y -Maxima der Absorptionsspektren: FCPb (braun) = 671 nm, FCPa (schwarz) = 672 nm. Emissionsmaxima: FCPb (orange) = 674 nm, FCPa (grau) = 675 nm, vgl. auch [165].

3.2.2 Größe und Form des FCPb

3.2.2.1 Stabilität des FCPb in der Größenausschlusschromatographie

Um die verschiedenen Oligomerisierungszustände der FCP-Komplexe sichtbar zu machen, wurden FCPa und FCPb unter verschiedenen Bedingungen auf ihre Stabilität hin überprüft (Abb. 3.2-5). Als Referenz gelten jeweils die frisch aus dem Saccharosegradienten isolierten Lichtsammelkomplexe, wobei FCPb bei kontinuierlicher Flussrate von 0,3 ml/min ca. 0,75 ml

vor dem FCPa-Komplex eluiert. Abbildung 3.2-5 zeigt deutlich, dass die beiden Komplexe stabil gegenüber der langfristigen Lagerung bei -80 °C und einer 24-stündigen Inkubation bei 4 °C sind. Das kurzzeitige Versetzen der Probe mit Hochsalzlösung (NaCl) vor dem Auftragen auf die SEC simuliert den Salzschock, dem die Komplexe im Trocknungsprozess bei der Kontrastierung mit Uranylacetat für die Analyse im Transmissionselektronenmikroskop ausgesetzt sind, das Lyophilisieren und Beglimmen der Probe (siehe Abschnitt 2.7) stellt den Versuch dar, das Verhalten des getrockneten FCPb auf ein elektrisches Feld im o.g. Kontrastiervorgang nachzuempfinden .

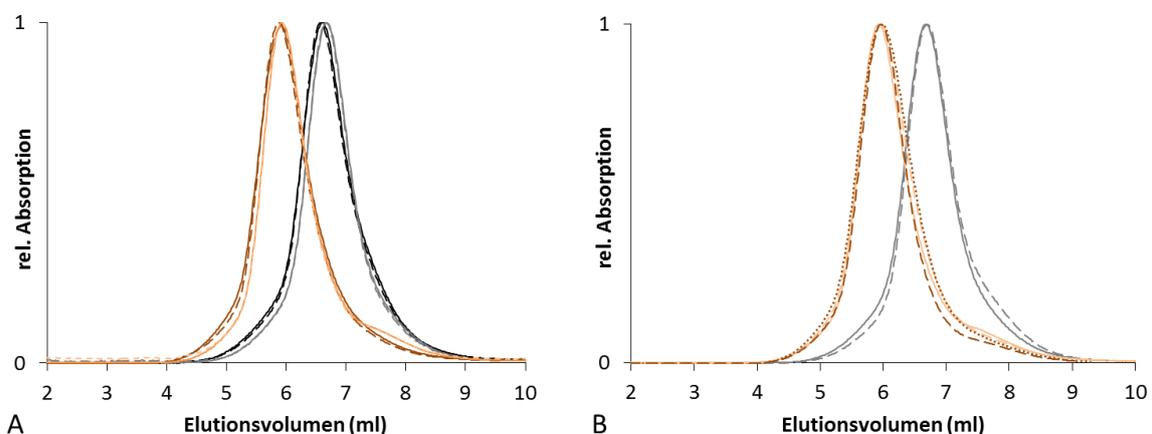


Abbildung 3.2-5: Stabilität von FCPa und FCPb. **A)** SEC von frisch isoliertem FCPa (schwarz) bzw. FCPb (braun) und 3 Tage bei -80 °C eingefrorenem FCPa (grau) bzw. FCPb (orange), gemessen bei 437 (durchgehende Linie) und 280 nm (gestrichelt). **B)** 3 Jahre bei -80 °C gelagerter FCPa (grau durchgehend), über Nacht bei 4 °C inkubierter FCPa (grau gestrichelt), 4 Jahre bei -80 °C gelagerter FCPb (orange durchgehend), über Nacht bei 4 °C inkubierter FCPb (lagerte 4 Jahre bei -80°C), anschließend 1' versetzt mit 0,8 M NaCl (orange gestrichelt), FCPb (lagerte 4 Jahre bei -80°C), 5' mit 5 M NaCl versetzt (braun gepunktet), FCPb (2009) lyophilisiert und beglimmt (braun gestrichelt).

Für den Nachweis der Monomere und einer davon ausgehenden Rückschlussmöglichkeit auf die höheren Oligomerisierungszustände von FCPb wurden die Komplexe härteren Bedingungen (Inkubation mit 100 mM β -DDM für 60 Minuten (FCPa) bzw. 3 Stunden (FCPb) bei Raumtemperatur) ausgesetzt und wiederum über die SEC aufgetrennt (Abb. 3.2-6A). FCPb (orange) zeigt dabei drei deutliche Maxima, FCPa (grau) hingegen zwei, die aber im Elutionsverhalten deckungsgleich mit denen des FCPb sind. Bei beiden Proben sind jedoch leichte Verschiebungen des ersten Maximums im Vergleich zu den als Referenz frisch isolierten FCPa (schwarz) bzw. FCPb (braun) Komplexen erkennbar: Rechtsverschiebung um 50 μ l bei FCPb (orange) und um 90 μ l bei FCPa (grau). Die erhaltenen SEC-Maxima I-III wurden durch Absorptions- bzw. Emissionsspektren näher charakterisiert (Abb. 3.2-6B, B1 für FCPb, Abb. 3.2-6C bzw. C1 für FCPa).

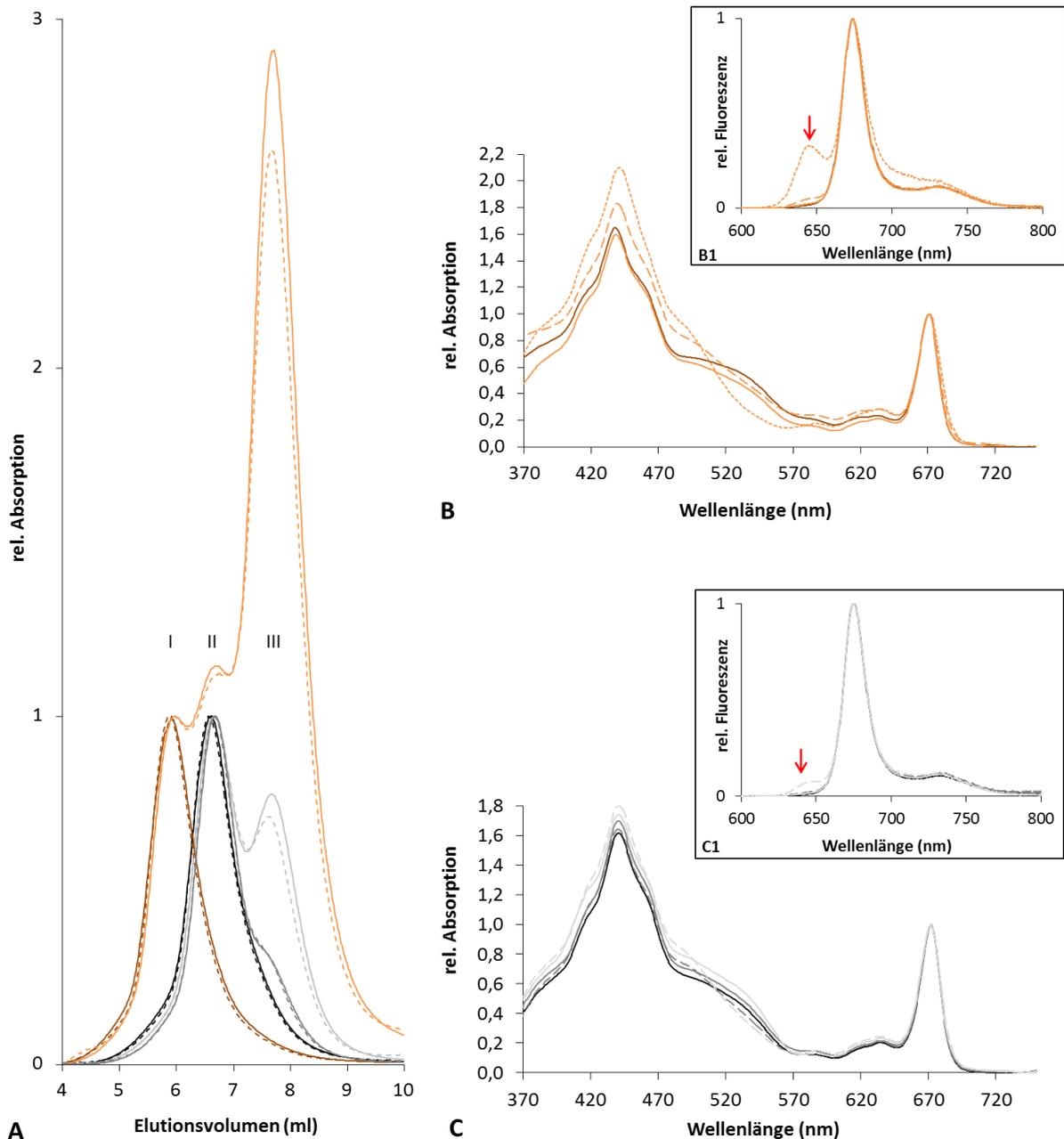


Abbildung 3.2-6: Oligomerisierungszustände von FCPs. **A)** Größenausschusschromatographie: frisch aus SDG gereinigter FCPa (schwarz) und FCPb (braun), FCPa inkubiert mit 20 mM β -DDM (grau) bzw. 100 mM DDM (hellgrau), FCPb inkubiert mit 100 mM β -DDM (orange). Absorption bei 437 nm (durchgehende Linie) und 280 nm (gestrichelt). **B)** Absorptionsspektren von FCPb: frisch aus SDG isoliert (braun durchgehend), SEC Maximum I (orange durchgehend), II (orange gestrichelt) und III (orange gepunktet). B1) Emissionsspektren von B), angeregt bei 465 nm. **C)** Absorptionsspektren von FCPa: frisch isoliert (schwarz), versetzt mit 20 mM β -DDM: SEC Maximum II (dunkelgrau durchgehend), III (dunkelgrau gestrichelt), versetzt mit 100 mM β -DDM: SEC Maximum II (hellgrau durchgehend), III (hellgrau gestrichelt). C1) Emissionsspektren von C), angeregt bei 465 nm. Rote Pfeile zeigen die Chl c - Emission.

Insbesondere bei Maximum III wird sowohl für FCPa als auch FCPb eine Verschiebung der Absorptionsstärke im längerwelligen Absorptionsbereich von Fucoxanthin (>520 nm) hin zu dessen Absorption im Blaulichtbereich (<520 nm) sichtbar, der sich mit dem Absorptionsbereich der Chlorophylle überschneidet. Dies spiegelt sich auch in der Protein- bzw. Pigmentmessung während des SEC-Laufs wieder (Abb. 3.2-6A). Normiert auf das jeweils

erste Maximum der Proben sowohl in der Absorption von Chl a (437 nm), als auch für die Proteinabsorption (280 nm), erhöht sich bei Maximum III die 437 nm – Absorption deutlich. Die Emissionsspektren zeigen bei Anregung von Chlorophyll c bei 465 nm für das SEC-Maximum III von FCPa und FCPb eine deutliche Störung der Energieweiterleitung auf Chlorophyll a (Vgl. Chlorophyll c Emission bei ca. 634 nm in Abb. 3.2-6B1, C1).

Um zu prüfen, ob dies an der völligen Zerstörung der Pigment-Protein-Bindung liegt oder ob es sich lediglich um in ihrer Funktionalität etwas beeinträchtigte Monomere handelt, wurde in einem nachfolgenden Schritt für FCPa eine mildere Solubilisierung (15-minütige Inkubation mit 20 mM β -DDM bei 4 °C) gewählt.

Maximum III ist hier in der SEC als Schulter zu erkennen, Protein (280 nm)- und Chlorophyll (437 nm) - Absorption sind deckungsgleich (Abb. 3.2-6A, dunkelgrau gestrichelte bzw. durchgehende Linie), es geht also kein Pigment verloren. Bei den zugehörigen Absorptionsspektren zeigt sich auch hier für das Maximum III die bereits beobachtete Verschiebung der Absorptionsstärke vom hinteren in den vorderen Absorptionsbereich des Fucoxanthins (Abbildung 3.2-6C). Die Energieweiterleitung von Chlorophyll c auf Chlorophyll a ist in dieser milder solubilisierten Probe im Gegensatz zu dem 100 mM β -DDM Ansatz intakt (Abb. 3.2-6C1).

Als Größenreferenz wurde zudem der funktionell und strukturell verwandte Lichtsammelkomplex LHCII, isoliert durch SDG von solubilisierten *N. tabacum* Thylakoiden, eingesetzt. Das ca. 125 kDa große Trimer von LHCII eluierte zwischen FCPa und FCPb mit einem Abstand von ca. 170 μ l auf FCPb (Abb. 3.2-7), ist also kleiner als der FCPb-Komplex.

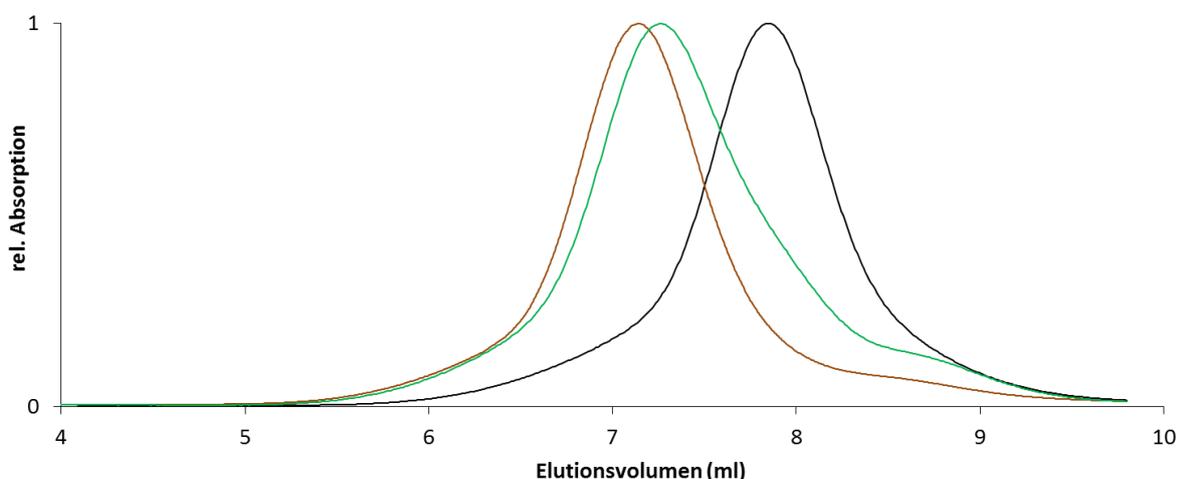


Abbildung 3.2-7: Vergleich der Größenverhältnisse von Lichtsammelkomplexen. FCPb (braun), LHCII (grün) und FCPa (schwarz). Absorptionsmessung bei 437 nm.

3.2.2.2 Gelelektrophoresen und Immunodetektionen

Die Reinheit der isolierten Lichtsammelkomplexe wurde anhand einer denaturierenden Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung bzw. der zugehörigen Immunodetektion überprüft (Abb. 3.2-8A,B). Es zeigt sich dabei sowohl für den gereinigten FCPa (2) als auch für FCPb (3) nur jeweils ein deutlich sichtbares Proteinsignal. Das unterste Signal des Größenstandards (M) entspricht einer Größe von etwa 19 kDa (Abb. 3.2-8A links). Bei der Immunodetektion mit α -FCP2 wurde die FCPb-Fraktion (3) auf eventuelle Verunreinigungen mit FCPa getestet. Es kann hier im Gegensatz zu den Positivkontrollen (Thylakoide (1) und FCPa (2)) keine Reaktion mit dem verwendeten Antikörper beobachtet werden.

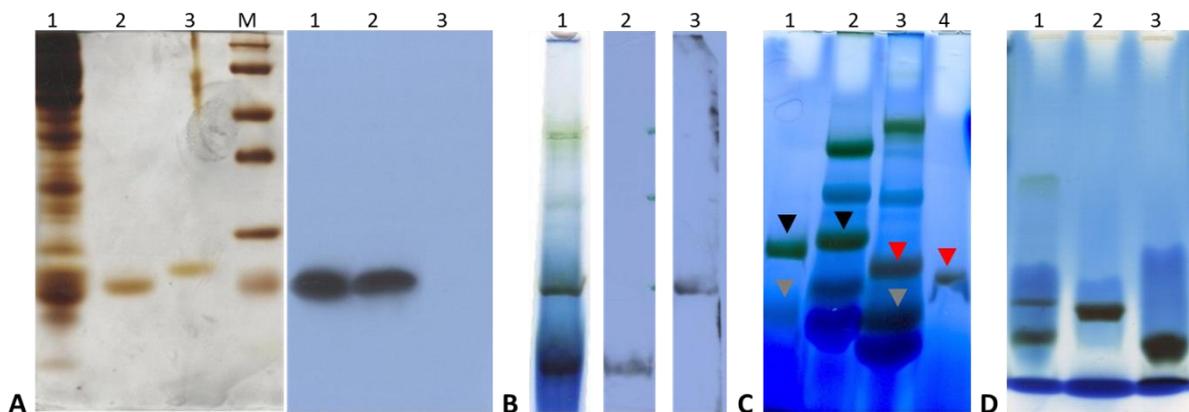


Abbildung 3.2-8: Gelelektrophoretische Auftrennung von FCPa und FCPb. **A)** Silberfärbung der SDS-PAGE (links) und die zugehörige Immunodetektion mit α -FCP2 (rechts) von *C. m.* Thylakoiden (1), über SDG gereinigte FCPa (2) und FCPb (3), M = Größenstandard Fermentas SM#0441. **B)** Blue Native Gel von *C.m.* (1) und die zugehörigen Immunodetektionen mit α -FCP2 für FCPa (2) und mit α -lhcf1-11 für FCPb (3). **C)** Blue Native Gel von gereinigtem LHCII aus Tabak (1), Tabak Thylakoiden (2), *C.m.* Thylakoiden (3) und gereinigtem FCPb (4). Schwarze Pfeile: LHCII-Trimere, graue Pfeile: Monomere von LHCII und FCPa, rote Pfeile: FCPb-Trimer. **D)** *C.m.* Thylakoide (1) im Größenvergleich mit gereinigtem FCPb (2) und FCPa (3).

