

**Untersuchungen zur Klärung der Funktion  
der ‘Early Light-Inducible Proteins’  
(ELIPs) bei Höheren Pflanzen**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

**DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN**  
**-Dr. rer. nat.-**

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biol. Melanie Schröder**

geboren am 21.08.1974 in Hannover

2005

Referent: Herr Prof. Dr. Klaus Kloppstech  
Korreferent: Frau PD Dr. Franziska Krajinski  
Tag der Promotion: 02. Februar 2005

## Zusammenfassung

Sowohl kurzfristige als auch langfristige Veränderungen der Umweltbedingungen führen bei Organismen zu einem Wechsel der Genexpression. Zu den positiv lichtregulierten Proteinen photoautotropher Lebewesen gehören die early light-inducible proteins (ELIPs), einer Gruppe kernkodierter und in der Thylakoidmembran lokalisierter Proteine. Erstmals wurden sie in den frühen Phasen der Ergrünung etiolierter Erbsenkeimlinge beschrieben, später konnten die ELIPs aber auch bei ergrünenden Pflanzen unter Lichtstressbedingungen nachgewiesen werden. Die genaue Funktion dieser Proteine ist noch nicht bekannt, jedoch wird eine Funktion im Schutz vor photooxidativen Schäden postuliert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich neben dem Schutz vor Lichtstress mit der Annahme, wonach die ELIP-Proteine als zeaxanthinbindende Proteine eine Funktion im  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg besitzen und als Kollektoren und Dissipatoren überschüssiger Lichtenergie dienen.

Zur Klärung dieser Frage wurde eine luteinfreie Mutante *lut2* von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija eingesetzt, in der die *elip*-mRNA in Antisense-Orientierung inseriert wurde. Basierend auf der Hypothese wurde ein lichtsensitiver Phänotyp erwartet, der sowohl im  $\alpha$ - als auch im  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg beeinträchtigt ist. Die Charakterisierung der Transformanten zeigte bei einer Pflanze eine Reduzierung der *elip*-Induktion, die aber in ihrem Wachstum keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp und der *lut2*-Mutante erkennen lässt. Eine Mutante, die sich durch eine massive oder vollständige Inhibierung des ELIPs auszeichnet, konnte nicht gefunden werden. Da auch die ermittelte Transformationsrate in diesem Experiment sehr niedrig war, kann ein letaler Phänotyp, besonders während der frühen Phase der Keimlingsentwicklung, nicht ausgeschlossen werden.

Als zweiter Modellorganismus wurde in *Vitis vinifera* cv. Sultanina die ELIP-Expression und die Pigmentzusammensetzung analysiert. Aufgrund seines natürlichen Standortes zeichnet sich *Vitis vinifera* durch eine Toleranz gegenüber hohen Lichtintensitäten aus.

Datenbankrecherchen lieferten die Evidenz für mindestens ein *elip*-Gen in *Vitis vinifera*. Dies wurde in dieser Arbeit vollständig isoliert und zur Feststellung der Genstruktur sequenziert. Daher konnte auch eine Charakterisierung des Genproduktes, dem ELIP-Protein, durchgeführt werden.

Ein gegen das Erbsen-ELIP gerichteter Antikörper, der eine Kreuzdetektion gegen das ELIP-Protein aus *Vitis vinifera* besitzt, ermöglichte die Analyse der Proteinakkumulation unter verschiedenen Licht- und Kältestressbedingungen in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums eines Blattes. Parallel wurde auch die Veränderung der Pigmentzusammensetzung bestimmt. Die höchsten ELIP- und Zeaxanthinakkumulationen fanden sich bei hohen Lichtintensitäten und moderaten Temperaturen in jungen Blättern. Eine synergistische Wirkung der beiden Stressoren Licht und Kälte konnte hier, anders als bei bisher beschriebenen Spezies, nicht gefunden werden.

Erste mRNA-Analysen führten zu dem Ergebnis, dass bei Kälte und Hochlicht die *elip*-Transkription ähnlich oder sogar höher ist als bei moderaten Temperaturen, während eine Proteinakkumulation bei niedrigen Temperaturen erst zu einem viel späteren Zeitpunkt auftritt. Diese Differenzen lassen auf zwei unterschiedliche Regulationsmechanismen der Transkription und Translation vermuten. Die Ergebnisse bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina deuten auf weitere Schutzmechanismen hin, die in der Kälte in den Vordergrund treten. Die Stärke der Lichtstressantwort ist zusätzlich vom Entwicklungsstadium des Blattes abhängig. Die dabei bestehende Korrelation der ELIP-Akkumulation und der Zeaxanthinbildung lassen Rückschlüsse auf miteinander verflochtene Funktionen zu.

## Abstract

Both short and long term environmental stresses induce changes in the gene expression in plants. Early light-inducible proteins (ELIPs) belong to positively regulated light induced proteins of the photoautotrophic organisms. This protein is localized in the thylakoid membranes. First ELIPs were detected in the early phase of etiolated pea seedlings but later found also in the plants under greening phase during light stress. The function of ELIPs is not yet clear but postulated to be involved in protection of plants during photo-oxidation. This work focuses on investigating the protection role during photooxidation, also researches about the possible functional role as zeaxanthin binding protein by involving in the  $\beta$ -carotenoid biosynthesis pathway and also as possible excessive light energy dissipater.

To study the objective, lutein free *lut2* mutant from *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija was produced containing *elip*-mRNA in the antisense direction. Based on the hypothesis it is expected to have a light sensitive phenotype impaired in the  $\alpha$ - and also in  $\beta$ -carotenoid biosynthesis. During the characterization of transformed plants, one plant showed reduction in *elip* induction, but could not be differentiated phenotypically between wild and *lut2* mutants. No mutant lines with partial or full inhibition of ELIPs could be found. The possible explanation for such low rate of transformation might be due to the fatal effect in the phenotype even during the germination stage of the plants.

*Vitis vinifera* cv. Sultanina was selected as second experimental plant to analyse the ELIP expression and the composition of the pigments. Due to its natural growing habitat *Vitis vinifera* has developed tolerance to high light intensity.

Search through database revealed at least one *elip*-gene in *Vitis vinifera*. This *elip*-gene has been isolated and sequenced. Characterization of the gene product, the ELIP protein is in progress.

To analyse the cross-induction of antibody raised using Pea-ELIP against ELIP protein from *Vitis vinifera*, various experimental conditions with high light and chilling stress were employed in combination of the development of a leaf at these above said conditions. In parallel changes in the pigment composition were determined. Highest concentrations of ELIP and zeaxanthin accumulation could be seen with in the young leaves grown under higher light intensity and moderate temperature. Synergetic effect of both high light and cold stresses could not be established as the reports describe about till yet experimented plants.

Initial mRNA-analysis in the plants grown under high light and chilling stress reveals an unchanged or even little higher *elip*-transcription than under moderate temperature, whereas the protein accumulation is seen at the late growth period during chilling temperature. These two different results probably are due to two way-regulation of transcription and translation.

These results of *Vitis vinifera* signifies additional protective functions inspite of its abundance during chilling stress. The answer to light stress might be linked with the development stages of a leaf. The concomitant correlation between ELIP accumulation and zeaxanthin biosynthesis should be followed through in further investigations.

**Schlagworte:**

ELIP, Xanthophyllzyklus, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*

**Keywords:**

ELIP, xanthophyll cycle, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1.1. Photosynthese der Höheren Pflanzen</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Photoinhibition</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Schutzmechanismen</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Carotinoide und Xanthophyllzyklus</b>	<b>9</b>
<b>1.5. ELIP-Proteine</b>	<b>15</b>
1.5.1. Struktur der ELIP-Proteine	18
1.5.2. ELIP-ähnliche Proteine	19
1.5.3. Mögliche Funktionen des ELIP	20
<b>1.6. Ziele der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<hr/>	
<b>2.1. Verwendete Materialien und Reagenzien</b>	<b>23</b>
2.1.1. Chemikalien	23
2.1.2. Kits	25
2.1.3. Marker	25
<b>2.2. Pflanzenanzucht und Hochlichtbedingungen</b>	<b>25</b>
2.2.1. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Wassilewskija auf Erde	25
2.2.2. Anzucht von <i>Vitis vinifera</i> cv. Sultanina	26
2.2.3. Hochlichtbehandlung	26
2.2.3.1. Kurzzeitige Lichtstressbehandlungen	26
2.2.3.2. Langzeit-Experimente	27
<b>2.3. Protein-Isolierung</b>	<b>27</b>
2.3.1. Isolierung von Gesamt-Proteinextrakt	27
2.3.2. Bestimmung des Proteingehaltes	28
2.3.2.1. Esenschnelltest	28
2.3.2.2. Proteinbestimmung nach Lowry <i>et al.</i> (1951), modifiziert	28

<b>2.4. Protein-Gelelektrophorese</b>	<b>29</b>
2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970)	29
2.4.2. Färbung von SDS-Gelen	30
2.4.2.1. Coomassie Färbung	30
2.4.2.2. Coomassie-kolloidal Färbung nach Neuhoff (1988)	30
2.4.2.3. Silberfärbung nach Blum <i>et al.</i> (1987), modifiziert	31
<b>2.5. Immunologischer Proteinnachweis</b>	<b>32</b>
2.5.1. Western-Blot nach Towbin <i>et al.</i> (1979)	32
2.5.2. Strippen von Nitrocellulosemembranen	34
2.5.3. Bestimmung der Molaren Masse von Proteinen	34
<b>2.6. Nukleinsäuren-Isolierung</b>	<b>35</b>
2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA	35
2.6.1.1. Plasmid-Minipräparation	35
2.6.1.2. Plasmid-Minipräparation über eine Säule	36
2.6.2. Isolierung genomischer DNA	36
2.6.2.1. Isolierung von genomischer DNA nach Doyle und Doyle (1990), modifiziert	36
2.6.2.2. Minipräparation von genomischer DNA	37
2.6.3. Isolierung von Gesamt-RNA	38
2.6.4. DNase-Verdau isolierter Gesamt-RNA	38
2.6.5. Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren	39
2.6.6. DNA-Agarosegelelektrophorese	39
2.6.6.1. Native Gelelektrophorese	39
2.6.6.2. Denaturierende Agarosegelelektrophorese	40
2.6.7. RNA-Agarosegelelektrophorese	41
2.6.8. DNA-Elution aus Agarosegelelektrophoresen	42
<b>2.7. Analyse von Nukleinsäuren</b>	<b>42</b>
2.7.1. Southern- und Northern-Blot	42
2.7.2. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde	43
2.7.3. Hybridisierung	44

<b>2.8. Pigment-Analyse</b>	<b>45</b>
2.8.1. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	45
2.8.2. Pigmentextraktion	46
2.8.3 Gradientenelution	47
2.8.4. Berechnung der Pigmentmenge	47
2.8.5. Bestimmung des EPS-Wertes	48
2.8.6. Photometrische Pigmentbestimmung	48
<b>2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>	<b>49</b>
2.9.1. verwendete Oligonukleotide	49
2.9.2. PCR	50
2.9.3. RT-PCR	51
<b>2.10. DNA-Modifizierung</b>	<b>52</b>
2.10.1. Plasmide	52
2.10.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	52
2.10.3. Ligation mit T4-DNA-Ligase	53
2.10.4. Auffüllen von Überhängen mit T4-DNA-Polymerase	54
2.10.5. Einschnitt-Klonierung	55
<b>2.11 Bakterienkultur</b>	<b>55</b>
2.11.1 Bakterienstämme	55
2.11.2. Bakterienkultur und Antibiotika	56
2.11.2.1. Flüssigkultur	56
2.11.2.2 Kultur auf Agar	56
2.11.2.3. Herstellung von Glycerindauerkulturen	57
2.11.2.4. Blau-Weiß-Screening positiv rekombinanter Klone	<b>57</b>
<b>2.12. Bakterientransformation</b>	<b>57</b>
2.12.1. Herstellung von elektrokompetenten Zellen von <i>E.coli</i> nach Sambrook <i>et al.</i> (1989)	57
2.12.2. Herstellung von kompetenten Zellen von <i>A.tumefaciens</i> nach Höfgen und Willmitzer (1988)	58
2.12.3. Bakterientransformation	58
2.12.3.1. Elektroporation von <i>E.coli</i>	58
2.12.3.2. Gefrierschocktransformation von <i>A.tumefaciens</i> nach Höfgen und Willmitzer (1988)	59

<b>2.13. Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Wassilewskija</b>	<b>59</b>
2.13.1. Vakuum-Infiltration nach Bechtold <i>et al.</i> (1993), modifiziert	59
2.13.2. Sterilanzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	61
2.13.3. Kallusvermehrung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<hr/>	
<b>3.1. Untersuchungen bei <i>Vitis vinifera</i> cv. Sultanina</b>	<b>63</b>
3.1.1. Charakterisierung der ersten 10 Blätter eines Triebes von <i>Vitis vinifera</i>	63
3.1.1.1. Äußeres Erscheinungsbild	63
3.1.1.2. Bestimmung der Pigmentzusammensetzung	67
3.1.2. Sequenzanalyse des <i>elip</i> -Gens	70
3.1.2.1. Herstellung der <i>elip</i> -Klone und Sequenzierung	70
3.1.2.2. Multiples Alignment verschiedener ELIP-Proteine	76
3.1.3. Biochemische Charakterisierung	81
3.1.3.1. Bestimmung der apparenten Molaren Masse des reifen ELIP- Proteins	81
3.1.3.2. Überprüfung der <i>elip</i> -Transkription bei Hochlicht	82
3.1.3.3. Quantifizierung der Kopienzahl des <i>elip</i> -Gens im Genom	83
3.1.4. Hochlichtexperimente	85
3.1.4.1 Expression des ELIP-Proteins	85
3.1.4.2 Analyse der Pigmentzusammensetzung	93
<b>3.2. Untersuchungen zur Funktion des ELIP-Proteins bei <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>106</b>
3.2.1. Herstellung eines <i>elip</i> -Antisense-Konstruktes für die Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	106
3.2.1.1. Überprüfung der luteinfreien Mutante <i>lut2</i> von <i>Arabidopsis thaliana</i> cv. Wassilewskija	107
3.2.1.2. Amplifizierung der <i>elip</i> cDNA	108
3.2.1.3. Zwischenklonierung in den Vektor pGEM-T	110
3.2.1.4. Umklonierung in den Vektor pART7	111
3.2.1.5. Überprüfung der Insertorientierung	114
3.2.1.6. Klonierung der Expressionskassette von pART7 in den binären Vektor pBinHygTX	115

3.2.1.7. Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV 3101	117
3.2.2. Vakuuminfiltration von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Saatgutgewinnung	118
3.2.3. Aussaat des gewonnenen Saatguts auf Hygromycin	118
3.2.4. Kallusvermehrung der hygromycinresistenten Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	119
3.2.5. Überprüfung der auf Hygromycin gewachsenen <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
3.2.6. Charakterisierung der transgenen Doppelmutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
<b>4. Diskussion</b>	<b>126</b>
<hr/>	
<b>4.1. Untersuchungen zur ELIP-Funktion bei <i>Vitis vinifera</i></b>	<b>128</b>
4.1.1. Analyse der Genstruktur des elips bei <i>Vitis vinifera</i> cv. Sultanina	130
4.1.2. Abhängigkeit der Induktion des ELIP-Proteins und der Pigment- zusammensetzung von variierenden Licht- und Temperaturverhältnissen	132
<b>4.2. Untersuchungen zur ELIP-Funktion bei <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>138</b>
<b>5. Literaturverzeichnis</b>	<b>144</b>
<hr/>	

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
<sup>32</sup> P	Radioaktives Phosphorisotop
<sup>3</sup> P680	Tripletchlorophyll
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
APX	Ascorbatperoxidase
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
Cab	Chlorophyll a/b-bindend
Cbr	ELIP-ähnliches Protein aus <i>Dunaliella bardawil</i>
cDNA	komplementäre DNA
CIM	kallusinduzierendes Medium
cm	Zentimeter
cpm	Impulse pro Minute
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium Bromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Aminosäuresequenz
cv.	Kultivar
D1, D2	Proteine des Reaktionszentrum vom Photosystem II
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleositriphosphat
Dsp	ELIP-ähnliches Protein aus <i>Craterostigma plantagineum</i>
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELIP	early light-inducible protein
EST	expressed sequence tag
GA <sub>3</sub>	Gibberellinsäure
HL	Hochlicht

HLIP	high light-inducible protein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Indolyl-3-Essigsäure
IBA	Indol-3-Buttersäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LHCI bzw. LHCII	Lichtsammelkomplexe von PSI und PSII
LL	Niedriglicht
<i>lut2</i>	Luteinmutante
m	Meter
M	Mol
mA	Milliampere
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
Min.	Minute / Minuten
ml	Milliliter
MOPS	3-(N-Morpholin)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Skoog
MW	Molekulargewicht
NAA	1-Naphthylessigsäure
NADP	Nicotinamid-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblue Tetrazoliumsalz
NCBI	National Center of Biological Informatics
NPQ	Nichtphotochemische Löschung von Energie
N-Terminus	Amino-Terminus einer Aminosäuresequenz
OD	Optische Dichte
P680	Chlorophyll a-Molekül im Reaktionszentrum des PSII
P700	Chlorophyll a-Molekül im Reaktionszentrum des PSI
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PSI bzw. PSII	Photosystem I und II
PVDF	Polyvenylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub>	Plastochinakzeptoren des PSII
RIM	Wurzelinduzierendes Medium
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP-HPLC	Umkehrphasen-Chromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasenkettenreaktion

SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde / Sekunden
SEM	Sprosstreckungsmedium
SIM	Sprossinduzierendes Medium
SOD	Superoxiddismutase
SSU	kleine Untereinheit der Rubisco
Std.	Stunde / Stunden
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMN	Tris-Magnesium-Natriumchlorid-Puffer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
u	units
üN-Kultur	über-Nacht-Kultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
V <sub>f</sub>	Verdünnungsfaktor
Vol	Volumeneinheiten
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylgalactosid

### Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
<b>Unpolare Aminosäuren</b>		
Alanin	Ala	A
Glycin	Gly	G
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V
<b>Polare Aminosäuren</b>		
Asparagin	Asn	N
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
<b>Positiv geladene Aminosäuren</b>		
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K
<b>Negativ geladene Aminosäuren</b>		
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E

## Genetischer Code

Erster Buchstabe	Zweiter Buchstabe				Dritter Buchstabe
	U	C	A	G	
U	Phenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	U
	Phenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	C
	Leucin	Serin	Stop	Stop	A
	Leucin	Serin	Stop	Tryptophan	G
C	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	U
	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	C
	Leucin	Prolin	Glutamin	Arginin	A
	Leucin	Prolin	Glutamin	Arginin	G
A	Isoleucin	Threonin	Asparagin	Serin	U
	Isoleucin	Threonin	Asparagin	Serin	C
	Isoleucin	Threonin	Lysin	Arginin	A
	Methionin (Start )	Threonin	Lysin	Arginin	G
G	Valin	Alanin	Aspartat	Glycin	U
	Valin	Alanin	Aspartat	Glycin	C
	Valin	Alanin	Glutamat	Glycin	A
	Valin	Alanin	Glutamat	Glycin	G

## **1. Einleitung**

### **1.1. Photosynthese der Höheren Pflanzen**

Die Photosynthese ist der primäre Stoffwechselprozess photoautotropher Organismen, in der die Umwandlung der absorbierten Lichtenergie in chemische Energie erfolgt. Unter Verbrauch von Kohlendioxid und Wasser werden in der oxygenen Photosynthese der Höheren Pflanzen Kohlenhydrate und Sauerstoff produziert. Dabei ist die Photosynthese in zwei miteinander verknüpfte Reaktionen einzuteilen: die Primärreaktion (Elektronentransportkette), in der die Reduktionsäquivalenten  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  und die Energieäquivalenten ATP unter der Spaltung von Wasser und der Synthese molekularen Sauerstoffs gebildet werden und der Sekundärreaktion (Calvin-Zyklus), in dem die Reduktion des Kohlendioxids unter der Bildung von Kohlenhydraten erfolgt. Beide Reaktionsschritte sind in den Chloroplasten lokalisiert, wobei die Komponenten der Primärreaktion in der Thylakoidmembran und die Komponenten der Sekundärreaktion im Stroma zu finden sind. An der Primärreaktion der Höheren Pflanzen sind mehrere Multiproteinkomplexe beteiligt: die beiden Photosysteme II und I mit den dazugehörigen Lichtsammelantennen, der Cytochrom  $b_6/f$ - und der  $\text{CF}_1/\text{CF}_0$ -Komplex, auch ATP-Synthetase-Komplex genannt. Für den PSII-Komplex wurden bislang 30 Proteine identifiziert, aus denen er aufgebaut ist (Shi und Schröder, 2004). Dabei kann er in zwei weitere Untereinheiten eingeteilt werden, die aus jeweils mehreren Proteinkomplexen zusammengesetzt sind: den Lichtsammelantennen und dem Core-Komplex. Das Lichtsammlersystem des PSII ist aus insgesamt 6 unterschiedlichen chlorophyll a/b-bindenden LHCII-Polypeptiden („light harvesting complex“) aufgebaut (Thornber *et al.*, 1991). Die Hauptkomponente der LHCII-Antennen ist LHCIIB, welches in seiner nativen Form als Trimer vorliegt und etwa 60% aller Chlorophylle des PSII, aber auch Xanthophylle bindet. LHCIIB ist aus zwei unterschiedlichen Polypeptiden aufgebaut, die durch die Gene *lhcb1* und *lhcb2* kodiert werden. Ein drittes Genprodukt, *lhcb3*, scheint auch mit dem LHCIIB assoziiert zu sein. Sowohl Homotrimere als auch Heterotrimere können für das LHCIIB auftreten. Die Struktur des LHCIIB-Monomers konnte durch hochauflösende Elektronenkristallographie weitestgehend geklärt werden (Kühlbrandt *et al.*, 1994), so dass auch Aussagen über vorhandene mögliche Chlorophyll- und Carotinoidbindungsstellen getroffen werden konnten.

Jedes LHCIIb-Monomer ist charakterisiert durch 3 transmembrane Domänen, wobei die beiden Helices I und III durch Ionenpaarbindungen zusammengehalten werden, welche aus geladenen Aminosäure-Reste resultieren. Diese scheinen auch für die Chlorophyllbindung verantwortlich zu sein. Neben Histidinresten sind besonders Asparagin- und Glutaminreste an diesen Ionenpaarbindungen beteiligt. Sequenzvergleiche zeigten, dass die beiden Helices I und III zueinander homolog sind. Während die Chlorophyll a-Moleküle im Zentrum des Monomers lokalisiert sind, scheinen die Chlorophyll b-Moleküle am Rande des Komplexes angeordnet zu sein. Die Involvierung eines Threoninrestes am Polypeptid in der proteinkinasenvermittelten Phosphorylierung wird diskutiert, welche eine Adaptation an kurzzeitige Änderungen an Lichtbedingungen ermöglicht (siehe auch 1.3.). Zusätzlich wurden zentral im Monomer 2 Luteinmoleküle identifiziert, deren Isoprenoidketten sich überkreuzen. Ihnen wird eine Bedeutung in der Stabilisierung der LHC-Polypeptide in der Thylakoidmembran zugesprochen (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Auch weitere Xanthophylle scheinen mit dem LHCII assoziiert zu sein, jedoch in weitaus geringeren Gehalten als Lutein. Bei einem nicht-reduzierten Plastochinonpool finden sich noch Violaxanthin und Neoxanthin in dem LHCII. Die Struktur aller LHCII-Polypeptide scheint identisch zu sein, da die Sequenzähnlichkeiten untereinander sehr hoch sind. Die 3 kleineren LHCII-Polypeptide, LHCIIa (CP29), LHCIIc (CP26) und LHCII d (CP24) liegen jedoch, anders als die LHCIIb-Polypeptide, als Monomere vor. Strukturüberlegungen führen zu der Annahme, dass die 3 kleineren Polypeptide die Verbindung zwischen den LHCIIb und dem Core-Komplex des PSII darstellen.

Der Core-Komplex wird aus dem Reaktionszentrum, dem Cytochrom  $b_{559}$ -Komplex, den beiden intrinsischen Lichtsammelantennen CP47 und CP43 (Green, 1988) und verschiedenen peripheren Polypeptiden aufgebaut, von denen 3 Bestandteile des wasseroxidierenden Core-Komplexes sind. Das Reaktionszentrum besteht aus einem Heterodimer der beiden Proteine D1 und D2. An ihnen sind die redoxaktiven Komponenten der photosynthetischen Elektronentransportkette des PSII gebunden, welche aus einem Chlorophyll a-Dimer (P680), 2 Molekülen Pheophytin, je 1 Molekül Plastochinon  $Q_A$  und  $Q_B$  und einem funktionellen Tyrosin-Rest Y159 des D1-Proteins bestehen.

Die Absorption der Lichtenergie erfolgt in den Lichtsammelantennen des PSII. Hier wird die Energie durch Resonanztransfer von den Carotinoiden und den Chlorophyllen auf den primären Elektronendonator P680, ein Chlorophyll a-Dimer, geleitet. Das angeregte P680\* leitet ein Elektron an den primären Elektronenakzeptor Pheophytin weiter und wird

dadurch zum  $P680^+$  oxidiert. Die primäre Ladungstrennung wird durch einen schnellen Elektronentransfer auf Plastochinon  $Q_A$  unter der Bildung des Radikalpaars  $P680^+-Q_A^-$  stabilisiert. Der Energietransfer auf einen zweiten Plastochinakzeptor,  $Q_B$ , verläuft dagegen langsamer. Erst durch eine zweite Ladungstrennung und dem Elektronentransfer auf  $Q_B$  wird dieses zweifach protoniert und verlässt als Plastohydrochinon das Reaktionszentrum zum Plastochinonpool der Thylakoidmembran. Der nachfolgende Elektronenakzeptor für den reduzierten Plastochinonpool ist der Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex, der aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist. An diesem Komplex wird ein gebundenes Plastocyanin reduziert, bei dem es sich um ein mobiles, wasserlösliches Redoxsystem handelt, welches eine Verbindung zwischen dem Cytochrom  $b_{559}$ -Komplex und dem PSI darstellt. Durch eine weitere lichtinduzierte Ladungstrennung am  $P700$  des PSI werden die Elektronen auf eine Kaskade von hintereinander geschalteten Akzeptormolekülen übertragen und letztendlich auf den Endakzeptor  $NADP^+$  geleitet, der dann in die Sekundärreaktion, dem Calvin-Zyklus eintritt. Da  $P680^+$  mit +1,1 V ein sehr starkes Oxidationsmittel ist, können Elektronen direkt aus dem Wasser über einen redoxaktiven Tyrosylrest ( $Tyr_Z$ ) des D1-Proteins und einem Cluster von 4 Manganionen aufgenommen werden (Debus, 1992). Während der Oxidation des Wassers zur Bildung eines Moleküls Sauerstoff durchlaufen die Mangancluster fünf unterschiedliche Redoxzustände  $S_0 - S_4$  (Aro *et al.*, 1993).

Der über die Elektronentransportkette aufgebaute transmembrane Protonengradient, resultierend aus der Photolyse des Wassers auf der Lumenseite der Thylakoidmembran, dem Elektronenfluss durch den Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex und der Reduktion des  $NADP^+$  auf der Stromaseite, dient der ATP-Synthetase, Energieäquivalenten in Form von ATP für nachfolgende Stoffwechselprozesse bereitzustellen.

## 1.2. Photoinhibition

Die Kapazität der photosynthetischen Elektronentransportkette ist nicht unbegrenzt, sie kann jedoch in Abhängigkeit von wechselnden Umweltbedingungen langfristig variieren. Steigt mit zunehmender Lichtintensität die Absorption von Lichtquanten, werden die Komponenten der Elektronentransportkette reduziert, d. h. die gebildeten Äquivalenten  $NADPH+H^+$  und ATP können im anschließenden Calvin-Zyklus nicht mehr oxidiert werden. Als Folge wird das Photosynthesesystem zunehmend reduziert (Miyaki und Yokota, 2000) und die von den Chlorophyllen absorbierte Energie in den Lichtsammelantennen kann nicht mehr abgegeben werden. Bei einem nichtreduzierten

Plastochinonpool ist die Lebensdauer des angeregten Chlorophylls, dem Singulettchlorophyll, sehr kurz. Kann es jedoch die Energie nicht mehr weitergeben, so geht es unter der Abgabe eines Teils der Anregungsenergie in den Triplettzustand über. Triplettchlorophylle haben eine deutlich höhere Lebensdauer als Singulettchlorophylle und sind in der Lage, ihre Energie auf molekularen Sauerstoff zu übertragen. Der gebildete Singulett-Sauerstoff und die daraus resultierenden Sauerstoffverbindungen wie Hydrogenperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Superoxidanion ( $\text{O}_2^-$ ) und Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ) können zu oxidativen Schäden in den Zellen führen. Besonders betroffen sind Proteine und Lipide. Innerhalb der Lipide können reaktive Sauerstoffspezies Lipidperoxidationen auslösen, die autokatalytisch eine Kettenreaktion hervorrufen. Um diese Schäden zu minimieren, haben Pflanzen zahlreiche Schutzmechanismen entwickelt, die in 1.3. vorgestellt werden. Nehmen die oxidativen Schäden zu und übersteigen sie die Kapazität der vorhandenen Schutzmechanismen, führen diese langfristig zu einem Verlust der photochemischen Effizienz und zu einer irreversiblen Schädigung der einzelnen Multienzymkomplexe (= Photoinhibition). Das Ausmaß der Schäden ist gravierender, wenn zwei Stressoren gleichzeitig wirken. So konnte für die Faktoren Licht- und Kältestress eine synergistische Wirkung beschrieben werden. Besonders stark betroffen ist dabei das D1-Protein (Prasil *et al.*, 1992). Beschädigte D1-Proteine können jedoch degradiert und neu synthetisiert wieder in den PSII-Komplex eingebaut werden. Während funktionsfähige PSII-Komplexe in den gestapelten Granabereichen angeordnet sind, vermuten Prasil *et al.* (1992) eine Lokalisation der Reparatur beschädigter PSII-Komplexe in den ungestapelten Bereichen der Thylakoide.

Für die Photoinhibition wurden bislang *in vitro* 2 verschiedene Mechanismen beschrieben: eine Photoinhibition auf der Donorseite des PSII und eine auf der Akzeptorseite (Aro *et al.*, 1993; Ohad *et al.*, 1994). Beide Mechanismen wurden bislang nur *in vitro* beschrieben, *in vivo*-Nachweise fehlen. Eine Donorseiteninhibition tritt ein, wenn die Zahl der Elektronen, die das PSII verlassen, höher ist als die Rate der Elektronen, die von der Donorseite aus geliefert werden. Beobachtet wurde dieses Phänomen, wenn die wasserspaltenden Reaktionen unterbrochen sind (Demeter *et al.*, 1987; Jegerschöd *et al.*, 1990). Als Konsequenz wird die Lebenszeit des oxidierten primären Elektronendonors  $\text{P680}^+$  deutlich erhöht, was zu einer Oxidierung benachbarter Pigmente, Redoxkomponenten oder Aminosäuren führen kann (Barber und Andersson, 1992; Telfer *et al.*, 1991). Während dieser Mechanismus sauerstoffunabhängig ist, läuft *in vitro* die Akzeptorseiteninhibition nur unter aeroben Bedingungen ab. Starke Belichtungen führen

zu einer Überreduktion des Plastochinonpools in der Membran. Aus dieser Überreduktion resultiert ein Mangel an reduzierbaren Plastochinon  $Q_B$ .  $Q_A$ , unter nichtreduzierenden Bedingungen kurzlebig, kann die Elektronen daraufhin nicht mehr an ein Akzeptormolekül weitergeben. Durch eine zweite Reduktion dieses Plastochinons und einer zweifachen Protonierung wird der Zustand des  $Q_AH_2$  stabilisiert. Dieses kann die Bindungsstelle irreversibel am PSII verlassen. Durch eine weitere Ladungstrennung am PSII kann Pheophytin reduziert und das Radikalpaar  $P680^+-Pheo^-$  gebildet werden, was zu einem Triplettzustand des P680 führt. Durch Reaktion mit Sauerstoff kann das Triplett  $^3P680$  zu oxidativen Schäden in den Zellen führen.

Da die oxygene Photosynthese mit der Bildung von reaktiven Nebenprodukten gekoppelt ist, die zu Schäden in den Chloroplasten führen würden, sind auch unter normalen Wachstumsbedingungen Schutzmechanismen notwendig. Prasil *et al.* (1992), Aro *et al.* (1993) sowie Andersson und Barber (1996), beschrieben eine Involvierung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Beschädigung des PSII, welches im Vergleich zum PSI bevorzugt betroffen ist. Als Ursache wird eine geringere Stabilität des PSII unter Lichtstressbedingungen diskutiert (Powles, 1984). Darin ist besonders das D1-Protein des Reaktionszentrums involviert (Aro *et al.*, 1993; Ohad *et al.*, 1984). Um die Aktivität der Photosynthese zu erhalten, muss eine Degradation des beschädigten D1-Proteins und eine *de novo*-Synthese neuen Proteins erfolgen. Während aktives PSII in den Granabereichen der Chloroplasten lokalisiert ist, konnten inaktivierte, beschädigte PSII-Proteinkomplexe in den ungestapelten Regionen gefunden werden (Prasil *et al.*, 1992), was zu der Annahme führte, dass die Biodegradation und *de novo*-Synthese neuen Proteins dort lokalisiert ist. Der Prozess des Abbaus beschädigter D1-Proteine und der *de novo*-Synthese neuer Proteine findet auch unter normalen Lichtbedingungen statt. Der Umsatz dieser Proteine steigt jedoch mit zunehmender Lichtintensität. Dabei kann die Lebenszeit eines D1-Proteins bis auf weniger als 30 Min. abnehmen (Greenberg *et al.*, 1987). Übersteigt die Menge beschädigter PSII-Komplexe die Kapazität der Reparaturmechanismen, führt dies zu der oben genannten Photoinhibition, der Abnahme der Netto-Photosyntheserate. Einen Zusammenhang zwischen der D1-Degradation und der Konzentration an ROS konnten sowohl *in vitro* als auch bei *Synechocystis* sp. PCC6803 *in vivo* nachgewiesen werden (Chen *et al.*, 1992; Ananyev *et al.*, 1992; Miyao *et al.*, 1995;). Aber nicht nur das D1-Protein wird beschädigt, sondern auch die anderen Untereinheiten des PSII-Komplexes, wobei diese Prozesse deutlich langsamer ablaufen. So konnte auch für das D2-Protein ein lichtinduzierter Abbau und eine Synthese neuen Proteins, wenn auch sehr

langsam, nachgewiesen werden (Prasil *et al.*, 1992). Neben der Beschädigung des PSII kann auch das PSI von photooxidativen Schäden betroffen sein. Bereits 1970 diskutierte Satoh eine Lichtempfindlichkeit dieses Photosystems anhand ermittelter Resultate von *in vitro*-Experimenten. Auch *in vivo* konnte eine Lokalisation von Antioxidantien nahe des PSI beschrieben werden (Asada, 1994a; Ogawa *et al.*, 1995; Miyake und Asada, 1992), zu denen die Enzyme Superoxiddismutase und Ascorbatperoxidase zählen. Kältesensitive Pflanzen wie die Kartoffel zeigen bereits bei niedrigen Temperaturen unter Schwachlichtbedingungen eine signifikantere Photoinhibition des PSI im Vergleich zum PSII (Havaux und Davaud, 1994; Sonoike *et al.*, 1995). Als Ursache wird hierfür eine abnehmende Kohlendioxidfixierung bei verringerten Temperaturen vermutet, was zu einer starken Reduktion der Akzeptorseite des PSI führt.

### **1.3. Schutzmechanismen**

Obwohl das Vorhandensein von Licht für photoautotrophe Organismen essentiell ist, liefert die oxygene Photosynthese reaktive Nebenprodukte, die oxidative Schäden in den Zellen hervorrufen können (Asada, 1994a). Zur Minimierung dieser Schäden und zur Vermeidung der daraus resultierenden Photoinhibition haben alle photosynthetisch aktive Organismen ein weitreichendes Netz an Schutzmechanismen entwickelt. Zu ihnen kann auch die negative Phototaxis, die Bewegung von der Lichtquelle weg, gezählt werden, von der entweder nur die Chloroplasten oder auch ganze Blätter betroffen sein können. Aber auch eine Veränderung der Antennengröße in beiden Photosystemen in Abhängigkeit von der eingestrahnten Lichtenergie wird beschrieben. So kann eine Langzeitakklimatisierung an höhere oder auch niedrigere Lichtintensitäten in einer veränderten LHCI-Genexpression (Escoubas *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1995) oder einer Degradation der Proteine (Lindahl *et al.*, 1995) resultieren. Aber auch kurzzeitige Veränderungen konnten bei wechselnden Umweltbedingungen beschrieben werden, die zu einer Neuverteilung der Energie zwischen dem PSII und dem PSI führt. Der höhere Anregungszustand des PSII im Vergleich zum PSI führt zu einer Überreduktion des Plastochinonpools in der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Daraus resultiert die Aktivierung einer Kinase, welche die peripheren LHC-Polypeptide phosphoryliert. Dies ermöglicht eine Trennung von dem PSII und eine laterale Bewegung, die zu einer Umverteilung der Anregungsenergie führt. Eine direkte Involvierung dieses Prozesses in die Photoprotektion wird jedoch noch diskutiert, da die Kinase offensichtlich bei extremen Lichtbedingungen deaktiviert wird (Demmig *et al.*, 1987; Rintamäki *et al.*, 1997). Auch eine langfristige

Akklimatisierung der photosynthetischen Elektronentransportrate an wechselnde Umweltbedingungen wird beschrieben. Durch eine Änderung von Enzymaktivitäten oder wechselnder Genexpression kann die Kapazität des linearen Elektronentransportes reguliert werden.

Ein wichtiger Schutzmechanismus photosynthetisch aktiver Organismen ist die thermische Dissipation überschüssiger Lichtenergie (NPQ). Ein durch Hochlicht aufgebaute transmembraner Protonengradient ( $\Delta\text{pH}$ ) in den Chloroplasten führt zu einer Löschung der überschüssigen Lichtenergie innerhalb des PSII in Wärme (Björkman und Demmig-Adams, 1994; Demmig-Adams, 1990; Demmig-Adams und Adams, 1992), was durch einen Temperaturanstieg der Blätter gemessen werden kann. Der Anstieg des  $\Delta\text{pH}$  führt zu einer Protonierung spezifischer LHC-Polypeptide, dem CP26 und dem CP29 (Crofts, 1994; Horton und Ruban, 1994; Walters *et al.*, 1994), und der Aktivierung des sich frei im Lumen befindlichen Enzyms Violaxanthin-De-Epoxidase, das im sogenannten Xanthophyllzyklus die Umwandlung des Xanthophylls Violaxanthin in Zeaxanthin katalysiert. Der detaillierte Mechanismus dieses Prozesses wird in 1.4. beschrieben. Sowohl die Bindung des Zeaxanthins als auch die Protonierung führen zu einer Konformationsänderung der Lichtsammelantennen, was an einer Änderung der Absorption gemessen werden kann (Bilger und Björkman, 1990; Bilger und Björkman, 1994; Ruban *et al.*, 1993). Als Folge dieser Konformationsänderung wird keine Lichtenergie mehr in den Lichtsammelantennen absorbiert, sondern überschüssige Energie in Wärme abgegeben.

Die sogenannte „Mehler-Reaktion“ (Mehler, 1951), auch als „Wasserzyklus“ oder „Pseudozyklischer Elektronentransport“ bezeichnet, ermöglicht einen Verbrauch überschüssiger Elektronen und Sauerstoff innerhalb des PSI. Durch Übertragung von Elektronen des Reduktionsmittels Ferredoxin auf molekularen Sauerstoff wird Superoxidanion auf der Akzeptorseite des PSI produziert. Die Entgiftung dieses Radikals erfolgt in nacheinander geschalteten enzymatischen Reaktionen mit den Enzymen Superoxiddismutase (SOD) und Ascorbatperoxidase (APX) unter der Bildung von  $\text{H}_2\text{O}$  und Monodehydroascorbat. Letzteres wird anschließend reduziert und Ascorbat regeneriert (Asada, 1994b; Asada, 1999). Dieser Prozess ermöglicht den Verbrauch von jeweils 4 Elektronen, bei dem keine Reduktionsäquivalente  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  gebildet, jedoch ein transmembraner Protonengradient aufgebaut wird. Dieser dient der Aktivierung der ATP-Synthetase und der nichtphotochemischen Energielöschung.

In der Photorespiration wird unter Lichteinfluss ebenfalls molekularer Sauerstoff unter der Bildung von Kohlendioxid verbraucht. Als Substrat dient Ribulose-bisphosphat, welches

von dem Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase entweder carboxyliert oder oxidiert werden kann. Die Carboxylierung des Substrates erfolgt im Calvin-Zyklus bei hohen CO<sub>2</sub>-Partialdrücken, während die Oxidierung bei hohen O<sub>2</sub>-Partialdrücken auftritt. Die Bedeutung der Photorespiration für den Schutz vor photooxidativen Schäden ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch führten Untersuchungen an Mutanten der Photorespiration zu einer verstärkten Photoinhibition (Artus *et al.*, 1986; Kozaki und Takeba, 1996). Auch ein zyklischer Elektronentransport wird sowohl für das PSII als auch für das PSI beschrieben, wobei *in vivo* der Nachweis des zyklischen Weges im PSII noch nicht erfolgte. *In vitro* konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Untereinheit des PSII, das Cytochrom b<sub>559</sub>, Pheo<sup>-</sup> oxidieren oder P680<sup>+</sup> reduzieren kann. Beide Komponenten können innerhalb des PSII zu starken oxidativen Schäden führen. Im zyklischen Elektronentransport des PSI dagegen wird ein bedeutender photoprotektiver Schutz gesehen. Zum einen wird mit Hilfe dieses Mechanismus die überschüssige absorbierte Lichtenergie des PSI gelöscht, und zum anderen wird der Protonengradient innerhalb der Thylakoidmembran beibehalten, der zu einer thermischen Dissipation im PSII führt (Heber und Walker, 1992).

Aber auch die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies durch zahlreiche Moleküle zählt zu den in den photoautotrophen Organismen vorhandenen Schutzmechanismen. Bei den Carotinoiden handelt es sich um membrangebundene Antioxidantien. Ihre Funktion in den Zellen ist essentiell, da Mutanten, die in der Carotinoidbiosynthese gestört sind, einen letalen Phänotyp aufweisen (Anderson und Robertson, 1960; Sager, 1958). Dabei werden den Carotinoiden sowohl eine Funktion als akzessorische Pigmente als auch eine Funktion im Quenchen von Singulett- und Triplettchlorophyll zugeschrieben (1.4.).

Tocopherol ist ebenfalls ein membrangebundenes Antioxidant der Chloroplasten. Das wichtigste Tocopherol ist dabei  $\alpha$ -Tocopherol (= Vitamin E), welches für die Entgiftung von Singulett-Sauerstoff, Superoxidanion und Hydroxylradikalen verantwortlich ist und somit die Oxidation der Lipide minimiert (Foyer, 1994). Auch wird eine Funktion des  $\alpha$ -Tocopherols in der Beendigung der Kettenreaktion autokatalytischer, durch reaktive Sauerstoffspezies initiierte Lipidperoxidationen durch die Bildung eines  $\alpha$ -Tocopherylradikals diskutiert (Fryer, 1992). In die Regeneration des  $\alpha$ -Tocopherols scheint sowohl Ascorbat, als auch, nach neueren Untersuchungen, Zeaxanthin involviert zu sein (Havaux und Niyogi, 1999). Es wird zudem angenommen, dass die Anwesenheit des  $\alpha$ -Tocopherols in der Thylakoidmembran die Fluidität und Stabilität der Lipidmatrix beeinflusst (Fryer, 1992), welche ausschlaggebend für die Sauerstoffdurchlässigkeit der Membran ist.

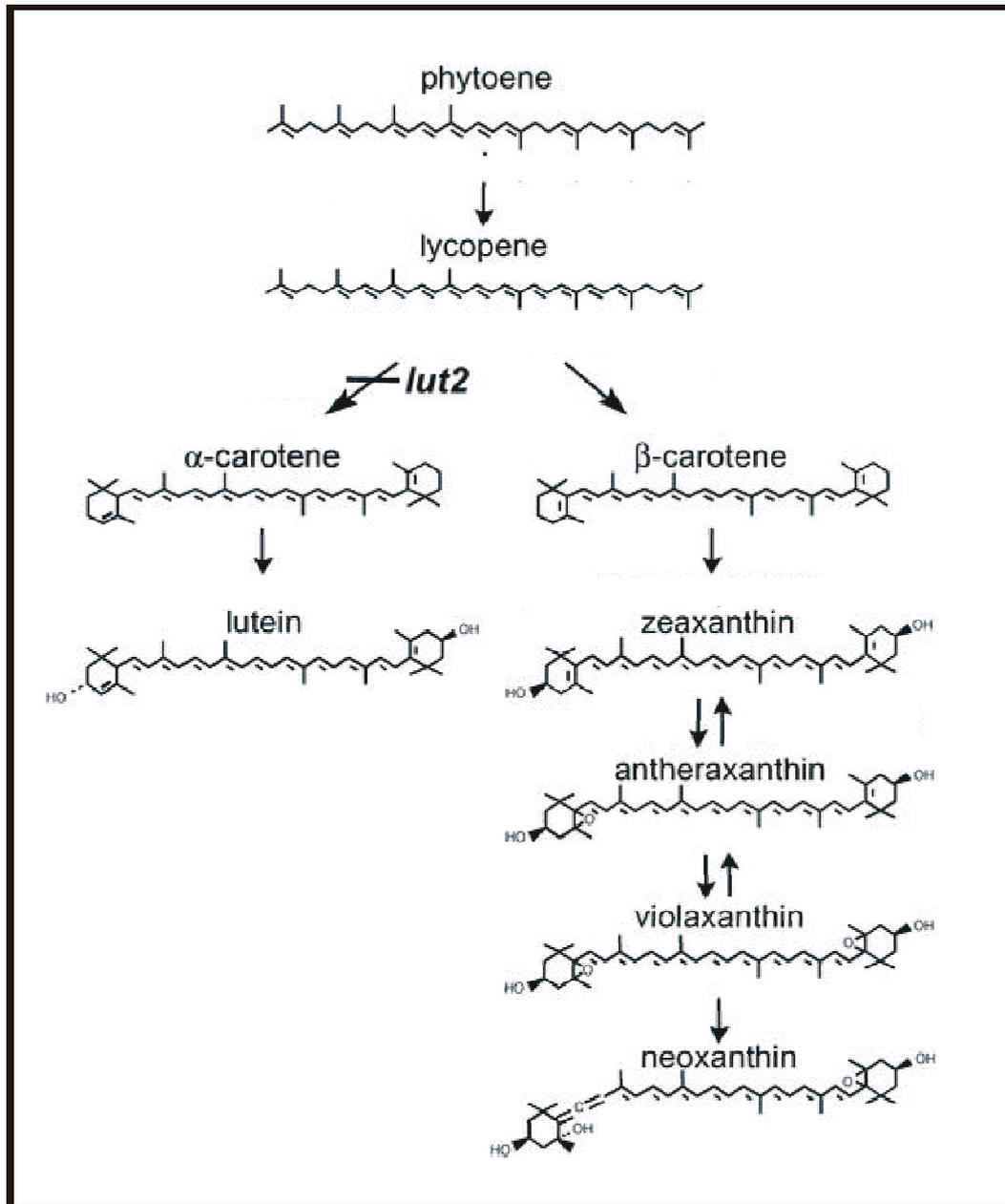
Ein im Chloroplasten vorhandenes lösliches Antioxidant ist Ascorbat (= Vitamin C). Auch ihm wird eine Rolle in der direkten Löschung von Singulett-Sauerstoff, Superoxidanion und Hydroxylradikalen zugesprochen, aber ebenso in der Regeneration des  $\alpha$ -Tocopherols. Des Weiteren ist Ascorbat ein wichtiges Substrat für das Enzym Violaxanthin-De-Epoxidase des Xanthophyllzyklus und der Ascorbatperoxidase der Mehler-Reaktion (Noctor und Foyer, 1998; Ogawa *et al.*, 1995). An der Entgiftung von Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikalen scheint auch ein weiteres lösliches Antioxidant beteiligt zu sein, das Glutathion. Eine Bedeutung in der  $\alpha$ -Tocopherol-Regeneration und der Ascorbatregeneration wurde ebenfalls beschrieben (Asada, 1994; Foyer *et al.*, 1994).

Diese Übersicht über die in den photoautotrophen Organismen ablaufenden Mechanismen zeigt auch, wie stark verknüpft die einzelnen Reaktionen miteinander sein können. Dabei ist die Bedeutung Einzelner im Schutz vor photooxidativen Schäden noch nicht ausreichend geklärt, oder deren Nachweis konnte bislang nur *in vitro*, nicht aber *in vivo* erfolgen. Hier gibt es für manche Reaktionen widersprüchliche Angaben, wie beispielsweise bei der Mehler-Reaktion. Ersichtlich wird jedoch die Vielfältigkeit, mit der photoautotrophe Organismen in der Lage sind, oxidative Schäden zu minimieren.

#### **1.4. Carotinoide und Xanthophyllzyklus**

Die gelb, orange oder rot gefärbten Carotinoide zählen zu den in der Natur am häufigsten vorkommenden Pigmenten. Ihre Anwesenheit in photosynthetisch aktiven Organismen ist essentiell. Zwar nicht direkt in die photosynthetische Elektronentransportkette involviert, führt die vollständige Inhibierung der Carotinoïdbiosynthese zu einem letalen Phänotyp, der vollständig unfähig ist, im Licht in der Anwesenheit von Sauerstoff zu wachsen (Oelmüller, 1989; Krinsky, 1979). Während innerhalb der Algen eine Vielzahl unterschiedlicher Carotinoide vorkommen, ist die Pigmentzusammensetzung innerhalb der Höheren Pflanzen einheitlich und die Zahl der verschiedenen Carotinoide sehr gering (Young, 1993). Das Auftreten von  $\beta$ -Carotin ist überwiegend auf die beiden Reaktionszentren der Photosysteme beschränkt, während die Xanthophylle Lutein, Neoxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin in den Pigment-Proteinkomplexen der Lichtsammelantennen der Thylakoidmembranen lokalisiert sind. Weitere Xanthophylle in den Höheren Pflanzen dagegen sind lediglich selten für einzelne Arten beschrieben worden. Innerhalb der Thylakoidmembranen sind unter normalen Wachstumsbedingungen die Gehalte der einzelnen Carotinoide zueinander einheitlich. Mit

45% ist Lutein das am häufigsten vertretene Carotinoid in den Chloroplasten, hinzu kommen 25 – 30%  $\beta$ -Carotin, 10 – 15% Violaxanthin und 10 – 15% Neoxanthin (Britton, 1993). Jedoch variiert die Zusammensetzung je nach Wachstumsbedingungen und kann sich an veränderte Lichtverhältnisse anpassen.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Carotinoidbiosyntheseweges der Höheren Pflanzen und Algen ausgehend vom Phytoen.**

Die Synthese der Xanthophylle erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen, dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg. Während Lutein aus  $\alpha$ -Carotin synthetisiert wird, werden die restlichen Xanthophylle der Höheren Pflanzen ausgehend von  $\beta$ -Carotin gebildet. Die reversible De-Epoxidierung bzw. Epoxidierung der Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin erfolgt im sogenannten Xanthophyllzyklus.

Die Carotinoide lassen sich formal vom Isopren ableiten und werden den Tetraterpenen zugeordnet. Die Synthese erfolgt ausgehend von Geranylgeranyldiphosphat durch Kopf-an-Kopf-Kondensation zweier Moleküle Geranylgeranyldiphosphat unter der Bildung des C<sub>40</sub>-Moleküls Phytoen. Die vier anschließenden Dehydrogenierungsschritte führen zu der Synthese des Lycopins. Ausgehend von diesem Schritt erfolgt die Synthese der Xanthophylle auf zwei unterschiedlichen Wegen. Durch zweimalige Zyklisierung, katalysiert durch das Enzym Lycopin- $\beta$ -Cyclase, wird Lycopin zu  $\beta$ -Carotin umgewandelt. Durch eine Reihe von Hydroxylierungs- und Epoxidierungsreaktionen werden vom  $\beta$ -Carotin ausgehend die Xanthophylle Zeaxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin und Neoxanthin gebildet. Anders als dieser  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg wird die Bildung des  $\alpha$ -Carotins ausgehend vom Lycopin im  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweg durch zwei verschiedene Enzyme, der Lycopin- $\beta$ -Cyclase und der Lycopin- $\epsilon$ -Cyclase, katalysiert (Cunningham *et al.*, 1996). Durch eine zweifache Hydroxylierung erfolgt im Anschluss die Synthese des Luteins (Abb. 1.1). Während der  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg bei allen photosynthetischen Organismen zu finden ist, tritt der  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweg nur bei Höheren Pflanzen und Algen auf. Der Nachweis einiger Xanthophylle auch in der äußeren Chloroplastenmembran führte zu der Hypothese, wonach die Carotinoidbiosynthese innerhalb dieser Membranen lokalisiert ist (Joyard *et al.*, 1998). Ob jedoch frei in der Membran vorhanden, oder in Pigment-Proteinkomplexen lokalisiert, ist dabei unklar. Ein Indiz für die in der äußeren Chloroplastenmembran lokalisierte Carotinoidbiosynthese ist der transiente Anstieg des Violaxanthins mit der lichtinduzierten De-Epoxidation des Violaxanthins in der Thylakoidmembran (Siefermann-Harms *et al.*, 1978).

Innerhalb des photosynthetischen Prozesses werden den Carotinoiden 3 Funktionen zugesprochen. Lokalisiert in den Chlorophyll a/b-bindenden Proteinen der Lichtsammelantennen, dienen sie als akzessorische Pigmente für die Absorption der Lichtenergie. Carotinoide absorbieren eingehende Lichtenergie eines Wellenlängen-bereiches zwischen 450 – 570 nm, in dem die Chlorophylle nicht effizient absorbieren. Durch Singulett-Singulett-Resonanztransfer kann die Energie auf Chlorophyll weitergegeben werden (Siefermann-Harms, 1985; Siefermann-Harms, 1987) und daraus resultierend ein Energietransfer auf die beiden Chlorophyll a-Moleküle der Reaktionszentren beider Photosysteme erfolgen. Unter optimalen Bedingungen wurde eine Effizienz bis zu 85% beschrieben (Owens, 1996).

Eine weitere Funktion ist die strukturelle Stabilisierung der Chlorophyll-bindenden Proteine der Lichtsammelantennen (Paulsen *et al.*, 1990), als auch der Reaktionszentren

beider Photosysteme (Humbeck *et al.*, 1989; Markgraf und Öelmüller, 1991; Trebst und Depka, 1997). Strukturüberlegungen des LHCIIb-Proteins führten zu der Annahme, dass die Trimere insgesamt 36 Chlorophylle und 8 Xanthophylle binden (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Innerhalb eines Monomers sind zwei Luteinmoleküle lokalisiert, während Neoxanthin und Violaxanthin in substöchiometrischen Gehalten auftreten. Letzteres ist dabei nur sehr schwach an dem Pigment-Protein-Komplex gebunden (Ruban *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass neben den Chlorophyllen die beiden Luteinmoleküle für die korrekte und stabile Anordnung der Komplexe in der Membran verantwortlich sind (Plumley und Schmidt, 1987; Humbeck *et al.*, 1989; Paulsen *et al.*, 1993). Beide Moleküle sind zentral innerhalb des Komplexes lokalisiert, wo sie sich in einem Winkel von  $45^\circ - 50^\circ$ , bezogen zur Ebene der Thylakoidmembran, kreuzen (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Gruzecki *et al.*, 1999).

Eine weitere sehr wichtige Funktion der Carotinoide besteht im photoprotektiven Schutz vor überschüssiger Lichtenergie. Wenn die absorbierte Energie die Kapazität der photosynthetischen Elektronentransportkette übersteigt, kann die von den Chlorophyllen und Carotinoiden absorbierte Anregungsenergie nicht mehr weitergeleitet werden. Der langsame Verbrauch angeregten Singulettchlorophylls führt zu einer Konvertierung des Moleküls in den Triplettzustand. Das gebildete Triplettchlorophyll kann anschließend seine Energie auf molekularen Sauerstoff unter der Bildung von Singulett-Sauerstoff übertragen. Dabei steigt der Gehalt an Singulett-Sauerstoff in den Chloroplasten Höherer Pflanzen mit Zunahme der Lichtintensität (Hideg *et al.*, 1998). Als Folge können reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanion, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikale gebildet werden, die mit oxidierbaren Molekülen wie Lipide und Proteine reagieren.

Zu den Antioxidantien innerhalb der Chloroplasten Höherer Pflanzen zählend, sind die Carotinoide in der Lage, die überschüssige Lichtenergie zu absorbieren und als harmlose Energie in Wärme abzugeben. Diese nichtphotochemische Löschung überschüssiger Energie, NPQ (Horton *et al.*, 1996), resultiert aus der Möglichkeit der Carotinoide, die Energie des Triplettchlorophylls über einen Triplett-Triplett-Energietransfer aufzunehmen. Aufgrund des geringeren Energiezustandes der resultierenden Triplettcarotinoide kann die Energie nun nicht mehr auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, was zu der genannten Abgabe der Energie in Wärme führt. Aber auch die direkte Übertragung der Energie vom Singulett-Sauerstoff auf die Carotinoide ist möglich. Da auch hier eine erneute Übertragung auf Sauerstoff ausgeschlossen werden kann, ist der Prozess irreversibel und

die Energie kann als Wärme abgegeben werden (Siefermann-Harms, 1987; Frank und Cogdell, 1996).

Des Weiteren erfolgt unter hohen Lichtintensitäten innerhalb von Minuten eine Änderung der Pigmentzusammensetzung innerhalb der Lichtsammelkomplexe. Im sogenannten Xanthophyllzyklus wird durch De-Epoxidation des Violaxanthins über das Intermediat Antheraxanthin Zeaxanthin gebildet (Demmig-Adams und Adams, 1996; Pfündel und Bilger, 1994, Eskling *et al.*, 1997). Katalysiert wird diese Reaktion durch das sich frei im Lumen befindliche Enzym Violaxanthin-De-Epoxidase (Hager und Holocher, 1994), wobei die Aktivität des Enzyms abhängig ist von dem unter hohen Lichtflüssen aufgebauten transmembranen Protonengradienten. Die De-Epoxidation des Violaxanthins stellt einen reversiblen Prozess dar, da mit ansteigenden pH-Werten die De-Epoxidase deaktiviert und die Epoxidase aktiviert wird, welche die Umwandlung des Zeaxanthins und des Antheraxanthins in Violaxanthin katalysiert. Da die Akkumulation des Zeaxanthins und dessen Intermediats Antheraxanthin mit dem Auftreten des NPQ korreliert, wurde eine Funktion beider Xanthophylle im NPQ postuliert (Demmig-Adams und Adams, 1996; Pfündel und Bilger, 1994). Auch Gilmore und Yamamoto (1992) beschrieben eine Abhängigkeit des NPQ von dem Xanthophyllzyklus und dem ansteigenden transmembranen Protonengradienten. Auch die Tatsache, dass Zeaxanthin nur unter photoinhibitorischen Bedingungen auftritt (Eskling *et al.*, 1997), führte zu der Annahme eines photoprotektiven Schutzes in den Chloroplasten (Havaux *et al.*, 1998; Gruszecki, 1999, Niyogi *et al.*, 1997b). Der genaue Prozess konnte jedoch noch nicht geklärt werden. Unter Lichtstressbedingungen führt ein zunehmender transmembraner Protonengradient zu einer Konformationsänderung der Lichtsammelantennen des Photosystem II, was zu einer verstärkten thermischen Dissipation (NPQ) überschüssiger Anregungsenergie und einer geringeren Chlorophyll-Fluoreszenz führt (Niyogi *et al.*, 1997b; Björkman und Demmig-Adams, 1994; Horton *et al.*, 1994; Horton *et al.*, 1996). Die Konformationsänderung resultiert dabei aus der Protonierung von Aminosäureresten des LHCII bei niedrigen pH-Werten, die erst ein NPQ ermöglicht (Horton und Ruban, 1994; Gilmore, 1997). Die De-Epoxidation des Violaxanthins korreliert wiederum mit der Konformationsänderung, ebenso wie mit dem NPQ. Zeaxanthin könne daher möglicherweise direkt Triplettchlorophylle und Singulett-Sauerstoffe quenchen (Havaux *et al.*, 1998; Demmig-Adams und Adams, 1996), oder in der protonen-induzierten Strukturänderung des LHCII involviert sein (Horton *et al.*, 1996), die zu der nichtphotochemischen Energielöschung führt (Walters *et al.*, 1996). Dass der Xanthophyllzyklus nicht ausschließlich im NPQ

involviert ist, zeigten Untersuchungen an den Mutanten *npq1* und *npq4* von *Arabidopsis thaliana* (Havaux und Niyogi, 1999). Während in der Mutante *npq1* die De-Epoxidierung des Violaxanthins zu Zeaxanthin inhibiert ist, zeichnet sich die Mutante *npq4* durch das Fehlen des NPQ aus. Durch das vollständige Fehlen des Zeaxanthins konnte eine Zunahme der Lipidperoxidation nachgewiesen werden, während die Abwesenheit des NPQ im Vergleich zum WT in keinem signifikanten Anstieg der Lipidperoxidation resultiert. Die Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der Xanthophyllzyklus neben der nicht-photochemischen Energielöschung auch eine Funktion im Schutz der Membranlipide vor Lipidperoxidation durch die Reaktion mit freien Radikalen in der Membran aufweist (Palozza und Krinsky, 1992). In die Regeneration der dadurch gebildeten Carotinoidradikale scheinen die Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbat involviert zu sein (Edge *et al.*, 1997). Andere Arbeiten beschreiben ebenfalls einen Zusammenhang des sich frei in der Membran befindlichen Zeaxanthins mit  $\alpha$ -Tocopherol und Ascorbat, jedoch wird hier eine Rolle des Zeaxanthins in der Regeneration des Vitamin E nach dessen Abfangen eines Sauerstoffradikals beschrieben (Böhm *et al.*, 1997; Havaux und Niyogi, 1999). Obwohl der Mechanismus noch nicht geklärt ist, wird eine synergistische Wirkung der Carotinoide und des Vitamin E postuliert (Böhm *et al.*, 1997; Stahl *et al.*, 1998).

