

<u>1. Theoretischer Hintergrund</u>	2
<u>1.1 Der Ort der Photosynthese – die Chloroplasten</u>	3
<u>1.1.1 Photosynthese-Pigmente</u>	4
<u>1.2 Die Lichtreaktion</u>	7
<u>1.2.1 Die Photosysteme</u>	7
<u>1.2.2 Die Elektronentransportketten</u>	9
<u>1.3 Die Dunkelreaktion</u>	13
<u>1.4 Photorespiration (Lichtatmung)</u>	14
<u>1.5 Wege zur CO₂-Fixierung</u>	15
<u>1.5.1 Die C₃-Pflanzen</u>	15
<u>1.5.2 Die C₄-Pflanzen</u>	15
<u>1.5.3 Die CAM-Pflanzen</u>	16
<u>1.6 Aufgabenstellung des Versuches</u>	17
<u>2. Material und Methoden</u>	18
<u>3. Ergebnisse</u>	19
<u>4. Diskussion</u>	21
<u>5. Weiterführende Fragen</u>	23
<u>5.1 Welches Phänomen beschreibt der Emerson-Effekt?</u>	23
<u>5.2 Wie ist die Struktur von RUBISCO, was ist das Besondere?</u>	23
<u>5.3 Was ist NADP?</u>	23
<u>5.4 Ist Licht zur CO₂-Fixierung notwendig?</u>	23
<u>5.5 Was sind CAM-Pflanzen?</u>	24
<u>5.6 Warum taucht in der Reaktionsgleichung der Photosynthese Wasser auf beiden Seiten der Gleichung auf?</u>	24
<u>5.7 Woher stammt der freigesetzte Sauerstoff und woher weiß man das?</u>	24
<u>5.8 In welchen Organismen findet man die einfachste Form der Photosynthese?</u>	24
<u>6. Zusammenfassung</u>	25

1. Theoretischer Hintergrund

Für das Leben auf der Erde ist die Umwandlung von Strahlungsenergie der Sonne in für die Lebewesen nutzbare Energie essentiell.

Den Prozess, bei dem durch chlorophyllhaltige Lebewesen unter Lichteinwirkung organische Stoffe gebildet werden, nennt man **Photosynthese**. Bei der Photosynthese wird molekularer Sauerstoff gebildet, der dann wieder von anderen Lebewesen genutzt werden kann.

Zur dieser direkten Nutzung der Lichtenergie sind nur die **photoautotrophen Organismen** befähigt, die als Autotrophe die von ihnen benötigte Energie aus der Umsetzung anorganischer Substanzen gewinnen (Assimilation). Die heterotrophen Organismen hingegen können organische Stoffe nicht selbst produzieren, sondern müssen auf organische Stoffe zurückgreifen, die andere Organismen hergestellt haben.

Die Gesamtbilanz der Photosynthese lautet:



$$\Delta G = +2872 \text{ kJ/mol}$$

Damit die Strahlungsenergie genutzt werden kann, muss sie erst absorbiert und dann in chemische Energie umgewandelt werden. Diese Umwandlung von Strahlungs- in chemische Energie nennt man **Lichtreaktion**. Hier entstehen Reduktionsäquivalente ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) und Energie in Form von ATP, die dann in der darauf folgenden Synthese von Kohlenhydraten, Proteinen und anderen organischen Substanzen verbraucht werden. Diese Syntheseschritte werden unter dem Begriff **Dunkelreaktion** zusammengefasst, da hier das Licht nur indirekt benötigt wird. Auf Licht- und Dunkelreaktion wird in den Abschnitten 1.2 und 1.3 eingegangen.

1.1 Der Ort der Photosynthese – die Chloroplasten

Die Photosynthese findet in speziellen Plastiden, den **Chloroplasten** statt; diese kommen hauptsächlich in den Blättern oder Blattäquivalenten der Pflanzen vor und befinden sich dort in den Mesophyllzellen. In einer Mesophyllzelle können etwa 50 - 200 Chloroplasten vorkommen. Chloroplasten haben einen Durchmesser von $5\ \mu\text{m}$ und sind ca. $2\text{-}3\ \mu\text{m}$ dick, sie enthalten den grünen Farbstoff Chlorophyll, weitere Farbpigmente und Enzyme, die der photosynthetischen Nährstoffproduktion dienen. Der Inhalt der Chloroplasten ist vom Cytoplasma durch eine Doppelmembran mit einem schmalen Intermembranraum getrennt. Im Inneren der Chloroplasten befinden sich scheibenförmig abgeflachte Vesikel, die **Thylakoide**, die in manchen Teilen übereinander gelagert sind und die sogenannten **Grana** bilden. Das Thylakoidsystem ist in eine dickflüssige Substanz, das **Stroma**, eingebettet. Die zu Grana aufgestapelten Thylakoide werden als Granathylakoide, die sie verbindenden, im Stroma liegenden Thylakoide werden als Stromathylakoide bezeichnet.

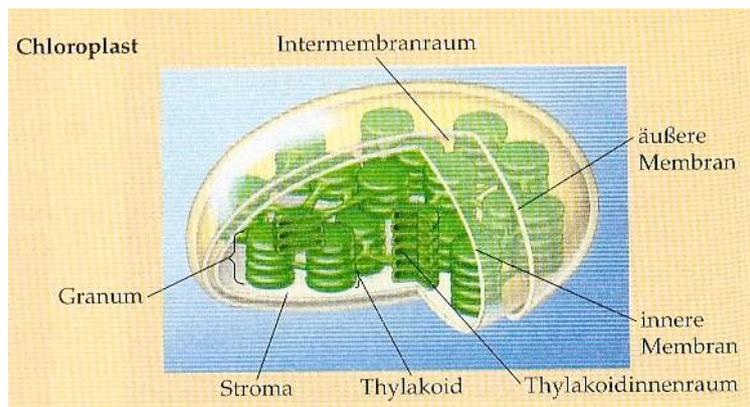


Abb.1: Aufbau eines Chloroplasten (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

Durch die Thylakoidmembran wird das Innere des Chloroplasten in zwei Kompartimente, das Thylakoidlumen und das Stroma, eingeteilt. Mit Hilfe dieser Kompartimentierung wandeln die Chloroplasten während der Photosynthese Lichtenergie in chemische Energie um.

Das Chlorophyll ist das häufigste Pigment im Chloroplasten, es absorbiert blaues (ca. 480nm) und rotes (ca. 700nm) Licht und reflektiert grünes Licht (530nm). Aus diesem Grund sehen die Blätter der Pflanzen für uns grün aus.

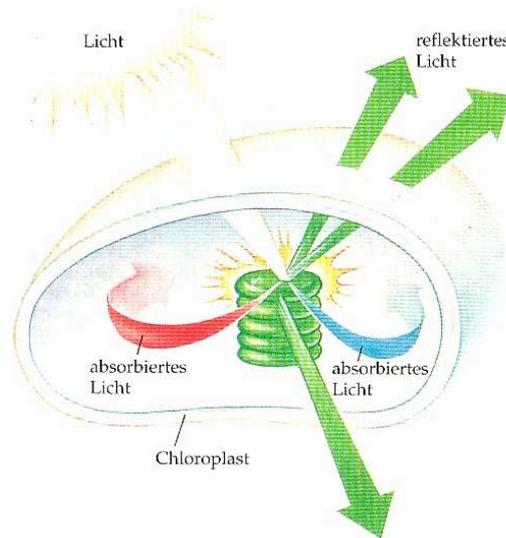


Abb.2: Wechselwirkung von Licht und Chloroplast (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

1.1.1 Photosynthese-Pigmente

In den Pflanzen haben sich unterschiedliche Pigmente entwickelt, die in der Photosynthese eine wichtige Rolle spielen. Diese Pigmente wollen wir im Folgenden vorstellen.