Die Abbildungen 3.2-8B-D zeigen verschiedene native Gelelektrophoresen, um die Oligomerisierung von FCPa und FCPb zusätzlich unabhängig von den SEC-Analysen (Abschnitt 3.2.1) zu betrachten.

In Abb.3.2- 8B Spur 1 wurden *C. meneghiniana* Thylakoide nach 5-minütiger Solubilisierung mit 20 mM β -DDM in einer Blue Native - Gelelektrophorese aufgetrennt. Spur 2 zeigt die Immunodetektion mit dem FCPa detektierenden α -FCP2 nach Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot). Im Anschluss wurden die gebundenen Antikörper wieder entfernt (Stripping) und die Membran mit FCPb detektierendem α -fcp1-11 inkubiert (Spur 3). Die Immunodetektionen zeigten jeweils ein spezifisches Signal für FCPa und FCPb auf Höhe der in der BN-PAGE deutlich sichtbaren braunen Proteinbanden. Abbildung 8C zeigt den Vergleich des Laufverhaltens von via SDG gereinigtem LHCII (Spur 1) aus *N. tabacum*, den zugehörigen Thylakoiden (Spur 2),

Thylakoide aus *C. meneghiniana* (Spur 3) und dem zugehörigen, über IEX und SDG gereinigten FCPb (Spur 4).

Die gereinigten Lichtsammelkomplexe (1,4) laufen sowohl bei *N. tabacum* (schwarze Pfeile) als auch bei *C. meneghiniana* (rote Pfeile) bei etwas niedrigerem Molekulargewicht als die entsprechenden Banden in den aufgetrennten Thylakoiden (2,3). LHCII zeigt dabei in jedem Fall ein höheres Molekulargewicht als FCPb und FCPa. Letzterer befindet sich etwas unterhalb der Größe des LHCII Monomers (1,3; graue Pfeile).

In Abbildung 8D wird das Laufverhalten von gereinigtem FCPa (3) und FCPb (2) noch einmal im Vergleich zu solubilisierten Thylakoiden (1) verdeutlicht: der gereinigte FCPb läuft wie schon in 8C leicht unterhalb der oberen braunen Bande der Thylakoidprobe, der gereinigte FCPa deutlich darunter.

In der Analyse über native Gelsysteme zeigte sich der FCPb-Komplex stets kleiner, in der Größenausschlusschromatographie (Abb. 3.2-6, 3.2-7) jedoch größer als das LHCII-Trimer.

3.2.2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Für einen weiteren Größenvergleich zwischen den Lichtsammelkomplexen aus *C. meneghiniana* und *N. tabacum* wurden wie in Abschnitt 2.10.2 beschrieben im Transmissionselektronenmikroskop Bilder der aus dem SDG entnommenen und mittels Uranylacetat kontrastierten Proben in 300000-facher Vergrößerung mit einer CCD-Kamera

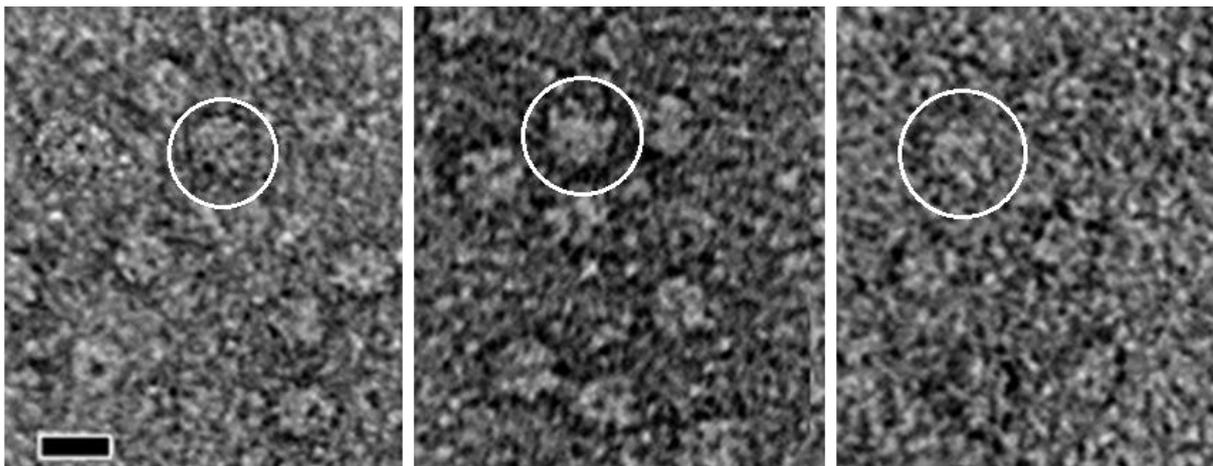


Abbildung 3.2-9: Größenvergleich verschiedener Lichtsammelkomplexe im Transmissionselektronenmikroskop. Von links nach rechts: FCPb, LHCII und FCPa auf hydrophilem Kohlefilm bei 300000-facher Vergrößerung. Der angegebene Maßstab entspricht 10 nm.

(1000x1000 Pixel) aufgenommen (Abb. 3.2-9). Als hydrophiler Träger für die Proteinlösungen diente hier ein mit negativer elektrischer Ladung versehener Kohlefilm.

Die Partikel von LHCII, FCPb und FCPa zeigen eine Größe von ca. 7-8 nm, wobei insbesondere die FCPa-Probe deutlich zerfallener wirkte und im Gegensatz zu LHCII und FCPb mehrheitlich auch wesentlich kleinere Fragmente aufwies. Da der FCPb-Komplex hier im Größenbereich des LHCII-Trimers liegt, wird es in der Folge als FCPb-Trimer bezeichnet.

In Abb. 3.2-10-A1 sind exemplarisch Seitenansichten der in Abb. 3.2-9 gezeigten FCPb-Probe dargestellt. Durch das Verwenden von unbehandeltem Kohlefilm als hydrophobem Träger für die Proteinlösung orientierten sich die in β -DDM-Detergenzhüllen gelösten FCPs seitlich zur Trägeroberfläche. Obwohl die gleiche Verdünnung (1:20) wie für die oben dargestellte Aufsicht verwendet wurde, blieb im Verhältnis dazu durch die fehlenden Wechselwirkungen zwischen Protein und Kohlefilm nur ein Bruchteil der Proteine haften. Es konnte auf dem hydrophobem Kohlefilm keine signifikante Partikelmenge im Größenbereich der in Abb. 3.2-9 gezeigten Aufsichten der FCPb-Trimere gefunden werden.

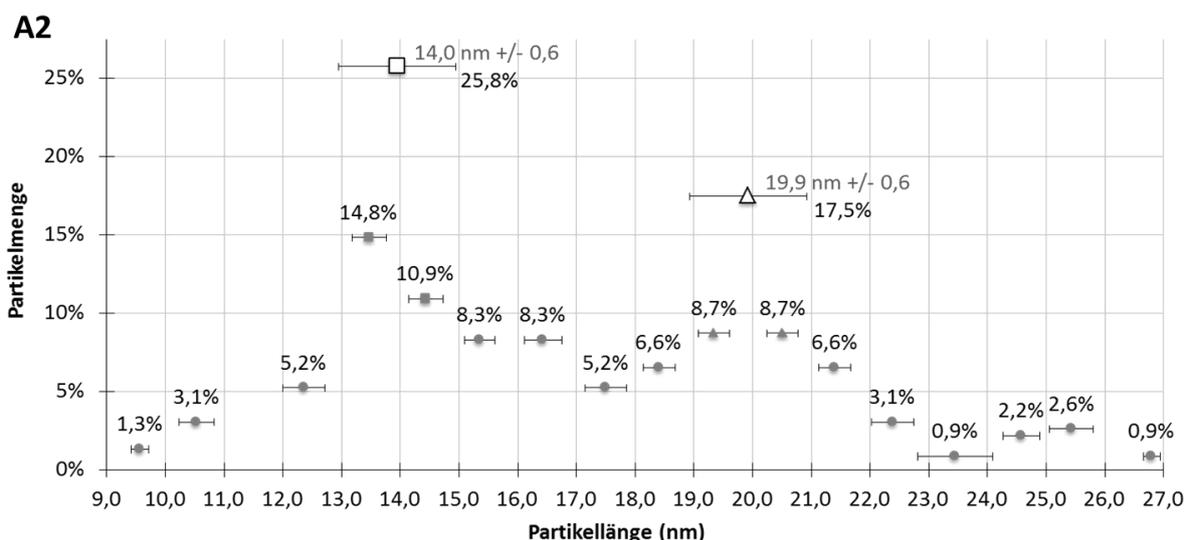
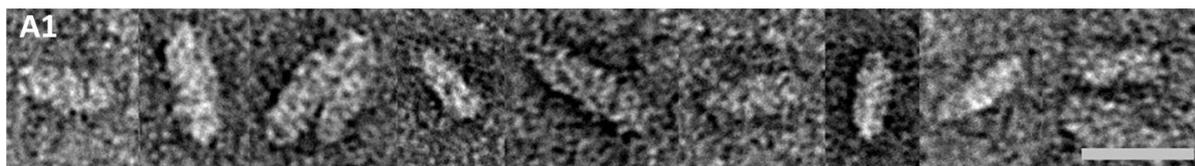


Abbildung 3.2-10: Seitenansichten des FCPb. **A1)** Gezeigt sind exemplarische TEM-Aufnahmen von FCPb Seitenansichten auf hydrophobem Kohlefilm bei 300000-facher Vergrößerung mit einer Breite von ca. 6 nm und variablen Längen, die in A2 näher ausgewertet sind. Maßstab = 20 nm. **A2)** Statistische Verteilung der Längen von 229 FCPb-Partikeln in Seitenansicht. Gruppirt wurden jeweils Partikellängen mit gleicher Vorkommastelle (graue Symbole), bzw. die Summe der beiden zahlenmäßig größten Gruppen im Bereich von 13-15 nm (\square 14 nm \pm 0,6 nm) bzw. 19-21 nm (Δ 19,9 nm \pm 0,6 nm).

Etwa 25 % der insgesamt 229 auswertbaren Seitenansichten zeigten eine Länge von 14 nm \pm 0,6nm, 17,5 % sind etwa 19,9 nm \pm 0,6nm lang (Abb. 3.2-10-A2). Die Partikelbreiten

schwanken zwischen ca. 6-8 nm. Durch mögliche Kippstellungen dieser 229 ausgewerteten Seitenansichten ist die Breite nicht zuverlässig zu bestimmen.

Die Länge der in Abb. 3.2-11C1 gezeigten Hexamer-Aufsichten (Summe aus 27 Einzelbildern) beträgt ca. 14 nm, ihre Breite liegt im Bereich der in Abb. 3.2-9 gezeigten FCPb-Rohpartikel-Durchmesser von ca. 7-8 nm. In Anbetracht der Unschärfe auf Grund der wenigen Partikelbilder, die aufsummiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich in Abb. 3.2-11C1 auch um Seitenansichten und nicht um eine hexamere Anordnung der FCPs handeln könnte.

In der Einzelpartikelanalyse (Abschnitt 2.11.3) wurden die bei 133000x Vergrößerung gemachten Aufnahmen zueinander ähnlicher FCPb-Trimere für eine bessere Auflösung summiert, woraus sich in verschiedenen Klassen zwei dominierende Ansichten ergaben (vgl. auch Erläuterungen in 2.11-3B und C) Abb. 3.2-11-B1, oben: Summe aus 2661 Einzelbildern, unten: Summe aus 4344 Einzelbildern). Diese Ansichten sind sehr ähnlich zueinander, wenngleich die Summe aus 4344 Partikeln etwas größer und runder ist, als die Summe der 2661 Einzelpartikel. Diese beiden Bilder könnten, ohne dass eine konkrete Zuordnung möglich ist, als Vorder- bzw. Rückseite des FCPb deklariert werden. Ihre Größe beläuft sich auf etwa 6-7 nm. In beiden Bildern erkennt man die dreiseitige Struktur, die auch schon vom LHCI bekannt ist (Abb. 3.2-11-B2, hier: mit FCP-Pigmenten, zusammengestellt von C. Büchel nach Premvardhan *et al.* (2010) [51] und Liu *et al.* (2004) [30]).

Die hier analysierte FCPb-Probe war in Hinblick auf die Partikelgröße insgesamt sehr homogen, es konnten jedoch auch einige wenige, größere Partikel gefunden werden (Abb. 3.2-11-C1: potentielle Hexamere (Summe aus 27 Einzelbildern), C2: potentielle Nonamere (Summe aus 8 Einzelbildern) mit je ca. 14 nm Durchmesser).

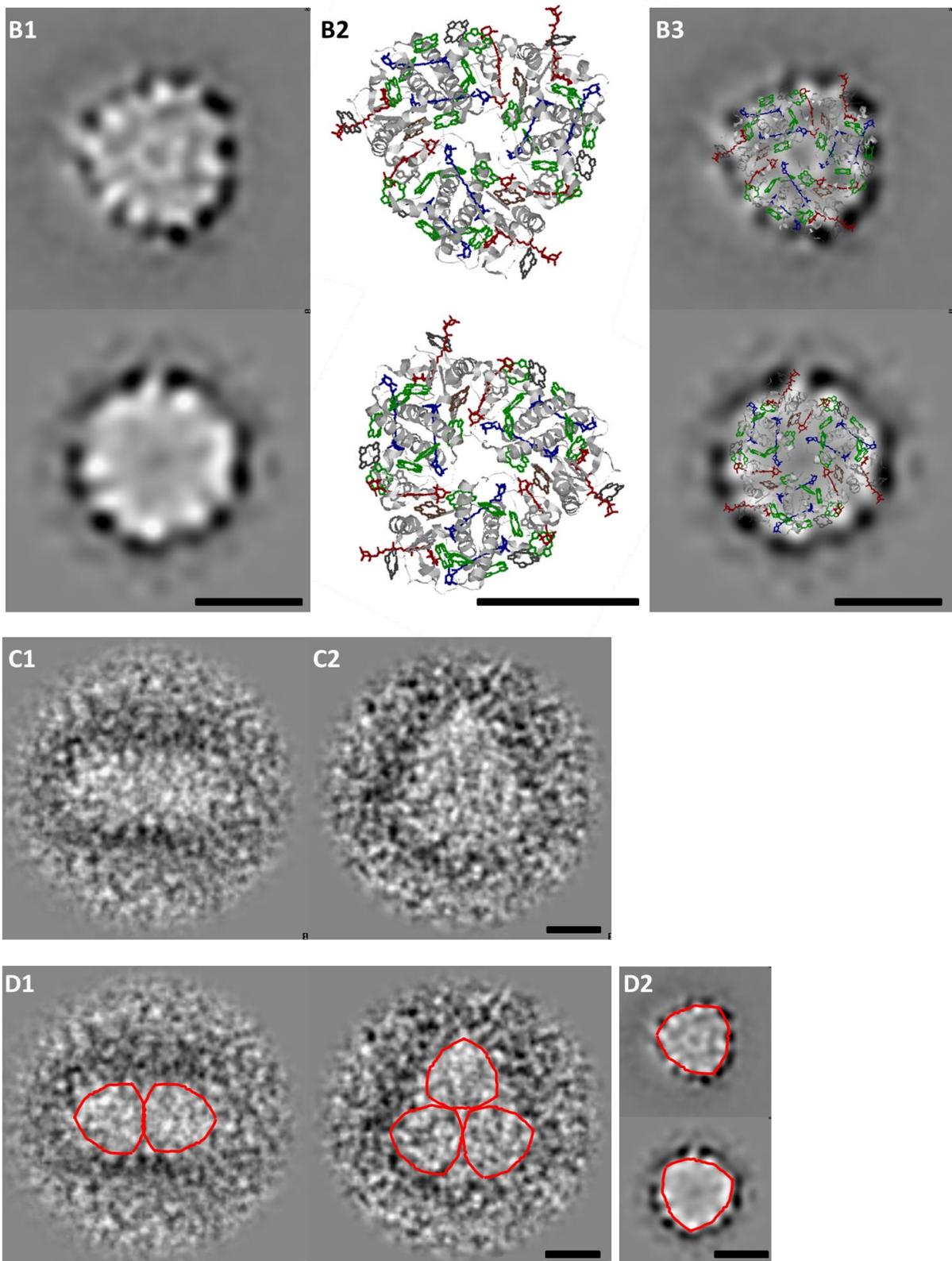


Abbildung 3.2-11: Aufsichten des FCPb nach Einzelpartikelanalyse. Schwarze Maßstäbe = 5 nm.

B1) Strukturen des FCPb Trimers nach Einzelpartikelanalyse, ggf. Ansichten von zwei Seiten. Oben: Summe aus 2661 Einzelbildern, unten: Summe aus 4344 Einzelbildern.

B2) Modell der Röntgenstruktur des LHCII-Trimers aus Spinat mit FCP-Pigmenten (von C. Büchel nach Premvardhan *et al.* (2010) [51] und Liu *et al.* (2004) [30], blau/rot: Fucoxanthin, grün/ grau/schwarz: Chl a, braun: Chl c).

B3) Zur Veranschaulichung der strukturellen Ähnlichkeit angefertigte, maßstabsgerechte Kombination aus B1 und B2.

C1) Potentielle hexamere Struktur des FCPb mit einer Länge von ca. 14 nm, Summe aus 27 Bildern.