Die Fähigkeit der Carotinoide, Energie entweder auf Chlorophyll zu transferieren oder zu quenchen, scheint abhängig von dem Energieniveau der Singulettzustände ( $S_1$ ) der Xanthophylle zu sein. Die Fähigkeit, Energie vom Triplettchlorophyll oder Singulett-Sauerstoff aufzunehmen, steigt mit der Anzahl konjugierter Doppelbindungen.

Die Arbeiten mit zahlreichen Mutanten der Carotinoidbiosynthese dienten der Klärung spezifischer Funktionen einzelner Pigmente. So konnte an Mutanten gezeigt werden, die sich durch eine unterschiedliche Xanthophyllzusammensetzung auszeichnen, dass die Carotinoidbindungsstellen in den LHCII austauschbar sind (Pogson *et al.*, 1996; Pogson *et al.*, 1998; Niyogi *et al.*, 1997b). Das Fehlen des Luteins bei *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii* und *Scenedesmus obliquus* führt zu keinen signifikanten Defekten im Lichtsammeln oder im photoprotektiven Schutz, trotzdem verändert sich durch den Ersatz dieses Pigmentes die molekulare Struktur des LHCII (Lokstein *et al.*, 2002, Chunaev *et al.*, 1991; Bishop, 1996).

Neben der Funktion in der Strukturstabilisierung des LHCII und dem Lichtsammeln konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass neben Zeaxanthin und Antheraxanthin auch Lutein eine Aufgabe in der nichtphotochemischen Energielöschung bei hohen

Lichtintensitäten hat. An Mutanten, die in der Synthese des Luteins beeinträchtigt sind, wurde eine Verringerung des NPQ gemessen, der jedoch zu keinem signifikant veränderten Wachstum führte (DellaPenna, 1999). Dabei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob Lutein einen direkten Einfluss auf die Dissipation überschüssiger Lichtenergie hat, oder ob der Ersatz des Luteins im LHCII zu einer Strukturveränderung führt, die eine protoneninduzierte Konformationsänderung des LHCII und somit eine Dissipation der Lichtenergie verhindert (Pogson *et al.*, 1998, DellaPenna, 1999). Aber auch das Fehlen des Zeaxanthins in den Mutanten *npq1* von *Arabidopsis thaliana* und *Chlamydomonas reinhardtii* führt zu keiner Veränderung des Wachstums oder des phänotypischen Erscheinungsbildes (Havaux und Niyogi, 1999; Niyogi *et al.*, 1997b).

Dagegen sind die Doppelmutanten *lor1npq1* von *Chlamydomonas reinhardtii* und *lut1npq1* von *Arabidopsis thaliana*, die weder einen intakten Xanthophyllzyklus noch Lutein besitzen, lichtsensitiv gegenüber hohen Lichtintensitäten, was zu einer massiven Ausbleichung führt. Diese Beobachtung gab Grund zu der Annahme, dass sich zwar die beiden Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin gegenseitig im Schutz vor oxidativen Schäden ersetzen können, ein Fehlen beider aber in einem lichtsensitiven Phänotyp resultiert. Daher konnte sowohl dem Lutein als auch dem Zeaxanthin eine wichtige Funktion im photoprotektiven Schutz zugesprochen werden, der durch die anderen Xanthophylle nicht ersetzt werden kann. Obwohl Carotinoide bis zu einem bestimmten Grad in der Lage sind, sich gegenseitig zu ersetzen, unterscheiden sich die einzelnen Xanthophylle jedoch in der Fähigkeit voneinander, Pigment-Proteinkomplexe zu stabilisieren, Energie auf die Reaktionszentren zu übertragen oder überschüssige Energie zu quenchen.

## 1.5. ELIP-Proteine

Die Gruppe der ELIP-Proteine („early light-inducible proteins“) wurde erstmalig während der Ergrünung etiolierter Erbsenkeimlinge beschrieben (Grimm *et al.*, 1989). Aber auch bei anderen Pflanzen konnte die transiente Expression der ELIP-Proteine in den frühen Phasen der Chloroplastendifferenzierung während der Ergrünung nachgewiesen werden (Apel und Kloppstech, 1978; Grimm und Kloppstech, 1987; Meyer und Kloppstech, 1984). Im Unterschied zu anderen positiv lichtregulierten Genen erreichen die Transkriptmengen bereits nach 2 – 4 Std. ein transientes Maximum und das Genprodukt wird schneller als andere lichtregulierten Proteine akkumuliert. Das Auftreten der ELIP-Proteine beschränkt sich während der Ergrünung ausschließlich auf die frühen Phasen. Mit zunehmender

Akkumulation anderer lichtregulierter Proteine wie LHCII oder SSU fällt die Menge vorhandenen ELIP-Proteins drastisch ab und kann in ergrüntem Pflanzen nicht mehr nachgewiesen werden. Daher wurde dieser Proteingruppe zunächst eine Rolle in der Regulation der Chloroplastendifferenzierung zugesprochen (Meyer und Kloppstech, 1984). Bei den ELIPs handelt es sich um kernkodierte, in der Thylakoidmembran lokalisierte Proteine, die als Vorstufenproteine an den cytoplasmatischen 80S-Ribosomen synthetisiert, posttranslational in die Chloroplasten importiert und in die Thylakoidmembran integriert werden (Grimm und Kloppstech, 1985; Meyer und Kloppstech 1984; Grimm *et al.*, 1989). Vor der Insertion werden die Vorstufenproteine durch eine Stroma-Peptidase prozessiert, welche die N-terminale Leadersequenz abspaltet (Richter und Lamppa, 1989; Kruse und Kloppstech, 1992). ELIP-Proteine wurden sowohl bei Monokotylen als auch bei Dikotylen Pflanzen beschrieben wie *Zea mays* (Kloppstech, 2001, unveröffentlicht), *Arabidopsis thaliana* (Moscovici-Kadouri und Chamovitz, 1997; Jansson, 1999), *Hordeum vulgare* (Grimm und Kloppstech, 1987) und *Pisum sativum* (Meyer und Kloppstech, 1984). Dabei liegen die *elips* entweder als einzelnes Gen wie bei *Pisum sativum* (Scharnhorst *et al.*, 1985) und *Arabidopsis thaliana* (Heddad und Adamska, 2000) vor, oder als Multigenfamilie, wie es für *Hordeum vulgare* (Grimm *et al.*, 1989) und *Spinacia oleracea* (Lindahl *et al.*, 1997) beschrieben wurde. Bei der Gerste werden die ELIPs in zwei Multigenfamilien eingeteilt, deren Genprodukte unterschiedliche Molare Massen aufweisen. Zu der Familie der kleinen ELIPs gehören Vorstufenproteine mit einer Masse von 16, 17, und 18 kDa. Das prozessierte Protein weist eine Masse von 13,5 kDa auf. Innerhalb der Familie der großen ELIPs konnten Vorstufenproteine mit Molaren Massen von 24 – 27 kDa gefunden werden, deren Endprodukte Massen von 13,5 kDa, 18 kDa und 18,5 kDa aufweisen (Grimm *et al.*, 1989).

Aufgrund von Sequenzhomologien zu den LHCII-Proteinen Höherer Pflanzen und zu den carotinoidbindenden Proteinen der Grünalgen (Levy *et al.*, 1993) werden die ELIPs zu der Gruppe der chlorophyll a/b-bindenden Proteine gezählt (Kolanus *et al.*, 1987; Grimm *et al.*, 1989). Unter optimalen Wachstumsbedingungen in den grünen Pflanzen nicht nachzuweisen, werden die ELIP-Proteine aber auch durch Lichtstress (Lers *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1992; Adamska *et al.*, 1992a; Pötter und Kloppstech, 1993) oder während der Akklimation von Schwachlicht an Starklicht transient induziert (Lindahl *et al.*, 1997). Dabei ist die Geninduktion abhängig von dem Wellenlängenbereich. Während rotes und dunkelrotes Licht keinen Einfluss hat, wird die *elip*-Expression durch Blaulicht und UV-A Licht induziert, was auf eine Kontrolle durch den Photorezeptor Cryptochrom schließen

lässt (Adamska *et al.*, 1992a; Adamska *et al.*, 1992b). Aber auch Methyljasmonat (Wierstra und Klopstech, 2000), Kälte (Montané *et al.*, 1997), Nährstoffmangel (Levy *et al.*, 1993, Gruber, 1999), Seneszenz (Binyamin *et al.*, 2001) und Trockenheit (Ouvrard *et al.*, 1996) führen zu einer *elip*-Transkription. In etiolierten Keimlingen ist für die Regulation der Expression Blaulicht und der Photorezeptor Phytochrom verantwortlich (Adamska *et al.*, 1996).

Obwohl die Transkription strikt lichtabhängig ist, wird die Stärke der Expression durch weitere Faktoren beeinflusst. So führen unterschiedliche pflanzliche Entwicklungsstadien zu differierenden Expressionsmustern (Grimm *et al.*, 1989; Adamska, 1995). Pötter und Klopstech (1993) zeigten an Gerstenblättern, dass unter Lichtstressbedingungen die höchsten Transkriptmengen in den basalen, noch jungen Bereichen nachzuweisen sind. Einen regulatorischen Effekt auf die *elip*-Transkription zeigen auch niedrigere Temperaturen. Bei Untersuchungen an *Pisum sativum* konnte eine zunehmende mRNA-Stabilisierung bei absinkenden Temperaturen beobachtet werden (Adamska und Klopstech, 1994). Zwar führt die Erniedrigung der Temperatur unter Hochlicht zu einer verlangsamten ELIP-Translation (Adamska und Klopstech, 1994), aber trotzdem wird ein synergistischer Effekt der beiden Faktoren Kälte und Licht, der zu einer verstärkten ELIP-Akkumulation in der Thylakoidmembran führt, beschrieben (Adamska *et al.*, 1996). Die Ursache wird in einer ELIP-spezifischen Protease des Serin-Typs vermutet. Sie ist in der Thylakoidmembran assoziiert und scheint durch den unter Lichtstress aufgebauten transmembranen Protonengradienten aktiviert zu werden. Die strikte Temperaturabhängigkeit der Protease führt zu einer Inaktivierung bei Temperaturen unter 20°C und über 30°C, was bei niedrigen Temperaturen in einer Akkumulation des ELIP-Proteins in der Thylakoidmembran resultiert. Die Aktivität der Protease scheint auch verantwortlich für die Stabilität der ELIP-Proteine während der Erholung unter Schwachlicht zu sein. Die Degradation des ELIP-Proteins erfolgt bei niedrigeren Temperaturen deutlich langsamer, aber auch die *elip*-Transkripte bleiben länger stabilisiert (Adamska und Klopstech, 1994). Ebenso führt die Stärke des Lichtstresses zu einer unterschiedlichen Akkumulationsstärke des Proteins während der Phasen der Erholung (Adamska *et al.*, 1993).

Für die Stabilisierung der prozessierten ELIP-Proteine in die Thylakoidmembran scheinen Pigmente verantwortlich zu sein. Adamska *et al.* (2001) zeigten, dass die posttranslationelle Insertion der ELIPs in Etioplastenmembranen *in vitro* von der Anwesenheit von Chlorophyll a, aber nicht von Chlorophyll b abhängig ist. In Gegenwart des Xanthophylls Lutein ist eine stabile Integration auch unabhängig von Zeaxanthin zu

beobachten. Auch konnte an isolierten ELIP-Proteinen der Erbse Chlorophyll a und Lutein nachgewiesen werden (Adamska *et al.*, 1999). Eine Unabhängigkeit der Proteinstabilisierung von Chlorophyll b konnte auch an ELIP-ähnlichen Proteinen der Cyanobakterien und der Rotalgen aufgezeigt werden (Miroshnichenko-Dolganov *et al.*, 1994; Kessler *et al.*, 1992). Trotz hoher Sequenzhomologien zu den chlorophyll a/b-bindenden Proteinen (Cab-Proteine) führte dieses Ergebnis zu der Annahme, dass ELIPs chlorophyll a-bindende Proteine repräsentieren. Aber auch die Möglichkeit einer schwachen Assoziation des Chlorophyll b an die ELIP-Proteine kann nicht ausgeschlossen werden, was zu einer Dissoziation vom Komplex während der Isolierung führen würde. Evidenz für diese Annahme lieferten Adamska *et al.* (1999) beim Vergleich des ermittelten Chlorophyll/Carotinoid-Verhältnis im Vergleich zu anderen Chlorophyll a/b-bindenden Proteinen. Letztere sind durch deutlich höhere Werte charakterisiert (Paulsen, 1995; von Wettstein *et al.*, 1995; Horton *et al.*, 1996; Green und Durnford, 1996; Funk *et al.*, 1995; Kühlbrandt *et al.*, 1994; Bassi *et al.*, 1997).

### **1.5.1. Struktur der ELIP-Proteine**

ELIP-Proteine sind in Anlehnung an ihrer Polypeptidsequenz durch insgesamt 3 transmembrane Helices charakterisiert (Green und Kühlbrandt, 1995), wobei für die beiden Helices I und III signifikante Sequenzhomologien zu den LHCIIB-Proteinen der Lichtsammelkomplexe beschrieben wurden (Grimm *et al.*, 1989; Green und Pichersky, 1994). In der Thylakoidmembran inseriert, sind sowohl bei den LHCIIB-Proteinen als auch bei den ELIPs die C-terminalen Bereiche dem Lumen und die N-terminalen Bereiche dem Stroma der Thylakoidmembranen zugewandt (Grimm *et al.*, 1989). Trotz dieser Übereinstimmung unterscheiden sich beide Proteine voneinander, da die ELIPs kürzere Verbindungen zwischen den transmembranen Domänen aufweisen und der C-terminale Rest der LHCIIB-Proteine fehlt (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Grimm *et al.*, 1989). Sequenzvergleiche zu den LHCIIB-Proteinen lassen für die ELIPs 4 Chlorophyll-bindungsstellen vermuten. Tatsächlich konnten Adamska *et al.*, (2001) an Etioplastenmembranen *in vitro* nachweisen, dass die Anwesenheit von Chlorophyll a für eine posttranslationelle Integration in die Thylakoidmembran notwendig ist.

### 1.5.2. ELIP-ähnliche Proteine

Sowohl bei prokaryotischen als auch bei eukaryotischen Organismen konnten Proteine gefunden werden, die hohe Homologien zu den ELIP-Proteinen der Höheren Pflanzen aufweisen. In dem prokaryotischen Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Dolganov *et al.*, 1995) konnte ein Gen identifiziert werden, welches transient unter Lichtstress exprimiert wird. Ähnlich wie die ELIP-Proteine wird auch dessen Transkription durch Blaulicht und UV-A Licht reguliert (Dolganov *et al.*, 1995). Dieses als HLIP („high light-inducible protein“) bezeichnete Protein besitzt nur eine transmembrane Domäne, jedoch zeigten Sequenzanalysen innerhalb der Helix hoch konservierte Bereiche, wie sie für die Helix I und Helix III der Cab-Proteine charakteristisch sind. Aufgrund dieser Strukturähnlichkeiten wird angenommen, dass die HLIPs durch Ionenpaarbindungen Homodimere bilden, die eine chlorophyllbindende Funktion ermöglicht (Dolganov *et al.*, 1995; Green und Kühlbrandt, 1995). HLIP-ähnliche Proteine konnten auch bei *Synechocystis* 6803 (Kaneko *et al.*, 1996), im Cyanellengenom von *Cyanophora paradoxa* (Stirewalt *et al.*, 1995) und in den Plastidchromosomen der Rotalgen *Cyanidium caldarium* (Maid und Zetsche, 1992) und *Porphyra purpurea* (Reith und Munholland, 1995) isoliert werden.

Die salztolerante einzellige Grünalge *Dunaliella bardawil* ist in der Lage, bei hohen Lichtintensitäten zu wachsen. Die Akklimatisierung an hohe Lichtintensitäten führt zu einer massiven Anreicherung von  $\beta$ -Carotin (Ben Amotz und Avron, 1983), die mit der Akkumulation eines kernkodierten Proteins, dem Cbr („carotenoid biosynthesis-related“) korreliert (Lers *et al.*, 1990; Lers *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1992). Die Genexpression wird dabei durch Blaulicht und UV-A Licht reguliert, nicht jedoch durch grünes und rotes Licht (Banet *et al.*, 1999). Die Cbr-Proteine sind durch das Vorhandensein von 3 transmembranen Domänen charakterisiert. Diese zeigen hohe Homologien zu den Helices der Cab-Proteine. Analog zu dem Verhalten Höherer Pflanzen bei Lichtstress führt auch bei *Dunaliella bardawil* ein durch Lichtstressbedingungen aufgebauter transmembraner Protonengradient zu der De-Epoxidation des Violaxanthins im Xanthophyllzyklus unter der Bildung von Zeaxanthin. Lokalisationsstudien führen zu der Annahme, dass das Cbr-Protein innerhalb der Antennen-Pigment-Protein-Komplexe des PSII lokalisiert ist und für die Bindung des Zeaxanthins verantwortlich ist (Lers *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1993). Durch diese Interaktion könnte eine photoprotektive Aufgabe erfüllt werden.

Bei der Trockenstress-toleranten Pflanze *Craterostigma plantagineum*, welche einen extremen Verlust zellulären Wassers zulässt (Bartels *et al.*, 1992), werden während der

Dehydrierung neue Transkripte exprimiert. Ein Genprodukt ist das Protein Dsp-22 („desiccation related protein“), welches im Gegensatz zu den anderen stressinduzierten Proteinen strikt lichtkontrolliert ist. Das prozessierte Protein hat eine Molare Masse von 21 kDa und ist in der Thylakoidmembran dehydrierter Chloroplasten zu finden (Bartels *et al.*, 1992). Dabei repräsentiert *dsp-22* eine Genfamilie, die nahe Verwandtschaften zu den ELIP-Proteinen aufweisen.

ELIP-ähnliche Proteine, ebenfalls bei Lichtstress reguliert, konnten auch im Genom von *Arabidopsis thaliana* gefunden werden. Neben HLIPs mit nur einer Helix (Jansson *et al.*, 2000) wurden auch zwei ELIP-ähnliche Proteine, die Seps („stress-enhanced protein“, Heddad und Adamska, 2000), mit zwei transmembranen Domänen gefunden.

Aufgrund dieser Vielzahl unterschiedlicher Proteine, die jedoch zueinander besonders in den Bereichen der transmembranen Domänen hohe Übereinstimmungen zeigen, wurde ein gemeinsamer Vorfahr aller Proteine postuliert. Ausgehend von den HLIPs, die eine Helix aufweisen, postulierten Green und Pichersky (1994) einen möglichen entwicklungs-geschichtlichen Verlauf: innerhalb der Evolution wurde eine Addition eines Gens eines anderen Ein-Helix-Proteins mit dem HLIP-Gen angenommen. Durch interne Genduplikation entstanden die mit 4 transmembranen Helices charakterisierten Proteine wie die PsbS. Durch den Verlust der vierten Helix könnten am Ende der Evolution die ELIPs und die LHCII-Proteine entstanden sein. Evidenzen für diese Theorie lieferten die Analysen des PsbS-Proteins, welches 4 Helices besitzt (Wedel *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1992). Homologien finden sich dabei zwischen den Helices I und III sowie zwischen den Helices II und IV, was auf eine interne Genduplikation schließen lässt. Als Untereinheit des PSII Komplexes wird das PsbS-Protein auch zu der Familie der LHC-Proteine gezählt.

### **1.5.3. Mögliche Funktionen des ELIP**

Aufgrund ihrer Anwesenheit in den frühen Phasen der Ergrünung etiolierter Pflanzen wurde für die ELIPs zunächst eine Funktion in der Regulation der Chloroplastentranskription während der Ergrünung angenommen (Meyer und Klopstech, 1984). Aber auch eine Bedeutung in der Neuordnung der Membranen, zum Beispiel in dem Abbau der in der Dunkelheit exprimierten Proteine, wurde diskutiert (Meyer und Klopstech, 1984). Erst der Nachweis der ELIPs unter Hochlichtbedingungen führte zu der Annahme, dass sie in dem Schutz photoautotropher Organismen vor oxidativen Schäden involviert sein könnten (Adamska und Klopstech, 1991). Für die ELIP-ähnlichen Proteine

wie dem Cbr bei *Dunaliella bardawil* und dem HLIP des Cyanobakteriums *Synechococcus* werden ähnliche Funktionen angenommen (1.5.2).

Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Korrelation der Zunahme des ELIP-Proteins mit der Photoinaktivierung des PSII, der Degradation des D1-Proteins und dem Wechsel der Pigmentzusammensetzung (Adamska *et al.*, 1993). Dabei wird die genaue Funktion der ELIP-Proteine weiterhin diskutiert.

Mit steigender Lichtintensität nimmt die Zahl beschädigter und wieder neu synthetisierter Proteine zu, von denen besonders in den ersten Stunden das D1-Protein des PSII-Reaktionszentrums betroffen ist (Prasil *et al.*, 1992; Aro *et al.*, 1993; Lindahl *et al.*, 1995). Während funktionsfähige PSII-Komplexe in den Granabereichen lokalisiert sind, trennen sich beschädigte in die nichtgestapelten Regionen, in denen beschädigte D1-Proteine abgebaut und neu synthetisierte D1-Proteine eingebaut werden (Prasil *et al.*, 1992). Denkbar wäre eine Funktion als transientes chlorophyllbindendes Protein während einer Reorganisation anderer pigmentbindender Proteine unter Lichtstressbedingungen (Adamska *et al.*, 1999; Adamska, 1997). Adamska (1997) definierte eine Hypothese, nach der die ELIP-Proteine die Chlorophylle während der Degradation und Synthese anderer pigmentbindender Proteine unter Lichtstressbedingungen übernehmen. Die gebundenen Chlorophylle würden möglicherweise anschließend durch die Aktivität einer Chlorophyllase abgebaut oder für neu synthetisierte Proteine wiederverwendet werden. Der Nachweis eines parallel zur Reorganisation des PSII-Komplexes ablaufenden Chlorophyllabbaus blieb jedoch bislang aus. Die Vermutungen von Prasil *et al.* (1992), wonach die Reparatur beschädigter PSII-Komplexe in den ungestapelten Bereichen der Thylakoidmembranen lokalisiert ist, korreliert mit den Befunden von Adamska und Klopstech (1991), die eine Anordnung der ELIP-Proteine innerhalb dieser Regionen beschreiben.

Als eine weitere Funktion wird die Involvierung der ELIP-Proteine in der nichtphotochemischen Energielöschung überschüssiger Strahlungsenergie diskutiert (Montané *et al.*, 1997; Krol *et al.*, 1999). Unter diesen Bedingungen würden die ELIPs einen Ersatz für die degradierten LHCII-Proteine darstellen. Diese Annahme basiert auf Befunde, wonach ELIPs neben 4 Chlorophyll a-Molekülen auch Xanthophylle binden (Adamska *et al.*, 1999) und die Akkumulation der Xanthophylle und der ELIP-Proteine mit der Zunahme des Elektronendrucks des PSII korreliert (Montané *et al.*, 1997). Ein Zusammenhang wird dabei zwischen der Akkumulation des unter Lichtstress gebildeten De-Epoxids Zeaxanthin und der Akkumulation des ELIPs beschrieben (Krol *et al.*, 1995).

Ähnliche Resultate lieferten Untersuchungen an *Dunaliella bardawil*, wo die ELIP-ähnlichen Cbr-Proteine Zeaxanthin binden und einen Komplex zur Dissipation von überschüssiger Lichtenergie bilden (Levy *et al.*, 1993).

### **1.6. Ziele der Arbeit**

Ein Ziel der Arbeit war es, die ELIP-Expression in den Blättern von *Vitis vinifera* cv. Sultanina bei definierten Licht- und Temperaturverhältnissen zu klären. In der Natur an sonnenexponierten Hanglagen angebaut, stellt sich die Frage nach vorhandenen Schutzmechanismen in diesen Pflanzen. Obwohl Schutzmechanismen wie die nichtphotochemische Energielöschung und die vorhandenen Vitamin E-Gehalte bereits bestimmt wurden, sollte hier erstmalig die Expression der ELIP-Proteine beschrieben werden. Um eine Korrelation zum Zeaxanthingehalt zu bestimmen, wurden ebenfalls Pigmentanalysen von Blattextrakten durchgeführt.

Die genaue Funktion der ELIP-Proteine konnte bislang noch nicht geklärt werden. Die Anwesenheit dieses Proteins unter Lichtstressbedingungen, in denen andere lichtregulierte Proteine wie LHCII und SSU herunterreguliert werden, führt zu der Annahme, dass die ELIP-Proteine eine Funktion im Schutz vor photooxidativen Schäden haben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage näher untersucht werden, ob ELIP-Proteine eine Rolle als „pigment-carrier“ im  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg besitzen. Diese Überlegungen basieren auf Beobachtungen, nach denen die Zunahme an Zeaxanthin in den Chloroplasten bei Lichtstressbedingungen mit der Akkumulation des ELIPs korreliert. Ein Zusammenhang besteht dabei mit den langsam ablaufenden Adaptationsvorgängen des Xanthophyllzyklus, in denen der Gesamtgehalt des Zeaxanthins zunimmt, wenn die ursprünglichen pigmentbindenden LHC-Proteine degradiert werden. Ausgehend von einer luteinfreien Mutante (*lut2*) von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija, die vollständig im  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweg inhibiert ist, sollte die Induktion des ELIP-Proteins durch Antisense-Inhibierung reduziert oder wenn möglich vollständig unterdrückt werden. Wenn nun die ELIP-Proteine eine Funktion in der Zeaxanthinbindung zur Kollektion und Dissipation überschüssiger Lichtenergie besitzen, würde eine Inhibierung der ELIP-Akkumulation zu einer Beeinträchtigung des  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweges führen. Daraus folgend erwarten wir letztendlich eine Doppelmutante, die sowohl im  $\alpha$ - als auch im  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg beeinträchtigt ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Verwendete Materialien und Reagenzien**

#### **2.1.1. Chemikalien**

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
<sup>32</sup> P-dCT	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
5-Brom-4-Chlor-3-Ondolylphosphat (BCIP)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Biodyne B Nylon Membran	Pall, Dreieich, Deutschland
Bisacrylamid (N,N'-Methylenbisarcylamid)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Folin-Ciocalteus-Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Hexadecyltrimethylammonium Bromid (CTAB)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
LB-Agar low salt	Duchefa, Haarlem, Holland
LB-Broth low salt	Duchefa, Haarlem, Holland
Lithiumchlorid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthal-azinedion)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen, Deutschland

Methanol	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Nitroblue Tetrazolium (NBT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Nitrocellulose BA85, 0,45 µm	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phenol	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
PMSF	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Polyvinylpyrrolidon 40 (PVP 40)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
QA-Agarose TM	Qbiogene, Heidelberg, Deutschland
Sephadex G-50	Pharmacia, Uppsala, Sweden
Serva-Blue R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Silbernitrat	Applichem, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tween 80	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg, Deutschland
ε-Aminocaprinsäure	Serva, Heidelberg, Deutschland

Die übrigen Chemikalien sind in den einzelnen Methoden vermerkt oder wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), J. T. Baker (Griesheim, Deutschland), Boehringer (Ingelheim, Deutschland), MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Carlsbad, California), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

### 2.1.2. Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland, # 27104

GeneCleanII-Kit der Firma Qbiogene, Heidelberg, Deutschland # 1001-400

DecaLabel™ DNA Labeling Kit von MBI Fermentas, # K0622

### 2.1.3. Marker

DNA-Standards:

Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, # SM0321

Gene Ruler DNA Ladder Mix von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, # SM0331

Gene Ruler DNA Ladder High Range von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, # SM0393

1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen, Carlsbad, California, # 10787-018

λ-DNA/HindIII-Fragments von Gibco BR, Carlsbad, California, # 15612-013

Protein-Standards:

SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein-Standard von Invitrogen Carlsbad, California, #LC5925

## 2.2. Pflanzenanzucht und Hochlichtbedingungen

### 2.2.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija auf Erde

Für die durchgeführten Experimente wurde Saatgut von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija verwendet. Es lag sowohl Saatgut vom Wildtyp als auch einer Luteinmangelmutante *lut2* (G. Giuliano, T-DNA Bank Versailles, Frankreich ) vor. Die Anzucht erfolgte auf Erde in Anzuchtschalen. Nach leichtem Andrücken der Erde wurde das Saatgut gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt und die Erde ausreichend bewässert. Die Keimung des Saatguts erfolgte in der ersten Woche im Gewächshaus unter einer Abdeckhaube, um ein Austrocknen der Erde zu verhindern. Eine weitere Woche später wurden die Keimlinge in Pflanzschalen pikiert. Um eine gegenseitige Behinderung der Pflanzen auszuschließen, sollten nicht mehr als 75 auf einer 30 x 45 cm großen Fläche kultiviert werden. Das weitere Wachstum erfolgte für etwa 3 Wochen in Klimakammern mit Leuchtstoffröhren Typ Radium NL36W/21 weiß Radiocolor der Firma Philips, Eindhoven, Holland, im 12 Std. Licht-Zyklus bei einer Temperatur von 23°C und einer Lichtintensität von 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### **2.2.2. Anzucht von *Vitis vinifera* cv. Sultanina**

Für die vegetative Vermehrung von *Vitis vinifera* cv. Sultanina (Herkunftsland: Chile, Anbaugebiet Valle de Elqui) eigneten sich Sprosssegmente des Vorjahres, die schon leicht verholzt waren. An diesen Segmenten befanden sich an jeder ehemaligen Blattachsel Augen (= Knospen), in denen die Blattanlagen bereits vorhanden, jedoch noch nicht ausgetrieben waren. Die Vorkultur auf Flüssigmedium ermöglichte die Ausbildung von Wurzeln und Blättern an diesen Trieben. Dafür wurden zunächst Löcher in einem Abstand von 5 cm zueinander in eine Styroporplatte gestanzt. Die Stecklinge wurden in den Löchern fixiert und anschließend schwimmend auf Nährmedium (Hoagland's No.2 Basal Salt Mixture, Sigma-Aldrich, München, Deutschland, # H-2395) angezogen. Es empfahl sich, die Lösung alle 4 Tage zu erneuern. Bei einer Lichtintensität von  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und einer Temperatur von  $25^\circ\text{C}$  in einem 12 Std. Licht-Zyklus bildeten sich in der Klimakammer nach 3 Wochen junge Blätter und Wurzeln. 2 Wochen später waren die Wurzeln soweit entwickelt, dass die Stecklinge auf Erde umgesetzt werden konnten. Aufgrund der Umstellung auf Erde mussten die Stecklinge in der folgenden Woche unter einer Abdeckhaube weiter kultiviert werden.

### **2.2.3. Hochlichtbehandlung**

#### **2.2.3.1. Kurzzeitige Lichtstressbehandlungen**

Lichtstressbehandlungen bis zu 6 Std. wurden in einer speziellen Apparatur durchgeführt, die in der institutseigenen Werkstatt entworfen wurde. Sie bestand aus einer mit Wasser gefüllten Glasküvette, die mit Hilfe eines Kryostaten temperierbar war. Als Lichtquelle dienten vier 1000 W Photolampen Typ Phillips PF811, Phillips (Eindhoven, Holland), die in zwei Lampenhaltern angebracht waren. Zwischen der Glasküvette und den Lampen befand sich eine mit kaltem Wasser gefüllte Plexiglaswanne, um einen Schutz der Blätter vor übermäßiger Hitze, die von den Lampen abgestrahlt wurde, zu gewährleisten. Die Exposition einzelner Blätter erfolgte schwimmend auf der Wasseroberfläche, wobei darauf geachtet werden musste, dass sich die Blätter nicht gegenseitig beschatten. Ventilatoren, die neben der Glasküvette angebracht wurden, regulierten die Temperatur bei  $25^\circ\text{C}$ . Mit Hilfe dieser Apparatur konnten Lichtintensitäten bis zu  $2500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  erreicht werden. Da die Lichtstärke stufenlos regulierbar war, konnten die Kontrollpflanzen bei  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  ebenfalls waagrecht exponiert werden.

### 2.2.3.2. Langzeit-Experimente

Langzeit-Experimente bzw. Experimenten an ganzen Pflanzen von *Vitis vinifera* und *Arabidopsis thaliana* wurden in speziell entworfenen Klimakammern durchgeführt. 17 Metaldampfhochdrucklampen HQI-T400W/DV der Firma OSRAM (München, Deutschland), die zur Verminderung der Wärmeentwicklung hinter dicken Glasplatten angebracht sind, erzeugten gleichmäßige Lichtintensitäten von  $1500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bis 50 cm unter der Glasplatte. Ebenfalls in den Kammern vorhandene Ventilatoren wurden von Temperaturfühlern gesteuert. Sie gewährleisteten eine gleichmäßige Luftverteilung und somit konstante Temperaturbedingungen, die von  $5^\circ\text{C}$  bis  $35^\circ\text{C}$  stufenlos reguliert werden konnten. Die Lichtintensitäten wurden mit einem PAR Quantum Sensor SKP 215 der Firma Skye Instruments (Powys, Wales), gemessen. Geerntetes Blattmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pulverisieren erfolgte in einer Kugelmühle Typ „Pulverisette 5“ der Firma Fritsch (Idar-Oberstein, Deutschland), deren Porzellangefäße und -kugeln vor Zugabe des Pflanzenmaterials ausreichend mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden. Bei 300 rpm wurde das Pflanzenmaterial innerhalb von 5 Min. pulverisiert.

## 2.3. Protein-Isolierung

### 2.3.1. Isolierung von Gesamt-Proteinextrakt

Von dem gemörserten Pflanzenmaterial wurden 500 mg in einem 50 ml Sarstedt-Röhrchen mit 5 ml Extraktionspuffer versetzt und durch vortexen vermischt. Nach einer 20-minütigen Inkubation im Wasserbad bei  $65^\circ\text{C}$  und einer kurzen Abkühlung auf Eis erfolgte die Zentrifugation für 10 Min. bei RT und  $12500 \times g$ . Der Überstand enthielt den gelösten Gesamt-Proteinextrakt und wurde in ein neues Gefäß überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

<u>Extraktionspuffer:</u>	55 mM	$\text{Na}_2\text{CO}_3$
	2% (w/v)	SDS
	2 mM	$\text{Na}_2\text{EDTA}$
	1 mM	PMSF
	3 mM	$\epsilon$ -Aminocapronsäure
	12% (v/v)	Glycerin
	56 mM	DTT
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau

### 2.3.2. Bestimmung des Proteingehaltes

#### 2.3.2.1. Esenschnelltest

Der Esentest eignet sich besonders für Vorversuche, in denen die Konzentration der Proteinproben schnell und lediglich annähernd bestimmt werden sollen. Als Referenz wurde eine BSA-Eichreihe in dem Bereich von 0 – 0,9 µg BSA pro 5 µl Extraktionspuffer (siehe 2.3.1.) erstellt. Je 5 µl der Eichreihe und der zu bestimmenden Proteinlösung wurden auf einen Streifen 3 MM Whatman-Papier pipettiert und getrocknet. Die Färbung des Streifens erfolgte für 10 Min. schwenkend in Eisenlösung. Um die Hintergrund-Färbung zu reduzieren, wurde anschließend das Whatman-Papier mit ausreichend Wasser gespült. Durch den Farbvergleich der Proteinlösung mit der Eichreihe ließ sich die Konzentration der Proben abschätzen.

<u>Eisenlösung:</u>	0,1% (w/v)	Coomassie Brillant Blue G250
	25% (v/v)	Isopropanol
	10% (v/v)	Essigsäure

#### 2.3.2.2. Proteinbestimmung nach Lowry *et al.* (1951), modifiziert

Die Proteinbestimmung nach Lowry zählt zu den colorimetrischen Methoden. Unter alkalischen Bedingungen, in Anwesenheit von Tartrat, reagieren die Peptidbindungen mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen unter der Bildung eines rötlich-violetten Protein- $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes (Biuret-Methode). Das Reagenz Folin-Ciocalteus wandelt vorwiegend die an die Aminosäurereste von Tyrosin und Tryptophan gebundenen  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Cu}^+$  um, wodurch aus dem Bestandteil Phosphomolybdät/Wolframat Heteromolybdän-Blau gebildet wird. Die Intensität der Farbreaktion korreliert mit dem Gehalt an Protein in der Probe und kann im Spektralphotometer bestimmt werden. Da eine Reihe von Substanzen die Farbreaktion stören können, empfiehlt sich eine vorangehende TCA-Fällung der Proteine.

Für die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe wurde zunächst eine BSA-Eichreihe von 0-100 µg BSA pro 10 µl  $\text{H}_2\text{O}$  erstellt. Je 10 µl der Eichreihe des Referenzproteins und der zu bestimmenden Proteinextrakte wurden mit 500 µl 10% TCA versetzt, für 10 Min. auf Eis gefällt und für weitere 10 Min. bei 18000 x g und 4°C zentrifugiert. Nachdem die Überstände sorgfältig abgesaugt wurden, wurde das Pellet in 200 µl 0,1 M NaOH gelöst und nach Zugabe von 1 ml Lösung III die Ansätze sofort geschüttelt. Dies geschah im gleichen Zeitabstand, wie z.B. alle 10 Sek., voneinander. Nach genau 10 Min. erfolgte die Zugabe von 100 µl Lösung IV, ein kurzes Schwenken und eine Inkubation im Dunkeln für 30 Min. Die Extinktion wurde am Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 500 nm



<u>1 x Laemmli-Laufpuffer:</u>	20% (v/v) 0,1% (w/v)	5 x Laemmli-Laufpuffer SDS
<u>Acrylamid-Lösung:</u>	30% (w/v) 0,8% (w/v)	Acrylamid N,N'-Methylbisacrylamid
<u>14% Trenngel:</u>	47% (v/v) 380 mM 0,1% (w/v) 0,08% (w/v) 0,08% (v/v)	Acrylamid-Lösung Tris/HCl pH 8,8 SDS APS TEMED
<u>6% Sammelgel:</u>	17,7% (v/v) 810 mM 0,1% (w/v) 0,1% (v/v)	Acrylamid-Lösung Tris/HCl pH 6,8 APS TEMED

## 2.4.2. Färbung von SDS-Gelen

### 2.4.2.1. Coomassie Färbung

Zur Überprüfung der Proteinextraktion ist die Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen eine sehr schnelle, jedoch auch unempfindliche Färbemethode. Das Gel wurde für 30 Min. in Coomassieblau-Färbelösung geschwenkt. Der Farbüberschuss auf dem Gel wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen in Entfärber reduziert, bis die blauen Proteinbanden gut sichtbar waren. Nach ausreichendem Spülen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O wurde das Gel eingescannt und zur längeren Aufbewahrung, zwischen zwei Cellophanfolien gespannt, für etwa 2 Tage bei RT getrocknet.

<u>Coomassieblau-Färbelösung:</u>	0,12% (w/v) 45% (v/v) 9% (v/v)	Serva-Blue R 250 Methanol Eisessig
<u>Entfärber:</u>	20% (v/v) 14% (v/v)	Methanol Eisessig

### 2.4.2.2. Coomassie-kolloidal Färbung nach Neuhoff (1988)

Die Sensitivität der Coomassie-kolloidal Färbung ist um das Doppelte erhöht im Vergleich zur herkömmlichen Coomassie Färbung. Der Zeitaufwand ist jedoch höher, da die eigentliche Färbung des Gels über Nacht erfolgt.

Nachdem das Gel für 1 Std. schwenkend in der Fixierungslösung inkubiert wurde, erfolgte die Färbung des Gels in 80% (v/v) Färbelösung und 20% (v/v) Methanol über Nacht. Anschließend wurde das Gel mehrmals mit ausreichend ddH<sub>2</sub>O gewaschen und entfärbt. War die unspezifische Hintergrundfärbung zu stark, wurde das Gel zusätzlich mit 20% (v/v) Methanol entfärbt.

<u>Lösung A:</u>	2% (w/v)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	10% (w/v)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<u>Lösung B:</u>	5% (w/v)	Coomassie Brillant Blau G250
<u>Fixierer:</u>	40% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
<u>Färbelösung:</u>	98% (v/v)	Lösung A
	2% (v/v)	Lösung B

#### 2.4.2.3. Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987), modifiziert

Bei Vorhandensein nur geringer Probenmengen empfiehlt sich die Silberfärbung eines Polyacrylamidgeles. Im Vergleich mit den voran beschriebenen Färbemethoden ist die Empfindlichkeit um das 50 – 100-fache erhöht.

Über Nacht wurde das Gel zunächst in Fixierungslösung inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 30% (v/v) Ethanol für jeweils mindestens 30 Min. Anschließend wurde das Gel für genau 1 Min. mit Lösung 1 imprägniert und dann dreimal 1 Min. in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dabei war darauf zu achten, die Zeiten dieser beiden Schritte genau einzuhalten. Die Färbung des Gels mit Lösung 2 liegt zwischen 20 und 60 Min. Eine Inkubation für 40 Min. hatte sich bei den durchgeführten Experimenten als geeignet herausgestellt. In diesem Schritt binden die Silberionen an die basischen und schwefelhaltigen Aminosäure-Reste der Proteine und werden reduziert. In den nun folgenden Schritten wurde mit vorgekühlten Lösungen gearbeitet. Nachdem das Gel für zweimal 30 Sek. in ddH<sub>2</sub>O gewaschen wurde, erfolgte die Zugabe von Lösung 3. Diese enthält ein starkes Reduktionsmittel, welches die Silberionen im Gel zu metallischem Silber reduziert und so die Proteinbanden rötlich-braun bis schwarz gefärbt werden. Die Zeit dieser Reduktion liegt zwischen 2 und 10 Min. Die Reduktion wurde durch eine zweimal 10-minütige Behandlung der Gels mit 7% (v/v) Essigsäure gestoppt. Nachdem das Gel noch zweimal 2 Min. mit ddH<sub>2</sub>O gespült wurde, konnte dieses in 30% (v/v) Methanol mehrere Tage aufbewahrt werden. Wie auch die Coomassie-Gele konnten die Silbergele nach mehrmaligem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O zwischen zwei Lagen Cellophanpapier getrocknet werden.

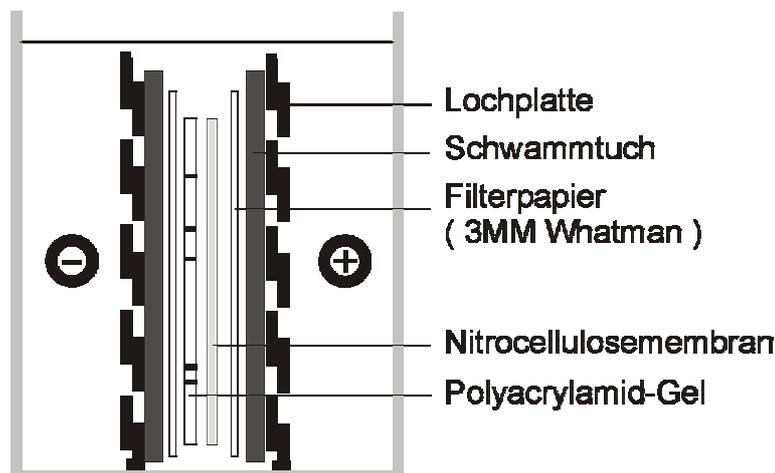
<u>Fixierer:</u>	50% (v/v)	Methanol
<u>Lösung 1:</u>	866 µM	Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> x 5H <sub>2</sub> O
	0,25% (v/v)	Formaldehydlösung
<u>Lösung 2:</u>	0,2% (w/v)	Silbernitratlösung
	0,03% (v/v)	Formaldehydlösung

<u>Lösung 3:</u>	6% (w/v)	Natriumcarbonatlösung
	0,02% (v/v)	Formaldehydlösung (37%)
	17 $\mu$ M	$\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$

## 2.5. Immunologischer Proteinnachweis

### 2.5.1. Western-Blot nach Towbin *et al.* (1979)

Um spezifische Proteine in einem Gel immunologisch nachweisen zu können, muss das in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteinisolat zunächst auf eine immobilisierende Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert werden. Dabei wird zwischen dem Semi-Dry-Blot- (Khyse-Andersen, 1984) und dem Tank-Blot-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979) unterschieden. Beiden ist das Anlegen einer Spannung und der elektrophoretische Transfer der Proteine senkrecht zur Trennrichtung des Gels gemeinsam. Ein schematischer Aufbau eines Sandwichs für das Tank-Blotting ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1:** Schematische Abbildung des Tank-Blot-Aufbaus nach Towbin *et al.* (1979).

Alle Komponenten wurden zunächst ausreichend in Transfer-Puffer getränkt, bevor das Sandwich luftblasenfrei zusammengebaut wurde. Der Transfer auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran Protran-Nitrocellulose BA85 (0,45  $\mu$ m) der Firma Schleicher und Schuell (Dassel-Relliehausen, Deutschland) erfolgte bei 10°C in einer Elektroblokt-Kammer der Firma Hoefer Scientific (San Francisco, USA) für 1½ - 2 Std. bei 400 mA. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran wurde diese zunächst für 1 Std. in frisch angesetzten Blockierungspuffer inkubiert und anschließend über Nacht in frischem Blockierungspuffer mit dem primären Antikörper bei 4°C geschwenkt. Zum Entfernen überschüssiger Reste des Antikörpers wurde die Membran hinterher viermal 6 Min. in PBST gewaschen. Ein gegen die Fc-Region des primären Antikörpers gerichteter, mit einer enzymatisch aktiven Gruppe gekoppelter, sekundärer Antikörper

wurde für 2 Std. in Blockierungspuffer auf die Membran gegeben. Um die überschüssigen Reste des zweiten Antikörpers zu entfernen, wurde die Membran erneut viermal 6 Min. mit PBST gewaschen. Die anschließende Enzymreaktion variierte nach der Wahl des sekundären Antikörpers. Handelte es sich bei dem gekoppelten Enzym um eine alkalische Phosphatase, wurde die Membran zunächst kurz für 2 Min. in TMN-Puffer äquilibriert. Durch Zugabe der NBT/BCIP-Lösung katalysiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase die Umsetzung von BCIP und NBT zu einem unlöslichen braun-violetten Farbstoff. Der Abbruch der Farbreaktion erfolgte durch Spülen der Membran mit ausreichend Wasser. Lichtgeschützt zwischen Filterpapier konnte die Membran getrocknet und aufbewahrt werden.

Die Verwendung eines an Peroxidase gekoppelten Antikörpers liefert nach Zugabe von Luminol ein Licht emittierendes Produkt (Chemilumineszenz). Hierfür wurde eine Lösung aus je 2 ml der ECL-Lösung I und der ECL-Lösung II auf die Membran gegeben, kurz (10 – 60 Sek.) inkubiert und anschließend abgossen. Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte an einer Quantix CCD-Kamera (Photometrics, Kodak KAF 1401E Chip), verbunden mit einem Schneider/Kreuznach Xenon 0,95 / 25 mm Objektiv mit der Lightview32 Software (Photometrics).

<u>Transferpuffer:</u>	20% (v/v) 20% (v/v) 0,02% (w/v)	5x Laemmli-Laufpuffer Methanol SDS-Stammlösung
<u>10 x PBS pH 7,1:</u>	1,4 M 27 mM 87 mM 18 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<u>PBST:</u>	10% (v/v) 0,1% (v/v)	10 x PBS Tween 20
<u>Blockierungspuffer:</u>	5% (w/v) in PBST	Magermilchpulver
<u>ECL-Lösung I:</u>	100 mM 2,5 mM 0,5 mM	Tris/HCl pH 8,5 Luminol p-Cumarsäure
<u>ECL-Lösung II:</u>	100 mM 5,4 mM	Tris/HCl pH 8,5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<u>TMN-Puffer:</u>	100 mM 100 mM 5 mM	Tris/HCl pH 9,5 NaCl MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
<u>BCIP-Lösung:</u>	5% (w/v)	5-Brom,4-Chlor,3-Indolyolphosphat in Dimethylformamid

NBT-Lösung: 5% (w/v) Nitroblue Tetrazolium  
in 70% (v/v) Dimethylformamid

BCIP/NBT-Lösung: 0,66% (v/v) NBT-Lösung  
0,33% (v/v) BCIP-Lösung  
in TMN-Puffer

Verwendete primäre Antikörper und deren Verdünnungen in Blockierungs-Puffer:

Kaninchen-Anti-ELIP (*Arabidopsis thaliana*) 1:250  
Ziegen-Anti-ELIP (*Pisum sativum*) 1:300  
Kaninchen-Anti-ELIP (*Nicotiana tabacum*) 1:250  
Kaninchen-Anti-ELIP (*Zea mays*) 1:500  
Kaninchen-Anti-GST-ELIP (*Hordeum vulgare*) 1:1000  
Kaninchen-Anti-LHCII (*Hordeum vulgare*) 1:3000

Verwendete sekundäre Antikörper und deren Verdünnungen in Blockierungs-Puffer:

Ziege-Anti-Kaninchen IgG alkalische Phosphatase gekoppelt (Sigma-Aldrich, # A-3687) 1:20000  
Kaninchen-Anti-Ziege IgG alkalische Phosphatase gekoppelt (Sigma-Aldrich, # A-4187) 1:20000  
Kaninchen-Anti-Ziege IgG Peroxidase gekoppelt (Sigma-Aldrich, # A-9169) 1:10000

### 2.5.2. Strippen von Nitrocellulosemembranen

Das Strippen von Nitrocellulosemembranen ermöglichte den mehrmaligen Gebrauch einer Membran und daher auch den Gebrauch von verschiedenen Antikörpern mit nur einem Gel. Die an der Membran gebundenen Antikörper wurden durch eine 30-minütige Inkubation bei 50°C in Lösung 1 vollständig entfernt. Nach zweimaligem Waschen der Membran für 10 Min. in PBS wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran erneut durch eine Inkubation mit frischer Blockierungslösung abgesättigt. Die anschließende Antikörperbehandlung erfolgte nach Vorschrift (siehe 2.5.1.).

Lösung 1: 62,5 mM Tris/HCl pH6,7  
100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2% (w/v) SDS

PBS: 10% (v/v) 10 x PBS

### 2.5.3. Bestimmung der Molaren Masse von Proteinen

Anhand einer bekannten Aminosäuresequenz eines Proteins kann dessen Molare Masse mit verschiedenen Computerprogrammen berechnet werden. Des weiteren kann auch die apparente Molare Masse im Western-Blot annähernd bestimmt werden, sofern ein gegen das zu untersuchende Protein gerichteter Antikörper vorliegt.

Für die immunologische Bestimmung wurde isolierter Proteinextrakt zusammen mit bekannten Standardproteinen in einer SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine

Nitrocellulosemembran transferiert und das Protein mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Mit Hilfe einer Eichreihe, in der die zurückgelegte Wanderungsstrecke der Referenzproteine gegen den Logarithmus der Molaren Masse aufgetragen wurde, konnte die des untersuchten Proteins bestimmt werden.

## **2.6. Nukleinsäuren-Isolierung**

### **2.6.1. Isolierung von Plasmid-DNA**

Allen Plasmidisolierungen ist die Methode der alkalischen Hydrolyse gemeinsam. Der bakterielle Zellaufschluss wird gefördert durch die Anwesenheit von EDTA, während SDS Membrane und Proteinkomplexe in lösliche Bestandteile zerlegt. Die chromosomale DNA wird im Gegensatz zur Plasmid-DNA durch die Zugabe von Natronlauge denaturiert, die dann im Anschluss durch die Zugabe des Neutralisierungspuffers unlösliche Komplexe bildet und ausfällt. Durch eine Zentrifugation können diese Zellbestandteile anschließend von der sich in Lösung befindenden Plasmid-DNA getrennt werden.

#### **2.6.1.1. Plasmid-Minipräparation**

Für das Screening von Transformationsansätzen und für Klonierungsexperimente wurde die HB-Lyse von *E.coli* verwendet. Dafür wurden die gepickten Einzelkolonien in sterilen Reagenzgläsern mit 10 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum überimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (150 rpm). 1,5 ml der üN-Kultur wurden anschließend für 2 Min. in einer Tischzentrifuge bei 16000 x g, RT zentrifugiert. Nach vollständigem Absaugen der Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 300 µl Puffer 1. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 wurde der Ansatz vorsichtig vier- bis sechsmal über Kopf gemischt und für nicht mehr als 5 Min. bei RT stehen gelassen. Dann erfolgte die Zugabe von 300 µl Puffer 3, ein erneutes vorsichtiges Schütteln des Ansatzes und die Inkubation für 10 Min. auf Eis. Die Suspension wurde anschließend bei 16000 x g, RT für 10 Min. zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur vollständigen Beseitigung aller unlöslichen Bestandteile wurde der Ansatz ein weiteres Mal zentrifugiert. Zur Fällung der isolierten Plasmid-DNA wurde 400 µl des Überstandes mit 700 µl 2-Propanol versetzt, vermischt und 30 Min. bei 16000 x g, RT zentrifugiert. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, noch einmal für 10 Min. bei 16000 x g (RT) zentrifugiert und der Überstand erneut abgesaugt. Bei 60°C wurde das isolierte

Plasmidpellet getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum besseren Lösen der Plasmid-DNA erfolgte eine Inkubation für 10 Min. bei 50°C. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert.

<u>Puffer 1:</u>	50 mM 10 mM 400 µg/ml	Tris/HCl pH 8,0 EDTA RNase A
<u>Puffer 2:</u>	200 mM 1% (w/v)	NaOH SDS
<u>Puffer 3:</u>	2,55 M	K-Acetat pH 4,8 ( mit Eisessig einstellen )
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM 1 mM	Tris/HCl pH 8,0 EDTA

### 2.6.1.2. Plasmid-Minipräparation über eine Säule

Für die Sequenzierung von in *E.coli* transformierter Plasmide wurde eine Plasmid Mini-Präparation über eine Säule der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland (QIAprep Spin Miniprep Kit, # 27104), durchgeführt. 2 ml einer über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln in LB-Medium mit selektiven Antibiotikum angezogene Bakterienkultur wurde für 10 Min. bei 16000 x g in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Pellet anschließend in 250 µl Puffer P1 durch vorsichtiges Schnipsen resuspendiert, mit 250 µl Puffer P2 versetzt und vorsichtig gemischt. Dann wurden 350 µl Puffer N3 hinzupipettiert, gemischt und für 10 Min. bei 16000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine QIAprep Säule gegeben, diese für 30 Sek zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und einer Zentrifugation für 30 Sek. gewaschen. Nachdem der Durchfluss verworfen war, wurde die Säule durch nochmaliges Zentrifugieren für 1 Min. getrocknet. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50 µl Puffer EB auf die Säule gegeben und erneut für 30 Sek zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt die gelöste Plasmid-DNA und wurde bei –20°C gelagert.

## 2.6.2. Isolierung genomischer DNA

### 2.6.2.1. Isolierung von genomischer DNA nach Doyle und Doyle (1990), modifiziert

Zur Isolierung genomischer DNA wurden 1 - 3 g des in flüssigem Stickstoff fein gemörserter Pflanzenmaterials in 10 ml CTAB-Puffer (auf 60°C vorgewärmt) und 20 µl β-Mercaptoethanol suspendiert. Nach einer Inkubation für 1 Std. im Wasserbad bei 65°C wurde der Ansatz für 20 Min. bei 2100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein

neues Gefäß überführt, mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und kurz gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 Min. wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze, zur Vermeidung von Scherkräften, abgenommen, mit 1 Vol 2-Propanol versetzt und vorsichtig gemischt. Die DNA fiel als fädig erscheinendes Aggregat aus, welches mittels einer Pasteurpipette, deren Spitze zu einem Haken umgeschmolzen war, gefischt werden konnte. Nach einem kurzen Waschschrift der DNA in 70% (v/v) Ethanol wurde diese im Exsikkator getrocknet und anschließend in 50 - 100 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNA wurde für 30 Min. im Wasserbad bei 40 – 50°C gelöst und anschließend bei –20°C aufbewahrt.

<u>CTAB-Puffer:</u>	2% (w/v)	CTAB
	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
	20 mM	EDTA
	1,4 M	NaCl
	2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon 40

#### 2.6.2.2. Minipräparation von genomischer DNA

Die Minipräparation eignete sich besonders für Experimente, in denen nur sehr geringe Mengen der zu analysierenden Probe vorlagen. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden maximal 100 mg Pflanzenmaterial überführt, mit 50 µl Shorty-Puffer versetzt und mit Hilfe eines kleinen Pistills vorsichtig zerstoßen. Nach einer Zugabe von 750 µl Shorty-Puffer und 50 µl RNase A (c = 10 mg/ml) wurde der gesamte Ansatz ausreichend vermischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 5 Min. bei 16000 x g, RT. Von dem klaren Überstand wurden 500 µl in einem neuen Reaktionsgefäß mit 550 µl PCI versetzt, 10 Sek. vermischt und erneut für 5 Min. bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert. Nachdem 500 µl erneut wie angegeben mit 550 µl PCI versetzt und zentrifugiert wurden, wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt und für 10 Min. bei RT und 16000 x g sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet in 80% (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert, bei 37°C getrocknet und in 40 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die isolierte DNA wurde bei –20°C gelagert.

<u>Shorty-Puffer:</u>	0,2 M	Tris / HCl pH 9,0
	0,4 M	LiCl
	25 mM	EDTA
	1% (w/v)	SDS
<u>PCI:</u>	25:24:1 Volumeneinheiten Phenol (80%), Chloroform und Isoamylalkohol, pH 7,5	

### 2.6.3. Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde sämtliches Einwegmaterial und die verwendeten Lösungen, mit Ausnahme des PCI und Ethanol, doppelt autoklaviert, um die Anwesenheit aktiver RNasen auszuschließen. Fein gemörsertes Pflanzenmaterial (300 mg) wurde mit 750 µl Lysispuffer versetzt und durch Vortexen ausreichend vermischt. Die folgenden Arbeiten wurden unter dem Abzug durchgeführt. Nach Zugabe von 750 µl PCI wurde das Lysat 30 Min. intensiv geschüttelt und zur Trennung der Phasen 20 Min. bei 18000 x g (RT) zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne das Präzipitat der Interphase zu vermischen. Zur vollständigen Aufreinigung der wässrigen Phase wurde eine erneute Extraktion mit 750 µl PCI durchgeführt, 5 Min. geschüttelt und wie oben angegeben 15 Min. zentrifugiert. Optional konnte dieser Schritt wiederholt werden, bis kein Präzipitat mehr an der Interphase auftrat. Der klare Überstand wurde anschließend mit 0,75 Vol 8 M LiCl versetzt und zur Fällung der RNA über Nacht bei 4°C gelagert. Die nachfolgenden Schritte wurden alle bei 4°C durchgeführt. Die ausgefallene RNA wurde 20 Min. bei 18000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 500 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2, und 1,25 ml eiskaltem 96%-igen Ethanol wurde für 1 Std. bei -70°C gefällt. Im Anschluss an einer 20-minütigen Zentrifugation bei 18000 x g, 4°C wurde das Pellet kurz mit 1 ml 70% (v/v) kaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde im Vakuumrotor getrocknet und anschließend in 50 µl ddH<sub>2</sub>O reuspendiert. Um Reste ungelöster Bestandteile zu entfernen, empfahl sich ein abschließender Zentrifugationsschritt. Die im Überstand enthaltene RNA wurde bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

<u>Lysispuffer:</u>	100 mM	Tris/HCl pH 8,0
	20 mM	EDTA
	600 mM	NaCl
	4% (w/v)	SDS

<u>PCI:</u>	25:24:1 Volumeneinheiten	Phenol (80%), Chloroform und Isoamylalkohol, pH 4,5
-------------	--------------------------	---

### 2.6.4. DNase-Verdau isolierter Gesamt-RNA

Für die semiquantitative Analyse isolierter Gesamt-RNA in einer RT-PCR (2.9.3.) war es notwendig, zuvor eine Behandlung mit DNase durchzuführen, um Spuren von Deoxyribonukleotiden auszuschließen, die das Ergebnis der RT-PCR verfälschen könnten. Für diesen Versuch wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 500 ng RNA,

1 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 u/µl Deoxyribonuklease (RNase frei), 1 u/µl Ribonuklease-Inhibitor und DEPC-behandeltes Wasser bis zu einem Endvolumen auf 10 µl pipettiert. Nach einer Inkubation für 30 Min. bei 37°C wurden 1 µl 25 mM EDTA hinzugegeben und für 10 Min. bei 65°C die DNase hitzedeaktiviert. Diese RNA konnte nun direkt für die RT-PCR verwendet werden.

<u>10 x Reaktionspuffer für DNase:</u>	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
	25 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>

### 2.6.5. Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration erfolgte bei einer 1:100- oder 1:50-Verdünnung der Proben am Spektralphotometer Typ „DU 7500 Spectrophotometer“ der Firma Beckman (Fullerton, California) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Um die Qualität der isolierten DNA bzw. RNA zu überprüfen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm gemessen. Bei sauberen Präparationen sollte das Verhältnis  $E_{(260\text{ nm})}/E_{(280\text{ nm})}$  zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

$$C_{\text{DNA}} = 50 * f_{\text{Verdünnung}} * OD_{260\text{nm}}$$

$$C_{\text{RNA}} = 40 * f_{\text{Verdünnung}} * OD_{260\text{nm}}$$

$$f_{\text{Verdünnung}} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 2.6.6. DNA-Agarosegelelektrophorese

#### 2.6.6.1. Native Gelelektrophorese

Native Gelelektrophoresen dienen unter anderem der Überprüfung der Amplifizierung von PCR-Fragmenten, des Restriktionsendonukleaseverdaus, der Bestimmung des Nukleinsäuregehaltes und der Elution spezifischer DNA-Fragmente. Für ein 1%-iges Agarosegel wurde 1 g QA-Agarose TM von Qbiogene mit 100 ml TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nachdem die Agarose auf 60°C abgekühlt war, wurde das Gel in einem Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach Festwerden der Agarose wurde der Kamm entfernt, die zu analysierenden DNA-Proben mit 1/6 Laufpuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Der Lauf erfolgte in Elektrophoresekammern „Sub-Cell GT cell“ von Bio-Rad (München, Deutschland) mit TAE-Puffer. Die gewählte Spannung variierte je nach Gelgröße zwischen 80 und 120 mV. Im Anschluss wurde das Agarosegel im Ethidiumbromidbad (20 µl einer 5 mg/ml

Stammlösung auf 1 l ddH<sub>2</sub>O) 20 Min. gefärbt. Ethidiumbromid ist ein rötlich gefärbter Fluoreszenzfarbstoff, der sich mit seinen aromatischen Ringen an die heterozyklischen der Nukleotidbasen bindet (Interkalation). Die Dokumentation der Gele erfolgte am „GelDoc 1000“ von Bio-Rad.