Chlorophyll

Die Chlorophylle a und b bestehen aus einem hydrophilen Porphyrinringsystem mit Mg^{2+} als Zentralatom, das aus vier Pyrrolringen aufgebaut ist, und einem Phytol-„Schwanz“.

Im Ringsystem finden sich viele konjugierte Doppelbindungen, welche für die Farbigkeit des Moleküls verantwortlich sind. Die Chlorophylle werden nach den Substituenten, die an den Pyrrolringen sitzen, unterteilt:

Chlorophyll a und b unterscheiden sich lediglich dadurch, dass das Chlorophyll a am 2.Pyrrolring eine Methylgruppe und das Chlorophyll b an derselben Stelle eine Aldehydgruppe hat.

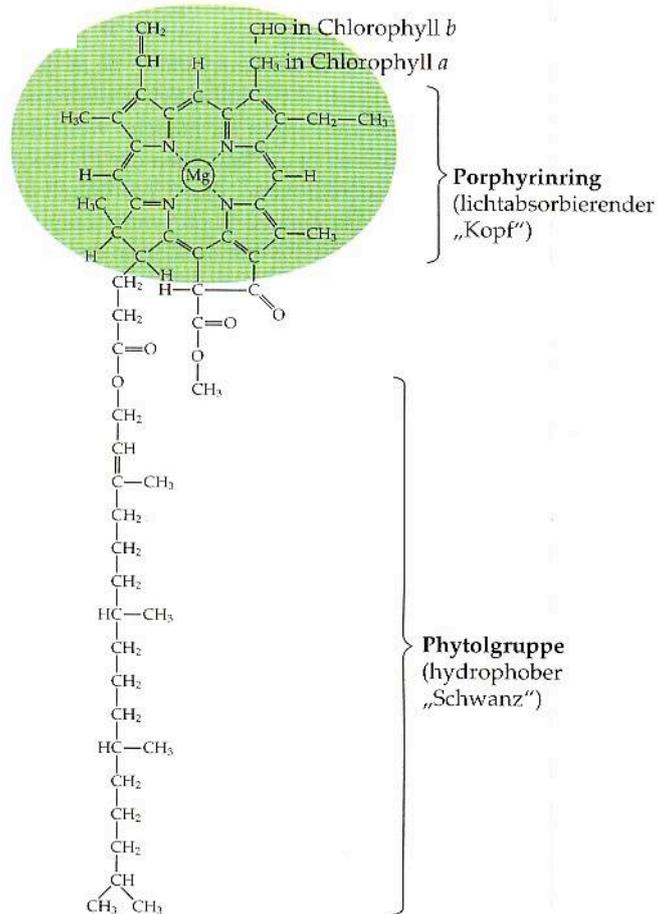


Abb.3: Chlorophyll-Struktur (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

Den gleichen Aufbau wie die Chlorophylle haben die **Phäophytine**, jedoch besitzen sie kein Zentralatom und sind deshalb ungeladen.

Carotinoide

Die Carotinoide gehören zu den Tetraterpenen (40 C-Atome) und lassen sich in Carotine, Xanthophylle, Phycobiline und Carotinoidsäuren einteilen.

Carotine

Carotine sind Kohlenwasserstoffe aus 40 C-Atomen, die, je nach Carotin, unterschiedlich stark dehydriert sind. Die Carotine sind gelb oder orange gefärbt, wobei die Färbung von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen abhängig ist.

Aus Carotinen mit einem β -Ionenring entsteht 1 Molekül Vitamin A, aus einem Carotin mit zwei β -Ionenringen entstehen 2 Moleküle Vitamin A.

Wie oben schon erwähnt, setzt sich die Photosynthese aus zwei Reaktionen, der Licht- und der Dunkelreaktion zusammen, auf die nun näher eingegangen werden soll:

1.2 Die Lichtreaktion

In der Lichtreaktion wandeln die Pflanzen die Strahlungsenergie der Sonne in chemische Energie um, die sie dann nützen können.

Auf die einzelnen Bestandteile und Abläufe werden wir nun näher eingehen:

1.2.1 Die Photosysteme

Unter Photosystemen versteht man die Lichtsammel-Komplexe (light harvesting complex, auch Antennenkomplex) und Lichtsammel-Fallen (trapping center), die sich in der Thylakoidmembran befinden. Sie werden, je nach ihrem Absorptionsmaximum, als Photosystem I (700nm) und Photosystem II (680nm) bezeichnet. Das Photosystem I (PS I) befindet sich in den Stromathylakoiden, das Photosystem II (PS II) in den Granathylakoiden.

Ein LHC besteht aus mehreren hundert Farbpigmenten, und da in einem Photosystem so viele und verschiedene Pigmentmoleküle vorhanden sind, kann Licht auf einer sehr großen Oberfläche und in einer großen Wellenlängen-Bandbreite aufgefangen werden.

Jedes Photosystem besteht aus einem Reaktionszentrum (bestehend aus zwei Chlorophyll a- Molekülen und einem primären Elektronen-Akzeptor) das von mehreren LHCs umgeben ist.

Absorbiert ein Pigmentmolekül eines LHCs ein Photon, wird die dabei gewonnene Energie über weitere Pigmentmoleküle bis zu zwei bestimmten Chlorophyll a- Molekülen (Dimer) weitergeleitet, die sich im Reaktionszentrum befinden.

Dort befindet sich neben den Chlorophyll a – Molekülen ein weiteres Molekül, der primäre Elektronen-Akzeptor. Auf diesen werden in einer Redox-Reaktion die Elektronen der Chlorophylle übertragen. Das Elektron wird durch Lichteinwirkung auf ein höheres Energieniveau angehoben und vom primären Elektronen-Akzeptor eingefangen, bevor es im Chlorophyll wieder in seine ursprüngliche Position zurückfallen kann (wäre der Elektronen-Akzeptor nicht vorhanden, würde das Chlorophyll fluoreszieren).

Auf der Thylakoidmembran der Chloroplasten gibt es zwei verschiedene Photosysteme, die sich in ihren primären Elektronen-Akzeptoren unterscheiden. Beim Photosystem I ist dies

das Phäophytin, beim Photosystem II ist er noch nicht bekannt. Auch die Chlorophyllpaare im Reaktionszentrum unterscheiden sich, das Chlorophyll des Photosystems I absorbiert am besten Licht einer Wellenlänge von 700nm (dunkelrot), das Chlorophyll des Photosystems II absorbiert bevorzugt Licht bei 680nm (rot). Demnach werden die beiden Chlorophyllpaare auch als P700 und P680 bezeichnet.

Chemisch gesehen sind P700 und P680 identisch, einzig ihre Bindung an unterschiedliche Proteine in der Thylakoidmembran beeinflusst die Verteilung der Pigmente, worauf dann das unterschiedliche Absorptionsverhalten zurückzuführen ist.