C2) Potentielle nonamere Struktur des FCPb mit einer Seitenlänge ca. 13 nm, Summe aus 8 Bildern.

D1 & D2) Schematische, maßstabsgerechte Übertragung der hier rot umrandeten Trimere (D2, Boxgröße 64x64 Pixel) auf die potentiellen Strukturen der höheren Oligomere (D1, Boxgröße 128x128).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung des Ketocarotinoide produzierenden *N. tabacum*

4.1.1 Bindung der Ketocarotinoide an die Lichtsammelproteine

Neben der Charakterisierung allgemeiner Auswirkungen der Ketocarotinoid-Produktion in *N. tabacum* auf die Thylakoidstruktur stellt sich vor allem die Frage, ob die Ketocarotinoide anstelle der nativen Carotinoide funktionell an die Lichtsammelproteine, insbesondere die Untereinheiten des Hauptantennenkomplexes LHCII, zu binden vermögen.

Bereits 1969 wurde in den Photosystemfraktionen des Cyanobakteriums *Anabaena variabilis* das sekundäre Carotinoid Echinenon gefunden [166]. 1992 folgte ein Bericht über am LHCI der Grünalge *Eremosphaera viridis* gebundene Ketocarotinoide, wobei hier insbesondere Canthaxanthin, in geringerem Maße aber auch Astaxanthin in zwei veresterten Formen und Echinenon detektiert werden konnten [167]. In *in vitro* Rekonstituierungsversuchen mit monomerem LHCII wurde gezeigt, dass Astaxanthin, im Gegensatz zu Canthaxanthin, vermutlich auf Grund einer OH-Gruppe am dritten C-Atom des Cyclohexanrings, mit einer zu Neoxanthin vergleichbaren Affinität an die LHCII-Proteine zu binden vermag [168]. Ob diese Bindung funktionell bezüglich der Energieweiterleitung war, kann anhand der veröffentlichten Daten nicht nachvollzogen werden.

Für die Assemblierung von LHCII-Monomeren ist nach den Erkenntnissen diverser *in vitro* Rekonstituierungsversuche neben den posttranslational in den Chloroplasten importierten Apoproteinen die Verfügbarkeit der an diese Lichtsammelproteine bindenden Pigmente unerlässlich [35], [36], [169]. Da jedoch auch gezeigt wurde, dass die Carotinoidbindestellen im LHCII nicht nur spezifisch mit einem Pigment interagieren [32] und in Anbetracht der o.g. Lhc-Rekonstituierung mit Astaxanthin stellt sich die Frage nach der Austauschbarkeit der nativen Pigmente gegen die in der bkt-Linie erzeugten Ketocarotinoide.

Eine Besonderheit bei der Besetzung der N1-Bindestelle im LHCII-Monomer ist, dass Neoxanthin in seiner 9-cis-Konformation gebunden wird, die Luteine und Violaxanthin an ihren Bindestellen hingegen alle in ihrer trans-Konformation [40]. Diese Bindestelle scheint eine cis-Konformation unbedingt vorauszusetzen, da Violaxanthin in Neoxanthin-Deletionsmutanten von *A. thaliana* in cis-Konformation umgewandelt wurde und in diesem Zustand an N1 binden konnte [170]. Für Astaxanthin konnten in *Haematococcus lacustris in*

vivo vorkommende *cis*-Isomere gezeigt werden, darunter auch die 9-*cis*-Konformation [171]. Obwohl nicht aufgeklärt ist, welche Konformation die Ketocarotinoide in der hier untersuchten Pflanze aufweisen, unterstützen die oben zusammengefassten Erkenntnisse das *in vitro* schon gezeigte Potential des Astaxanthins, auch *in vivo* an den LHCII binden zu können.

Neben Neoxanthin werden auch die meisten Chl b Moleküle in der Peripherie von Helix C eines LHCII-Monomers gebunden [30]. Die An- bzw. Abwesenheit von Neoxanthin verursacht dabei eine leichte Veränderung in der räumlichen Ausrichtung der Chlorophyll b Moleküle, ohne jedoch den Energietransfer von Chl b auf Chl a zu beeinträchtigen [33]. Die Bindung von Neoxanthin an Helix C wird stabilisiert über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem epoxidierten Cyclohexanring des Xanthophylls und einem Tyrosin-Rest der Helix, wobei die 3-OH-Gruppe von besonderer Bedeutung zu sein scheint [168]. Sofern Astaxanthin im vorliegenden Fall an die Neoxanthin-Bindestelle N1 bindet, könnte es mit seiner im Vgl. zu Neoxanthin auf Grund der beiden Keto-Gruppen etwas verringerten Polarität zu einer leichten Beeinträchtigung der Konformationen der umliegenden Chl b Moleküle führen, so dass eine optimale Energieweiterleitung von angeregtem Chl b auf Chl a nicht mehr möglich ist und die überschüssige Energie daher in Form der beobachteten Chl b Fluoreszenz abgegeben werden muss.

Wenngleich also nicht ausgeschlossen werden kann, dass Astaxanthin an die Lichtsammelproteine zu binden vermag, muss mit Blick auf den Vergleich von Absorptions- zu Anregungsspektren (Abb. 3.1-7, 3.1-8) jedoch betont werden, dass es in keinem Fall eine funktionelle, der Energieübertragung auf Chl a dienende Bindung zu sein scheint.

In Hinblick auf eine spezifische Assoziation des Astaxanthins mit dem LHCII sei erwähnt, dass in der BN-PAGE, neben den hier verstärkt auftretenden LHCII-Monomeren, keine den Ketocarotinoiden entsprechende, rötliche Färbung auf dem Gel festgestellt werden konnte, die in Folge einer schwachen, unspezifischen Bindung abgelöstes Pigment repräsentieren könnte (Abb. 3.1-6B).

4.1.2 Auswirkung der Ketocarotinoide auf die LHCII-Trimerisierung

Die Anwesenheit von Neoxanthin wurde als nicht essentiell für den stabilen Aufbau der LHCII-Monomere beschrieben [32], [172]. Es wurde aber für die LHCII-Trimere ein höherer Neoxanthingehalt, bzw. eine größere Affinität des Neoxanthins zu Trimeren als zu den

Monomeren nachgewiesen [116], [168]. Neoxanthin könnte also neben dem N-terminalen Proteinbindemotiv WYGPDR und dem Membranlipid Phosphatidylglycerin durchaus auch eine Rolle für die Stabilität der Trimere spielen und auf Grund seiner in der Peripherie gelagerten, etwas aus dem Komplex in die Thylakoidmembran ragenden Struktur die Bindung an andere Photosynthese-Proteine vermitteln [40], [41], [44], [45]. Anhand der *lut1* und *lut2* Mutanten von *A. thaliana* wurde zudem gezeigt, dass Lutein für eine stabile Trimerisierung des LHCII essentiell ist [173].

Insbesondere Neoxanthin fehlte in der hier untersuchten bkt-Linie völlig und die Menge an Lutein pro Chl a war um etwa die Hälfte reduziert (Tab. 3.1-4B), so dass vor dem o.g. Hintergrund wissenschaftlicher Erkenntnisse (Stabilisierung der LHCII-Trimere) eine entsprechende Reduktion des trimeren LHCII-Komplexes zu erwarten war. Die LHCII-Trimer-Fraktion im Saccharosedichtegradienten für die bkt-Linie schien auch deutlich weniger ausgeprägt als im Wildtyp, obwohl das Chl a/b Verhältnis in beiden Organismen identisch war. Der direkte Vergleich der LHCII-Fraktionen durch eine Blue Native PAGE zeigte zudem eine etwas größere Instabilität der aus der bkt-Linie isolierten Trimere (Abb. 3.1-6B). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass zwar in WT und bkt-Linie in gleichem Maße LHCII-Monomere pro Photosystem gebildet werden, in der bkt-Linie jedoch nicht allesamt zu Trimeren assemblieren bzw. die Bindung zwischen den Monomeren innerhalb eines Komplexes geschwächt sein könnte.

Bereits für die Thylakoide und in der Folge auch für die daraus isolierten, vollständig assemblierten LHCII-Trimere zeigte sich eine geringe Chl b - Emission nach Anregung im Absorptionsmaximum von Chl b als Indikator für eine leicht beeinträchtigte Energieübertragung zu Chl a (3.1-8D).

Als Folge der beeinträchtigten LHCII-Trimerisierung ist das deutlich reduzierte NPQ-Level in der bkt-Linie zu benennen (Abb. 3.1-2), das trotz des nur leicht verringerten Violaxanthin/Chl a - Gehalts als essentiellen Bestandteil der pH-abhängigen Energielöschung die postulierte Notwendigkeit der Aggregation intakter LHCII-Trimere zur Bildung der für das NPQ benötigten Ausbildung sogenannter „Quenching“-Zentren unterstützt [40], [125]. Von der Forschergruppe um R. Bassi wurde postuliert, dass der Zerfall des LHCII-CP24-CP29-Verbunds (siehe vergleichend auch Abb. 1.2-2) im PSII-LHCII-Superkomplex unter Starklichtbedingungen maßgeblich an der Ausbildung des NPQ beteiligt ist [124]: mit steigendem Anteil dissoziierter minorer und LHCII-Antennenproteine steigt auch das NPQ.

In der vorliegenden Arbeit wurden die hier über Saccharosegradienten aufgetrennten Thylakoide zuvor nicht mit Starklicht behandelt, zeigten in der bkt-Linie jedoch zum einen das Fehlen der PSII-LHCII-Superkomplexe und zum anderen wurde kaum NPQ ausgebildet (Abb. 3.1.6A, Abschnitt 3.1.2.1). Es wäre für zukünftige Arbeiten noch eine mögliche Fragestellung, ob sich in Abhängigkeit von in Starklicht- und Normallicht-behandelten Blättern Unterschiede in der Fraktionszusammensetzung von den entsprechend belichteten, über Saccharosedichtegradienten aufgetrennten Thylakoiden zeigen, die ggf. mit Veränderungen im NPQ-Level korrelieren. Ob dies letztendlich zu einem weiteren Erkenntnisgewinn hinsichtlich der zu Grunde liegenden NPQ-Mechanismen beiträgt, kann derzeit nicht mit Sicherheit gesagt werden. Dies ist nicht zuletzt auch in der fehlenden Klarheit darüber begründet, ob die hier bereits im Normallicht beobachtete Dissoziation der PSII-LHCII-Superkomplexe bereits *in vivo* vorlag oder durch die strukturell beeinträchtigten Thylakoide der bkt-Linie erst präparationsbedingt erfolgte.

4.1.3 Auswirkung der Ketocarotinoide auf die PSII-LHCII-Superkomplex-Assemblierung

Die hier untersuchte bkt-Linie zeichnete sich bei den SDG durch das Fehlen von PSII-LHCII-Superkomplexen und einem höheren Anteil an dissoziierten PSII Dimeren aus (3.1-6A,B). Da Wildtyp- und bkt-Linien-Thylakoide unter gleichen Bedingungen solubilisiert worden sind, scheint der Zerfall der Superkomplexe in der bkt-Linie während der Auftrennung der Granathylakoide im Saccharosedichtegradienten (Abb. 3.1-6A) in einer gestörten Bindung der LHCII-Trimere über die minoren CP24, CP26 und CP29 an PSII begründet zu sein. Auch die minoren Antennenproteine binden Lutein, Viola- und (außer CP24 [174]) Neoxanthin, wengleich die Spezifität für die Art der Carotinoide an den entsprechenden Bindestellen hier schwächer ausgeprägt ist als im LHCII [37], [168], [175], [176]. Inwieweit die gebildeten Ketocarotinoide den Zusammenbau der Superkomplexe und das stabilere Zusammenlagern der PSII-Monomere durch zufälliges Anlagern innerhalb der Thylakoidmembran und ggf. einer damit verbundenen Veränderung der Membraneigenschaften oder durch Störung der Protein-Proteininteraktion durch spezifisches Anlagern an die Lhcs verhindern, bleibt aber offen. Die vergleichenden HPLC-Analysen von Blattmaterial und Thylakoiden zeigten jedoch, dass ein Großteil der gebildeten Ketocarotinoide in den isolierten Membranen verblieb. Der verbleibende Rest könnte in den bei der bkt-Linie etwas vergrößerten Plastoglobuli akkumuliert sein (Abb. 3.1-4). Zumindest Canthaxanthin kommt auf Grund der Abwesenheit

von C3-Hydroxyl-Gruppen am Cyclohexanring für eine Bindung an den LHCI1 nicht in Frage [168] und die den nativen Stöchiometrien funktionell eingebauter Carotinoide leicht übersteigende Menge an Ketocarotinoiden in der bkt-Linie spricht für eher willkürliche Wechselwirkungen der hydrophoben Kohlenstoff-Ketten der Carotinoide mit den hydrophoben Thylakoidmembranen, so dass es hier durchaus zur Verhinderung der Superkomplex-Assemblierung und einer größeren Instabilität des PSII-Dimers kommen könnte.

4.1.4 Funktionelle Auswirkungen der Ketocarotinoide auf den Photosyntheseapparat

Die Grünalge *Haematococcus* ist einer der wenigen Organismen, die unter Stressbedingungen relativ hohe Mengen an Astaxanthin synthetisieren können. Stressbedingungen können Nährstoffveränderungen [177]-[179] und/oder einfallendes Starklicht sein, in deren Folge unter anderem eine reduzierte Photosyntheserate, ein flacherer OJIP-Kurvenverlauf und damit einhergehend ein verringertes F_v/F_m auftreten [180]-[183]. Die Bildung der Ketocarotinoide war dabei entweder durch Nährstoffmangel [180] und/oder Starklicht [181]-[183] und/oder der Umwandlung der Algenzellen in ihre Ruheformen, die sogenannten Aplanosporen [180], [181], [183], verbunden, so dass die o.g. Effekte nicht zwangsläufig auf die hier verwendete bkt-Linie von *N. tabacum* Var. Xanthi übertragbar sein müssen. Sie zeigen aber Veränderungen in der Photosynthese, die auch hier beobachtet wurden (Abb. 3.1-2, 3.1-3) und deren Ursachen in der Folge näher diskutiert werden.

In *Haematococcus* wird den sekundären Carotinoiden durch Ansammlung im Cytoplasma ein sogenannter „Abschirmungseffekt“ vor überschüssiger Lichtenergie zugesprochen [182], [184], der auch hier Ursache für die verringerte *in vivo* Fluoreszenz (Abb. 3.1-3) sein könnte. Es gilt jedoch zu beachten, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ketocarotinoide mehrheitlich direkt an oder in der Thylakoidmembran gelagert sind (Tab. 3.1-4) und ein Einbau in die Lichtsammelkomplexe [167], [168] nicht ausgeschlossen werden kann. Insbesondere in der LHCI1-Fraktion ist eine deutliche Reduktion der Chlorophyll a - Fluoreszenz in der bkt-Linie nach Anregung von Chl b bei gleichem Chlorophyll a - Gehalt wie im WT (Abb. 3.1-8C,D) zu erkennen. Diese wird sicherlich zum Teil durch die leichte Chlorophyll b - Emission dem damit verbundenen, unvollständigen Energietransfer von Chl b auf a verursacht. Da die Chlorophyll b-Emission hier jedoch sehr gering ausfällt, liegt es

durchaus im Rahmen des Möglichen, dass durch den Ketocarotinoid-Anteil in der bkt-Linien-Probe von vornherein eine geringere Menge des eingestrahnten Lichts an den akzessorischen Pigmenten des LHCs ankommt, so dass hier generell weniger Energie übertragen werden kann. Ein weiterer Grund für die reduzierte Chl a - Fluoreszenz könnte aber auch die direkte Singulett-Singulett-Energieübertragung von Chlorophyll a auf Astaxanthin sein, sofern Astaxanthin funktionell in den LHCI eingebaut werden würde und sofern der S_1 -Zustand des Astaxanthins unter dem Q_Y -Level des Chlorophylls liegt und eine entsprechende räumliche Anordnung der Pigmente selbiges gewährleistet. Das Energielevel-Schema für Astaxanthin wurde bereits untersucht und die Geschwindigkeiten der Umwandlung angeregten Astaxanthins ($S_2 \rightarrow S_1$) zurück in dessen Grundzustand ($S_1 \rightarrow S_0$) in diesem Zusammenhang bestimmt, jedoch leider nicht in Bezug zum Chlorophyll [185]. Vergleichende Femtosekundspektroskopie könnte hier mehr Aufschluss über die Lage des S_1 - bzw. Q_Y -Levels von Astaxanthin bzw. Chlorophyll geben.

Die Rohdaten der Anregungsspektren zeigen über den gesamten Messbereich eine deutlich niedrigere Chlorophyll a - Fluoreszenz, insbesondere in der LHCI-Fraktion der bkt-Linie (Inset in Abb. 3.1-8B), die sowohl für eine abschirmende Wirkung des Astaxanthins als auch für eine mögliche S_1 - S_1 -Energieübertragung von Chlorophyll a auf Astaxanthin sprechen können. Das verringerte F_v/F_m - Verhältnis in der bkt-Linie (Tab. 3.1-1) deutet jedoch auf zusätzliche Beeinträchtigungen im PSII hin, da selbst bei einem Abfangen bzw. des S_1 -Transfers eines Teils der eingestrahnten Lichtenergie durch bzw. auf Astaxanthin das Verhältnis aus Grundfluoreszenz und Maximalfluoreszenz in WT und bkt-Linie gleich bleiben sollte. Entsprechend müssten die nicht normierten OJIP-Kurven (Abb. 3.1-3A) der bkt-Linie dann zwar unterhalb der Fluoreszenz des WT, aber in jedem Fall parallel zur Kontrolle verlaufen. Sie flachen jedoch deutlich ab. Eine direkte fluoreszenzlöschende Wirkung der Ketocarotinoide als Ursache für die angeflachte OJIP-Kurve inkl. des im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduzierten F_m setzt die direkte Nähe der Ketocarotinoide zum Reaktionszentrum voraus, die *in vivo* so bisher nur von Echinenon im Cyanobakterium *Anabaena* beschrieben wurde [166]. Die in 4.1-4 beschriebene Lockerung der PSII-LHCI-Strukturen in der bkt-Linie könnte eine unspezifische Anlagerung der Ketocarotinoide und damit eine solche Fluoreszenzlöschung zumindest theoretisch ermöglichen.