<u>6 x Ladungspuffer:</u>	0,09% (w/v)	Bromphenolblau
	0,09% (w/v)	Xylencyanol
	60% (v/v)	Glycerin
	60 mM	EDTA
<u>TAE-Puffer:</u>	40 mM	Tris
	10 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA
	auf pH 7,8 mit konz. Essigsäure einstellen	

### 2.6.6.2. Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse der Anzahl der *elip*-Kopien in der genomischen DNA von *Vitis vinifera* diente die Southern-Blot Analyse. Jeweils 20 µg der isolierten genomischen DNA wurden mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen bei der jeweils entsprechenden Restriktionstemperatur über Nacht gespalten. Die DNA-Fragmente wurden anschließend nach ihrem Molekulargewicht in einem Agarosegel aufgetrennt und im Kapillarblot auf eine immobilisierende Membran transferiert.

20 µg der gespaltenen DNA wurden mit 1/6 Ladungspuffer versetzt und auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für 1 Std. bei einer Spannung von 80 mV in TAE-Puffer. Anschließend wurde das Gel zur Überprüfung der Qualität des Restriktionsendonukleaseverdaus für 20 Min. im Ethidiumbromidbad gefärbt und für die Dokumentation fotografiert. Damit die radioaktiv markierte Sonde auch an die nachzuweisenden DNA-Fragmente hybridisieren kann, musste zunächst die doppelsträngige DNA im Gel denaturiert und einzelsträngig gemacht werden. Dies erfolgte schwenkend durch eine zweimal 20-minütige Inkubation in frisch zubereiteter Denaturierungslösung. Dabei war darauf zu achten, dass das gesamte Gel vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Anschließend wurde das Gel zweimal 20 Min. auf einem Schüttler in Neutralisierungslösung gewaschen.

<u>Denaturierungslösung:</u> (frisch ansetzen)	1.5 M	NaCl
	0.5 M	NaOH
<u>Neutralisierungslösung:</u>	1 M	Tris/HCl pH 8,0
	2 M	NaCl

### 2.6.7. RNA-Agarosegelelektrophorese

Um das Vorhandensein bestimmter RNA-Spezies nachweisen zu können, wurde die isolierte RNA (siehe 2.6.3.) zunächst in einem denaturierenden Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und anschließend über einen Kapillar-Blot auf eine immobilisierende Membran transferiert (2.7.1.1.). Die Konzentration des Agarosegels war abhängig von der Größe der nachzuweisenden RNA. Die unten angegebene Tabelle (Tab 2.1) zeigt die geeigneten Agarosegelkonzentrationen auf.

Größe der RNA-Fragmente (kb)	Konzentration des Agarosegels (w/v %)
1 - 30	0,5
0,8 - 12	0,7
0,5 - 7	1,0
0,4 - 6	1,2
0,2 - 3	1,5
0,1 - 2	2,0

**Tab. 2.1: Agarosegel-Konzentration des denaturierenden Gels in Abhängigkeit von der Größe der nachzuweisenden RNA-Spezies.**

Für die Präparation eines 1,5%-igen Agarosegels wurde zunächst 1,88 g Agarose in 104 ml ddH<sub>2</sub>O in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60°C erfolgte die Zugabe von 12 ml 10 x MOPS und 4 ml 37% Formaldehyd. Vor dem Auftrag der Proben auf das Gel wurde zunächst 10 µg der gelösten Gesamt-RNA mit 3 Vol Northern-Mix versetzt, gemischt und 15 Min. bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Nach kurzer Abkühlung der Proben auf Eis konnten diese auf das Gel aufgetragen werden. Der Lauf erfolgte in 1 x MOPS bei 80 - 120 mV, abhängig von der Größe des Gels. Im Anschluss daran wurde die Qualität des Gels im Transilluminator überprüft und dokumentiert. Das Vorhandensein von Ethidiumbromid im Northern-Mix ermöglichte das Sichtbarmachen der RNA-Banden unter UV-Licht.

<u>10 x MOPS:</u>	0,2 M	MOPS (Sterilfiltriert)
	0,05 M	Natriumacetat
	0,01 M	EDTA pH7,0
<u>Northern-Lösung 1:</u>	10% (v/v)	10 x MOPS pH 7,0
	6,5 % (v/v)	Formaldehyd
	50 % (v/v)	Formamid
<u>Northern-Lösung 2:</u>	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	50% (v/v)	Glycerin
	1 mM	EDTA pH 8,0

Northern-mix: 5 ml Northern-Lösung 1 + 1 ml Northern-Lösung 2 +  
40 µl Ethidiumbromid (c = 5mg/ml)

### **2.6.8. DNA-Elution aus Agarosegelelektrophoresen**

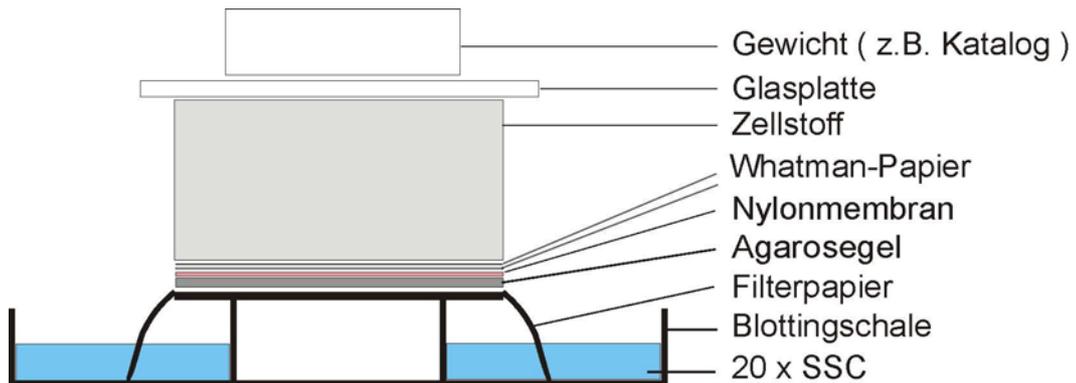
Die Extraktion von DNA aus nativen Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des GeneCleanII-Kit der Firma Qbiogene (Heidelberg, Deutschland). Die gewünschte DNA Bande wurde mit Hilfe eines scharfen und sauberen Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. 3 Vol NaI-Lösung wurden zugegeben, kurz vermischt und im Wasserbad bei 45 - 55°C inkubiert. Dabei wurde das Reaktionsgefäß alle 2 Min. kurz geschwenkt. Nach etwa 5 Min. sollte sich die Agarose vollständig gelöst haben, ansonsten wurde die Inkubationszeit noch erhöht. Vor dem Gebrauch der Glasmilch wurde diese 1 Min. gevortext, um alle Komponenten zu solubilisieren. In das Reaktionsgefäß wurden 5 µl der Glasmilch pipettiert, gemischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Während dieses Schrittes den gesamte Ansatz alle 1 - 2 Min. vortexen, um die Glasmilch in Lösung zu halten. Die an die Glasmilch gebundene DNA wurde für 5 Sek. in einer Tischzentrifuge bei 16000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit 500 µl eiskaltem New Wash durch Resuspendieren gewaschen und wie angegeben zentrifugiert. Nach den Waschschrinen wurde noch einmal zentrifugiert, um sämtliche Flüssigkeitsreste zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 20 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, 2 - 3 Min. bei 45 - 55°C inkubiert und für 30 Sek. zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gelöste DNA und wurde bei -20°C gelagert.

## **2.7. Analyse von Nukleinsäuren**

### **2.7.1. Southern- und Northern-Blot**

Der Transfer von isolierter, mit Restriktionsendonukleasen verdauter und in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennter DNA und isolierter Gesamt-RNA auf eine Bodyne B Nylonmembran der Firma Pall, New York, USA, erfolgte mittels Kapillarblot (siehe Abb. 2.2) über Nacht. Als Laufpuffer diente hier 20 x SSC, der in die Blottingschale gefüllt wurde. Das Agarosegel wurde mit der Oberseite nach unten auf einen Streifen Filterpapier gelegt, welches mit beiden Enden im Laufpuffer hing, und somit eine „Brücke“ zwischen der Lösung und dem Agarosegel bildete. Um das Gel herum wurde Aluminiumfolie gelegt, um einen Kontakt außerhalb des Gel-Membran-Filterkomplexes auszuschließen, was zu einem verminderten Transfer führen würde. Auf das Gel wurde zunächst luftblasenfrei eine Nylonmembran und anschließend 2 Lagen 3 MM-Filterpapier

(Whatman) gleicher Größe gelegt. Es folgte ein etwa 6 cm dicker Stapel Zellstoff, der für die entsprechende Saugkraft im Kapillarblot verantwortlich war. Abschließend wurde eine Glasplatte und ein etwa 0,5 kg schweres Gewicht auf den gesamten Blot gelegt. Der Transfer erfolgte 18 – 20 Std. über Nacht. Anschließend wurde die Membran für 90 Sek. unter UV-Licht im Transilluminator gelegt, um die DNA / RNA auf der Membran zu fixieren. Zwischen zwei Lagen Whatman-Papier konnte die Membran getrocknet und in Aluminiumfolie bei RT bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.



**Abb. 2.2: Schematischer Aufbau des Kapillar-Blots für einen Southern- und Northern-Blot.**

<u>20 x SSC:</u>	0.3 M	Natriumcitrat pH 7,0
	3 M	NaCl

### 2.7.2. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Als komplementären Strang für die nachzuweisende DNA / RNA Spezies wurde eine radioaktiv markierte Sonde eingesetzt. Dafür wurde eine Teilsequenz genomischer DNA über eine PCR amplifiziert und anschließend radioaktiv markiert. Die Markierung erfolgte mit dem „DecaLabel™ DNA Labeling Kit“ von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland, #K0622), basierend auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983). Hierbei wurde die zu markierende doppelsträngige DNA zunächst auf 95°C erhitzt, um DNA-Einzelstränge vorliegen zu haben. Kurze Dekanukleotide binden an die DNA-Einzelstränge und dienen der DNA Polymerase I, Exonuklease Minus (Klenow Fragment exo-) als Primer, die den komplementären Strang in der Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten verlängert. Ist dabei, wie in diesem Versuch angewendet, ein Desoxynukleotidtriphosphat <sup>32</sup>P-radioaktiv markiert, wird dieses in den Strang mit eingebaut, der dann radioaktiv markiert ist. 100 ng der zu markierenden DNA wurden mit 10 µl Dekanukleotiden versetzt und auf 41 µl Gesamtvolumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ansatz wurde ausreichend vermischt und anschließend für 10 Min. bei 95°C denaturiert.

Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis erfolgte eine kurze Zentrifugation und die Zugabe von 3 µl Mix C, 5 µl  $^{32}\text{P}$ -dCTP (2 MBq) und 1 µl Klenow Fragment exo- (5 u). Nach einer Inkubation von 5 Min. bei 37°C wurden 4 µl dNTP Mix zugegeben und erneut wie oben angegeben inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt.

Um die markierte DNA von den freien Nukleotiden zu trennen, wurde der Labeling-Ansatz mit 100 µl TNE-Puffer versetzt, auf eine mit TNE-Puffer äquilibrierte Sephadex-G50-Säule gegeben und für 5 Min. bei 300 rpm in einer Biophuge A (Heraeus-Christ, Hanau, Deutschland) abzentrifugiert. Dabei verblieben die ungebundenen Nukleotide im Säulenmaterial, während sich die markierte Sonde im Eluat befand. Vor und nach der Gelfiltration wurde jeweils 1 µl des Labeling-Ansatzes auf ein Stück Whatman-Papier pipettiert und im Beckmann-Counter nach Cerenkov die Einbaerate und die counts pro ml Hybridisierungslösung bestimmt.

<u>TNE-Puffer:</u>	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

Sephadex-G-50-Säule (Sephadex G-50 von Pharmacia: Typ Dextran mit einem Fraktionierungsbereich von 1-30 kDa)

### 2.7.3. Hybridisierung

Die Hybridisierung stellt die Assoziation einzelsträngiger, an der Membran gebundener Nukleinsäuren mit Einzelsträngen der Sonde dar. Dabei erhöht sich die Spezifität der Sonde mit zunehmender Länge der Nukleinsäurefragmente. In Kunststoffschalen wurden die Membranen zunächst für 3 - 6 Std. bei 60°C in 15 - 20 ml Hybridisierungslösung geschwenkt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Denaturierung der hergestellten Sonde durch 10-minütiges Kochen, bevor sie vorsichtig in die Hybridisierungslösung pipettiert wurde. Ein direkter Kontakt der Membran mit der konzentrierten Sonde sollte dabei vermieden werden. Es empfiehlt sich eine Aktivität von  $1 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$  cpm pro ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C schüttelnd über Nacht. Anschließende Waschschriffe dienten dazu, unspezifische Bindungen der Sonde an nicht homologe Sequenzen zu entfernen. Dabei wurde zunächst die Membran zweimal 15 Min. mit Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend zweimal 15 Min. mit Waschpuffer 2 bei RT. Zwischen den einzelnen Waschschriffen wurde die Aktivität der Membran gemessen. Bei verbleibender zu hoher Strahlung konnten die Waschschriffe mit einer Erhöhung der Temperatur bis auf

65°C und einer Verringerung der Salzkonzentration der Waschlösung wiederholt werden. Die noch feuchte Membran wurde in Folie eingeschweißt und eine Phosphorimager-Platte (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) aufgelegt. In einer Bleikassette verschlossen betrug die Expositionszeit 1 - 4 Tage. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software TINA Version 2.0 (Raytest).

Die Hybridisierungslösung wurde bei -20°C gelagert und konnte innerhalb eines kurzen Zeitraumes wiederverwendet werden. Die Halbwertszeit von <sup>32</sup>P beträgt 14 Tage. Vor einem erneuten Gebrauch der Hybridisierungslösung muss diese noch einmal für 20 Min. auf 70°C erhitzt werden.

<u>Hybridisierungslösung:</u>	50% (v/v)	Formamid
	5 x	Denhardt's
	5 x	SSC
	1% (w/v)	SDS
	100 µg/ml	Lachssperma DNA (frisch zugeben, vorher 10 Min. bei 95°C kochen)
<u>100 x Denhardt's:</u>	2% (w/v)	Ficoll 400
	2% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon 25
	2% (w/v)	BSA
<u>Waschpuffer 1:</u>	2 x	SSC
	0,1% (w/v)	SDS
<u>Waschpuffer 2:</u>	0,1 x	SSC
	0,1% (w/v)	SDS

## 2.8. Pigment-Analyse

### 2.8.1. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Wie bei allen chromatographischen Methoden dient die HPLC der Trennung von verschiedenen Substanzgemischen. Anders als bei der herkömmlichen Säulenchromatographie wird die mobile Phase mit Drücken bis zu 400 bar durch die Säule, in der sich die stationäre Phase befindet, gepumpt. Der Vorteil der HPLC liegt in der Möglichkeit, selbst chemisch verwandte Substanzen zu trennen. Je nach zu trennenden Gemischen können unterschiedliche Chromatographiemethoden angewendet werden. In der Normalphasen-Chromatographie stellen hochporöse Kiesegelteilchen, die an ihrer Oberfläche Silanolgruppen tragen, die stationäre polare Phase dar, die von der unpolaren mobilen Phase (=Eluent) mit der zu trennenden Substanz durchströmt wird. Polare Substanzen treten nun aufgrund von Van der Waals'-Kräften mit der stationären Phase in

Wechselwirkung und verlassen die Säule später als unpolare Substanzen. Bei der Umkehrphasen-Chromatographie (RP-HPLC) sind die polaren Silanolgruppen der Kieselgelteilchen aufgrund chemischer Modifikation durch unpolare Alkylreste ersetzt. In diesem Fall sind die Kieselgelteilchen nur noch Träger der stationären Phase. Häufig eingesetzte Säulen in der Umkehrphasen-Chromatographie sind mit C<sub>18</sub>- und C<sub>8</sub>-Alkylresten besetzt. Die mobile Phase ist in diesem Fall nun polarer als die stationäre, was dazu führt, dass, anders als bei der Normalphasen-Chromatographie, zunächst die stärker polaren Substanzen die Säule verlassen.

Bei einer isokratischen Elution wandert der Eluent mit konstanter Zusammensetzung durch die Säule, während sich bei einer Gradientenelution die Zusammensetzung schrittweise oder konstant ändert. Die Änderung geschieht derart, dass die Elutionskraft (= Verdrängungskraft) der mobilen Phase zunimmt. Notwendig wird diese Methode bei Substanzgemischen, die aufgrund der unterschiedlichen Polaritäten starke Differenzen in der Retentionszeit (= Zeit, die eine Substanz benötigt, um durch die Säule zu gelangen) aufweisen. Mit Hilfe eines angeschlossenen Detektors wurden die eluierten Substanzen als Peaks aufgezeichnet und als Ergebnis die Flächen unter den jeweiligen Peaks in mV \* Min. dargestellt, nicht jedoch deren genaue Identifizierung. Aufgrund dessen wurden die Peaks in einem Fraktionssammler gesammelt und anschließend in einem Spektralphotometer bestimmt.

### **2.8.2. Pigmentextraktion nach Norris *et al.*, 1995**

Für die Extraktion der Pigmente wurde 50 mg fein gemörsertes Pflanzenmaterial in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Das Gewicht wurde an der Analysenwaage auf 1 mg genau notiert. Es wurde 500 µl Aceton zugegeben, sorgfältig gemischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Dabei musste alle 2 Min. erneut kurz gemischt werden. Nach einer Zentrifugation bei 18000 x g, 4°C für 10 Min. wurde der Überstand vollständig in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und auf Eis im Dunkeln aufbewahrt. Das Pellet wurde mindestens zweimal mit 400 µl Aceton gewaschen und erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt erschien das Pellet weiß. Die Menge des für die Extraktion eingesetzten Acetons wurde ebenfalls notiert. Die Überstände wurden vereinigt, gemischt und, um die Proben von Schwebstoffen zu befreien, noch einmal für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Verhältnis 1:5 verdünnt. Der Blattextrakt wurde anschließend luftblasenfrei in die 20 µl Probenschleife der HPLC-Anlage injiziert.

### 2.8.3. Gradientenelution nach Norris *et al.*, 1995

Die Auftrennung der auf die HPLC-Säule gegebenen Pigment-Extrakte erfolgte mit Hilfe einer Gradientenelution, bei der zwei verschiedene Lösungsmittel eingesetzt wurden. In welchen Verhältnissen und zu welchen Zeiten Lösungsmittel A (Acetonitril und ddH<sub>2</sub>O, 9:1) und Lösungsmittel B (Ethylacetat) auf die Säule trafen, ist der Tab. 2.2 zu entnehmen.

#### Anlage HPLC:

HPLC-Pumpen 420 (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)

HPLC Detektor 430 (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)

Gradientenmischer M800 (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)

Fraktionssammler Frac-100 (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)

20 µl Probenschleife

Programm zur Datenaufzeichnung: Kroma System 2000 (Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland)

#### Lösungen für die HPLC:

Aceton für die HPLC (Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland)

Ethylacetat für die HPLC (Applichem, Darmstadt, Deutschland)

Acetonitril für die HPLC (Applichem, Darmstadt, Deutschland)

ddH<sub>2</sub>O ultrapure

Wasseranlage: Seralpur PRO90CN 0,2 µm der Firma Seral Reinstwassersysteme (Ransbach-Baumbach, Germany)

Zeit (in Min.)	Acetonitril + H <sub>2</sub> O (9:1)	Ethylacetat	Flußrate
Initial	70 %	30 %	0,5 ml/min
5,00	60 %	40 %	
15,00	47 %	52 %	
25,00	30 %	70 %	
27,50	0 %	100 %	
32,50	0 %	100 %	
35,00	70 %	30 %	
40,00	70 %	30 %	
41,00	70 %	30 %	

Tab 2.2: Gradientenelution der HPLC für die Pigmentextraktion

### 2.8.4. Berechnung der Pigmentmenge

Das während einer Gradientenelution aufgezeichnete Chromatogramm gibt für die einzelnen Pigmente lediglich die einzelnen Peakflächen in mV\*Min. an. Zur Bestimmung der Pigmentmengen wurde die Kalibrierung nach Jens Beator (1993) zur Hilfe genommen. Dabei wird bei angegebenen Wellenlängen von folgenden Kalibrierungsfaktoren  $k$  ausgegangen:

Chlorophyll a (bei 431 nm):	22,9 ng/mV x Min.
Chlorophyll b (bei 464 nm):	18,7 ng/mV x Min.
Neoxanthin (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.
Violaxanthin (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.
Antheraxanthin (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.
Lutein (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.
Zeaxanthin (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.
β-Carotin (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.
α-Carotin (bei 464 nm):	10,9 ng/mV x Min.

Daraus ergibt sich für die Bestimmung der in den Blattextrakten vorhandenen und in der HPLC aufgetrennten Pigmente nachstehende Formel:

$$\frac{\text{Pigment (ng)}}{\text{Frischgewicht (g)}} = \frac{\text{Peakfläche (mV * Min.)} \times k \text{ (ng/mV * Min.)} \times V_f}{\text{Frischgewicht (g)}}$$

$V_f$  = Verdünnungsfaktor  
 $k$  = Kalibrierungsfaktor

### 2.8.5. Bestimmung des EPS-Wertes

Der „epoxidation state of the xanthophyll pool“ (EPS-Wert; Demmig-Adams, 1990) ist ein Maß für die Deepoxidation des Violaxanthins zu Antheraxanthin und Zeaxanthin. Werte gegen 1 liegen bei nicht-photoinhibierenden Bedingungen vor, während sie mit zunehmendem Lichtstress abfallen.

$$\text{EPS} = (\text{Violaxanthin} + 0,5 \times \text{Antheraxanthin}) / (\text{Violaxanthin} + \text{Antheraxanthin} + \text{Zeaxanthin})$$

### 2.8.6. Photometrische Pigmentbestimmung

Da die HPLC zwar mit der Kenntnis des Extinktionskoeffizienten eine Bestimmung der Pigmentmenge zulässt, nicht aber dessen genaue Identifizierung, erfolgte diese am Spektralphotometer. Hierfür wurden die einzelnen Peakfraktionen gesammelt, im Vakuumrotor getrocknet und in den entsprechenden Lösungsmitteln aufgenommen (Tab. 2.3 und Tab. 2.4). Die Absorptionsmaxima ermöglichen die Charakterisierung des Peaks.

Absorptionsmaxima der Chlorophylle in 100% Aceton	
Name	Abs.-Maxima (nm) Literatur
Chlorophyll a	411, <b>430</b> , 579, 616, (645), <b>662</b>
Chlorophyll b	<b>456</b> , 596, <b>645</b>

#### Abb. 2.3: Absorptionsmaxima der Chlorophylle in 100% Aceton.

Die in der HPLC aufgetrennten und gesammelten Pigmente wurden im Vakuumrotor schonend getrocknet und anschließend in wenig Aceton aufgenommen. Zur Identifizierung der Chlorophyllpeaks wurden die Absorptionsmaxima nach Lichtenthaler (1987) bestimmt.

Absorptionsmaxima der Carotinoide		
Name	Lösungsmittel	Abs.-Maxima (nm ) Literatur
Neoxanthin	100 % Ethanol	415, 439, 467
Violaxanthin	100 % Ethanol	419, 440, 470
Antheraxanthin	100 % Ethanol	422, 444, 472
Lutein	100 % Ethanol	422, 445, 474
Zeaxanthin	100 % Aceton	430, 452, 479
$\beta$ -Carotin	100 % Aceton	429, 452, 478
$\alpha$ -Carotin	100 % Aceton	k.A.

**Abb. 2.4: Absorptionsmaxima der Carotinoide.**

Die in der HPLC getrennten Carotinoide wurden gesammelt, im Vakuumrotor getrocknet und in den oben angegebenen Lösungsmitteln aufgenommen. Durch die ermittelten Absorptionsmaxima lassen sich die verschiedenen Pigmentpeaks den einzelnen Carotinoiden zuordnen. Nach: Britton *et al.*, 1995.

## 2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.9.1. verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5'-3'Richtung	Länge	Funktion	Hybrid. Temp.	Größe amplifiziertes Fragments
Elip2-fwr	GAC GAA TTC AGT GAA CGC CA	20 bp	Amplifizieren des PCR-Fragmentes für Antisense-Inhibierung <i>elip2</i> bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	55 °C	672 bp
Elip2-rev	CGT CCG CAG GAT CCA GCT TA	20 bp			
CamV-fwr	GTG ACA TCT CCA CTG ACG TAA GG	23 bp	1)Prüfung des Antisense-Einbaus von <i>elip2</i> bei <i>Arabidopsis thaliana</i> 2)Kolonie-PCR von <i>E.coli</i> und <i>A.tumefaciens</i> 3)Sequenzierung	56°C	669 bp
Anti-Elip2-rev	GGC AAC AGC ATC GTT CAA CA	20 bp			
RT-Elip1-fwr	ACA TGC AGT CAG TGT TCG CT	20 bp			
RT-Elip1-rev	CAA CGC AAC GAG ACC GAG CA	20 bp	Primer für die semiquantitative RT-PCR zur Überprüfung der Antisense-Inhibierung von <i>elip1</i> bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	54°C	524 bp
RT-Elip2-fwr	GGC AAC AGC ATC GTT CAA CA	20 bp	Primer für die semiquantitative RT-PCR zur Überprüfung der Antisense-Inhibierung von <i>elip2</i> bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	56°C	565 bp
RT-Elip2-rev	GAC GAA CTC AGT GAA CGC CA	20 bp			
HptII-fwr	CGC GTC TGC TGC TCC ATA CA	20 bp	Herstellung einer stranspezifischen Sonde für Hygromycin-Resistenz	57°C	492 bp
HptII-rev	CAG CGA GAG CCT GAC CTA TT	20 bp			
RT-VV-fwr	CAA CCA CCA TGC AAT CCA CC	20 bp	Sequenzierung der <i>elip</i> -cDNA von <i>Vitis vinifera</i> cv. Sultanina	55°C	744 bp bei genomischer DNA
RT-VV-rev	TAT TCA GTG AAG GCG AGT GC	20 bp			
Seq-VV-fwr	AGT ACA CAG TAG CAT CGC CA	20 bp	Sequenzierung des <i>elip</i> -Gens der genomischen DNA bei <i>Vitis vinifera</i>	53 °C	639 bp bei cDNA
Seq-VV-rev	GGT GAT AGC TAG ACA AGA G	19 bp			

**Tab.2.5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.**

Neben der Auflistung der Namen und Sequenzen wurden zusätzlich die Kombination der Oligonukleotide untereinander dargestellt. Daher stellt die Tabelle zusätzlich den Anwendungsbereich, die geeignete Hybridisierungstemperatur und die Größe des amplifizierten Fragmentes dar.

### 2.9.2. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1988) dient der Amplifizierung spezifischer Nukleotidsequenzen. Im Rahmen dieser Arbeit diente als Matrize sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA. Der Einsatz war vielfältig. Über eine PCR amplifizierte Nukleotidabschnitte genomischer DNA wurden in einer Sequenzierung analysiert. Weiterhin wurde für die Erstellung von transgenen Antisense-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* die *elip2*-cDNA aus einem vorliegenden Vektor amplifiziert und anschließend in Antisense-Orientierung in einen Transformationsvektor kloniert. Die Selektion positiver Klone nach Klonierungsexperimenten (Kolonie-PCR) erfolgte ebenso über eine PCR wie auch die Herstellung strangspezifischer Sonden für den Southern-Blot. Das Prinzip der PCR ist dabei wie folgt: durch eine thermische Denaturierung wird die template DNA in ihre Einzelstränge zerlegt. Nach Abkühlung auf eine für die verwendeten synthetischen Oligodeoxyribonukleotide (= Primer) spezifische Temperatur folgt die Hybridisierung dieser an die komplementären Sequenzabschnitte der Einzelstränge am 3'-Ende. Die Synthese des Doppelstranges erfolgt durch die thermostabile Taq-Polymerase bzw. PWO-Polymerase bei 72°C vom 3'-Ende des Primers her (= Polymerisation). Die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsabläufe führt zu einer exponentiellen Vermehrung der ausgewählten Nukleotidsequenz. Für die PCR wurde der Thermocycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Firma MJ Research (Watertown, Massachusetts) verwendet. Dieser ist mit einem Peltier-Element ausgestattet, welches die Temperaturwechsel des wärmeleitenden Metallblocks durch Anlegen eines Stroms an einen aus zwei Metallen bestehenden Leiter in sehr kurzer Zeit erreicht. Je nach Stromrichtung resultiert daraus eine Heizung oder Kühlung des Blocks (Schimpf, 2002). Die Auswahl der geeigneten Primer und die Ermittlung der idealen Hybridisierungstemperatur erfolgte mit Hilfe des Programms „Primer“, Version 2.2.

#### PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 25 µl):

- 2,5 µl 10 x Reaktionspuffer für Taq-Polymerase bzw. PWO-Polymerase
- 0,5 µl Nukleotidmix (je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- 2 µl forward Primer (10 pmol/µl)
- 2 µl reverse Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Red Taq-Polymerase (Sigma-Aldrich) bzw. PWO-Polymerase (Hybaid) (1 u/µl)
- 1 µl Matrizen-DNA oder Bakterienkolonie
- 16 µl steriles ddH<sub>2</sub>O

PCR-Programm:

- |                    |                              |
|--------------------|------------------------------|
| 1. 94°C, 3,00 Min. | Initiale Denaturierung       |
| 2. 35 Zyklen:      |                              |
| 94°C, 30 Sek.      | Denaturierung                |
| 50-60°C, 30 Sek.   | Primer-Hybridisierung        |
| 72°C, 1 Min.       | Polymerisation               |
| 3. 72°C, 3 Min.    | abschließende Polymerisation |
| 4. Kühlung bei 4°C |                              |

<u>10x Reaktionspuffer für Pwo-Polymerase:</u>	100 mM	Tris/HCl pH 8,8
	250 mM	KCl
	20 mM	MgSO <sub>4</sub>

<u>10x Reaktionspuffer für Taq-Polymerase:</u>	100 mM	Tris/HCl pH 8,3
	500 mM	KCl
	11 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0.1% (w/v)	Gelatine

**2.9.3. RT-PCR**

Die RT-PCR (RT = Reverse Transkription) dient der Amplifikation spezifischer RNA-Sequenzen. Zunächst wird die RNA mit Hilfe der DNA Polymerase Reverse Transkriptase in einer Zwei-Schritt-RT-Reaktion in den komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben (= Erststrangsynthese). Durch den Einsatz eines Oligo(dT)-Primers, der im Bereich des Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA hybridisiert, wird nur die in der Gesamt-RNA vorkommende mRNA in cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden PCR wird die cDNA als template eingesetzt und amplifiziert. Die RT-PCR bietet die Möglichkeit, unter Verwendung eines definierten Standards, die Transkripthäufigkeit bestimmter Gene nachzuweisen. Im Vergleich zur Northern-Blot Analyse hat die RT-PCR den Vorteil, dabei auch seltene Transkripte nachweisen zu können.

Für den ersten Schritt der RT-Reaktion wurden in einem Reaktionsgefäß 500 ng RNA mit 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Oligo(dt)23(Poly-dT-Primer) versetzt, mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und vermischt. Nach einer Inkubation des Gemisches bei 70°C für 10 Min. im Wasserbad wurde dieses für 2 Min. auf Eis gekühlt. Für die cDNA-Erststrangsynthese wurde im zweiten Schritt zu 6 µl des Reaktionsansatzes aus dem ersten Schritt 2 µl 5 x Reaktionspuffer für M-MuLV Reverse Transkriptase, 1 u RNase Inhibitor und 200 u M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 Std. bei 42°C. Dieser Reaktionsansatz wurde für eine anschließende PCR verwendet, in der die cDNA als template diente.

<u>5 x Reaktionspuffer:</u>	250 mM	Tris/HCl pH 8,3
	250 mM	KCl
	20 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT

## 2.10. DNA-Modifizierung

### 2.10.1. Plasmide

Plasmid	Merkmale	Verwendungszweck	Herkunft
pGEM-T	Ap <sup>R</sup> , lacZ $\alpha$ , EcoRV mit 3'-terminalen Thymidin-resten an beiden Enden	Inserieren eines PCR-Fragmentes	Promega
pART7	Ap <sup>R</sup> , lacZ $\alpha$	Klonierungsvektor	Gleave, 1992
pBinHyg-TX	Hyg <sup>R</sup>	Binärer Vektor	Gatz <i>et al</i> , 1992
pBluescript SK (+/-)	Ap <sup>R</sup> , lacZ $\alpha$	Universelles high copy number Plasmid für Sequenzierung	Stratagene

**Tab. 2.6:** Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide und deren Merkmale.

### 2.10.2. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Anwendung von Restriktionsendonukleasen ermöglicht eine sequenzspezifische Hydrolyse von DNA. Dabei kann die Spaltung in Abhängigkeit von der Wahl des Restriktionsenzym zu glatten (blunt ends) oder 5'- bzw. 3'- überhängenden (sticky ends) Strangenden führen. Eine Einheit (1 u) eines Restriktionsenzym ist dabei als die Menge definiert, die 1  $\mu$ g Lambda-DNA in 1 Std. vollständig spalten kann. Sie finden ihre Anwendung unter anderem bei der Herstellung rekombinanter Klone aber auch bei der Spaltung der genomischen DNA in verschieden große Fragmente für die Southern-Blot Analyse. Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme ist in Tab. 2.7 zusammengestellt.

Bei Klonierungsexperimenten wurden 200 - 1000 ng der zu hydrolisierenden DNA mit 2  $\mu$ l zehnfach konzentriertem Reaktionspuffer, 5 u des Restriktionsenzym und bis zu einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l mit sterilem ddH<sub>2</sub>O versetzt und gemischt. Die Inkubation erfolgte für 3 Std. oder über Nacht bei der für das Restriktionsenzym spezifischen Temperatur. Abschließend wurde dieses bei einer vorgegebenen Temperatur hitzedeaktiviert. Für die Hydrolyse genomischer DNA wurde die Menge der eingesetzten DNA auf 20  $\mu$ g erhöht und diese mit 10 u des gewünschten Restriktionsenzym über Nacht gespalten. Die gesamte genomische DNA wurde hierbei vollständig in unterschiedlich große Fragmente gespalten, die anschließend für den Southern-Blot in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine immobilisierende Membran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden konnten.

Name des Restriktionsenzym	Sequenz	Strangende	Temperatur-Optimum	Puffer	Puffer für Doppelrestriktion
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	5'-Überhänge	37°C	<i>Bam</i> HI	1 x Y <sup>+</sup> /Tango 2 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	5'-Überhänge	37°C	O <sup>+</sup>	2 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	5'-Überhänge	37°C	R <sup>+</sup>	1 x Y <sup>+</sup> /Tango 2 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Kpn</i> I	GGTAC/C	3'-Überhänge	37°C	<i>Kpn</i> I	1 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Not</i> I	GC/GGCCGC	5'-Überhänge	37°C	O <sup>+</sup>	2 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Pvu</i> I	CGAT/CG	3'-Überhänge	37°C	R <sup>+</sup>	1 x Y <sup>+</sup> /Tango 2 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Sma</i> I	CCC/GGG	Glatte Enden	30°C	1xY <sup>+</sup> /Tango	1 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Xba</i> I	T/CTAGA	5'-Überhänge	37°C	1xY <sup>+</sup> /Tango	1 x Y <sup>+</sup> /Tango
<i>Xho</i> I	C/TCGAG	5'-Überhänge	37°C	R <sup>+</sup>	2 x Y <sup>+</sup> /Tango

**Tab. 2.7: Verwendete Restriktionsenzyme (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mit der Auflistung der vorgegebenen Reaktionsbedingungen.**

Puffer:

<i>Bam</i> HI:		O <sup>+</sup>	
10 mM	Tris/HCl pH 8,0	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
5 mM	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 mM	KCl	100 mM	NaCl
0,02% (v/v)	Triton X-100	0,1 mg/ml	BSA
0,1 mg/ml	BSA		

R<sup>+</sup>:

10 mM	Tris/HCl pH 8,5
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 mM	KCl
0,1 mg/ml	BSA

*Kpn*I:

10 mM	Tris/HCl pH 7,5
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,02% (v/v)	Triton X-100
0,1 mg/ml	BSA

Y<sup>+</sup>/Tango:

33 mM	Tris-Acetat pH 7,9
10 mM	Mg-Acetat
66 mM	K-Acetat
0,1 mg/ml	BSA

**2.10.3. Ligation mit T4-DNA-Ligase**

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Verbindung zwischen eines 5'-Phosphatrestes und einer 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Enden. Dadurch erfolgt die Insertion eines spezifischen DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor unter der Bildung eines rekombinanten Klones. Die Verknüpfung kann dabei nur erfolgen, wenn die beiden zu ligierenden Fragmente glatte Strangenden besitzen oder überstehende Enden, die zueinander komplementär sind. Für die Ligation von überstehenden Enden empfiehlt sich

ein Vektor:Insert-Verhältnis von 1:2. In einem Gesamtvolumen von 30 µl wurden 3 µl 10-fach konzentrierter Ligationspuffer für kohäsive Strangenden mit 0,6 µl 50 mM ATP, 6 µl 50 mM DTT, 100 ng des zu inserierenden DNA-Fragments und 50 ng linearisiertem Vektor versetzt. Nach Zugabe von sterilem ddH<sub>2</sub>O bis zu einem Gesamtvolumen von 29 µl wurde anschließend 1 µl T4-DNA-Ligase (Hybaid) hinzupipettiert, gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Anders als bei der Ligation von Restriktionsfragmenten mit kohäsiven Strangenden erhöht sich bei glatten Strangenden unter diesen Reaktionsbedingungen die Wahrscheinlichkeit der Selbstligierung linearisierter Vektoren. Dies führt zu einer erhöhten Anzahl nichtrekombinanter Plasmide. Durch die Zugabe von Polyethylenglykol zum Ligationspuffer wird die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt, und in Verbindung mit der Erhöhung der Enzym- und der ATP-Konzentration die Zahl der Rekombinanten erhöht.

Zu einer höheren Ausbeute führt auch die Einschnitt-Klonierung (2.10.5.). Sie kann angewendet werden, wenn zu inserierende DNA-Fragmente mit glatten Strangenden in Vektoren ligiert werden, die nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen mit glatten Enden vorliegen. Hier wird die Spaltung zeitgleich mit der Ligation durchgeführt.

<u>10 x Ligationspuffer:</u> (für kohäsive Strangenden)	660 mM 50 mM	Tris/HCl pH 7,9 MgCl <sub>2</sub>
<u>5 x Ligationspuffer:</u> (für glatte Strangenden)	330 mM 25 mM 25% (v/v)	Tris/HCl pH 7,9 MgCl <sub>2</sub> PEG 8000

#### **2.10.4. Auffüllen von Überhängen mit T4-DNA-Polymerase**

Mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase können 5'-überstehende Strangenden (= kohäsive Enden) von DNA-Fragmenten in Gegenwart von Desoxynukleotiden enzymatisch unter der Bildung von glatten Strangenden aufgefüllt werden. Notwendig wird diese Methode, wenn eine Ligation von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden mit einem linearisierten Vektor erforderlich ist, der glatte Strangenden besitzt. Analog können damit auch DNA-Fragmente mit glatten und linearisierte Vektoren mit überstehenden Enden ligiert werden, ebenso wie Vektoren und Inserts, die mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen unter der Bildung von unterschiedlich überstehenden Strangenden gespalten wurden.

Zu 200 - 1000 ng DNA wurden in einem Reaktionsgefäß 2 µl 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer, 1 µl 2 mM Nukleotidmix, 1 µl T4-DNA-Polymerase (Hybaid) und 2 µl 50 mM DTT pipettiert und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

gebracht, gemischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 Min. bei 75°C hitzeinaktiviert.

<u>10 x Reaktionspuffer:</u>	500 mM	Tris/HCl pH 8,0
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mg/ml	BSA
	50 mM	DTT

### 2.10.5. Einschritt-Klonierung

Wie in 2.10.3. beschrieben, führt die Ligation von Restriktionsfragmenten mit glatten Enden zu einer erhöhten Anzahl Vektoren, die das zu inserierende Fragment nicht tragen. Um diese zu verringern, kann die Ligation in einer Einschritt-Klonierung erfolgen, bei der parallel das ungeschnittene Plasmid mit Restriktionsendonukleasen unter der Bildung von glatten Enden hydrolysiert und mit dem zu inserierendem Fragment ligiert wird. Hierfür wurde im Verhältnis 1:10 ungeschnittenes Plasmid (100 ng) mit 1 µg des DNA-Fragmentes, welches bereits glatte Strangenden besaß, gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 6 µl 5-fach konzentriertem Ligationspuffer für glatte Strangenden, 0,6 µl 50 mM ATP, 0,6 µl 50 mM DTT, 10 u des Restriktionsenzym, 1 u der T4-DNA-Ligase und ddH<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 30 µl. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die T4-DNA-Ligase für 10 Min. bei 65°C hitzedeaktiviert und nach Abkühlung weitere 5 u des Restriktionsenzym hinzugegeben. Der abschließende Restriktionsverdau für 4 Std. bei RT führt zur Linearisierung nichtrekombinanter Vektoren, was zu einer Verringerung der Anzahl leerer Plasmide führt.

## 2.11. Bakterienkultur

### 2.11.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5αmcr <sup>-</sup>	supE sbcB15 hsdR4 rpsL thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZ ΔM15] mcr-
<i>E.coli</i> NM522	supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z ΔM15]
<i>A.tumefaciens</i> GV3101	rpoH <sup>+</sup> hrcA <sup>+</sup>

Tab. 2.8: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und deren Genotypen.

## 2.11.2. Bakterienkultur und Antibiotika

### 2.11.2.1. Flüssigkultur

Die Anzucht von *E.coli* und *A.tumefaciens* erfolgte in LB-Medium. In 10 ml des autoklavierten Mediums wurde die entsprechende Menge Antibiotikum gegeben und einzelne Kolonien einer LB-Agarplatte (2.11.2.2.) oder 50 µl einer Glycerindauerkultur (2.11.2.3.) in das Medium überimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht auf dem Schüttler (150 rpm) bei 37°C für *E.coli* und bei 28°C für *A.tumefaciens*. Am darauffolgenden Tag konnten die gewachsenen Kulturen für eine Plasmidisolierung verwendet oder bei Bedarf in größere Volumina überimpft werden. Hierfür wurden 1 ml einer Über-Nacht-Kultur in 250 ml frisches LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und wie oben angegeben inkubiert.

<u>LB-Medium (Luria-Bertani):</u>	1% (w/v)	Trypton
	1% (w/v)	NaCl
	0,5%	Hefe-Extrakt
	pH 7,2 mit 1 N NaOH eingestellt	

### 2.11.2.2. Kultur auf Agar

Für die Herstellung der LB-Platten musste der autoklavierte, noch flüssige LB-Agar zunächst bis auf 60°C abgekühlt werden, bevor die Zugabe des Antibiotikums erfolgte. Mit 500 ml LB-Agar wurden etwa 20 Agarplatten gegossen. Nach dem vollständigem Aushärten des LB-Agars wurde maximal 200 µl einer Bakterien-Kultur auf die Platte gegeben und gleichmäßig mit Hilfe eines Drigalskispatels verteilt. Im Brutschrank wuchsen die ausgestrichenen *E.coli* bei 37°C über Nacht, während *A.tumefaciens* 1 - 2 Tage bei 28°C wuchsen. Ist die Identifizierung einzelner Kolonien aufgrund eines dichten Bakterienrasens nicht möglich gewesen, erfolgte ein Verdünnungsausstrich mit Hilfe einer Impföse. Ein kleiner Ausschnitt der gewachsenen Kolonien wurde gepickt, auf einer neuen Platte ausgestrichen und anschließend wie oben angegeben kultiviert. Bakterienkulturen auf Agar können für etwa 4 Wochen bei 4°C gelagert werden. Bei einer dauerhaften Aufbewahrung empfiehlt sich die Herstellung von Glycerindauerkulturen (2.11.2.3.)

<u>LB-Agar:</u>	1% (w/v)	Bacto-Agar in LB-Medium
-----------------	----------	-------------------------

#### verwendete Antibiotikum-Stammlösungen:

Ampicillin (1000 x):	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
Hygromycin (2000 x):	20 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
Rifampicin (1000 x):	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert
Kanamycin (1000 x):	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O, sterilfiltriert

### **2.11.2.3. Herstellung von Glycerindauerkulturen**

500 µl einer frischen Über-Nacht-Kultur von *E.coli* und *A.tumefaciens* wurde 2 Min. in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml sterilem 50% (v/v) Glycerin in LB-Medium resuspendiert. Die Kultur konnte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  mehrere Monate gelagert werden.

### **2.11.2.4. Blau-Weiß-Screening positiv rekombinanter Klone**

Einige in dieser Arbeit verwendeten Vektoren tragen das lac'Z-Gen, welches für die  $\beta$ -Galaktosidase kodiert und in dem sich die MCS für die Klonierung von fremder DNA befindet. Dieses Enzym spaltet unter physiologischen Bedingungen Laktose, kann jedoch auch das farblose X-Gal nach Zugabe des Induktors IPTG in einen blau gefärbten unlöslichen Farbstoff umwandeln. Diese Eigenschaft der Vektoren vereinfacht das Auffinden positiv rekombinanter Klone. Erfolgte keine Insertion von DNA in die MCS, bleibt die Aktivität des lac'Z-Gens erhalten und die gewachsenen Bakterienkolonien erscheinen nach Zugabe von IPTG und X-Gal blau.

Befindet sich jedoch Fremd-DNA in der MCS, so wird die Aktivität des Gens unterbrochen, die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase unterbleibt und die Kolonien bleiben weiß. Die Wahrscheinlichkeit, die zu inserierende Sequenz zu tragen, ist bei diesen Kolonien erhöht.

Zunächst wurden je 50 µl 4% (w/v) X-Gal (gelöst in DMF) und 50 µl 100 mM IPTG auf den selektiven Agarplatten verteilt und für 1 Std. getrocknet. Anschließend wurden die transformierten *E.coli* auf den Nährböden ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten positiv rekombinante weiße Kolonien von nicht rekombinanten blauen Kolonien unterschieden werden. Zur Intensivierung der Blaufärbung wurden die Platten zusätzlich für etwa 2 - 4 Std. in den Kühlschrank gestellt. Anschließend wurden die weißen Kolonien gepickt, auf neuen Agarplatten vereinzelt und für eine Kolonie-PCR oder eine Plasmidisolierung weiterverwendet.

## **2.12. Bakterientransformation**

### **2.12.1. Herstellung von elektrokompenten Zellen von *E.coli* nach Sambrook *et al.* (1989)**

Um die Transformation von *E.coli* mit Hilfe der Elektroporation durchführen zu können, ist die Herstellung von elektrokompenten Zellen notwendig. Am Vorabend wurden

100 µl elektrokompetenter Zellen in einem Reagenzglas mit 10 ml sterilem LB-Medium überimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. 1 ml der Über-Nacht-Kultur wurden anschließend in 250 ml LB-Medium inokuliert und erneut schwenkend bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,6 angezogen. Dies war nach etwa 5 Std. erreicht. Nach Abkühlen der Zellsuspension auf Eis wurde diese bei 4000 x g für 10 Min. abzentrifugiert. Die nachfolgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das bakterielle Pellet zweimal in 5 ml sterilem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, auf 250 ml aufgefüllt und wie oben angegeben zentrifugiert. Im Anschluss an diese beiden Waschschrte wurde das Pellet in 25 ml 15%-igem sterilen Glycerin resuspendiert, 30 Min. bei 4000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden im 1,5-fachem Volumen in 15%-igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots von 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung von elektrokompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

### **2.12.2. Herstellung von kompetenten Zellen von *A.tumefaciens* nach Höfgen und Willmitzer (1988)**

250 µl einer Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 wurde in 10 ml LB-Medium und Rifampicin (c = 100 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1 ml der Kultur in 200 ml LB-Medium pipettiert und eine weitere Nacht bei 28°C inkubiert. Da *A.tumefaciens* deutlich langsamer wachsen im Vergleich zu *E.coli*, erreichte die OD<sub>600nm</sub> erst am nächsten Morgen einen Wert von 0,5 - 0,8 (log-Phase). Nachdem die Bakteriensuspension für 10 Min. bei 4000 x g zentrifugiert wurde, wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit sterilem TE-Puffer gewaschen. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 1/10 vom Ausgangsvolumen des LB-Mediums resuspendiert, in 250 µl Fraktionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Kompetente Zellen von *A.tumefaciens* lagerten bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C.

<u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA

### **2.12.3. Bakterientransformation**

#### **2.12.3.1. Elektroporation von *E.coli***

Eine effiziente Methode zur Transformation von Bakterien ist die Elektroporation, bei der durch kurze Hochspannungspulse Löcher in der Zellwand der Bakterien erzeugt werden, durch welche die exogen angebotene DNA in die Zelle aufgenommen werden kann.

Die Elektroporation von *E.coli* wurde mit dem BTX Elektro-Cell-Manipulator ECM 395 (Holliston, Massachusetts) durchgeführt. Hierfür wurden 100 µl elektrokompetenter Zellen von *E.coli* langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 - 3. µl der zu transformierenden DNA versetzt und kurz durch auf- und abpipettieren vermischt. Die Suspension wurde in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen, Germany) überführt und in den Elektroporator gestellt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV. Anschließend wurde 1 ml frisches LB-Medium ohne Antibiotikum zu der Suspension gegeben und kurz vermischt. Nach überführen der Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden sie für 1 Std. bei 37°C im Schüttler bei 150 rpm regeneriert, bevor sie auf selektivem LB-Agar ausplattiert wurden.

#### **2.12.3.2. Gefrierschocktransformation von *A.tumefaciens* nach Höfgen und Willmitzer (1988)**

Kompetente Zellen von *A.tumefaciens* wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit 0,5 – 1 µg Plasmid DNA versetzt und gemischt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz 5 Min. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Wasserbad bei 37°C 5 Min. inkubiert. Nach einer Verdünnung in 1 ml LB-Medium wurden die Zellen auf einem Schüttler 2 – 4 Std. bei 28°C inkubiert. Aliquots von 100 µl wurden auf selektivem LB-Agar ausgestrichen und 2 Tage bei 28°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten anschließend auf die Anwesenheit der Plasmid-DNA mit Hilfe einer Kolonie-PCR überprüft werden. Von den erfolgreich transformierten Kolonien wurden Glycerindauerkulturen hergestellt (siehe 2.11.2.3.) und diese bei –70°C gelagert.

### **2.13. Transformation von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija**

#### **2.13.1. Vakuum-Infiltration nach Bechtold *et al.* (1993), modifiziert**

Eine geeignete Methode der Agrobakterien-Transformation von *Arabidopsis thaliana* stellt die Vakuum-Infiltration nach Bechtold *et al.* (1993) dar. Zunächst erfolgte die Aussaat von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija auf Erde in einer Pikierschale im Gewächshaus. Nach etwa 2 Wochen konnten je 4 junge Keimlinge in Töpfe mit einem Durchmesser von 10 cm umgesetzt werden. Die weitere Kultivierung der Pflanzen erfolgte im Kurztag (8 Std. Licht), um eine dichte Rosette auszubilden. Zur Induktion der Infloreszenz wurden die Pflanzen nach 4 Wochen in den Langtag (16 Std. Licht) umgestellt. Wenn die primäre Infloreszenz eine Höhe von etwa 10 cm erreicht hatte, wurde diese an der Basis entfernt,

um eine höhere Anzahl an Infloreszenzen zu erhalten. 6 - 7 Tage nach Entfernen der primären Infloreszenz waren die sekundären Blütenstände soweit entwickelt, dass die ersten Blütenknospen gerade im Aufbrechen begriffen waren. In diesem Stadium konnten die Pflanzen für die Transformation eingesetzt werden.

3 Tage vor der Vakuum-Infiltration erfolgte die Anzucht von *A.tumefaciens* GV3101. Für die Vorkultur wurde 10 ml selektives LB-Medium mit 100 µl der Agrobakterien-Glycerinkultur angeimpft und für 2 Tage bei 28°C schüttelnd inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde am Abend vor der Transformation 250 ml LB-Medium mit Kanamycin (c = 50 µg/l) und Rifampicin (c= 100 µg/l) inokuliert und erneut über Nacht bei 28°C inkubiert. Das Wachstum der Bakteriensuspension erfolgte bis zum Erreichen einer  $OD_{600nm} = 1,2$ . Anschließend wurden sie bei 5800 x g bei RT abzentrifugiert und in ungefähr 250 ml Infiltrationsmedium resuspendiert bis zu einer  $OD_{600nm} = 0,8$ . Die resuspendierten Bakterien wurden in ein 400 ml Becherglas gegeben und ein Topf mit 4 Pflanzen kopfüber in die Lösung getaucht. Dabei war darauf zu achten, dass nur die Blütenstände in die Suspension tauchten, nicht aber die Rosettenblätter. Das Becherglas wurde zusammen mit dem Infiltrationsmedium und dem Pflanzentopf in den Exsikkator gestellt und ein Vakuum angelegt, bis Luftblasen an den untergetauchten Blütenständen zu erkennen waren. Die Vakuumpumpe konnte dann gestoppt und die Pflanzen für 1 – 2 Min. im Vakuum inkubiert werden. Nach Ablauf der Zeit wurde der Unterdruck ruckartig aufgehoben, was den Bakterientransfer in das pflanzliche Gewebe verstärken sollte. Der Versuch war mit derselben Lösung bis zu viermal wiederholbar. Wurden mehr Töpfe infiltriert, empfahl sich der Gebrauch einer neuen Bakteriensuspension. Nach der Vakuuminfiltration wurden die Pflanzen in Plastikbeutel gehüllt und für 24 Std. liegend in der Klimakammer kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Pflanzen aufrecht gestellt, die Plastikhüllen geöffnet und diese wieder einen Tag später vollständig entfernt. Bis zur Ernte des Saatgutes wuchsen die Pflanzen in der Klimakammer bei 23°C und in einem 12 Std. Licht / 12 Std. Dunkel-Rhythmus. Ungefähr 4 – 6 Wochen nach der Transformation konnte das Saatgut gesammelt und für etwa 1 Woche bei RT getrocknet werden. Die Lagerung des Saatgutes bis zur sterilen Aussaat erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Infiltrationsmedium (IM):

½	Murashige & Skoog salts (Sigma # 5524)
1 x	B5 Vitamine (Sigma # G-2519)
5% (w/v)	Saccharose
mit 1 N KOH auf pH 5,7 einstellen und autoklavieren, dann Zugabe von:	
0,044 µM	Benzylaminopurin (BAP)
0,15% (v/v)	Tween 80

### 2.13.2. Sterilanzucht von *Arabidopsis thaliana*

Für die Selektion des transformierten Saatgutes von *Arabidopsis thaliana* wurde dieses unter sterilen Bedingungen auf Agar angezogen. Eine Enzymspatelspitze Samen (das entspricht einer Menge von etwa 10 mg) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 70% (v/v) Ethanol für 10 Min. über Kopf geschüttelt. Anschließend wurde das Ethanol abpipettiert, 1 ml Natriumhypochloridlösung (12%-ige Lösung 1:1 mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnen) zugegeben und noch einmal für maximal 10 Min. über Kopf geschüttelt. Nachdem die Lösung abgenommen wurde, erfolgte ein fünfmaliger Waschschrift des Saatgutes mit jeweils 500 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O. Mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze konnten die Samen dann auf eine Petrischale mit selektivem ½ x MS-Agar gegeben und mit einem Drigalskispatel vorsichtig verteilt werden. Nach Beendigung wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen, für 2 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert und anschließend in einer Klimakammer bei 23°C und 12 Std. Licht angezogen. Nach 3 Wochen konnten die auf Selektionsmedium gewachsenen transgenen Pflanzen auf frischen MS-Agar umgesetzt und weiter kultiviert werden.

<u>½ x MS-Agar:</u>	½ x	MS-Medium
	3% (w/v)	Sucrose
	1% (w/v)	Pflanzenagar
	pH 5,7; einstellen mit 1N KOH	
	nach dem Autoklavieren zugeben:	
	Hygromycin (c = 10 mg/l)	
<u>1 x MS-Medium:</u>	100 ml	Stammlösung MS-Makroelemente
	1 ml	Stammlösung MS-Spurenelemente
	20 ml	Eisen-EDTA-Lösung
	1 ml	Stammlösung MS-Vitamine
<u>Stammlösung</u>	188 mM	KNO <sub>3</sub>
<u>MS-Makroelemente (10 x):</u>	206 mM	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
	30 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	15,0 mM	MgSO <sub>4</sub>
	12,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<u>Stammlösung</u>	110 mM	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
<u>MS-Spurenelemente (1000 x):</u>	30 mM	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	100 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	10 mM	KI
	1 mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
	0,1 mM	CuSO <sub>4</sub>
	0,1 mM	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
<u>Eisen-EDTA-Lösung (50 x)</u>	5 mM	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA

### 2.13.3. Kallusvermehrung von *Arabidopsis thaliana*

Durch Kallusvermehrung konnten Klone transgener Pflanzen hergestellt werden. Dafür wurden die Blätter etwa 4 Wochen alter Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* verwendet, die zuvor auf Selektionsmedium (siehe 2.13.2.) angezogen wurden. Vor dem Umsetzen wurden diese entlang der Mittelrippe geteilt. Nach Auflegen auf CIM-Agar wurden die Blattstücke für etwa 4 – 6 Wochen in der Klimakammer inkubiert bis zur Kallus-Bildung. Anschließend wurden die Kalli auf selektivem SIM-Agar umgesetzt, bis sich aus den Kalli kleine Pflanzen entwickelten. Zur Bildung längerer Sprosse wurden die Pflanzen anschließend in größeren Tanks auf SEM-Agar umgesetzt und anschließend auf wurzelinduzierendem RIM-Agar. Dabei ist vor dem Umsetzen der regenerierten Pflanzen auf RIM-Agar darauf zu achten, dass sämtliche Kallus-Reste von der Pflanze entfernt waren. Nach ungefähr 4 - 8 Wochen sollten die Sprosse Wurzeln gebildet haben und konnten auf Erde umgesetzt werden.

<u>1 x MS-Agar:</u>	1 x	MS-Medium
	3% (w/v)	Sucrose
	0,8% (w/v)	Pflanzenagar
	pH 5,7, einstellen mit 1 N KOH, autoklavieren	
	nach dem Autoklavieren zugeben:	
	Hygromycin (c = 10 mg/l)	
<u>CIM-Agar</u> <u>(Kallusinduzierendes Medium):</u>	1 x	MS-Agar
	Zusätzlich nach dem Autoklavieren zugeben:	
	4,5 µM	2,4-D
	1 µM	Kinetin
<u>SIM-Agar</u> <u>(Sprossinduzierendes Medium):</u>	1 x	MS-Agar
	Zusätzlich nach dem Autoklavieren zugeben:	
	4,4 µM	BAP
	0,54 µM	NAA
<u>SEM-Agar</u> <u>(Sprosstreckungsmedium):</u>	1 x	MS-Agar
	Zusätzlich nach dem Autoklavieren zugeben:	
	4,4 µM	BAP
	0,54 µM	NAA
	0,3 µM	GA <sub>3</sub>
<u>RIM-Agar</u> <u>(Wurzelinduktionsmedium):</u>	1 x	MS-Agar
	Zusätzlich nach dem Autoklavieren zugeben:	
	4,9 µM	IBA

## **3. Ergebnisse**

### **3.1. Untersuchungen bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina**

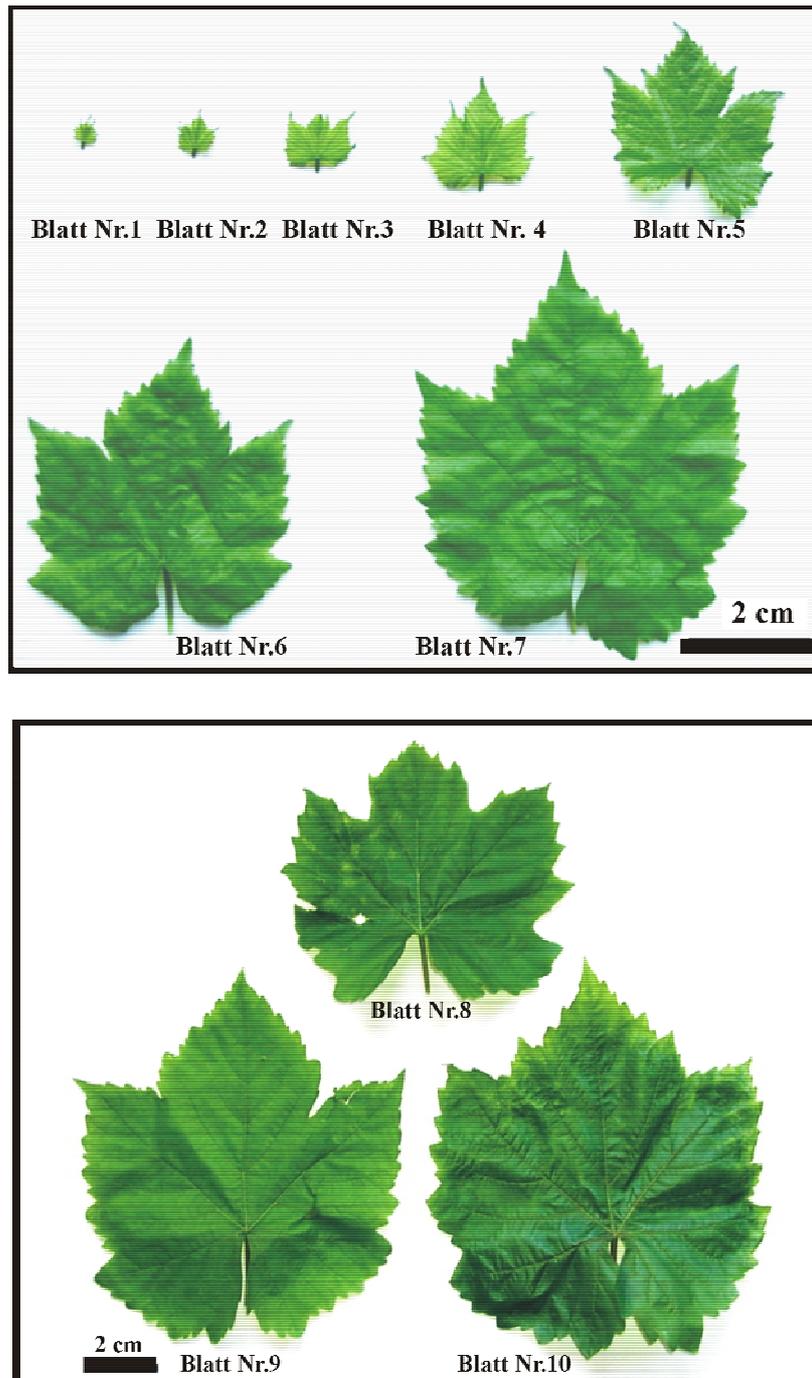
Der Anbau von Kulturreben in Regionen der gemäßigten Klimazonen erfolgt ausschließlich an sonnenexponierten Hängen. Um eine möglichst große Laubfläche zu gewährleisten, welche die eingehende Sonnenenergie absorbieren kann, werden die Kulturreben parallel zum Hang und dadurch frontal zur Sonneneinstrahlung gebunden. Für Untersuchungen des Verhaltens von *Vitis vinifera* bei Licht- und Temperaturstress sind dabei die jungen Blätter der Kulturrebe interessant, die sich an der Spitze eines Triebes, direkt zur Sonne exponiert, entwickeln. Dabei werden an wolkenlosen Tagen Lichtintensitäten von über  $2000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  erreicht. Bereits Lichtintensitäten von  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  reichen in Laborversuchen an anderen Spezies wie *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum* oder *Arabidopsis thaliana* aus, um bei moderaten Temperaturen Antworten auf Lichtstress nachzuweisen. Dazu gehört die Induktion des ELIP-Proteins in den Chloroplasten sowie das Auftreten des Xanthophylls Zeaxanthin, welches nur unter photoinhibitorischen Bedingungen in den Blattextrakten nachzuweisen ist.