Tab.1: Unterschiede zwischen den beiden Photosystemen

	Photosystem 1	Photosystem 2
Reaktionszentrum	Chlorophyll a	Chlorophyll a
Absorptions-Maximum	700nm	680nm
LHCs	Chlorophyll a und b, Carotinoide (Carotine) und Phycobilline	Chlorophyll a und b, Carotinoide (Xanthophylle) und Phycobilline
Vorkommen	Stroma-Thylakoid	Grana-Thylakoid

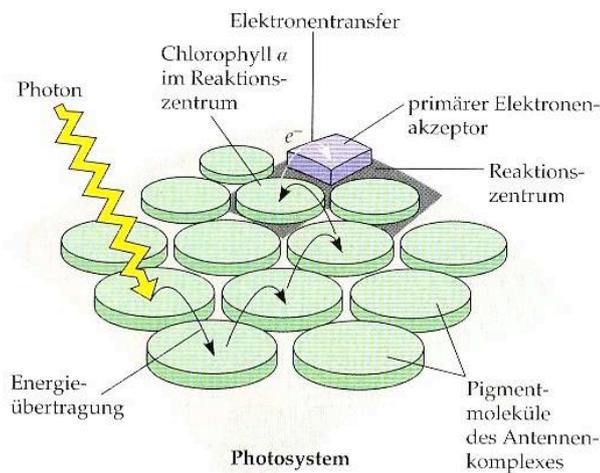


Abb.5: Energietransfer in einem Photosystem (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

Emerson-Effekt

Die beiden Photosysteme sind voneinander abhängig, dieser Zustand wird durch den Emerson-Effekt beschrieben: werden Algen mit Licht zweier verschiedener Wellenlängen (680nm und 700nm) bestrahlt, kann man zwei unterschiedliche Syntheseraten messen. Bestrahlt man die Algen aber mit Licht beider Wellenlängen gleichzeitig, ist die gemessene Photosyntheserate höher als die durch Addieren der beiden Werte bei Bestrahlung mit nur je einer Wellenlänge. Dieser von Emerson 1957 entdeckte Effekt beruht darauf, dass das vom PS I absorbierte dunkelrote Licht nur dann optimal zur Photosynthese genutzt werden kann, wenn auch kürzerwelliges Licht (vom PS II) absorbiert wird.

1.2.2 Die Elektronentransportketten

Durch die Lichteinstrahlung werden die beiden Photosysteme in der Thylakoidmembran in einen energiereichen Zustand versetzt, mit dieser Energie wird dann die Synthese von NADPH und ATP angetrieben. Essentiell für diese Energieumwandlung ist der Elektronentransport über die Photosysteme und andere in der Thylakoidmembran eingelagerte Moleküle. Für diesen Elektronentransport gibt es zwei Wege:

Nichtzyklischer Elektronentransport

Beim nichtzyklischen Elektronentransport, der bei der Photosynthese vorherrscht, werden die Elektronen, die von den Pigmentmolekülen abgegeben wurden, nicht zu ihrem Ausgangsort zurücktransportiert.

Wird vom PS II Licht absorbiert, fängt der primäre Elektronen-Akzeptor die angeregten Elektronen des Reaktionszentrums P680 ein. Von einem P680-Chlorophyll stammt dabei ein Elektron. Da das Chlorophyll nun oxidiert ist, ist es ein sehr starkes Oxidationsmittel und möchte seine Elektronenlücken wieder auffüllen.

Die beiden abgegebenen Elektronen werden durch zwei Elektronen ersetzt, die ein Enzymkomplex (**wasserspaltender Komplex**) einem Wassermolekül entzogen hat. Diese lichtinduzierte Spaltung des Wassers bezeichnet man als **Photolyse**, hierbei werden zwei Wassermoleküle in vier Protonen und ein freigesetztes Sauerstoffmolekül zerlegt:



Die auf ein höheres Energieniveau gebrachten Elektronen fließen dann über eine Elektronentransportkette vom primären Elektronen- Akzeptor des PS II zum PS I.

Die Elektronentransportkette zwischen PS II und PS I besteht aus einem Plastochinon-Molekül, einem Komplex aus den Cytochromen b_6 und f (Cytochromkomplex) und einem kupferhaltigen Plastocyanin-Molekül.

Das Energiegefälle, das die Elektronen in der Transportkette durchlaufen, wird von der Thylakoidmembran zur **ATP-Synthase** verwendet. Da diese Art der ATP-Synthese lichtgetrieben ist und im nichtzyklischen Elektronentransport vorkommt, bezeichnet man sie als **nichtzyklische Photophosphorylierung** (siehe Photophosphorylierung durch Chemiosmose).

Haben die Elektronen das unterste Energieniveau erreicht, füllen sie die Elektronenlücken des P700 im PS I auf. Diese Elektronenlücken entstehen, genau wie beim PS II, wenn die Elektronen durch Lichtenergie zum primären Elektronen- Akzeptor getrieben werden. Der primäre Elektronen- Akzeptor des PS I gibt die Elektronen dann an ein FeS-Molekül weiter, von diesem gelangen sie auf ein eisenhaltiges Ferredoxin-Molekül. Von diesem Protein werden sie anschließend durch das Enzym NADP^+ -Reductase auf das NADP^+ übertragen (Redoxreaktion), es entsteht **$\text{NADPH} + \text{H}^+$** , das im Calvin-Zyklus als Reduktionsmittel für die Zuckersynthese verwendet wird (2. Elektronentransportkette).

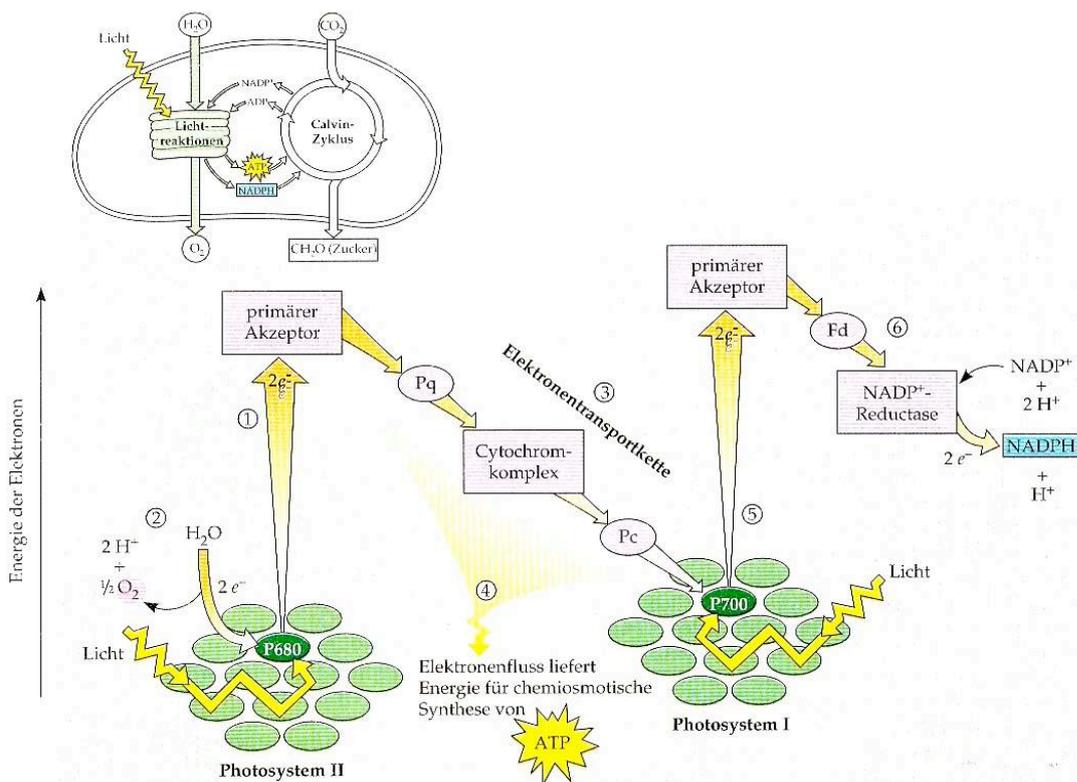


Abb.6: Nichtzyklischer Elektronentransport (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

Photophosphorylierung durch Chemiosmose

Allgemein versteht man unter der Photophosphorylierung die **Bildung von ATP** aus ADP und Phosphat. Dazu ist eine protonenmotorische Kraft (Energie) nötig, die in der Lichtreaktion der Photosynthese von der Thylakoidmembran der Chloroplasten erzeugt wird.