Die Ketocarotinoide produzierende bkt-Linie weist in den OJIP Kurven zusätzlich zu den o.g. Beeinträchtigungen in der Energieweiterleitung von Chl b auf Chl a im Lichtsammelkomplex

auch eine Störung des Elektronenflusses im PSII auf (Abb. 3.1-3B). Diese ist bei Weitem nicht so stark ausgeprägt, wie der für die Blockade des Elektronenabflusses von Q_A auf Q_B durch Zugabe des Phenylharnstoffderivats DCMU (3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff) beobachtete, exponentielle Fluoreszenzanstieg [186], weist jedoch auf einen leichten Elektronenstau vor dem Akzeptorchinon B (Q_B) und damit auf dessen im Vergleich zum WT länger andauernden Reduktionszustand hin [186], [187]. Mögliche Ursache hierfür wäre eine leicht beeinträchtigte Mobilität des dissoziationsfähigen, doppelt reduzierten Q_B oder dessen entsprechendem, oxidierten Ersatz-Chinon aus dem mobilen Plastochinonpool durch eine Verringerung der Membranfluidität, verursacht durch die eingelagerten Ketocarotinoide. Solch ein Einfluss der Xanthophylle auf Lipiddoppelmembranen wurde als positiv für die Thermostabilität und die antioxidante Wirkung in Hinblick auf Lipidperoxidation beschrieben [188], [189]. Insbesondere letzteres konnte auch hier im Falle einer stärkeren Radikalreduktion durch die ketocarotinoidhaltigen Thylakoide beobachtet werden (Abb. 3.1-10). Die Verringerung der Membranfluidität könnte in dem hier erzeugten, künstlichen System jedoch auch zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Photosynthesekomplexe und ihrer oben beschriebenen Assemblierungsproblematik führen.

4.1.5 Auswirkungen der Ketocarotinoidproduktion auf die Thylakoidstruktur

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Chloroplasten aus *bkt*-Linie und Wildtyp haben gezeigt, dass die Stapelung der Granathylakoide in der *bkt*-Linie deutlich beeinträchtigt ist (Abb. 3.1-5). Es sind zwar durchaus Granastapel zu erkennen, daneben existieren jedoch, verglichen mit dem Wildtyp, ausgesprochen weite Bereiche vereinzelter, ungeordneter Thylakoidmembranen.

In ersten *in vitro* Experimenten zu den Ursachen für die Stapelung der Thylakoidmembranen konnte nachgewiesen werden, dass die Granastapel sowohl durch die Abwesenheit von einfachen und zweifachen Kationen wie KCl und $MgCl_2$ als auch durch einen negativen Anstieg der Nettoladung der Granathylakoidmembran abnehmen [190]-[192]. Neben der damit verbundenen Bedeutung der van der Waals - Kräfte für die Interaktion zweier Membranen, ergänzte später vor allem die Erkenntnis um die Rolle des LHCII das Bild der Ursachen für die Granastapelung in Chlorophyll a/b-haltigen Organismen: So konnte für eine Gersten-Mutante mit verringertem Chl b Gehalt ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringeres Ausmaß der Granastapel gezeigt werden [193]. Als mögliche Ursache der LHCII

vermittelten Adhäsion zweier Thylakoidmembranen wurden hierfür hydrophobe Interaktionen gegenüberliegender LHCII-Proteine postuliert [194]. Dieses Modell der LHCII-Interaktion konnte durch die Analyse von LHCII-Molekülen im 2D-Kristallgitter präzisiert werden: die positiv geladene Peptidsequenz am N-Terminus eines LHCII interagiert „klettverschlussartig“ mit der negativ geladenen Oberfläche des gegenüberliegenden Komplexes [47]. Insbesondere die trimere Struktur dieses aus den Untereinheiten lhcb1, lhcb2 und lhcb3 bestehenden Lichtsammelkomplexes ist dabei von besonderer Bedeutung. So konnte zwar für lhcb1/lhcb2-Antisense-Mutanten von *A. thaliana* trotz fehlenden LHCII-Trimers die gleiche Art Granastapel wie im WT beobachtet werden [195], Ursache dafür war jedoch die Entstehung eines LHC-Trimers aus lhcb3 und dem eigentlich monomeren, minoren Lichtsammelprotein CP26 [196]. Neueste Experimente in *A. thaliana* erweitern das Bild der für die Thylakoidstapelung notwendigen Faktoren um das Protein CURT1, das für die Krümmung der Thylakoide am Rand der Grana verantwortlich zu sein scheint und damit die Stapelbildung *per se* erst möglich macht [197].

Vor dem Hintergrund dieses Wissens über die Ursachen für die Entstehung der Granastapel in höheren Pflanzen stellt sich die Frage, weshalb die Ketocarotinoide produzierende Tabak-bkt-Linie im Vergleich zum Wildtyp in der vorliegenden Arbeit deutlich lockerere Thylakoidstapel aufweist. Da es sich hier um Blattquerschnitte von auf gleichem Substrat gewachsenen Pflanzen handelt, liegen die Reduktion des LHCII-Gehalts und/oder eine beeinträchtigte Assemblierung des LHCII als mögliche Ursachen für das verringerte Maß an Granastapeln nahe. Ein Indiz für die Verringerung der LHCII-Menge stellt die verringerte Grundfluoreszenz F_0 in den direkt am Blatt durchgeführten Mini-PAM- bzw. PEA-Messungen dar (Tab. 3.1-1, Abb. 3.1-3A). Die HPLC-Analysen zeigten zudem eine deutliche Reduktion von Chl a und b pro Trockengewicht in der bkt-Linie (mit ca. 31,9 nmol im Vgl. zu ca. 57,4 nmol beim WT), das Verhältnis von Chl a zu Chl b unterschied sich jedoch mit einem Wert von jeweils 3,2 bei bkt-Linie und Wildtyp nicht (Tab. 3.1-4). Stattdessen konnte bei der bkt-Linie neben der Verringerung des Gesamtchlorophyllgehalts pro Blattfläche eine deutliche Verringerung aller detektierbaren Pigmente pro Trockengewicht gegenüber dem Wildtyp ermittelt werden (Tab. 3.1-4A).

Damit deutet auch die hier beobachtete Stapelungsproblematik bei den Thylakoiden der bkt-Linie auf eine *in vivo* bereits beeinträchtigte LHCII-Assemblierung hin, da im Falle intakter LHCII-Trimere nach den oben beschriebenen Erkenntnissen die Stapelung der

Granathylakoide nicht sonderlich beeinträchtigt sein sollte. In Anbetracht der o.g. gleichen Chl a/b Ratio für WT und bkt-Linie, sprich: der vergleichbaren Menge an LHC pro Photosystem, sollte sie wegen des insgesamt reduzierten Pigmentgehalts und den damit korrelierenden Photosystemproteinen lediglich kleiner, aber doch mit geordneter Struktur ausfallen.

Die hier dargestellte, gestörte Granathylakoidstapelung, die verringerte Trimerisierung des LHCII und auch die Chl b - Emissionen der bkt-Linie sind Indikatoren für eine mögliche Assoziation des Astaxanthins an die Lichtsammelproteine. Ob Astaxanthin tatsächlich in den LHCII eingebaut wird, bleibt aber letztendlich offen. Sicher ist, dass es selbst im Falle einer Bindung an die N1-Bindestellen der monomeren LHCII-Untereinheiten in funktionieller Hinsicht nicht der Energieübertragung auf Chlorophyll a dient.

4.2 Der Lichtsammelkomplex FCPb aus *C. meneghiniana*

4.2.1 Größe und Stabilität der Lichtsammelkomplexe FCPa und FCPb

Die Größe und Stabilität der beiden Lichtsammelkomplexe in *Cyclotella meneghiniana* wurde in Hinblick auf die spätere Analyse der FCPb-Struktur durch drei verschiedene Systeme näher untersucht: Einerseits über Größenausschlusschromatographie, andererseits über Gelelektrophoresen und Transmissionselektronenmikroskopie.

Es stehen sich dabei, abhängig von der verwendeten Methode, unterschiedliche Erkenntnisse in Hinblick auf die Größe von FCPa und FCPb gegenüber.

In der Größenausschlusschromatographie (Abb. 3.2-6A, 3.2-7) und den Aufnahmen der Seitenansichten des FCPb (Abb. 3.2-10) erwies sich dieser als größer als das LHCII-Trimer aus *N. tabacum*, was auf das bereits postulierte höhere Oligomer hinweist [198].

In den nativen Gelelektrophoresen (Abb. 3.2-8B-D) und den Aufsichten des FCPb (Abb. 3.2-9, 3.2-11) zeigte dieser sich geringfügig kleiner als das LHCII-Trimer, was auf Grund seiner im Verhältnis zum LHCII etwas kürzeren Aminosäuresequenz der Monomere [54], [19] und der Pigmentstöchiometrie [51] einer trimeren Form entsprechen würde.

Der in Büchel, 2003 [198] als Trimer postulierte FCPa lief in der BN (Abb. 3.2-8C) auf Höhe des LHCII-Monomers und war in seiner trimeren Form auch im TEM wesentlich weniger häufig zu beobachten als der FCPb bzw. der LHCII.

Maßgeblicher Unterschied zwischen diesen beiden konträren Ergebnissen hinsichtlich der Größe des FCPb ist, je nach Methode, das Fehlen bzw. Vorhandensein elektrischer Ladungen. In der Gelelektrophorese und bei Verwendung von mit negativer Ladung versehener Kohlefilme für die Einzelpartikelanalyse im TEM findet sich nur das Trimer des FCPb, wohingegen in ladungsfreien Systemen wie der Gelfiltration und bei Verwendung ungeladener Kohlefilme für die Einzelpartikelanalyse im TEM höhere Oligomere des FCPb erkennbar sind. Die Assemblierung der höheren Oligomere ist scheinbar anfälliger gegenüber des Einflusses elektrischer Ladungen, ebenso wie die Trimerisierung des FCPa-Heterotrimers aus fcp2 und fcp6 sensitiver gegenüber dieser Methoden zu sein scheint und dadurch monomerisiert.

Für *Thalassiosira pseudonana* wurden mit dem gleichen Gelsystem, das in der vorliegenden Arbeit für die Auftrennung von *C. meneghiniana* Thylakoiden verwendet wurde, und anschließender Massenspektrometrie Oligo- bzw. Trimere für FCPb bzw. FCPa publiziert

[199]. Das Laufverhalten dieser Komplexe unterscheidet sich jedoch im direkten Vergleich der Komplexauftrennung im Gelsystem nicht von dem der hier als Tri- bzw. Monomere betrachteten FCPb bzw. FCPa-Komplexe aus *C. meneghiniana* (Abb. 3.2-8B-D).

In der nativen Gelelektrophorese könnte eine unterschiedlich hohe Anzahl von gebundenen Molekülen des Farbstoffs Coomassie-Blau an die FCPs und den LHCII einen Einfluss auf das Laufverhalten der Komplexe haben, so dass sich eventuelle oligomere Formen der FCPs durch mehr gebundenes Coomassie schneller im Gel bewegen als das LHCII Trimer. Der negativ geladene Farbstoff Coomassie-Blau lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren (AS), wodurch jede AS auf Grund ihrer Aminogruppe als Bindepartner in Frage kommen kann [156]. Die Zahl der basischen AS im Fcp5 beläuft sich auf 20, im LHCII auf ca. 22 pro Monomer. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine höhere Affinität des Coomassies zum FCPb dessen Laufgeschwindigkeit derartig beeinflusst. Es wird daher an dieser Stelle angenommen, dass es sich bei den in Abb. 3.2-8B-D gezeigten FCPs nicht um ladungsbedingt im Vgl. zum LHCII ein anderes Laufverhalten aufweisende Oligo- bzw. Trimere für FCPb bzw. FCPa handelt, sondern um den trimeren Zustand des FCPb und die entsprechenden Monomere des FCPa.

Bezüglich der Sensitivität der Komplexe in Hinblick auf elektrische Felder wurden zur Überprüfung der Stabilität der höheren Oligomere des FCPb andere Stressoren an den Proben getestet. Bedingungen wie Gefrier-Tau-Verfahren, Hochsalz- oder De- und Rehydratationsstress beeinflussen den Assemblierungszustand der FCPs hingegen nicht (Abb. 3.2-5). Erst harschere Solubilisierungsbedingungen erbrachten letztendlich eine sichere Zuordnung der Elutionsmaxima in Bezug auf die Komplexgröße (Abb. 3.2-6A). Die starke Solubilisierung der Komplexe mit 100 mM β -DDM führt zu drei Elutionsmaxima für FCPb und den beiden damit korrelierenden Maxima für FCPa. Da die zugehörigen Absorptionsspektren hier Verschiebungen der Fucoxanthin-Absorptionen in den blauwelligen Bereich zeigen und die Fluoreszenzspektren die gestörte Energieweiterleitung von Chlorophyll c auf Chlorophyll a verdeutlichen, ist eine völlige Zerstörung der Pigment-Proteinbindungen nicht auszuschließen (Abb. 3.2-6B1,C1). Damit wäre SEC-Maximum III als Monomer für FCPa bzw. FCPb anzuzweifeln. Da jedoch die etwas mildere Solubilisierung mit 20 mM β -DDM eine Schulter auf Höhe des zuvor genannten Maximums zeigt, deren Absorptions- bzw.

Fluoreszenzspektrum deutlich stärker von der Intaktheit der Pigmentproteinbindung zeugt, wird dieses Maximum als das jeweilige FCP Monomer angenommen.

Damit entspräche das SEC Maximum II des FCPb entweder einem Di- oder Trimer, da dessen Elution zum einen vor dem des LHCII-Trimers erfolgte (Abb. 3.2-7) und sie zum anderen auf Höhe des ersten Maximums von FCPa liegt. Da im TEM für dieses FCPa Maximum Trimere gefunden worden sind (Abb. 9, rechts) und die FCP Trimere auf Grund ihrer kürzeren Aminosäuresequenz und Pigmentzusammensetzung mit einer Größe von ca. 100 kDa etwas kleiner sind, als der strukturell ähnliche Komplex des LHCII-Trimers aus höheren Pflanzen (ca. 125 kDa), wird SEC Elutionsmaximum II als FCP-Trimer angenommen.

Demnach bleibt für das erste Elutionsmaximum von FCPb nur die Annahme, dass es sich hierbei um die bereits vermuteten höheren Oligomere handelt [55], wobei anhand der hier gezeigten SEC-Analysen offen weiterhin bleibt, ob Hexa- oder Nonamere vorliegen.

4.2.2 Struktur des FCPb Oligomers

Um eine präparationsbedingte Lockerung der Proteinuntereinheiten und den damit möglichen schnelleren Zerfall des Oligomers zu vermeiden, wurden die FCPb-Proben für die Einzelpartikelanalyse direkt aus dem SDG entnommen, da das Verkürzen der Reinigungsschritte durch direkte Verwendung des FCPb aus den SDG spektroskopisch keinen signifikanten Unterschied zu der zusätzlich über die SEC gereinigten Fraktion zeigte (Abb. 3.2-6B). Die Verwendung von ungeladenen Kohlefilmen als Träger der Proteinlösung bei der Analyse im Transmissionselektronenmikroskop ermöglichte das Vermessen von Seitenansichten des FCPb, deren Längen zu 25% im Bereich von ca. 14 +/- 0,6 nm akkumulieren (Abb. 3.2-10A). Seitenansichten tragen zunächst einmal nichts zu Überblicksaufnahmen in Hinblick auf die Anordnung der FCPb-Untereinheiten bei, sie stellen aber einen Indikator für den hier stattgefundenen Zerfall potentieller Oligomere in trimere Untereinheiten dar, denn die Verwendung von negativ geladenem Kohlefilm für die entsprechende Aufsichtorientierung der Proteine, zeigte ausgesprochen homogene, deutlich kleinere Partikel mit einem Durchmesser von 6,5 nm +/- 0,5 nm, also etwa der Hälfte der o.g. Seitenlängen.

Die Länge der in Abb. 3.2-11C1 gezeigten Hexamer-Aufsichten (Summe aus 27 Einzelbildern) beträgt ca. 14 nm, ihre Breite liegt im Bereich der in Abb. 3.2-9 gezeigten FCPb-Rohpartikel-Durchmesser von ca. 7-8 nm. In Anbetracht der Unschärfe auf Grund der wenigen

Partikelbilder, die aufsummiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich in Abb. 3.2-11C1 auch um Seitenansichten und nicht um eine hexamere Anordnung der FCPs handeln könnte.

Durch das Verwenden hydrophiler Kohlefilme als Trägermaterial für die Proteinlösung orientierten sich die FCPb-Komplexe in Aufsichtlage. Dies ermöglichte die Einzelpartikelanalyse des FCPb mit zwei Summenbildern, die die Vorder- und Rückseite des Komplexes darstellen könnten (Abb. 3.2-11B1).

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit ließ sich damit erstmalig die Struktur des FCPb-Trimers nachweisen (Abb. 3.2-1-B1). Diese Struktur entspricht der aus dem LHCII bekannten Anordnung der monomeren Untereinheiten [30], [47], wobei das FCPb-Trimer mit seinen leicht verkürzten Aminosäuresequenzen und einem Pigmentverhältnis von 4:4:1 (Chl a:Fucoxanthin:Chl c) mit 8 Fucoxanthin, 8 Chlorophyll a und 2 Chlorophyll c pro ca. 19 kDa großem FCP-Monomer [51] etwa 1/3 kleiner als der 9 nm große LHCII mit seinen ca. 8 Chl a, 6 Chl b und bis zu 4 Carotenoiden pro ca. 25-28 kDa großem Monomer [29], [30], [32], [33] aus der Einzelpartikelanalyse des PSII-LHCII-Superkomplexes aus *A. thaliana* ist ([27], persönliche Kommunikation mit E. Boekema). Damit konnte das 2003 von C. Büchel postulierte Modell für die Anordnung der FCPb-Trimere eindeutig bestätigt werden [55].