Daher ist es interessant festzustellen, wie sich die Blätter von *Vitis vinifera* unter Lichtverhältnissen verhalten, die für andere langfristig zu photooxidativen Schäden führen, während Weinblätter diese im Verlauf der Vegetationsperiode auch zum optimalen Wachstum und zur optimalen Reife der Reben benötigen.

#### **3.1.1. Charakterisierung der ersten 10 Blätter eines Triebes von *Vitis vinifera***

##### **3.1.1.1. Äußeres Erscheinungsbild**

Stecklinge von *Vitis vinifera* cv. Sultanina wurden in Flüssigkultur bis zur Ausbildung von Wurzeln und Blättern angezogen. Die weitere Kultivierung erfolgte im Gewächshaus auf Erde. Bei der Durchführung von Experimenten mit den Weinpflanzen wurden etwa gleichgroße Pflanzen ausgewählt, deren durchschnittliche Gesamtgröße bei 60 - 70 cm lag.

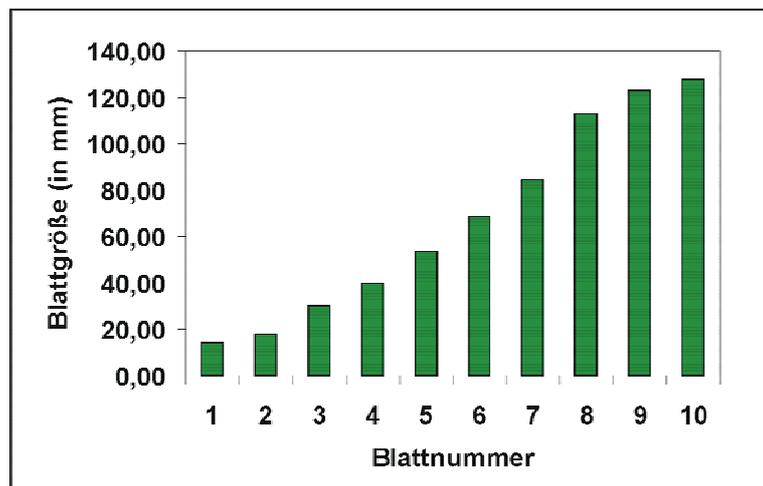


**Abb. 3.1: Darstellung der ersten 10 Blätter eines Triebes von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Aufgrund der zweizeiligen Beblätterung konnte eine Unterteilung der Blätter durchgeführt werden, wobei das Blatt 1, welches sich an der Spitze eines Triebes befindet, das jüngste Blatt darstellt und das Blatt 10 das älteste.

Um Unterschiede bei den Blättern von *Vitis vinifera* unter verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen aufzeigen zu können, erfolgte zunächst eine Zuordnung der verschiedenen Blattentwicklungsstadien eines Triebes. Die Sprosse sind sympodial verzweigt und die Triebe weisen eine zweizeilige Beblätterung auf. Die Nummerierung der Blätter erfolgte von der Triebspitze aus, wobei das Blatt Nummer 1 das jüngste

Entwicklungsstadium eines Weinblattes darstellt, dessen durchschnittliche Größe bei 15 mm lag. Als Maß der Größe wurde hierbei die Länge des Hauptnerves eines Blattes bestimmt. Mit einer Größe von 128 mm war das zehnte Blatt in der vorgenommenen Aufzeichnung das älteste. In der Abbildung 3.1 sind die ersten 10 Blätter und in Abb. 3.2 deren durchschnittliche Größen dargestellt

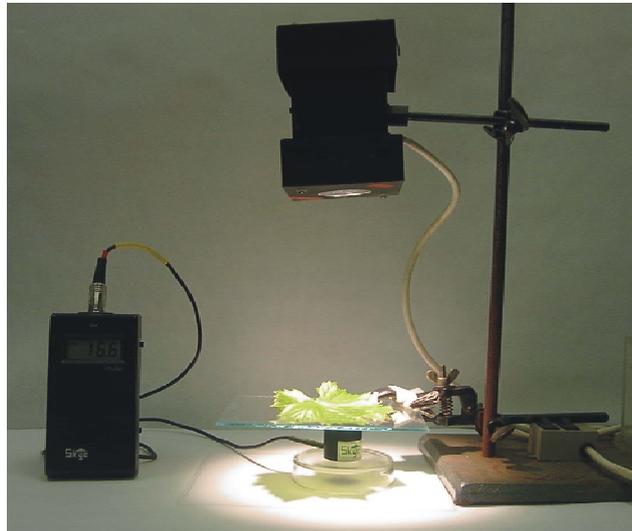


**Abb. 3.2: Darstellung der durchschnittlichen Blattgrößen der ersten 10 Blätter eines Triebes von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Um eine Aussage über die durchschnittliche Größe der Blätter treffen zu können, wurde die Länge des Hauptnervs bestimmt.

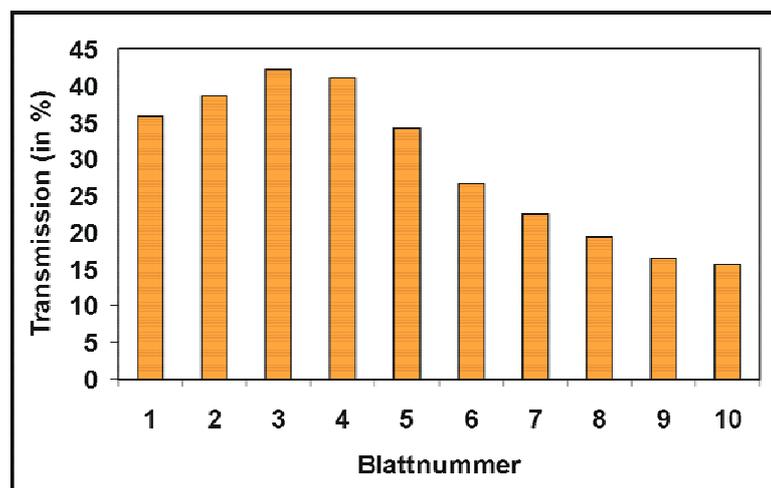
Betrachtet man die Struktur der einzelnen Blätter, unterscheiden sich diese deutlich voneinander. Die jüngeren Blätter 1 - 4 sind sehr filigran mit einer blass grünen Farbe und erscheinen daher transparent. Eine Eigenschaft, die mit zunehmendem Blattalter abnimmt, da die Struktur kräftiger erscheint und die Blätter dunkelgrün gefärbt sind. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Menge des durch ein Blatt transmittierenden Lichtes bestimmt (Abb. 3.3). Hierfür wurde eine Halogenlampe 20 cm oberhalb einer Glasplatte befestigt, unter der zur Messung der Lichtintensität ein PAR-Sensor der Firma Skye angebracht war. Während der Messungen war darauf zu achten, dass weder der Sensor noch die Lichtquelle zueinander verschoben wurden, was zu abweichenden Messergebnissen geführt hätte. Das Ernten der Blätter, die für dieses Experiment verwendet wurden, erfolgte unmittelbar vor den Messungen. Aus der Lichtintensität des nur durch die Glasplatte tretenden Lichtes und der Lichtintensität, die durch die Glasplatte und sich einem darauf befindlichen Blattes trat, konnte die Transmission der ersten 10 Blätter ermittelt werden (Abb. 3.4).

Die höchste Transmission wurde bei den ersten 4 Blättern eines Triebes gemessen, wobei das durchschnittliche Maximum bei dem dritten Blatt mit 42,21% lag. Mit zunehmendem Blattnummer nimmt die Transmission ab und erreicht ein Minimum bei 15,6%, gemessen am zehnten Blatt.



**Abb. 3.3: Aufbau der Messanlage zur Bestimmung der Menge transmittierenden Lichtes.**

Die Blätter eines Triebes wurden auf eine Glasplatte gelegt, unter der sich ein Quantum PAR Sensor der Firma Skye befand. Zunächst wurde das durch das Blatt tretende Licht gemessen und anschließend, zur Bestimmung des transmittierenden Lichts in %, das auf den Sensor fallende Licht in Abwesenheit des Blattes.



**Abb. 3.4: Ergebnis der Messung der Transmission einfallenden Lichts bei den ersten 10 Blättern von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den anschließenden Hochlichtexperimenten die Blätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina in 2 unterschiedliche Gruppen eingeteilt, wobei zu der Gruppe der jüngeren Blätter die Blätter 1 – 4 gezählt wurden und zu den älteren die

Blätter 6 – 10. Das fünfte Blatt ließ sich nur schlecht zuordnen, da es bei den unterschiedlichen Weinpflanzen ein differierendes Erscheinungsbild aufwies. Daher wurde es aus der Zuordnung der Gruppen herausgenommen.

### 3.1.1.2. Bestimmung der Pigmentzusammensetzung

Als weiterer wichtiger Aspekt der Blattcharakterisierung wurde die Pigmentzusammensetzung der Blätter 1 – 10 ermittelt. Mit Hilfe der HPLC war es möglich, die Pigmente eines Blattextraktes zu trennen und durch die Angabe des Extinktionskoeffizienten eine Aussage über deren vorhandene Menge zu treffen. Da die HPLC nur Angaben in mV\*min über die Menge eines Pigmentes in einer Probe macht, jedoch keine Aussage über die Identität des Pigmentes getroffen werden kann, wurden die einzelnen Peakfraktionen zur genauen Identifizierung im Anschluss an der Chromatographie gesammelt, getrocknet und in Ethanol bzw. Aceton (siehe Tab. 2.3 und Tab. 2.4) gelöst. Am Spektralphotometer konnten anhand der Absorptionsmaxima die einzelnen Pigmente den Fraktionen zugeordnet werden.

In Abb. 3.5 sind zwei repräsentative Läufe der HPLC dargestellt, die bei den beiden Detektionswellenlängen 431 nm und 464 nm aufgezeichnet wurden. Lediglich die Zuordnung der Carotine erfolgte unzureichend, da  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin nicht deutlich getrennt wurden. Hierfür wurden vorangehende Arbeiten (Beator, 1993) hinzugezogen, in denen ebenfalls die Pigmentanalyse von Blattextrakten erfolgte.

Die Ergebnisse der ersten 10 Blätter sind in Abb. 3.6 dargestellt. Die Gehalte der Pigmente Violaxanthin, Neoxanthin, Lutein und Chlorophyll b steigen mit zunehmender Blattzahl. Eine Ausnahme ist dabei das siebte Blatt, da der Gehalt an den genannten Pigmenten leicht absinkt. Anders sieht es bei Antheraxanthin und Zeaxanthin aus. Innerhalb der ersten 10 Blättern variiert der Antheraxanthingehalt in einem Bereich zwischen 38  $\mu\text{g/g}$  FG (Blatt 3) und 21  $\mu\text{g/g}$  FG (Blatt 8). Dagegen konnte Zeaxanthin nur in den ersten 4 Blättern gemessen werden, wobei das Maximum mit über 2  $\mu\text{g}$  Zeaxanthin/g FG beim Blattextrakt des ersten Blattes gemessen wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zusätzlich der EPS-Wert (epoxidation state of the xanthophyll pool) nach Demmig-Adams und Adams (1990) bestimmt. Unter nicht-photoinhibierenden Bedingungen liegt dieser Wert bei 1, während er mit zunehmendem NPQ in den Blättern auf ein Minimum abfällt.

Für die ersten 10 Blätter eines Triebes von *Vitis vinifera* cv. Sultanina wird bei der Bestimmung des EPS-Wertes deutlich, dass das Minimum bei den jüngsten Blättern

auftritt. Innerhalb der ersten vier Blätter steigt der Wert von 0,77 auf 0,89. Die nachfolgenden Blätter liegen bei einem EPS-Wert zwischen 0,92 und 0,94.

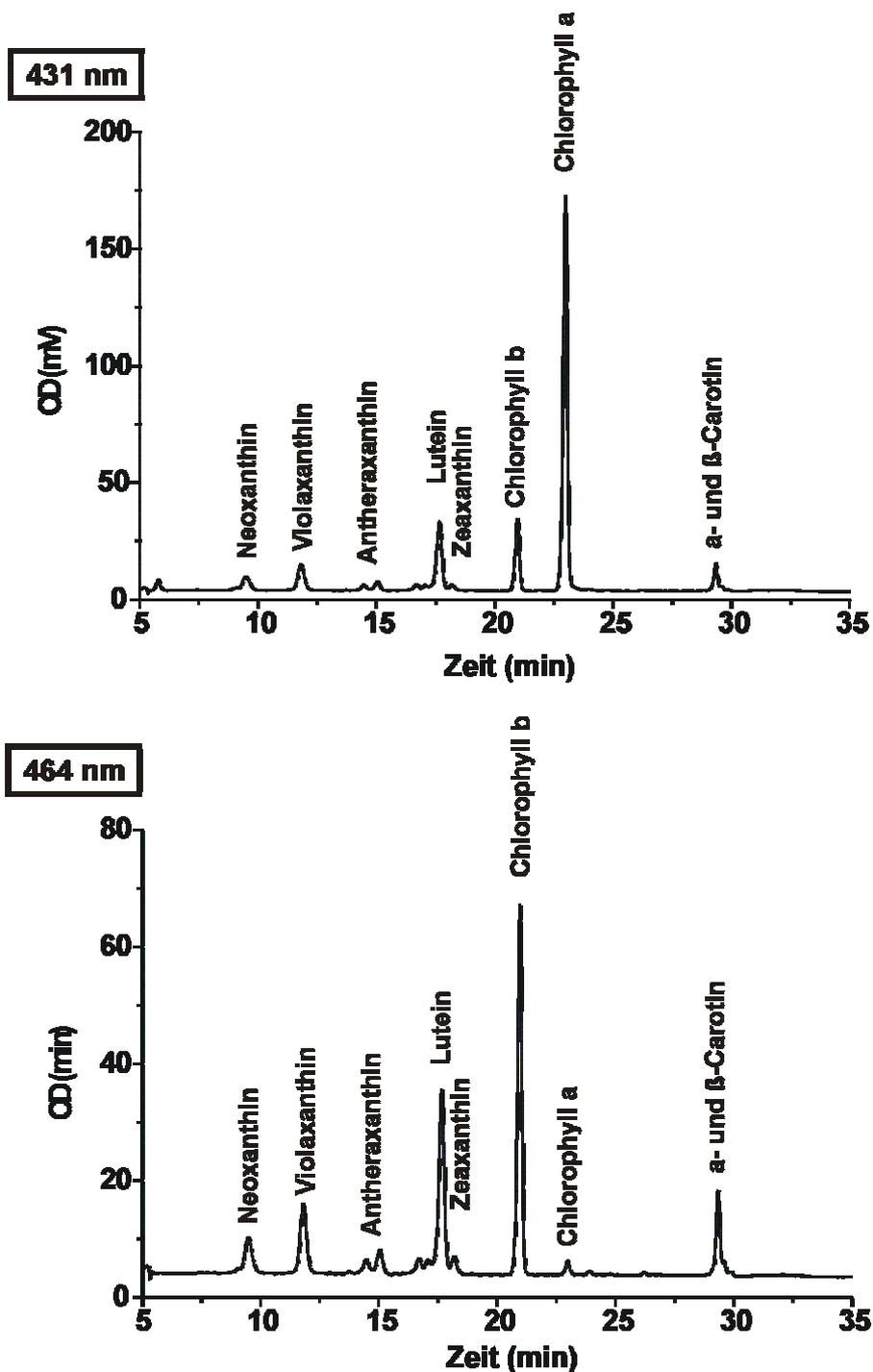
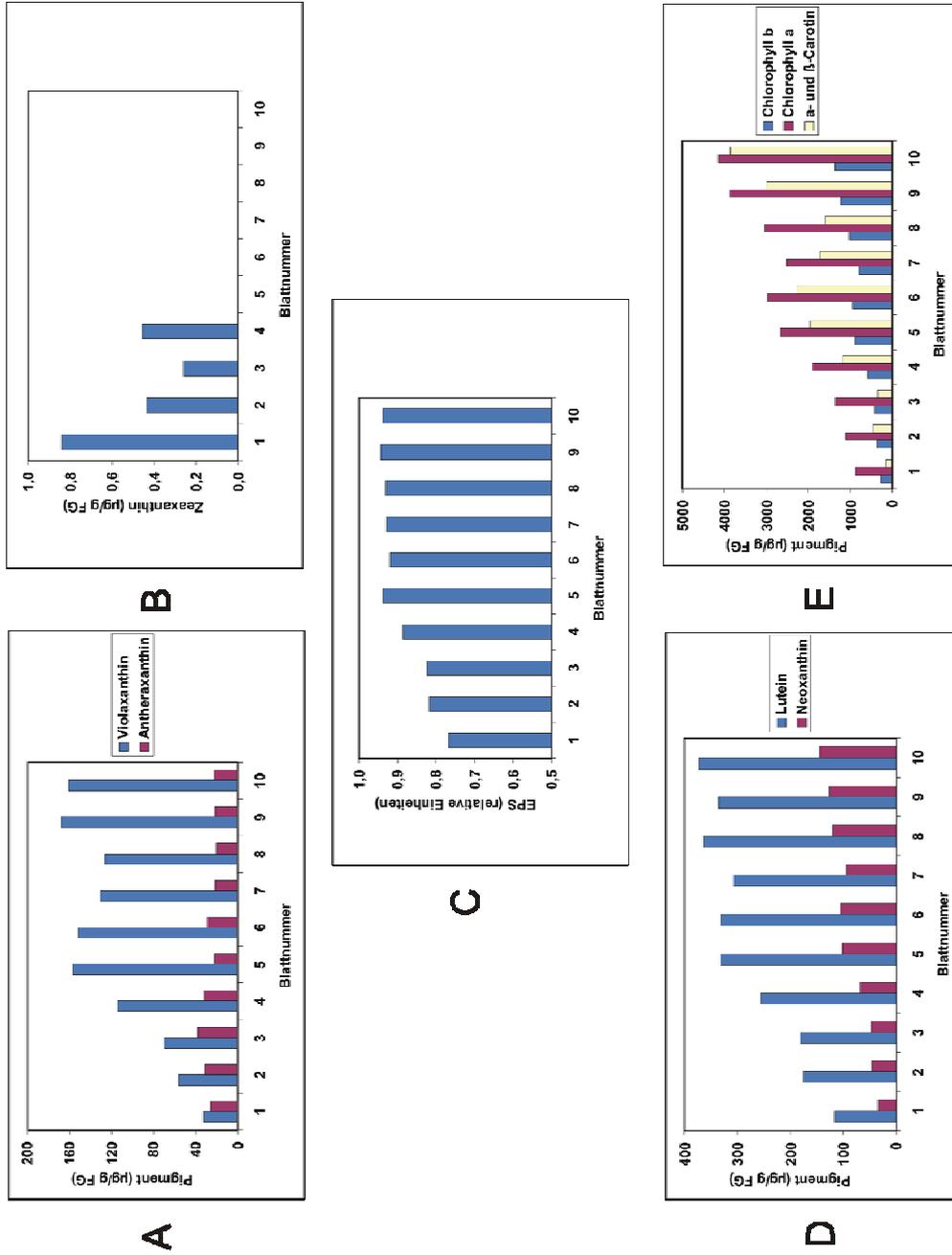


Abb. 3.5: Zwei HPLC-Beispielchromatogramme bei den Detektionswellenlängen 431 nm und 464 nm.

Isolierte Blattextrakte wurden in einer RP-HPLC aufgetrennt. Die Identifizierung der einzelnen Peaks erfolgte am Spektralphotometer, nachdem die einzelnen Fraktionen gesammelt, getrocknet und wieder in einem entsprechenden Lösungsmittel gelöst wurden. Lediglich die beiden Carotine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin ließen sich hier unzureichend auftrennen. Daher wurden sie zu der Gruppe der Carotine zusammengefasst.



**Abb. 3.6: Ergebnis der Pigmentanalyse von Blattextrakten der ersten 10 Blätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.** Für die Analyse der Pigmente wurden die Blattextrakte der ersten 10 Blätter in einer RP-HPLC aufgetrennt und anhand der bekannten Extinktionskoeffizienten die Verteilung der Pigmente bestimmt. Zusätzlich wurde auch noch der "epoxidation state of the xanthophyll pool" bestimmt (Demmig-Adams, 1990)

### 3.1.2. Sequenzanalyse des *elip*-Gens

#### 3.1.2.1. Herstellung der *elip*-Klone und Sequenzierung

In der Datenbank „TIGR“ konnte die Sequenz eines EST-Klones von *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (EST ID: CA48EN0005\_IlaF\_C07, NCBI Accession No.: CB345605) gefunden werden, welche partiell Homologien bis zu 68% zu *elip*-Genen anderer Spezies aufweist. Zur Klärung der Genstruktur des *elip*-Gens bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kultivar *Vitis vinifera* cv. Sultanina wurden mit Hilfe der vorliegenden Sequenz von *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon Primer ausgewählt, die sich für die Amplifizierung der zu untersuchenden und zu sequenzierenden DNA-Fragmente eigneten (Abb. 3.7).

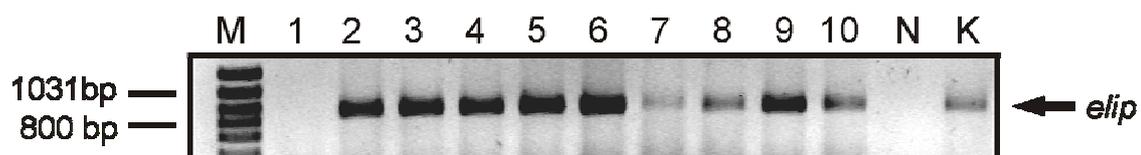
<b>Seq-VV-fwr</b>	
CAGAGTACACAGTAGCATCGCCATAGCATCATAGCGCCATTGGAAGCCCTTGCACGACTCGCTAAGAATTTCC	
<b>RT-VV-fwr</b>	
GGAGTCGACGCTGATGGCCATGGCAACCACCATGCAATCCACCCTTGCAACAGCTATGACACGCGTAGCCAAC	
AGAACCAGAGATCTCCAGGTCGTCCCTCCAGGTCGGTGCTACGTCTTCAAAGGAGTGCTGTCACCACCAACC	
CCCAGCAGCCACCCTCGCTCTCACAGTCACGTCAACCGATCCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTGCGCCTAAGGT	
GAGCACCAAATTTGGGGGTGTGTTTCGCATTTAGTGGGCCGGCACCGGAGAGGATCAACGGCAGGCTTGCCATG	
GTAGGCTTTGTTGCGGCAATGGGTGCGGAAATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCTCAGATATCCAACGGTG	
GGATTCCATGGTTCTGGGAACCGCTGTTGTA CTCTACTGGCTTCTCTGATTCCCTTGTTCAAAGGTGTGAG	
CGTGGAGTCCAAATCGAAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAGATGTGGAATGGGAGGTTTGCCATGTTGGGT	
<b>RT-VV-rev</b>	<b>Seq-VV-rev</b>
CTGGTTGCACTCGCCTTCACTGAATACTCTTAAAGGTGGTGCTCTTGTCTAGCTCTCACCCCCCGGTTTTGCC	
ATCTGTTTTGGCTCACATCTCTAATGTAATTCAGGATCCTTCAATGTAATGGAAAAATGGTATCTTGACTT	
TATATGAT	

**Abb. 3.7: Darstellung der in der Datenbank „TIGR“ gefundenen Nukleotidsequenz von *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (EST ID: CA48EN0005\_IlaF\_C07), welche partiell hohe Homologien zu *elip*-Sequenzen anderer Spezies aufweist.**

Die grau unterlegten Nukleotide des EST-Klons kodieren für ein Gen, welches im Vergleich mit Nukleotidsequenzen anderer *elip*-Gene Bereiche hoher Homologien besitzt. Die Primer, die zur Klärung der Genstruktur des *elip*-Gens bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina erfolgreich eingesetzt werden konnten, sind in der Darstellung umrahmt.

In einem ersten Sequenzierungsschritt wurde zunächst unter Verwendung der beiden Primer „Seq-VV-fwr“ und „Seq-VV-rev“ in einer PCR das DNA-Fragment aus isolierter genomischen DNA des Kultivars Sultanina amplifiziert. Dabei wurden die beiden Primer so ausgewählt, dass der forward-Primer „Seq-VV-fwr“ vor dem angegebenen Startcodon

und der reverse Primer „Seq-VV-rev“ auf dem Stopcodon liegt. Die Bedingungen für die PCR sind der Tabelle 2.5 zu entnehmen. Da das amplifizierte Fragment im Anschluss sequenziert werden sollte, wurde das Enzym PWO-Polymerase eingesetzt, welches aufgrund einer 3' → 5' Exonuklease-Aktivität die Eigenschaft besitzt, Lesefehler während der Neustrangsynthese zu korrigieren. Die Qualität der PCR wurde anschließend in einem Agarosegel überprüft, wobei das amplifizierte Fragment eine Größe von 800 bis 900 bp aufwies. Nach Aufreinigung mit dem Kit „E.Z.N.A. Cycle Pure“ erfolgte die Insertion des zu sequenzierenden Nukleotidabschnittes in einer Einschnitt-Klonierung in den Vektor pBluescript SK (+/-) der Firma Stratagene, der durch einen Restriktionsendonukleaseverdau mit dem Enzym *Sma*I unter der Bildung glatter Strangenden linearisiert wurde. Nach der Transformation des Klonierungsansatzes in den Stamm *E.coli* NM522 wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (c = 100 mg/l), sowie 5 mM IPTG und 2 mg/ml X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Da der verwendete Klonierungsvektor eine lac'Z-Region besitzt, konnte eine erste Selektion durch das Blau-Weiß-Screening erfolgen. Weiße Kolonien wurden anschließend in einer Kolonie-PCR auf das Insertionsereignis geprüft (Abb. 3.8), wobei die gleichen Primer verwendet wurden, die auch bereits zur Amplifizierung des *elip*-Fragmentes aus der isolierten genomischen DNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina eingesetzt wurden. Zur weiteren Durchführung wurde die Kolonie 2 ausgewählt.



**Abb. 3.8: Ergebnis der Kolonie-PCR zur Identifizierung rekombinanter Klone von *E.coli* NM522 in einem 1%-igem Agarosegel.**

Nach der blau-weiß Selektion gewachsener Kolonien wurden die weißen Kolonien 1 - 10 auf das Insertionsereignis geprüft. Die Kontrolle K zeigt die zu erwartende Größe des amplifizierten Fragmentes zwischen 800 und 900 bp. Die Negativkontrolle N wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Pro Spur wurden 3 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen. Als Standard (M) wurden 2,5 µl des Markers Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus verwendet.

Nach Anzucht einer 2 ml Flüssigkultur über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler wurde eine Plasmidisolierung der Kolonie 2 von *E.coli* NM522 mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen durchgeführt. Die Reinheit des isolierten Plasmids wurde anschließend in einem Agarosegel überprüft, dessen Konzentration im Photometer bei 260 nm bestimmt und für die Sequenzierung ein Aliquot von 100 ng des Plasmids getrocknet. Die Analyse

erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg. Als Primer wurde der Standardprimer „T7“ des Klonierungsvektors pBluescript SK (+/-) eingesetzt.

Nach Subtraktion restlicher Nukleotide des Vektors führte die Sequenzierung des amplifizierten DNA-Fragmentes von *Vitis vinifera* cv. Sultanina zu folgendem Ergebnis, wobei die Sequenzen der beiden Primer „Seq-VV-fwrđ“ und „Seq-VV-rev“ in dieser Darstellung farblich markiert sind:

**Seq-VV-fwrđ** →

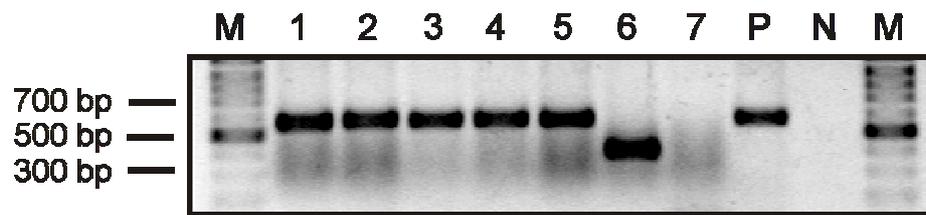
```

AGTACACAGTAGCATCGCCA TAGCATCATAGCGCCATTGGAAGCCCTTGCACGACTCGCTAAGAATTTCCGGAG
TCGACGCTGATGGCCATGGCAACCACCATGCAATCCACCGTTGCAACAGCTATGACACGCGTAGCCAACAGAA
CCAGAGATCTCCAGGTCGTCCCTCCCAGGTCGGTGCTACGTCTTCAAAGGAGTGCTGTGCAGGTGCGGTGCAC
CAAGGAGGTAAGATCTCAACCTCCACTCAGATCATAGCAGATAATGTCAGCCGATTTATGGGATTTTGACAAC
TGATCTCGTAACCAATGTGCAGGATGGCCAAAGCGAACGGCCACCACCTGTCACCACCAACCCCCAGCAGCCA
CCCTCACTCTCACAGTCACGTCAACCGATCCCCTCCTCCTCCTCCTGCGCCCAAGGTATGTAAGTCCGCG
GGTAACTTTTTCCATGGTCACTTTTCCGGTGGGGTGTATAACCTGAGAATATATATATATGTTTTTGAATTTTGT
GGCAGGTGAGCACCAAATTTGGGGATGTGTTTCGCGTTTAGTGGGCCGGCACC GGAGAGGATCAACGGCAGGCT
TGCCATGGTAGGCTTTGTTGCGGCAATGGGTGCGGAAATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCCTCAGATATCC
AACGGTGGGATTCATGGTTCCTGGGAACCGCTGTTGTACTCTCACTGGCTTCTCTGATTCCTTGTTCAAAG
GTGTGAGCGTGGAGTCCAAATCGGAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAGATGTGGAATGGGAGGTTTGCCAT
GTTGGGTCTGGTTGCACTCGCCTTCACTGAATATCTTAAAGGTGGTGCCTTGTGTAGCTATCACC

```

← **Seq-VV-rev**

Um Intron- und Exonstrukturen des *elip*-Gens von *Vitis vinifera* cv. Sultanina festlegen zu können, musste zusätzlich noch eine cDNA-Synthese und dessen Sequenzierung erfolgen. Homologievergleiche der genomischen *elip*-DNA bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina mit der *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon zeigten sowohl im Bereich des 5'- als auch des 3'-Strangendes eine 100%-ige Übereinstimmung zueinander. Für die Primer-Auswahl zur Amplifizierung der cDNA innerhalb dieser Nukleotidabschnitte konnte davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die 5'- bzw. 3'-terminalen Exonstrukturen handelt. Die beiden verwendeten Primer „RT-VV-fwrđ“ und „RT-VV-rev“ innerhalb dieser Domänen sind in der Abb. 3.7 ebenfalls dargestellt. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte mit isolierter Gesamt-RNA aus Weinblättern, die für 6 Std. bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C inkubiert wurden. Das resultierende cDNA-Fragment besaß bei der Überprüfung in einem Agarosegel eine Größe von etwa 600 bp (nicht gezeigt). Dessen Insertion erfolgte, wie schon im ersten Sequenzierungsschritt beschrieben, nach der Aufreinigung mit dem Kit „E.Z.N.A. Cycle Pure“ über eine *Sma*I-Schnittstelle in den Klonierungsvektor pBluescript SK (+/-). Nach Elektroporation in den Stamm *E.coli* NM522, Kultivierung über Nacht bei 37°C und einer ersten Selektion mit Hilfe des Blau-Weiß-Screenings wurden 7 weiße Kolonien in einer Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer „RT-VV-fwrđ“ und „RT-VV-rev“ auf das Insertionsereignis geprüft (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9: Ergebnis der Kolonie-PCR gewachsener weißer Kolonien von *E.coli* NM522 zur Überprüfung der Insertion der *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Nach Vorabselektion der gewachsenen Kolonien von *E.coli* NM522 über Blau-Weiß-Screening wurden positiv rekombinante Klone mit Hilfe einer PCR analysiert. Die Spuren 1 – 7 repräsentieren das Ergebnis der Kolonie-PCR der 7 gewachsenen weißen Kolonien von *E.coli* NM 522. In der Positivkontrolle P wurde als Template die cDNA der durchgeführten RT-PCR eingesetzt, während in der Negativkontrolle N der leere Klonierungsvektor pBluescript SK (+/-) eingesetzt wurde. Je Spur wurden 5 µl des PCR-Ansatzes aufgetragen. Als Marker M diente je Spur 2,5 µl Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus.

Für die Sequenzierungsarbeiten wurde über Nacht bei 37°C eine 2 ml Flüssigkultur der Kolonie 3 angezogen, eine Plasmidisolierung durchgeführt und nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung 100 ng des isolierten Plasmids getrocknet. Wie auch im vorangegangenen Schritt erfolgte die Sequenzierung durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland. Die Verwendung des Klonierungsvektors pBluescript SK (+/-) ermöglichte die erneute Wahl der Standardprimers „T7“ für die Sequenzierungsarbeiten.

Um die Genstruktur des *elip*-Gens bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina klären zu können, wurden nachfolgend die Ergebnisse der Sequenzierungen des Fragmentes der genomischen *elip*-DNA von *Vitis vinifera* und der *elip*-cDNA gegenübergestellt und somit die Festlegung von Exon- und Intronstrukturen ermöglicht (Abb. 3.10). Die grau unterlegten Nukleotide stimmen in beiden Sequenzen überein, sie sind zusätzlich mit einem (\*) gekennzeichnet. Im Ergebnis der genomischen DNA wurden die beiden Start- und Stopcodons des Gens rot markiert.

Aus dem Vergleich der beiden analysierten Sequenzen lässt sich für das *elip*-Gen bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina folgende Genstruktur festlegen (Abb. 3.11): mit einer Gesamtlänge von 779 Nukleotiden besteht das *elip* aus insgesamt 3 Exons und 2 Introns. Dabei fallen auf die Exons 1, 2 und 3 jeweils 145 bp, 109 bp und 343 bp. Dagegen sind die beiden Introns 1 und 2 mit einer Größe von 88 bp und 94 bp relativ kurze Fragmentstücke. Daraus ergibt sich für die *elip*-cDNA eine Gesamtlänge von 597 bp.

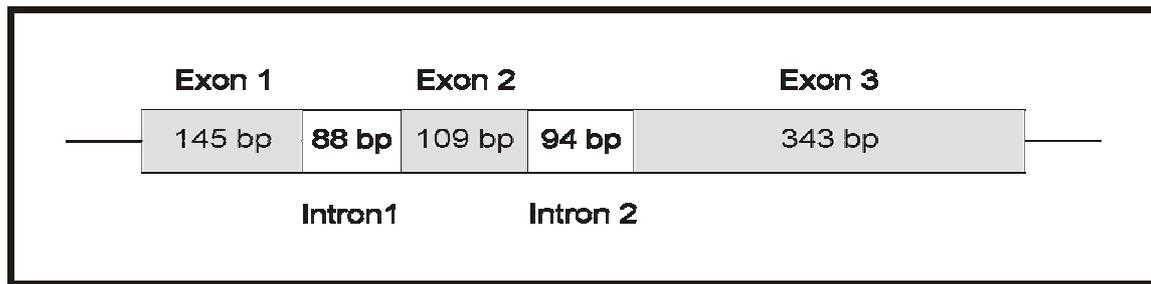
gDNA V. V. cv. Sultanina	AGTACACAGTAGCATCGCCATAGCATCATAGCGCCATTGGAAGCCCTTGACGACTCGCT	60
cdNA V. V. cv. Sultanina	-----	
gDNA V. V. cv. Sultanina	AAGAATTTTCGGAGTCGACGCTGATGGCCATGGCAACCACCATGCAATCCACCGTTGCAAC	120
cdNA V. V. cv. Sultanina	-----CAACCACCATGCAATCCACCGTTGCAAC	28
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	AGCTATGACACGCGTAGCCAACAGAACCAGAGATCTCCAGGTCGTCCCTCCCAGGTCGGT	180
cdNA V. V. cv. Sultanina	AGCTATGACACGCGTAGCCAACAGAACCAGAGATCTCCAGGTCGTCCCTCCCAGGTCGGT	88
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	GCTACGTCTTCAAAGGAGTGCTGTGCAGGTGCGGTGCACCAAGGAGGTAAGATCTCAACC	240
cdNA V. V. cv. Sultanina	GCTACGTCTTCAAAGGAGTGCTGTGCAGGTGCGGTGCACCAAGGAGG-----	135
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	TCCACTCAGATCATAGCAGATAATGTCAGCCGATTTATGGGATTTTGACAACCTGATCTCG	300
cdNA V. V. cv. Sultanina	-----	
gDNA V. V. cv. Sultanina	TAACCAATGTGCAGGATGGCCAAAGCGAACGGCCACCACCTGTCACCACCAACCCCCAGC	360
cdNA V. V. cv. Sultanina	-----ATGGCCAAAGCGAACGGCCACCACCTGTCACCACCAACCCCCAGC	180
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	AGCCACCCTCACTCTCACAGTCACGTCAACCGATCCCTCCTCCTCCTCCTGCGCCCA	420
cdNA V. V. cv. Sultanina	AGCCACCCTCACTCTCACAGTCACGTCAACCGATCCCTCCTCCTCCTCCTGCGCCCA	240
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	AGGTATGTAAAGTCCGCGGTAACCTTTTCCATGGTCACTTTTCCGGTGGGGTGATAAC	480
cdNA V. V. cv. Sultanina	AGGT-----	244
	***	
gDNA V. V. cv. Sultanina	CTGAGAATATATATATGTTTTTGAATTTTGTGGCAGGTGAGCACCAAATTTGGGGATGTG	540
cdNA V. V. cv. Sultanina	-----GAGCACCAAATTTGGGGATGTG	266
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	TTTCGGTTTAGTGGGCCGGCACCGGAGAGGATCAACGGCAGGCTTGCCATGGTAGGCTTT	600
cdNA V. V. cv. Sultanina	TTTCGGTTTAGTGGGCCGGCACCGGAGAGGATCAACGGCAGGCTTGCCATGGTAGGCTTT	326
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	GTTGCGGCAATGGGTGCGGAAATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCTCAGATATCCAAC	660
cdNA V. V. cv. Sultanina	GTTGCGGCAATGGGTGCGGAAATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCTCAGATATCCAAC	386
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	GGTGGGATTCATGGTTCCCTGGGAACCGCTGTTGTAICTCTCACTGGCTTCTCTGATTCCC	720
cdNA V. V. cv. Sultanina	GGTGGGATTCATGGTTCCCTGGGAACCGCTGTTGTAICTCTCACTGGCTTCTCTGATTCCC	446
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	TTGTTCAAAGGTGTGAGCGTGGAGTCCAAATCGGAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAG	780
cdNA V. V. cv. Sultanina	TTGTTCAAAGGTGTGAGCGTGGAGTCCAAATCGGAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAG	506
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	ATGTGGAATGGGAGGTTTGCCATGTTGGGTCTGGTTGCACTCGCCTTCACTGAATACTTT	840
cdNA V. V. cv. Sultanina	ATGTGGAATGGGAGGTTTGCCATGTTGGGTCTGGTTGCACTCGCCTTCACTGAATA----	562
	*****	
gDNA V. V. cv. Sultanina	AAAGGTGGTGCTCTGTGTAG	861
cdNA V. V. cv. Sultanina	-----	

**Abb. 3.10: Alignment der sequenzierten *elip*-cDNA und der sequenzierten genomischen *elip*-DNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Die in einer PCR amplifizierten und in Klonierungsvektoren inserierten PCR-Fragmente wurden sequenziert und das Ergebnis zur Klärung der Genstruktur bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina gegenübergestellt. Identische Nukleotide sind grau unterlegt und mit einem (\*) gekennzeichnet. Die Start- und Stopcodons sind innerhalb der genomischen DNA rot dargestellt.

gDNA V. v. cv. Sultanina = Sequenz der genomischen *elip*-DNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina

cdNA V. v. cv. Sultanina = Sequenz der *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina



**Abb. 3.11: Darstellung der Genstruktur des *elip*-Gens von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Anhand des Ergebnisses der Sequenzierung der amplifizierten Fragmente der genomischen DNA und des Nukleotidabschnittes der *elip*-cDNA konnte eine schematische Darstellung der Genstruktur erstellt werden. Die grau unterlegten Felder stellen die Exons dar, während die weißen Felder die Introns repräsentieren.

Um Differenzen der *elip*-cDNA der beiden Kultivare *Vitis vinifera* cv. Sultanina und *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon zu veranschaulichen, wurde zusätzlich ein Alignment der vorliegenden cDNA-Sequenzen vorgenommen, dessen Ergebnis in Abb. 3.12 dargestellt ist. Dabei wurden, wie vorangehend bereits dargelegt, die 5'- und 3'-terminalen Bereiche bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina aus dem Ergebnis des Sequenzvergleiches der genomischen DNA und cDNA komplettiert. Daraus resultiert folgendes Ergebnis: mit einer Größe von 597 bp ist die *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina um 48 bp größer als die *elip*-cDNA des Kultivars Cabernet Sauvignon. Für das übersetzte Protein bedeutet dies eine Differenz von 16 Aminosäuren. Unter Vernachlässigung des bei Cabernet Sauvignon verringerten Sequenzabschnittes weisen die beiden Kultivare zueinander eine Homologie von mehr als 98% auf. Bestimmt werden konnte dies mit Hilfe des Programms „ClustalW“, Des Higgins, European Bioinformatics Institute, U.K.

```

V. vinifera cv. Sauvignon  ATGGCCATGGCAACCACCATGCAATCCACCCTTGCAACAGCTATGACACGCGTAGCCAAC 60
V. vinifera cv. Sultanina  ATGGCCATGGCAACCACCATGCAATCCACCCTTGCAACAGCTATGACACGCGTAGCCAAC 60
*****

V. vinifera cv. Sauvignon  AGAACCAGAGATCTCCAGGTCGTCCTCCAGGTCGGTGCTACGCTCTCAAAGGAGTGCT 120
V. vinifera cv. Sultanina  AGAACCAGAGATCTCCAGGTCGTCCTCCAGGTCGGTGCTACGCTCTCAAAGGAGTGCT 120
*****

V. vinifera cv. Sauvignon  GT-----CACCACC 129
V. vinifera cv. Sultanina  GTGCAAGTGCAGGTCACCAAGGAGGATGGCCAAAGCGAACGGCCACCACCTGT CACCACC 180
**                               *****

V. vinifera cv. Sauvignon  AACCCCCAGCAGCCACCCTCGCTCTCACAGTCACGTCAACCGATCCCTCCTCCTCCT 189
V. vinifera cv. Sultanina  AACCCCCAGCAGCCACCCTCACTCTCACAGTCACGTCAACCGATCCCTCCTCCTCCT 240
*****

V. vinifera cv. Sauvignon  CCTCCTGCGCCTAAGGTGAGCACCAAATTTGGGGGTGTGTTTCGCATTTAGTGGGCGCGCA 249
V. vinifera cv. Sultanina  CCT---GCGCCCAAGGTGAGCACCAAATTTGGGGATGTGTTTCGCATTTAGTGGGCGCGCA 297
**          *****

```

V. vinifera cv. Sauvignon	CCGGAGAGGATCAACGGCAGGCTTGCCATGGTAGGCTTTGTTGCGGCAATGGGTGCGGAA	309
V. vinifera cv. Sultanina	CCGGAGAGGATCAACGGCAGGCTTGCCATGGTAGGCTTTGTTGCGGCAATGGGTGCGGAA *****	357
V. vinifera cv. Sauvignon	ATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCTCAGATATCCAACGGTGGGATTCCATGGTTCCTG	369
V. vinifera cv. Sultanina	ATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCTCAGATATCCAACGGTGGGATTCCATGGTTCCTG *****	417
V. vinifera cv. Sauvignon	GGAACCGCTGTTGTACTCTCACTGGCTTCTCTGATTCCCTTGTTCAAAGGTGTGAGCGTG	429
V. vinifera cv. Sultanina	GGAACCGCTGTTGTACTCTCACTGGCTTCTCTGATTCCCTTGTTCAAAGGTGTGAGCGTG *****	477
V. vinifera cv. Sauvignon	GAGTCCAATCGAAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAGATGTGGAATGGGAGGTTTGCC	489
V. vinifera cv. Sultanina	GAGTCCAATCGAAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAGATGTGGAATGGGAGGTTTGCC *****	537
V. vinifera cv. Sauvignon	ATGTTGGGTCTGGTTGCACTCGCCTTCACTGAATATCTTAAAGGTGGTGCTCTTGTGTAG	549
V. vinifera cv. Sultanina	ATGTTGGGTCTGGTTGCACTCGCCTTCACTGAATATCTTAAAGGTGGTGCTCTTGTGTAG *****	597

**Abb. 3.12: Ergebnis eines Alignments der *elip*-cDNA-Sequenzen der beiden Kultivare *Vitis vinifera* cv. Sultanina und *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon.**

Nach der Festlegung der *elip*-cDNA-Sequenz von *Vitis vinifera* cv. Sultanina wurden die EST-Klone beider Kultivare gegenübergestellt und miteinander verglichen. Grau unterlegte und mit einem (\*) markierte Nukleotide kennzeichnen zueinander identische.

### 3.1.2.2. Multiples Alignment verschiedener ELIP-Proteine

ATGCCATGGCAACCACCATGCAATCCACCGTTGCAACAGCTATGACACGCGTAGCCAACAGAACCAGA
M A M A T T M Q S T V A T A M T R V A N R T R
GATCTCCAGGTCGTCCCTCCCAGGTCGGTGCTACGTCTTCAAAGGAGTGCTGTGCAGGTGCGGTGCACC
D L Q V V P P R S V L R L Q R S A V Q V R C T
AAGGAGGATGGCCAAAGCGAACGGCCACCACCTGTCACCACCAACCCCGAGCAGCCACCCTCACTCTCA
K E D G Q S E R P P P V T T N P Q Q P P S L S
CAGTCACGTCAACCGATCCCTCCTCCTCCTCCTGCGCCCAAGGTGAGCACCAAATTTGGGGATGTG
Q S R Q P I P P P P P A P K V S T K F G D V
TTCGCGTTTAGTGGGCCGGCACCGGAGAGGATCAACGGCAGGCTTGCCATGGTAGGCTTTGTTGCGGCA
F A F S G P A P E R I N G R L A M V G F V A A
ATGGGTGCGGAAATATGGAAGGGTGAGGATGTGTTTGCTCAGATATCCAACGGTGGGATTCCATGGTTC
M G A E I W K G E D V F A Q I S N G G I P W F
CTGGGAACCGCTGTTGTACTCTCACTGGCTTCTCTGATTCCCTTGTTCAAAGGTGTGAGCGTGGAGTCC
L G T A V V L S L A S L I P L F K G V S V E S
AAATCGGAGGGGTTGATGACTTCTGATGCGGAGATGTGGAATGGGAGGTTTGCCATGTTGGGTCTGGTT
K S E G L M T S D A E M W N G R F A M L G L V
GCACTCGCCTTCACTGAATATCTTAAAGGTGGTGCTCTTGTGTAG
A L A F T E Y L K G G A L V *

**Abb. 3.13: Übersetzung der *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina in die Aminosäuresequenz.**

Mit Hilfe des Programm „CloneManager5“ wurde die sequenzierte *elip*-cDNA in die Proteinsequenz übersetzt. Das daraus resultierende Polypeptid besitzt eine Länge von insgesamt 199 Aminosäuren.

Nachdem die sequenzierte und komplettierte *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina analysiert und dem Kultivar Cabernet Sauvignon zur Festlegung der Homologien gegenübergestellt wurde, folgte die Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz des Vorstufenproteins.

Mit Hilfe des Programms „Clone Manager5“ konnte ein Leserahmen mit einer gesamten Länge von 199 Aminosäuren festgelegt werden. Die Abb. 3.13 stellt die *elip*-cDNA zusammen mit der entsprechenden Proteinsequenz dar.

Zur Darstellung hoch konservierter Bereiche in der translatierten ELIP-Proteinsequenz von *Vitis vinifera* cv. Sultanina wurde im Anschluss ein Homologievergleich mit anderen bekannten ELIP-Sequenzen durchgeführt (Abb. 3.14). Das Alignment erfolgte mit dem Programm CLUSTALW (Des Higgins, European Bioinformatics Institute, U.K), wobei die Auswahl der für das Alignment verwendeten Proteinsequenzen das Ergebnis einer NCBI-Suche mit der ermittelten Aminosäuresequenz des ELIP-Proteins von *Vitis vinifera* cv. Sultanina darstellt. Für die Festlegung der Transitpeptide wurde das Programm „ChloroP Version 1.1“ (Emanuelsson *et al.*, 1999) herangezogen. Zur Bestimmung transmembraner Domänen wurden die Programme „DENSE ALIGNMENT SURFACE“ (Cserzo *et al.*, 1997), „PREDATOR“ (Frishman und Argos, 1996) und „TMHMM“ (Sonnhammer *et al.*, 1998) ausgewählt. Während die exakte Abgrenzung der transmembranen Bereiche in allen verwendeten Programmen unterschiedlich waren, stimmten die Angaben über die zentralen Bereiche überein. Unter Zuhilfenahme der Angaben von Heddad und Adamska (2000) erfolgte anschließend eine Festlegung der Helices. Die Ergebnisse der Auswertungen sind in Abb. 3.14 zusammengefasst. Grau und mit (\*) markierte Aminosäuren sind in allen 8 miteinander verglichenen Sequenzen identisch. Sowohl (:) als auch (.) zeigen auf, dass die Aminosäuren untereinander ähnlich sind. Die ermittelten Leadersequenzen sind in der Darstellung umrahmt und die Position der drei ermittelten transmembranen Helices markiert. Homologien zu bekannten ELIP-Sequenzen anderer Spezies lassen sich für das übersetzte ELIP-Protein bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina zwischen den Aminosäuren 83 und 193 finden, wobei hoch konservierte Bereiche zwischen den Positionen 97 und 115 sowie 170 und 189 liegen. Immer wiederkehrende Motive sind dabei „GPAPERINGRLAM“ (Position 96 – 109), „WNGR“ (Position 174 – 177) und „AMLGL“ (Position 176 – 180), die in allen ELIP-Proteinsequenzen zu finden sind. Diese Motive befinden sich, nach Sekundärstrukturanalysen, in den Bereichen der Helix I und Helix III. Ihre Positionen können dem Alignment entnommen werden. Innerhalb der Helix II sind ebenfalls



Die Möglichkeit der Bestimmung von Homologiegraden zwischen Proteinsequenzen liefert das Alignment „CLUSTALW“. Neben der Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz gibt es auch Informationen über die Kongruenz der alignierten Sequenzen an. Interessant ist dabei ein unabhängiger Vergleich der Übereinstimmungen zwischen den Vorstufenproteinen, den Leadersequenzen und den reifen Proteinen. Für die Vorstufenproteine lassen sich Sequenzübereinstimmungen zwischen 48% und 97% finden, wobei letztere zwischen den beiden Kultivaren *Vitis vinifera* cv. Sultanina und *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon auftreten. Interessant ist dabei noch die Übereinstimmung zwischen *Pisum sativum* und *Medicago sativa*, die sowohl für das Vorstufenprotein, der Leadersequenz als auch dem reifen Protein bei 82% liegt. Abgesehen von den beiden Kultivaren *Vitis vinifera* und den beiden genannten zueinander stark verwandten ELIP-Proteinen liegen die Bereiche hoher Homologien nicht in dem Bereich der Leadersequenzen. Hier nehmen die Sequenzähnlichkeiten bis auf 5% bei einem Vergleich der ELIP-Proteine von *Arabidopsis thaliana* 1 mit *Lycopersicon esculentum* ab, während sie innerhalb des reifen Proteins auf 58% ansteigen. Allgemein lässt sich für das analysierte ELIP von *Vitis vinifera* cv. Sultanina sagen, dass die Homologien innerhalb des Transitpeptides, wie es auch beim Vergleich anderer Spezies untereinander auftritt, maximal bei 20% liegen. Natürlich muss da der Sequenzvergleich zum zweiten Weinkultivar Cabernet Sauvignon ausgenommen werden. Dagegen nehmen die Sequenzähnlichkeiten des reifen Proteins von *Vitis vinifera* zu den anderen ELIP-Proteinen auf 63% bis 68% zu. Unter ausschließlicher Berücksichtigung der transmembranen Bereiche der ELIP-Proteine nehmen die Übereinstimmungen noch deutlich zu. Die höchste Übereinstimmung findet sich für *Vitis vinifera* cv. Sultanina mit 57% beim Vorstufenprotein zu dem ELIP von *Arachis hypogaea*. Nachstehende Tabellen listen die Sequenzähnlichkeiten, die mit dem Programm „CLUSTALW“ ermittelt wurden, auf. Dabei wurden die 8 Proteinsequenzen von *Vitis vinifera* cv. Sultanina (V. v. S.), *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (V. v. C., Accession No. CB345605), *Medicago sativa* (M. s., Accession No. AAK63815), *Pisum sativum* (P. s., Accession No. P11432), *Arachis hypogaea* (A. h., Accession No. AA033591), *Lycopersicon esculentum* (L. e., Accession No. AA592268) sowie *Arabidopsis thaliana* 1 (A. t. 1, Accession No. AAD28779) und *Arabidopsis thaliana* 2 (A. t. 2 Accession No. AAB88391) gegenübergestellt. Um zu verdeutlichen, dass die ermittelten Homologien auf die Sequenz des reifen Proteins beschränkt ist, wurden die Vergleiche zwischen den Vorstufenproteinen, den Leadersequenzen und den reifen Proteinen durchgeführt (Tab 3.1)

## A) Sequenzähnlichkeiten zwischen den Vorstufenproteinen (in %)

	V. v. S.	V. v. C.	M. s.	P. s.	A. h.	L. e.	A. t. 1	A. t. 2
V. v. S.		97	53	52	57	53	55	52
V. v. C.	97		59	54	60	52	52	54
M. s.	53	59		82	75	54	51	51
P. s.	52	54	82		67	56	50	53
A. h.	57	60	75	67		59	51	60
L. e.	53	52	54	56	59		48	58
A. t. 1	55	52	51	50	51	48		67
A. t. 2	52	54	51	53	60	58	67	

## B) Sequenzähnlichkeiten zwischen den Transitpeptiden (in %)

	V. v. S.	V. v. C.	M. s.	P. s.	A. h.	L. e.	A. t. 1	A. t. 2
V. v. S.		97	13	13	20	15	14	15
V. v. C.	97		16	16	27	16	14	18
M. s.	13	16		82	54	24	23	18
P. s.	13	16	82		50	25	8	18
A. h.	20	27	54	50		31	17	36
L. e.	15	16	24	24	31		5	50
A. t. 1	14	14	23	8	17	5		52
A. t. 2	15	18	18	18	36	50	52	

## C) Sequenzähnlichkeiten zwischen den reifen Proteinen (in %)

	V. v. S.	V. v. C.	M. s.	P. s.	A. h.	L. e.	A. t. 1	A. t. 2
V. v. S.		95	63	62	68	63	65	66
V. v. C.	95		69	62	68	60	66	68
M. s.	63	69		82	82	64	56	60
P. s.	62	62	82		73	61	58	62
A. h.	68	68	82	73		65	63	68
L. e.	63	60	64	61	65		58	66
A. t. 1	65	66	56	58	63	58		78
A. t. 2	66	68	60	62	68	66	78	

**Tab.3.1 A - C: Ergebnisse der Sequenzhomologien zwischen 8 ELIP-Proteinen innerhalb der Vorstufenproteine (A), der Transitsequenzen (B) und der reifen Proteine (C).**

Das Alignment erfolgte mit den Proteinsequenzen von *Vitis vinifera* cv. Sultanina (V. v. S.), *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (V. v. C.), *Medicago sativa* (M. s.), *Pisum sativum* (P. s.), *Arachis hypogaea* (A. h.), *Lycopersicon esculentum* (L. e.) sowie *Arabidopsis thaliana* 1 (A. t. 1) und *Arabidopsis thaliana* 2 (A. t. 2).

Mit einer Länge von insgesamt 199 Aminosäuren und einer mit Hilfe des bioinformatischen Programmes „ChloroP Version 1.1“ vorhergesagter Leadersequenz von 44 Aminosäuren ergibt sich eine Länge des reifen Proteins bei dem Kultivar *Vitis vinifera* cv. Sultanina eine Größe des reifen Proteins von 157 Aminosäuren. Zur Bestimmung der Molekülmasse des ELIP-Proteins wurden vergleichend die beiden Programme „Compute pI/MW“ (Bjellqvist *et al.*, 1993) und „ProtParam“ (Gill und von Hippel, 1989) Beide berechnen eine Molekülmasse des Vorstufenproteins mit 21266 Dalton und einem pI = 0,79, während das reife Protein eine Molekülmasse von 16348 und ein pI von 5,44 besitzt.

### 3.1.3. Biochemischen Charakterisierung

#### 3.1.3.1. Bestimmung der apparenten Molaren Masse des reifen ELIP-Proteins

Neben der Ermittlung der Molekülmasse mit Hilfe bioinformatischer Methoden wurde auch die apparente Molare Masse des Proteins bestimmt. Aufgrund der Eigenschaft des ELIP-Antikörpers der Erbse, eine Antigenität auch gegen das ELIP-Protein des Weins zu besitzen (siehe 3.1.4.1), konnte dieser für das Experiment verwendet werden. Aber auch für die anderen Versuche zur Untersuchung des Verhaltens der Weinblätter unter definierten Licht- und Temperaturbedingungen wurde er herangezogen.

In einer SDS-PAGE wurden 20 µg des isolierten Gesamtproteinextraktes junger Blätter aufgetrennt, die für 3 Tage bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 25°C in einem 12 Std. Lichtzyklus inkubiert wurden. Als Referenz wurde der SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard auf das Gel geladen. Nach dem Transfer auf eine immobilisierende Membran und einem anschließenden immunologischen Nachweis konnte die Bande des ELIPs mit denen der Standardproteine verglichen und die apparente Molare Masse bestimmt werden. Für die Erstellung der Kalibrierungsgerade wurden die Laufstrecken der Standardproteine gegen den Logarithmus ihrer Molekülmasse aufgetragen.

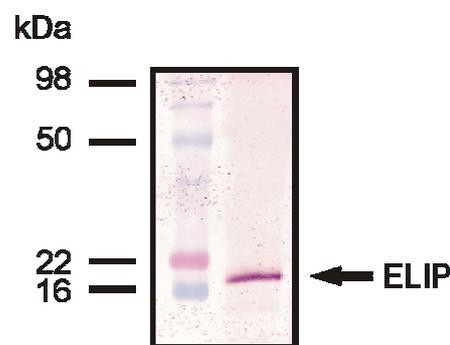
Die Laufstrecken der einzelnen Standardproteine sind in der Tab. 3.2 gegenübergestellt, während in der Abb. 3.15 das Ergebnis des Western-Blots abgebildet ist.

Aus der zurückgelegten Wanderungstrecke von 3,55 cm resultiert für das reife ELIP-Protein eine apparente Molare Masse von ungefähr 17500 Dalton.

Standard	MW (Da)	log <sub>10</sub> MW	Laufstrecke (cm)
BSA	98000	4,99	0,50
Glutamindehydrogenase	64000	4,81	0,90
Alkoholdehydrogenase	50000	4,70	1,35
Carboanhydrase	36000	4,56	2,00
Myoglobin	22000	4,34	3,15
Lysozyme	16000	4,20	3,80

**Tab. 3.2:** Die zur Bestimmung der apparenten Molaren Masse des reifen ELIP-Proteins verwendeten Proteinstandards.

Insgesamt 6 verschiedene Standardproteine wurden in einer SDS-PAGE parallel zur Gesamtproteinprobe des Weins aufgetrennt. In der Tabelle sind neben den Molekülmassen auch deren Logarithmus und die Laufstrecke im SDS-Gel eingetragen



**Abb. 3.15:** Ergebnis des Western-Blots zur Bestimmung der apparenten Molaren Masse des ELIP-Proteins von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.