Ein in die Thylakoidmembran integriertes Element der Elektronentransportkette pumpt Protonen durch die Membran: das Plastochinon nimmt, gleichzeitig mit den Elektronen vom PS II, auch Protonen aus dem Stroma auf, es wird zu Plasthydrochinon. Wenn das Plasthydrochinon die Elektronen an den Cytochromkomplex abgibt, gibt es die Protonen in den Thylakoidinnenraum ab, so entsteht ein Protonengradient an der Thylakoidmembran. Dieser pH-Gradient ist ziemlich groß: wird der Chloroplast beleuchtet, sinkt der pH-Wert im Thylakoidlumen auf ca. 5 ab, im Stroma steigt er auf ca. 8 an. Wird der Chloroplast nicht mehr beleuchtet, verschwindet auch der pH-Gradient, er wird jedoch bei erneuter Beleuchtung sehr schnell wieder aufgebaut.

In die Thylakoidmembran eingelagert ist auch eine ATP-Synthase, die den Protonengradienten an der Membran nutzt, um ATP aus ADP und P zu synthetisieren, hierzu verwendet sie die Protonen aus der Photolyse und vom Plasthydrochinon.

zweitere Kette sind noch erheblich mehr Forschungsarbeiten erforderlich. Abbildung 10.15 zeigt ein relativ grobes

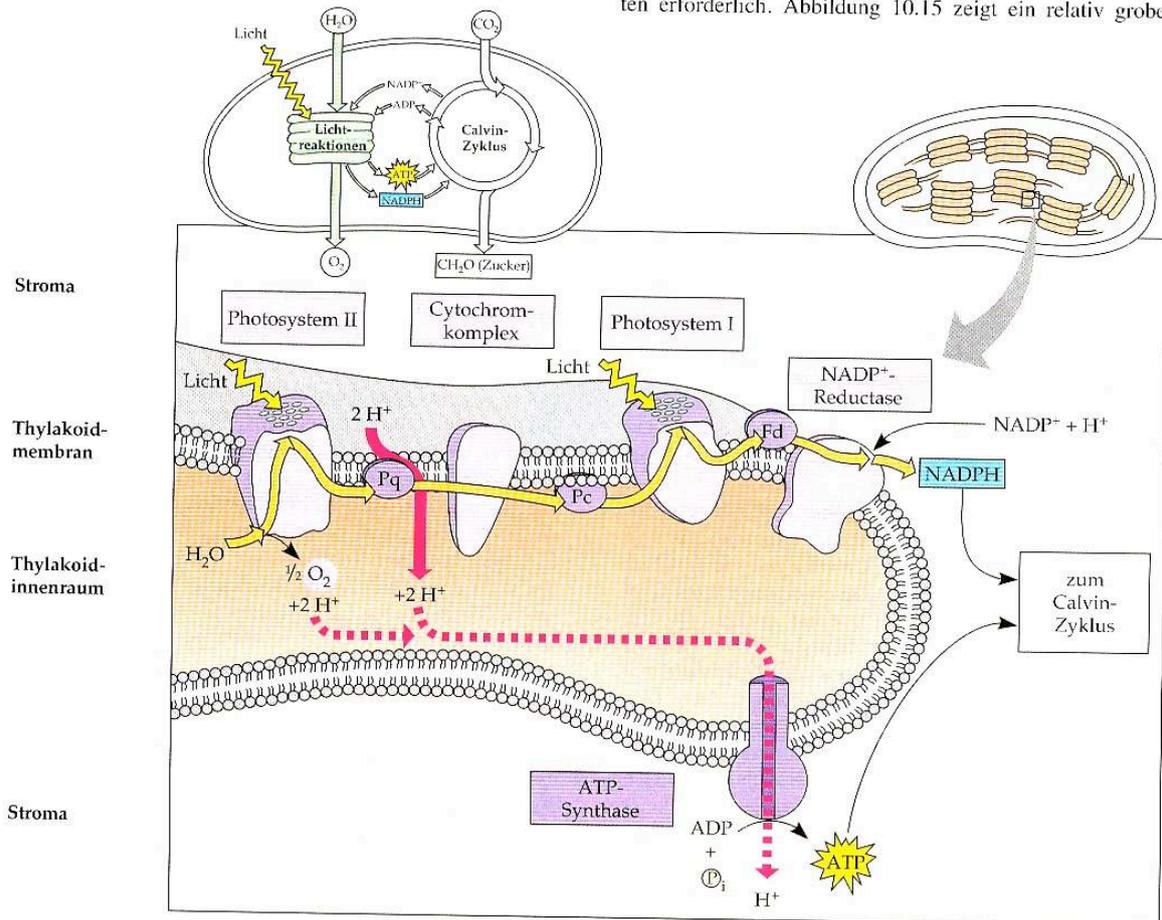


Abb.7: Vereinfachtes Modell des Thylakoidmembranaufbaus (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

Zyklischer Elektronentransport

Unter bestimmten Bedingungen können die Chloroplasten auf einen weiteren Elektronentransportweg umschalten. Bei diesem zyklischen Elektronentransport kehren die Elektronen wieder über ein Ferredoxin-Molekül und Cytochrome zum Plastochinon der ersten Elektronentransportkette zurück; also wird auf diesem Weg weder NADPH gebildet, noch O_2 freigesetzt, jedoch ATP wird gebildet.

Im nichtzyklischen Elektronentransport entstehen äquimolare Mengen ATP und NADPH, doch der angeschlossene Calvin-Zyklus verbraucht mehr ATP als NADPH. Man vermutet, dass der NADPH-Gehalt in den Chloroplasten entscheidend dafür ist, ob die Elektronen den zyklischen oder nichtzyklischen Weg einschlagen. Wenn die ATP- Konzentration im Chloroplasten abnimmt und nicht mehr ausreichend für den Calvin-Zyklus vorhanden ist, verlangsamt sich dieser. Dadurch steigt die NADPH- Konzentration im Chloroplasten an, woraufhin bevorzugt der nichtzyklische Weg abläuft ÷ die ATP- Konzentration nimmt wieder zu.

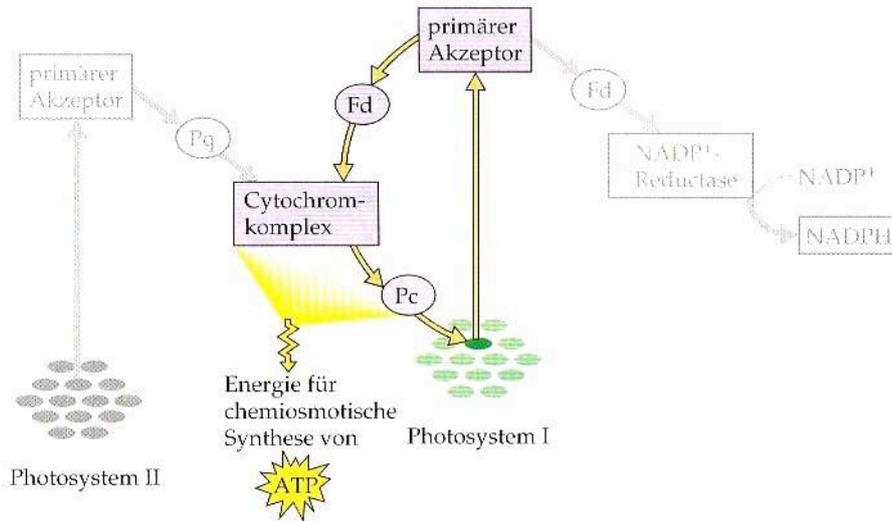


Abb.8: Zyklischer Elektronentransport (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

1.3 Die Dunkelreaktion

Während die Lichtreaktion der Photosynthese primär dazu dient, Energie in Form von ATP und die Reduktionsäquivalente (NADPH) zu bilden, läuft in der Dunkelreaktion der eigentliche Syntheseprozess ab. Dieser beinhaltet die Reduktion und Fixierung von CO_2 . Der CO_2 -Rezeptor ist das Ribulose-1,5-diphosphat, und als Katalysator dient das Enzym **RUBISCO** (Ribulosebisdiphosphatcarboxylase). Auf Grund seiner Wichtigkeit wird es auch als **Schlüsselenzym** des **Calvin-Zyklus** bezeichnet.