Die Größe FCP-artiger Lichtsammelkomplexe anderer Organismen beläuft sich auf durchschnittlich ca. 9 nm für *Petalonia fascia* (Braunalge, [200]) und ca. 7 nm für den Durchmesser eines Trimers von *Chromera velia* (Chromeraceae), das zu höheren Oligomeren assembliert und in seiner Struktur dem Trimer bzw. höheren Oligomer aus *Xanthonema debile* (Xanthophyceae) frappierend ähnelt [201], [202]. Für letzteres wurde eine Assemblierung von fünf Trimeren postuliert, wobei eine kritische Betrachtung der Größenverhältnisse (Trimer ca. 8x6,5 nm, Oligomer ca. 15x13 nm) und der Gesamtstruktur von Tri- und Oligomer bei *Chromera* und *Xanthonema* eher für eine tetramere Anordnung der Trimer-Untereinheiten zu sprechen scheint.

Nichts desto trotz spiegeln diese beiden Komplexe mit einer Länge von ungefähr 15 nm eine der beiden am häufigsten gemessenen Längen der nicht via Einzelpartikelanalyse aufsummierten Seitenansichten des FCPb aus *Cyclotella wicker* (Abb. 3.2-10A, ca. 14 nm). Durch die Aufsummierung der zur Analyse des Trimers verwendeten Einzelbilder wurde im

Zuge der Verbesserung der Auflösung die Unschärfe in der Partikelbegrenzung reduziert. So ist das Ergebnis dieses Prozesses (6-7 nm, Abb. 3.2-10-B1) durch den klarer definierten Randbereich etwas kleiner als die Rohpartikel (7-8 nm, Abb. 3.2-9). Die unverrechneten Seitenansichten des FCPb (Abb. 3.2-10-A) sind daher nicht direkt auf die Bildsumme des trimeren Komplexes übertragbar, geben jedoch gute Anhaltspunkte für die Größenbereiche, in denen sich dieser Komplex bewegen kann.

Erst kürzlich konnten anhand einer ungefärbten Variante der in dieser Arbeit und von Grouneva *et al.*, 2011 [199] verwendeten nativen Gelelektrophorese höhere Oligomere mit einer Größe von ca. 180 kDa in *Cyclotella meneghiniana* gezeigt werden [142]. Vor diesem Hintergrund und den hier dargelegten Erkenntnissen über die Strukturen für das FCPb-Trimer und potentielle höherer Oligomere (in Seiten- und Aufsicht), scheint die von C. Büchel, 2003 [55] postulierte und in Abb. 3.2-11-C2 bzw. -D1 gezeigte, nonamere Anordnung des FCPb mit einem sehr stabilen Trimer als kleinster Untereinheit sehr plausibel.

5 Zusammenfassung

Es ist wohl unumstritten, dass das Leben, wie wir es kennen, ohne die sauerstoffproduzierenden Organismen unserer Erde nicht möglich wäre. Zu ihnen gehören nicht nur die Landpflanzen, deren mannigfaltige Nutzung wichtiger Bestandteil unseres Alltags ist. Auch mikroskopisch kleine Algenarten leisten einen entscheidenden Beitrag zu den Stoffwechselkreisläufen dieser Welt. Unter ihnen befinden sich die Kieselalgen (Diatomeen), die mit einer Varietät von bis zu 10000 Spezies etwa 40 % der marinen Primärproduktion verantworten. Der Ursprung der heutigen zur oxygenen Photosynthese befähigten Eukaryoten geht auf Endosymbioseereignisse zurück, von denen aus sich diese Organismen ausgesprochen vielfältig entwickelt haben. Diese Vielfalt wird dabei nicht nur anhand ihrer äußeren Morphologie, sondern auch auf subzellulärer Ebene, deutlich. So zum Beispiel durch die unterschiedlichen Strukturen der Thyakoidmembranen, die sich in Kieselalgen wie *Cyclotella meneghiniana* in dreilagigen Bändern arrangieren. In Pflanzen wie *Nicotiana tabacum* (Tabak) hingegen bilden sie große, stapelartige Bereich aus, die zur räumlichen Separation der in den Thylakoiden eingebetteten Photosystemen beitragen. Auch die an die Photosysteme (PS) gebundenen Lichtsammelproteine (Lhcs) haben sich in Tabak und *Cyclotella* unterschiedlich entwickelt. Gemäß ihrem Namen zeichnen sie sich zwar allesamt durch die Sammlung und Weiterleitung der Lichtenergie an die Photosysteme aus, grenzen sich aber in Hinblick auf Proteingröße und Pigmentierung voneinander ab.

Die Lhcs der höheren Pflanzen werden entsprechend ihrer Zuordnung zu den Photosystemen in den aus zwei Heterodimeren bestehenden LHCI des PSI und die Lhcb-Antennenproteine des PSII unterschieden. Zu letzteren gehören der trimere Hauptantennenkomplex LHCI und die monomeren, minoren Antennenproteine. Die Lhcs binden die zur Lichtsammlung benötigten Pigmente, vor allem Chlorophyll a und Chlorophyll b, aber auch primäre Carotinoide wie Violaxanthin, Lutein und Neoxanthin, in unterschiedlichen Stöchiometrien. Es ist bereits bekannt, dass die Pigmentierung entscheidend zur Stabilität der Lichtsammelproteine beiträgt, wenngleich zum Teil auch eine gewisse Flexibilität in Bezug auf die Art der gebundenen Pigmente an den entsprechenden Bindestellen der Proteine besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Fragestellung inwieweit die in der Regel nicht in Pflanzen vorkommenden Ketocarotinoide die Struktur und Funktion des LHCI aus einer Ketocarotinoide produzierenden *N. tabacum* - Transformante (bkt-Linie) beeinflussen und welche Auswirkungen sie auf dessen Photosyntheseapparat im Allgemeinen haben. Die bkt-Linie bildet dabei zum Teil auf Kosten ihrer primären Carotinoide sowohl das als antioxidativ und als anti-kanzerogen beschriebene Astaxanthin, als auch dessen Vorstufe Canthaxanthin und einige Derivate dieser Pigmente, die, nach vergleichenden HPLC-Analysen von Blättern und Thylakoidfraktionen, zu einem

großen Teil mit der Thylakoidmembran assoziiert sind. Durch spektroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Ketocarotinoide in Hinblick auf die Energieweiterleitung zum Chlorophyll a nicht funktionell an den LHCII binden, ihre Produktion aber die Trimerisierung dieses Lichtsammelkomplexes in *N. tabacum* nachhaltig beeinträchtigt. Auch die Assemblierung der PSII-LHCII-Superkomplexe wird dadurch maßgeblich gestört. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten der bkt-Linie verdeutlichen zudem die Beeinträchtigung der Granathylakoid-Stapelung: Sie fällt ungeordneter aus als im Wildtyp, was durch den Mangel an intakten LHCII-Trimeren begründet sein kann.

In funktioneller Hinsicht stören die Ketocarotinoide die Energieweiterleitung innerhalb des PSII und bewirken die Reduktion der photoprotektorisches, nicht-photochemischen Fluoreszenzlöschung des Wirtsorganismus nachhaltig. Zeitgleich reduzieren sie durch einen abschirmenden Effekt auf Grund ihrer Assoziation mit der Thylakoidmembran und/oder durch einen eventuellen S_1 - S_1 -Energietransfer von Chl a auf die Ketocarotinoide aber auch die Menge der Lichtenergie, die über die Lhcs an die Photosysteme weitergeleitet wird. Dadurch kommt ihnen neben dem nachhaltig störenden Einfluss auf die Intaktheit des Photosyntheseapparats zugleich auch eine schützende Wirkung vor einem Übermaß an Lichtenergie zu.

Aus *Cyclotella meneghiniana* sind zwei Hauptantennenkomplexe bekannt: FCPa und FCPb. Im Gegensatz zu den Lhcs der Chl a/b-haltigen Organismen binden die Lichtsammelproteine der Diatomeen das Xanthophyll Fucoxanthin anstelle des Luteins, und Chlorophyll c anstelle des Chlorophyll b. Im Gegensatz zu der bereits sehr detailliert aufgeklärten Struktur des trimeren LHCII in höheren Pflanzen, existieren für den Aufbau des FCPb in *C. meneghiniana* bisher nur fundierte Modellvorschläge. Diese postulieren eine homotrimere Grundstruktur für den FCPb, die zu höheren Oligomeren assembliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen und der anschließenden Einzelpartikelanalyse nun erstmalig die Struktur des etwa 6-7 nm großen, trimeren FCPb gezeigt und die Richtigkeit der bisher postulierten Modellvorschläge in Hinblick auf die Struktur des Trimers bewiesen werden. Nach den hier dargelegten Erkenntnissen gleicht die Anordnung der Untereinheiten des FCPb-Trimers der des LHCII. Zudem ergibt sich aus dem Zusammenhang der hier erhobenen Daten und den in der Fachliteratur veröffentlichten Ergebnissen zum Thema FCPb ein klares Bild über die Anordnung der höheren Oligomere in Form von Nonameren. Auch diese Erkenntnisse unterstützen das ursprünglich von C. Büchel vorgeschlagene Modell für die oligomere Struktur des FCPb in *C. meneghiniana*.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* 5(9), 2043–2049.
- [2] Márton, L., Wullems, G. J., Molendijk, L., Schilperoort, R. A. (1979) In vitro transformation of cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277, 129–131.
- [3] Sela-Burlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van Den Elzen, P.J., Cornelissen, B.J. (1993) Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and β -1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiol.* 101(3), 857–863.
- [4] Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W., Sandermann, H. (1991) Biochemical plant responses to ozone. *Plant Physiol.* 95(3), 882–889.
- [5] Zhang, K., Letham, D. S., John, P. C. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* 200(1), 2–12.
- [6] Bhattacharya, D., Medlin, L. (1998) Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiol.* 116 (1), 9–15.
- [7] Falkowski, P. G., Katz, M. E., Knoll, A. H., Quigg, A., Raven, J. A., Schofield, O., Taylor, F. J. R. (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 305(5682), 354–360.
- [8] McFadden, G. I. (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J. Phycol.* 37(6), 951–959.
- [9] Norton, T. A., Melkonian, M., Andersen, R. A. (1996) Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308–326.
- [10] Falkowski, P. G., Barber, R. T., Smetacek, V. (1998) Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281, 200–207.
- [11] Falciatore, A., Bowler, C. (2002) Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 109–130.
- [12] Wilhelm, C., Büchel, C., Fisahn, J., Goss, R., Jakob, T., Laroche, J., Lavaud, J., Lohr, M., Riebesell, U., Stehfest, K., Valentin, K., Kroth, P.G. (2006) The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist* 157(2), 91–124.
- [13] Pysznik, A. M., Gibbs, S. P. (1992) Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophyll a/c light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Protoplasma*, 166(3-4), 208–217.
- [14] Cohen-Bazire, G., Pfennig, N., Kunisawa, R. (1964) The fine structure of green bacteria. *J. Cell Biol.* 22(1), 207–225.

- [15] Psencík, J., Ikonen, T. P., Laurinmäki, P., Merckel, M. C., Butcher, S. J., Serimaa, R. E., Tuma, R. (2004) Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. *Biophys. J.* 87(2), 1165–1172.
- [16] Koller, K. P., Wehrmeyer, W., Mörschel, E. (1978) Biliprotein assemble in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. On the molecular composition of energy-transferring complexes (tripartite units) forming the periphery of the phycobilisome. *Eur. J. Biochem.* 91(1), 57–63.
- [17] Arteni, A. A., Ajlani, G., Boekema, E. J. (2009) Structural organisation of phycobilisomes from *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and their interaction with the membrane. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1787(4), 272–279.
- [18] Jansson, S., Pichersky, E., Bassi, R. Green, B. R., Ikeuchi, M., Melis, A., Simpson, D. J., Spangfort, M., Staehelin, A. L., Thornber, J. P. (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b -binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10(3), 242–253.
- [19] Jansson, S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*/IT. *Trends Plant Sci.* 4(6), 236–240.
- [20] Montané, M. H., Kloppstech, K. (2000) The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene* 258(1-2), 1–8.
- [21] Green, B. R., Pichersky, E. and Kloppstech, K. (1991) Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* 16(5), 181–186.
- [22] Jansson, S. (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1184(1), 1–19.
- [23] van den Hartog, F. T. H., Dekker, J. P., van Grondelle, R., Völker, S. (1998) Spectral distributions of "trap" pigments in the RC, CP47, and CP47-RC complexes of photosystem II at low temperature: a fluorescence line-narrowing and hole-burning study. *J. Phys. Chem. B* 102, 11007–11016.
- [24] di Donato, M., van Grondelle, R., van Stokkum, I. H. M., Groot, M. L. (2007) Excitation energy transfer in the photosystem II core antenna complex CP43 studied by femtosecond visible/visible and visible/mid-infrared pump probe spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 111, 7345–7352.
- [25] Haworth, P., Watson J. L., Arntzen C. J. (1983) The detection, isolation and characterization of a light-harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 724(1), 151–158.
- [26] Bassi, R., Simpson, D. (1987) Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I. *Eur. J. Biochem.* 163(2), 221–230.
- [27] Caffarri, S., Kouril, R., Kereïche, S., Boekema, E. J., Croce, R. (2009) Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes. *EMBO J.* 28(9), 3052–3063.
- [28] Morosinotto, T., Bassi, R. (2011) Assembly of light harvesting pigment-protein complexes in photosynthetic eukaryotes. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Eaton-Rye and Govindjie eds. Springer, pp. 113–123.

- [29] Kühlbrandt, W., Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614–621.
- [30] Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428, 287–292.
- [31] Scholes, G. D., Fleming, G. R., Olaya-Castro, A., van Grondelle, R. (2011) Lessons from nature about solar light harvesting. *Nat Chem* 3, 763–774.
- [32] Croce, R., Weiss, S. and Bassi, R. (1999) Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* 274 (42), 29613–29623.
- [33] Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R. (1999) The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Letters* 456(1), 1–6.
- [34] Dall'Osto, L., Lico, C., Alric, J., Giuliano, G., Havaux, M., Bassi, R. (2006) Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection in vivo under strong light. *BMC Plant Biol.* 6(32).
- [35] Plumley, F. G., Schmidt, G. W. (1987) Reconstitution of chlorophyll a/b light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84(1), 146–150.
- [36] Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215(3), 809–816.
- [37] Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H. (2000) Carotenoid binding sites in LHCII – Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267(2), 616–624.
- [38] Hobe, S., Trostmann, I., Raunser, S., Paulsen, H. (2006) Assembly of the major light-harvesting chlorophyll-a/b complex: Thermodynamics and kinetics of neoxanthin binding. *J. Biol. Chem.* 281(35), 25156–25166.
- [39] Kühlbrandt, W., Wang, D.N. (1991) Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* 350, 130–134.
- [40] Barros, T., Kühlbrandt, W. (2009) Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex II. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1787(6), 753–772.
- [41] Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995) N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex. *Biochemistry* 34(32), 10224–10228.
- [42] Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., Jansson, S. (2006) Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiol.* 140(3), 793–804.
- [43] Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.* 242(2), 288–292.
- [44] Trémolières, A., Dubacq, J. P., Ambard-Bretteville, F., Remy, R. (1981) Lipid composition of chlorophyll-protein complexes: specific enrichment in trans-hexadecenoic acid of an oligomeric form of light-harvesting chlorophyll a/b protein. *FEBS Letters* 130(1), 27-31.

- [45] Nussberger, S., Dörr, K., Wang, D. N., Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* 234(2), 347–356.
- [46] Dekker, J. P., Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1706(1-2), 12–39.
- [47] Standfuss, J., van Terwisscha Scheltinga, A.C., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24(5), 919–928.
- [48] Allen, J. F., Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6(7), 317–326.
- [49] Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I., Andres, C., Kessler, F., Rochaix, J.-D., Vener, A.V., Goldschmidt-Clermont, M. (2010) The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(10), 4782–4787.
- [50] Galka, P., Santabarbara, S., Khuong, T. T. H., Degand, H., Morsomme, P., Jennings, R.C., Boekema, E.J., Caffarri, S. (2012) Functional analyses of the plant photosystem I-light-harvesting complex II supercomplex reveal that light-harvesting complex II loosely bound to photosystem II is a very efficient antenna for photosystem I in state II. *Plant Cell* 24(7), 2963–2978.
- [51] Premvardhan, L., Robert, B., Beer, A., Büchel, C. (2010) Pigment organization in fucoxanthin chlorophyll a/c(2) proteins (FCP) based on resonance Raman spectroscopy and sequence analysis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1797(9), 1647–1656.
- [52] Green, B. R., Pichersky, E. (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl a/b and Chl a/c light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynthesis Research*, 39(2), 149–162.
- [53] 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. *Mol. Gen. Genet.* 253, 377–386.
- [54] Eppard, M., Rhiel, E. (1998) The genes encoding light-harvesting subunits of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) constitute a complex and heterogeneous family. *Mol. Gen. Genet.* 260(4), 335–345.
- [55] Büchel, C. (2003) Fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: 18 and 19 kDa subunits assemble into different oligomeric states. *Biochemistry* 42(44), 13027–13034.
- [56] Veith, T., Büchel, C. (2007) The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1767(12), 1428–1435.
- [57] Veith, T., Brauns, J., Weisheit, W., Mittag, M., Büchel, C. (2009) Identification of a specific fucoxanthin-chlorophyll protein in the light harvesting complex of photosystem I in the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1787(7), 905–912.