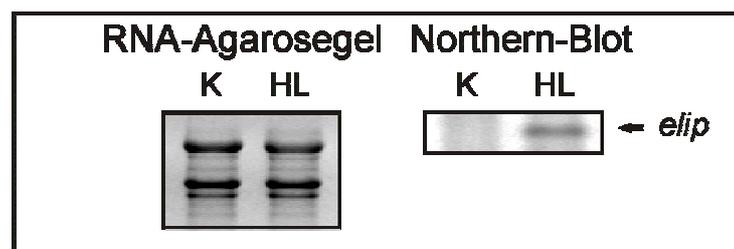
Für die Bestimmung der Molekülmasse der reifen ELIP-Proteins wurde neben dem Gesamtproteinextrakt von *Vitis vinifera* ein Proteinstandard in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch die Ermittlung einer Kalibrierungsgeraden des Standards konnte die apparente Molare Masse des ELIP-Proteins bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina bestimmt werden. Für die SDS-PAGE wurden 2,5 µl des Proteinstandards und 20 µg des Proteinextraktes aufgetragen

### 3.1.3.2. Überprüfung der *elip*-Transkription bei Hochlicht

Neben der Sequenzierung und Analyse des *elip*-Gens und dem dazugehörigem Protein von *Vitis vinifera* cv. Sultanina wurde die Regulation der Transkription des Gens unter Hochlicht bei 25°C und unter Kontrollbedingungen überprüft. Transkripte des *elip*-Gens treten transient in den frühen Phasen der Chloroplastendifferenzierung (Meyer und Kloppstech, 1984; Grimm und Kloppstech, 1987) während der Ergrünung Höherer Pflanzen auf. Ein Nachweis der Transkripte erfolgte aber auch in den Chloroplasten ergrünter Pflanzen, die an hohe Lichtintensitäten exponiert wurden (Adamska *et al.*, 1992 a, b).

Neben der Analyse des *elip*-Gens mit Hilfe bioinformatischer Methoden kann nun zusätzlich auch die Überprüfung biochemisch auf transkriptioneller Ebene erfolgen. Dabei gilt anhand der oben angegebenen Literaturverweise, dass sich in den Gesamt-RNA-

Isolierungen der Kontrollpflanzen kein Signal des *elip*-Transkriptes befinden sollte, dafür jedoch unter Hochlichtbedingungen. Da ein transienter Anstieg der *elip*-mRNA bei *Arabidopsis thaliana* (Urban, 1998) innerhalb der ersten 6 Std. nachgewiesen wurde, erfolgte die Inkubation der Weinpflanzen für ebenfalls 6 Std. bei 1000  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und 25°C. Als Referenz dienten Gesamt-RNA-Extrakte von Kontrollpflanzen, die unter Anzuchtbedingungen wuchsen (100  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und 25°C). Die isolierte Gesamt-RNA wurde in einem denaturierendem Agarosegel aufgetrennt und im Northern-Blot auf eine immobilisierende Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten *elip*-Sonde, die aus der sequenzierten cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina erhalten wurde (3.2.2.1.). Das Ergebnis in Abb. 3.16, welches sowohl das Agarosegel der RNA-Isolierung als auch den Northern-Blot darstellt, zeigt wie erwartet eindeutig einen negativen Nachweis des *elip*-Transkriptes unter Kontrollbedingungen, während dieser unter Hochlichtbedingungen positiv ausfällt.



**Abb. 3.16: Transkriptionsregulation des *elip*-Gens von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

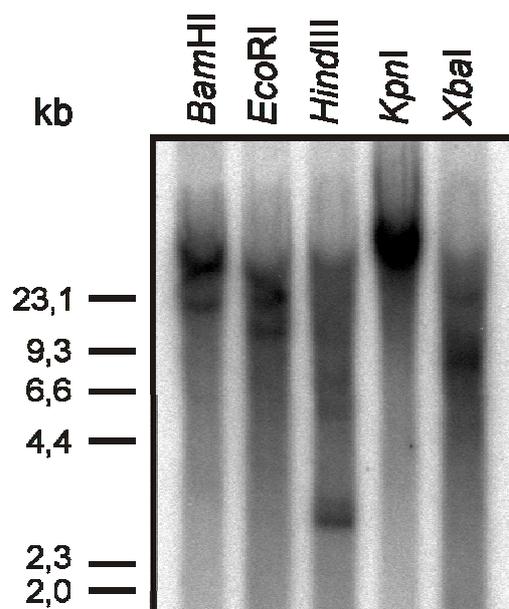
10  $\mu\text{g}$  isolierter Gesamt-RNA von Blättern, die unter Anzuchtbedingungen wuchsen (K) und von Blättern, die für insgesamt 6 Std. bei 1000  $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und 25°C lichtstressbehandelt wurden (HL), wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine immobilisierende Membran transferiert und mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten *elip*-cDNA-Sonde hybridisiert. Der Pfeil zeigt das positive Transkript-Signal bei den unter Hochlicht inkubierten Pflanzen.

### 3.1.3.3. Quantifizierung der Kopienzahl des *elip*-Gens im Genom

Über das Auftreten von *elip*-Genen bei *Vitis vinifera* konnten bislang keine Literaturangaben gefunden werden. Datenbankrecherchen mit der analysierten *elip*-DNA liefern bislang keine Evidenzen für weitere *elip*-Gene im Weingenom. Nur das Anlegen einer cDNA-Datenbank bei Lichtstressbedingungen könnte Aufschlüsse geben, ob sich weitere *elip*-Gene im Genom finden lassen. Dabei ist das Auftreten der Anzahl von *elip*-Genen bei Höheren Pflanzen sehr unterschiedlich. Multigenfamilien finden sich beispielsweise bei *Hordeum vulgare* (Grimm *et al.*, 1989) und bei *Arabidopsis thaliana* (Moscovici-Kadouri und Chamovitz, 1997; Jansson, 1999), während bei *Pisum sativum* nur ein *elip* nachgewiesen wurde (Kolanus *et al.*, 1987). Dabei differieren die Anzahl der Kopien der *elips* im Genom stark. Während für *Hordeum vulgare* insgesamt mehr als 10

nachgewiesen werden konnte (Dreyer, 1998), befindet sich für beide *Arabidopsis thaliana elips* jeweils nur eine Kopie im Genom (Heddad und Adamska, 2000).

Für die Southern-Blot Analyse wurden jeweils 20 µg genomische DNA von *Vitis vinifera* mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I und *Xba*I verdaut. Da die vollständige Sequenz der genomischen *elip*-DNA ermittelt wurde, konnte durch Analyse aller Restriktionsenzymschnittstellen innerhalb des *elip*-Gens mit dem Programm „Clone Manager5“ abgesichert werden, dass keine der ausgewählten 5 Restriktionsenzyme in diesem Bereich schneiden. Die über Nacht gespaltene DNA wurde anschließend auf einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt, denaturiert und mit Hilfe des Southern-Blot Verfahrens auf eine Membran transferiert. Der Nachweis des *elips* erfolgte mit einer <sup>32</sup>P-radioaktiv markierten Sonde der *elip*-cDNA, die mit Hilfe der beiden Primer „RT-VV-fwrđ“ und „RT-VV-rev“ nach einer RT-PCR amplifiziert wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.17: Southern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Anzahl der *elip*-Kopien im Genom von *Vitis vinifera* cv. Sultanina.**

Jeweils 20 µg isolierter genomischer DNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I und *Xba*I gespalten, in einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer <sup>32</sup>P-markierten Sonde eines Teilfragmentes der *elip*-cDNA, die mit Hilfe der Primer „RT-VV-fwrđ“ und „RT-VV-rev“ aus der *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina amplifiziert wurde. Als Marker wurde 4 µl λ DNA/*Hind*III-Fragments aufgetragen.

Obwohl dieses Experiment mehrmals durch Variieren der DNA-Mengen und der Verwendung verschiedener Sonden wiederholt wurde, ließ sich kein deutlicheres Bild des Southern-Blots erhalten. Signifikant war jedes Mal das Auftreten eines starken Signals bei der mit *Hind*III gespaltenen DNA. Die Stärke und Breite des Signals lassen auf insgesamt

1 - 2 Banden schließen. Auch in den anderen Spuren findet sich eine Evidenz für mehr als eine Kopie des *elip*-Gens im Weingenom. Jedoch kann das Auftreten von mehr als 10 Kopien, wie es bei *Hordeum vulgare* der Fall ist, ausgeschlossen werden. Es stellt sich jedoch auch die Frage, ob es sich um ein einzelnes Gen handelt. Ausgeschlossen werden kann nicht das Vorhandensein zweier oder mehrerer verschiedener *elip*-Gene bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina, die jedoch hohe Sequenzhomologien zueinander aufweisen und an denen die radioaktiv markierte Sonde hybridisieren kann.

### 3.1.4. Hochlichtexperimente

#### 3.1.4.1. Expression des ELIP-Proteins

Da kein Antikörper gegen das ELIP-Protein von *Vitis vinifera* vorlag, mussten in Voruntersuchungen vorhandene ELIP-Antikörper auf mögliche Kreuzhybridisierungen mit ihren Äquivalenten aus *Vitis vinifera* getestet werden. Hierfür standen folgende Antikörper zur Auswahl:

Kaninchen-Anti-ELIP (*Arabidopsis thaliana*), Verdünnung: 1:250

Ziegen-Anti-ELIP (*Pisum sativum*), Verdünnung 1:300

Kaninchen-Anti-ELIP (*Nicotiana tabacum*), Verdünnung 1:250

Kaninchen-Anti-ELIP (*Zea mays*), Verdünnung 1:500

Kaninchen-Anti-GST-ELIP (*Hordeum vulgare*), Verdünnung 1:1000

Die Anzucht von *Vitis vinifera* und *Arabidopsis thaliana* erfolgte wie unter 2.2. beschrieben, wobei die Kultivierung von *Nicotiana tabacum* auch der Vorgehensweise von *Arabidopsis thaliana* entsprach. Samen von *Zea mays* und *Hordeum vulgare* wurden in Pflanzschalen auf Vermiculit ausgebracht, anschließend mit einer dünnen Schicht Vermiculit bedeckt und in einem 12 Std. Lichtzyklus bei 23°C angezogen. Nach 4 Tagen konnten die Pflanzen für die Hochlichtexperimente verwendet werden. Ähnlich erfolgte auch die Kultivierung von *Pisum sativum*, jedoch wurden die Samen zusätzlich über Nacht in Wasser vorgequollen und die Ernte der jungen Pflanzen erfolgte erst nach 7 Tagen.

Im Rahmen des Vorexperimentes wurden die Blätter in speziell für kurzzeitige Lichtstressbehandlungen angefertigten Glasküvetten, auf Wasser schwimmend, für 6 Std. bei einer Lichtintensität von  $2500 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und 25°C inkubiert. Die Exposition der Kontrollblätter erfolgte ebenfalls für 6 Std. waagrecht schwimmend auf dem Wasserbad, jedoch bei einer Lichtintensität von  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und

25°C. Anschließend wurde das Blattmaterial sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, in der Kugelmühle pulverisiert und zum immunologischen Nachweis des ELIP-Proteins Gesamtproteinextrakte gewonnen.

Nach der Auftrennung der Proteinextrakte in einem 14%-igem Laemmli-Gel, dem Transfer auf eine immobilisierende Nitrocellulosemembran und der immunologischen Nachweisreaktion mit den unterschiedlichen ELIP-Antikörpern konnte eine Kreuzdetektion mit dem ELIP-Antikörper aus *Pisum sativum* nachgewiesen werden.

Dabei wurden bei beiden Kontrollpflanzen kein ELIP-Protein exprimiert, während nach einer Lichtstressbehandlung über 6 Stunden bei  $2500 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C eine Bande bei etwa 17 kDa sichtbar wurde.

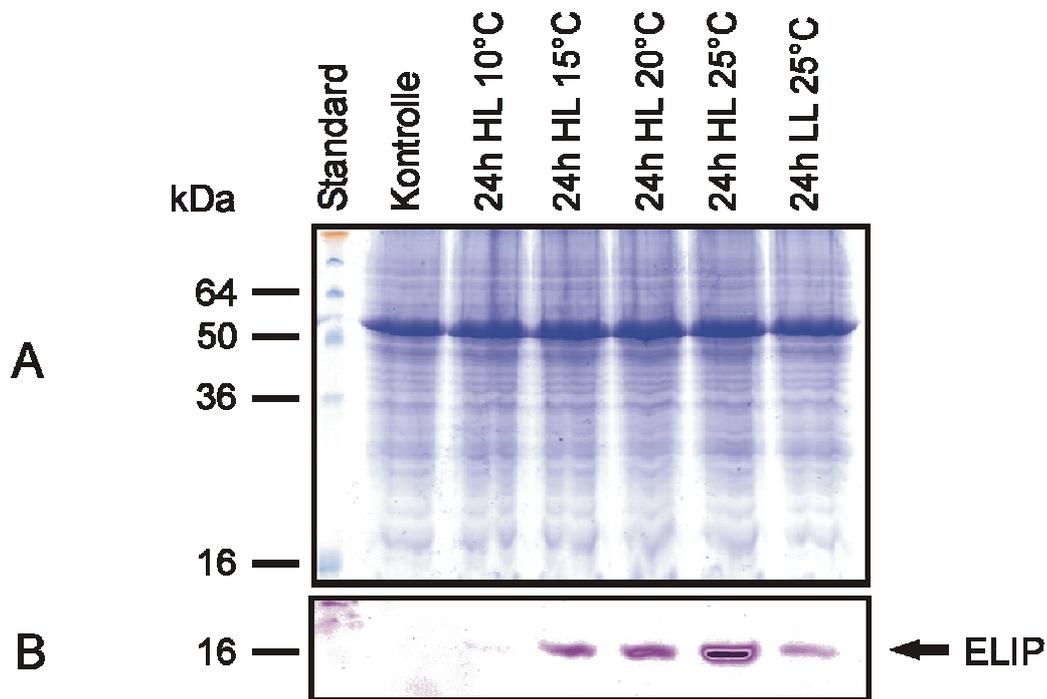
Daher war es möglich, mit Hilfe des Antikörpers gegen das ELIP-Protein aus *Pisum sativum* eine Quantifizierung der ELIP-Expression bei *Vitis vinifera* unter veränderten Licht- und Temperaturbedingungen durchzuführen.

### **Hochlichtexperiment bei 24 Std. Dauerlicht**

Zunächst wurde die ELIP-Induktion bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina nach 24 Std. Dauerhochlicht bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt. Im Gewächshaus angezogene Weinpflanzen wurden zunächst für 8 Tage bei  $100 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in einem 12 Std. Licht- / 12 Std. Dunkel-Rhythmus zur gleichmäßigen Adaption in eine Klimakammer gestellt. Triebe, die für die anschließenden Hochlichtexperimente eingesetzt werden sollten, wurden gleichmäßig auf einer Ebene, die aus untereinander vernetzten Bambusstangen bestand, ausgebracht, ohne dabei die Blätter oder die Sprosse zu beschädigen. Diese Vorgehensweise wurde auch für die anschließenden Lichtstressbehandlungen angewandt.

Bei einem 24-stündigen Dauerhochlicht von  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  variierte der Temperaturbereich von 10 – 25°C. Die Unterteilung der Weinblätter erfolgte dabei in zwei Gruppen, wobei die jungen Blätter die Blätter 1 – 4 und die älteren die Blätter 6 – 10 darstellen. Zusätzlich wurden Pflanzen auch für die Dauer von 24 Std. bei  $100 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bei moderaten Temperaturen von 25°C inkubiert. Als Kontrollen dienen Blätter der in Klimakammern bei  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C angezogenen Pflanzen bei einem 12 h Licht- / 12 h Dunkel-Rhythmus. Gesamtproteinextrakte der geernteten und gemörserten Blätter wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und für eine Western-Blot-Analyse verwendet. Abb. 3.18A stellt das Coomassie gefärbte SDS-Gel der

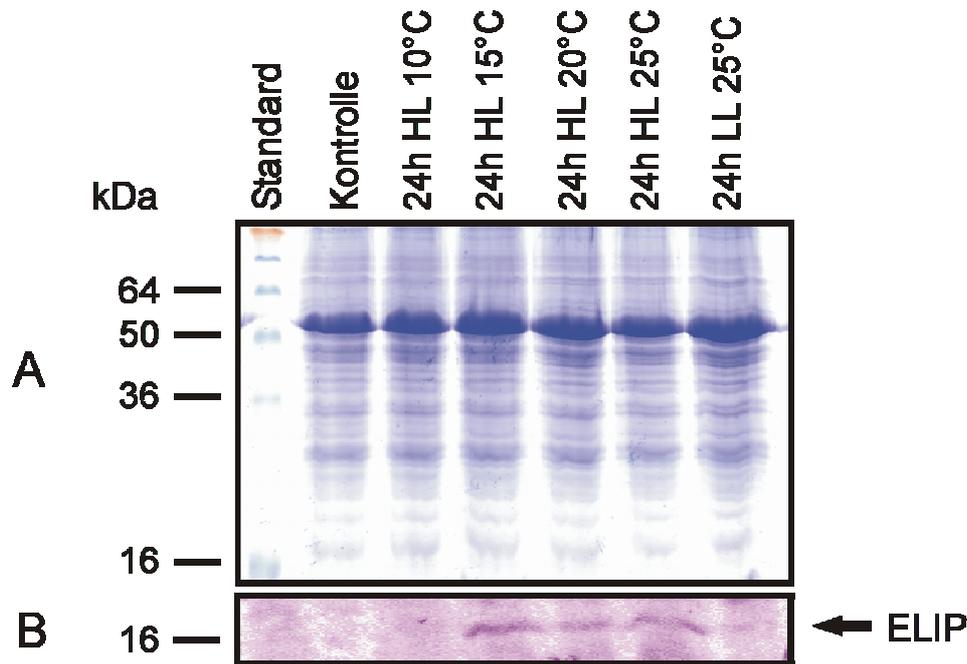
Gesamtproteinextrakte junger Weinblätter dar. Pro Spur wurde 20  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Das Ergebnis des Western-Blots ist in Abb. 3.18B dargestellt.



**Abb. 3.18: Coomassie gefärbtes Gel und Western-Blot zur Untersuchung der ELIP-Induktion junger Weinblätter.**

Bild A zeigt die Auftrennung der isolierten Gesamtproteinextrakte verschiedener Licht- und Temperaturbehandlungen in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. Pro Spur wurden 20  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Als Standard wurde 4  $\mu\text{l}$  des SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein-Standards eingesetzt. Bild B zeigt das Ergebnis des dazugehörigen Western-Blot. Primärer Antikörper war der Ziegen-Antikörper Anti-ELIP der Erbse (1:300). Auch hier wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt je Spur eingesetzt; HL = Hochlicht bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , LL = Schwachlicht bei  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Die unter den gewählten Bedingungen höchste Induktion des ELIP-Proteins tritt nach 24 Std. bei einer Lichtintensität von  $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  auf. Dagegen wird deutlich, dass nach 24 Std. Dauerhochlicht und Kälte ( $10^\circ\text{C}$ ) die ELIP-Akkumulation nur sehr schwach nachgewiesen werden konnte. Dagegen sind die Banden nach 24 Std. Dauerlicht und  $15^\circ\text{C}$  bzw.  $20^\circ\text{C}$  deutlich stärker, doch liegen sie in ihrer Intensität unter der bei  $25^\circ\text{C}$  und Dauerhochlicht inkubierten Proteinextrakten. Eine weitere Beobachtung ist der Nachweis des ELIPs nach 24 Std. Dauerlicht bei  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$ . Die Intensität der Bande ist jedoch geringer als bei den Hochlichtexperimenten zwischen  $15^\circ\text{C}$  und  $25^\circ\text{C}$ . In der Kontrolle fiel dagegen der Proteinnachweis negativ aus. Im Unterschied zu den jungen Blättern ist die ELIP-Expression bei der Gruppe der älteren Blätter unter diesen Licht- und Temperaturbedingungen deutlich geringer (Abb. 3.19).



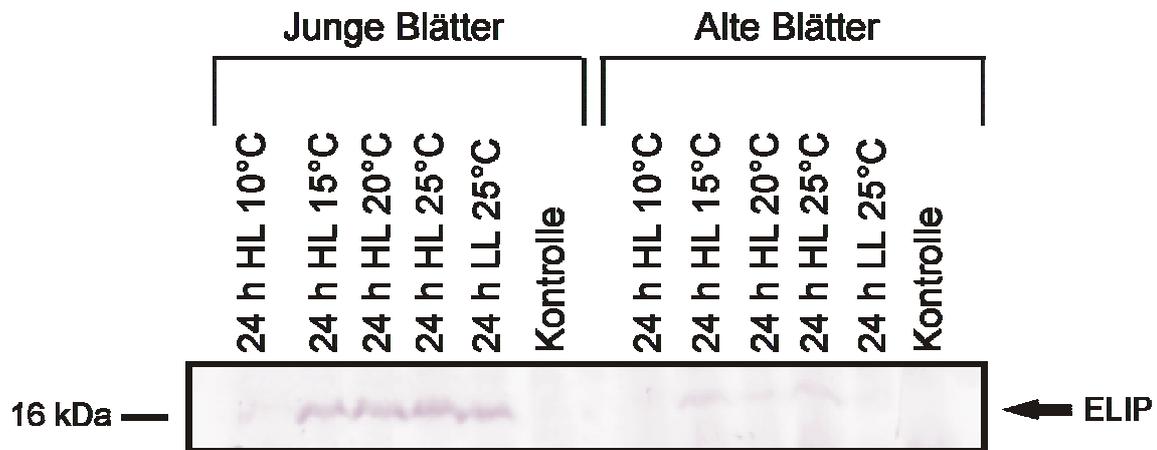
**Abb. 3.19: Western-Blot und Coomassie gefärbtes Gel zur Untersuchung der ELIP-Induktion älterer Weinblätter.**

Bild A zeigt die Auftrennung der isolierten Gesamtproteinextrakte verschiedener Licht- und Temperaturbehandlungen in einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. Pro Spur wurden 20  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Als Standard wurde 4  $\mu\text{l}$  des SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein-Standards eingesetzt. Bild B zeigt das Ergebnis des dazugehörigen Western-Blot. Primärer Antikörper war der Ziegen-Antikörper Anti-ELIP der Erbse in einer Verdünnung von 1:300. Auch hier wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt je Spur eingesetzt; HL = Hochlicht bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , LL = Schwachlicht bei 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Trotzdem wird deutlich, dass auch hier die Proteinexpression bei höheren Temperaturen und Hochlicht bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  stärker ist als bei niedrigeren. Während nach 24 Std. 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und einer Temperatur von 10°C keine Bande bei 17 kDa sichtbar wird, wird ELIP bei den Temperaturen von 15°C, 20°C und 25°C und einer Lichtintensität von 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  für 24 Std. exprimiert. Im Gegensatz zu den jungen Blättern kann jedoch bei den Gesamtproteinextrakten der Blätter 6 - 10, die für 24 Std. Dauerlicht bei 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  inkubiert wurden, keine ELIP-Induktion nachgewiesen werden.

Um den Unterschied der ELIP-Induktion bei den beiden Blattgruppen hervorzuheben, wurden zusätzlich die Gesamtproteinextrakte der Blätter 1 - 4 und die Gesamtproteinextrakte der Blätter 6 - 10, die bei definierten Licht- und Temperaturverhältnissen inkubiert wurden, zusammen in einer vergleichenden SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und das ELIP-Protein immunologisch angefärbt. Das

Ergebnis in Abb. 3.20 zeigt die deutlich stärkere Akkumulation des ELIP-Proteins bei der jungen Blattgruppe.



**Abb. 3.20: Western-Blot eines direkten Vergleiches der ELIP-Induktion junger und alter Weinblätter bei unterschiedlichen Licht- und Temperaturbedingungen.**

Um eine vergleichende Aussage der ELIP-Expression bei jungen und alten Blättern zu treffen, wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt, bei der die Proben beider Blattgruppen aufgetragen wurden. Je Spur wurde 20  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt aufgetragen; HL = Hochlicht bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , LL = Schwachlicht bei 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

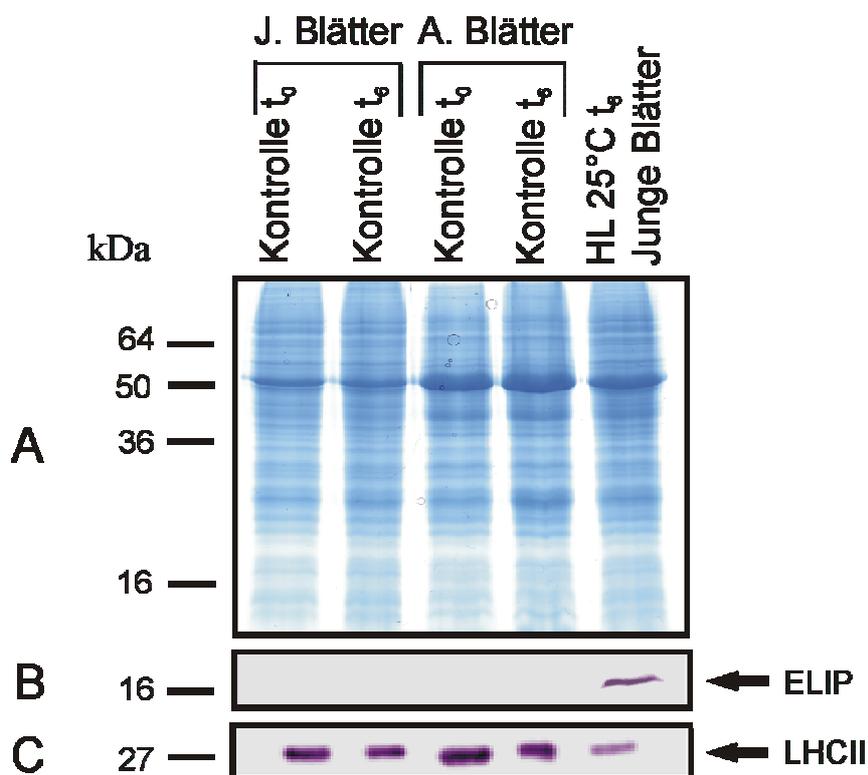
### Hochlichtexperiment bei einem 12 Std. Licht- / 12 Std. Dunkelrhythmus

Für ein weiteres Hochlichtexperiment wurden die Weinpflanzen ebenfalls für 8 Tage in der Klimakammer bei 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  adaptiert. In einem direkten Vergleich wurden nun die Pflanzen mit zwei verschiedenen Temperatur- und Hochlichtbedingungen behandelt. Anders als im voran beschriebenen Hochlichtexperiment bei 24 Std. Dauerlicht erfolgte die Hochlichtbehandlung in diesem Fall über insgesamt 4 Tage bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Std. Dabei standen die Pflanzen tagsüber bei einer Lichtintensität von 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und einer Temperatur von 10°C bzw. 25°C. Das Sammeln der Proben erfolgte am dritten Tag der Hochlichtbehandlung um 6.00 Uhr ( $t_0$ ) morgens kurz nach dem Einschalten der Lampen, um 12.00 Uhr ( $t_6$ ) mittags und um 18.00 Uhr ( $t_{12}$ ) abends kurz vor dem Ausschalten. Am vierten Tag wurde noch einmal um 6.00 Uhr ( $t_{24}$ ) morgens geerntet. Als Kontrolle diente Blattmaterial von Pflanzen, die in der Klimakammer bei 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  bei 25°C inkubiert wurden. Wie in dem ersten Experiment wurden auch hier die jungen und die älteren Blätter getrennt voneinander gesammelt und eingefroren.

Abb. 3.21 zeigt das Ergebnis der Gesamtproteinextrakte der Kontrollblätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina. Als Referenz wurde Gesamtprotein junger Blätter aufgetragen, die

bei einer Temperatur von 25°C und 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  am dritten Tag der Hochlichtbehandlung zum Zeitpunkt  $t_6$  geerntet wurden.

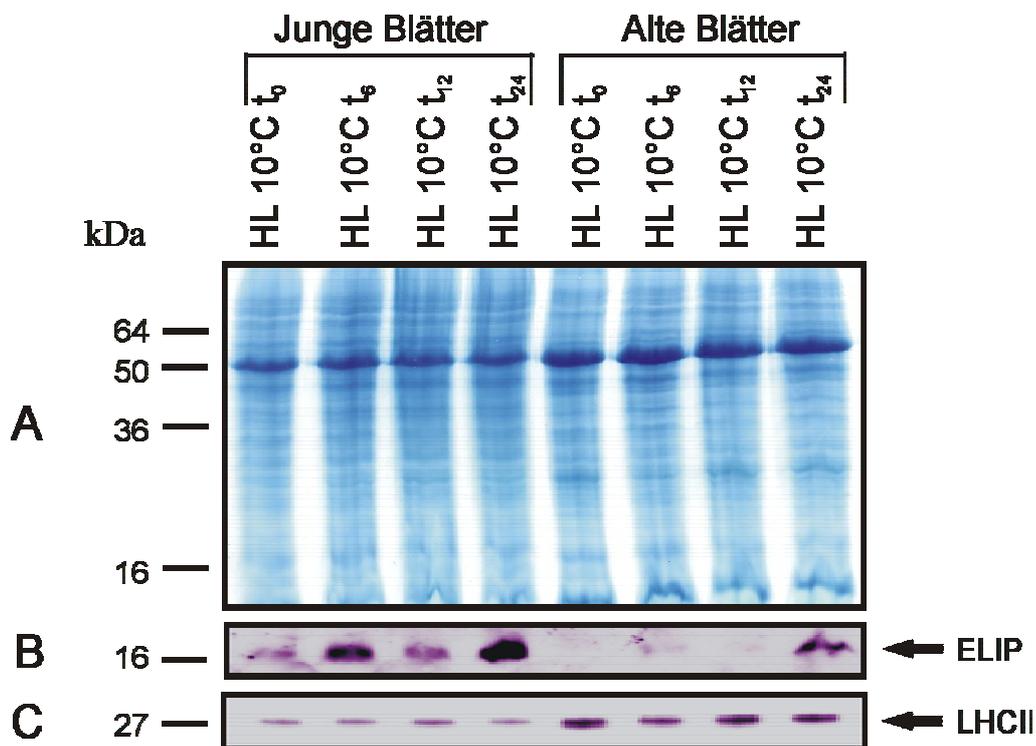
Bei allen Kontrollblättern konnte im Western-Blot keine ELIP-Induktion nachgewiesen werden, während bei der Hochlichtprobe eine deutliche Bande bei der Größe von etwa 17 kDa sichtbar ist. Vergleichend wurde auch eine Western-Blot Analyse für den Nachweis des LHCII-Proteins durchgeführt. Hierfür wurden 0,5  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt je Spur aufgetragen. Mit einer Größe von ungefähr 27 kDa ist dieses Protein in den Kontrollen deutlich stärker exprimiert als bei der Hochlichtprobe.



**Abb. 3.21: Coomassie-kolloidal gefärbtes Gel und Western-Blot zum Nachweis des ELIP- und des LHCII-Proteins.**

In einer SDS-PAGE wurden Gesamtproteinextrakte junger und alter Blätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina aufgetragen, die bei moderaten Licht- und Temperaturbedingungen von 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C geerntet wurden. Als Vergleich wurde auch Gesamtproteinextrakt junger Blätter aufgetragen die am dritten Tag zum Zeitpunkt  $t_6$  bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C in einem 12 Std. Licht / 12 Std. Dunkelrhythmus inkubiert wurden. Sowohl für das Coomassie-kolloidal gefärbte Gel als auch für den Western-Blot zum immunologischen ELIP-Nachweis wurden je Spur 20  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Für den Nachweis des LHCII-Proteins wurden lediglich 0,5  $\mu\text{g}$  Protein je Spur aufgetragen. Als Antikörper wurden der Anti-Ziege Erbsen-ELIP (1:300) und Anti-Kaninchen Gersten LHCII (1:3000) eingesetzt; HL = Hochlicht bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

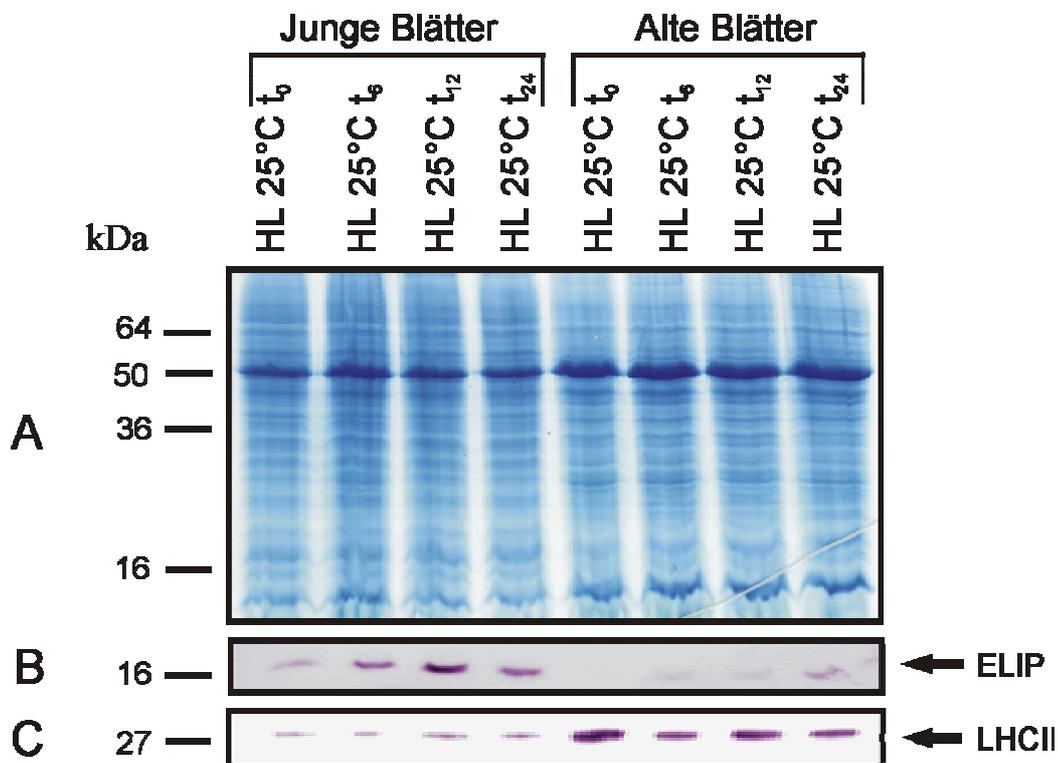
Werden Weinpflanzen für 3 Tage bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und einer Temperatur von  $10^\circ\text{C}$  inkubiert (Abb. 3.22), ist auch hier, ähnlich wie im Hochlichtexperiment bei 24 Std. Dauerlicht, die Proteinexpression der jungen und alten Blättern unterschiedlich stark. Während bereits am dritten Tag bei den Blättern 1 - 4 das ELIP-Protein nachgewiesen wurde, geschah dieses bei den älteren Blättern erst am vierten Tag ( $t_{24}$ ). Das Expressionsmaximum tritt bei den jungen Blättern am dritten Tag zum Zeitpunkt  $t_6$  auf. Im Vergleich der beiden Proben  $t_0$  und  $t_{24}$  (morgens) wird ersichtlich, dass die Proteininduktion am vierten Tag weiter ansteigt. Das Auftreten des LHCII-Proteins ist dagegen in den Proben der älteren Blätter deutlich erhöht. Eine Veränderung des LHCII-Proteins innerhalb der jungen bzw. innerhalb der alten Blätter wird aus diesen Ergebnissen nur sehr schwach ersichtlich. Zum Zeitpunkt  $t_{24}$  der Probennahme der jungen Blätter ist das Auftreten im Vergleich zum Zeitpunkt  $t_0$  etwas erniedrigt.



**Abb. 3.22: Coomassie-kolloidal gefärbtes Gel und Western-Blot zum immunologischen Nachweis des ELIP- und des LHCII-Proteins.**

In einer SDS-PAGE wurden Gesamtproteinextrakte junger und alter Blätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina aufgetragen, die für 3 - 4 Tage bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $10^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Blattmaterial wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_6$ ,  $t_{12}$  und  $t_{24}$  geerntet. Sowohl für das Coomassie-kolloidal gefärbte Gel als auch für den Western-Blot zum immunologischen ELIP-Nachweis wurden je Spur  $20 \mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Für den Nachweis des LHCII-Proteins wurden  $0,5 \mu\text{g}$  Protein je Spur aufgetragen. Als Antikörper wurden der Anti-Ziege Erbsen-ELIP (1:300) und Anti-Kaninchen Gersten LHCII (1:3000) eingesetzt; HL = Hochlicht bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

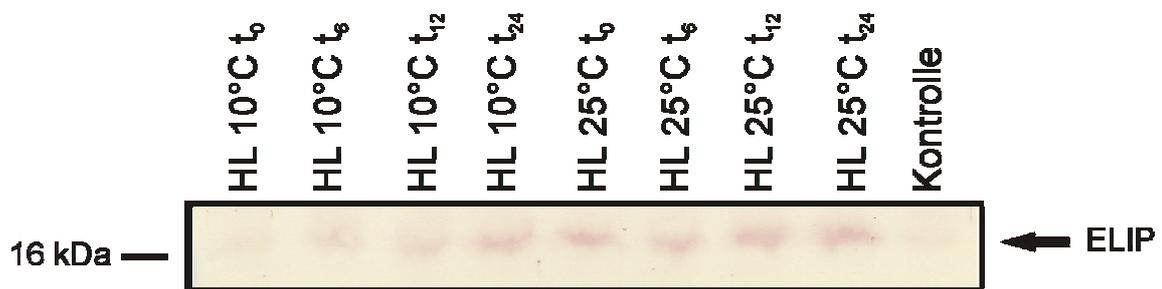
Auch bei einer Temperatur von 25°C und 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Abb. 3.23) über insgesamt 4 Tage steigt die ELIP-Induktion in den Blättern 1 - 4. Dabei ist, ebenso wie bei 10°C, die Expression am vierten Tag kurz nach dem Einschalten der Lampen ( $t_{24}$ ) stärker als am dritten Tag zum gleichen Zeitpunkt ( $t_0$ ). Bei den älteren Blättern ist eine sehr schwache Bande erst zum Zeitpunkt  $t_6$  erkennbar, ähnlich wie zum Zeitpunkt  $t_{12}$  der Probennahme. Die höchste ELIP-Expression konnte bei den älteren Blättern am vierten Tag ( $t_{24}$ ) nachgewiesen werden. Ein vergleichender Western-Blot für den Nachweis des LHCII-Proteins zeigt ein ähnliches Bild wie bei den Blättern, die bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und einer Temperatur von 10°C über mehrere Tage inkubiert wurden. Das Auftreten von LHCII-Proteinen ist bei den älteren Blättern signifikant höher im Vergleich zu den jüngeren.



**Abb. 3.23: Coomassie-kolloidal gefärbtes Gel und Western-Blot zum immunologischen Nachweis des ELIP- und des LHCII-Proteins.**

In einer SDS-PAGE wurden Gesamtproteinextrakte junger und alter Blätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina aufgetragen, die für 3 - 4 Tage bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C inkubiert wurden. Blattmaterial wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_6$ ,  $t_{12}$  und  $t_{24}$  geerntet. Sowohl für das Coomassie-kolloidal gefärbte Gel als auch für den Western-Blot zum immunologischen ELIP-Nachweis wurden je Spur 20  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt eingesetzt. Für den Nachweis des LHCII-Proteins wurden 0,5  $\mu\text{g}$  Protein je Spur aufgetragen. Als Antikörper wurden der Anti-Ziege Erbsen-ELIP (1:300) und Anti-Kaninchen Gersten LHCII (1:3000) verwendet; HL = Hochlicht bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Um auch hier die Abhängigkeit der Induktionsstärke von der Temperatur aufzuzeigen, wurden die Ergebnisse der jungen Blätter miteinander verglichen. Die Abb. 3.24 unterstützt die Beobachtung des Hochlichtexperimentes bei 24 Std. Dauerlicht, da auch über einen Verlauf von insgesamt 4 Tagen bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  die Expression des ELIPs unter moderaten Temperaturen bei  $25^\circ\text{C}$  höher liegt als in der Kälte bei  $10^\circ\text{C}$ . Während bereits zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $25^\circ\text{C}$  des Hochlichtexperimentes ELIP nachgewiesen werden konnte, tritt bei einer Temperatur von  $10^\circ\text{C}$  unter Hochlichtbedingungen eine erste schwache Bande zum Zeitpunkt  $t_6$  auf. Diese ist im Vergleich zu der Bande bei  $25^\circ\text{C}$  und Hochlicht jedoch deutlich geringer.



**Abb. 3.24: Western-Blot der ELIP-Expression junger Weinblätter bei einer Lichtintensität von  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $10^\circ\text{C}$  bzw.  $25^\circ\text{C}$ .**

Neben dem Vergleich zwischen jungen und älteren Blättern wurden auch die Gesamtproteinextrakte junger Blätter gegenübergestellt, die bei unterschiedlichen Temperaturen Lichtstress ausgesetzt wurden. Hierbei wird deutlich, dass eine erhöhte Proteinexpression bei  $25^\circ\text{C}$  und  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auftritt im Vergleich zur den Proben, die bei  $10^\circ\text{C}$  und  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  inkubiert wurden. In der Kontrolle wurde kein ELIP exprimiert. Je Spur wurden  $20 \mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt aufgetragen.

#### 3.1.4.2. Analyse der Pigmentzusammensetzung

Neben der Analyse der ELIP-Induktion unter Hochlichtbedingungen wurde auch eine Bestimmung der Änderung von Pigmentzusammensetzungen lichtstressbehandelter Blätter von *Vitis vinifera* cv. Sultanina mit Hilfe der HPLC vorgenommen. Basierend auf den Ergebnissen der Proteinanalyse wurde ebenfalls zwischen 2 verschiedenen Hochlichtexperimenten unterschieden. Da signifikante Differenzen der ELIP-Induktion zwischen den beiden Temperaturen  $25^\circ\text{C}$  und  $10^\circ\text{C}$  bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  auftraten, wurden die Pigmentanalysen bei diesen Licht- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Eine Identifikation der einzelnen Peaks erfolgte bereits in den vorangegangenen Pigmentanalysen der Blattcharakterisierungen am Spektralphotometer. Auch im Rahmen der Pigmentanalyse wurden die Blätter des Weins in zwei Gruppen aufgeteilt, die in 3.1.1.1. bereits vorgestellt wurden.

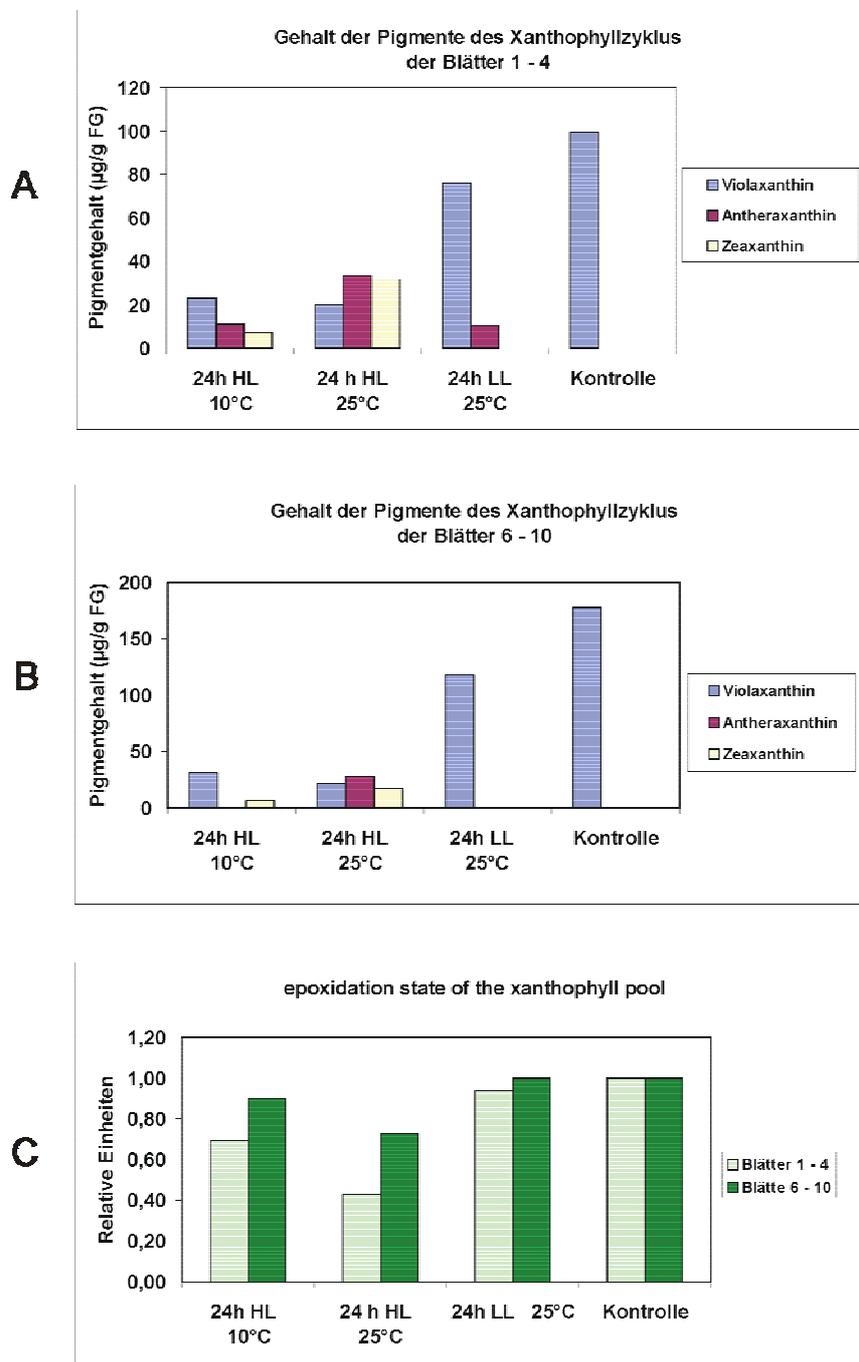
### Hochlichtexperiment bei 24 Std. Dauerlicht

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Pigmentgehalte der Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin (Abb. 3.25). Sowohl bei den jungen als auch bei den alten Blättern trat ein Violaxanthinmaximum bei den Kontrollpflanzen auf. Während bei den jungen Blättern 100 µg Violaxanthin/g FG gemessen wurden, waren es bei den alten Blättern 178 µg/g FG. Der Nachweis von Antheraxanthin und Zeaxanthin fiel bei diesen Proben negativ aus. Werden die Pflanzen bei 100 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> für 24 Std. unter Dauerlicht inkubiert, sinkt der Violaxanthingehalt auf 76 µg/g FG bei den jungen und 118 µg/g FG bei den alten Blättern. Deutlich weiter nimmt dieser Wert bei den beiden Hochlichtexperimenten ab. Ein Minimum erreicht die Violaxanthinmenge sowohl bei den jungen als auch bei den älteren Blättern nach 24 Std. Dauerlicht bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 25°C. Während bei den Blättern 1 - 4 20 µg Violaxanthin/g FG gemessen wurde, befand in sich dem Blattextrakt der Blätter 6 - 10 26 µg Violaxanthin/g FG. Etwas höher liegt dagegen der Wert nach einer 24-stündigen Lichtstressbehandlung bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 10°C (23 µg Violaxanthin/g FG bei den Blättern 1 - 4 und 33 µg/g FG bei den Blättern 6 - 10).

Dagegen erreicht Antheraxanthin mit 33 µg/g FG (Blätter 1 - 4) bzw. 28 µg/g FG (Blätter 6 - 10) sein Maximum nach 24 Std. bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> bei 25°C. Während in den Blattextrakten der älteren Blätter anderer Temperatur- und Lichtbedingungen kein zusätzliches Antheraxanthin messbar war, fällt der Gehalt dieses Pigmentes bei den jungen Blättern nach 24 Std. 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 10°C auf 11 µg/g FG und nach 24 Std. Dauerlicht bei 100 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 25°C auf 10 µg/g FG.

Ein ähnliches Bild konnte auch für Zeaxanthin nachgewiesen werden. Ein Zeaxanthinmaximum wurde in den Blattextrakten junger Blätter nach 24 Std. Hochlicht bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 25°C gemessen (32 µg/g FG). Nach 24 Std. bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 10°C sinkt dieser Wert auf 7 µg/g FG ab und bei den Pflanzen, die für 24 Std. bei 100 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> inkubiert wurden, konnte kein Zeaxanthin mehr nachgewiesen werden. Auch bei den Blättern 6 - 10 liegt das Zeaxanthinmaximum nach 24 Std. bei 1000 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 25°C (17 µg/g FG) und sinkt bei 24 Std. Lichtstress und 10°C auf 7 µg/g FG. Ebenso wie bei den jungen Blättern konnte in den beiden Lichtexperimenten, in denen die Pflanzen bei 100 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> und 25°C inkubiert wurden, kein Zeaxanthin nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse wurde zusätzlich der EPS-Wert bestimmt. Sowohl bei den alten als auch bei den jungen Blättern ist dessen Maximum mit 1,0 bei den

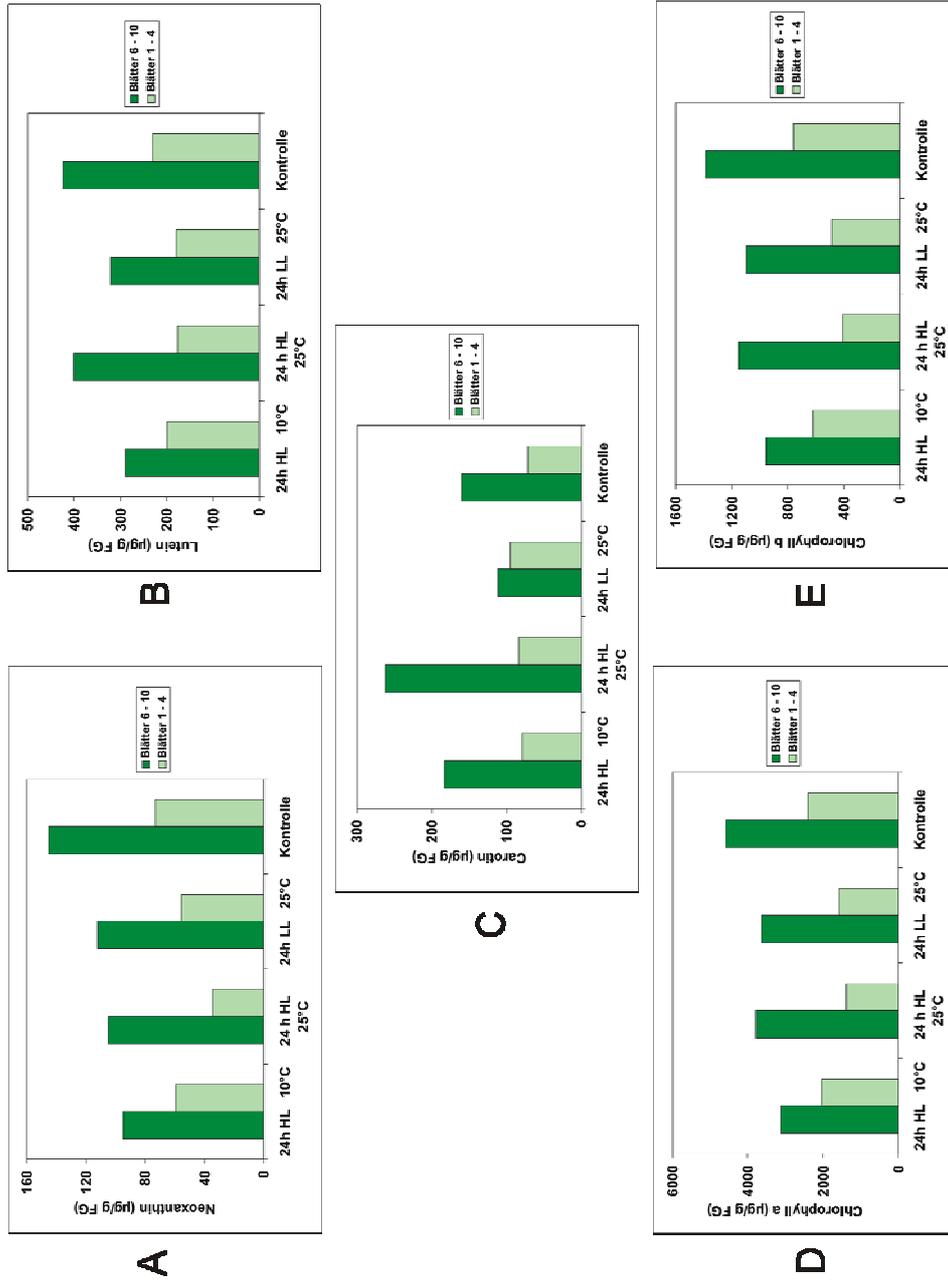
Kontrollpflanzen zu finden und nimmt nach 24 Std. Dauerlicht bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  um 57% bei den jungen bzw. 47% bei den älteren Blättern auf ein Minimum ab.



**Abb. 3.25: Gehalte der Pigmente Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin in Blattextrakten von *Vitis vinifera* cv. Sultanina und die EPS-Werte des Hochlichtexperimentes bei 24 Std. Dauerlicht.**

Blattextrakte junger (A) und älterer Blätter (B), die für 24 Std. bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (HL) und  $10^\circ\text{C}$  bzw.  $25^\circ\text{C}$ , sowie bei  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (LL) und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, wurden mit Hilfe der RP-HPLC auf ihre Gehalte an Zeaxanthin, Antheraxanthin und Violaxanthin untersucht und zusätzlich der epoxidation state of the xanthophyll pool (EPS-Wert) bestimmt. Als Kontrolle dienten Blattextrakte von Weinpflanzen, die unter Anzuchtbedingungen geerntet wurden.

Zusätzlich wurden in diesem Experiment die Gehalte an Neoxanthin, Lutein sowie die Chlorophylle a und b in den isolierten Blattextrakten bestimmt (Abb. 3.26). Wie bereits bei der Charakterisierung der ersten 10 Weinblätter beobachtet, sind auch in diesem Experiment die Pigmentgehalte der Blätter 6 - 10 höher als die der ersten vier Blätter. Das Maximum der oben angegebenen Pigmente wurde bei den jungen Blättern in den Blattextrakten der Kontrollpflanzen gemessen. Das Minimum trat dagegen nach 24 Std. bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C auf. Hier fiel der Wert im Vergleich zu den Kontrollblättern bis zu 76% (Neoxanthin) ab. Anders sieht es bei den älteren Blättern aus. Hier trat das Pigmentminimum nach 24 Std. Dauerhochlicht bei 10°C auf mit einer Verringerung des Gehaltes um 32% sowohl bei Neoxanthin, als auch bei Lutein und den beiden Chlorophyllen a und b im Vergleich zum Blattextrakt der Kontrollpflanzen. Des weiteren war bei den jüngeren Blättern der 4 aufgeführten Pigmente Chlorophyll a und b, Neoxanthin und Lutein, der Wert der Probe nach 24 Std. Dauerlicht bei 100  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C niedriger als bei den Blättern, die für 24 Std. bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 10°C inkubiert wurden. Die Differenz zwischen diesen beiden Lichtexperimenten lag in dem Bereich von 6% und 22%. Für die Blätter 6 - 10 ließ sich eine entgegengesetzte Aussage treffen. Das Minimum liegt hier bei den Proben, die für 24 Std. bei 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 10°C inkubiert wurden. Dieser Wert steigt unter Hochlichtbedingungen und 25°C leicht an und erreicht ein Maximum bei den Blättern 6 - 10, die für 24 Std. bei 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C inkubiert wurden, unter Vernachlässigung der Kontrollblattextrakte. Bei Neoxanthin liegt dagegen das Maximum bei den älteren Blättern nach 24 Std. Dauerhochlicht und 25°C. Ein anderes Bild liefert die Analyse der Carotine. Zwar wurde auch hier in der Gruppe der älteren Blätter ein insgesamt höherer Pigmentgehalt gemessen, jedoch lag das Carotinmaximum bei den älteren Blättern nicht in der Kontrolle, sondern mit einem Anstieg um 63% nach 24 Std. Lichtstress bei 1000  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C. Bei der Gruppe der jungen Blättern liegt das Carotinmaximum bei dem Kontrollansatz, die Werte der drei anderen Lichtinkubationen sind um 33% bis 44% erniedrigt



**Abb. 3.26: Pigmentgehalte der Blattextrakte von *Vitis vinifera* cv. Sultanina nach dem Hochlichtexperiment bei 24 Std. Dauerlicht.** Eine Analyse der hergestellten Extrakte der unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubierten Blätter erfolgte nicht nur für die Carotinoide des Xanthophyllzyklus, sondern auch für die Pigmente Neoxanthin, Lutein, Chlorophyll a und b und den Carotin. Dabei wurden die Ergebnisse der jungen und alten Blätter direkt miteinander verglichen.

## Hochlichtexperiment in einem 12 Std. Licht- / 12 Std. Dunkelrhythmus

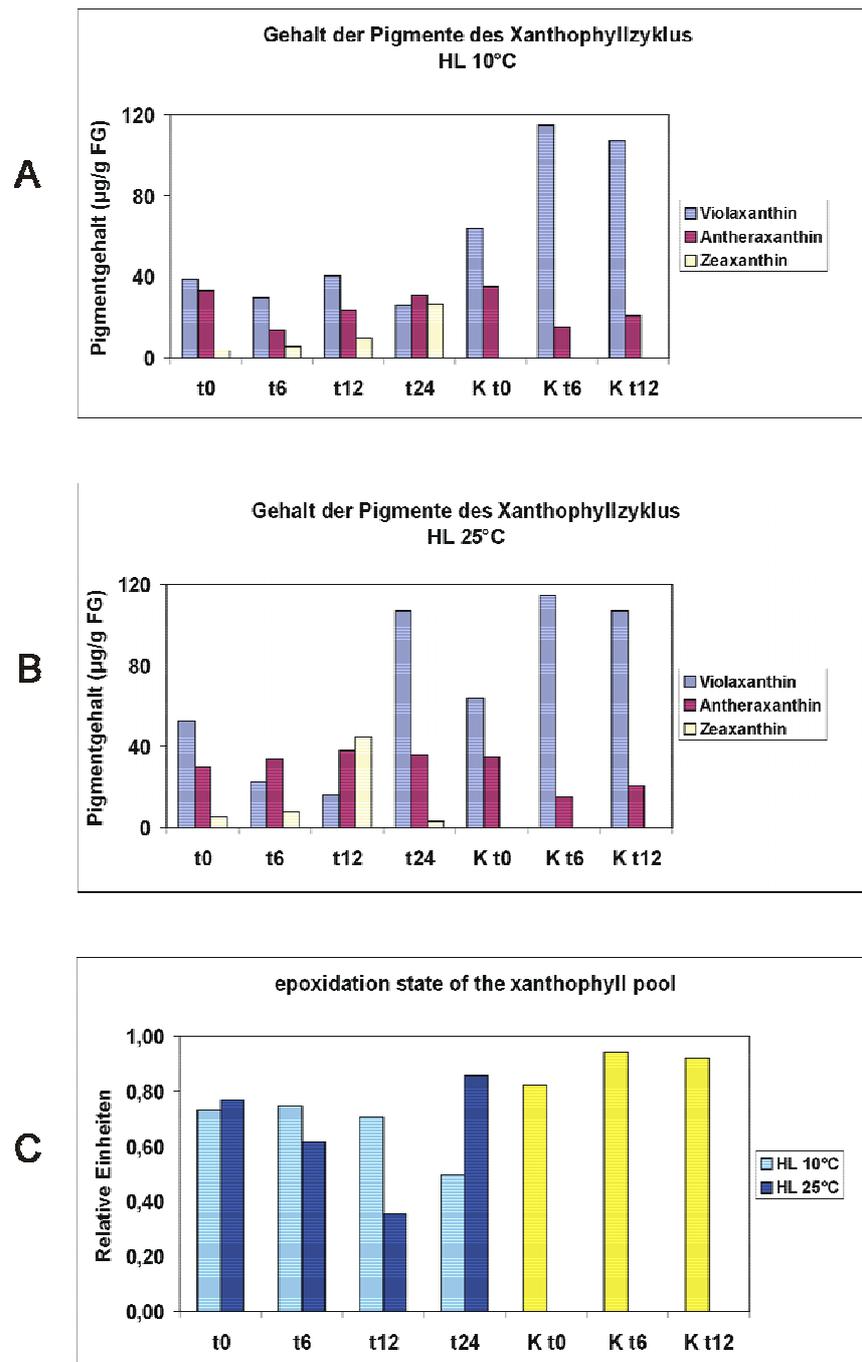
### a) Gruppe der jungen Blättern ( Blätter 1 – 4)

Zur deutlicheren Veranschaulichung wurden die Ergebnisse der jungen und älteren Blätter getrennt voneinander ausgewertet. Wie auch bei der 24-stündigen Lichtstressbehandlung von *Vitis vinifera* wurden hier zunächst die Pigmente des Xanthophyllzyklus ausgewertet und miteinander verglichen. Dabei wurden die Ergebnisse der Pflanzen, die für 3 Tage bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bei  $10^\circ\text{C}$  bzw. bei  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, in zwei getrennten Graphiken und in einer weiteren das Ergebnis der Bestimmung des EPS-Wertes sowohl der jungen zusammen mit den älteren Blätter dargestellt (Abb. 3.27). In den Kontrollblattextrakten wurden zunächst nur die Pigmente Violaxanthin und Antheraxanthin nachgewiesen. Dabei ist die vorhandene Menge des Violaxanthins zum Teil bis auf das zehnfache höher als die des Antheraxanthins ( $t_6$ ). Auf den Tagesverlauf betrachtet nimmt die Menge des gemessenen Violaxanthins bis zum Mittag hin zu und fällt anschließend zum Abend hin ab ( $t_{12}$ ), wobei der Ausgangswert des Tages nicht wieder erreicht wird. Der Verlauf des Antheraxanthins ist dabei genau entgegengesetzt. Während der Wert am Morgen erhöht ist, nimmt er im Verlauf des Tages zum Mittag ( $t_6$ ) ab und steigt anschließend wieder, wobei der Ausgangswert auch hier nicht wieder erreicht wird. Der beschriebene Verlauf des Antheraxanthins zeigt sich auch bei dem Lichtexperiment, bei dem die Pflanzen bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $10^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Der Wert  $t_{24}$  ( $31 \mu\text{g Antheraxanthin/g FG}$ ) ist zwar höher als  $t_{12}$  ( $23 \mu\text{g Antheraxanthin/g FG}$ ) am Abend zuvor, kann jedoch nicht das Maximum des Vortages  $t_0$  ( $33 \mu\text{g/g FG}$ ) erreichen. Auch Violaxanthin zeigt bei diesem Experiment einen identischen Tagesablauf, nur ist der Pigmentgehalt zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ( $26 \mu\text{g Violaxanthin/g FG}$ ) am darauffolgenden Morgen auf einem Minimum. Die Menge vorhandenen Zeaxanthins ist dabei im Vergleich der beiden Messtage zueinander ansteigend. Zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ( $26 \mu\text{g Zeaxanthin/g FG}$ ) ist der Wert um mehr als das 7-fache erhöht im Vergleich zum Start der Messungen  $t_0$ .