Nach der Fixierung des CO_2 in Ribulose-1,5-bisphosphat (C_5 -Körper) entsteht ein instabiles Zwischenprodukt, welches in 2 Moleküle 3-Phosphoglycerat (C_3 -Körper) zerfällt. Das 3-Phosphoglycerat reagiert mit dem ATP aus der Lichtreaktion zu der energiereichen 1,3-Diphosphoglycerinsäure.

Diese energiereiche aktivierte Verbindung ist die Grundlage der weiteren Prozesse: von der 1,3-Diphosphoglycerinsäure wird das energiereiche, gebundene Phosphat in einer Reduktionsreaktion abgespalten und es entsteht 3-Phosphoglycerinaldehyd (G3P), dabei wird NADPH (aus der Lichtreaktion) verbraucht.

2 der G3P-Moleküle werden nun frei und können zu Fructose-1,6-bisphosphat reagieren, die dann zu Fructose-6-phosphat und weiteren Zuckern umgebaut werden kann. Die restlichen G3P-Moleküle dienen dazu, den Akzeptor Ribulose-1,5-bisphosphat zu regenerieren.

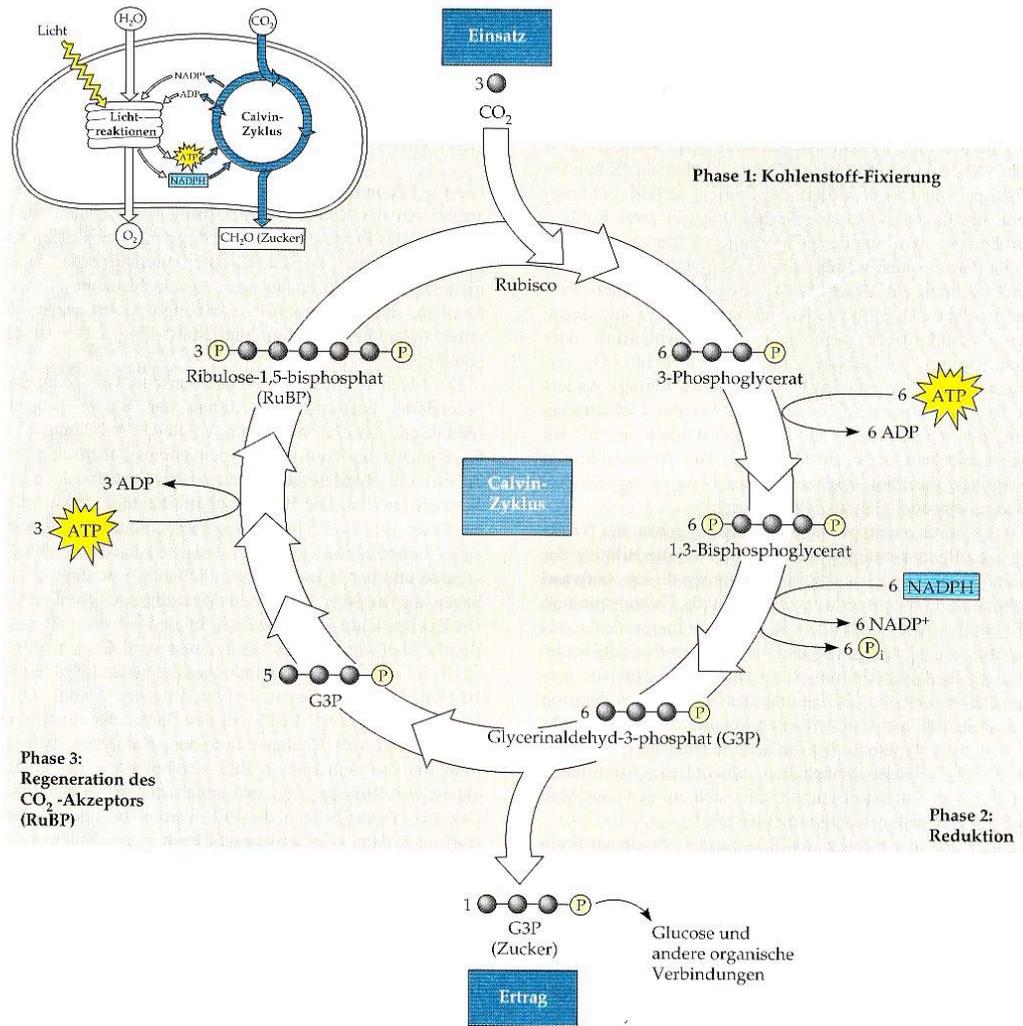


Abb.9: Der Calvin-Zyklus (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

1.4 Photorespiration (Lichtatmung)

Unter Photorespiration versteht man die eng mit der Photosynthese verknüpfte Reaktion von Ribulose-1,5-bisphosphat mit O₂ (statt mit CO₂), durch die CO₂, Serin und NH₃ entstehen.

Die Photorespiration steht nicht in Zusammenhang mit der Zellatmung in den Mitochondrien, da zwar O₂ verbraucht, aber kein ATP gebildet wird.

Da die Photorespiration einen Teil der Photosyntheseprodukte wieder abbaut, vermindert sie den Photosynthesegewinn.

1.5 Wege zur CO₂-Fixierung

1.5.1 Die C₃-Pflanzen

Unter den C₃-Pflanzen sind diejenigen Pflanzen zusammengefasst, bei denen Ribulose-1,5-bisphosphat der einzige organische CO₂-Akzeptor ist. Die Bezeichnung C₃ leitet sich aus der C-Atomenanzahl von 3 der ersten Stoffwechselprodukte ab.

Reis, Weizen und Soja sind Beispiele für C₃-Pflanzen, sie schließen an heißen, trockenen Tagen ihre Stomata, wodurch die Wasserabgabe reduziert wird. Hier entsteht das Problem, dass der CO₂-Gehalt in den Blättern sinkt und dadurch der Calvin-Zyklus verlangsamt abläuft, die Photosynthese läuft ineffizient ab. Dieser Effekt wird durch die Photorespiration noch zusätzlich verstärkt.

Durch den Einbau von O₂ statt CO₂ durch Rubisco wird das Ribulose-1,5-bisphosphat zu Glycolsäure oxidiert, die dann in den Peroxisomen zu CO₂ aus O₂ oxidiert wird. So entstehen wertvolle Nährstoffe noch ATP, also ist dieser Weg für die Pflanzen völlig unökonomisch und verhindert eine effiziente Photosynthese bei niedrigen CO₂-Partialdrucken.