- [58] Ikeda, Y., Yamagishi, A., Komura, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Shibata, Y., Itoh, S., Koike, H., Satoh, K. (2013) Two types of fucoxanthin-chlorophyll-binding proteins I tightly bound to the photosystem I core complex in marine centric diatoms. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1827(4), 529–539.
- [59] Beer, A., Gundermann, K., Beckmann, J., Büchel, C. (2006) Subunit Composition and Pigmentation of Fucoxanthin–Chlorophyll Proteins in Diatoms: Evidence for a Subunit Involved in Diadinoxanthin and Diatoxanthin Binding. *Biochemistry* 45(43), 13046–13053.
- [60] Oeltjen, A., Krumbein, W. E., Rhiel, E. (2002) Investigations on transcript sizes, steady state mRNA concentrations and diurnal expression of genes encoding fucoxanthin chlorophyll a/c light harvesting polypeptides in the centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Plant Biol.* 4(2), 250–257.
- [61] Förster, T. (1947). "Ein Beitrag zur Theorie der Photosynthese," *Z. Naturforsch.*, 2b, 174-182.
- [62] Laible, P. D., Knox, R. S., Owens, T. G. (1998) Detailed balance in Förster–Dexter excitation transfer and its application to photosynthesis. *J. Phys. Chem. B* 102(9), 1641–1648.
- [63] Wu, P., Brand, L. (1994) Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* 218(1), 1–13.
- [64] Dexter, D. L. (1953) A Theory of sensitized Luminescence in solids. *The Journal of Chemical Physics*, 21(5), 836–850.
- [65] Hill, R., Bendall, F. (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature* 186, 136–137.
- [66] Bouges-Bocquet, B. (1973) Electron transfer between the two photosystems in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 314(2), 250–256.
- [67] Velthuys, B. R., Amesz, J. (1974) Charge accumulation at the reducing side of system 2 of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 333(1), 85–94.
- [68] Velthuys, B. R. (1982). The function of plastoquinone in electron transfer. In: *Function of Quinones in Energy Conserving Systems*. B. L. Trumpower, Hrsg. Academic Press, San Diego. 401-408
- [69] Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303, 1831–1838.
- [70] Peloquin, J. M., Britt, R.D. (2001) EPR/ENDOR characterization of the physical and electronic structure of the OEC Mn cluster. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1503(1-2), 96–111.
- [71] Robblee, J. H., Messinger, J., Cinco, R. M., McFarlane, K. L., Fernandez, C., Pizarro, S. A., Sauer, K., Yachandra, V. K. (2002) The Mn cluster in the S(0) state of the oxygen-evolving complex of photosystem II studied by EXAFS spectroscopy: are there three Di-mu-oxo-bridged Mn(2) moieties in the tetranuclear Mn complex? *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7459–7471.
- [72] Hoganson, C. W. and Babcock, G. T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* 277, 1953–1956.

- [73] Vrettos, J. S., Limburg, J., Brudvig, G. W. (2001) Mechanism of photosynthetic water oxidation: combining biophysical studies of photosystem II with inorganic model chemistry. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1503(1-2), 229–245.
- [74] Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulikidjanian, A., Clausen, J. (2002) Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation. *Philos. Trans. R. Soc. London, B, Biol. Sci.* 357(1426), 1407–20.
- [75] Nelson, N., Neumann, J. (1972) Isolation of a cytochrome *b₆f* particle from chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 247, 1817–1824.
- [76] Hurt, E., Hauska, G. (1981) A cytochrome *f/b₆* complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 117(3), 591–595.
- [77] Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* 62(2), 327–367.
- [78] Trumpower, B. L. (1990) The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *J. Biol. Chem.* 265(20), 11409–11412.
- [79] Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 1005–1075.
- [80] Joliot, P., Joliot, A. (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(15), 10209–10214.
- [81] Brettel, K., Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1507(1-3), 100–114.
- [82] Arnon, D. I. (1959) Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature* 184, 10–21.
- [83] McCarty, R. E., Evron, Y., Johnson, E. A. (2000) The chloroplast ATP synthase: A Rotary Enzyme? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 83–109.
- [84] Junge, W. (1999) ATP synthase and other motor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(9), 4735–4737.
- [85] Calvin, M. (1956) The photosynthetic carbon cycle. *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 1895–1915.
- [86] Gouterman, M. (1961) Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectroscopy*, 6, 138–163.
- [87] Gouterman, M., Wagnière, G. H. (1963) Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectroscopy* 11 (1-6), 108–127.
- [88] Murata, N., Nishimura, M., Takamiya, A. (1966) Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. 3. Emission and action spectra of fluorescence--three emission bands of chlorophyll a and the energy transfer between two pigment systems. *Biochim. Biophys. Acta* 126(2), 234–243.
- [89] Boardman, N. K., Thorne, S. W. and Anderson, J. M. (1966) Fluorescence properties of particles obtained by digitonin fragmentation of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56(2), 586–593.
- [90] Powles, S. B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35(1), 15–44.
- [91] Demmig-Adams, B., Adams III, W. W. (1996) Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198(3), 460–470.

- [92] Demmig-Adams, B., Adams III, W. W., Barker, D. H., Logan, B.A., Bowling, D. R., Verhoeven, A. S. (1996) Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum* 98(2), 253–264.
- [93] Maxwell, K., Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668.
- [94] Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141(2), 391–396.
- [95] Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 224–233.
- [96] Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125(4), 1558–1566.
- [97] W. Schmidt (2000) *Optische Spektroskopie - Eine Einführung*. Wiley-VCH. Weinheim.
- [98] de Bianchi, S., Ballottari, M., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2010) Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy. *Biochem. Soc. Trans.* 38(2), 651–660.
- [99] Gilmore, A. M., Hazlett, T. L., Debrunner, P. G., Govindjee (1996) Comparative time-resolved photosystem II chlorophyll a fluorescence analyses reveal distinctive differences between photoinhibitory reaction center damage and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Photochem. Photobiol.* 64(3), 552–563.
- [100] Gilmore, A. M., Ball, M. C. (2000) Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(20), 11098–11101.
- [101] Schuster, G., Dewit, M., Staehelin, L. A., Ohad, I. (1986) Transient inactivation of the thylakoid photosystem II light-harvesting protein kinase system and concomitant changes in intramembrane particle size during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 103(1), 71–80.
- [102] Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U. M., Carlberg, I., Andersson, B., Aro, E. M. (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation in vivo. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* 272(48), 30476–30482.
- [103] Yamamoto, H.-Y. (1979) Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants. *Pure Appl. Chem.*, 51(3), 639-648.
- [104] Eskling, M., Arvidsson, P.-O., Akerlund, H.-E. (1997) The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 806–816.
- [105] Owens, T. G. (1986) Light-Harvesting Function in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum*: II. Distribution of Excitation Energy between the Photosystems. *Plant Physiol.* 80(3), 739–746.
- [106] Ting, C.S., Owens, T.G. (1994) The Effects of Excess Irradiance on Photosynthesis in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 106(2), 763–770.
- [107] Lohr, M., Wilhelm, C. (1999) Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(15), 8784–8789.

- [108] 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 tricornutum*. *Plant Physiol.* 129(3), 1398–1406.
- [109] Wedel, N., Klein, R., Ljungberg, U., Andersson, B., Herrmann, R. G. (1992) The single-copy gene *psbS* codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. *FEBS Letters* 314(1), 61–66.
- [110] Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Andersson, B., Renger, G. (1995) The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* 270(50), 30141–30147.
- [111] Li, X.-P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., Niyogi, K.K. (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the *PsbS* protein. *J. Biol. Chem.* 279(22), 22866–22874.
- [112] Zia, A., Johnson, M.P., Ruban, A.V. (2011) Acclimation- and mutation-induced enhancement of *PsbS* levels affects the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 233(6), 1253–1264.
- [113] Demmig, B., Winter, K., Krüger, A., Czygan, F.C. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* 84(2), 218–224.
- [114] Ruban, A. V., Horton, P. (1999) The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. *Plant Physiol.* 119(2), 531–542.
- [115] Polívka, T., Herek, J. L., Zigmantas, D., Akerlund, H. E., Sundström, V. (1999) Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(9), 4914–4917.
- [116] Ruban, A. V., Lee, P. J., Wentworth, M., Young, A. J., Horton, P. (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* 274, 10458–10465.
- [117] Dreuw, A., Fleming, G. R., Head-Gordon, M. (2005) Role of electron-transfer quenching of chlorophyll fluorescence by carotenoids in non-photochemical quenching of green plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 858–862.
- [118] Rees, D., Young, A., Noctor, G., Britton, G., Horton, P. (1989) Enhancement of the Δ pH-dependent dissipation of excitation energy in spinach chloroplasts by light-activation; correlation with the synthesis of zeaxanthin. *FEBS Letters* 256(1-2), 85–90.
- [119] G. Noctor, D. Rees, A. Young, P. Horton (1991) The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence and the transthylakoid pH-gradient in isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta Bioenergetics* 1057(3), 320–330.
- [120] Crouchman, S., Ruban, A., Horton, P. (2006) *PsbS* enhances nonphotochemical fluorescence quenching in the absence of zeaxanthin. *FEBS Letters* 580(8), 2053–2058.
- [121] Wilk, L., Grunwald, M., Liao, P.-N., Walla, P.J., Kühlbrandt, W. (2013) Direct interaction of the major light-harvesting complex II and *PsbS* in nonphotochemical quenching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(14), 5452–5456.

- [122] Holt, N. E., Fleming, G.R., Niyogi, K. K. (2004) Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43(26), 8281–8289.
- [123] Szabó, I., Bergantino, E., Giacometti, G. M. (2005) Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *EMBO Rep.* 6(7), 629–634.
- [124] Betterle, N., Ballottari, M., Zorzan, S., Bianchi, S. de, Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., Bassi, R. (2009) Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J. Biol. Chem.* 284(22), 15255–15266.
- [125] Johnson, M. P., Goral, T. K., Duffy, C. D. P., Brain, A. P. R., Mullineaux, C. W., Ruban, A. V. (2011) Photoprotective energy dissipation involves the reorganization of photosystem II light-harvesting complexes in the grana membranes of spinach chloroplasts. *Plant Cell* 23(4), 1468–1479.
- [126] Holzwarth, A. R., Miloslavina, Y., Nilkens, M., Jahns, P. (2009) Identification of two quenching sites active in the regulation of photosynthetic light-harvesting studied by time-resolved fluorescence. *Chemical Physics Letters* 483(4-6), 262–267.
- [127] Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1993) Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3), 867–873.
- [128] Boussiba, S., Vonshak, A. (1991) Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32(7), 1077–1082.
- [129] Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G. A. (2002) Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Proc. Biochem.*, 37(6), 623–627.
- [130] Guerin, M., Huntley, M.E., Olaizola, M. (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol.* 21(5), 210–216.
- [131] B. Renstrom, H. Berger, S. Liaaen-Jensen (1981) Esterified, Optically Pure (3S, 3'S)-Astaxanthin from Flowers of *Adonis annua*. *Biochem. System. Ecology* 9(4), 249–250.
- [132] B. Czezug (1987) Ketocarotenoids – autumn carotenoids in *Metasequoia glyptostroboides*. *Biochem. Syst. Ecol.* 15(3), 303–306.
- [133] Baker, R. T. M. (2001) Canthaxanthin in aquafeed applications: is there any risk? *Trends Food Sci. & Technol.* 12(7), 240–243.
- [134] Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* 18(4), 160–167.
- [135] Terao, J. (1989) Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* 24(7), 659–661.
- [136] Onogi, N., Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Fukutomi, Y., Moriwaki, H., Muto, Y., Kojima, S. (1998) Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. *Nutr. Cancer* 32(1), 20–24.

- [137] Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K., Hara, A. (1995) Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis* 16(12), 2957–2963.
- [138] Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K., Hara, A. (1995) Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.* 55(18), 4059–4064.
- [139] Zhong, Y.-J., Huang, J.-C., Liu, J., Li, Y., Jiang, Y., Xu, Z.-F., Sandmann, G., Chen, F. (2011) Functional characterization of various algal carotenoid ketolases reveals that ketolating zeaxanthin efficiently is essential for high production of astaxanthin in transgenic *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 62(10), 3659–3669.
- [140] Huang, J., Zhong, Y., Sandmann, G., Liu, J., Chen, F. (2012) Cloning and selection of carotenoid ketolase genes for the engineering of high-yield astaxanthin in plants. *Planta* 236(2), 691–699.
- [141] Huang, J.-C., Zhong, Y.-J., Liu, J., Sandmann, G., Chen, F. (2013) Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. *Metab. Eng.* 17, 59–67.
- [142] Nagao, R., Takahashi, S., Suzuki, T., Dohmae, N., Nakazato, K., Tomo, T. (2013) Comparison of oligomeric states and polypeptide compositions of fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein complexes among various diatom species. *Photosyn. Res.*, August 2013, vor Drucklegung. Online ISSN 1573-5079
- [143] Provasoli, L., Mclaughlin, J.J., Droop, M. R. (1957) The Development of artificial media for marine algae. *Arch Mikrobiol* 25(4), 392–428.
- [144] Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthes Research*, 10(1-2), 51–62.
- [145] Kautsky, H., Appel, W., Amann, H. (1960) Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. Part XIII. The fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochem. Z.* 332, 277–292.
- [146] Genty, B., Briantis, J.-M., Baker, N. R. (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta General Subjects* 990(1), 87–92.
- [147] Strasser, J., Govindjee. On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Research in Photosynthesis*, Murata, N. (Hrsg.), pp. 29–32.
- [148] Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B., Strasser, R. (1998) Chlorophyll a fluorescence induction in higher plant: modeling and numerical simulation. *J. Theor. Biol.*, 131–151.
- [149] Papageorgiou, G.C., Govindjee (2004) Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Kluwer Academic. Dordrecht, London.
- [150] Porra, J. R., Thompson, W. A., Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, 975(3), 384–394.

- [151] Jeffrey, S. W., Humphrey, G. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a,b,c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 191–194.
- [152] Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006) Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 19, 669–675.
- [153] Berthold, D. A., Babcock, G. T., Yocum, C. F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Letters* 134(2), 231–234.
- [154] Eshagi, S., Andersson, B., Barber, J. (1999), Isolation of a highly active PSII– LHCII supercomplex from thylakoid membranes by a direct method. *FEBS Letters* 446(1), 23–26.
- [155] Schägger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368–379
- [156] Schägger, H., von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199(2), 223–231.
- [157] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76(9), 4350–4354.
- [158] Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17(1), 208–212.
- [159] Oostergetel, G. T., Keegstra, W., Brisson, A. (1998) Automation of specimen selection and data acquisition for protein electron crystallography. *Ultramicroscopy*, 74(1-2), 47–59.
- [160] Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I., Ludtke, S.J. (2007) EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 157(1), 38–46.
- [161] Barera, S., Pagliano, C., Pape, T., Saracco, G. and Barber, J. (2012) Characterization of PSII-LHCII supercomplexes isolated from pea thylakoid membrane by one-step treatment with α - and β -dodecyl-D-maltoside. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367(1608), 3389–3399.
- [162] Järvi, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Aro, E.-M. (2011) Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega-complexes. *Biochem. J.* 439, 207–214.
- [163] Ding, S., Lei, M., Lu, Q., Zhang, A., Yin, Y., Wen, X., Zhang, L., Lu, C. (2012) Enhanced sensitivity and characterization of photosystem II in transgenic tobacco plants with decreased chloroplast glutathione reductase under chilling stress. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1817(11), 1979–1991.
- [164] Xu, Q., Chitnis, P. R. (1995) Organization of photosystem I polypeptides. Identification of PsaB domains that may interact with PsaD, 108(3) 1067–1075.
- [165] Gildenhoff, N., Amarie, S., Gundermann, K., Beer, A., Büchel, C., Wachtveitl, J. (2010) Oligomerization and pigmentation dependent excitation energy transfer in fucoxanthin-chlorophyll proteins. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1797 (5), 543–549.
- [166] Ogawa, T., Vernon, L. P., Mollenhauer, H. H. (1969) Properties and structure of fractions prepared from *Anabaena variabilis* by the action Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 172(2), 216–229.

- [167] Vechtel, B., Pistorius, E. K., Ruppel, H. G. (1992) Occurrence of secondary carotenoids in PS I complexes isolated from *Eremosphaera viridis* (De Bary) (Chlorophyceae). *Z. Naturforsch.* 47c, 51–56.
- [168] Phillip, D., Hobe, S., Paulsen, H., Molnar, P., Hashimoto, H., Young, A.J. (2002) The binding of Xanthophylls to the bulk light-harvesting complex of photosystem II of higher plants. A specific requirement for carotenoids with a 3-hydroxy-beta-end group. *J. Biol. Chem.* 277(28), 25160–25169.
- [169] Booth, P.J., Paulsen, H. (1996) Assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* 35(16), 5103–5108.
- [170] Dall'Osto, L., Cazzaniga, S., North, H., Marion-Poll, A., Bassi, R. (2007) The *Arabidopsis* *aba4-1* mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress. *Plant Cell* 19(3), 1048–1064.
- [171] Yuan, J.-P., Chen, F. (1997) Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques* 11(7), 455–459.
- [172] Formaggio, E., Cinque, G., Bassi, R. (2001) Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. *J. Mol. Biol.* 314(5), 1157–1166.
- [173] Lokstein, H., Tian, L., Polle, J. E. W., DellaPenna, D. (2002) Xanthophyll biosynthetic mutants of *Arabidopsis thaliana*: altered nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence is due to changes in Photosystem II antenna size and stability. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics* 1553(3), 309–319.
- [174] Caffarri, S., Passarini, F., Bassi, R., Croce, R. (2007) A specific binding site for neoxanthin in the monomeric antenna proteins CP26 and CP29 of Photosystem II. *FEBS Letters* 581(24), 4704–4710.
- [175] Das, S.K., Frank, H.A. (2002) Pigment compositions, spectral properties, and energy transfer efficiencies between the xanthophylls and chlorophylls in the major and minor pigment-protein complexes of photosystem II. *Biochemistry* 41(43), 13087–13095.
- [176] Ros, F., Bassi, R., Paulsen, H. (1998) Pigment-binding properties of the recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted in vitro. *Eur. J. Biochem.* 253(3), 653–658.
- [177] Borowitzka, M. A., Huisman, J. M., Osborn, A. (1991) Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of applied phycology* 3(4), 295–304.
- [178] Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., Nagai, S. (1992) Growth and Astaxanthin Formation of *Haematococcus pluvialis* in Heterotrophic and Mixotrophic Conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74(1), 17–20.
- [179] Harker, M., Tsavalos, A. J., Young, A. (1996) Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82(2), 113–118.
- [180] Zlotnik, I., Sukenik, A., Dubinsky, Z. (1993) Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *J. Phycol.*, 29(4) 463–469.