Ein anderes Bild ergibt sich bei der Auswertung der Blattextrakte von Weinpflanzen, die bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Der Gehalt an Violaxanthin nimmt im Verlauf des ersten Messtages kontinuierlich ab und erreicht ein Minimum zum Zeitpunkt  $t_{12}$  mit  $16 \mu\text{g/g FG}$ . Am nächsten Tag steigt der Gehalt dieses Xanthophylls auf ein Höchstwert an ( $107 \mu\text{g/g FG}$ ). Antheraxanthin dagegen zeigt keine eindeutigen Tendenzen. Der Gehalt pendelt dabei innerhalb der 24 Std., in denen die Messungen durchgeführt wurden, zwischen  $29 \mu\text{g/g FG}$  und  $38 \mu\text{g/g FG}$ . Zeaxanthin nimmt zum Abend des ersten Messtages um mehr als das 8-fache zu. Am nächsten Morgen fällt der

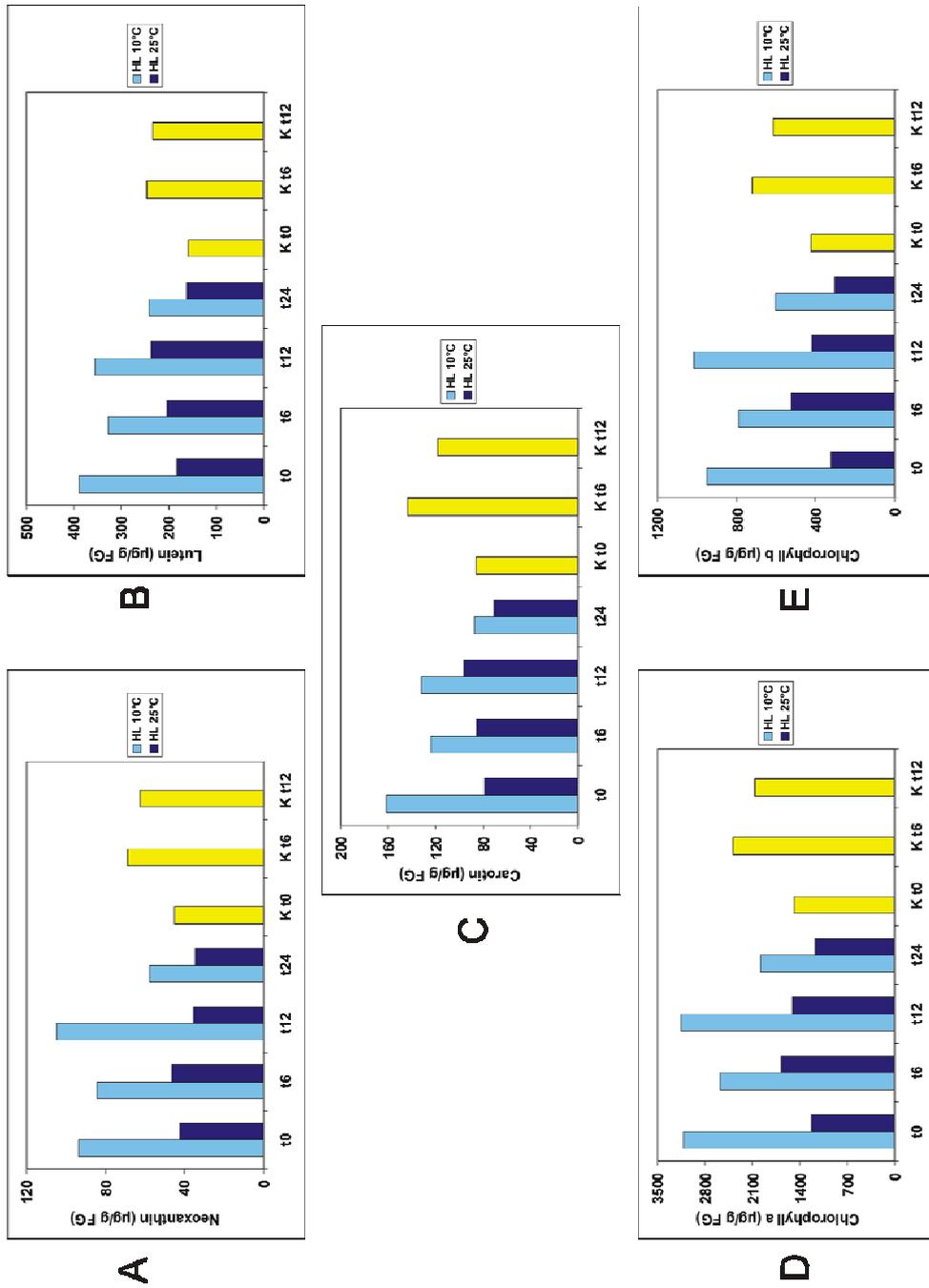
Wert innerhalb dieser Messreihe auf ein Minimum ( $3 \mu\text{g/g FG}$ ). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde auch der EPS-Wert der einzelnen Blattextrakte bestimmt. Bei  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $10^\circ\text{C}$  schwankt der Wert am ersten Messtag zwischen 0,71 und 0,73, während er am Morgen des zweiten Messtages ( $t_{24}$ ) auf 0,50 abfällt. Dagegen zeigt der Verlauf der Blätter, die bei  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, ein anderes Bild. Innerhalb des ersten Tages nimmt der EPS-Wert um mehr als 50% ab auf 0,36. Am darauffolgenden Tag ( $t_{24}$ ) beginnt der EPS-Wert bei einem Maximalwert (0,86). Die EPS-Werte der Kontrollblattextrakte liegen im Tagesverlauf zwischen 0,82 und 0,94, wobei das Maximum zur Mittagszeit ( $t_6$ ) erreicht wurde.

Des Weiteren wurden in den Blattextrakten die Gehalte der Pigmente Neoxanthin, Lutein,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin sowie die von den Chlorophyllen a und b ermittelt (Abb. 3.28). Besonders auffällig war hierbei, dass, mit Ausnahme der Carotine, die Pigmentgehalte unter Lichtstress bei  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $10^\circ\text{C}$  höher waren als bei den Blattextrakten der Kontrollpflanzen. Dabei war die Rhythmik im Verlauf eines Tages gegenläufig. Zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde bei den Kontrollen ein Minimalwert des jeweiligen Pigmentes gemessen, wobei bis  $t_6$  der Gehalt stark zunahm und anschließend wieder abfiel, wobei das Minimum des Morgen nicht erreicht wurde. Bei den Hochlichtproben, die bei  $10^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, fiel der Wert des Pigmentes bis zum Mittag ( $t_6$ ) und stieg anschließend wieder bis auf einen Maximalwert an ( $t_{12}$ ). Am nächsten Morgen ( $t_{24}$ ) lag der Pigmentgehalt auf einem im Vergleich zum Vortag niedrigerem Niveau. Bei der Analyse der Blattextrakte, die bei  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, ließ sich bei den Chlorophyllen und Neoxanthin eine der Kontrolle entsprechenden Tagesrhythmik erkennen. Anders als bei den Hochlichtproben, die bei  $10^\circ\text{C}$  geerntet wurden, ist hier jedoch der Pigmentgehalt niedriger als bei den Kontrollblättern. Am folgenden Tag ( $t_{24}$ ) fällt der Pigmentgehalt der  $25^\circ\text{C}$  Lichtstressproben etwas unter den Ausgangswert des Vortages. Bei Lutein und den Carotinen dagegen steigt der Pigmentgehalt im Verlauf des ersten Tages kontinuierlich und liegt am folgenden Tag ( $t_{24}$ ) bei einem Minimum, der jedoch nur geringfügig unter dem Ausgangswert liegt.



**Abb. 3.27: Gehalte der Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin in Blattextrakten junger Blätter des Hochlichtexperimentes bei einem 12 Std. Licht / 12 Std. Dunkel-Rhythmus und die daraus resultierenden EPS-Werte.**

Das geerntete Blattmaterial wurde extrahiert und die Zusammensetzung der Pigmente in der RP-HPLC analysiert. Als Vertreter des Xanthophyllzyklus wurden zunächst die drei Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin analysiert und gegenübergestellt. Als Maß für den Redoxzustand einer Blattes wurde zusätzlich der EPS-Wert der einzelnen Proben bestimmt



**Abb. 3.28: Pigmentzusammensetzung der Blattextrakte junger Blätter des Hochlichtexperimentes in einem 12 Std. Lichtzyklus.** Neben den Pigmenten des Xanthophyllzyklus wurden auch die anderen Pigmente Neoxanthin, Lutein, die Carotine sowie Chlorophyll a und b in den Blattextrakten bestimmt. Dabei wurden die Ergebnisse der bei 10°C und 25°C inkubierten Hochlichtproben gegenübergestellt. Als Referenz dienten Kontrollpflanzen (K), die bei 100 µmol Photonen \* m<sup>-2</sup> \* s<sup>-1</sup> inkubiert und zu 3 Tageszeiten (t<sub>0</sub>; t<sub>6</sub>; t<sub>12</sub>) geerntet wurden.

**b) alte Blätter**

Weiterhin wurden im zweiten Hochlichtexperiment die Ergebnisse der alten Blätter miteinander verglichen. Auch hier wurden zunächst die Ergebnisse der drei Xanthophylle Violaxanthin, Antheraxanthin und Neoxanthin, als Mitglieder des Xanthophyllzyklus, zusammengestellt (Abb. 3.29).

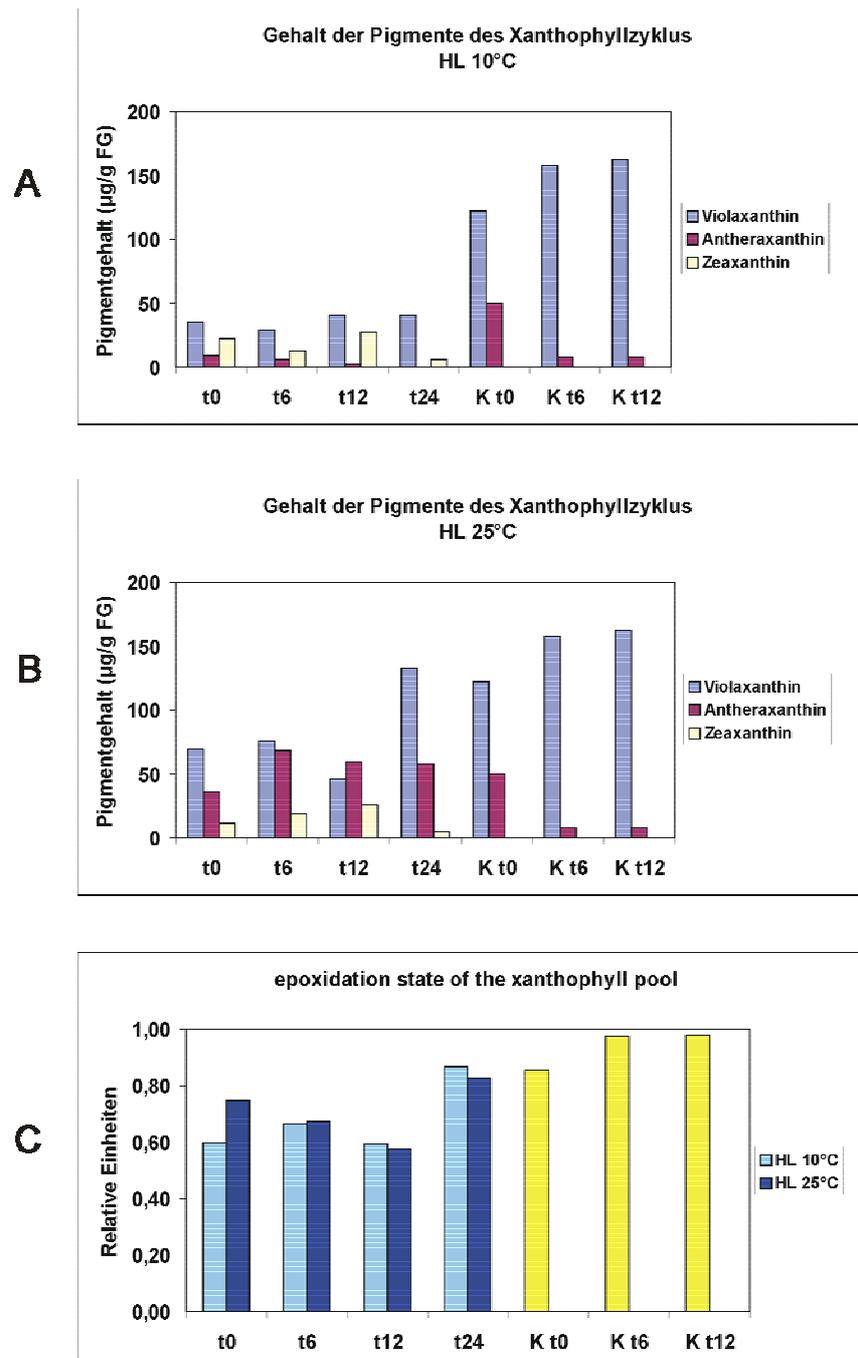
Bei den Kontrollen konnten wie bei den jungen Blättern auch kein Zeaxanthin gemessen werden. Violaxanthin nimmt im Verlauf des Tages von  $t_0$  bis  $t_{12}$  hin zu, genau gegenläufig dazu nimmt das vorhandene Antheraxanthin ab. Zum Abend ( $t_{12}$ ) hin ist die Menge des vorhandenen Violaxanthins um mehr als das 21-fache höher als die Menge an vorhandenen Antheraxanthin, am Morgen ( $t_0$ ) lediglich nur um das Doppelte höher. Der Gehalt des Violaxanthins ist in diesem Hochlichtexperiment bei  $10^\circ\text{C}$  im Vergleich zu den Kontrollblattextrakten um 67% bis 82% erniedrigt. Das Minimum wurde zum Zeitpunkt  $t_0$  ( $29 \mu\text{g/g FG}$ ) erreicht. Antheraxanthin dagegen fällt im Verlauf des Tages  $t_0$  bis  $t_{12}$  kontinuierlich ab und konnte bei der Messung  $t_{24}$  nicht mehr nachgewiesen werden. Das erreichte Maximum lag dabei bei  $9 \mu\text{g/g FG}$  ( $t_0$ ). Der Tagesverlauf des Zeaxanthins entspricht dem des Violaxanthins. Bis zum Mittag ( $t_6$ ) fällt der Gehalt und erreicht dann zum Abend ( $t_{12}$ ) hin ein Maximum ( $27 \mu\text{g Zeaxanthin/g FG}$ ). Das Minimum ( $6 \mu\text{g/g FG}$ ) wurde am darauffolgenden Morgen ( $t_{24}$ ) gemessen.

Ein etwas anderes Ergebnis zeigen die Proben, die bei  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Violaxanthin ist in deutlich höheren Mengen in den Blattextrakten nachzuweisen. Dabei lag das Maximum unter Vernachlässigung der Kontrollproben bei den Extrakten, die zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ( $133 \mu\text{g Violaxanthin/g FG}$ ) geerntet wurden. Im Verlauf des ersten Tages steigt die Menge vorhandenen Violaxanthins zum Mittag hin an und fällt dann zum Abend hin ( $t_{12}$ ) auf ein Minimum. Antheraxanthin zeigt einen ähnlichen Tagesverlauf. Dieses Pigment fällt zum Abend hin zwar ab, erreicht jedoch nicht das Minimum des Morgens. Zeaxanthin erreicht hingegen im Verlauf des ersten Messtages ein Maximum und liegt am Abend ( $t_{12}$ ) bei  $26 \mu\text{g/g FG}$ , während am darauffolgenden Morgen ein Minimum gemessen wurde ( $5 \mu\text{g/g FG}$ ). Die EPS-Werte wurden sowohl für beide Lichtexperimente als auch für die Kontrollen bestimmt. Das Maximum mit 0,98 liegt bei den Kontrollen  $t_6$  und  $t_{12}$ . Wurden die Blätter bei  $25^\circ\text{C}$  und  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  inkubiert, fällt der Wert im Verlauf des ersten Messtages ab und erreicht am Abend ( $t_{12}$ ) ein Minimum (0,58), während am folgenden Morgen  $t_{24}$  der Maximalwert errechnet wurde (0,83). Der EPS-Wert der Pflanzen, die für insgesamt 4 Tage bei  $10^\circ\text{C}$  und  $1000 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  kultiviert wurden, erreicht ebenfalls wie bei den Proben bei

---

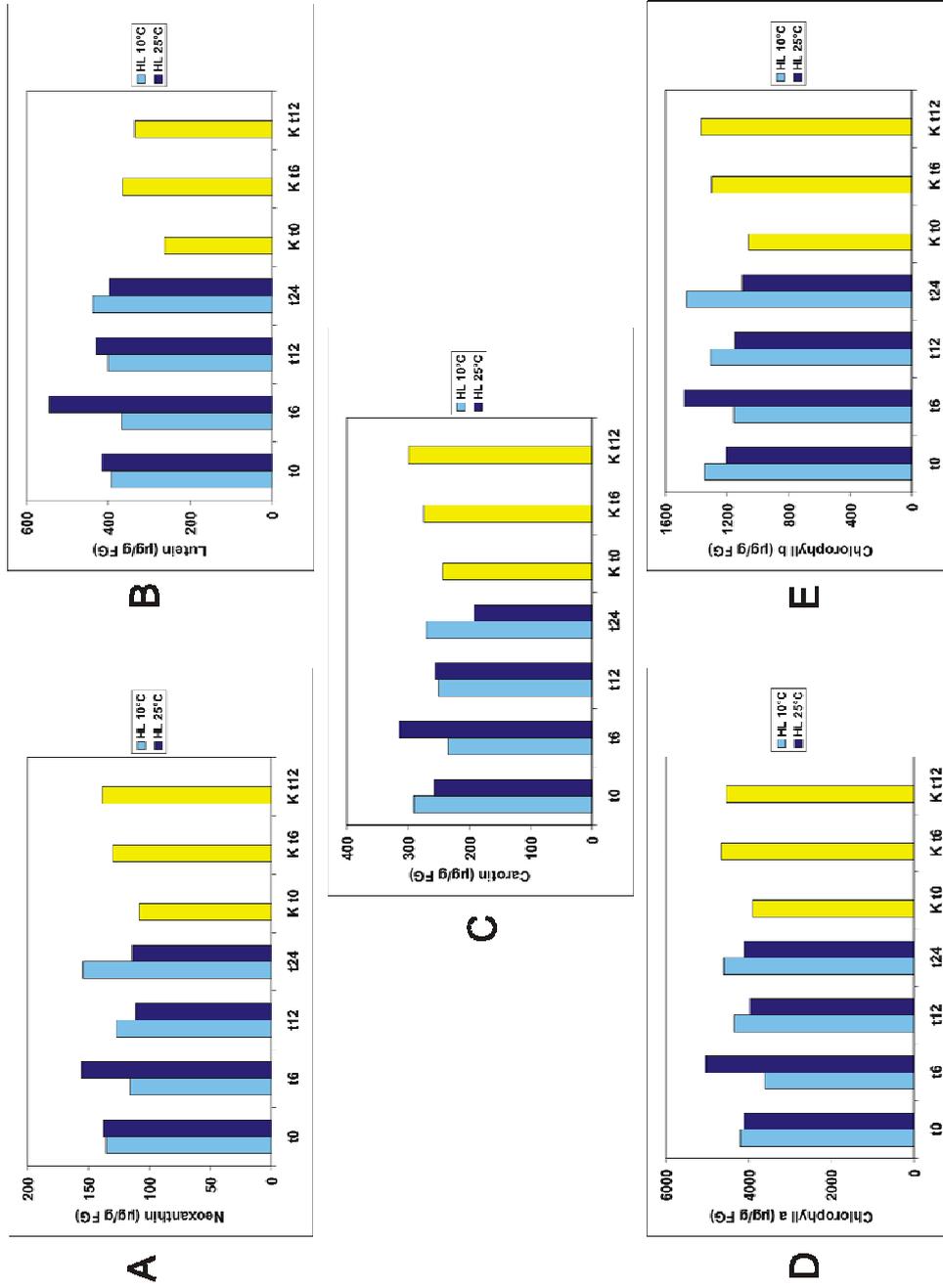
25°C ein Maximum am vierten Tag ( $t_{24}$ ) mit 0,87. Im Verlauf des ersten Messtages schwankt der Wert zwischen 0,60 und 0,67.

Bei der Auswertung der anderen Pigmente Neoxanthin, Lutein, Chlorophyll a und b sowie den beiden Carotinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin konnten die signifikanten Unterschiede zwischen den Temperaturen der Hochlichtproben, wie sie bei den jungen Blättern beobachtet wurden, nicht festgestellt werden (Abb. 3.30). Bei den 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 25°C behandelten Pflanzen konnte ein Rhythmus in allen untersuchten Pigmenten nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt  $t_6$  steigt der Pigmentgehalt auf ein Maximum und fällt zum Abend hin wieder auf einem Wert ab, der niedriger ist als der Ausgangswert  $t_0$ . Am darauffolgenden Tag  $t_{24}$  liegt der Pigmentgehalt niedriger als am Vortag, wenn auch nur sehr gering. Bei den Proben, die bei 10°C und Hochlicht behandelt wurden, konnte ein gegenläufiger Verlauf nachgewiesen werden. Das Pigmentminimum wurde mittags zum Zeitpunkt  $t_6$  erreicht. Am folgenden Tag  $t_{24}$  ist der Wert des Pigmentes im Vergleich zum Vorabend erhöht, bei Neoxanthin und Chlorophyll b ist er sogar höher als der Ausgangswert  $t_0$ .



**Abb. 3.29: Pigmentgehalte der Mitglieder des Xanthophyllzyklus Violaxanthin, Neoxanthin und Antheraxanthin in den älteren Blättern von *Vitis vinifera* des insgesamt viertägigen Hochlichtexperimentes in einem 12 Std. Licht / 12 Std. Dunkelrhythmus.**

Blätter von Weinpflanzen, die bei 25°C (B) bzw. 10°C (A) und  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  lichtstressbehandelt wurden, wurden auf das Vorkommen der Pigmente Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin hin untersucht. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe einer RP-HPLC. Zusätzlich wurde vergleichend der epoxidation state of the xanthophyll pool (EPS-Wert) der Weinblätter bestimmt (C).



**Abb. 3.30: Ergebnis der Pigmentextraktion der älteren Weinblätter bei unterschiedlichen Lichtstressbedingungen.**

Ältere Blätter von Weinpflanzen, die für insgesamt 4 Tage bei definierten Licht- und Temperaturbedingungen behandelt wurden, wurden auf ihre Pigmentzusammensetzung untersucht. Dargestellt ist hierbei das Ergebnis der Zusammensetzung von Lutein, Neoxanthin, Chlorophyll a und b und den Carotinolen. Die beiden Temperaturen 10°C und 25°C sind dabei vergleichend gegenübergestellt. Als Kontrollen (K) dienten Blattextrakte von Pflanzen, die bei 100 µmol Photonen\*m<sup>-2</sup>\*s<sup>-1</sup> inkubiert und zu den Zeitpunkten t<sub>0</sub>, t<sub>6</sub> und t<sub>12</sub> geerntet wurden.

### 3.2. Untersuchungen zur Funktion des ELIP-Proteins bei *Arabidopsis thaliana*

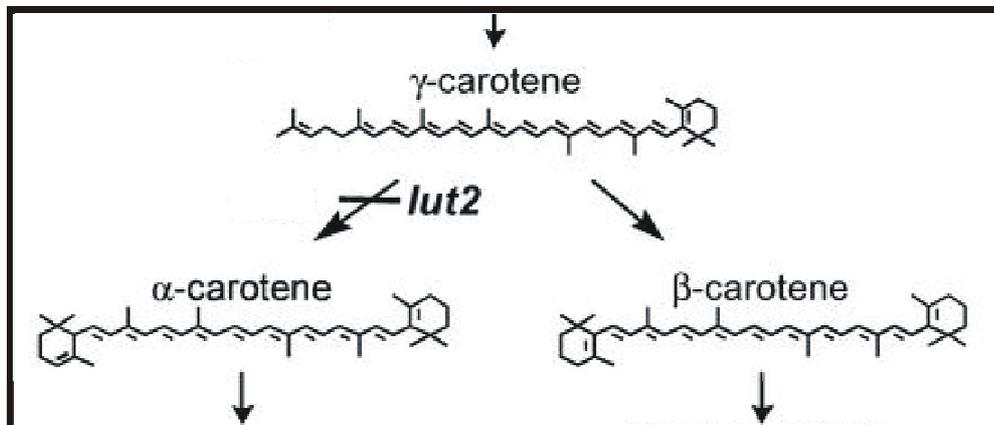
#### 3.2.1. Herstellung eines *elip*-Antisense-Konstruktes für die Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass ELIPs eine Funktion als xanthophyllbindende Proteine einnehmen und der Dissipation überschüssiger Lichtenergie dienen (Krol *et al.*, 1995; Krol *et al.*, 1999; Adamska, 1997; Lindahl *et al.*, 1997). Die wichtigsten Vertreter der Xanthophylle in den Chloroplasten Höherer Pflanzen sind dabei Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin und Neoxanthin. Deren Synthese erfolgt, ausgehend vom Zwischenprodukt Lycopin, auf zwei unabhängigen Wegen, dem  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweg, in dem Lutein gebildet wird, und dem  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg, der zur Bildung der anderen vier Xanthophylle führt (Abb. 1.1). Sie besitzen in den Chloroplasten eine Funktion sowohl als akzessorische Pigmente (Siefermann-Harms, 1985; Siefermann-Harms, 1987) als auch zum Schutz vor überschüssiger Lichtenergie (Demmig-Adams und Adams, 1992). Untersuchungen an *Chlamydomonas*-Mutanten, die entweder im  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Carotinoidbiosyntheseweg beeinträchtigt waren, zeigten keinen Phänotyp. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich die Xanthophylle beider Synthesewege gegenseitig ersetzen können. Die Blockierung beider Wege dagegen führte zu einem lichtsensitiven Phänotyp (Niyogi *et al.*, 1997).

Die transiente Akkumulation der ELIPs in den Chloroplasten Höherer Pflanzen unter photoinhibierenden Bedingungen korreliert mit der Zunahme des Zeaxanthingehaltes in den Chloroplasten (Krol *et al.*, 1995). Diesem Xanthophyll wird eine besondere Funktion im NPQ (Nonphotochemical Quenching) bei hoher Photonendichte zugeschrieben (Demmig-Adams und Adams, 1992; Gilmore, 1997). Aufgrund dessen wird den ELIPs eine Rolle in der Stabilisierung des Zeaxanthins zugeschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine transgene Doppelmutante von *Arabidopsis thaliana* hergestellt werden, welche durch das Fehlen des  $\alpha$ -Carotinoid-biosyntheseweges charakterisiert ist und zusätzlich durch eine Antisense-Inhibierung der *elip*-mRNA kein ELIP-Protein akkumulieren kann. Unter Beachtung der Arbeitshypothese, wonach den ELIPs eine Funktion in der Zeaxanthinbindung zugeschrieben wird, sind in dieser Doppelmutante beide Carotinoidbiosynthesewege beeinträchtigt, was besonders unter höheren Lichtflüssen zu einem lichtsensitiven Phänotyp führen müsste.

Für diese Untersuchungen erhielten wir eine *lut2* Mutante von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija (G. Giuliano, T-DNA Bank Versailles, Frankreich), die durch das Fehlen

des *lycopin- $\epsilon$ -cyclase* Gens charakterisiert ist, was dazu führt, dass diese Mutante keinen  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweg besitzt (Abb.3.31).



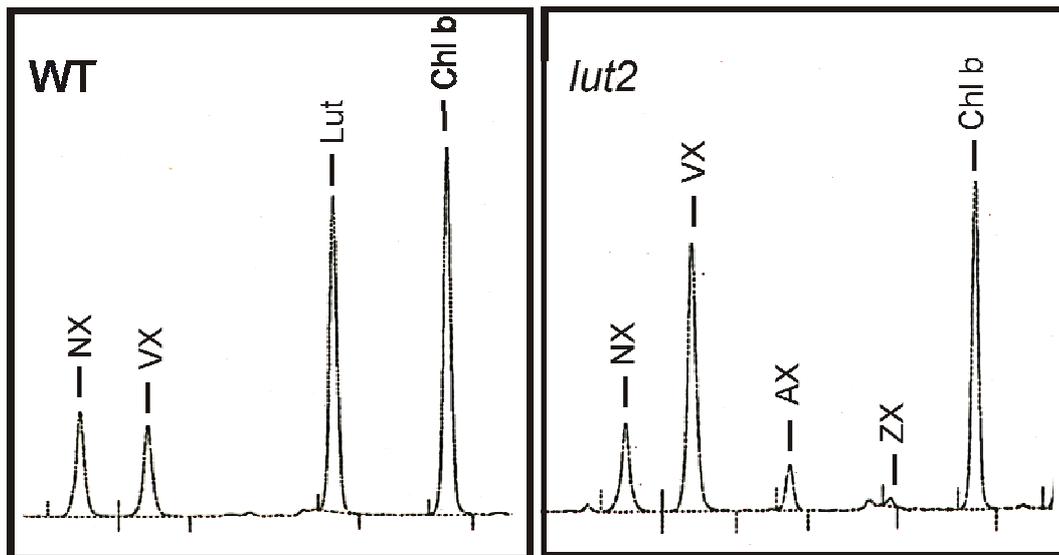
**Abb. 3.31: Darstellung des Genlokus der Mutation bei der *lut2*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija.**

Die in dieser Arbeit verwendete Mutante *lut2* von *Arabidopsis thaliana* (G. Giuliano, T-DNA Bank Versailles, Frankreich) ist durch ihr Fehlen des *lycopin- $\epsilon$ -cyclase* Gens charakterisiert. Daraus resultiert, dass die vorliegende Mutante nicht in der Lage ist, Carotinoide des  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweges zu synthetisieren.

### 3.2.1.1. Überprüfung der luteinfreien Mutante *lut2* von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija

Für die Herstellung der transgenen Doppelmutante sollte zunächst das Fehlen des Xanthophylls Lutein in der Einfachmutante ausgeschlossen werden. Hierfür wurde eine Analyse der Pigmentzusammensetzung mit Hilfe der HPLC sowohl an Wildtyp Pflanzen als auch an der luteinfreien Mutante *lut2* durchgeführt. Die Ergebnisse des Wildtyps und der Mutante sind in Abb. 3.32 gegenübergestellt.

Eine exakte Bestimmung der einzelnen Pigmentgehalte wurde hier nicht durchgeführt. Ausschlaggebend war lediglich die An- bzw. Abwesenheit des Luteinpeaks in beiden Chromatogrammen (Peak Lut). Während in Abb. 3.32 WT ein signifikanter Luteinpeak nachgewiesen wurde, der in seiner Höhe deutlich über den beiden Peaks des Neoxanthins und des Violaxanthins liegt, fällt dieser Nachweis in Abb. 3.32 *lut2* negativ aus. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte die Herstellung einer transgenen Doppelmutante durchgeführt werden.



**Abb. 3.32: Ergebnisse der Pigmentanalysen des Wildtyps und der luteinfreien Mutante von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija.**

Mit der RP-HPLC war es möglich, sowohl den Wildtyp (WT) als auch die luteinfreie Mutante (*lut2*) auf die Pigmentzusammensetzung zu überprüfen. Die Chromatogramme stellen Ausschnitte der HPLC-Läufe dar, die für die Charakterisierung der Pflanzen ausschlaggebend sind. Identifikation der Peaks: NX = Neoxanthin, VX = Violaxanthin, AX = Antheraxanthin, Lut = Lutein, ZX = Zeaxanthin, Chl b = Chlorophyll b.

### 3.2.1.2. Amplifizierung der *elip* cDNA

Anders als bei *Pisum sativum* (Kolanus *et al.*, 1987) und *Nicotiana tabacum* (Blecken *et al.*, 1994), bei denen *elip* als einzelnes Gen vorliegt, konnten bei *Arabidopsis thaliana* bisher zwei verschiedene *elips* nachgewiesen werden (Moscovici-Kadouri und Chamovitz, 1997; Jansson, 1999). Um eine Antisense-Inhibierung des ELIP-Proteins erfolgreich durchzuführen, musste daher eine geeignete Sequenz hoher Homologien beider Gene zueinander ausgewählt werden. In Abb. 3.33 ist ein Vergleich der beiden Nukleotidsequenzen dargestellt. Da ein Teil der cDNA gezielt in Antisense-Orientierung in den Expressionsvektor pART7 klonieren werden sollte, mussten zusätzlich mit Hilfe eine PCR zwei neue Restriktionsenzymststellen in die cDNA eingeführt werden, welche nicht ein weiteres Mal innerhalb der cDNA schneiden und in der MCS des Vektors vorkommen. Der ausgewählte Abschnitt der cDNA des *elip2*, der hierfür die notwendigen Voraussetzungen erfüllte, ist in der Abb. 3.33 umrahmt. Die ausgewählten Primer wurden modifiziert und eine *EcoRI* und eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt.

Elip2-fwr ( forward ) Primer mit einer *Eco*RI-Schnittstelle:

5'-GACG/AATTCAGTGAACGCCA-3'

Elip2-rev ( reverse) Primer mit einer *Bam*HI-Schnittstelle:

5'-CGTCCCCAG/GATCCAGCTTA-3'

```

elip1 -----
elip2 CACGCGTCCGCACGATCTAGCTTAAAGTTCTGTAACCTAAGCGATAATCACTTAGCTACT

elip1 -----AGTGTGAGTAATTTAGGC
elip2 CCAAGTTTCTTCTTAATTTCTCTCACACTAGTAGTTCTAAGCTTAGAAATGGCAACAGC

elip1 GTCGTTTAAACATGCAGTCAGTGTTCGCTGCTCCTTCCGGTGTATTGACTACACGCAACAT
elip2 ATCGTTCAACATGCAATCAGTCTTCGC-----CGGTGGATTAACCACTCGCAAGAT

elip1 CAGAAACA-CAAACC-----AACTCTTCT----TCAAGAGGATTGCTCCGGT
elip2 CAACACCAACAAGCTTTTCTCCGCCGGTAGCTTCCCTAACCTCAAGAGGAATTTATCCGGT

elip1 AGGAGTCAGA TGCATGGCTCAGGGCGATCCTATCAAGGAAGATCCTTCTGTGCCTCGA
elip2 GGGAGTGAGA TGCATGGCTGAGGGAGGACCCACGAATGAAGACTCTTC---ACCAGCAC

elip1 CCTCGACTTCGGCCACTCCACCACAAATGCCACAGTCTCCTCCTCCACCAGTTAGCAAGC
elip2 CATCTACCTCGGCCGCTCAGCCGTTGCCGAAGTACCATCTCCTCCTCCTATGAAAC

elip1 CTAAGGTGAGTACGAAGTTTGGAGATTTGCTAGCGTTTAGCGGTCCAGCACCAGAGAGGA
elip2 CTAAGGTGAGCACAAGTTTAGCGACTTGCTAGCGTTTAGCGGTCCAGCACCAGAGAGGA

elip1 TCAACGGGAGACTAXCAATGGTTGGATTTCGTGGCGGCCATCGCCATGGAGTTATCAAAGG
elip2 TTAACGGACGTTTAGCGATGGTTGGATTTCGTGGCGCGTTGGCTGTCGAGCTATCCAAGG

elip1 GAGAAAACGXGTTTGCTCAGATCTCTGACGGTGGTGTGCGGTGGTTTCTAGGAACAACAG
elip2 GTGAAAACGTTTLAGCTCAGATCTCCGACGGTGGCGTCTCATGGTTCCTCGGTACAACAG

elip1 CGTTGTTGACGTTGGCAGTGGTTCGGTTGTTCAAGGGAATAAGGGCAGAGGCAAAGT
elip2 CGATCTTGACACTTGCCTGCTTGTGCCGCTTTTCAAGGGCATAAGCGTTGAGTCCAAGT

elip1 CAAAAGGTTTCATGACTTCAGACGCCGAGCTATGGAACGGTTCGGTTTGCATGCTCGGTC
elip2 CCAAAGGTATCATGACGTGAGCTTTTGAACGGACGTTTCGCGATGCTCGGTT

elip1 TCGTTGCGTTGGC-CTCACCAGTACGTCACTGGTGGGAC-TTAAGCTAAAGCTTTTGT
elip2 TGGTCGCGTTGGCGTTCAGTGGTTCGTTCAAGGTGGGACACTCGTCTAAGGAAAAGAGA

elip1 TTGCTAGTTTAAAGGACAAATTTGGAGAATGATTATGTAACGCATAGATTGATT-TAATAC
elip2 GCAC-GTTATGGGGAGGATGTTTAAATACGATTTTGCC-CATGTAATTTCTCTGTAAGT

elip1 TATGAGTTTTTAAACAAAAAAAAAAAACTAAATTACTCACACTGGCGCCGCTCTAGAACT
elip2 AATCTGTGTTAGGCCTACTGTGTGTTTTATAC-ATGTGTACTAAGTGACATTTTGAAGT

elip1 AGTGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTTCGACTCGAGGG
elip2 TCGGGTTAAAAACACTTTAAA-----

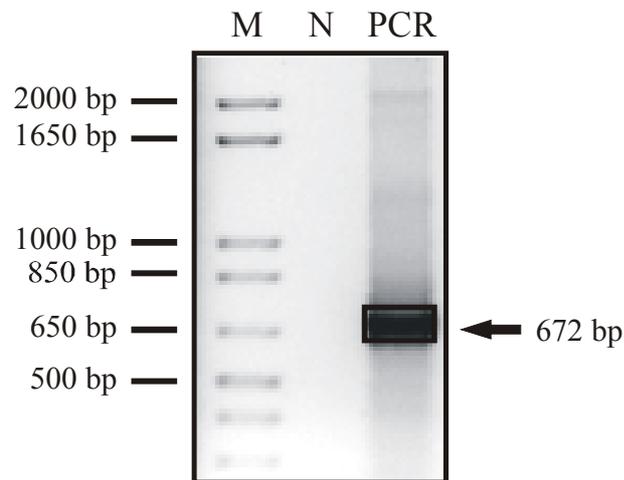
elip1 GGGCCCGTACCACTTTX
elip2 -----

```

**Abb. 3.33: Sequenzvergleich der cDNA von *elip1* (Accession-No.: AF134132) und *elip2* (Accession-No. U89014) bei *Arabidopsis thaliana*.**

Um ein geeignetes Antisense-Konstrukt zur Inhibierung der ELIP-Expression zu erstellen, wurde zunächst ein Alignment der Sequenzen der beiden EST-Klone durchgeführt. Die grau unterlegten Nukleotide kennzeichnen die zueinander Homologen. Der Sequenzabschnitt, der für die Herstellung des Konstruktes ausgewählt wurde, ist im *Arabidopsis thaliana elip2* umrahmt.

Durch die Auswahl zweier verschiedener Restriktionsenzyme, die 5'-überstehende Strangenden bilden, konnte in den nachfolgenden Schritten eine kontrollierte Insertion der cDNA in Antisense-Orientierung in den Expressionsvektor pART7 erfolgen. In Abb. 3.34 ist das Ergebnis der PCR dargestellt. Das 672 bp große PCR-Fragment wurde anschließend mit dem GeneCleanII-Kit (Firma Qbiogene) aus dem Gel eluiert.



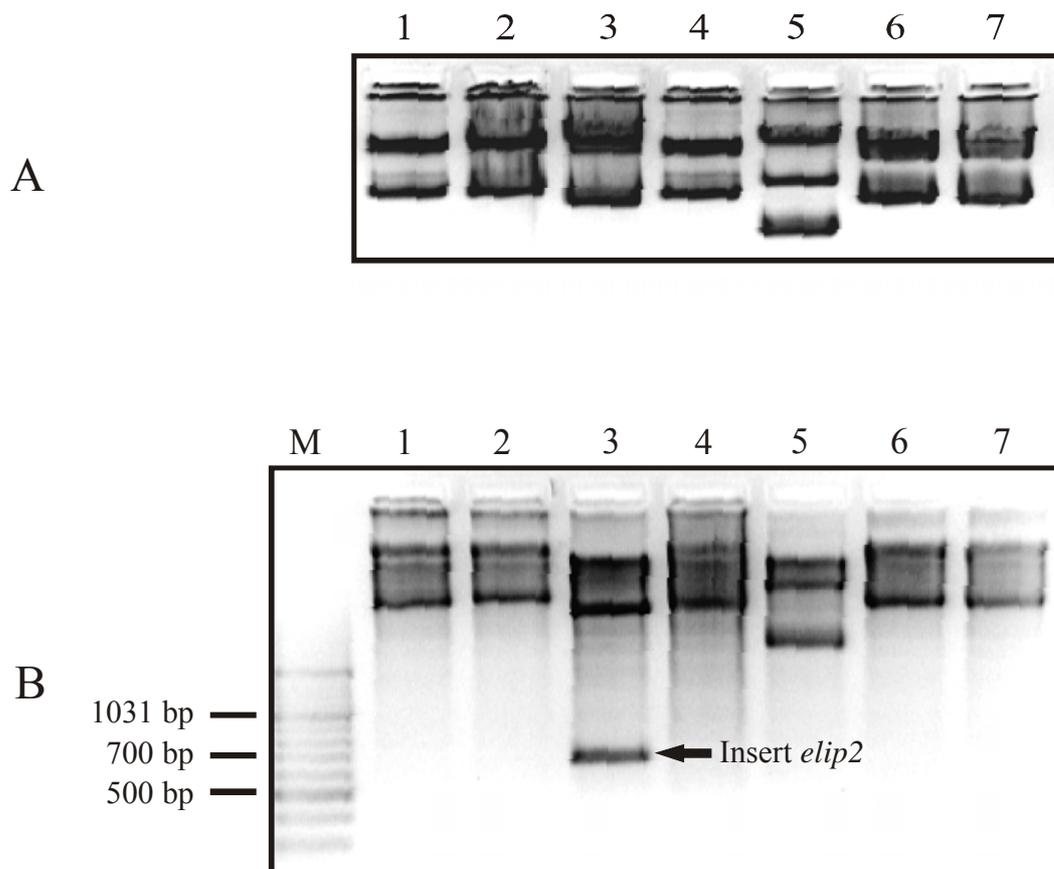
**Abb. 3.34: 1%-iges Agarosegel der amplifizierten Teilsequenz der cDNA von *elip2*.**

Über eine PCR konnte unter Verwendung der beiden Primer „Elip2-fwr“ und „Elip2-rev“ ein 672 bp großes cDNA-Fragment von *elip2* amplifiziert werden, welches an den beiden Strangenden durch Modifikationen der Primer die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* trägt, die der gezielten Klonierung des Fragmentes in Antisense-Orientierung in den Vektor pART7 dienen. Es wurde in dieser Spur 5 µl des PCR-Ansatzes in die Geltasche geladen. In der Spur M wurde 2,5 µl 1 Kb Plus DNA Ladder als Standard aufgetragen und in der Spur N 5 µl des negativen PCR-Ansatzes, der als Template ddH<sub>2</sub>O beinhaltet. Die mit dem Pfeil markierte Bande wurde aus dem Gel eluiert und für die weitere Klonierung verwendet.

### 3.2.1.3. Zwischenklonierung in den Vektor pGEM-T

Es zeigte sich, dass eine direkte Spaltung des amplifizierten PCR-Fragmentes mit den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* und anschließender Klonierung in den Vektor pART7 erfolglos war, da beide Enzyme an den Strangenden nicht vollständig geschnitten haben. Daher wurde die Teilsequenz der cDNA zunächst in den Zwischenvektor pGEM-T (Firma Promega) kloniert. Dieser ist durch die Behandlung mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* innerhalb der MCS linearisiert und durch eine zusätzliche Addition eines Thymidinrestes an beiden 3'-Strangenden charakterisiert. Die in der PCR verwendete *Taq*-Polymerase hängt an die synthetisierten DNA-Fragmente Adeninreste, wodurch eine Klonierung in den Zwischenvektor ermöglicht werden konnte. Nach der Ligation erfolgte die Transformation in *E.coli* DH5α*mc*r und die Anzucht auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin. Da der Vektor pGEM-T das β-Galaktosidasegen

trägt, erfolgte vorab eine Selektion der Kolonien über das Blau-Weiß-Screening durch Zugabe von IPTG und X-Gal auf die Agarplatten. Zur Prüfung der erfolgreichen Insertion des PCR-Fragmentes in den Vektor wurde eine Plasmidisolierung gewachsener und nicht blau gefärbter Kolonien durchgeführt und diese nach einer Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* identifiziert. Das Ergebnis der Plasmidisolierung von 6 Kolonien und des anschließenden Restriktionsendonukleaseverdau ist in der Abb. 3.35 dargestellt. Lediglich die Kolonie 3 trägt das inserierte DNA-Fragment von *elip2* und konnte für die Klonierung in den Vektor pART7 verwendet werden.



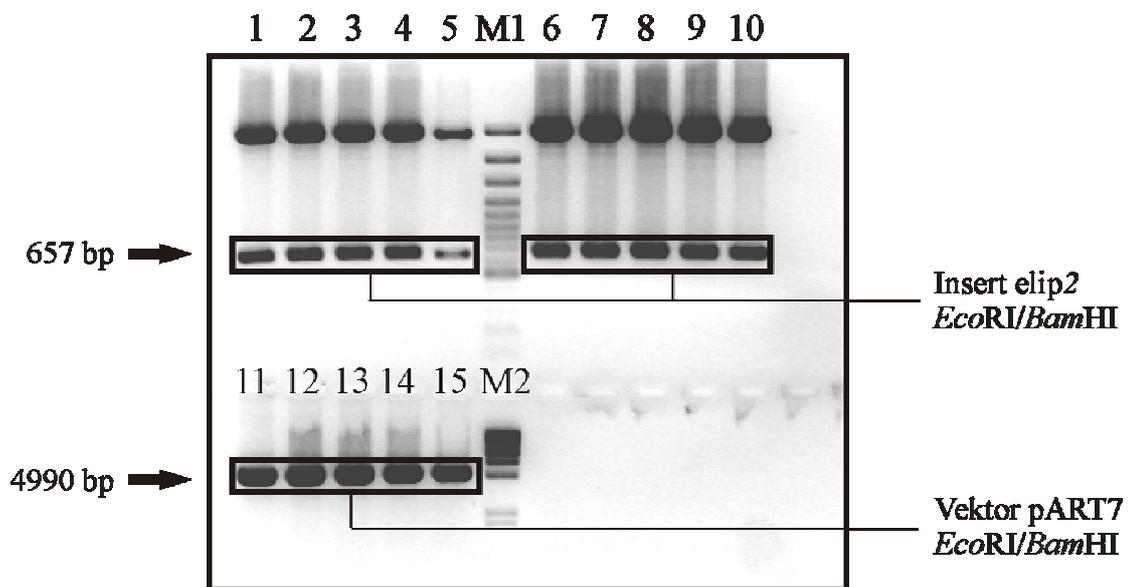
**Abb. 3.35: 1%-iges Agarosegel der Plasmidisolierung gewachsener weißer Kolonien und anschließendem Restriktionsendonukleaseverdau.**

Für die Identifizierung positiv rekombinanter Klone wurden nach einem Blau-Weiß-Screening insgesamt 7 weiße Kolonien von der LB-Agarplatte gepickt und für eine Plasmidisolierung in 10 ml LB-Medium und 100 mg/l Ampicillin über Nacht angezogen. Das Ergebnis der isolierten Plasmide der 7 Kolonien (Spur 1 - 7) ist im Bild A dargestellt, während B den anschließenden Verdau der Plasmide mit den beiden Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* darstellt. Sowohl von der Plasmidisolierung als auch vom Restriktionsendonukleaseverdau wurden jeweils 5  $\mu$ l Probe aufgetragen. Der Pfeil zeigt das aus dem Vektor gesplattene Insert bei etwa 670 bp der Kolonie 3. Als Standard wurde 2,5  $\mu$ l GeneRuler DNA Ladder Mix aufgetragen.

#### 3.2.1.4. Umklonierung in den Vektor pART7

Das in den Zwischenvektor pGEM-T klonierte Teilsegment der *elip2* cDNA wurde anschließend in den Expressionsvektor pART7 in Antisense-Orientierung ligiert, welcher

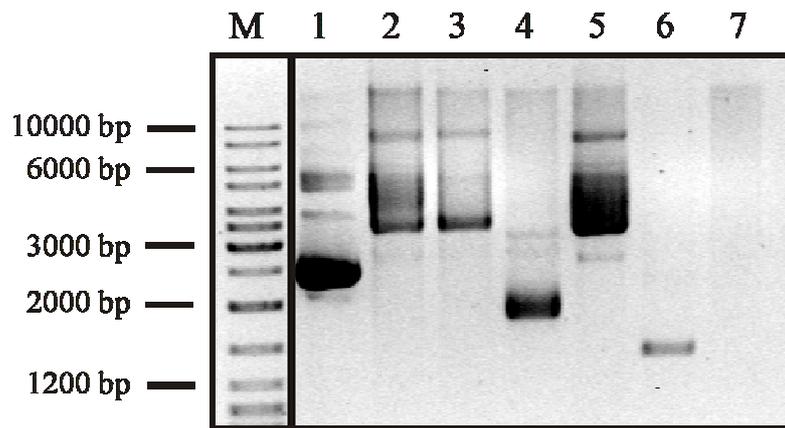
unter Kontrolle des Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotors permanent eine Antisense-RNA exprimiert. Für diese Umklonierung wurde der rekombinante Klon 3 (siehe 3.2.1.2.) ausgewählt. Nach einer Plasmidisolierung und einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* erfolgte die Auftrennung in einem Agarosegel und die entsprechende Bande des Inserts, dessen Größe nach der Spaltung 657 bp betrug, wurde aus dem Gel eluiert (siehe Abb. 3.36). Ebenso wurde auch pART7 mit den beiden Restriktionsenzymen gespalten und nach einer Auftrennung im Agarosegel aus diesem eluiert.



**Abb. 3.36: 1%-iges Agarosegel des Restriktionsansatzes isolierter Plasmide von pART7 und pGEM-T Kolonie 3.**

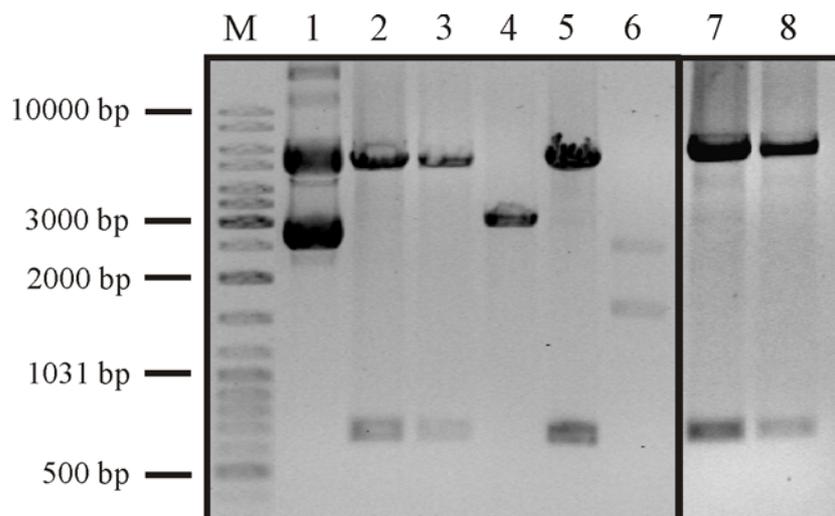
Die Spuren 1 – 10 zeigen das Ergebnis der Plasmidisolierung und einem anschließenden Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* der Kolonie 3 des Zwischenvektors pGEM-T, welcher das Insert *elip2* trägt. Die Bande bei 657 bp stellt das in den Expressionsvektor pART7 zu inserierende Fragment dar. Die Spuren 11 - 15 präsentieren den mit *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Vektor pART7, dessen Größe bei 4990 bp liegt. Je Spur wurden 10 µl des Restriktionsverdaus aufgetragen. Sowohl die Bande, welches das Insert *elip2* darstellt, als auch die Bande des Vektors pART7 wurden aus dem Gel eluiert und für die Ligation verwendet. Als Größenstandards wurden je 4 µl Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (M1) und λ-DNA/HindIII-Fragments (M2) aufgetragen.

Nach anschließender Ligation erfolgte die Elektroporation von *E.coli* DH5α*mc*r und die Kultur auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin. Über Nacht gewachsene Kolonien wurden auf neue Platten vereinzelt und in LB-Flüssigkultur eine weitere Nacht inkubiert. Insgesamt wuchsen 7 Kolonien, die für eine Plasmidisolierung und einem anschließendem Restriktionsverdau verwendet wurden (Abb. 3.37 und 3.38).



**Abb. 3.37: Ergebnis der Plasmidisolierung von pART7/*elip2* in einem 1%-igem Agarosegel.**

Nach der Ligation der Inserts *elip2* mit dem Vektor pART7 und anschließender Transformation in *E.coli* DH5amcr wurden die auf LB-Agarplatten mit 100 mg/l Ampicillin gewachsenen Kolonien vereinzelt und nach Herstellung einer Flüssigkultur in LB-Medium für die Plasmidisolierung verwendet. Insgesamt konnten 7 Kolonien analysiert werden. Die Spuren 1 – 7 zeigen dessen Ergebnis, wobei bei der Kolonie 7 kein isoliertes Plasmid nachgewiesen wurde. Für den anschließenden Restriktionsverdau wurde sie daher nicht verwendet. Aufgetragen wurden 5  $\mu$ l isolierter Plasmide je Spur. Vom Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix wurden 2,5  $\mu$ l aufgetragen



**Abb. 3.38: Ergebnis des Restriktionsverdaus der 7 isolierten Plasmide von pART7/*elip2* in einem 1%-igem Agarosegel.**

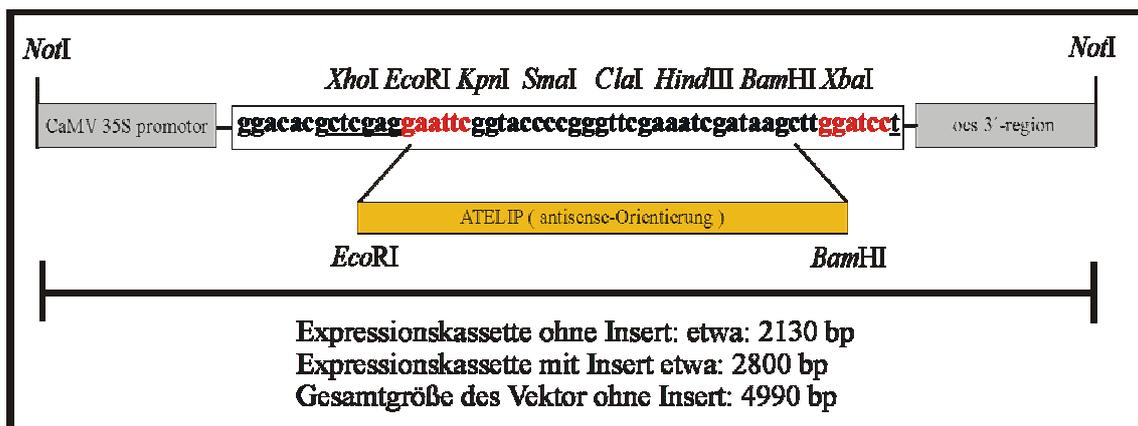
Zur Überprüfung einer erfolgreichen Insertion des Fragmentes *elip2* in den Klonierungsvektor pART7 wurden die isolierten Plasmide mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Bei erfolgreicher Ligation kann ein DNA-Fragment in der Größe von 657 bp nachgewiesen werden. Die Spuren 1 – 6 stellen das Ergebnis der Restriktion der 6 isolierten Plasmide dar (je 5  $\mu$ l). Bei den Kolonien 2, 3 und 5 wurde ein Bande in der gewünschten Größe nachgewiesen. Die Spuren 8 und 9 repräsentieren das Ergebnis eines Doppelverdaus der Plasmide 5 und 2 mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *XbaI*, welche die beiden Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI* flankieren (je 5  $\mu$ l). Als Standard wurde 2,5  $\mu$ l GeneRuler DNA Ladder Mix (M) auf das Gel aufgetragen.

Die Qualität der Plasmidisolierung war unterschiedlich, trotzdem wurden diese für einen Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* verwendet. War die Insertion der cDNA *elip2* erfolgreich, sollte bei der Überprüfung in einem Agarosegel eine

Bande bei 657 bp auftreten. Bei den drei Plasmidisolierungen der Kolonien 2, 3 und 5 war dies der Fall (Abb.3.38).

Zusätzlich musste ausgeschlossen werden, dass das Insert in mehr als einer Kopie in dem Expressionsvektor inseriert wurde. Daher erfolgte ein weiterer Doppelverdau der isolierten Plasmide der Kolonien 2 und 5 mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *XbaI*.

Eine Darstellung der MCS des Expressionsvektors mit den Restriktionsenzymen ist in Abb. 3.39 aufgezeigt. Die Schnittstellen der Enzyme *XhoI* und *XbaI* flankieren die beiden für die Insertion ausgewählten Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI*. Ist die Insertion von nur einer Kopie der cDNA des *elip2* in den Vektor erfolgt, ist das in einem Agarosegel erhaltene DNA-Fragment etwa 665 bp groß. Je nach Anzahl der Kopien in dem Vektor erhöht sich die Größe des DNA-Fragmentes um den Faktor der Kopienzahl. Bei den isolierten Plasmiden der Kolonie 2 und 5 lag eine einfache Insertion der Teilsequenz der cDNA von *elip2* vor. Für die weiteren Klonierungsexperimente wurden die isolierten Plasmide der zweiten Kolonie verwendet.



**Abb. 3.39: Schematische Darstellung der Expressionskassette des Vektors pART7.**

Die Expressionskassette des Vektors pART7 ist charakterisiert durch einen CaMV 35S-Promotor und einer ocs3'-terminalen Region. Die sich in der MCS befindlichen Restriktionsenzyme sind dargestellt. Der Teil der ausgewählten cDNA des *elip2* wurde über die beiden Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* in Antisense-Orientierung in den Expressionsvektor kloniert. Für die Klonierung in einen binären Vektor konnte die komplette Expressionskassette durch eine Spaltung mit *NotI* aus dem Vektor pART7 gewonnen werden.

### 3.2.1.5. Überprüfung der Insertorientierung

Durch die Wahl zweier verschiedener Restriktionsenzyme für die Insertion des Fragmentes der cDNA von *elip2* in den Vektor pART7 konnte eine gezielte Ausrichtung in Antisense-Orientierung durchgeführt werden. Zusätzlich wurden zwei neue Primer für eine PCR ausgewählt, welche die korrekte Ausrichtung der cDNA unterlegt. Dabei wurde der forward-Primer aus dem Bereich des CaMV 35S-Promotors gewählt und der reverse-

Primer innerhalb der Antisense-Sequenz des *elip2*. Erfolgte die Insertion der cDNA in Antisense-Orientierung, so musste bei der PCR ein Fragment in der Größe von etwa 687 bp amplifiziert werden, während in Sense-Orientierung eine DNA-Amplifikation erfolglos bliebe.

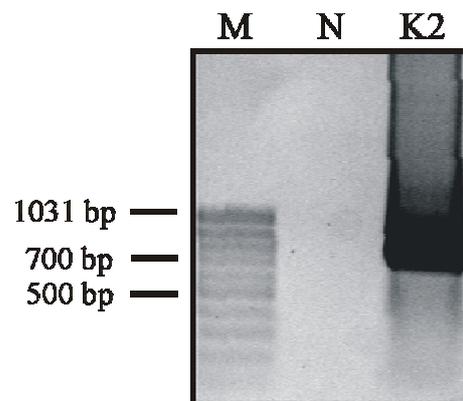
Camv-fwrđ (forward) Primer:

5'- GTGACATCTCCACTGACGTAAGG-3'

Anti-*elip2*-rev (reverse) Primer:

5'- GGCAACAGCATCGTTCAACA-3'

Abb. 3.40 stellt das Ergebnis der PCR zur Überprüfung der Orientierung des Inserts dar. Eine Bande bei der Größe von etwa 700 bp belegt die erfolgreiche Insertion der cDNA von *elip2* in Antisense-Orientierung in den Expressionsvektor pART7.



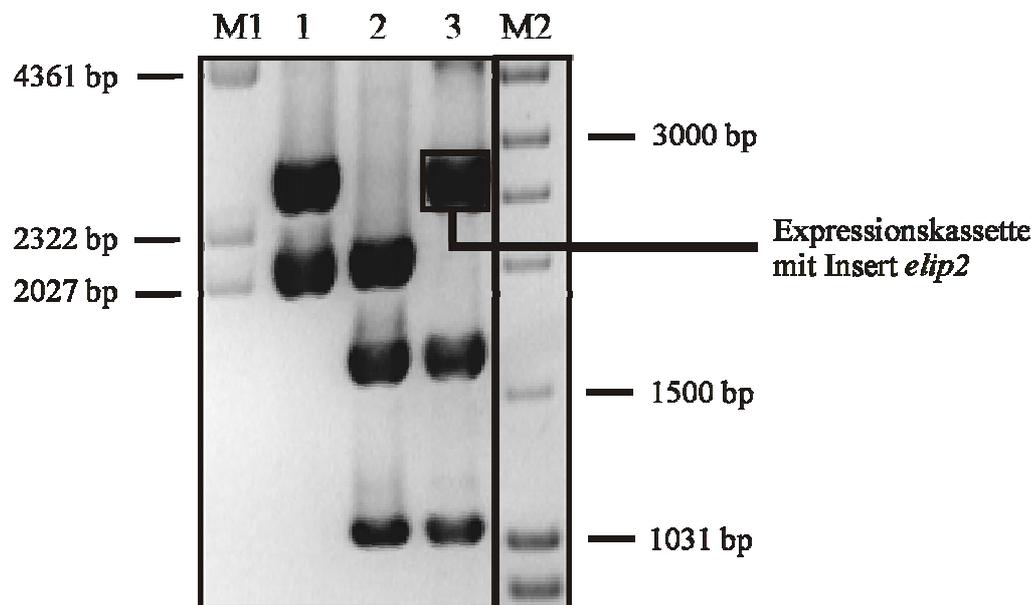
**Abb. 3.40: Agarosegel zur Überprüfung der Insertorientierung**

Die Prüfung der Antisense-Orientierung des in den Expressionsvektors pART7 inserierten DNA-Fragmentes erfolgte mit Hilfe einer PCR. Der forward-Primer wurde dabei aus dem Bereich des Promotors ausgewählt und der reverse-Primer aus dem Insert. Nur bei erfolgreicher Antisense-Insertion der cDNA wird ein PCR-Fragment bei einer ungefähren Größe von 687 bp amplifiziert. Als Größenstandard wurde in dem Agarosegel 2,5 µl des GeneRuler 100 bp DNA Ladder (M) verwendet. In der Spur N wurde 5 µl der Negativkontrolle aufgetragen und in K2 5 µl des Ergebnisses der PCR mit der Kolonie 2.