1.5.2 Die C₄-Pflanzen

Die C₄-Pflanzen unterscheiden sich von den C₃-Pflanzen durch ihren Weg der CO₂-Fixierung und ihre damit zusammenhängende Morphologie:

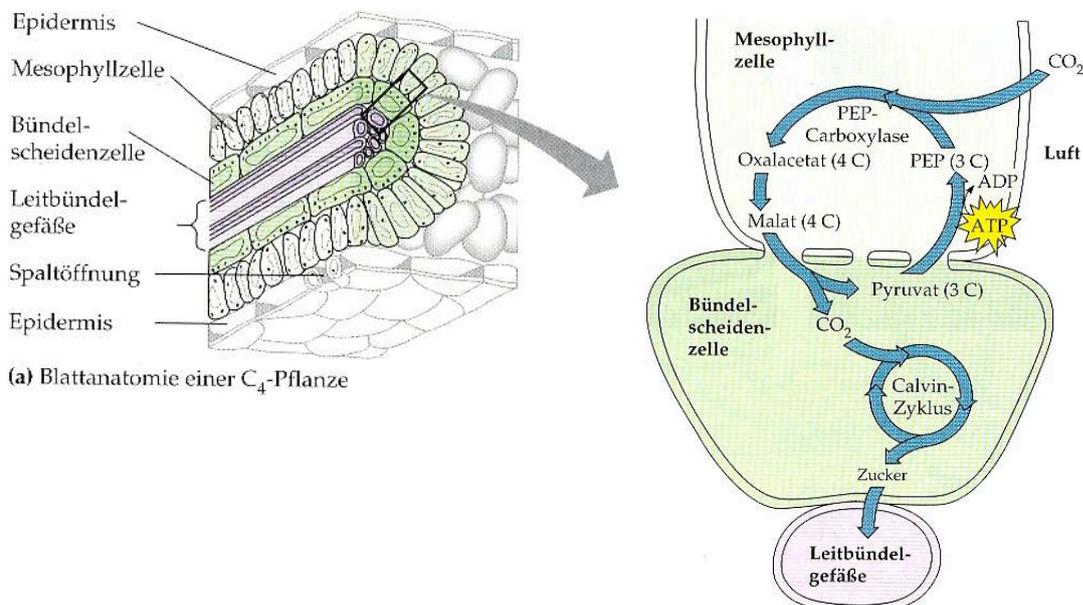


Abb.10: Blattanatomie der C₄-Pflanzen (Campbell: Biologie, 2.korrigierter Nachdruck, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 2000)

Sie haben zwei verschiedene Arten von photosynthetisch aktiven Zellen in ihren Blättern: Scheidenzellen, die um die Leitbündel gelagert sind, und Mesophyllzellen, die ihrerseits die Scheidenzellen umgeben. Diese beiden Zellarten haben unterschiedlich gebaute Chloroplasten (**Chloroplasten-Dimorphismus**): die Scheidenzellen sind durch große stärkereiche Chloroplasten, ein weitgehendes Fehlen von Granathylakoiden und einem reduzierten nichtzyklischen Elektronentransport (kein PS II, da keine Granathylakoide) gekennzeichnet, während die Chloroplasten in den Mesophyllzellen kleiner sind und beide Photosystem besitzen.

In den C₄-Pflanzen gibt es kaum Photorespiration, und um in ihrer heißen, trockenen Umgebung überleben zu können, haben die C₄-Pflanzen einen weiteren CO₂-Fixierungsmechanismus, der dem Calvin-Zyklus vorgeschaltet ist.

In den Mesophyllzellen befindet sich das Enzym **PEP-Carboxylase**, das die Anlagerung von CO₂ an Phosphoenolpyruvat (PEP) katalysiert. Dadurch entsteht ein C₄-Körper (Oxalacetat), der diesem Weg den Namen gegeben hat. Die Dicarbonsäure Oxalacetat wird in Malat umgewandelt, das dann in die Scheidenzellen transportiert wird. Hier wird das gebundene CO₂ frei und in den Calvin-Zyklus eingeschleust, das übrig bleibende Pyruvat wird wieder in die Mesophyllzellen transportiert und dort unter ATP-Verbrauch zum Akzeptor PEP oxidiert. Der Vorteil der PEP-Carboxylase ist, dass sie nur CO₂ und nicht auch O₂ wie RUBISCO bindet, außerdem ist ihre Affinität zu CO₂ sehr hoch, sie kann auch bei niedrigem CO₂-Partialdruck arbeiten.

Das Optimum der Enzyme der C₄-Pflanzen liegt bei 30-40°C, das der Enzyme der C₃-Pflanzen bei 15-20°C, die C₄-Pflanzen sind also optimal an ihren Standort angepasst. Außerdem haben die C₄-Pflanzen Malat und Aspartat als CO₂-Speicher und können so Zeiten mit wenig CO₂-Partialdruck, zum Beispiel wenn sie ihre Stomata geschlossen halten, leichter überdauern.

1.5.3 Die CAM-Pflanzen

Pflanzen wie Kakteen, sukkulente Crassulaceen oder Bromeliaceen haben einen weiteren Weg erfunden, an ihren extrem heißen und trockenen Standorten zu überleben. Die Photosynthese ist an diesen Standorten, wenn sie nach dem „normalen“ Weg verläuft, sehr ineffizient und unökonomisch für die Pflanzen, deswegen öffnen sie nur nachts ihre Stomata und halten sie tagsüber geschlossen, verhalten sich also umgekehrt zu den anderen Pflanzen. So wird der Wasserverlust tagsüber verringert, gleichzeitig kann die Pflanze aber auch kein CO₂ mehr aufnehmen. Deshalb nimmt sie das von ihr benötigte CO₂ nachts auf und speichert es in Carbonsäure-Anionen (v.a. Malat), die in den Vakuolen der

Mesophyllzellen bis zum Sonnenaufgang gespeichert werden. Werden dann tagsüber in der Lichtreaktion ATP und NADPH gebildet, wird das gespeicherte CO₂ freigesetzt und über den Calvinzyklus in die Zuckersynthese eingeschleust.

Der Name CAM-Pflanzen kommt vom Crassulaceen-Acid-Metabolismus (CAM), den die Crassulaceen mit Carbonsäuren als Speichermolekülen betreiben.

1.6 Aufgabenstellung des Versuches

In diesem Versuch soll die Photolyse des Wassers und die Bildung von O₂ bei isolierten Chloroplasten (bei Vorhandensein eines geeigneten Elektronen- Akzeptors) untersucht werden.

Man bezeichnet diese Reaktion als **Hill- Reaktion**, da sie zum ersten Mal 1937 von R. Hill durchgeführt wurde.

In unserem Versuch wird mit dem blauen Farbstoff DCPIP (Dichlorphenolindophenol) als Elektronen- Akzeptor gearbeitet. Die Entfärbung, zu der es bei der Reduktion des Farbstoffes kommt, wird als Nachweis für die Photolyse verwendet.

Die Hill- Reaktion wird von uns *in vitro* mit 5 verschiedenen Ansätzen (gekochte Chloroplastensuspension / ungekochte, belichtete Chloroplastensuspension / ungekochte, unbelichtete Chloroplastensuspension / ungekochte Chloroplastensuspension mit DCMU / Standard) durchgeführt. So soll der Einfluss von Licht, Dunkelheit, Denaturierung der Enzyme durch Hitze und eines Hemmstoffes (DCMU) geprüft werden.

2. Material und Methoden

Zu Beginn des Versuches zerschneidet man 7 g junge Spinatblätter ohne Stiele in kleine Stücke. Die Blattstückchen werden im gekühlten Mörser mit 7 ml Saccharoselösung (als isotonisches Lösemittel) und etwas Quarzsand homogenisiert.

Das Homogenat wird durch acht Lagen angefeuchtetes Mull gepresst und anschließend 5 Minuten zentrifugiert. Man überführt nach der Zentrifugation den Überstand in ein anderes Reagenzglas und zentrifugiert erneut (10 Minuten).

Die bei der Zentrifugation gewonnenen Chloroplasten werden, um sie aufzubrechen, in 9 ml 10%iger Propylenglycollösung aufgenommen. Um auch den restlichen Quarzsand abzutrennen, wird das Gemisch aus Chloroplasten und Propylenglycol ein drittes Mal zentrifugiert (3 Minuten bei 1000 U/min).