- [181] Shi, T., Cunningham Jr., F. X., Youmans, M., Grabowski, B., Sun, Z., Gantt, E. (1995) Cytochrome f loss in astaxanthin-accumulating red cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): comparison of photosynthetic activity, photosynthetic enzymes, and thylakoid membrane polypeptides in red and green cells. *J. Phycol.* 31(6), 897–905.
- [182] Hagen, C., Grünewald, K., Schmidt, S., Müller, J. (2000) Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *Eur. J. Phycol.* 35, 75–82.
- [183] Qiu, B., Li, Y. (2006) Photosynthetic acclimation and photoprotective mechanism of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) during the accumulation of secondary carotenoids at elevated irradiation. *Phycologia* 45, 117–126.
- [184] Yong, Y. Y. R., Lee, Y.-K. (1991) Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta)? *Phycologia*, 30(3), 257–261.
- [185] Amarie, S., Förster, U., Gildenhoff, N., Dreuw, A., Wachtveitl, J. (2010) Excited state dynamics of the astaxanthin radical cation. *Chemical Physics* 373, 8–14.
- [186] Stirbet, A., Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 104(1-2), 236–257.
- [187] Tóth, S. Z., Schansker, G., Strasser, R. J. (2007) A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. *Photosynth. Res.* 93(1-3), 193–203.
- [188] Havaux, M. (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Science* 3, 147–151.
- [189] Liang, J., Tian, Y.-X., Yang, F., Zhang J.-P., Skibsted, L. H. (2009) Antioxidant synergism between carotenoids in membranes. Astaxanthin as a radical transfer bridge. *Food Chemistry*, 115(4), 1437–1442.
- [190] Izawa, S., Good, N. E. (1966) Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. I. Light-scattering and volume changes. *Plant Physiol.* 41(3), 533–543.
- [191] Murakami, S., Packer, L. (1971) The role of cations in the organization of chloroplast membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 146(1), 337–347.
- [192] Sculley, M. J., Duniec, J. T., Thorne, S. W., Chow, W. S., Boardman, N. K. (1980) The stacking of chloroplast thylakoids. Quantitative analysis of the balance of forces between thylakoid membranes of chloroplasts, and the role of divalent cations. *Arch. Biochem. Biophys.* 201(1), 339–346.
- [193] Goodchild, D. J., Highkin, H. R., Boardman, N. K. (1966) The fine structure of chloroplasts in a barley mutant lacking chlorophyll B. *Exp. Cell Res.* 43(3), 684–688.
- [194] Mullet, J. E., Arntzen, C. J. (1980) Simulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 589(1), 100–117.

- [195] Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R. G., Howard, C. A., Ruban, A. V., Horton, P., Jansson, S. (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness 35, 350–361.
- [196] Ruban, A. V., Wentworth, M., Yakushevskaya, A. E., Andersson, J., Lee, P.J., Keegstra, W., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Jansson, S., Horton, P. (2003) Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. *Nature* 421, 648–652.
- [197] Armbruster, U., Labs, M., Pribil, M., Viola, S., Xu, W., Scharfenberg, M., Hertle, A.P., Rojahn, U., Jensen, P.E., Rappaport, F., Joliot, P., Dörmann, P., Wanner, G., Leister, D. (2013) Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 Proteins Modify Thylakoid Architecture by Inducing Membrane Curvature. *Plant Cell*. 25(7), 2661-2678
- [198] Büchel, C. (2003). Fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: 18 and 19 kDa subunits assemble into different oligomeric states, *Biochemistry* 42(44), 13027–13034.
- [199] Grouneva, I., Rokka, A., Aro, E.-M. (2011) The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *J. Proteome Res.* 10(12), 5338–5353.
- [200] Katoh, T., Ehara, T. (1990) Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from a brown alga, *Petalonia fascia*. *Electron microscopy studies. Plant Cell Physiol.*, 31(4), 439–447.
- [201] Tichý, J., Gardian, Z., Bina, D., Konik, P., Litvin, R., Herbstova, M., Pain, A., Vacha, F. (2013) Light harvesting complexes of *Chromera velia*, photosynthetic relative of apicomplexan parasites. *Biochim. Biophys. Acta* 1827(6), 723–729.
- [202] Gardian, Z., Tichý, J., Vácha, F. (2011) Structure of PSI, PSII and antennae complexes from yellow-green alga *Xanthonema debile*. *Photosyn. Res.* 108(1), 25–32.
- [203] Rivera, S., Vilaró, F., Canela, R. (2011) Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants. *Anal Bioanal. Chem.* 400(5), 1339–1346.

7 Anhang

7.1 Strukturen ausgewählter Carotinoide

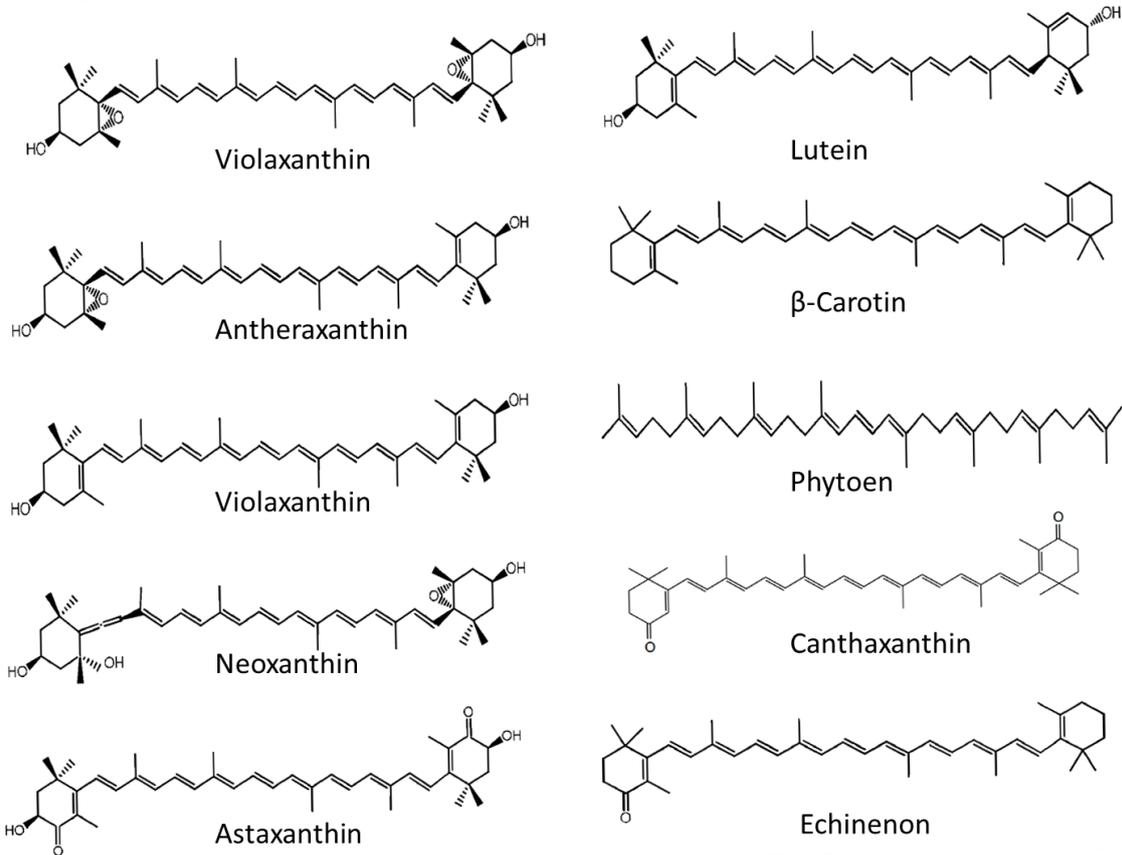


Abbildung 7.1-1: Carotinoidstrukturen. Aus Rivera *et al.* 2011 [203] und Guerin *et al.* 2003 [130].

7.2 Detaillierte Schrittfolge der Einzelpartikelanalyse des FCPb

Als initialer Datensatz zur Herstellung einer ersten Referenz wurde Partikel 1-10000 aus dem Gesamtdatensatz vom 12.09.2012 (01set-120912-raw.img) unter dem Namen „test.img“ verwendet (vgl. auch Tab 7.2-1). Die Einzelbilder in dieser Datei wurden nach Feststellen der durchschnittlichen Partikelgröße auf eine Bildgröße von 64x64 Pixeln reduziert. Die Bearbeitungsschritte hin zu den finalen Summenbildern des FCPb sind in Tabelle 7.2-2 angegeben.

Tabelle 7.2-1: Übersicht der zur FCPb Analyse aufgenommenen Datensätze aus Einzelpartikeln nach Picken mit EMAN2.

Aufnahmedatum = Ordner (Grid)	Partikelanzahl, Dateiname
120916-t1 (T1)	8076, 03set-sml.img
120912 (Q4)	18744, 01set-120912-raw.img
120908 (Q2,Q4)	27367, 01set-120908-raw.img

Tabelle 7.2-1: Abfolge der Analyseschritte mit der Software GRIP zur Aufklärung der Struktur von FCPb.

Input Datei	Partikelzahl	Bearbeitung	Output Datei	Ordner
test.img	10000	frequency filtering 0.1 / 0.6/ 0.1 / 0.9 (low/high/remain/softcircle)	test-psml3.img	120912/test
test-psml3.img		no reference alignment	test-psml3-ali.img	
test-psml3-ali.img		prepare Multivariate statistical analysis (MSA)	test-psml3-ali-3dt.img	
test-psml3-ali-3dt.img		MSA	test-psml3-ali-msa.map/dat	
test-psml3-ali-msa.map/dat		hierarchical classification "5000 gav"	test-psml3-ali-cls*.img	
test-psml3-ali-cls2.img	4526	conditional sum, correlation factor 0.1	test-psml3-ali-cls2-sum.img	
test-psml3-ali-cls2-sum.img	929	center particle	test-psml3-ali-cls2-sum-pref.img	
test-psml3-ali-cls2-sum-pref.img		contour "soft circle 0.5, fast decay"	ref03-02.img	
test.img, ref03-02.img	10000, 929	reference alignment	test-raw3-ali.img	
test-raw3-ali.img		prepare MSA	test-raw3-ali-3dt.img	
test-raw3-ali-3dt.img		MSA	test-raw3-ali-msa.dat	
test-raw3-refali-msa.dat		hier. classification, "2000 gav"	test-raw3-ali-cls*.img	
test-raw3-ali-cls26.img	1023	conditional sum, correlation factor 0.2	test-raw3-ali-cls26-sum.img	
test-raw3-ali-cls26-sum.img	1019	rotate	test-raw3-ali-cls26-sum-rot.img	total
test-raw3-ali-cls26-sum-rot.img		contour "soft circle 0.52, fast decay"	test-raw3-ali-cls26-sum-pref.img	
test-raw3-ali-cls26-sum-pref.img		copy	zjunk0.img	
test.img	10000	frequency filtering 0.001 / 0.45/ 0.1 / 0.9 (low/high/remain/softcircle)	test-psml4.img	120912/test
test-psml4.img		no reference alignment	test-psml4-ali.img	
test-psml4-ali.img		prepare MSA	test-psml4-ali-3dt.img	

test-psml4-ali-3dt.img		MSA	test-psml4-ali-msa.dat	
test-psml4-ali-3dt.dat		hierarchical classification "5000 gav"	test-psml4-ali-cls*.img	
test-psml4-ali-cls2.img	4334	conditional sum, correlation factor 0.1	test-psml4-ali-cls2-sum.img	
test-psml4-ali-cls2-sum.img	673	copy	ajunk1.img	total
ajunk1.img		contour	ajunk1-pref.img	
ajunk1-pref.img		"soft circle 0.54, fast decay"	ajunk1-pref-pref.img	
01-total-set.img	54187	contour "soft circle 0.9, fast decay"	01-total-set-psml.img	
01-total-set-psml.img		copy particle 1-25005	01-total-set-psml-cp.img	
01-total-set-psml-cp.img, ajunk1-pref-pref.img	25005, 673	reference alignment	01-total-set-psml-cp-ali.img	
01-total-set-psml-cp-ali.img		conditional sum, corr. factor 0.1	aset-ali-sum.img	
aset-ali-sum.img, zjunk0.img	469, 1019	combine	zjunka.img	
01-total-set-raw.img	54187	copy particles 1-24999	01-total-set-raw-cp.img	
01-total-set-raw.img	54187	copy particles 25000-54187	01-total-set-raw-cp2.img	
01-total-set-raw-cp.img	24999	filtering (0.06/0.6/0.1/0.8)	zjunk-total1a.img	
01-total-set-raw-cp2.img	29188	filtering (0.06/0.6/0.1/0.8)	zjunk-total1b.img	
zjunk-total1a.img, zjunka.img		multi reference alignment (MRA)	zjunk-total1a-ali.img	multiref
zjunk-total1a-ali.img		prepare MSA	zjunk-total1a-ali-3dt.img	
zjunk-total1a-ali-3dt.img		MSA	zjunk-total1a-ali-msa.dat	
zjunk-total1a-ali-msa.dat		hierarch. classification "5000 gav"	zjunk-total1a-ali-cls*.img	
zjunk-total1b.img, zjunka.img		multi reference alignment (MRA)	zjunk-total1b-ali.img	multiref
zjunk-total1b-ali.img		prepare MSA	zjunk-total1b-ali-3dt.img	
zjunk-total1b-ali-3dt.img		MSA	zjunk-total1b-ali-msa.dat	
zjunk-total1b-ali-msa.dat		hierarch. classification "5000 gav"	zjunk-total1b-ali-cls*.img	

Tabelle A: Ergebnisse des MRA von zjunk-total1a/b.img							
Klasse (~1a.img)	Partikel Anzahl	corr.factor 0,1	Form	Klasse (~1b.img)	Partikel	corr.factor 0,1	Form
2	3272	589	Dreieck	1	3241	280	Dreieck
66	3661	255	Sechseck	61	1252	157	Sechseck
75	1735	83	Sechseck	72	1653	375	Sechsecke
76	3275	105	Sechseck	130	1079	435	Sechseck
149	2711	294	Sechseck	143	4827	32	Sechseck
159	1945	59	Sechseck	160	1062	235	Dreieck
zjunk-total1a-ali-cls2.img		3272	cond. sum, corr. factor 0.1		zjunk-total1a-ali-cls2-sum.img		
zjunk-total1a-ali-cls2-sum.img		589	copy		testreftri.img		multiref2
zjunk-total1a-ali-cls2.img, zjunk-total1b-ali-cls1.img, zjunk-total1b-ali-cls160.img		s. Tab. A	combine		tri01.img		
alle "Sechseck"-Klassen in Tab. A		s. Tab. A	combine		hex01.img		
hex01.img, aset-ali-sum.img		22138, 469	reference alignment		hex01-ali.img		
hex01-ali.img			cond. sum, corr. factor 0.2		hex01-ali-sum2.img		
hex01-ali-sum2.img		4344	copy		a-final-hex.img		SPA Groningen
tri01.img			restore frequencies (reinterpolate)		01tri01.img		multiref2
hex01.img			restore frequencies (reinterpolate)		01hex01.img		multiref2
01tri01.img		7575	contour „soft circle 0.8, fast decay“		01tri01-psml.img		multiref2
01tri01.img, ajunk1-pref-pref.img		7575	reference alignment		01tri01-refhex-ali.img		multiref
01tri01-refhex-ali.img			prepare MSA		01tri01-refhex-ali-3dt.img		
01tri01-refhex-ali-3dt.img			MSA		01tri01-refhex-ali-msa.dat		
01tri01-refhex-ali-msa.dat			hierarch. classification „2500 gav“		01tri01-refhex-ali-cls*.img		
01tri01-refhex-ali-cls36.img			cond. sum serie		01tri01-refhex-ali-cls36-sumserie.img		

01tri01-refhex-ali-cl36-sumserie.img		copy img. no. 4	testrefhex.img	multiref2	
testrefhex.img, testreftri.img	16, 32	combine	testref-set1.img		
01hex01.img	22138	contour „soft circle 0.8, fast decay“	01hex01-psml.img		
01hex01-psml.img	testref- set1.img	MRA	01hex01-psml-ali.img		
01hex01-psml-ali.img		prepare MSA	01hex01-psml-ali-3dt.img		
01hex01-psml-ali-3dt.img		MSA	01hex01-psml-ali.dat		
01hex01-psml-ali.dat		hierarch. classification “5000 var”	01hex01-psml-ali-cl36*.img		
Tabelle B: Ergebnis des MRA von 01hex01.img					
Klasse	Partikel-Anzahl	Form	Klasse	Partikel-Anzahl	Form
1	3664	Dreieck	7	867	Dreieck
2	3573	Sechseck	8	1181	undefiniert
3	1856	Sechsecke	9	1434	Sechseck
4	1418	Dreieck	10	688	Dreieck
5	1865	Sechseck	11	1648	Dreieck
6	2344	Sechseck	12	1600	Sechseck
01hex01-psml-ali-cl36*.img, ~4, ~7, ~10, ~11.img, 01tri01-psml.img	s. Tab.B, 7575	combine	02tri.img		
01hex01-psml-ali-cl36*.img	688	cond. sum serie	01hex01-psml-ali-cl36-sum.img		
01hex01-psml-ali-cl36-sum.img		copy image no. 6	02testref-tri.img		
02tri.img, 02testref-tri.img	12672, 64	reference alignment	02tri-ali3.img		
02tri-ali3.img		prepare MSA	02tri-ali3-3dt.img		
02tri-ali3-3dt.img		MSA	02tri-ali3-msa.dat		
02tri-ali3-msa.dat		hier. classification “3500 var”	02tri-ali3-cl36*.img		
02tri-ali3-cl36*.img		cond. sum, corr. factor 0.2	a-final-tri.img	SPA Groningen	
a-final-tri.img, a-final-hex.img	2661, 4344	combine	a-final.img	SPA Groningen	

7.3 Detailwerte zu den (Mini)-PAM- und PEA-Messungen

Tabelle 7.3-1: Detailwerte der Mini-PAM-Messungen aus Tabelle 3.1-1.