### 3.2.1.6. Klonierung der Expressionskassette von pART7 in den binären Vektor pBinHygTX

Für die Herstellung doppelt transgener Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* musste die Expressionskassette, welche das Insert trägt, in einen binären Vektor kloniert werden. Dabei musste beachtet werden, dass die bereits transgenen Luteinmutanten eine Kanamycin-Resistenz trugen. Der Vektor pBinHygTX eignete sich für diese Experimente,

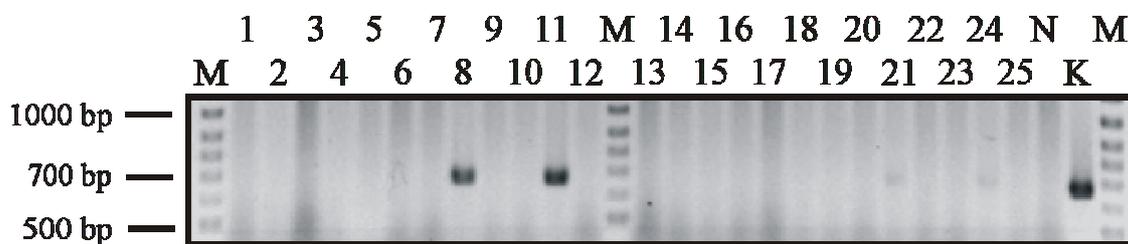
da dieser das Hygromycin-Phosphotransferasegen (*hptII*) trägt, aufgrund dessen erfolgreich transformierte Pflanzen eine Hygromycinresistenz besitzen. Durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *NotI* konnte die vollständige Expressionskassette aus pART7 gewonnen werden. Zusätzlich musste noch ein Restriktionsverdau mit *PvuI* durchgeführt werden, da die Expressionskassette zusammen mit dem Insert eine Größe von etwa 2800 bp aufwies, die ungefähr der des Rückgrats des Vektors entsprach, was dazu führte, dass beide Fragmente in einem Agarosegel unzureichend getrennt wurden. Da das Rückgrat jedoch noch zwei *PvuI*-Schnittstellen aufweist, konnte dieses in insgesamt drei kleinere Fragmente mit den Größen 1669 bp, 1057 bp und 135 bp gespalten werden.. In dem anschließenden Agarosegel konnten nun die einzelnen Fragmente identifiziert und die Expressionskassette aus dem Gel eluiert werden (Ab.3.41)



**Abb. 3.41: Agarosegel zur Gewinnung der Expressionskassette von pART7.**

Nach Insertion der cDNA in den Vektor hat dieser eine Gesamtgröße von 5662 bp. Davon entfallen auf die Expressionskassette 2798 bp und auf den Rückgrat 2864 bp. Letzter kann mit dem Restriktionsenzym *PvuI* in 3 kleinere Fragmente gespalten werden, wodurch die Expressionskassette identifiziert und zur Klonierung in den binären Vektor pBinHygTX aus dem Gel eluiert werden konnte. Die Spur 1 stellt 5  $\mu$ l eines Restriktionsverdaus des leeren Expressionsvektors pART7 mit *NotI* dar. Spur 2 ist das Ergebnis eines Doppelverdaus des nicht-rekombinanten Vektors pART7 mit *NotI* und *PvuI* (5  $\mu$ l). In der dritten Spur wurde 5  $\mu$ l der Plasmidisolierung der zweiten Kolonie nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *NotI* und *PvuI* aufgetragen. Die vollständige Expressionskassette, welche das Insert in Antisense-Orientierung trägt, besitzt eine Größe von etwa 2800 bp und konnte aus dem Gel eluiert werden. Als Marker wurden jeweils 2,5  $\mu$ l  $\lambda$ -DNA/HindIII-Fragments (M1) und Mass Ruler DNA Ladder Mix (M2) aufgetragen

Um die vollständige Expressionskassette in den binären Vektor über eine *Sma*I-Schnittstelle innerhalb der MCS klonieren zu können, mussten die kohäsiven Strangenden der Expressionskassette, die durch ein Restriktionsverdau mit *Not*I entstanden sind, mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase aufgefüllt werden. Die anschließende Insertion in den binären Vektor erfolgte in einer Einschnitt-Klonierung, in welcher die Linearisierung des Vektors pBinHygTX mit *Sma*I zeitgleich mit der Ligation des zu inserierenden Fragmentes erfolgte. Nach einer Transformation in *E.coli* NM522 wurden die auf LB-Agarplatten und 50 mg/l Kanamycin gewachsenen Kolonien über eine PCR charakterisiert und der geeignete Klon ausgewählt. Als Primer dienten hierbei „Camv-fwr“ und „Anti-elip2-rev“. Das Ergebnis ist in dem Agarosegel in Abb. 3.42 dargestellt. Für die weiteren Experimente wurde das isolierten Plasmid der Kolonie 8 verwendet.

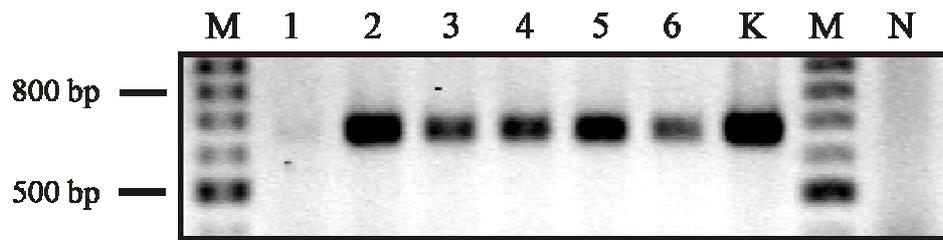


**Abb. 3.42: Ergebnis der Kolonie-PCR zur Identifizierung eines rekombinanten Klones.**

Die gewachsenen Kolonien 1 - 25 wurden über eine PCR analysiert und davon je 5  $\mu$ l in einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt. Die Kontrolle K zeigt die zu erwartende Größe des amplifizierten Inserts (2  $\mu$ l des PCR-Ansatzes), während N 5  $\mu$ l einer Negativkontrolle darstellt. Als Marker M wurde 2,5  $\mu$ l GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus aufgetragen. Das Agarosegel zeigt, dass nur bei den beiden gewachsenen Kolonien 8 und 11 eine Amplifizierung des DNA-Fragmentes erfolgreich war.

### 3.2.1.7. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde abschließend mit Hilfe der Gefrierschocktransformation der rekombinante binäre Vektor pBinHygTX, welcher die Expressionskassette des Vektors pART7 mit der cDNA von *elip2* in Antisense-Orientierung trägt, in den Stamm *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 kloniert. Diesem Stamm wird auch bei der durchgeführten Vakuuminfiltration eine hohe Transformationseffizienz zugeschrieben. Die Auswahl eines geeigneten Klons erfolgte ebenfalls wie in 3.1.1.6. mit einer Kolonie-PCR (Abb. 3.43).



**Abb. 3.43: Ergebnis der Kolonie-PCR der auf Kanamycin gewachsenen Kolonien von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 in einem 1%-igem Agarosegel.**

Um die Kolonien 1 - 14 auf eine erfolgreiche Transformation des binären Vektors zu testen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. In der Spur K wurde ein Kontrollergebnis und in N eine negative Kontrolle aufgetragen. Je Spur wurde 5 µl der Kolonie-PCR aufgetragen. Als Marker M diente hier 2,5 µl Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus.

### 3.2.2. Vakuuminfiltration von *Arabidopsis thaliana* und Saatgutgewinnung

Für die *in planta* Vakuuminfiltration von *Arabidopsis thaliana* wurden jeweils 4 Pflanzen, die in einem Topf mit 10 cm Durchmesser wuchsen, kopfüber in ein mit der Suspension von *Agrobacterium tumefaciens* gefülltes Becherglas getaucht. Dabei war darauf zu achten, dass nur die Blütenstände in die Lösung tauchten. Der Kontakt der Rosettenblätter und der Erde mit der Bakteriensuspension führte dazu, dass die Pflanzen verpilzten. Nach Anlegen eines zweiminütigen Vakuums wurde der Unterdruck ruckartig aufgehoben, was zu einem verstärkten Eintritt der transgenen Bakterien in das Pflanzengewebe führt. Nachdem die transformierten Pflanzen für eine Nacht liegend in einem verschlossenem Plastikbeutel inkubiert wurden, konnten sie am nächsten Tag aufrecht hingestellt werden. Der Plastikbeutel wurde geöffnet, aber erst am darauffolgenden Tag vollständig entfernt. Die zuerst entwickelten Schoten wurden bei der Ernte des Saatgutes ausgeschlossen, da sie zum Zeitpunkt der Transformation zu weit entwickelt waren. Das in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelte Saatgut wurde für eine Woche bei geöffnetem Deckel getrocknet und anschließend steril ausplattiert.

### 3.2.3. Aussaat des gewonnenen Saatguts auf Hygromycin

Nachdem das geerntete Saatgut ausreichend getrocknet wurde, erfolgte die Aussaat auf Selektionsmedium. In den ersten beiden Wochen keimte die überwiegende Zahl Samen. Erst nach der dritten Woche konnten die erfolgreich transformierten von den nur einfach transgenen Pflanzen unterschieden werden. Letztere wurden bräunlich und bildeten ein nur schwach entwickeltes Wurzelwerk aus. Die hygromycinresistenten Pflanzen dagegen waren kräftig grün mit langen Wurzeln. Insgesamt konnten zunächst 19 Pflanzen identifiziert werden, die auf Hygromycin wuchsen. Während die ersten 6 hygromycinresistenten Keimlinge zu einem früheren Zeitpunkt ausplattiert wurden,

konnten bei den nachfolgenden 13 gewachsenen Keimlingen unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl der vorhandenen LB-Agarplatten, auf denen Saatgut ausplattiert wurde, die durchschnittliche Transformationsrate in diesem Experiment festgelegt werden.

Da anhand der gestellten Hypothese davon ausgegangen wurde, einen lichtsensitiven Phänotyp zu erhalten, wurden die LB-Agarplatten bei unterschiedlichen Lichtintensitäten inkubiert. Das Auszählen von 8 LB-Platten ergab dabei eine durchschnittliche Samenzahl von 1000. Daraus ergaben sich von der Lichtintensität abhängige Transformationsraten, die in Tab. 3.3 dargestellt sind. Interessant war dabei, dass weder bei Lichtintensitäten unter  $20 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  noch über  $60 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  hygromycinresistente Pflanzen wuchsen.

Lichtintensität ( $\mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	0 - 19	20 - 29	30 - 39	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70 - 79
Transformationsrate (in %)	0	0,03	0,02	0,04	0,03	0	0

**Tab. 3.3: Ergebnis der ermittelten Transformationseffizienz in Abhängigkeit von der Lichtintensität.**

Das auf LB-Agarplatten ausplattierte Saatgut wurde bei definierten Lichtverhältnissen für insgesamt 3 Wochen angezogen. Durch die Ermittlung der durchschnittlichen Samenzahl auf einer Platte konnte somit eine Aussage über die lichtabhängige Transformationsrate getroffen werden.

Für die Vermehrung durch Kallusgewebe (3.2.4.) wurden die insgesamt 19 hygromycinresistenten Pflanzen auf frisches 1 x MS-Medium gesetzt und bei  $50 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bei  $23^\circ\text{C}$  in einem 12 Std. Licht- / 12 Std. Dunkelrhythmus in der Klimakammer kultiviert.

In den frühen Phasen des Wachstums unterschieden sich dabei die beiden hygromycinresistenten Pflanzen 2 und 14 in ihrem Phänotyp deutlich von den anderen. Während die restlichen kräftig grün erschienen, waren diese beiden Pflanzen anfangs blass grün, was jedoch im Verlauf der Keimlingsentwicklung wieder änderte. Dabei blieb das Wachstum dieser beiden nicht hinter dem der anderen zurück.

### **3.2.4. Kallusvermehrung der hygromycinresistenten Pflanzen von *Arabidopsis thaliana***

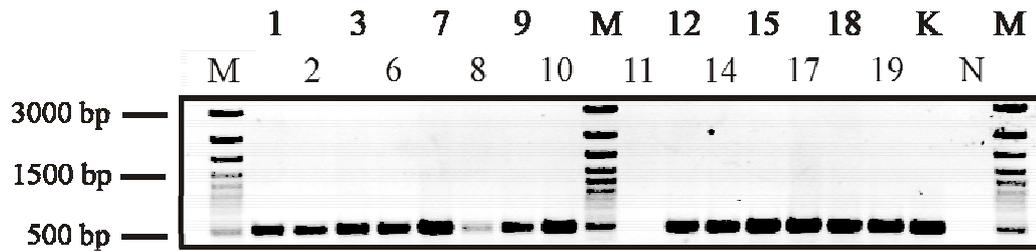
Nach weiteren 2 Wochen waren die hygromycinresistenten Pflanzen so weit entwickelt, dass eine Kallusvermehrung durchgeführt werden konnte. Dafür wurden die Blätter an der Mittelrippe geteilt und auf selektiven kallusinduzierenden Agar (CIM) gelegt. Nach 4

Wochen war an den Schnittstellen eine deutliche Kallusbildung sichtbar und die Blattstücke konnten auf sprossinduzierendes Medium (SIM) überführt werden. Erste Sprosse wuchsen nach etwa 3 Wochen und wurden auf Sprosstreckungsmedium (SEM) gesetzt. Nachdem sich kräftige Sprosse entwickelt hatten, erfolgte eine Weiterkultur auf wurzelinduzierendem Medium (RIM). Wurzeln konnten sich dabei jedoch nur entwickeln, wenn sämtliches Kallusgewebe an den Sprossen entfernt wurde. Trotz des sorgfältigen Entfernens des restlichen Gewebes bildeten sich nicht bei allen Sprossen ein Wurzelwerk. Hinzu kam, dass auch eine Bildung von Saatgut bei den meisten Pflanzen unterblieb. Unter sterilen Bedingungen entwickelte sich, zudem auch nur sehr gering, bei lediglich 4 Mutanten, Nummer 6, 7, 8, und 19 Saatgut. Dieses wurde gesammelt, getrocknet und bei 4°C gelagert.

Ein weiterer Versuch, die Pflanzen, welche Wurzeln ausgebildet haben, zur Saatgutgewinnung auf Erde zu bringen, zeigte keinen Erfolg. Die auf Agar angezogenen Pflanzen wurden aus den Anzuchtbehältern genommen und restlicher Agar an den Wurzeln vorsichtig mit warmen Wasser abgespült. Nach dem Transfer auf Erde wurden die Pflanzen noch für eine Woche unter einer Abdeckhaube angezogen, unter der eine gleichbleibende Luftfeuchtigkeit von 100% gewährleistet bleiben sollte, die der in den Anzuchtbehältern entsprach. Trotzdem starben die auf Erde umgesetzten hygromycinresistenten *Arabidopsis*-Pflanzen ab, bevor sie Saatgut bilden konnten.

### **3.2.5. Überprüfung der auf Hygromycin gewachsenen *Arabidopsis thaliana***

Die auf Hygromycin gewachsenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* wurden im Laufe der Kallusvermehrung auf eine erfolgreiche Insertion der T-DNA des binären Vektors pBINHygTX, welcher *elip2* in Antisense-Orientierung enthält, überprüft. Hierfür reichten bereits 100 mg frisches Pflanzenmaterial zur Minipräparation genomischer DNA. Die isolierte DNA wurde anschließend in einer PCR auf das Vorhandensein des Hygromycinphosphotransferasegens (*hptII*) überprüft, welches in doppelt transgenen Sprossen exprimiert wird, wobei die beiden Primer „HPTII-fwrđ“ und „HPTII-rev“ ausgewählt wurden. Abb. 3.44 zeigt das Ergebnis der PCR in einem 1%-igem Agarosegel. Da bereits in der frühen Phase der Kallusvermehrung 4 Pflanzen abstarben, konnte die PCR zur Überprüfung des Insertionsereignis nur bei 15 durchgeführt werden. Bei 14 von den 15 Mutanten konnte eine Bande, die der Größe der Kontrolle entspricht, nachgewiesen werden. Dagegen fiel bei der Kontrolle, die mit isolierter genomischer DNA einer nicht transgenen Pflanze durchgeführt wurde, wie erwartet negativ aus.

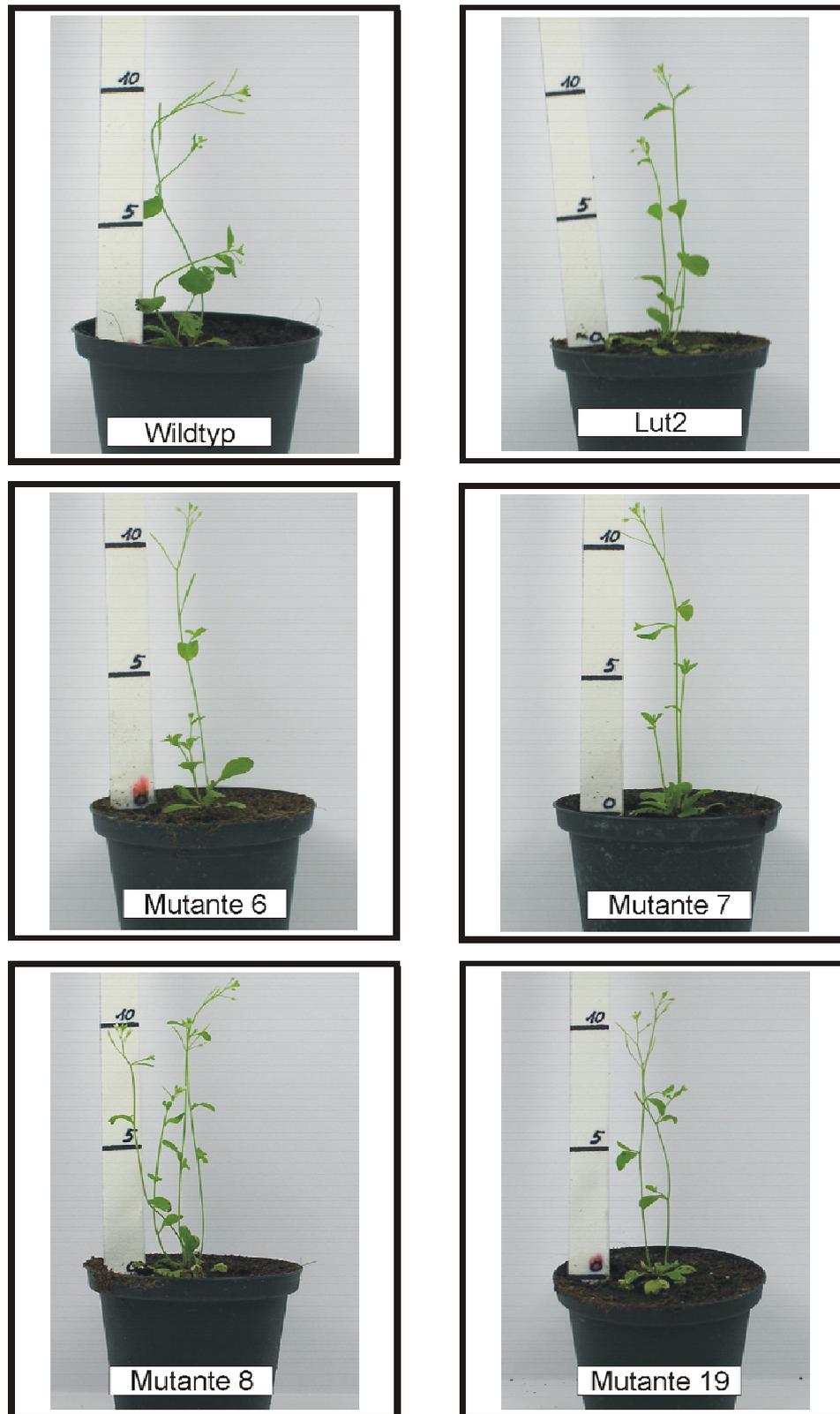


**Abb. 3.44: Ergebnis der PCR zur Untersuchung einer vorhandenen Hygromycin-Resistenz in den Doppelmutanten in einem 1%-igem Agarosegel.**

Pflanzenmaterial der gewachsenen transgenen Doppelmutanten wurde geerntet und die genomische DNA isoliert. Die Überprüfung der erfolgreichen Insertion des Antisense-Konstruktes erfolgte mit Hilfe einer PCR. Hierfür wurden Primer innerhalb des *hptII*-Gens des binären Vektors pBINHygTX ausgewählt, dessen amplifiziertes Fragment bei 492 bp liegt. Als Marker M wurden 4  $\mu$ l des GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus aufgetragen, die Spuren 1 - 15 zeigen das Ergebnis der PCR mit genomischer DNA der auf Hygromycin gewachsenen Pflanzen (je 5  $\mu$ l). In der Spur P wurden 5  $\mu$ l einer Positivkontrolle aufgetragen, während in N das Ergebnis isolierter genomischer DNA einer nicht transformierter Pflanze aufzeigt (5  $\mu$ l).

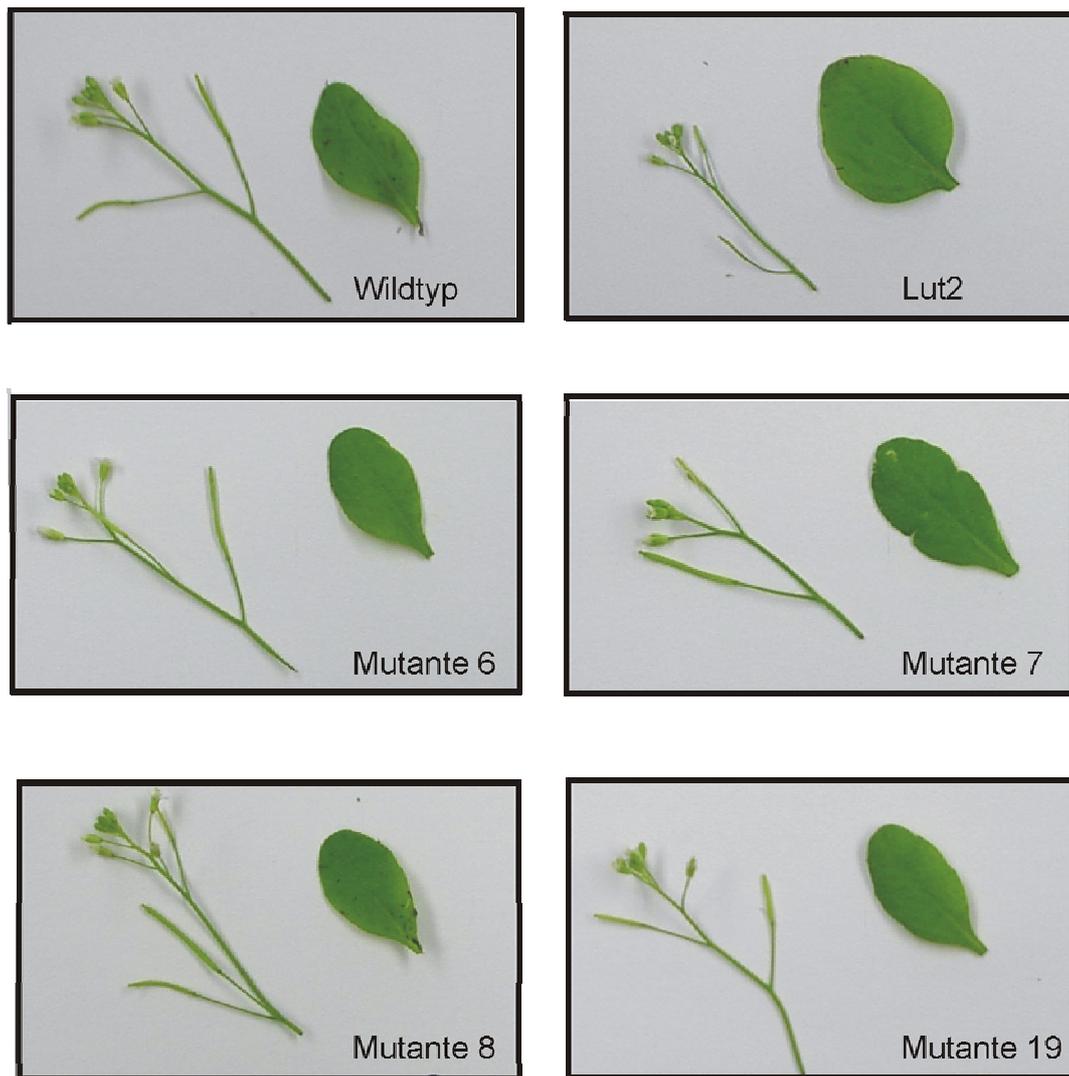
### 3.2.6. Charakterisierung der transgenen Doppelmutanten von *Arabidopsis thaliana*

Zur genaueren Charakterisierung der vier transgenen Doppelmutanten von *Arabidopsis thaliana* wurde die F2-Saat auf selektivem MS-Medium angezogen. Um einen Vergleich durchführen zu können, wurde ebenfalls auch Saatgut des Wildtyps und der Luteinmutante auf MS-Medium ohne Antibiotikum angezogen. Nach etwa 2 Wochen bei 50  $\mu$ mol Photonen $\cdot$ m<sup>-2</sup> $\cdot$ s<sup>-1</sup> in einem 12 Stunden Lichtzyklus hatten die Pflanzen 4 – 5 Blattgenerationen entwickelt, so dass sie auf Erde umgesetzt werden konnten. Die weitere Anzucht erfolgte ebenfalls unter den oben angegebenen Bedingungen in der Klimakammer. Zunächst wurde für die Charakterisierung der Doppelmutanten die phänotypische Ausprägung mit dem Wildtyp und *lut2* verglichen. Bei Betrachtung zahlreicher Pflanzen der F2-Saat ließ sich jedoch kein Unterschied feststellen. Repräsentativ wurden in Abb. 3.45 die Pflanzen gegenübergestellt. Auch bei genauerem Vergleich der Blätter und der Blütenstände ließen sich für die 4 Doppelmutanten keine lichtsensitiven Merkmale feststellen (Abb.3.46)



**Abb. 3.45: Phänotyp von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija.**

Die F<sub>2</sub>-Saat von insgesamt 4 Mutanten wurde parallel zum Wildtyp und zur *lut2*-Mutante auf MS-Medium ausplattiert. Nachdem die Keimlinge 4 – 5 Blattgenerationen gebildet hatten, wurden die Keimlinge auf Erde umgesetzt und bei 23°C angezogen. Anhand der Bilder wird ersichtlich, dass sich hinsichtlich der phänotypischen Ausbildung die Doppelmutanten nicht vom Wildtyp und der Einfachmutante *lut2* unterscheiden.

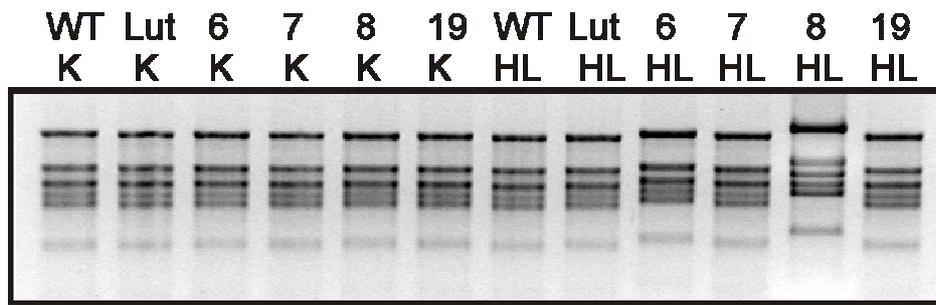


**Abb. 3.46: Detaillierte Darstellung der Blätter und der Blütenstände sowohl der Doppelmutanten als auch des Wildtyps und der *lut2*-Mutante von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija.**

Von den aus Abb. 3.45 dargestellten Pflanzen wurden zur besseren Veranschaulichung die Rosettenblätter und die Blütenstände untereinander verglichen. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Pflanzen festgestellt werden.

Um die Frage nach der Stärke der Inhibierung der ELIP-Expression der 4 Mutanten zu klären, wurde die semiquantitative Analyse der RT-PCR gewählt. Urban (1998) beschrieb bei Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana* während der ersten 6 Std. einer Hochlicht- und Kältestressbehandlung einen transienten Anstieg der *elip*-Expression. Daher wurden auch in diesem Experiment die Pflanzen für 6 Std. bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $10^\circ\text{C}$  inkubiert und Blattmaterial geerntet. Als Kontrollen dienten Pflanzen, die bei  $100 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $23^\circ\text{C}$  wuchsen. Um einen vergleichende Aussage der *elip*-

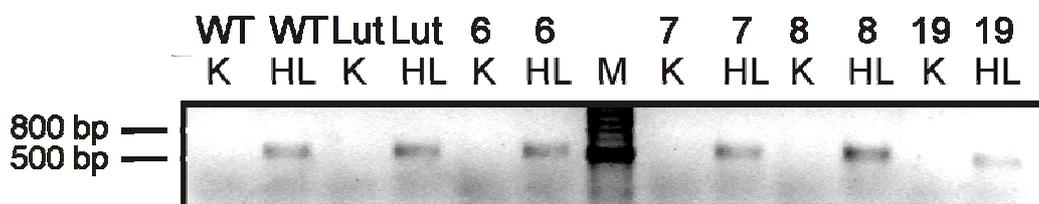
Expressionsstärke treffen zu können, wurden sowohl die Doppelmutanten als auch der Wildtyp und die *lut2*-Mutante analysiert.



**Abb.3.47: Ergebnis der RNA-Isolierung in einem 1,5%-igen denaturierenden Agarosegel.**

Um eine semiquantitative Aussage über den Erfolg der Antisense-Inhibierung der *elip*-Expression treffen zu können, wurden von den vier transgenen Doppelmutanten 6, 7, 8 und 19, dem Wildtyp (WT) und der *lut2*-Mutante (Lut) Blattmaterial geerntet bei 50  $\mu\text{mol}$  Photonen und 25°C (K) sowie nach einer Kälte- und Lichtstressbehandlung von 6 Std. bei 1000  $\mu\text{mol}$  Photonen  $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und 10°C (HL). Von dem gemörsertem Blattmaterial wurde eine Gesamt-RNA Extraktion vorgenommen und anschließend die Konzentration der einzelnen Proben gleichmäßig eingestellt. Je Spur wurde 0,5  $\mu\text{g}$  RNA aufgetragen.

Wichtig für die RT-PCR ist die Verwendung gleicher Mengen an Gesamt-RNA. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die Proben in einem denaturierenden Agarosegel auf ihre Gleichmäßigkeit geprüft (Abb. 3.47). Erst danach konnten die Proben für die RT-PCR eingesetzt werden. Im Anschluss an der Synthese der cDNA konnte das Vorhandensein der *elip*-Transkripte in einer PCR geprüft werden. Hierbei wurden für den Nachweis des *elip1* die beiden Primer „NB-Elip1-fwr“ und „NB-Elip1-rev“ eingesetzt und für das *elip2* „NB-Elip2-fwr“ und „NB-Elip2-rev“. Temperaturoptima für die PCR und die resultierenden Fragmentlängen können der Tabelle 2.5 entnommen werden (2.9.1.). Die Ergebnisse für die beiden Gene sind den Abb. 3.48 und Abb. 3.49 zu entnehmen. Zusammenfassend ist zu erkennen, dass in allen Hochlichtproben der Nachweis des *elip*-Transkriptes positiv verlief.



**Abb. 3.48: Semiquantitative Überprüfung der *elip1*-Expression bei *Arabidopsis thaliana*.**

Für die Überprüfung der Expressionsstärke des *elip1* beim Wildtyp (WT), der *lut2*-Mutante (Lut) und der F2-Saat der 4 Doppelmutanten 6, 7, 8 und 19 wurde die Isolierung von Gesamt-RNA von Blattmaterial durchgeführt, welches bei Kontrollbedingungen (K) bei 50  $\mu\text{mol}$  Photonen  $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und unter Hochlicht- und Kältestress nach 6 Std. bei 1000  $\mu\text{mol}$  Photonen  $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL) geerntet wurde. Nach einer RT-PCR wurde eine PCR zur Amplifizierung der *elip1*-cDNA durchgeführt. Je

Spur wurde 5  $\mu$ l aufgetragen. Als Marker (M) wurde 2,5  $\mu$ l Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus aufgetragen.



**Abb. 3.49: Semiquantitative Überprüfung der *elip2*-Expression bei *Arabidopsis thaliana*.**

Isolierte Gesamt-RNA des Wildtyps (WT), der *lut2*-Mutante (Lut) und der 4 Doppelmutanten 6, 7, 8 und 19 von Blattmaterial, welches unter Anzuchtbedingungen bei 50  $\mu$ mol Photonen $\cdot$ m $^{-2}$  $\cdot$ s $^{-1}$  und 23°C (K) geerntet wurde und von Blattmaterial nach einer 6-stündigen Stressbehandlung bei 1000  $\mu$ mol Photonen $\cdot$ m $^{-2}$  $\cdot$ s $^{-1}$  (HL). Nach einer RT-PCR wurde eine PCR zur Amplifizierung der *elip2*-cDNA durchgeführt. Je Spur wurde 5  $\mu$ l aufgetragen. Als Marker (M) wurde 2,5  $\mu$ l Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus aufgetragen.

Deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern für das *elip1* lassen sich nicht erkennen. Während in den Kontrollen kein *elip* nachgewiesen wurde, tritt unter Hochlicht ein deutliches Signal auf, dass in seiner Stärke zwischen dem Wildtyp der Mutante *lut2* und den drei Doppelmutanten 6, 7 und 8 identisch ist. Lediglich für die Mutante 19 konnte unter Hochlicht ein schwächeres Signal nachgewiesen werden.

Etwas anders sieht das Ergebnis des *elip2* aus. Abgesehen von der *lut2*-Mutante finden sich in allen Proben, auch in den Kontrollen, ein Bande des *elip*-Transkriptes. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass bereits unter Anzuchtbedingungen eine Stressor auf diese Pflanzen wirkte.

## **4. Diskussion**

Photoautotrophe Organismen benötigen Lichtenergie zur Aufrechterhaltung der photosynthetischen Stoffwechselprozesse, die der Assimilation von Kohlenstoffen dienen. Übertrifft jedoch die von den Lichtsammelantennen absorbierte Energie die Kapazität der photosynthetischen Elektronentransportkette, kann durch einen Ein-Elektronentransport sowohl direkt als auch vom angeregten Triplettchlorophyll aus die überschüssige Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff und den daraus resultierenden reaktiven Spezies wie Hydrogenperoxid, Superoxidanion oder Hydroxylradikale können irreversible oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und an der Photosynthese beteiligten Pigment-Proteinkomplexen hervorrufen (Barber und Andersson, 1992; Niyogi, 1999), was letztendlich zu einer Inaktivierung der Reaktionszentren des Photosystem II und zu einer Verringerung der photosynthetischen Kapazität führt (Photoinhibition). Zum Schutz vor oxidativen Schäden haben photosynthetisch aktive Organismen zahlreiche Mechanismen entwickelt, die der Dissipation überschüssiger Lichtenergie dienen.

Eine Involvement der ELIP-Proteine in diese Prozesse wird bereits seit langem diskutiert, jedoch konnte die genaue Funktion der ELIPs und ELIP-ähnlichen Proteine noch nicht geklärt werden. Sie treten sowohl transient während der frühen Phase der Ergrünung etiolierter Keimlinge auf, als auch bei ergrüneten Pflanzen unter der Einwirkung unterschiedlicher Stressoren wie Hochlicht (Adamska und Kloppstech, 1994; Adamska *et al.*, 1992b), UV-A-Strahlung (Adamska, 1995), Methyljasmonatbehandlung (Wierstra und Kloppstech, 2000), Kälte (Montané *et al.*, 1997), Nährstoffmangel (Gruber, 1999), Seneszenz (Binyamin *et al.*, 2001) und Trockenheit (Bartels *et al.*, 1992). Erhöhte Transkript- und Proteinmengen konnten dabei unter dem Einfluss mehrerer Stressfaktoren, wie der Kombination von Kälte und Lichtstress, bei unterschiedlichen Pflanzen wie *Nicotiana tabacum* (Gruber, 1999), *Hordeum vulgare* (Dreyer, 1998) und *Zea mays* (Beyer, unveröffentlicht) nachgewiesen werden. Dabei führt alleine die Verringerung der Temperatur unter Niedriglichtbedingungen zu höheren Transkriptmengen als bei 25°C und hohen Lichtintensitäten (Beyer, unveröffentlicht). Aber auch die Biodiversität verschiedener Kultivare spielt eine wichtige Rolle. Bei *Hordeum vulgare* konnten im Vergleich von mehreren Varietäten aus verschiedenen Ursprungsländern differierende

Signalstärken sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Dreyer, 1998).

Auch den Carotinoiden wird eine Schutzfunktion vor hohen Lichtflüssen zugeschrieben. Obwohl nicht direkt am Prozess der Elektronentransportkette beteiligt, führt eine Hemmung der Biosynthese der beiden Xanthophylle Zeaxanthin und Lutein bei *Chlamydomonas reinhardtii* unter Starklicht zu einem lichtsensitiven Phänotyp (Baroli *et al.*, 2003). Einen ähnlichen Phänotyp konnten Niyogi *et al.* (2001) an der Mutante *npq1lut2* von *Arabidopsis thaliana* nachweisen, die ebenso wie die *npq1lor2* Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in der Synthese des Zeaxanthins und Luteins inhibiert ist. Während die Xanthophylle Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin auch unter moderaten Temperatur- und Lichtbedingungen in den Chloroplasten der Höheren Pflanzen nachweisbar sind, ist Zeaxanthin das einzige Xanthophyll, welches ausschließlich unter Lichtstress im Xanthophyllzyklus durch die De-Epoxidation des Xanthophylls Violaxanthin gebildet wird (Eskling *et al.*, 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Schutz des photosynthetischen Apparates durch die Synthese des Zeaxanthins vor oxidativen Schäden postuliert. Eine Korrelation zwischen der nichtphotochemischen Energielöschung (NPQ) der absorbierten überschüssigen Lichtenergie und der Menge an Zeaxanthin wurde bislang mehrfach beschrieben (Demmig-Adams und Adams, 1992; Pfündel und Bilger, 1994). Demmig-Adams (1996) zeigte, dass die Aktivierung des NPQ sowohl von einem steigenden transmembranen Protonengradienten  $\Delta pH$  innerhalb der Thylakoidmembran, als auch der Zeaxanthinbildung abhängig ist.

Während die De-Epoxidierung des Violaxanthins innerhalb von Minuten nach dem Beginn der Lichtstressbehandlung erfolgt, konnten Havaux und Niyogi (1999) bei Mutanten von *Arabidopsis thaliana* auch langsamere, innerhalb von Stunden ablaufende Adaptationsvorgänge aufzeigen, in die Zeaxanthin involviert ist. Sie fanden heraus, dass ein Fehlen des Zeaxanthins in einer zunehmenden Lipidperoxidation in den Chloroplasten resultiert, was zu der Annahme führte, dass dieses Xanthophyll Thylakoidmembranlipide vor oxidativen Schäden schützt.

Den ELIPs, welche zur stabilen Integration in die Thylakoidmembran Chlorophyll a und Carotinoide benötigen (Adamska *et al.*, 2001), wird eine Rolle als transient unter Hochlicht auftretendem chlorophyllbindenden Protein zugeschrieben. Diskutiert wird eine temporäre Übernahme der während der Reorganisation beschädigter Proteine freiwerdender Chlorophylle. Adamska (1997) formulierte ein Modell, bei dem die ELIP-Proteine einen Komplex mit einer Chlorophyllase bilden, in dem die von den ELIP-Proteinen

übernommenen Chlorophyllmoleküle degradiert werden. Der Nachweis einer Chlorophyllase blieb jedoch bislang aus. Denkbar wäre aber auch die Möglichkeit, dass die in den ELIP-Proteinen stabilisierten Chlorophyllmoleküle für neu synthetisierte Pigment-Protein-Komplexe wiederverwendet werden. Unterstützt werden diese Überlegungen mit Befunden, nach denen eine Korrelation zwischen der Degradation des D1-Proteins und der ELIP-Protein Akkumulation beschrieben wird (Adamska *et al.*, 1992a).

Als eine weitere mögliche Funktion der ELIP-Proteine wird eine Involvierung in der Dissipation überschüssiger Lichtenergie angenommen (Braun *et al.*, 1996; Montané *et al.*, 1997), da Untersuchungen von Adamska *et al.* (1999) zeigten, dass ELIP-Proteine neben Chlorophylle auch Xanthophylle binden können (Adamska *et al.*, 1999). Dabei wird ein Zusammenhang zwischen der Zeaxanthin- und ELIP-Akkumulation in der Thylakoidmembran der Chloroplasten unter Stressbedingungen beschrieben (Krol *et al.*, 1999).

#### **4.1. Untersuchungen zur ELIP-Funktion bei *Vitis vinifera***

Durch die Kreuzdetektion des ELIP-Antikörpers von *Pisum sativum* gegen das ELIP-Protein von *Vitis vinifera* cv. Sultanina war es erstmalig möglich, die ELIP-Akkumulation bei *Vitis vinifera* unter definierten Licht- und Temperaturstressbedingungen zu analysieren. Untersuchungen über die Schutzmechanismen vor Stress bei *Vitis vinifera* treten zunehmend in den Vordergrund. Eine Ursache liegt in dem wachsenden Ozonloch, das zu einer Zunahme der UV-Strahlung führt. Kolb *et al.* (2003) zeigten an Weintrauben eine Veränderung der phenolischen Komponenten unter dem Einfluss von UV-A Strahlung. So konnten sie eine Zunahme an den Flavonoiden Quercetin und Kämpferol in den Trauben in Abhängigkeit von der Strahlungsdauer messen. Die Bildung von Flavonoiden wurde bereits mehrfach als Strategie im Schutz der Blätter vor UV-Strahlung beschrieben (1999; Winkel-Shirley, 2001).

Die Zunahme des UV-Strahlung und der daraus resultierende Anstieg phenolischer Komponenten kann zu einem großen wirtschaftliche Problem führen. Der Grund ist die durch die zunehmenden Phenole verursachte Geschmacksveränderung in den Trauben, die in einer Qualitätsminderung des Weins resultiert. Daher ist besonders die Arbeit an vorhandenen Schutzmechanismen im Wein von großer Bedeutung. Da auch die ELIP-Proteine durch UV-A Strahlung induziert werden (Adamska, 1995), könnte ein Verständnis der Funktion dieser Proteine im Wein helfen, die Probleme der zunehmenden

Phenolgehalte zu verringern. So wären transgene Pflanzen denkbar, die durch eine Verstärkung anderer UV-Schutzmechanismen die Bildung von phenolischen Komponenten reduziert.

Eine hohe wirtschaftliche Bedeutung erlangte die Kulturrebe auch in Chile, wo das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Kultivar *Vitis vinifera* cv. Sultanina angebaut wird. Der Ertrag lag 1997 bei 12,6 to/ha (Quelle: H. Düring, Weinbau in den Tropen und Subtropen, Universität Hohenheim). Ein bevorzugtes Weinanbaugebiet liegt dabei im Valle de Elqui, nahe der Stadt La Serena. Während der Vegetationsperiode von Oktober bis März liegen die durchschnittlichen Tagestemperaturen zwischen 18°C und 22°C (Tab. 4.1), wobei an heißen Tagen Temperaturen bis zu 36°C erreicht werden können (M. Pinto, persönliche Mitteilung). Tagsüber werden mittlere Sonnenstundenzahlen von 7 - 8 Std. erreicht und die Lichtintensitäten können über 2000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  betragen (eigene Messungen vor Ort). Der Anbau von Kulturreben erfolgt bevorzugt an sonnenexponierten Hanglagen, wobei die Reben parallel zum Hang und frontal zur Sonne ausgerichtet werden, um eine möglichst große Laubfläche zu gewährleisten, welche die eingehenden Sonnenstrahlen absorbieren kann.

	JAN	FEB	MAR	APR	MAI	JUN	JUL	AUG	SEP	OKT	NOV	DEZ
<b>Tagestemperatur (in °C)</b>	22	22	20	19	17	16	16	16	17	18	19	20
<b>Nachttemperatur (in °C)</b>	14	15	13	12	10	8	7	8	9	10	12	13
<b>Sonnenstunden / Tag (in Std.)</b>	8	8	7	6	6	5	5	6	6	7	6	8
<b>Regentage / Monat</b>	0	0	0	0	1	2	2	2	1	0	0	0

**Tab. 4.1: Klimatafel der Stadt La Serena, Chile, Quelle: HajoSiewer**

Besonders interessant ist dabei das Verhalten junger Blätter, die sich direkt unter dem Einfluss von hohen Lichtintensitäten entwickeln. Untersuchungen zur ELIP-Expression an *Nicotiana tabacum* (Gruber, 1999), *Hordeum vulgare* (Dreyer, 1998) und *Arabidopsis thaliana* (Urban, 1998) zeigten bereits bei Lichtintensitäten von 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  und Temperaturen von 25°C eine ELIP-Akkumulation. Eine Zunahme

der ELIP-Proteine korreliert mit einem Anstieg der Photoinaktivierung des PS II (Adamska, 1997). Aufgrund dieser genannten Zusammenhänge stellt sich für *Vitis vinifera* die Frage, ob und welche besonderen Schutzmechanismen die Pflanzen vor photooxidativen Schäden entwickelt haben. Zur optimalen Rebenentwicklung ist es sogar notwendig, während der Vegetationsperiode hohe Lichtintensitäten bei langer Sonnenscheindauer zu gewährleisten, was auch die Anordnung der Rebenblätter frontal zur Sonne zeigt. Da für das ELIP-Protein eine Schutzfunktion vor photooxidativen Schäden vermutet wird, soll im Rahmen dieser Arbeit die ELIP-Expression untersucht werden.

Aus diesem Grund wurde zunächst mit Hilfe von Datenbankrecherchen die Evidenz für ein *elip*-Gen geprüft. Da die Sequenz eines EST-Klons aus dem Kultivar Cabernet Sauvignon gefunden wurde, welches in der übersetzten Polypeptidsequenz Bereiche hoher Homologien zu ELIP-Proteinen anderer Spezies ausweist, konnte mit dessen Hilfe die Sequenzierung und anschließende Analyse des *elip*-Gens und dem daraus resultierenden Protein von *Vitis vinifera* cv. Sultanina durchgeführt werden.

#### **4.1.1. Analyse der Genstruktur des *elips* bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina**

Unter Zuhilfenahme der Datenbank „TIGR“ konnten Angaben über einen EST-Klon des Kultivars Cabernet Sauvignon gefunden werden, der zu 68% Homologien zu der Nukleotidsequenz des *elip2*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* aufweist. Ausgehend von diesem Resultat sollte zunächst die *elip*-Genstruktur bei dem Kultivar *Vitis vinifera* cv. Sultanina untersucht werden.

Nach Sequenzierung des aus der genomischen DNA amplifizierten Fragmentes und der aus der RT-PCR gewonnenen cDNA fanden sich für dieses Gen insgesamt 2 Introns, die mit einer Größe von unter 100 bp relativ kurz sind. Auch das *elip*-Gen von *Pisum sativum* besteht aus zwei Introns, die eine kurze Fragmentlänge aufweisen (Kolanus *et al.*, 1987), während beim kleinen *elip* von *Hordeum vulgare* nur ein Intron nachgewiesen wurde (Grimm *et al.*, 1989). Anders sieht es für das *elip1*-Gen von *Arabidopsis thaliana* aus. Dieses besteht aus insgesamt 7 Introns unterschiedlicher Länge, wobei das größte eine Länge von 657 bp und das kleinste eine Länge von 93 bp aufweist (Urban, 1998).

Die aus den Sequenzanalysen resultierende Länge der *elip*-cDNA von *Vitis vinifera* cv. Sultanina ist mit 597 bp um 48 bp größer als das *elip*-Gen des Kultivars Cabernet Sauvignon. Unter Vernachlässigung dieses Einschubs weisen beide Kultivare eine Sequenzähnlichkeit von 97% zueinander auf.

Bioinformatische Methoden ermöglichen, weitere Aussagen über das zu analysierende Gen und dem translatierten Protein zu treffen. Der offene Leserahmen lieferte ein *elip*-Polypeptid mit einer Größe von insgesamt 199 Aminosäuren. Ein multiples Alignment mit bekannten ELIP-Proteinsequenzen lieferte zusätzliche Evidenz, dass es sich bei der sequenzierten DNA um ein *elip*-kodierendes Gen handelt.

Allen ELIP- oder ELIP-ähnlichen Proteinen sind konservierte Domänen gemeinsam, die an der Bindung von Chlorophyll a-Molekülen beteiligt sind (Green und Kühlbrandt, 1995), wobei diese in den Helices I und III lokalisiert sind (Green und Kühlbrandt, 1995). Weder in der zweiten Helix noch im C-terminalen Bereich finden sich chlorophyllbindende Domänen.

Hohe Homologien des Translationsproduktes von *Vitis vinifera* cv. Sultanina zu bekannten ELIP-Proteinen anderer Spezies fanden sich in den Bereichen, die als transmembrane Domänen identifiziert wurden. Besonders auffällig sind dabei die konservierten Motive „GPAPERINGLAM“ der ersten Helix und „WNGR“ sowie „AMLGL“ der dritten Helix.

Nach den Angaben von Adamska (1997) lassen sich innerhalb der ersten Helix das Glu (E) in Position 91 und das Asn (N) in Position 94, sowie das Asn der Position 175 und das Glu der Position 172 der dritten Helix als mögliche Chlorophyllbindungsstellen ableiten.

Die Southern-Blot-Analyse sollte Aufschluss über die Anzahl der *elip*-Kopien im Genom von *Vitis vinifera* cv. Sultanina geben. Da die Sequenz der genomischen DNA bekannt war, konnten Restriktionsenzyme gewählt werden, die mit Sicherheit außerhalb des Gens schneiden. Die Quantifizierung brachte jedoch keine überzeugenden Ergebnisse. Die mehrfachen Wiederholungen mit verschiedenen Sonden, die sich in ihrer Größe unterschieden, lieferten gleiche Resultate. Besonders signifikant ist jedoch das Auftreten einer Bande bei etwa 3 kb der mit *Hind*III gespaltenen genomischen DNA, die aufgrund der Signalstärke und –breite auch aus 2 *elip*-Kopien resultieren kann. Deutlich wird jedoch, dass die Anzahl der *elip*-Kopien im Genom nicht der von *Hordeum vulgare* entspricht (Dreyer, 1998).

Das Expressionsverhalten des *elips* wurde bei unterschiedlichen Lichtbehandlungen in Northern-Blot Experimenten quantifiziert. Während unter der Verwendung der *elip*-cDNA-Sonde aus *Vitis vinifera* cv. Sultanina in der isolierten Gesamt-RNA der Kontrollpflanzen kein Transkript nachgewiesen wurde, trat nach einer 6-stündigen Hochlichtbehandlung ein starkes Signal auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit den erhaltenen Resultaten anderer Höheren Pflanzen, die einen transienten Anstieg des *elip*-Transkriptes

unter dem Einfluss von Lichtstress beschreiben (Adamska *et al.*, 1992; Pötter und Kloppstech, 1993).

#### **4.1.2. Abhängigkeit der Induktion des ELIP-Proteins und der Pigmentzusammensetzung von variierenden Licht- und Temperaturverhältnissen**

Als Kulturpflanze, die in sonnenexponierten Regionen angebaut wird, wurde das Verhalten der ELIP-Expression und die Pigmentzusammensetzung bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina untersucht. Dabei sollte die Veränderung der Expressionsstärke des Proteins und die Änderung der Pigmente in Laborversuchen bei definierten Licht- und Temperaturbedingungen untersucht werden. Die Unterteilung in die Gruppen der jungen (1 – 4) und alten (6 - 10) Blätter erfolgte nach den Ergebnissen, die bei der Charakterisierung der einzelnen Blätter 1 – 10 erzielt wurden (3.1.1.).

Sowohl im Hochlichtexperiment bei 24 Std. Dauerlicht als auch im 12 Std. Licht / 12 Std. Dunkelrhythmus konnte eine wesentlich stärkere ELIP-Akkumulation bei der Gruppe der jüngeren Blätter im Vergleich zu den älteren nachgewiesen werden. Auch in den Analysen der Pigmentzusammensetzungen ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Blattgruppen erkennen. Sowohl die Gehalte der beiden Chlorophylle a und b als auch die der Carotinoide Neoxanthin, Lutein und  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Carotin sind in den Blättern 6 – 10 deutlich erhöht, wobei Unterschiede von über 50% auftreten können, wie beispielsweise für Neoxanthin in Blattextrakten von Weinblättern, die für 24 Std. bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden. Dagegen liegt der Gehalt an Zeaxanthin und Antheraxanthin in den Blattextrakten der ersten 4 Blätter nach einer 24-stündigen Lichtstressbehandlung höher im Vergleich zu den älteren Blättern. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen der Blättercharakterisierung. Auch dort wurden mit zunehmendem Blattalter erhöhte Pigmentwerte gemessen. Eine Ausnahme bildete dabei das Xanthophyll Zeaxanthin, welches lediglich in den ersten 4 Blättern in detektierbaren Mengen auftrat.

Eine Abhängigkeit der ELIP-Expressionsstärke vom Entwicklungsstadium eines Blattes konnte schon bei Untersuchungen an der Gerste beschrieben werden (Dreyer, 1998). Dabei erfolgte eine Unterteilung der Primärblätter in 4 Segmente, wobei das basale Segment die entwicklungsgeschichtlich jüngsten und das apikale die ältesten Zellen eines Blattes darstellen. Eine deutlich stärkere Akkumulation des ELIPs fand sich in den basalen Regionen der Blätter. Die Abhängigkeit der Induktionsstärke vom Entwicklungsstadium der Blätter zeigte sich auch nach einer Akklimatisierung an Licht- und Kältestress

(Montané *et al.* 1997, Pötter und Kloppstech, 1993). Die LHCII-Proteine traten in ihrer Akkumulationsstärke im Vergleich zu den ELIP-Proteinen gegenläufig auf.

Diese Ergebnisse können sinngemäß auf die Resultate der ersten 10 Blätter eines Triebes von *Vitis vinifera* cv. Sultanina übertragen werden.

Das entscheidende Ergebnis dieser Hochlichtexperimente war die signifikant stärkere ELIP-Akkumulation bei jungen Weinblättern, die für 24 Std. im Dauerlicht bei  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und  $25^\circ\text{C}$  inkubiert wurden, im Vergleich zu den kälte- und hochlichtbehandelten jungen Blättern. Gleiche Resultate lieferten auch die Lichtstressbehandlungen mit *Vitis vinifera* in einem 12 Std. Lichtzyklus über insgesamt 4 Tage. Die stärksten ELIP-Akkumulationen wurden in den Gesamtproteinextrakten der Pflanzen nachgewiesen, die bei  $25^\circ\text{C}$  und Hochlicht inkubiert wurden. Während in der Western-Blot Analyse zum Zeitpunkt  $t_0$  des ersten Messtages bei den  $25^\circ\text{C}$  lichtstressbehandelten Proteinextrakten ein starkes Signal auftrat, war keine ELIP-Bande bei den Pflanzen erkennbar, die bei  $10^\circ\text{C}$  und Hochlicht inkubiert wurden. Erste Signale bei den in der Kälte behandelten Pflanzen traten erst im Verlauf dieses Messtages auf. Eine genaue Quantifizierung der Expressionsstärke kann jedoch nur über Verdünnungsreihen in nachfolgenden Experimenten ermittelt werden. Deutlich wird aber, dass die bei zuvor untersuchten Pflanzen beobachtete synergistische Wirkung der beiden Stressoren Licht und Kälte unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden konnte. Das erst deutlich spätere Auftreten der ELIP-Proteine in der Kälte zeigt sogar, dass eine gegenteilige Beobachtung gemacht wurde.

Gleiche Resultate lieferten auch die Analysen der Pigmentzusammensetzungen. Stärkste Zeaxanthinakkumulationen traten bei Blättern von Pflanzen auf, die für 24 Std. bei  $25^\circ\text{C}$  und  $1000 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  inkubiert wurden, während der Violaxanthingehalt abnahm (Abb. 3.42). Dementsprechend lag der Wert für den „epoxidation state of the xanthophyll pool“ (EPS-Wert) der bei  $25^\circ\text{C}$  und lichtstressbehandelten Pflanzen niedriger als bei  $10^\circ\text{C}$ . Bei den Kontrollblättern konnte, wie erwartet, unter den moderaten Licht- und Temperaturbedingungen weder ELIP noch Zeaxanthin nachgewiesen werden.

Das transiente Auftreten des ELIP-Proteins ergrünter Pflanzen unter plötzlichen Lichtstress (Adamska *et al.*, 1992) und während der Akklimatisierung an hohe Lichtflüsse (Lindahl *et al.*, 1997) korreliert mit einer Photoinaktivierung des PSII, dem Abbau des D1-Proteins und einer Änderung der Pigmentzusammensetzung (Adamska *et al.*, 1993). Da dem ELIP-Protein ein photoprotektiver Schutz vor hohen Lichtflüssen zugesprochen wird und dessen Auftreten mit der Synthese des Zeaxanthins durch die De-Epoxidation des Violaxanthins

im Xanthophyll-Zyklus korreliert (Krol *et al.*, 1995), welches der Dissipation überschüssiger Lichtenergie dient, wurden beide Faktoren in dieser Arbeit ermittelt und die Ergebnisse gegenübergestellt.

Es stellt sich hier die Frage, aus welchen Gründen ein synergistischer Effekt der beiden Stressfaktoren Kälte und Licht nicht auftritt. Während beispielsweise bei *Nicotiana tabacum* (Gruber, 1999) und *Hordeum vulgare* (Dreyer, 1998) die Kombination von Kälte und Lichtstress zu massiven Proteinakkumulationen führt, konnte bei *Vitis vinifera* eine Verringerung der Akkumulationsstärke in der Kälte unter Hochlicht nachgewiesen werden. Eine Synthese der unter Hochlicht beschädigten D1-Proteine Höherer Pflanzen nimmt in der Kälte stark ab. Als Ursache wird die deutliche Verlangsamung der D1-Proteolyse bei niedrigeren Temperaturen gesehen (Aro *et al.*, 1990). Dies hat unter länger andauernden Stressbedingungen eine Zunahme der Photoinhibition und eine Abnahme der Netto-Photosyntheseleistung zur Folge. Dagegen konnte an Weinpflanzen nachgewiesen werden, dass unter Feldbedingungen in der Kälte gewachsene Pflanzen nur einen sehr geringen Verlust der Netto-Photosyntheserate, gemessen an der Chlorophyllfluoreszenz, durch Photoinhibition besitzen (Chaumont *et al.*, 1997; Flexas *et al.*, 1999; Hendrickson *et al.*, 2003).

Chaumont *et al.* (1995) fanden bei Untersuchungen an *Vitis vinifera* heraus, dass über einen längeren Zeitraum bei Kälte und hohen Lichtflüssen 80% des ursprünglichen D1-Pools erhalten bleibt. Diese Resultate gaben Grund zu der Annahme, dass die Kapazität der Neusynthese des D1-Proteins bei diesen Pflanzen unter Stressbedingungen beträchtlich höher ist als bei anderen C3-Pflanzen, oder die Photosynthese reduziert ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen analysierten Hendrickson *et al.* (2004) die Faktoren, die am Schutz der Blätter von *Vitis vinifera* vor Photoinhibition unter Stressbedingungen beteiligt sind. Wie auch bei anderen Höheren Pflanzen nachgewiesen, nimmt bei den Weinblättern die Stärke des NPQ mit absinkender Temperatur zu. Unter der Annahme, dass Zeaxanthin in diesen Prozess involviert ist, wäre eine stärkere Zeaxanthinakkumulation und basierend auf der Arbeitshypothese eine Akkumulation des ELIP-Proteins in der Kälte anzunehmen.

Hendrickson *et al.* (2004) ermittelten ebenfalls eine stärkere Photoinaktivierung des PSII bei verringerten Temperaturen, die jedoch in ihrem Ausmaß im Vergleich zu anderen Spezies wie Bohne (Pätsikkä *et al.*, 1998), Kürbis (Tyystjärvi und Aro, 1996) und Erbsenblättern (Park *et al.*, 1995) reduziert ist.

Eine wichtige Funktion zum Schutz vor Photoinaktivierung des PSII wird dabei dem vergleichsweise hohen D1-Protein Pool auch bei niedrigen Temperaturen zugeschrieben

(Hendrickson *et al.*, 2004). Dies ist insoweit interessant, als dass in verschiedenen Veröffentlichungen mehrfach die Verlangsamung des D1-Reparaturprozesses bis hin zu einer Inhibierung bei verringerten Temperaturen beschrieben wurde (Aro *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1999; Salonen *et al.*, 1998).

Obwohl diese Arbeiten eine stärkere Kältetoleranz der Weinblätter gegenüber anderen Höheren Pflanzen beschreiben, erklärt das noch nicht die massive Akkumulation des ELIP-Proteins und des Zeaxanthins unter moderaten Temperaturen und Hochlicht. Auch Hendrickson *et al.* (2004) zeigten eine deutlich stärkere nichtphotochemische Energielöschung bei *Vitis vinifera* unter der Kombination der beiden Stressoren Hochlicht und Kälte.