Im Anschluss daran werden für 5 verschiedene Ansätze je zwei Reagenzgläser mit je 9 ml Puffer A (0,4 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5; 0,08 M KCl) und 1,5 ml Chloroplastensuspension vorbereitet.

Man untersucht folgende 5 Ansätze:

- (A) gekochte Chloroplastensuspension
- (B) ungekochte, belichtete Chloroplastensuspension
- (C) ungekochte, unbelichtete Chloroplastensuspension
- (D) ungekochte Chloroplastensuspension mit $2 \cdot 10^{-5}$ M DCMU
- (E) Standard

In jedes der Reagenzgläser der Ansätze (Ausnahme: Standard) werden noch 0,3 ml einer 0,1%igen Dichlorphenol-Indophenollösung (DCPIP) gegeben. Es wird keine DCPIP- Lösung zum Standard gegeben, da dieser als Nullkontrolle für die Messung im Spektralphotometer dient und aus diesem Grund keinen Farbstoff, also DCPIP, enthalten darf.

Gleich nach Zugabe der DCPIP- Lösung wird etwa eine Stunde lang alle 10 Minuten die Menge des Farbstoffes mit dem Photometer bei 600 nm gemessen.

Es ist darauf zu achten, dass der Ansatz (C) während des Versuches im Dunkeln gehalten wird.

Die Veränderung der Farbstoffmenge der einzelnen Ansätze im Laufe der Zeit soll anschließend graphisch dargestellt werden.

3. Ergebnisse

Bei den photometrischen Messungen ergaben sich für die einzelnen Lösungen folgende Werte:

Tab.2: Veränderung der Farbstoffmenge

Zeit [min]	Extinktion von Lösung A	Extinktion von Lösung B	Extinktion von Lösung C	Extinktion von Lösung D
0	0,5705	0,4670	0,5530	0,4735
10	0,7655	0,3225	0,5595	0,4980
20	0,8285	0,2020	0,6050	0,4955
30	0,8255	0,1550	0,5795	0,5135
40	0,8625	0,1395	0,5910	0,5265
50	0,8440	0,1205	0,5460	0,5370

Lösung A: gekochte Chloroplastensuspension

Lösung B: ungekochte, belichtete Chloroplastensuspension

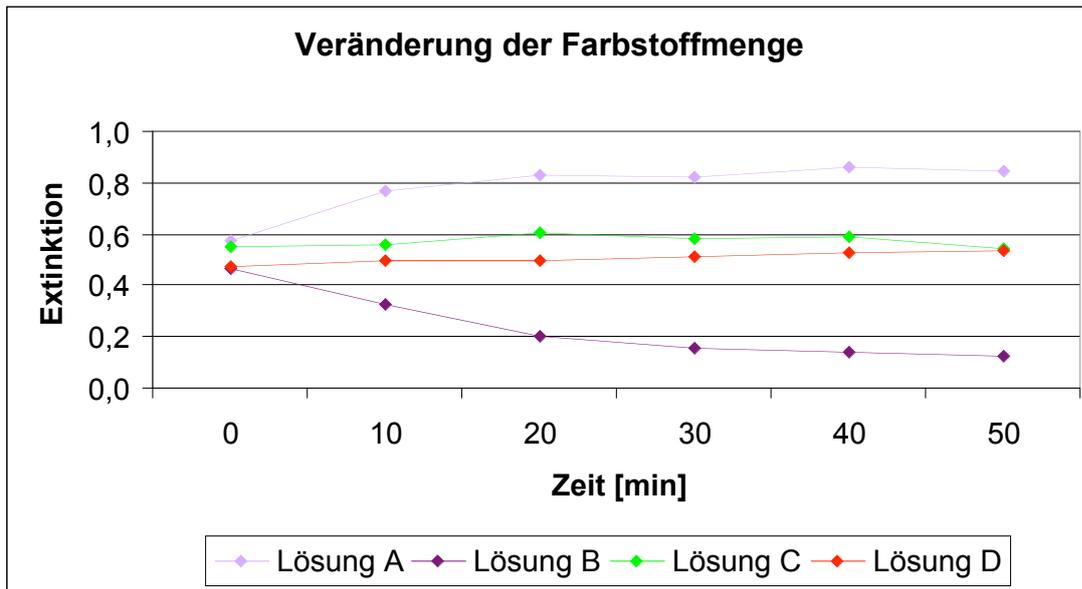
Lösung C: ungekochte, unbelichtete Chloroplastensuspension

Lösung D: ungekochte Chloroplastensuspension mit $2 \cdot 10^{-5}$ M DCMU

Die in der Tabelle aufgeführten Werte sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Werte der Einzelmessungen sind aus dem Messprotokoll (siehe Anhang) ersichtlich.

In Dia.1 ist die Veränderung der Farbstoffmenge der einzelnen Lösungen graphisch dargestellt.

Dia.1: Veränderung der Farbstoffmenge



Aus dem Diagramm ergibt sich Folgendes:

- **Lösung A:** zu Beginn der Messungen steigt die Kurve leicht an (Zunahme der Extinktionswerte), pendelt sich dann aber bei einem relativ gleichbleibenden Wert ein
- **Lösung B:** deutliche Abnahme der Extinktionswerte, also auch des Farbstoffs, im Laufe der Messungen; die Entfärbung der Lösung war auch mit bloßem Auge wahrnehmbar
- **Lösung C:** die Messungen ergeben relativ konstante Extinktionswerte (nur sehr kleine Schwankungen), was zu keinem Anstieg oder Absinken der Kurve führt
- **Lösung D:** ebenso wie bei Lösung C schwanken die gemessenen Extinktionswerte nur in einem kleinen Bereich; die gemessenen Werte ergeben also nahezu eine Gerade

4. Diskussion

Im Großen und Ganzen entsprechen die von uns ermittelten Ergebnisse den Erwartungen. Theoretisch hätten bei der ersten Messung die Extinktionswerte bei allen 4 Proben gleich sein sollen, da der zugegebene Farbstoff DCPIP noch nicht reduziert ist, sondern in der oxidierten (blauen) Form vorliegt. Es sollte also noch keine Reaktion stattgefunden haben, da die erste photometrische Bestimmung sofort nach der Zugabe des Farbstoffs durchgeführt wurde.

Dass die jeweils ermittelten Anfangswerte nicht gleich groß sind, kann zum einen dadurch erklärt werden, dass auch in dem sehr kurzen Zeitraum von der Farbstoffzugabe bis zur Messung die Lichtreaktionen bereits eingesetzt hat (Lösung B). Zum anderen ist als Fehlerquelle auch das teilweise Beschlagen der Küvetten auf Grund der gekühlten Lösungen zu nennen. Durch das Beschlagen war eine schnelle und zuverlässige Messung zum Teil nicht möglich, da die Küvetten zwischendurch immer wieder abgetrocknet werden mussten und beschlagene Küvetten den Extinktionswert natürlich stark verfälschen.

Wie oben bereits erwähnt, kommt es auf Grund der Lichtreaktion, die in der Lösung B mit dem Farbstoff als Elektronen- Akzeptor stattfindet, zur Entfärbung dieser Lösung und somit zu einer Abnahme der Extinktionswerte.

Bei den anderen drei Lösungen sollte es nicht zu einer Entfärbung kommen, da entweder durch Erhitzen alle Enzyme in der Lösung denaturiert sind (Lösung A) oder die Lichtreaktion nicht stattfinden kann, weil die Lösung im Dunkeln aufbewahrt wurde (Lösung C) oder ein Hemmstoff (DCMU) zugegeben wurde (Lösung D).

Die Kurve, die sich aus den von uns gemessenen Extinktionswerten für **Lösung B** ergibt, entspricht ganz unseren Erwartungen: man kann eine deutliche Abnahme der Extinktionswerte und somit auch der Farbstoffmenge erkennen.