SL	Probe	F ₀	F _m	F _t	F _m '	F ₀ '	F _r	F _v /F _m	F _v '/F _r	NPQ	qP	φPSII
	WT1	0,187	1,023	0,289	0,746	0,169	1,072	0,82	0,84	0,27	0,79	0,61
	WT2	0,195	1,126	0,322	0,798	0,198	1,072	0,83	0,82	0,29	0,79	0,60
	WT3	0,216	1,224	0,394	0,817	0,219	1,139	0,82	0,81	0,33	0,71	0,52
	∅	0,199	1,124	0,335	0,787	0,195	1,094	0,82	0,82	0,30	0,76	0,58
	Standard-abweichung	0,015	0,101	0,054	0,037	0,025	0,039	0,005	0,02	0,03	0,05	0,05
	bkt1	0,147	0,387	0,201	0,342	0,146	0,378	0,62	0,61	0,12	0,72	0,41
	bkt2	0,159	0,455	0,167	0,377	0,163	0,448	0,65	0,64	0,17	0,98	0,56
	bkt3	0,153	0,402	0,185	0,364	0,166	0,416	0,62	0,60	0,09	0,90	0,49
	∅	0,153	0,415	0,184	0,361	0,158	0,414	0,63	0,62	0,13	0,87	0,49
	Standard-abweichung	0,006	0,036	0,017	0,018	0,011	0,035	0,02	0,02	0,04	0,13	0,07
NL												
	WT1	0,198	1,105	0,312	0,794	0,218	1,145	0,82	0,81	0,28	0,84	0,61
	WT2	0,201	1,104	0,316	0,789	0,207	1,053	0,82	0,80	0,29	0,81	0,60
	WT3	0,198	1,063	0,319	0,780	0,197	1,092	0,81	0,82	0,27	0,79	0,59
	∅	0,199	1,091	0,316	0,788	0,207	1,097	0,82	0,81	0,28	0,81	0,60
	Standard-abweichung	0,002	0,024	0,004	0,007	0,011	0,046	0,004	0,01	0,01	0,02	0,01
	bkt1	0,167	0,482	0,177	0,440	0,168	0,517	0,65	0,68	0,09	0,97	0,60
	bkt2	0,131	0,453	0,230	0,440	0,166	0,548	0,71	0,70	0,03	0,77	0,48
	bkt3	0,152	0,440	0,256	0,406	0,166	0,531	0,65	0,69	0,08	0,63	0,37
	∅	0,150	0,458	0,221	0,429	0,167	0,532	0,67	0,69	0,06	0,79	0,48
	Standard-abweichung	0,018	0,022	0,040	0,020	0,001	0,016	0,03	0,01	0,03	0,17	0,11
t-Test, Vgl NL(X,WT) p =	0,0048	2x10 ⁻⁷	0,0077	4x10 ⁻⁷	0,0013	0,0002	0,0008	5x10 ⁻⁶	0,0002	0,3992	0,0748	
t-Test, Vgl SL(X,WT) p =	0,0038	0,0002	0,0049	0,0003	0,0395	0,0001	0,0003	8x10 ⁻⁶	0,0021	0,1386	0,0790	
t-Test, Vgl WT (SL,NL) p =								0,0351	5x10 ⁻⁵	0,2545	0,0950	0,1887
t-Test, Vgl X (SL,NL) p =								0,1084	8x10 ⁻⁵	0,0966	0,5501	0,9469
t-Test, Vgl F _v /F _r mit F _v '/F _r p =	WT Normallicht: 0,267		WT Schwachlicht: 0,858		bkt Normallicht: 0,535		bkt Schwachlicht: 0,267					

Tabelle 7.3-2: Fv/Fm-Werte aus MiniPAM und PEA-Messungen an Blättern von *N. tabacum* Var. Xanthi WT und bkt-Linie.

Datum	Messgerät	Bemerkungen	LL (40µE)		NL (120µE)	
			WT	bkt-Linie	WT	bkt-Linie
22.09.2011	Mini-PAM	15' Dunkeladaptation			0,800	0,659
					0,803	0,734
					0,794	0,677
					0,811	0,728
					0,794	0,71
20.03.2013	Mini-PAM	30' Dunkeladaptation	0,817	0,607	0,808	0,494
			0,807	0,628	0,818	0,521
			0,813	0,64	0,804	0,592
			0,811	0,625	0,812	0,536
						0,642
						0,647
						0,64
						0,643
						0,709
						0,707
17.06.2013	Mini-PAM	30' Dunkeladaptation	0,82	0,62	0,82	0,69
			0,83	0,65	0,82	0,71
			0,82	0,62	0,81	0,65
17.06.2013	PEA	30' Dunkeladaptation			0,832	0,696
					0,823	0,701
					0,838	0,683
					0,828	0,71
					0,835	0,696
						0,674
						0,68

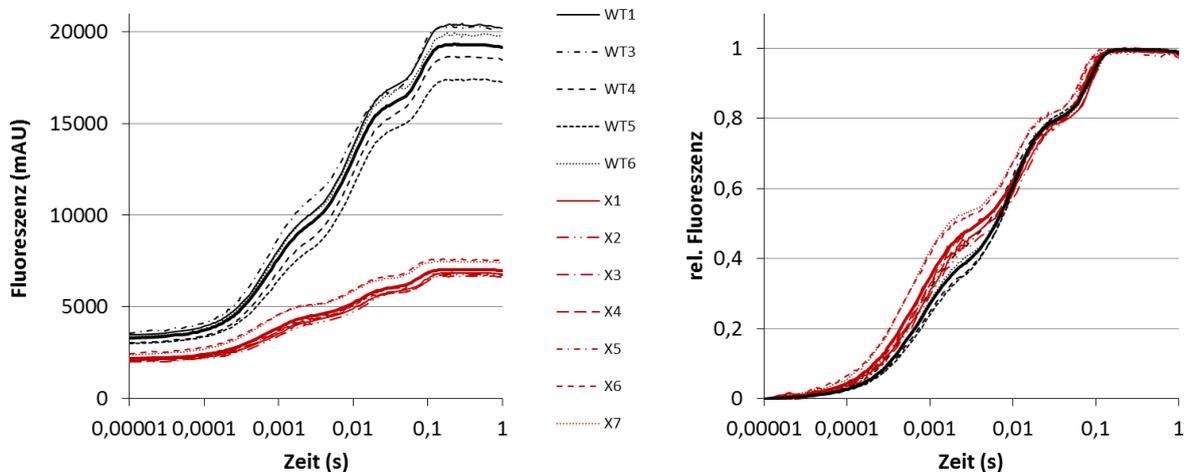


Abbildung 7.3-1: OJIP-Kurven der PEA-Messungen aus 3.1.2. Links: Rohdaten der Einzelkurven und Mittelwerte (dick) von WT (schwarz) und X (rot). Rechts: wie links, aber normiert auf 0 bzw. 1 im jeweiligen Minimum bzw. Maximum.

7.4 Exemplarisches Elutionsprofil der in der bkt-Linie enthaltenen Pigmente

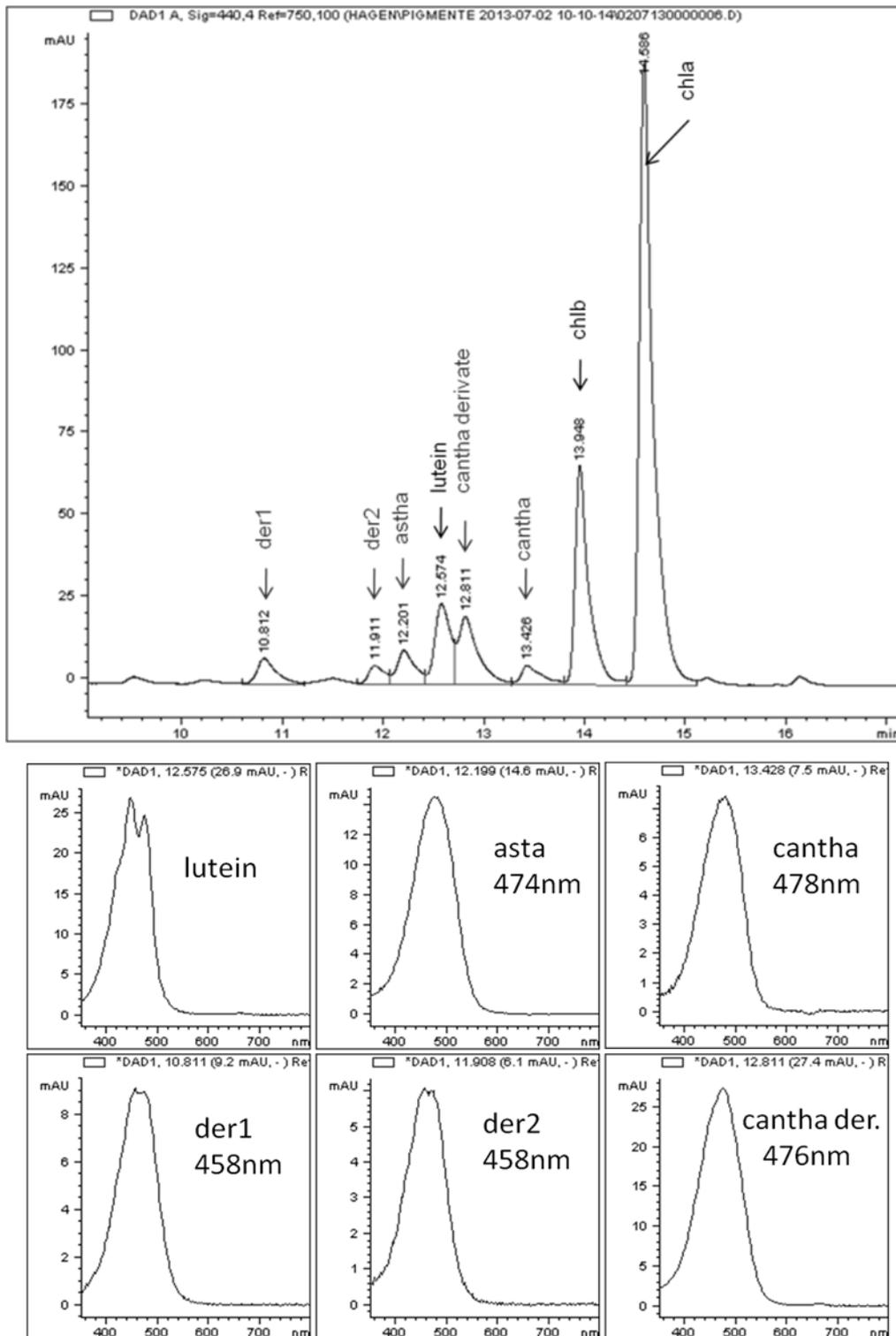


Abbildung 7.4-1: HPLC-Elutionsprofil eines Blattextrakts der bkt-Linie von *N. tabacum* mit Astaxanthin, Canthaxanthin und ihren Derivaten („der“).

7.5 Detailwerte zum Radikalreduktionsnachweis

Tabelle 7.5-1: Radikalreduktionsnachweis, Einzelmessungen.

Zeit (min)	WT 1	WT 2	WT 3			Ø	Standard- abweichung
1	1,076	1,078	1,076			1,077	0,001
2	1,038	1,015	1,021			1,025	0,012
3	1,008	0,983	0,986			0,992	0,014
5	0,967	0,942	0,94			0,950	0,015
10	0,91	0,877	0,876			0,888	0,019
20	0,867	0,819	0,814			0,833	0,029
35	0,825	0,776	0,76			0,787	0,034
65	0,763	0,726	0,705			0,731	0,029
125	0,689	0,67	0,641			0,667	0,024
	bkt 1	bkt 2	bkt 3	bkt 4	bkt 5		
1	1,071	1,077	1,079	1,069	1,064	1,072	0,006
2	1,001	1,018	1,019	1	0,996	1,007	0,011
3	0,963	0,977	0,985	0,96	0,958	0,969	0,012
5	0,91	0,94	0,92	0,909	0,898	0,915	0,016
10	0,854	0,856	0,86	0,836	0,841	0,849	0,010
20	0,785	0,775	0,804	0,772	0,787	0,785	0,013
35	0,73	0,706	0,756	0,733	0,738	0,733	0,018
65	0,673	0,648	0,703	0,684	0,692	0,680	0,021
125	0,601	0,575	0,626	0,606	0,631	0,608	0,022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die

**Strukturelle und funktionelle Analyse von Lichtsammelkomplexen
in *Nicotiana tabacum* und *Cyclotella meneghiniana***

selbständig angefertigt und mich keiner anderen als der in ihr angegebenen Hilfsmittel, incl. der zitierten Schriften, bedient habe.

Frankfurt am Main, den.....

Danksagung

Da ist er nun, der Tag, an dem alles zu Ende geht. Der Tag der Abrechnung. Muharhar! Jetzt aber!

WAS ZUM KUCKUCK ... ???!??

Nee, vergesst es. Ich will ja noch disputieren und friedlich mit euch anstoßen!

Also hinauf auf die Wolke nostalgischer Erinnerungen:

Chefin, Danke. Danke dafür, dass ich mich wissenschaftlich und organisatorisch austoben durfte. Danke für enorm viel Freiheit und die Möglichkeit, mich weiterentwickeln und meinen Weg suchen zu können. Danke für so manche (gerne auch hochschul- oder gesellschaftspolitische) Debatte zwischen Balkon (oder mittlerweile Feuerterasse) und Kaffeetisch. Danke für die vergangenen, in vielerlei Hinsicht extrem bereichernden Jahre.

Prof. Sandmann, Danke für den Tabak und für das Vertrauen in meine Lehrfähigkeiten. Ich habe es zwar immer nur über Dritte munkeln hören, gehe aber trotzdem einfach mal davon aus, dass ich die kleinen Lehrämter in den vergangenen Jahren ganz in Ihrem Sinne bespaßt habe.

Lars, Danke für die vielen „ich hab´da mal eine kurze Frage und du eine lange Antwort“-Gespräche. Jaha, es dauerte IMMER etwas länger! Macht aber nüscht, denn sie waren auch immer lehrreich, tröstlich, unterhaltsam und inspirierend. Vielen Dank für deine wissenschaftliche Begeisterung!

Dem AK um Egbert Boekema gebührt mein allerherzlichster Dank für den wahnsinnigen Support bei der Partikelanalyse. Hagen, Michael, Danke euch für eure Hilfe in Sachen Pigmente und Co!

Matthias, Danke für deine Gemütsruhe. Danke für´s Fels in der Brandung sein, für deine Besonnenheit im Umgang mit all unseren Schwächen und unseren ständigen Forderungen.

Markus, Danke für die Bonbons und die Taschentücher, für deine irritierend vertraute Soziophobie, deinen Humor und für die vielen technischen Sofort-Hilfen! Du bist großartig. ☺

Kerstin, wenn du ein Kuchenrezept wärst, stündest du ganz weit oben auf meiner Hitliste. Danke für´s Herz, für die unglaublich vielen Momente, die wir miteinander lachen und schwätzen konnten, für deine Fürsorglichkeit und deine Wärme. Ohne dich wäre der AK ein ganzes Stück ärmer.

Rike, du Zuckerstück, ohne dich wäre der tägliche Wahnsinn mit Abstand nicht so vergnüglich gewesen. Danke für deine Freundschaft.

Anne, Schnüppili, die Kakophonie des Seins kann nur durch Leberworscht aufgebessert werden! Ich schätze mich sehr glücklich, das ich mich eines schönen Tages doch mal zum Smalltalk mit der „neuen“ Master-Studentin durchgerungen habe (die da schon seit 3 Monaten oder so im AK war?!). Hach, was hätte ich sonst verpasst!

An alle anderen: ihr seid zu viele, es ist zu wenig Platz, zu wenig Zeit. Nichts desto trotz: Danke für viel Unterstützung und kreative Debatten. Danke für eure Eigenheiten und die gelegentlichen Bierchen. Ihr habt mit alle auf die eine oder andere Weise gefordert und geprägt. Bleibt, wie ihr seid.

Zu guter Letzt: meine Eltern. Ich liebe euch. Ich danke euch. Für alles, was ihr mir mit auf den Weg gegeben habt. Für euren Humor, für eure Liebe, für den schnöden Mammon, für ein zu Hause, in das ich immer gern zurückkomme, für eure Stärken und Schwächen, denn sie machen euch menschlich, und dafür, dass ihr mir in allen Lebenslagen immer gute Vorbilder wart. Knutsch.

Und ganz zum Schluss: Danke an mich. Für all den Schweiß, die Tränen und das Blut (jaha!). Geflossen ist alles. Und es war jedes Tröpfchen wert. Ich bereue nichts und schließe mit den Worten der unvergleichlichen Evelyn Haman als Frau Hoppenstedt in Loriots´ „Die Jodelschule“:

„Dann hab´ ich was eigenes. Dann hab´ ich mein Jodeldiplom!“

In diesem Sinne: ‚Hollerö dudöldö...‘ - ‚Dudöldi! Dudöldö ist zweites Futur bei Sonnenaufgang!‘