Zunächst stellt sich die Frage, ob *Vitis vinifera* cv. Sultanina an andere Temperaturen adaptiert ist, da diese im Anbaugebiet „Valle de Elqui“, Chile, an wolkenlosen heißen Tagen auf über 36°C ansteigen. Die Untersuchungen an Weinblättern wurde in den zitierten Veröffentlichungen an den Kultivaren Riesling, Müller-Thurgau, Dornfelder und Gordot durchgeführt (Flexas *et al.*, 1999; Hendrickson *et al.*, 2004; Ortoidze und Düring, 2001). Aber auch hier werden in Feldversuchen Temperaturen von über 30°C beschrieben. Untersuchungen an Varietäten der Gerste deuteten bei verschiedenen Ursprungsstandorten auf differierende Schwellenwerte hin, die für die Induktion von licht- und kälteinduzierte Prozesse in der Gerste verantwortlich sind (Dreyer, 1998). Bei dem turkmenischen Wildtyp ließ sich dabei schon bei sehr viel geringeren Stressbedingungen eine höhere ELIP-Antwort als in anderen Varietäten nachweisen. Aufgrund der hohen Temperaturschwankungen von mehr als 20°C, die diese Varietät innerhalb eines Tagesablaufes ausgesetzt ist, ließ dies in Bezug auf die Ausbildung von Schutzmechanismen ein erhöhtes Maß an Flexibilität vermuten. Trotzdem konnte auch hier wiederum ein deutlich stärkeres ELIP-Signal bei Kälte und Hochlicht im Vergleich zu den Pflanzen gemessen werden, die bei 25°C im Hochlicht inkubiert wurden. Dabei wird anhand der Lufttemperaturdaten des Standortes des turkmenischen Wildtyps (Dreyer, 1998) ersichtlich, dass dieser Wildtyp bei maximalen Tagestemperaturen bis zu 46°C wächst. Daraus resultiert, dass die turkmenische Gerstenvarietät an ihrem natürlichen Standort weit höheren Temperaturen ausgesetzt ist als das hier untersuchte Kultivar *Vitis vinifera* cv. Sultanina.

Des weiteren stellt sich die Frage, ob eventuell ein weiterer Stressor nur bei den unter Hochlicht in der Wärme behandelten Weinpflanzen synergistisch mit dem Faktor Licht wirkt, der eine deutlich höhere ELIP-Akkumulation hervorruft als die beiden

Stressfaktoren Licht und Kälte. Da Hendrickson *et al.* (2004) *Vitis vinifera* eine stärkere Kältetoleranz zugeschrieben hat, könnte eine verzögerte ELIP-Akkumulation bei niedrigeren Temperaturen dieses Expressionsmuster hervorrufen.

Eine Möglichkeit könnte ein unter Wasser und Hochlicht erniedrigtes Wasserpotential darstellen. Flexas und Medrano (2002) zeigten, dass bereits milde Trockenheit einen negativen Effekt auf die photochemischen Stoffwechselprozesse ausübt. Bei extremen Wassermangel führe dies sogar zu einer Verstärkung der Photoinhibition. Es wurde bereits eine negative Auswirkung des Wassermangels auf die Photosynthese, das Pflanzenwachstum, die Fruchtgröße und den Ertrag bei *Vitis vinifera* beschrieben (Liu *et al.*, 1978; Schultz und Matthews, 1988; Schultz und Matthews, 1993; Winkeln und Rambal, 1993; Delgado *et al.*, 1995; Flexas *et al.*, 1998; Flexas *et al.*, 1999). Ob dieser auch einen Einfluss auf die ELIP-Akkumulation bei *Vitis vinifera* hat, wurde noch nicht beschrieben. Einen positiven Effekt auf die *elip*-Transkription zeigten dagegen Untersuchungen zur Wassermangeltoleranz von *Helianthus annuus* (Ouvrard *et al.*, 1996). Die Inkubation eines trockenheitstoleranten Genotyps (R1) bei Wasserstress führte zu der Expression von *elip*-Transkripten.

Ein weiteres ELIP-ähnliches Protein, welches unter Wassermangel induziert wird, stellt das Dsp-22 („desiccation-induced protein“) aus *Craterostigma plantagineum* dar. Dieses ist jedoch im Vergleich zu den anderen Trockenstress-induzierten Genen strikt lichtreguliert. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente lassen dagegen keinen Wassermangel der Weinpflanzen vermuten, da die durch höhere Temperaturen hervorgerufene zunehmende Transpirationsrate mit regelmäßiger Bewässerung ausgeglichen wurde.

Unter natürlichen Standortbedingungen könnte eine aus Trockenheit resultierende Induktion des ELIPs jedoch nicht ausgeschlossen werden. Bei Betrachtung der oben angegebenen Klimadaten wird gerade während der Vegetationsperiode von Oktober bis April deutlich, dass die Niederschlagsmenge gegen Null geht, während eine Sonnenscheindauer bis zu 8 Std. erreicht wird. Daraus wird ersichtlich, dass der Wein aufgrund seines Standortes sehr tolerant gegenüber Trockenheit sein müsste. Für nächste Experimente wäre es interessant, Blattmaterial aus Feldversuchen auf das Vorhandensein von ELIPs zu prüfen. Werden dabei sowohl Blätter gesammelt, die oben auf dem Kronendach frontal zur Sonne exponiert sind, als auch Blätter, die sich unterhalb dessen im Schatten befinden, könnte eine Aussage über die ELIP-Induktion beim Wein unter verschiedenen Stressbedingungen getroffen werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob weitere Stressoren existieren, die für ein Expressionsmaximum der ELIPs bei 25°C verantwortlich sein könnten, jedoch einen geringeren Einfluss in der Kälte haben. Nährstoffmangel, wie er bei der Grünalge *Dunaliella bardawil* (Lers *et al.*, 1991) oder *Nicotiana tabacum* (Gruber, 1999) durch Anzucht auf sulfatarmen Medium erzeugt wurde, führte auch unter Niedrigtemperaturbedingungen zu einer stärkeren ELIP-Akkumulation unter Hochlicht.

Eine genaue Ursache für die im Gegensatz zu anderen Pflanzen aufzuweisende massive ELIP- und Zeaxanthinbildung bei moderaten Temperaturen und hohen Lichtflüssen ist dabei nicht zu finden. Erste Experimente zur Transkription der *elip*-mRNA zeigten interessanterweise bei Temperaturen von 10°C und Lichtintensitäten von 1000  $\mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  ein deutliches Signal, welches nach ersten Erkenntnissen ähnlich oder sogar höher liegen könnte als bei 25°C und hohen Lichtintensitäten.

Diese massiven Unterschiede zwischen der mRNA-Transkription und der Proteinakkumulation deuten auf eine posttranskriptionelle Regulation hin. Dabei stellt sich die Frage, wie es zu einer Verminderung der ELIP-Anhäufung in der Kälte kommen kann. Untersuchungen an *Pisum sativum* zeigten eine stärkere Zunahme der ELIP-Proteine in der Kälte und Hochlicht im Vergleich zu höheren Temperaturen (Adamska *et al.*, 1996). Die Ursache wird in einer in der Thylakoidmembran assoziierten ELIP-Protease des Serin-Typs mit einer apparenten Molekülmasse von 65kDa vermutet. In die Aktivierung der Protease scheint der unter Hochlichtbedingungen aufgebaute transmembrane Protonengradient involviert zu sein. Die ELIP-Protease ist stark temperaturabhängig. Unter 20°C und über 30°C erfolgt eine reversible Inaktivierung, was zu einer Akkumulation der ELIP-Proteine in der Kälte führt (Adamska *et al.*, 1996).

Auch wenn bei niedrigen Temperaturen eine verringerte Translationsrate vorliegt, so wäre aufgrund einer Inaktivierung der Protease ein Anstieg des ELIP-Proteins zu erwarten gewesen, der sich früher abzeichnet als am dritten Messtag.

Gegen die Annahme der verzögerten Translation sprechen auch bereits erwähnte Befunde, nach denen die ELIP-Akkumulation in der Thylakoidmembran mit dem Ausmaß der Degradation des D1-Proteins korreliert. Jedoch konnte auch bei *Vitis vinifera* eine stärkere Degradation des D1-Proteins in der Kälte unter Hochlicht im Vergleich zu den unter Hochlicht und 26°C kultivierten Pflanzen beschrieben werden (Hendrickson *et al.*, 2004). Eine Anhäufung des ELIP-Proteins bei 25°C und hohen Lichtintensitäten wäre also daher nicht zu erwarten gewesen. Da aber die Autoren wie Hendrickson *et al.* (2004) Untersuchungen zur D1-Degradation an anderen Kultivaren durchgeführt haben, wären

nachfolgende Experimente über das Verhalten speziell des Kultivars *Vitis vinifera* cv. Sultanina im Rahmen der D1-Degradation interessant.

Die hier ermittelten Ergebnisse an *Vitis vinifera* cv. Sultanina führen zu den Annahme, dass in diesen Blättern andere, eventuell auch zusätzliche Schutzmechanismen existieren, die bei niedrigen Temperaturen in den Vordergrund treten, so dass eine signifikante Akkumulation des ELIP-Proteins und des Zeaxanthins zunächst unterbleibt. Diese würden auch eine verstärkte Kältetoleranz und den relativ hohen D1-Pool des Weins erklären. Zur Klärung der Frage bietet es sich an, neben dem Auftreten des ELIP-Proteins auch die Akkumulation des Transkriptes in einem Langzeitexperiment zu bestimmen. Wäre es möglich, dass sich das Expressionsmuster über 4 Tage hinaus deutlich verschiebt, so dass doch noch eine stärkere Akkumulation des ELIP-Proteins in der Kälte nachzuweisen ist? Dies würde ja darauf hindeuten, dass bei niedrigeren Temperaturen andere Schutzmechanismen in den Vordergrund treten. Wenn davon ausgegangen wird, dass bei niedrigeren Temperaturen und Hochlicht beim Wein weitere Schutzmechanismen vor photooxidativen Schäden auftreten, so ist jedoch unter Beachtung unserer Arbeitshypothese interessant, dass sich sowohl das Expressionsmuster der ELIP-Proteine als auch die Zeaxanthinbildung im Vergleich zu den Ergebnissen bei *Hordeum vulgare* und *Nicotiana tabacum*, aber auch bei anderen Spezies Höherer Pflanzen, unterscheiden. Dieses Ergebnis bietet eine weitere Evidenz für den Zusammenhang zwischen dem ELIP und dem Zeaxanthin. Wären sie wirklich unabhängig voneinander reguliert, so hätte man auch ein differierendes Bild der Antwort auf Lichtstress erhalten können. Zwar kann der Zusammenhang nicht direkt belegt werden, jedoch sind die vorliegenden Ergebnisse derart, dass die Hypothese der Zeaxanthinbindung auch nicht widerlegt werden kann.

#### **4.2. Untersuchungen zur ELIP-Funktion bei *Arabidopsis thaliana***

In einem zweiten Teil sollte zur Klärung der Funktion des ELIP-Proteins eine Doppelmutante von *Arabidopsis thaliana* hergestellt werden, die durch das Fehlen des *lycopin- $\epsilon$ -cyclase*-Gens und der Antisense-Inhibierung der *elip*-mRNA charakterisiert ist. Daraus sollte eine Pflanze resultieren, die aufgrund des vollständigen Fehlens des  $\alpha$ -Carotinoidbiosyntheseweges weder die Carotinoide Lutein und  $\alpha$ -Carotin synthetisieren noch durch die Antisense-Inhibierung der *elip*-mRNA ELIP-Protein akkumulieren kann. Aufgrund der festgelegten Arbeitshypothese, wonach die ELIP-Proteine eine Funktion als zeaxanthinbindende Proteine einnehmen, würde somit eine Beeinflussung beider

Carotinoidbiosynthesewege erfolgen, was zu einem lichtsensitiven Phänotyp, besonders unter Lichtstressbedingungen, führen würde.

Ausgang für diese Untersuchungen war eine *lut2*-Mutante, in welche zusätzlich die Antisense-Inhibierung der *elip*-mRNA erfolgen sollte. Aufgrund einer kurzen Generationszeit und einer Genomgröße von 125 Megabasen (Arabidopsis Genom Projekt, 2000), welches zu den kleinsten unter den Höheren Pflanzen zählt, wird *Arabidopsis thaliana* häufig als Modellorganismus für Funktionsuntersuchungen herangezogen. Obwohl das Genom mittlerweile als vollständig sequenziert betrachtet wird, liefern neue Untersuchungen differierende Größen zum Genom von *Arabidopsis thaliana*. So erhielten Schmuths *et al.* (2004) Ergebnisse von Durchflußzytometrie-Experimenten, bei denen von einer Genomgröße von 211 Megabasen ausgegangen werden kann.

Für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* liegen zahlreiche unterschiedliche Protokolle vor. Neben Samen (Feldmann und Marks, 1987), Blattgeweben (Schmidt und Willmitzer, 1988; Van Lijsebettens *et al.*, 1991) und Wurzelgeweben (Valvekens *et al.*, 1988), können dabei auch ganze Pflanzen (Bechtold *et al.*, 1993) verwendet werden. Die Durchführung der letzteren Methode gegenüber anderen wird als schnell und effizient bezeichnet, da auf eine Gewebekultur und eine anschließende Regenerationszeit verzichtet werden kann (Clough und Bent, 1998). Des weiteren können hohe Transformationsraten erzielt werden, die jedoch abhängig von der Wahl des *Agrobacterium*-Stammes, dem Entwicklungsstadium der zu transformierenden Pflanzen, der Wahl des Detergenz und auch der Art der *in planta* Transformation (Rietz, 2002; Clough und Bent 1998) sind.

Einfaches Dippen der Blütenstände in die Bakteriensuspension lieferten in der F1-Saat bei Verwendung des *Agrobacterium*-Stammes LBA4404 eine Transformationseffizienz von weniger als 0,05%, während das Anlegen eines zweiminütigen Vakuums beim Eintauchen der Pflanzen in die Suspension die Effizienz verdoppelt (Rietz, 2002). Durch die Wahl der Stammes *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 können in der F1-Generation sogar mehr als 1% Transformanden nach eine Vakuuminfiltration erreicht werden (Rietz, 2002). Andere Protokolle beschreiben bei der Auswahl der optimalen Versuchsbedingungen ähnliche Erfolge ( Clough und Bent, 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in planta* Transformation von *Arabidopsis thaliana* führte nicht zu diesen hohen Transformationsraten. Die maximale Transformationsrate lag bei 0,04%, wobei interessanterweise die Effizienz in diesem Experiment von der Lichtintensität abhängig war. Hygromycinresistente Pflanzen der

F1-Saat fanden sich weder bei Lichtintensitäten unter  $20 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , noch über  $60 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Die maximale Ausbeute transgener F1-Saat lag bei Lichtintensitäten von  $40 - 49 \mu\text{mol Photonen} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Im Anschluss wurde die gekeimte F1-Saat auf frisches MS-Medium umgesetzt und für weitere 2 Wochen zur Ausbildung einer höheren Zahl Blattgenerationen angezogen, wobei der Selektionsdruck über die Dauer des Experimentes erhalten blieb.

Zur Bildung einer Vielzahl transgener hygromycinresistenter Klone der F1-Saat wurde anschließend eine Kallusvermehrung durchgeführt. Das hierfür gewählte Protokoll (Schmidt und Willmitzer, 1988) beschrieb eine Erfolgsrate der Wurzelbildung gewachsener Sprosse von bis zu 60%, wobei von diesen wiederum etwa 65% Saatgut bilden sollten. Aber auch bei 35% aller Sprosse, die keine Wurzeln produzieren, sei eine Saatgutbildung erfolgreich.

Diese Erfolgsrate konnte bei den hygromycinresistenten Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* cv. Wassilewskija nicht nachgewiesen werden. Lediglich bei 4 der über eine Kallusvermehrung angezogenen Sprossen konnte erfolgreich Saatgut produziert werden. Bei einer Ausgangszahl von insgesamt 19 Pflanzen, von denen über einen längeren Zeitraum hinweg zum Teil mehr als 50 Sprosse regeneriert werden konnten, liegt die Saatgutbildungsrate deutlich niedriger als in vorangegangenen Arbeiten beschrieben.

Während der Kallusvermehrung konnten insgesamt 4 Ausgangspflanzen nicht vermehrt werden. Entweder starben sie schnell nach dem ersten Umsetzen auf MS-Medium ab oder sie bildeten keine Kalli. Die restlichen 15 Pflanzen wurden nach einer Isolierung genomischer DNA auf das Vorhandensein des *hptII*-Gens geprüft, welches in erfolgreich transformierten Pflanzen die Hygromycinresistenz hervorruft. In insgesamt 14 Pflanzen konnte die Existenz des Gens nachgewiesen werden. Darüber konnte jedoch noch keine Aussage über die Stärke der ELIP-Akkumulation getroffen werden. Tatsächlich wird der hier verwendete CaMV-35S-Promotor als konstitutiver starker Promotor beschrieben (Jensen *et al.*, 1986; Sanders *et al.*, 1987). Aufgrund dessen wurde eine massive Inhibierung der *elip*-mRNA erwartet. Eine schnelle und semiquantitative Aussage über die Inhibierung eines Proteins kann mit Hilfe der RT-PCR erfolgen. Da für *Arabidopsis thaliana* die Evidenz für mindestens 2 *elip*-Gene besteht, wurde auch die Inhibierung beider Gene untersucht. Urban (1998) sequenzierte bereits vor Jansson (1999) das zweite *elip*-Gen und lieferte Befunde für ein drittes, vermutlich jedoch unvollständiges Gen. Dieses stimmt sowohl im Mittelteil der Proteinsequenz als auch in der Nukleotidsequenz vollständig mit der *elip2*-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* überein. Diese Resultate gaben

Grund zu der Annahme, dass das dritte *elip*-Gen ein unvollständiger EST-Klon des zweiten *elip*-Gens ist oder beide Gene zueinander homolog sind.

Leider konnte für 3 der 4 Mutanten keine signifikante Änderung der *elip1*-Expression nach einem 6-stündigen Hochlichtexperiment nachgewiesen werden. Lediglich die Mutante 19 zeigte ein schwächeres Signal. Unter Normallichtbedingungen fiel der Nachweis des *elip*-Transkriptes negativ aus.

Auch für das zweite *elip*-Gen konnte keine Inhibierung der Expressionsstärke beobachtet werden. Der Unterschied der Signalstärke der Mutante 19 zu den anderen drei war hier nicht so deutlich wie für das erste *elip*-Gen. Interessant war jedoch, dass sich auch in der isolierten Gesamt-RNA der Kontrollen, die nicht unter Hochlichtbedingungen inkubiert wurden, mit Ausnahme der *lut2*-Mutante Transkripte des *elip*-Gens fanden. Die Ursache kann in einer mangelnden Bewässerung liegen. Unterstützt wird diese Überlegung von dem Ergebnis der *lut2*-Mutante. Deren Saatgut wurde insgesamt 2 Wochen später ausgesät, auf Erde gebracht und bei Hochlicht inkubiert. Dabei wurde genauestens darauf geachtet, die gleichen Bedingungen für diese Pflanzen zu erhalten, wie sie auch für den Wildtyp und die 4 Doppelmutanten 6, 7, 8, und 19 angewendet wurden. Leider wurden letztere jedoch zeitweise nicht ausreichend gewässert, so dass diese Pflanzen Trockenstress ausgesetzt waren. Ein ähnliches Phänomen konnte auch schon Urban (1998) bei Untersuchung der *elip*-Transkription bei *Arabidopsis thaliana* feststellen. Während der heißen Sommermonate wurden bereits in den Kontrollen positive *elip*-Signale ermittelt. Eine Austrocknung der Erde bei der *lut2*-Mutante konnte dagegen ausgeschlossen werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Heddad und Adamska (2000) nicht erzielt. Sie beschrieben die Transkription der beiden *elips* unter verschiedenen Stressbedingungen. Eine positive Regulation der *elip*-Transkripte fanden sich nur bei Blättern, die unter UV-A Licht und bei Lichtstress inkubiert wurden. Weder in den Kontrollen, noch bei anderen Stressbedingungen wie Verwundung, Hitzeschock, Salzstress, aber auch Trockenstress konnten *elip*-Transkripte nachgewiesen werden. Die Ursache könnte dabei in der Ausführung des Experimentes liegen. Leider kann die Dauer des ausgesetzten Trockenstress im Rahmen dieser Arbeit nicht ausreichend definiert werden, da er eine Folge unzureichender Bewässerung war. Dagegen trockneten Heddad und Adamska die Blätter für insgesamt 2 Std. auf 3 MM Whatman-Papier und bestimmten einen Wasserverlust in den Blättern von 50%. Jedoch wurden von den Autoren keine Aussagen getroffen, ob die Experimente auch bei geringerer oder zunehmender Trockenheit durchgeführt wurden. Dies könnte die Unterschiede in der *elip*-Transkription erklären. Es

war auch nicht primäres Ziel der Autoren, die *elip*-Transkription in Abhängigkeit eines Wassermangels darzulegen. Vielmehr sollten Transkriptionsunterschiede zwischen den *elips* und einer weiteren hochlichtinduzierten Genfamilie von *Arabidopsis thaliana*, den *seps* („stress-enhanced proteins“), aufgezeigt werden. Eine generelle Verneinung der Trockenstress-Induktion sollte hierbei vermieden werden.

Zur genauen Klärung der Trockenstress-Induzierung der *elip*-mRNA wäre eine Induktionsreihe über einen längeren Zeitraum hinweg notwendig. Nur so könnte eine genauere Aussage über die Regulation des *elips* getroffen werden. Auch bietet es sich an, die Akkumulation des ELIP-Proteins zu untersuchen. Ein Antikörper gegen den N-terminalen Bereich des Arabidopsis-ELIP liegt vor. Gerade die parallel erhaltenen Resultate bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina zeigen, dass eine Aussage über die Proteinmenge keine Rückschlüsse auf die mRNA zulässt. Während bei 10°C und 24 Std. Dauerhochlicht bei *Vitis vinifera* cv. Sultanina kein Protein akkumuliert wurde, fiel der Nachweis des *elip*-Transkriptes positiv aus. Erste Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Stärke des Transkriptsignals ähnlich der Blätter waren, die für 24 Std. bei Hochlicht und 25°C inkubiert wurden, bei denen jedoch eine deutliche Akkumulation von ELIP-Proteinen nachgewiesen werden konnte.

Neben der Trockenstressinduzierbarkeit des *elip2* sollte diese auch für das *elip1* bei *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Deutlich wird anhand der beiden Abbildungen 3.48 und 3.49, dass die Antwort auf Stress bei beiden Genen unterschiedlich reguliert wird. Ob für eine Antwort auf Trockenstress des *elip1* erst eine gewisse Schwelle zur Induktion unterschritten werden muss, könnte somit ebenfalls geprüft werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Induktion der *elip1*-Transkription negativ ausfällt. Denkbar wäre, dass beide *elips* aufgrund unterschiedlicher Transkriptlevel auch für unterschiedliche Stressoren verantwortlich sind.

Ungeachtet dieser Befunde konnte bei allen 4 Mutanten keine signifikante Inhibierung der *elip*-Expression nachgewiesen werden. Der Nachweis einer geringeren Bande bei der Doppelmutante 19 führt dabei unter Normallichtbedingungen zu keinem Phänotyp.

Zusammenfassend stellt sich die Frage, warum keine transgene Doppelmutante erhalten wurde, die in ihrer *elip*-Expression stark oder vollständig reduziert ist. Um dies zu klären, sollten mehrere Faktoren beachtet werden. Zum einen ist die geringe Transformationseffizienz der *in planta* Transformation interessant. Welche Gründe sprechen für eine Effizienz, die um mehr als 96% reduziert ist?

Clough und Bent (1998) zeigten zum Beispiel, dass die Größe der Sprosse eine erfolgreiche Transformation beeinflusst. Werden Sprosse verwendet, die statt der im Protokoll angegebenen Größe von 10 cm nur 1 cm hoch sind, reduziert sich die Transformationsrate um mehr als 60%. Obwohl dieses bei der Transformation beachtet wurde, erfolgte die Transformation auch an Pflanzen, die Sprosse unterschiedlicher Größe aufwiesen. Dies trat auf, obwohl die primäre Infloreszenz nahe der Basis entfernt wurde zur Bildung von mehreren, sekundären Infloreszenzen. Um dieses Problem zu minimieren, wurden besonders kleine Sprosse aus der Saatgutbildung ausgeschlossen und nachwachsende regelmäßig entfernt. Auch kann die Wahl des Kultivars von *Arabidopsis thaliana* die Zahl transgener F1-Pflanzen drastisch reduzieren. Bereits Schmidt und Willmitzer beschrieben 1988 bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation der Blätter und Kotyledonen von *Arabidopsis thaliana* eine Abhängigkeit von der Kultivarwahl. Im Vergleich zur Transformationseffizienz bei *Arabidopsis thaliana* cv. C24 reduzierte sich diese beim Kultivar Wassilewskija um bis zu 90%. Das vorliegende Protokoll zur Vakuumfiltration von *Arabidopsis thaliana* (Rietz, 2002) diente der Transformation des Kultivars Columbia-0, wobei in dieser Arbeit das Kultivar Wassilewskija eingesetzt wurde.

Ein weiterer, durchaus sehr wichtiger Aspekt kann jedoch auch die Doppelmutante an sich sein. ELIP-Proteine wurden erstmalig während der Ergrünung etiolierter Erbsenkeimlinge beschrieben (Meyer und Klopstech, 1984; Grimm *et al.*, 1989). Die Aktivierung der *elip*-Transkription, an welcher der Photorezeptor Phytochrom beteiligt ist (Klopstech *et al.*, 1984) erfolgt deutlich schneller als die der anderen positiv lichtinduzierten Gene wie dem LHCI oder SSU (Meyer und Klopstech, 1984; Kolanus *et al.*, 1987, Grimm und Klopstech, 1987). Innerhalb der Carotinoide bilden sich Violaxanthin und Lutein als erste Xanthophylle in den sich in den entwickelnden Plastidmembranen. Es stellt sich daher die Frage, wie sich diese Pflanzen im Zuge der Keimlingsentwicklung verhalten, wenn sowohl die *elip*-Transkription herunterreguliert wird als auch die Synthese des Luteins inhibiert ist. Ein gegenseitiger Ersatz der Carotinoide wurde häufig diskutiert. Aufschlüsse lieferten dazu zahlreiche Mutanten sowohl von *Arabidopsis thaliana* als auch von *Chlamydomonas reinhardtii*. Unter Hochlicht zeigten die beiden Xanthophylle Lutein und Zeaxanthin eine besondere Bedeutung. Fehlte nur eines der beiden, so konnte zwar eine Verringerung des NPQ gemessen werden, jedoch war das Wachstum dieser Pflanzen ähnlich dem Wildtyp. Dagegen führten die Doppelmutanten *npq1lut2* bei *Arabidopsis thaliana* und *npq1lor1* bei *Chlamydomonas reinhardtii* zu einem lichtsensitiven Phänotyp unter Hochlicht-

bedingungen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mindestens eines der beiden Carotinoide notwendig ist, photoprotektiven Schutz in den Chloroplasten aufzubauen. Es zeigt aber auch, wie wichtig die Carotinoide im Vergleich zu anderen Schutzmechanismen der Höheren Pflanzen sind. Trotzdem ist der gesamte Schutzmechanismus sehr komplex und es ist schwierig, die einzelnen Antioxidantien und die photochemischen Schutzmechanismen voneinander zu trennen.

Eine zeaxanthinbindende Funktion des ELIPs, besonders im Verlauf von Langzeitexperimenten unter Hochlicht, wurde bereits mehrfach angenommen (Krol *et al.*, 1995; Montané *et al.*, 1997). Besonders dann, wenn die anderen chlorophyllbindenden Proteine unter Lichtstressbedingungen degradiert werden. Auch beim Wein zeigte sich nicht nur ein verändertes Akkumulationsmuster des ELIP-Proteins, sondern auch eine veränderte Akkumulation des Zeaxanthins. Zwar nicht eindeutig bewiesen, kann unter diesen Bestimmungen immer noch ein Zusammenhang der ELIP-Akkumulation als zeaxanthinbindendes Protein zur Dissipation überschüssiger Lichtenergie angenommen werden. Weitere Experimente müssten da aber noch folgen.

Ausgehend vom Keimlingsstadium transgener Doppelmutanten stellt sich nun die Frage, ob wir einen letalen Phänotyp erwarten können. Arbeiten über etiolierte Pflanzen liegen nicht zahlreich vor. Wenn also sowohl das während der Chloroplastendifferenzierung zuerst auftretende Xanthophyll Lutein fehlt und ebenso das erste lichtregulierte Protein ELIP, so wäre denkbar, dass die Differenzierung des Chloroplasten derart gestört wird, dass eine Ausbildung funktionsfähiger Chloroplasten unterbleibt und photooxidative Schäden bereits in den frühen Stadien der Ergrünung irreversiblen Folgen hervorrufen würden. Diese Annahme ist jedoch rein spekulativ, wäre aber denkbar. Eine Überprüfung dieser Annahme ließe sich nur durch ein Ausschlussverfahren vornehmen. Ließe sich eine transgene Doppelmutante erstellen, die weder ELIP noch Lutein akkumuliert und trotzdem lebensfähig ist, könnte man diesen Lösungsweg ablehnen. Des weiteren stellt sich die Frage, welche Funktion die anderen ELIP-ähnlichen Proteine bei *Arabidopsis thaliana* einnehmen. Hier konnten sowohl ein- als auch zwei-Helix-Proteine identifiziert werden, die ebenfalls durch Hochlicht induzierbar sind. Angaben über deren Verhalten während der Ergrünung liegen nicht vor.

## **5. Literaturverzeichnis**

**Adamska, I. (1995)** Regulation of early light-inducible protein gene expression by blue and red light in etiolated seedling involves nuclear and plastid factors. *Plant Physiol.* **107**, 1167 – 1175

**Adamska, I. (1997)** ELIPs-light-induced stress proteins. *Physiol. Plant.* **100**, 794 - 805

**Adamska, I. und Kloppstech, K. (1991)** Evidence for an association of the early light-inducible protein (ELIP) of pea with photosystem II. *Plant Mol. Biol.* **16**, 209 - 223

**Adamska, I. und Kloppstech, K. (1994)** Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions. *J. Biol. Chem.* **269**, 30221 – 30226

**Adamska, I., Kloppstech, K. und Ohad, I. (1992a)** UV light stress induces the synthesis of the early light-inducible protein and prevents its degradation. *J. Biol. Chem.* **267**, 24732 – 24737

**Adamska, I., Kloppstech, K. und Ohad, I. (1992b)** Synthesis of the early light-inducible protein is controlled by blue light and related to light stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2610 – 2613

**Adamska, I., Kloppstech, K. und Ohad, I. (1993)** Early light-inducible protein in pea is stable during light stress but is degraded during recovery at low light intensity. *J. Biol. Chem.*, **268 (8)**, 5438 - 5444

**Adamska, I., Kruse, E. und Kloppstech, K. (2001)** Stable insertion of the early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll a. *J. Biol. Chem.* **276 (11)** 8582 - 8587

**Adamska, I., Lindahl, M., Roobol-Bóza, M. und Andersson, B. (1996)** Degradation of the light stress protein is mediated by an ATP-independent serine-type protease under low light conditions. *Eur. J. Biochem.* **236**, 591 – 599

**Adamska, I., Roobol-Bóza, M., Lindahl, M. und Andersson, B. (1999)** Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur. J. Biochem.* **260 (2)**, 453 – 460

**Ananyev, G., Wydrzynski, T., Renger, G. und Klimov, V. (1992)** Transient peroxide formation by the manganese-containing, redox active donor side of photosystem II upon inhibition of O<sub>2</sub> evolution with lauroylcholine chloride. *Biochim. Biophys. Acta* **1100**, 303 – 311

**Anderson, I.C., Robertson, D.S. (1960)** Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. *Plant Physiol.* **35**, 531 – 534

**Apel, K. und Kloppstech, K. (1978)** The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Eur. J. Biochem.* **85**, 581 – 588

- Aro, E.-M., Hundal, T., Carlberg, I. und Andersson, B. (1990)** In vitro studies in light-induced inhibition of photosystem II and D1-protein degradation at low temperatures. *Biochim. Biophys. Acta*, **1019**, 269 – 275
- Aro, E.-M., Virgin, I. und Andersson, B. (1993)** Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 113 - 134
- Artus, N.N., Somerville, S.C., Somerville, C.R. (1986)** The biochemistry and cell biology of photorespiration. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **4**, 121 - 147
- Asada, K. (1994a)** Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. Baker N.R, Bowyer J.R. Photoinhibition of Photosynthesis - From Molecular Mechanisms to the Field. St Thomas House/Becket St/Oxford OX1 1SJ/United Kingdom: Bios Scientific Publishers Ltd. p 129-142 *Environmental Plant Biology*.
- Asada, K. (1994b)** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of defence Systems in Plants, ed. Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. Boca Raton; CRC Press, pp 77 – 104
- Asada, K. (1999)** The water-water cycle. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**; 601 – 639
- Banet, G., Pick, U., Malkin, S. und Zamir, A. (1999)** Differential responses to different light spectral ranges of violaxanthin de-epoxidation and accumulation of Cbr, an algal homologue of plant early light inducible proteins, in two strains of *Dunaliella*. *Plant Physiol. Biochem.* **37** (11), 875 - 879
- Barber, J. und Andersson, B. (1992)** Too much of good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17** (2), 61 – 66
- Baroli, I., Do, A.D., Yamane, T. und Niyogi, K.K. (2003)** Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress. *Plant Cell* **15**, 992 – 1008
- Bartels, D., Hanke, C., Schneider, K., Michel, D. und Salamini, F. (1992)** A desiccation-related ELIP-like gene from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is regulated by light and ABA. *EMBO J.* **11**, 2771 – 2778
- Bassi, R., Sandona, D., und Croce, R. (1997)** Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiol. Plant.* **100**, 769 - 779
- Beator, J. (1993)** Die Bedeutung der circadianen Rhythmik und lichtkontrollierten Genexpression für die Entwicklung der Gerste (*Hordeum vulgare*). Dissertation, Universität Hannover
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G. (1993)** In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* **316**, 1194 - 1199
- Ben Amotz A. und Avron M. (1983)** On the factors which determine massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **72**, 593 - 597

- Bilger, W. und Björkman, O. (1990)** Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* **25**, 173 – 185
- Bilger, W. und Björkman, O. (1994)** Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* **193**, 238 – 246
- Binyamin, L., Falah, M., Portnoy, V., Soudry, E. und Gepstein, S. (2001)** The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **212** (4), 591 – 597
- Bishop, N.I. (1996)** The  $\beta,\epsilon$ -carotenoid, lutein, is specifically required for the formation of the oligomeric forms of the light harvesting complex in the green alga, *Scenedesmus obliquus*, J. Photochem. Photobio. B: Biol. **36**, 279 - 283
- Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-Ch., Frutiger, S. und Hochstrasser, D.F. (1993)** The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**, 1023 – 1031
- Björkman, O. und Demmig-Adams, B. (1994)** Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in leaves of higher plants. In *Ecophysiology of Photosynthesis*, E.-D. Schulze und M.M. Caldwell, eds (Berlin, Springer-Verlag) 17 – 47
- Björkman, O. und Niyogi, K.K. (1998)** in *Photosynthesis: Mechanisms and Effects Vol. III*, ed. Garab, G. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), 2085 - 2090
- Blecken, J., Weisshaar, B. und Herzfeld, F. (1994)** The distinct cis-acting elements are involved in light-dependent activation of the elip-promotor. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 371 - 379
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H.J. (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93 - 99
- Böhm, S., Frishman, D. und Mewes, H.W. (1997)** Variations of the C2H2 zinc finger motif in the yeast genome and classification of yeast zinefinger proteins. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2464 – 2469
- Braun, P., Banet, G., Tal, T., Malkin, S. und Zamir, A. (1996)** Possible role of Cbr, an algal early-light-induced protein, in nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* **110**, 1405 - 1411
- Britton, G. (1993)** Biosynthesis of carotenoids. In *Carotenoids in Photosynthesis*, A.J. Young und G. Britton, eds (London: Chapman and Hall ) 96 – 126
- Chaumont, M., Osorio, M.L., Chaves, M.M., Vanacker, H., Morot-Gaudry, J.F. und Foyer, C.H. (1997)** The absence of photoinhibition during the mid-morning depression of photosynthesis in *Vitis vinifera* grown in semi-arid and temperate climates. *Plant Physiol.* **150**, 743 – 751

- Chen, G.-X., Kazimir, J. und Cheniae, G.M. (1992)** Photoinhibition of hydroxylamine-extracted photosystem II membranes: studies of the mechanism. *Biochemistry* **31**, 11072 – 11083
- Chunaev, A., Mirnaya, O., Maslov, V. und Boschetti, A. (1991)** Chlorophyll b- and loroxanthin-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthetica* **25**, 291 - 301
- Clough, S.J. und Bent, A.F. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735 – 43
- Crofts, A.R., Yerkes, C.T. (1994)** A molecular mechanism for q<sub>E</sub>-quenching. *FEBS Lett.* **352**, 265 – 270
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. und Elofsson, A. (1997)** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng.* **10** (6), 673 – 676
- Cunningham, F.X., Pogson, B.J., Sun, Z., McDonald, K., DellaPenna, D. und Gantt, E. (1996)** Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**, 1613 – 1626
- Debus, R.J. (1992)** The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim Biophys Acta* **1102** (3), 269 – 352
- DellaPenna, D. (1999)** Carotenoid synthesis and function in plants: Insights from mutant studies in *Arabidopsis*. *Pure Appl. Chem.* **71** (12), 2205 - 2212
- Demeter, S., Neale, P.J. und Melis, A. (1987)** Photoinhibition impairment of the primary charge separation between P-680 and pheophytin in photosystem II of chloroplasts. *FEBS Lett.* **214**, 370 – 374
- Demmig, B., Cleland, R.E. und Björkman, O. (1987)** Photoinhibition, 77K chlorophyll fluorescence quenching and phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll-protein complex of photosystem II in soybean leaves. *Planta*, **172**; 378 – 385
- Demmig-Adams, B. und Adams, W.W. (1996)** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**, 21 - 26.
- Demmig-Adams, B. und Adams, W.W.III (1992)** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 599 – 626
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A. Bowling, B.A. und Verhoeven, A.S. (1996)** Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.* **98**, 253 – 264
- Demming-Adams, B. (1990)** Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1020**, 1 - 24
- Dolganov, N.A., Bhaya, D. und Grossman, A.R. (1995)** Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (2), 636 – 640

- Doyle, J.J. und Doyle, J.L. (1990)** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13 - 15
- Dreyer, S. (1998)** Untersuchungen zur Biodiversität von *elip*-Genen in verschiedenen Gersten-Kultivaren. Dissertation, Universität Hannover
- Edge, R., McGarvey, D.J. und Truscott, T.G. (1997)** The carotenoids as antioxidants: A review. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **41**, 189 - 200
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G. (1999)** ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* **8 (5)**, 978 – 984
- Escoubas, J.-M., Lomas, M., LaRoche, J. und Falkowski, P.G. (1995)** Light intensity regulation of cab gene transcription is signalled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10237 – 10241
- Eskling, M., Arvidsson, P.-O. und Åkerlund, H.-E. (1997)** The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant.* **100**, 806 - 816
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6 - 13
- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1984)** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **137**, 266 – 267
- Feldmann, K.A. und Marks, M.D. (1987)** Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 1 – 9
- Flexas, J. und Medrano, H. (2002)** Energy dissipation in C3 plants under drought. *Funct. Plant. Biol.* **29**, 1209 – 1215
- Flexas, J., Badger, M., Chow, W.S., Medrano, H. und Osmond, C.B. (1999)** Analysis of the relative increase in photosynthetic O<sub>2</sub> uptake when photosynthesis in grapevine leaves is inhibited following low night temperatures and/or water stress. *Plant Physiol.* **121**, 675 - 684
- Flexas, J., Escalona, J.M. und Medrano, H. (1998)** Down-regulation of photosynthesis by drought under field conditions in grapevine leaves. *Aus. J. Plant Physiol.* **25**, 893 – 900
- Foyer, C.H., Descourvières, P. und Kunert, K.J. (1994)** Protection against oxygen radicals : an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* **17**; 507 – 523
- Foyer, C.H., Lelandais, M. und Kunert, K.J. (1994)** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**, 696 - 717
- Frank, H.A. und Cogdell, R.J. (1996)** Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* **63**, 257 – 264

- Frishman, D. und Argos, P. (1996)** Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* **9**, 133 – 142
- Fryer, M.J. (1992)** The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol). *Plant Cell Environ.* **15**, 381 – 392
- Funk, C., Schroder, W.P., Napiwotzki, A., Tjus, S.E., Renger, G. und Andersson, B. (1995)** The PSII-S protein of higher plants: A new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* **34**, 11133 – 11141
- Gatz, C., Froberg, C. und Wendenburg, R. (1992)** Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *The Plant Journal* **2**, 397 – 404
- Gill, S.C. und von Hippel, P.H. (1989)** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319 – 326
- Gilmore, A.M. (1997)** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* **99**, 197 – 209
- Gilmore, A.M. und Yamamoto, H.Y. (1992)** Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (5) 1899 – 1903
- Gleave, A.P. (1992)** A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* **20** (6), 1203 - 1207
- Green, B.R. und Durnford, D.G. (1996)** The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 685 - 714
- Green, B.R. und Kühlbrandt, W. (1995)** Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynth. Res.* **44**, 139 – 148
- 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 ancestor. *Photosynthesis Research* **39**, 149 - 162
- Green, B.R., Pichersky, E. und Kloppstech, K. (1991)** Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* **16** (5) 181 – 186
- Greenberg, B.M., Gaba, V., Matoo, A.K. und Edelman, M. (1987)** Identification of a primary in vivo degradation product of the rapidly-turning-over 32 kd protein of photosystem II. *EMBO J.* **6**, 2865 – 2869
- Grimm, B. und Kloppstech, K. (1987)** The early light-inducible proteins of barley. Characterization of two families of 2-h-specific nuclear-coded chloroplast proteins. *Eur. J. Biochem.* **167** (3), 493 – 499

- Grimm, B., Kruse, E. und Kloppstech, K. (1989)** Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-harvesting chlorophyll binding proteins. *Plant Mol. Biol.* **13**, 583 - 593
- Gruber, J. (1999)** Untersuchung der Expression eines frühen lichtinduzierten Proteins des Tabaks (*Nicotiana tabacum*). Dissertation, Universität Hannover
- Gruszecki, W. (1999)** Carotenoids in membranes. In *The Photochemistry of Carotenoids*. H. Frank, A. Young, G. Britton, and R. Cogdell, eds ( Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 363 - 379
- Gruszecki, W.I., Grudzinski, W., Banaszek-Glos, A., Matula, M., Kernen, P., Krupa, Z. und Siewiesiuk, J. (1999)** Xanthophyll pigments in light-harvesting complex II in monomolecular layers: localisation, energy transfer and orientation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1412**, 173 - 183
- Hager, A. und Holocher, K. (1994)** Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* **192**, 581 – 589
- Havaux, M. und Davaud, A. (1994)** Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of photosystem II activity. Preferential inactivation of photosystem I. *Photosynth. Res.* **40**, 75 – 92
- Havaux, M. und Niyogi, K.K. (1999)** The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8762-8767
- Heber, U. und Walker, D. (1992)** Concerning a dual function of coupled cyclic electron transport in leaves. *Plant Physiol.* **100**, 1621 – 1626
- Heddad, M. und Adamska, I. (2000)** Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll a/b-binding gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (7), 3741 - 3746
- Hendrickson, I., Ball, M.C., Osmond, C.B., Furbank, R.T. und Chow, W.S. (2003)** Assessment of Photoprotection mechanisms of grapevines at low temperatures. *Funct. Plant. Biol.* **30**, 631 – 642
- Hendrickson, L., Förster, B., Furbank, R.T. und Chow, W.S. (2004)** Process contributing to photoprotection of grapevine leaves illuminated at low temperature. *Physiol. Plant.* **121**, 272 – 281
- Hideg, E., Kálai, T., Hideg, K. und Vass, I. (1998)** Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production: Detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry* **37**, 11405 - 11411
- Höfgen, R. und Willmitzer, R. (1988)** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acid Res.* **16** (20), 9877

- Horton, P. und Ruban, A.V. (1994)** The role of light-harvesting complex II in energy quenching. In *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field*. N.R. Baker und J.R. Bowyer, eds (Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers), 111 – 128
- Horton, P., Ruban, A.V. und Walters, R.G. (1994)** Regulation of light harvesting in green plants: Indication by Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* **106**, 415 – 420
- Horton, P., Ruban, A.V. und Walters, R.G. (1996)** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 655 - 684
- Humbeck, K., Römer, S. und Senger, H. (1989)** Evidence for an essential role of carotenoids in the assembly of an active photosystem II. *Planta* **179**, 242 – 250
- Jansson, S. (1999)** A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in plant science* **4 (6)**, 236 - 240
- Jansson, S., Andersson, J., Kim, S.J. und Jackowski, G. (2000)** An *Arabidopsis thaliana* protein homologous to cyanobacterial high-light-inducible proteins. *Plant Molecular Biology* **42**, 345 - 351
- Jegerschöld, C., Virgin, I. und Styring, S. (1990)** Light-dependent degradation of the D1 protein in photosystem II is accelerated after inhibition of the water splitting reaction. *Biochemistry* **29 (26)**, 6179 - 6186
- Jensen, J.S., Marcker, K.A., Otten, L. und Schell, J. (1986)** Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature* **321**, 669 – 674
- Joyard, J., Teyssier, E., Miege, C., Berny-Seigneurin, D., Marechal, E., Block, M.A., Dorne, A.J., Rolland, N., Ajlani, G. und Douce, R. (1998)** The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol.* **118**, 715 – 723
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosochi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996)** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Research* **3**, 109 - 136 und 185 - 209 (supplement)
- Khyse-Andersen, J. ( 1984 )** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203 – 209
- Kim, S., Sandusky, P., Bowlby, N.R., Aebersold, R., Green, B.R., Vlahakis, S., Yocum, C.F. und Pichersky, E. (1992)** Characterization of a spinach psbs cDNA encoding the 22 kDa protein of photosystem II. *FEBS Lett.* **314**, 67 – 71

- Kolanus, W., Scharnhorst, C., Kühne, U. und Herzfeld, F. (1987)** The structure and light dependent transient expression of a nuclear-encoded chloroplast protein gene from pea (*Pisum sativum* L.). *Mol. Gen. Genet.* **209**, 234-239
- Kolb, C.A., Kopecký, J., Riederer, M. und Pfündel, E.E. (2003)** UV screening py phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). *Funct. Plant Biol.* **30**, 1177 – 1186
- Kozaki, A. und Takeba, G. (1996)** Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature* **384**; 557 – 560
- Krinsky, N.I. (1979)** Carotenoid protection against oxidation. *Pure Appl. Chem.* **51**, 649 - 660
- Król, M., Ivanov, A.G., Jansson, S., Kloppstech, K. und Huner, N.P.A. (1999)** Greening under high light or cold temperatures affects the level of xanthophyll-cycle pigments, early light-inducible proteins, and light-harvesting polypeptides in wild-type barley and the *Chlorina f2* mutant. *Plant Physiol.* **120**, 193-203
- Król, M., Spangfort, D., Huner, N.P.A., Öquist, G., Gustafsson, P. und Jansson, S. (1995)** Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll b-less barley mutant. *Plant Physiol.* **107**, 873 – 883
- Kruse, E. und Kloppstech, K. (1992)** Integration of early light-inducible proteins into isolated thylakoid membranes. *Eur. J. Biochem.* **208** (1), 195 – 202
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N. und Fujiyoshi, Y. (1994)** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614 - 621
- La Roche, J., van der Staay, G.W., Partensky, F., Ducret, A., Aebersold, R., Li, R., Golden, S.S., Hiller, R.G., Wrench, P.M., Larkum, A.W. und Green, B.R. (1996)** Independent evolution of the prochlorophyte and green plant chlorophyll a/b light-harvesting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (26), 15244 – 15248
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Lee, H.-Y., Chow, W.S. und Hong, Y.-N. (1999)** Photoinactivation of photosystem II in leaves of *Capsicum annuum*. *Physiol. Plant.* **105**, 377 – 384
- Lers A., Biener Y. und Zamir, A. (1990)** Photoinduction of massive  $\beta$ -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.* **93**, 389 - 395
- Lers, A., Levy, H. und Zamir, A. (1991)** Co-regulation of a gene homologous to early light-induced genes in higher plants and  $\beta$ -carotene biosynthesis in the alga *Dunaliella bardawil*. *J. Biol. Chem.* **266**, 13698 – 13705
- Levy, H., Gokhman, I. und Zamir, A. (1992)** Regulation and light-harvesting complex II association of a *Dunaliella* protein homologous to early light-induced proteins in higher plants. *The Journal Of Biological Chemistry* **267** (26), 18831 - 18836

- Levy, H., Tal, T., Shaish, A., und Zamir, A. (1993)** Cbr. An algal homolog of plant early light-induced proteins, is a putative zeaxanthin binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 20892 – 20896
- Lindahl, M., Funk, C., Webster, J., Bingsmark, S., Adamska, I. und Andersson, B. (1997)** Expression of ELIPs and PSII protein in spinach during acclimative reduction of the photosystem II antenna in response to increased light intensities. *Photosynth. Res.* **54**, 227 – 236
- Lindahl, M., Yang, D.-H. und Andersson, B. (1995)** Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *Eur. J. Biochem.* **231**, 503 – 509
- Liu, W.T., Pool, R., Wenkert, W. und Kriedemann, P.E. (1978)** Changes in photosynthesis, stomatal resistance and abscisic acid of *Vitis labruscana* through drought and irrigation cycles. *Am. J. Enol. Vitic.* **29**, 239 – 246
- Lokstein, H., Tian, L., Polle, J.E.W. und 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* **38**, 17 - 38
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fasse, A.L. und Randall, R.J. (1951)** Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 – 275
- Maid, U. und Zetsche, K. (1992)** A 16 kb small single-copy region separates the plastid DNA inverted repeat of the unicellular red alga *Cyanidium caldarium*: physical mapping of the IR-flanking regions and nucleotide sequences of the psbD-psbC, rps16, 5S rRNA and rpl21 genes. *Plant Mol. Biol.* **19** (6), 1001 – 1010
- Markgraf, T. und Oelmüller, R. (1991)** Evidence that carotenoids are required for the accumulation of a functional photosystem II, but not photosystem I in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta* **185**, 97 – 104
- Maxwell, D.P., Falk, S. und Huner, N.P.A. (1995)** Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. *Plant Physiol.* **107**, 687 - 694
- Mehler, A.H. (1951)** Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**; 65 –77
- Melis, A. (1999)** Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: What modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci.* **4**, 130 - 135
- Meyer, G. und Kloppstech, K. (1984)** A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for a pea nuclear DNA. *Eur. J. Biochem.* **138**, 201 – 207
- Miroshnichenko-Dolganov, N.A., Bhaya, D. und Grossmann, A.R. (1994)** Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll a/b binding protein of higher plants: Evolution and regulation. *Proc. Natl. Sci. USA* **92**, 636 – 640

- Miyake, C. und Asada, K. (1994)** Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **35**, 539 – 549
- Miyake, C. und Yokota, A. (2000)** Determination of the rate of photoreduction of O<sub>2</sub> in the water-water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **41** (3), 335 – 343
- Miyao, M., Ikeuchi, M., Yamamoto, N. und Ono, T. (1995)** Specific degradation of the D1 protein of photosystem II by treatment with hydrogen peroxide in darkness: implication for the mechanism of degradation of the D1 protein under illumination. *Biochemistry*, **34**, 10019 – 10026
- Montané, M.-H., Dreyer, S., Triantaphylidès, C. und Kloppstech, K. (1997)** Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by posttranscriptional regulation. *Planta* **202**, 293 – 302
- Moscovici, S. und Chamovitz, D.A. (1997)** Characterization of a cDNA encoding the early light-inducible protein (ELIP) from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **115**, 1287 - 1290
- Neuhoff, V., Arnold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988)** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie brilliant blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255 - 262
- Neuhoff, V., Stamm, R., und Eibl, H. (1985)** Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**, 427 - 448.
- Niyogi, K., Shih, C., Chow, W.S., Pogson, B.J., DellaPenna, D. und Björkman, O. (2001)** Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynthesis research* **67**, 139 - 145
- Niyogi, K.K. (1999)** Photoprotection revisited : Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 333 - 359
- Niyogi, K.K., Björkman, O. und Grossmann, A.R. (1997a)** Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* **9**, 1369 - 1380
- Niyogi, K.K., Björkman, O. und Grossmann, A.R. (1997b)** The roles of specific xanthophylls in Photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14162 - 14167
- Noctor, G. und Foyer, C.H. (1998)** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 249 – 279
- Norris, S.R., Barette, T.R. und DellaPenna, D. (1995)** Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of Phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**; 2139 – 2149

- Oelmüller, R. (1989)** Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. *Photochem. Photobiol.* **49**, 229 - 239
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Takabe, K. und Asada, K. (1995)** Attachment of CuZn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant Cell Physiol.* **36**, 565 – 573
- Ohad, I., Keren, N., Zer, H., Gong, H., Mor, S.T., Gal, A., Tal, S., und Domovich, Y. (1994)** in *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field* (Baker, N. R., and Bowyer, J. R., eds) pp. 165 - 181, Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom
- Ohad, I., Kyle, D.J. und Arntzen, C.J. (1984)** Membrane protein damage and repair: Removal and replacement of inactivated 32 – kilodalton polypeptides in chloroplast. *J. Cell Biol.* **99**, 481 – 485
- Ortoizze, T. und Düring, H. (2001)** Light utilisation and thermal dissipation in light- and shade-adapted leaves of *Vitis* genotypes. *Vitis* **40** (3), 131 – 136
- Ouvrard, O., Cellier, F., Ferrare, K., Tousch, D., Lamaze, T., Dupuis, J.-M. und Casse-Delbart, F. (1996)** Identification and expression of water stress- and abscisic-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant Mol. Biol.* **31**, 819 – 829
- Owens, T.G. (1996)**. Processing of excitation energy by antenna pigments. In Baker NR, ed, *Advances in Photosynthesis: Photosynthesis and the Environment*, Vol. 5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 1 – 23
- Palozza, P. und Krinsky, N.J. (1992)** Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. *Methods Enzymol.* **213**, 403 - 420
- Park, Y.-I., Chow, W.S. und Anderson, J.M. (1995)** Light inactivation of functional photosystem II of pea leaves grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* **196**, 401 – 411
- Pätsikkä, E., Aro, E.-M. und Tyystjärvi, E. (1998)** Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiol.* **117**, 619 – 627
- Paulsen, H. , Finkenzeller, B. und Kuhlein, N. (1993)** Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **215** (3), 809 – 816
- Paulsen, H., Rümmler, U. und Rüdiger, W. (1990)** Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211.
- Paulsen, H. (1995)** Chlorophyll a/b-binding proteins. *Photochem. Photobiol.* **62**, 367 - 382.
- Pfündel, E. und Bilger, W. (1994)** Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* **42**, 89 – 109

- Plumley, F.G. und Schmidt, G.W. (1987)** Reconstitution of chlorophyll a/b light harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 146 – 150
- Pogson, B., McDonald, K., Truong, M., Britton, G. und DellaPenna, D. (1996)** *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell* **8**, 1627 - 1639
- Pogson, B.J., Niyogi, K.K., Björkman, O. und DellaPenna, D. (1998)** Altered xanthophyll composition adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13324 - 13329
- Pötter, E. und Kloppstech, K. (1993)** Effects of light stress on the expression of early light-inducible proteins in barley. *Eur. J. Biochem.* **214**, 779 – 786
- Powles, S.B. (1984)** Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 15 – 44
- Prasil, O., Adir, N. und Ohad, I. (1992)** Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. *Top Photosynth.* **11**, 293 – 348
- Reith, M. und Munholland, J. (1995)** Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 333 – 335
- Richter, S. und Lamppa, G.K. (1998)** A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Cell Biology* **95** (13) 7463 – 7468
- Rietz, S. (2002)** Molekulare und biochemische Untersuchungen von Mitgliedern der Phospholipase-A-Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* in der Reaktion auf pflanzliche Hormone sowie biotischen und abiotischen Stress. Dissertation, Universität Hannover
- Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U.-M., Carlberg, I., Andersson, B. und Aro, E.-M. (1997)** Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 30476 – 30482
- Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J. und 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
- Ruban, A.V., Young, A.J. und Horton, P. (1993)** Induction on nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. Evidence for changes in the state of the light harvesting system of photosystem II *in vivo*. *Plant Physiol.* **102**, 741 - 750
- Sager, R. und Zalokar, M. (1958)** Pigments and photosynthesis in a carotenoid-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Nature* **182**, 98 – 100
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487 - 491

- Salonen, M., Aro, E.-M. und Rintamaki, E. (1998)** Reversible phosphorylation and turnover of the D1-protein under various redox states of Photosystem II induced by low temperature photoinhibition. *Photosynth. Res.* **58**, 143 – 151
- Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P.M. und Bressan, R.A. (1999)** An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol. Biol.* **17**, 11 - 17
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Sanders, P.R., Winter, J.A., Barnason, A.R., Rogers, S.G. und Fraley, R.T. (1987)** Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acid Res.* **4**, 1543 – 1558
- Satoh, K. (1970)** Mechanism of photoinactivation in photosynthetic systems. III. Site and mode of photoinactivation in photosystem I. *Plant Cell Physiol.* **11**, 187 – 197
- Scharnhorst, C., Heinze, H., Meyer, G., Kolanus, W., Bartsch, K., Heinrichs, S., Gudschun, T., Möller, M. und Herzfeld, F. (1985)** Molecular cloning of a pea mRNA encoding an early light induced, nuclear coded chloroplast protein. *Plant Mol. Biol.* **4**, 241 – 245
- Schimpf, G. (2002)** *Gentechnische Methoden.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 3. Auflage
- Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988)** High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants. *Plant Cell Reports* **7**, 583 – 586
- Schmuths, H., Meister, A., Horres, R. und Bachmann, K. (2004)** Genome size variation among accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* **93**, 1 – 5
- Schultz, H.R. und Mathews, M.A. (1988)** Vegetative growth distribution during water deficits in *Vitis vinifera*. *Aust. J. Plant Physiol.* **15**, 641 – 656
- Schultz, H.R. und Matthews, M.A. (1993)** Growth, osmotic adjustment, and cell-wall mechanisms of expanding grape leaves during water deficits. *Crop Sci.* **33**, 287 – 294
- Shi, L.-X. und Schröder, W.P. (2004)** The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* **1608**, 75 – 96
- Siefermann-Harms, D. (1978)** The accumulation of neutral red in illuminated thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta* **504** (2), 265 – 277
- Siefermann-Harms, D. (1985)** Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim. Biophys. Acta* **811**, 325 - 355
- Siefermann-Harms, D. (1987)** The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. *Physiol. Plant.* **69**, 561 – 568

- Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G. und Krogh, A. (1998)** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**, 175 – 182
- Sonoike, K. und Terashima, I. (1994)** Mechanism of photosystem I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* **194**, 287 – 293
- Sonoike, K., Terashima, I., Iwaki, M. und Itoh, S. (1995)** Destruction of photosystem I iron-sulfur centers in leaves of *Cucumis sativus* L. by weak illumination at chilling temperatures. *FEBS Lett.* **362** (2), 235 – 238
- Stahl, U., Ek, B. und Stymne, S. (1998)** Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase a (2) from developing seed of elm. *Plant Physiol.* **117**, 197 – 205
- Stirewalt, V.L., Michalowski, C.B., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J. und Bryant, D.B. (1995)** Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol. Biol. Repr.* **13**, 327 – 332
- Thornber, J.P., Morishige, D.T., Anandan, S. und Peter, G.F. (1991).** Chlorophyll-caroteno-proteins of higher plant thylakoids. *In* The Chlorophylls (H. Scheer ed.), 549 - 585. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Towbin, H. Staehelin, T. und Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350 - 4354
- Trebst, A. und Depka, B. (1997)** Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **400** (3), 359 – 362
- Tyystjärvi, E. und Aro, E.-M. (1996)** The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2213 – 2218
- Urban, M. (1998)** Das Lichtstressprotein ELIP in *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Universität Hannover
- Valvekens, D., Van Montagu, M. und Van Lijsebettens, M. (1988)** Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5536 – 5540
- Van Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R. und Van Montagu, M. (1991)** Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theor Appl Genet* **81**, 277 – 284
- Von Wettstein, D., Gough, S. und Kannangara, C.G. (1995)** Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1039 – 1057
- Walters, R.G., Ruban, A.V. und Horton, P. (1994)** Higher plant light-harvesting complexes LHCIIa and LHCIIc are bound by dicyclohexylcarbodiimide during inhibition of energy dissipation. *Eur. J. Biochem.* **226**, 1063 – 1069

**Walters, R.G., Ruban, A.V. und Horton, P. (1996)** Identification of proton-active residues in a higher plant light-harvesting complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14204 – 14209

**Wedel, N., Klein, R., Ljungberg, U., Andersson, B. und Herrmann, R.G. (1992)** The single-copy gene *psbS* codes for a phylogenetically intriguing 22 kDa polypeptide of photosystem II. FEBS Lett **314**, 61 - 66

**Wierstra, I. und Klopstech, K (2000)** Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley. Plant Physiol. **124**, 833 - 844

**Winkel, T. und Rambal, S. (1993)** Influence of water stress on grapevines growing in the field: from leave to whole-plant response. Aust. J. Plant Physiol. **20**, 143 – 157

**Young, A.J. (1993)** Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. Carotenoids in Photosynthesis, Chapman and Hall, London, 16 - 71

## Lebenslauf

Name Melanie Schröder  
Geburtsdatum 21. 08. 1974  
Geburtsort Hannover

### **Schulbildung:**

Aug. 1981 – Juli 1985 Grundschule Eichendorffschule, Hannover  
Aug. 1985 – Juli 1987 Orientierungsstufe Ludwig-Windthorst-Schule, Hannover  
Aug. 1987 – Juli 1994 Gymnasium St- Ursula-Schule, Hannover  
Abitur

### **Hochschulstudium:**

Okt. 1994 – März 2001 Studium der Diplom-Biologie an der Universität Hannover  
Studienschwerpunkte: Botanik, Zellbiologie und Bodenkunde  
Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Vorkommen von Diffusionsbarrieren im Apoplasten der Kressewurzel“ am Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Abschluss: Diplom-Biologin

#### Veröffentlichung:

Schröder M., Kunz U., Stelzer R., and Lehmann H. ( 2002 ).  
On the evidence of a diffusion barrier in the outer cortex apoplast of cress-roots ( *Lepidium sativum* ), demonstrated by analytical electron microscopy. J. Plant Physiol. 159. 1197-1204

### **Promotionsstudium:**

April 2001 –Dez. 2004 Anfertigung der vorgelegten Dissertation am Institut für Botanik der Universität Hannover in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Kloppstech