Da diese Lösung sowohl unbehandelt als auch während des ganzen Versuchs dem Licht ausgesetzt war, konnte hier die Lichtreaktion (elektronenliefernde und –übertragende Prozesse) unter optimalen Bedingungen ablaufen.

Da in der **Lösung A** durch das Erhitzen alle Enzyme denaturiert sein müssten, sollten in der Theorie die Extinktionswerte bei allen Messungen gleich groß sein. Bei unseren Messungen kam es jedoch anfangs zu einer Zunahme der Werte und somit zu einem Anstieg der Kurve. Ab der dritten Messung schwanken die ermittelten Werte nur noch in einem relativ kleinen Bereich. Die Schwankung der Werte kann dadurch erklärt werden, dass es durch die Hitze

im Wasserbad zum Ausflocken der Proteine kam. Diese relativ großen Flocken, die in der Lösung schwimmen, verfälschen natürlich auch die Extinktionswerte.

Ebenso wie in Lösung A, so müssten auch in **Lösung C** die Extinktionswerte konstant bleiben. Dadurch dass die Suspension nicht belichtet wird, kann überhaupt keine Lichtreaktion stattfinden. Die von uns ermittelten Werte steigen im Laufe der Messungen leicht an (Ausnahme: 3. und 6. Messung), obwohl man eher erwarten würde, dass die Werte leicht abnehmen, da die Lösung während der Messungen zum Teil doch leicht belichtet wurde.

Eine Fehlerquelle bei dieser Suspension können Pipettierfehler sein. Beide Lösungen für die Einzelmessungen sollten theoretisch sowohl dieselbe Menge als auch die dieselbe Farbe haben. Beide von uns vorbereiteten Suspensionen hatten aber eine deutlich unterschiedliche Menge und Farbe. Daher lassen sich auch die stark voneinander abweichenden Werte der Einzelmessungen (siehe Messprotokoll) erklären.

Aus den gemessenen Extinktionswerten bei **Lösung D** ergibt sich annähernd eine Gerade, was ganz unseren Erwartungen entspricht. Die einzelnen Messwerte schwanken nur in einem sehr kleinen Bereich.

Da der Hemmstoff DCMU die Elektronenübertragung blockiert, kann in dieser Suspension keine Lichtreaktion stattfinden, was bedeutet, dass keine Entfärbung und somit auch keine Abnahme der Extinktionswerte erfolgen kann.

5. Weiterführende Fragen

5.1 Welches Phänomen beschreibt der Emerson-Effekt?

Emerson hat Algen einmal mit Licht der Wellenlänge 680nm und einmal mit Licht der Wellenlänge 700nm bestrahlt und jeweils die Photosyntheserate gemessen. Die Summe aus beiden Syntheseraten ist jedoch niedriger als der Wert, den man erhält, wenn man die Algen gleichzeitig mit Licht der Wellenlängen 680 und 700nm bestrahlt. Aus diesem Ergebnis kann man ableiten, dass es zwei Photosysteme gibt, die sich gegenseitig unterstützen.

5.2 Wie ist die Struktur von RUBISCO, was ist das Besondere?

RUBISCO (Ribulose-2-phosphat-carboxylase) ist das Enzym, das die CO₂-Fixierung im Calvin-Zyklus katalysiert. Es kann aber neben CO₂ auch O₂ fixieren, dies spielt bei der Photorespiration eine wichtige Rolle.

RUBISCO besteht aus acht kleinen Untereinheiten, die im Kerngenom codiert sind, und acht großen Untereinheiten, die im Plastidengenom codiert sind.

5.3 Was ist NADP?

Hinter der Abkürzung NADP versteckt sich das Molekül Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat. Dieses Molekül kommt in einer oxidierten (NADP⁺) und einer reduzierten (NADPH+H⁺) Form vor und dient der Zelle als Protonen- oder Elektronen-Überträger bei räumlich getrennten Redox-Reaktionen.

5.4 Ist Licht zur CO₂-Fixierung notwendig?

Nein. CO₂ wird in der Dunkelreaktion fixiert, hierfür sind die Energie in Form von ATP und die Reduktionsäquivalente notwendig, die in der Lichtreaktion gebildet werden. Die Dunkelreaktion selber ist also nur indirekt vom Licht abhängig, sie kann auch im Dunkeln stattfinden, benötigt aber die Produkte der Lichtreaktion.

5.5 Was sind CAM-Pflanzen?

Als CAM-Pflanzen werden Pflanzen bezeichnet, die einen weiteren Weg zur CO₂-Fixierung entwickelt haben, da sie an extrem heißen und trockenen Standorten wachsen: sie öffnen ihre Stomata nur nachts und halten sie tagsüber geschlossen (Siehe Abschnitt 1.5.3 CAM-Pflanzen). Die Crassulaceae sind eine Familie, die diesen Weg betreibt, sie haben als Speichermoleküle Carbonsäuren. Nach dem Crassulaceae-Acid-Metabolismus werden diese Pflanzen als CAM-Pflanzen bezeichnet.

5.6 Warum taucht in der Reaktionsgleichung der Photosynthese Wasser auf beiden Seiten der Gleichung auf?

In der Photolyse wird Wasser verbraucht (6H₂O auf der rechten Seite) und in der Dunkelreaktion entsteht wieder Wasser bei der Reduktion von 1,3-Diphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerinaldehyd (12H₂O auf der linken Seite).

5.7 Woher stammt der freigesetzte Sauerstoff und woher weiß man das?

Man markierte den Sauerstoff (¹⁸O) im eingesetzten Wasser, dessen Weg dann verfolgt werden konnte. Der markierte Sauerstoff wurde als O₂ in der Photolyse wieder freigesetzt.

5.8 In welchen Organismen findet man die einfachste Form der Photosynthese?

Die phototrophen Bakterien sind mehr oder weniger obligate Anaerobier, ihre Photosynthese liefert kein O₂, da ihnen eine dem PS II der Pflanzen entsprechende Pigmentgruppe fehlt. Sie können also kein H₂O als Elektronendonator für die Elektronentransportkette spalten.

Die phototrophen Bakterien repräsentieren einen phylogenetisch alten, primitiven Photosynthesetyp, der an eine O₂-arme Umwelt angepasst ist. Nach der Evolution des wasserspaltenden Photosyntheseapparats blieb er als Relikt in einigen ökologischen Nischen (z.B. anaerobe Zonen in stehenden Gewässern) erhalten.

6. Zusammenfassung

Bei diesem Versuch wird *in vitro* an Hand der Hill-Reaktion die Photolyse des Wassers und die Bildung von O_2 bei isolierten Chloroplasten (bei Vorhandensein eines geeigneten Elektronenakzeptors) untersucht.

Dabei beobachtet man in einer Messreihe die Veränderung der Extinktionswerte bzw. die Veränderung der Farbstoffmenge in 4 verschiedenen Lösungen (gekocht / ungekocht, belichtet / ungekocht, unbelichtet / mit Hemmstoff).

Literaturverzeichnis

- Campbell: **Biologie**, 2. korrigierter Nachdruck 2000, Spektrum Verlag
- Heldt, Hans-Walter: **Pflanzenbiochemie**, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, 1996
- Mohr, Schopfer: **Pflanzenphysiologie**, 4., völlig neubearbeitete und aktualisierte Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, 1992
- Nultsch: **Allgemeine Botanik**, 10. Auflage, 1996, Thieme Verlag
- Schopfer / Brennicke: **Pflanzenphysiologie**, 5. Auflage, 1999, Springer Verlag)
- **Skript** zum Grundpraktikum Pflanzenphysiologie und molekulare Botanik SS 2003
- Alte Protokolle